

Simone Seeböck BSc

Wirt-Pathogenbeziehung zwischen *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* und *Didymella bryoniae*- mit besonderem Augenmerk auf Freilanduntersuchungen und Arabinogalaktan-Protein Produktion im Rahmen der Abwehr gegen *Didymella bryoniae*

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Pflanzenwissenschaften

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuerin

Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Maria Müller

Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz

Graz, Mai 2016

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Herrn Dr. Herbert Huss möchte ich herzlichst danken, dass er mir die Möglichkeit der Durchführung der Freilandversuche an der Versuchsstation Lambach-Stadl-Paura des Instituts für biologische Landwirtschaft der HBLFA Raumberg-Gumpenstein gestellt hat und mich an seinem umfangreichen Wissen im Bereich der angewandten Phytopathologie teilhaben ließ.

Für die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung meiner Masterarbeit gilt natürlich auch ein besonderer Dank meiner Betreuerin Ao. Univ.-Prof. Dr. Maria Müller, die auch während der schwierigeren, langatmigen Phasen meiner Masterarbeit an der Umsetzung der Arbeit nie gezweifelt hat.

Ein Dank auch an all jene, die mich am Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Graz unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, meiner Familie, und insbesondere bei meinen Eltern Waltraud und Robert, die mich während meines gesamten Studiums tatkräftig unterstützt haben.

Meinem Freund Matthias möchte ich besonders für die emotionale Unterstützung und für die großen Mengen an Qi danken, die mir immer wieder neuen Schwung gaben.

Alles was gegen die Natur ist, hat auf die Dauer keinen Bestand.
Charles Darwin 1809 – 1882



Abbildung von: <http://www.diesaat.at/oelkuerbis-sorten-2016+2500+1473589>

Zusammenfassung

Der Steirische Ölkürbis zählt in der Steiermark zu den wichtigsten Nutzpflanzen (Landwirtschaftskammer Steiermark 2013), da aus seinen dünnchaligen Samen das wertvolle Steirische Kürbiskernöl gewonnen werden kann (Teppner 2000, Teppner 1982). Das Produkt Steirisches Kürbiskernöl, das auch als „Schwarzes Gold“ bezeichnet wird (Teppner 2004) ist zugleich Schmankerl (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011) und auch „Medizin“ (Steigmeier, Kreuter und Sontag 2001, Reiterer und Reiterer 1994), wodurch die Abnahme und die wirtschaftliche Bedeutsamkeit in den letzten Jahre stark zugenommen hat (http://www.foodscience.tugraz.at/ilct_old/pfannhauser/berichte.htm Stand 11.5.2016). Krankheiten, die den Steirischen Ölkürbis betreffen, gehören somit neben Umwelteinflüssen zu den gefährlichsten Kontrahenten im Ölkürbisanbau. *Didymella bryoniae* zählt seit 2004 in der Steiermark zu den gefürchtetsten Pathogenen des Steirischen Ölkürbisses (Huss 2011, Huss 2014). Der Ascomycet ist, neben der Gummistängelkrankheit, bei welcher durch eine Fäule der Stängel und Blattstiele der gesamte Vegetationskörper der Pflanzen absterben kann (Huss 2014a), auch der Verursacher der Fruchtfäule, bei welcher die Früchte am Feld komplett verfaulen (Zitter, Hopkins und Thomas 1996). Unter optimalen Bedingungen können Ertragseinbußen von bis zu 50 % erreicht werden (Huss 2014), wodurch *Didymella bryoniae* zu großen wirtschaftlichen Einbußen führen kann. Im Rahmen der Arbeit sollte anhand von Freilandversuchen unter Einbezug der Wetterbedingungen die Biologie des Pilzes, seine Eintrittspforten, sowie die Ausbreitung innerhalb der Pflanzen untersucht werden. Unter heißen und trockenen Wetterbedingungen kommen natürliche Eintrittspforten, sowie mechanische Verwundungen für *Didymella bryoniae* nur bedingt in Frage. Frühzeitige Ausbildung von Fruchtfäule und Gummistängelkrankheit blieben aus, wodurch wirtschaftliche Schäden durch Ernteaussfälle ausblieben. Insbesondere auch der von *Cucurbita pepo* induzierte Wundverschluss durch Arabinogalaktan-Proteine stellt eine Barriere für *Didymella bryoniae* da. Als problematisch fielen bei heißem, Sonnen-reichem Wetter jedoch sogenannte „Sonnenflecken“ auf den Früchten auf, die Infektionen mit *Didymella bryoniae* und anderen Pathogenen begünstigen könnten. Die Erforschung des Grundlagenwissens zur Biologie von *Didymella bryoniae* sollte einen Beitrag für potentielle nachfolgende angewandte Pathogen-Präventionsforschung liefern.

Abstract

The Styrian oil pumpkin is one of the most important crops in Styria (Landwirtschaftskammer Steiermark 2013), since its thin coated seeds are used to produce the Styrian pumpkin seed oil (Teppner 2000, Teppner 1982). This special oil, which is also known as "black gold" (Teppner 2004), is on the one hand a treat (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011), but on the other side also used as "medicine" (Steigmeier, Kreuter und Sonntag 2001, Reiterer und Reiterer 1994). Therefore, its economic importance increases annually (http://www.foodscience.tugraz.at/ilct_old/pfannhauser/berichte.htm Stand 11.5.2016). Diseases, which affect the Styrian Oil pumpkin, are therefore one of the most important rivals in pumpkin breeding and agriculture. Since 2004 *Didymella bryoniae* became one of the most feared pathogens for Styrian oil pumpkin farmers (Huss 2011, Huss 2014). *Didymella bryoniae* belongs to the phylum Ascomycota and is responsible for the gummy stem blight (Huss 2014a) as well as the fruit rot, also known as black rot (Zitter, Hopkins und Thomas 1996). Yield losses of up to 50 % due to *Didymella bryoniae* (Huss 2014) lead to large economic losses. This master thesis should be an approach for understanding the biology of *Didymella bryoniae*, both its entry points as well as its spreading within the plant. In field trials under hot and dry weather conditions, natural entry points and wounds could not be used for entrance. The production of arabinogalactan-proteins as a wound closure of *Cucurbita pepo* acted as a barrier for *Didymella bryoniae*. "Sunscalds" on fruits due to long sunny hours favored infections with *Didymella bryoniae* and other pathogens. Research into the basic knowledge of the biology of *Didymella bryoniae* should provide an input for potential subsequent applied pathogen prevention research.

1	Einleitung.....	11
1.1	Systematik und Charakteristik des Steirischen Ölkürbisses <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i>	11
1.2	Die Geschichte des Kürbisses.....	12
1.3	Zuchtziele und Sorten.....	14
1.4	Von der Frucht bis zum fertigen Kürbiskernöl.....	15
1.4.1	Die Ernte der Früchte.....	15
1.4.2	Verarbeitung der Kürbiskerne.....	16
1.4.3	Qualitätskontrolle des Steirischen Kürbiskernöls.....	17
1.5	Herkunftsschutz des steirischen Kürbiskernöls.....	17
1.6	Hauptanwendungen und Wirkungen des Steirischen Kürbiskernöls.....	19
1.7	Die wichtigsten Krankheitsbilder des Steirischen Ölkürbisses.....	20
1.7.1	Vektoren und Parasiten.....	20
1.7.2	Virale Erreger.....	21
1.7.3	Bakteriosen.....	21
1.7.4	Pilzliche Erreger.....	22
1.7.5	<i>Didymella bryoniae</i>	24
1.7.5.1	Systematik und Vorkommen.....	24
1.7.5.2	Morphologische Merkmale von <i>Didymella bryoniae</i>	25
1.7.5.3	<i>Didymella bryoniae</i> verursachte Krankheitsbilder des Steirischen Ölkürbisses.....	25
1.7.5.4	<i>Didymella bryoniae</i> als Auslöser der Blattdürre und Blattflecken.....	26
1.7.5.5	<i>Didymella bryonia</i> als Auslöser der Gummistängelkrankheit.....	26
1.7.5.6	<i>Didymella bryoniae</i> als Auslöser der Fruchtfäule.....	26
1.7.5.7	Ernteauffälle des Steirischen Ölkürbisses aufgrund von <i>Didymella bryoniae</i> in den vergangenen Jahren.....	27
1.7.5.8	Präventivmaßnahmen zur Verhinderung eines erhöhten Infektionsdruckes durch <i>Didymella bryoniae</i>	28
1.8	Arabinogalaktan-Proteine.....	28
1.8.1	Struktur und Vorkommen in der Pflanze.....	28
1.8.2	Funktionen der Arabinogalaktan-Proteine.....	29
1.9	Zielsetzung.....	30
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Kultivierung und Isolatauswahl von <i>Didymella bryoniae</i>	31
2.2	Kultivierungsversuch von <i>Didymella bryoniae</i> Isolat GL1.....	31
2.3	Optimierter Kultivierungsversuch von <i>Didymella bryoniae</i> Isolat GL1.....	31
2.4	Herstellung der <i>Didymella bryoniae</i> Konidiensuspension.....	31
2.5	Berechnung der Sporenanzahl mittels Zählkammer am Hämocytometer.....	32
2.6	Herstellung von Kryostocks für die Pilzkonservierung.....	32
2.7	Vorinokulationsversuch von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styrica</i> mit <i>Didymella bryoniae</i>	32

2.8	Hauptinokulation von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> für die physiologische Messreihe.....	33
2.9	Hauptinokulation von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> für die Herstellung mikroskopischer Totalpräparate	33
2.10	Hauptinokulationen von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> unter Freilandbedingungen	33
2.10.1	Inokulation der Blätter	34
2.10.2	Inokulation der Blattstiele und Stängel	34
2.10.3	Vergleich der Inokulation von mechanisch beschädigten Stängeln und unbeschädigten Stängeln	35
2.10.4	Inokulation der männlichen Blütenstiele	36
2.10.5	Inokulation der männlichen und weiblichen Blüten	36
2.10.6	Keimungsversuch der Samen nach Inokulation mit <i>Didymella bryoniae</i>	37
2.10.7	Inokulation der jungen Früchte	37
2.10.8	Inokulation der älteren Früchte ohne mechanische Verwundung/ nach mechanischer Verwundung.....	37
2.10.9	Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle	38
2.10.10	Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle	38
2.10.11	Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle	38
2.10.12	Inokulation der älteren Früchte ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, sowie ohne künstliche Verletzung.....	39
2.10.13	Inokulation der älteren Früchte-Vergleich Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation	40
2.11	Synthese des 1,3,5-tri-(p-β-d-glucosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene (β-D-glucosyl Yariv Reagenz)	40
2.12	Extraktion der Arabinogalaktanproteine (Kürbis)	41
2.13	Extraktion der Arabinogalaktanproteine (Efeu).....	42
2.14	Single Radial Diffusion Assay.....	42
2.15	Physiologische Messreihe.....	42
2.15.1	Photosynthese- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen	42
2.15.2	Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels Diaminobenzidin	43
2.15.3	Pigmentbestimmung mittels Photometrie	43
2.15.4	Bestimmung der Antioxidativen Kapazität mittels Photometrie	44
2.16	Mikroskopische Untersuchungen	44
2.16.1	Kratzpräparate.....	44
2.16.2	Quetschpräparate	44
2.16.3	Totalpräparate	44
2.16.4	Handschnitte	44
2.16.5	Gefriermikrotomie-Schnitte	44

2.16.6	Färbungen der mikroskopischen Schnitte	45
2.16.6.1	Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy	45
2.16.6.2	Methylenblau-Färbung	45
2.16.6.3	Färbung mit β -D-glucosyl Yariv Reagenz	45
2.17	Mikroskopische Aufnahmen	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Kultivierungsversuch von <i>Didymella bryoniae</i> Isolat GL1	46
3.2	Optimierter Kultivierungsversuch von <i>Didymella bryoniae</i> Isolat GL 1	46
3.3	Herstellung der <i>Didymella bryoniae</i> Konidiensuspension	46
3.4	Berechnung der Sporenanzahl mittels Zählkammer am Hämocytometer	46
3.5	Vorinokulationsversuche von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i>	46
3.6	Hauptinokulation von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> für die physiologische Messreihe	47
3.7	Hauptinokulation von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> für die Herstellung mikroskopischer Totalpräparate	47
3.8	Hauptinokulation von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i> unter Freiland-Bedingungen	47
3.8.1	Wetterdaten der Sommermonate Juli und August	47
3.8.2	Inokulation der Blätter	49
3.8.3	Inokulation der Blattstiele und Stängel	50
3.8.4	Vergleich der Inokulation von mechanisch beschädigten Stängeln und unbeschädigten Stängeln	54
3.8.5	Inokulation der männlichen Blütenstiele	55
3.8.6	Keimungsversuch der Samen nach Inokulation mit <i>Didymella bryoniae</i>	58
3.8.7	Inokulation der jungen Früchte	59
3.8.8	Inokulation ältere Früchte ohne mechanische Verwundung/mit mechanischer Verwundung	60
3.8.9	Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle	61
3.8.10	Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle	62
3.8.11	Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle	63
3.8.12	Inokulation der älteren Früchte ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, sowie ohne künstliche Verletzung	63
3.8.13	Inokulation der älteren Früchte-Vergleich Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation	64
3.9	Synthese Yariv Reagenz	65
3.10	Extraktion Arabinogalaktan-Protein (Kürbis)	65
3.11	Extraktion Arabinogalaktan-Protein (Efeu)	65
3.12	Quantifizierung Arabinogalaktan-Proteine mittels Single Radial Diffusion Assay	66
3.13	Physiologische Messreihe	68
3.13.1	Photosynthesemessung	68

3.13.2	Chlorophyllfluoreszenzmessungen (Photochemische Effizienz)	69
3.13.3	Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels Diaminobenzidin	69
3.13.4	Pigmentbestimmung mittels Photometrie	70
3.13.5	Bestimmung der Antioxidativen Kapazität mittels Photometrie	71
3.14	Mikroskopische Untersuchungen	73
3.14.1	Untersuchung der Morphologie von <i>Didymella bryoniae</i>	73
3.14.2	Mikroskopische Untersuchung: Vorinokulationsversuche von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i> mit <i>Didymella bryoniae</i>	73
3.14.3	Mikroskopie der Totalpräparate	74
3.14.4	Hyphenverlauf in der Frucht von <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>styriaca</i>	75
3.14.5	Mikroskopische Aufnahmen der β -D-glucosyl Yariv Reagenz gefärbten Schnitte des Fruchtfleisches	75
4	Diskussion	76
5	Tabellenverzeichnis	96
6	Abbildungsverzeichnis	98
7	Bildtafelverzeichnis	101
8	Literaturverzeichnis	108
9	Internetverzeichnis	114
10	Anhang	115

1 Einleitung

1.1 Systematik und Charakteristik des Steirischen Ölkürbisses *Cucurbita pepo* var. *styriaca*

Der Steirische Ölkürbis, der in der Botanik den Beeren angehört ist (Lieberei und Reisdorff 2012, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011), gehört zur Ordnung der Cucurbitales, in die Familie der Cucurbitaceae und zur Gattung *Cucurbita* (Strasburger 2008). Diese umfasst neben einigen wenigen Wildarten insgesamt fünf Speisekürbisarten: den Gartenkürbis (*C. pepo*), den Riesenkürbis (*C. maxima*), den Moschuskürbis (*C. moschata*), den Feigenblattkürbis (*C. ficifolia*) und die Ayote (*C. argyrosperma*= *C. mixta*) (Greibenšćikov 1950, Teppner 2005). Alle am Markt erhältlichen Sorten, so auch der Steirische Ölkürbis, entstanden durch Züchtungen aus den oben genannten Speisekürbisarten (Brancucci und Bränziger 2003).

Der Steirische Ölkürbis ist eine einjährige, krautig wachsende Pflanze (Kulmer und Weber 1990, Whitaker und Robinson 1986), welche durch die Ausbildung von spiraligen Ranken (Kulmer und Weber 1990) entweder als Kletterpflanze wächst oder am Boden dahin kriecht (Brancucci und Bränziger 2003). Bei Pflanzen, die am Boden liegen sind die Ranken meist eher kurz, während diese bei kletternden Pflanzen stärker entwickelt sind und beinahe ausnahmslos an allen Knoten zu finden sind (Zimmermann 1922). Die Stängel wurzeln häufig an den Nodi (Whitaker und Robinson 1986). Das Blätterdach der Pflanze kann eine Größe von bis zu 3 m² einnehmen (Brancucci und Bränziger 2003). Die Anordnung der Blätter erfolgt wechselständig (Zimmermann 1922, Whitaker und Robinson 1986). Die Blätter der Pflanze sind groß, an den Rändern häufig gezahnt und weisen eine herzähnliche bis ovale Form auf (Brancucci und Bränziger 2003, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Die Blattspreite ist mehr oder weniger stark gelappt (Zimmermann 1922, Teppner 2005) und stachelig behaart (Teppner 2005).

Die Pflanze ist einerseits als Flachwurzler im Boden verankert (Kulmer und Weber 1990) und verfügt andererseits über sichtbare sekundäre Wurzeln, die von den Knoten ausgehend in die Erde reichen. Diese dienen einer optimierten Nährstoffaufnahme im Zuge der Fruchtentwicklung (Brancucci und Bränziger 2003). Spross, Blatt- und Blütenstiele sind eckig und von einer unterschiedlich dichten, stacheligen Behaarung umgeben (Teppner 2005, Brancucci und Bränziger 2003, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011).

Beim Steirischen Ölkürbis handelt es sich um einen monözischen Pflanze (Schuster 1977, Whitaker und Robinson 1986), dessen Blüten eingeschlechtlich sind, wodurch der Kürbis auf entomophile Fremdbefruchter angewiesen ist. Eine Kürbisblüte ist sowohl bei Sonnenschein als auch an Regentagen nur einen Tag geöffnet, bevor sie verwelkt. Insbesondere die weiblichen Blüten, die nur einen kurzen Stielansatz besitzen, werden häufig vom Blätterdach verdeckt. Die männlichen, langstieligen Blüten hingegen ragen häufig über das Dach hinaus. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Blüten handelt es sich um fünfstrahlige, spitzzipfelige Trichterblüten mit einer sonnengelben Farbe. In der Regel beschränkt sich der Blütenstand in der Gattung *Cucurbita* auf eine männliche oder eine weibliche Blüte pro Blattachse (Teppner 2000, Schuster 1977). Die männlichen Blüten besitzen jeweils fünf Staubblätter, wobei zwei davon jeweils verwachsen sind und das fünfte frei vorliegt. Die fünf Filamente (Staubfäden) bilden eine zusammengewachsene Säule, welche den ringförmig verdickten, nektarabsondernden Blütenboden verdeckt und insgesamt ca. 15.000 Pollenkörner enthält (Hammer et al. 2002, Schuster 1977).

Die Gattung *Cucurbita* besitzt Pollen mit einer Größe von 120-200 µm im Durchmesser (Teppner 2004). Ebenso ist der Pollen des Steirischen Ölkürbisses groß, rund und besitzt eine stachelige Oberfläche (Brancucci und Bränziger 2003). Diese Oberfläche entsteht durch große, zylindrische und zahlreiche, dazwischenliegenden

winzigen Säulen-artigen Strukturen, welche zusammen die Sexine des Pollenkorns bilden (Teppner 2004). Der Pollen ist mit öligen Kittstoffen umgeben, um eine Haftung an Insekten zu erzielen (Hammer et al. 2002). Sowohl männliche als auch weibliche Blüten sondern Nektar ab (Whitaker und Robinson 1986). Die weibliche Blüte weist ein ringförmiges, nektarabgebendes Gewebe um den Griffel und den großen Narbenlappen auf (Hammer et al. 2002, Schuster 1977). Zwischen dem kurzen Blütenstiel und der weiblichen Blüte befindet sich bereits vor der Befruchtung ein kleiner kugelig Fruchtsatz (Teppner 2005, Brancucci und Bränziger 2003). Dieser unterständige Fruchtknoten weist bereits vor der Bestäubung die ungefähre Form der reifen Frucht auf (Teppner 2005). Beim Steirischen Ölkürbis (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) bzw. beim Gartenkürbis (*Cucurbita pepo*) liegen keine Spezialisierungen der Blüten vor, wodurch theoretisch eine Großzahl an Tieren als Bestäuber in Frage kämen (Hammer et al. 2002). In der Heimat des Kürbisses (Amerika) fungieren insbesondere spezialisierte Bienen der Gattungen *Xenoglossa* und *Peponapis* als Bestäuber (Teppner 2000). Beobachtungen zufolge werden die Blüten vor allem aufgrund des reichlichen Nektarangebots (Teppner 2000) hierzulande jedoch meist von Honigbienen oder Hummeln besucht. (Teppner 2000, Hammer et al. 2002, Brancucci und Bränziger 2003). Die Zaunrübe (*Bryonia* subsp.) hingegen, die neben der Spritzgurke das einzige europäische Kürbisgewächs ist, besitzt einen spezifischen Bestäuber, die Sandbienenart *Andrena florea* Fabr..

Die nach der Befruchtung der Ölkürbisblüten entstehenden Früchte sind rund (Teppner 2004), zunächst hellgrün dunkelgrün gestreift und jeweils oben und unten leicht abgeflacht. Im Bereich des Stielansatzes bilden sich grobe Falten (Brancucci und Bränziger 2003). Der Steirische Ölkürbis besitzt eine glatte Oberfläche (Brancucci und Bränziger 2003) und ist im reifen Stadium durch seine dunkelgelbe bis sattorange Farbe (Teppner 2004) mit dunkelgrünen Längsstreifen und einem kantigen, dunkelgrün bis hellgrün gestreiftem Fruchtstiel gekennzeichnet. Pro Pflanze entwickeln sich rund zehn Früchte mit einem Durchmesser von bis zu 50 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von drei bis fünf Kilogramm. Das fleischartige Fruchtfleisch ist im unreifen Zustand zunächst weiß und verfärbt sich in Folge des Reifeprozesses hellorange (Brancucci und Bränziger 2003, Teppner 2004). Im unreifen Zustand kann man den Übergang zwischen dem äußeren, dicht gepackten Fruchtfleisch und der inneren, losen Plazenta erkennen. Bei reifen Früchten hingegen ist sie abgestorben, wodurch die zahlreichen dunkelgrünen Samen in der saftfreien Fruchthöhle zu finden sind (Lieberei und Reisdorff 2012). Diese sind in etwa doppelt so lang wie breit, abgeflacht (Brancucci und Bränziger 2003, Steigmeier et al. 2001), spitzoval (Lieberei und Reisdorff 2012) und verfügen über eine, unterschiedlich stark ausgeprägte Randwulst (Teppner 2005). Die Samen sind dünnchalig, wodurch das Protochlorophyll im Chlorenchym der Testa (Samenschale) erkennbar ist (Teppner H. 1982, Teppner H. 2000). Dieses löst sich im Zuge des Pressvorgangs, wodurch das Öl seine charakteristische Farbe erhält. Aufgrund dieser Farbe wird das Kürbiskernöl auch als „Schwarzes Gold“ bezeichnet (Teppner 2004). Der Ölkürbis bevorzugt ein warmes Klima mit relativ hoher Luftfeuchtigkeit und wächst besonders gern auf gut durchlüfteten Böden, welche mindestens sechs Monate am Stück frostfrei sind (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, Whitaker und Robinson 1986).

1.2 Die Geschichte des Kürbisses

Entsprechend der Länge der Geschichte des Kürbisses, wurden der Frucht auch zahlreiche umgangssprachliche Bezeichnungen zugeschrieben. Im Volksmund ist er z.B. auch mit den Begriffen Dummkopf oder Ehebrecher bekannt. Die Bezeichnung Ehebrecher leitete sich vermutlich von der Tatsache ab, dass eine Frau nach Ehebruch im Zuge einer Schwangerschaft einen dicken Bauch bekam, welcher der Form eines Kürbisses ähnelte

(Brancucci und Bränziger 2003). Wirft man einen genauen Blick auf die allgemeine Geschichte des Kürbis, entdeckt man erste Dokumentationen über die Züchtung von Flaschenkürbissen (*Lagenaria siceraria*) bereits aus der Zeit der Antike. Die Flaschenkürbisse, die jedoch mit den Cucurbitaceen nicht verwandt sind, wurden in Europa bereits lange vor diesen als Nahrungsquelle verwendet (Teppner 2004, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Die Cucurbitaceen hingegen, die in der Neuen Welt beheimatet sind, kamen erst mit der Entdeckung Amerikas nach Europa (Teppner 1982). Zum Tribus Cucurbiteae gehören 13 Gattungen mit 110 Spezies, unter anderem auch die Gattung *Cucurbita* (Teppner 2004). Christoph Kolumbus vermerkte hierzu 1492 einen Eintrag in seinem Logbuch, der auf diese Speisekürbisse deutet (Teppner 2000). Es folgte eine rasche Ausbreitung in Europa (Teppner 1982), wodurch der Flaschenkürbis als Speisekürbis verdrängt wurde (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Während die ersten europäischen schriftlichen Aufzeichnungen von der Gattung *Cucurbita* aus den Jahren 1503-1508 stammen (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011), tauchten botanische Beschreibungen, sowie Zeichnungen von Cucurbitaceen in Kräuterbüchern von Fuchs erst in den Jahren 1542 und 1543 auf. Auch Fuchs bezeichnete jedoch mit *Cucurbita* bzw. Kürbis die heutige Gattung *Lagenaria* (Teppner 2000). In der Gattung *Cucurbita* hingegen, zu welcher neben einigen Wildarten fünf Speisekürbisarten zählen, schien in Europa insbesondere der Gartenkürbis (*Cucurbita pepo*) von großer Bedeutung zu sein (Brancucci und Bränziger 2003). Mit dem 16. Jahrhundert sind rasche Entwicklungen neuer Kultursorten von *Cucurbita pepo* dokumentiert, für welche Wildtypen von *C. pepo* subsp. *ovifera* aus den USA sowie *C. pepo* subsp. *fraterna* aus Mexiko als Vorfahren in Betrachtung gezogen werden (Teppner 2000). Teppner (2000) hingegen sieht *C. pepo* subsp. *gumala* aus Guatemala als einen weiteren potentiellen Vorfahren der Kultursorten von *C. pepo*.

Die Verwendung der Kürbisfrüchte als Nahrungsquelle schien zunächst insbesondere bei den Seefahrernationen eine Rolle zu spielen (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). 1546 tauchten anschließend Aufzeichnungen von Hieronymus Bock auf, die Angaben zur Verwendung von Kürbis beinhalten: das Fruchtfleisch könne man wie Äpfel oder Rüben kochen. Des Weiteren werden die Heilwirkungen der Kerne bei Blasenleiden erwähnt (Teppner 1999). Ebenso war Maria Theresia der Meinung, dass das wertvolle Öl nicht als gewöhnliche Speise dienen sollte, sondern in die Apotheke gehöre (Baldauf 2010 TC: 02:12).

Der älteste schriftliche Nachweis über die Verwendung von Kürbissen als Gemüse in der Steiermark stammt aus dem Jahr 1596. Die Verwertung von geschälten Kürbiskernsamen für die Produktion von Kürbiskernöl hingegen lässt sich erst auf das Jahr 1735 zurückführen (Teppner 2000).

Während insbesondere in der (West)-Steiermark die Kultivierung von Kürbissen und die Verwendung des Öls vermutlich keine Seltenheit war (Teppner 2004), schien jedoch eine generelle wirtschaftliche Bedeutsamkeit des Kürbisses bis zum zweiten Drittel des 18. Jahrhunderts nicht gegeben zu sein. Erst mit dem Erlass des kaiserlich königlichen Dekrets vom 6. Februar 1773 zur Verbreitung einer anonymen Druckschrift mit dem Titel „Kurzer Unterricht vom Anbaue, und nützlichen Gebrauche der Kürbise oder sogenannten Plüzer“ erhielt der Kürbisbau in der Steiermark seinen Aufschwung. Fachkreise vermuten, dass hinter der staatlichen Förderung des Anbaus der „Plüzer“ die Bekämpfung der Getreideknappheit stand (Teppner 1982, Teppner 2004). Diese Schrift beinhaltete sogar Anweisungen zur Kultivierung der Kürbisse in Monokultur. In der Steiermark spielte diese jedoch erst mit dem Ausbringen von Herbiziden in Bezug auf die Kultivierung von Mais eine Rolle. Davor wurde Kürbis stets als Zwischenfrucht mit Mais und Bohnen kultiviert (Teppner 2004).

Dokumentationen zur Kultivierung und zum Gebrauch des Steirischen Ölkürbis reichen ca. 200 Jahre zurück (Winkler 2000). Für die Produktion des Kürbiskernöls mussten die Kerne damals jedoch geschält werden, da die

Zellwände der vier äußeren Schichten der fünfschichtigen Samenschale stark verholzt waren. Eine Mutation sorgte anschließend für die Entstehung von dünnchaligen Samen, deren Samenschale im reifen Zustand aus drei nicht lignifizierten Schichten besteht (Teppner 2000, Teppner 1982). Genaue Angaben zum Datum bzw. zum Entstehungsort des genetisch rezessiven Merkmals „dünnchalig“ (Teppner 2000, Teppner 1982) sind nicht vorhanden (Teppner 2000), wobei man das Zeitintervall zwischen 1870 und 1880 für wahrscheinlich hält (Teppner 2000, Winkler 2000). Aufgrund verminderter Kosten und verringertem Arbeitsaufwand bei gleichbleibender Ölqualität kam es nach dem ersten Weltkrieg in der Steiermark zu einem Aufschwung in der Kultivierung dieser neuen Subspezies. Der Saatzeit Gleisdorf GmbH gelang es schließlich 1970 eine dünnchalige Kürbissubspezies mit dem Namen Gleisdorfer Ölkürbis zu registrieren (Winkler 2000).

1.3 Zuchtziele und Sorten

Die Züchtung von Kultursorten ermöglicht das Hervorbringen gewünschter Eigenschaften von Wildpflanzen, sowie eine Anpassung an die vorherrschenden Klima- und Kulturbedingungen (<http://www.saatzeitgleisdorf.at/> Stand 15.12.2015). Bei der Züchtung von Pflanzen unterscheidet man mehrere Formen: die klassische Selektionszüchtung (Vermehrung von Pflanzen mit positiven Merkmalen), die Heterosiszüchtung (Züchtung homozygoter Inzuchtlinien mit erhöhter Mehrleistung in der F1 Generation= Heterosis Effekt), die Mutationszüchtung (Änderung der Eigenschaften durch Einwirkung von Mutagenen, Auswahl von Mutationen mit positiven Effekten) und die Hybridzüchtung (homozygote Inzuchtlinien mit gewünschten Eigenschaften der Ausgangsinzuchtlinie). Die Züchtung verspricht das Erreichen eines oder mehrere Zuchtziele. Klassische Zuchtziele sind die Ertragssteigerung, die Qualitätsverbesserung und die Entwicklung von Toleranzen und Resistenzen gegen biotische und abiotische Faktoren. (<https://de.wikipedia.org/wiki/Pflanzenz%C3%BCchtung> Stand 15.12.2015).

Die Saatzeit Gleisdorf GmbH mit Firmensitz im Bezirk Weiz stellt im Bereich der Züchtung des Ölkürbisses eine wichtige Rolle dar. Die Zuchtziele betreffend des Steirischen Ölkürbisses beinhalten sowohl einen hohen Samenertrag und die Erhöhung des Samenanteils am Gesamtgewicht der Frucht, als auch eine gute Lösbarkeit der Samen vom Fruchtfleisch. Des Weiteren stehen die Züchtung von Linien mit großen, dickbauchigen Früchten und reduzierter Triebblänge (Buschtyp: für eine optimierte Kulturführung) im Vordergrund. Neben morphologischen Merkmalen steht auch die Verbesserung der Sameninhaltsstoffe. Entwicklung von Resistenzen gegen das Zucchinielbmosaikvirus, sowie gegenüber diversen Pilz- und Bakterienkrankheiten bilden ebenfalls einen Schwerpunkt. Parallel zu den konventionellen Zuchtzielen verfolgt die Saatzeit Gleisdorf seit 2003 die Selektion von Bio-Züchtungen mit erhöhter Konkurrenzkraft gegen Beikräuter (<http://www.saatzeitgleisdorf.at/> Stand 15.12.2015). Derzeit sind siebzehn verschiedenen Ölkürbissorten in der österreichischen Sortenliste eingetragen (siehe Abbildung 1) (<http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-sortenliste/> Stand 15.12.2015).

Beppo	(h, ub)
+ Camillo	(h, ub)
GL Classic	(f, ub)
GL Global	(h, ub)
GL Luna	(h, ub)
+ GL Maja	(h, ub)
GL Maximal	(h, ub)
GL Opal	(h, ub)
GL Oskar	(h, ub)
+ GL Planet	(h, ub)
GL Rustikal	(h, ub)
Gleisdorfer Diamant	(h, ub)
Gleisdorfer Express	(h, ub)
Gleisdorfer Ölkürbis	(f, ub)
Retzer Gold	(f, ub)
Sepp	(f, ub)
Wies 371	(f, ub)

Abbildung 1: eingetragene Ölkürbissorten der österreichischen Sortenliste 2015, f= freiabblühende Sorte, h= Hybridsorte, ub= unbeschalt, += Sorten, die erstmals angeführt sind (modifiziert von: <http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-sortenliste/> Stand 15.12.2015).

1.4 Von der Frucht bis zum fertigen Kürbiskernöl

Kürbisse bevorzugen lockere, nicht verdichtete Böden mit einem pH Wert zwischen 6 und 7. Warme, trockene Lagen und eine hohe Luftfeuchtigkeit begünstigen das Wachstum und die Reife der Früchte (<http://www.biofarm.ch/assets/files/Landwirtschaft/Merkblatt%20Bio-Oelkuerbis-Anbau.pdf> Stand 17.12.2015, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Prinzipiell gilt jedoch, dass Kürbisse dort gut wachsen, wo auch Mais und Wein gut gedeihen (<http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015). Der Anbau der Pflanzen findet meist zwischen April und Mai statt, wenn der Boden eine Mindesttemperatur von 10°C erreicht hat. Pro Hektar werden ca. 10.000 bis 15.000 Samen in einer Tiefe von 3 bis 5 cm ausgesät. Der Abstand zwischen den Pflanzen sowie zwischen den einzelnen Reihen steht in Abhängigkeit von der ausgewählten Sorte (<http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015). Die Anbaufläche in der Steiermark variierte zwischen den Jahren 2008 bis 2015 zwischen 10.000 und 15.000 Hektar (Landwirtschaftskammer Steiermark 2016), während sie Österreichweit auf ca. 25.000 Hektar geschätzt wird (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). In Abhängigkeit von der Region, sowie der Witterung schwanken die Hektarerträge zwischen 600 und 900 kg getrockneter Kerne (<http://www.landwirt.com/Oelkuerbis-Ernte-beginnt,,10665,,Bericht.html> Stand 17.12.2015) mit Spitzenerträgen bis zu 1000 kg (Landwirtschaftskammer Steiermark 2016). Die Früchte nehmen nach einer Reifezeit von durchschnittlich 55 Tagen die Größe von Fußbällen an (<http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015, <http://www.agrarheute.com/traction/news/kernige-steiermark> Stand 9.5.2016) und enthalten im Schnitt 400 Samen (Kürbiskerne) (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011).

1.4.1 Die Ernte der Früchte

Die Früchte werden im Spätsommer in den Monaten September und Oktober geerntet. Der genaue Zeitpunkt der Ernte ist ein heikler Punkt. Werden die Früchte zu früh geerntet wirkt sich dies negativ auf die Qualität des Kernöls aus. Wählen die Bauern den Erntezeitpunkt jedoch zu spät steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Früchte faulen (<http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015). Eine reife Frucht erkennt man an einem trockenen Stängel, der sich von der Frucht löst (<http://www.biofarm.ch/assets/files/Landwirtschaft/Merkblatt%20Bio-Oelkuerbis-Anbau.pdf> Stand 17.12.2015). Ebenso ist ein Großteil des Blätterdaches bereits abgestorben. Die Früchte selbst sind zum Zeitpunkt der Ernte

gelb verfärbt (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Die Ernte der Kürbiskerne wurde weit bis in das 20. Jahrhundert manuell und vorwiegend von den Frauen durchgeführt. Die Früchte wurden dafür entweder direkt am Feld mit einem Hackmesser halbiert oder zunächst eingesammelt und am Hof weiter verarbeitet. Die halbierten Früchte wurden von den Knien und einer Hand gehalten, während man mit der zweiten Hand die Kerne aus den einzelnen Kammern der Plazenta (innere, weiche und lose Fruchtfleischschicht) herausputzte (Lieberei und Reisdorff 2012, <https://de.wikipedia.org/wiki/K%C3%BCrbiskern%C3%B6l> Stand 15.12.2015). Mundartlich wurde der Erntevorgang auch als Kürbis-patzeln bezeichnet (Reiterer und Reiterer 1994). Die Samen wurden zur Trennung von den Fruchtfleischresten in Wasser gewaschen und anschließend getrocknet, wodurch sie lagerfähig werden (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Das zurückgebliebene Fruchtfleisch diente einerseits als Futter für Schweine (Teppner 2004) oder wurde mit den Pflanzenresten am Feld hinterlassen und später als Dünger untergepflügt (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, Teppner 2004, Reiterer und Reiterer 1994). Heute findet man kaum noch Betriebe, die eine händische Ernte der kostbaren Kerne durchführen. In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts setzte sich die maschinelle Ernte allmählich durch (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Aufgrund der hohen Anschaffungskosten der lediglich einmal im Jahr benötigten Maschinen schließen sich die Bauern häufig zu Genossenschaften zusammen und leihen sich die Maschinen aus (<http://www.meinbezirk.at/korneuburg/wirtschaft/75000-kg-kuerbiskerne-geerntet-und-getrocknet-d38708.html> Stand 17.12.2015). Zunächst werden die reifen Früchte mit einem Pflug (Rollmax) zu Reihen zusammengeschoben. Dieser Vorgang wird auch als „schwaden“ bezeichnet (<http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015). Anschließend werden die Früchte von einer Stachelwalze, die als Igel bezeichnet wird, aufgefasst und im Inneren der Maschine von Messern und Brecheisen in Stücke zerteilt. Die Siebtrommel trennt nun das Fruchtfleisch von den Kernen. Während die Fruchtfleischreste von der Maschine wieder auf das Feld befördert werden, gelangen die Kerne über eine Schnecke in einen Auffangbehälter. (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, <http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015).

1.4.2 Verarbeitung der Kürbiskerne

Beim Steirischen Kürbiskernöl wird die Ernte nicht auf einmal gepresst, sondern über das ganze Jahr hindurch. Um das zu ermöglichen müssen die geernteten Kerne lagerfähig gemacht werden. Nach der Ernte werden die Kerne dafür in Trommelsieben mit Wasser gewaschen (Kulmer und Weber 1990, <http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015). Der Kern, der einen Feuchtigkeitsgehalt von 50 bis 60% aufweist, muss mittels Sonneneinstrahlung, im Backofen oder in Trocknungsanlagen bei 60°C bei einer mittleren Dauer von zwölf Stunden auf einen Endfeuchtigkeitsgehalt von 6 bis 8% getrocknet werden. Während erstere Methoden für die Tagesmenge der Kerne, die bei einer händischen Ernte anfallen, vollkommen geeignet sind, verlangen die großen Mengen der maschinellen Ernte spezielle Trocknungsanlagen (Rossrucker 1992, Kulmer und Weber 1990). Während des Trocknungsvorgangs werden die Kerne per Hand oder mittels maschinellem Rührwerk gewendet, um den Vorgang der Trocknung zu beschleunigen (<http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Die Kerne sind trocken, wenn sie bei der Brechprobe brechen anstatt sich zu dehnen (<http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015). Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Kerne in einem luftdichten Raum gelagert, um eine Aufnahme von Fremdgerüchen, die den Geschmack des Öles verändern würden, zu verhindern (<http://www.kernoel.at/wissen/produktion.html> Stand

17.12.2015). Für die Produktion des Steirischen Kürbiskernöls müssen die Kerne zunächst gemahlen und anschließend mit Wasser und etwas Salz zu einem Brei verrührt werden (Kulmer und Weber 1990, [https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl Gewinnung Stand 17.12.2015](https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl%20Gewinnung%20Stand%2017.12.2015)). Für einen Liter Kürbiskernöl werden ungefähr 2,5 bis 3 kg Kürbiskerne bzw. 30 bis 40 Kürbisse benötigt (Landwirtschaftskammer Steiermark 2016). Während des Röstvorgangs, bei dem das zuvor zugesetzte Wasser bei ca. 100°C wieder verdampft wird (Baldauf 2010 TC: 11:33), kommt es zum Aufschließen des Öles (Trennung von Eiweiß und Fett). Ist der Röstvorgang beendet, kann die Masse gepresst werden (Kulmer und Weber 1990, [https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl Gewinnung Stand 17.12.2015](https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl%20Gewinnung%20Stand%2017.12.2015)). Traditionell wurde die geröstete Masse, die man auch als Ölkuchen bezeichnet, in der sogenannten Steirischen Ölkuh, einer speziellen Holzvorrichtung gepresst. Um genügend Druck für das Aufeinanderpressen zweier Holzeinsätze herzustellen, wurde ein Holzkeil zwischen die Vorrichtungen eingeschlagen. Daher spricht man auch vom Öl ausschlagen (Teppner 2000, [https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl Gewinnung Stand 17.12.2015](https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl%20Gewinnung%20Stand%2017.12.2015)). Der Name der Ölkuh leitete sich von dem herunter rinnenden Öl ab, dass an den Melkvorgang einer Kuh erinnerte (Baldauf 2010 TC: 17:39). Erst im 19. Jahrhundert entstanden die ersten hydraulischen Pressen, welche das heutige Ausmaß der Kürbiskernölherstellung erst möglich machten. Der Ölkuchen wird in den Zylinderpressen bei einem Druck von ca. 300 bis 350 bar kalt ausgepresst ([https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl Gewinnung Stand 17.12.2015](https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl%20Gewinnung%20Stand%2017.12.2015), Brancucci und Bränziger 2003, Kulmer und Weber 1990). Das gewonnene Öl bedarf zum Absetzen der Schwebestoffe in etwa zehn Tage bevor es in dunklen Flaschen abgefüllt werden kann (Reiterer und Reiterer 1994, <http://www.kernoel.at/wissen/produktion.html> Stand 17.12.2015). Die Rückstände, die als Presskuchen bezeichnet werden, dienen den Tieren häufig als Futter (Reiterer und Reiterer 1994).

1.4.3 Qualitätskontrolle des Steirischen Kürbiskernöls

Eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale beim Steirischen Kürbiskernöl ist das Farbenspiel. Das Öl weist eine dunkelgrüne Farbe auf, die es der Einlagerung von Chlorophyll in die dünne Schale bzw. Häutchen des Kerns verdankt. Dieser Farbstoff wird während des Pressvorgangs vom Öl gebunden. Ein weiteres Pigment, das in den Kernen enthalten ist, ist das Carotin. Seine orange-rötliche Farbe verleiht dem Steirischen Kürbiskernöl im durchfallenden Licht einen rötlichen Schimmer (<http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015, Teppner 2004). Neben diesem Farbenspiel, das lediglich dem Steirischen Kürbiskernöl vorbehalten ist, wird der Geschmack des Steirischen Kürbiskernöls von einer Prüfungskommission beurteilt (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011).

1.5 Herkunftsschutz des steirischen Kürbiskernöls

In der EU existieren insgesamt vier Lebensmittelgütesiegel:

- Bio
- Geschützte geografische Angabe (g.g.A) → Verbindung zwischen mindestens einer der Produktionsstufen (Erzeugung, Verarbeitung, Herstellung) und dem Herkunftsgebiet, oder Erzeugnis mit besonderem Ansehen

- Geschützte Ursprungsbezeichnung (g.U) → Erzeugung, Verarbeitung und Herstellung eines Produkts eines bestimmten geographischen Gebiets müssen nach einem festgelegtem Verfahren durchgeführt werden
- Garantiert traditionelle Spezialität (g.t.S)

(Reithmayer 2011)

Neben einigen anderen Schmankerln, wie z.B. der Wachauer Marille, dem Tiroler Speck oder dem Steirischen Kren, steht auch das steirische Kürbiskernöl unter dem Schutz der Europäischen Union. Laut der Verordnung (EG) 510/2006 zum Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen für Agrarerzeugnisse und Lebensmittel dürfen regionale Lebensmittel weder nachgemacht noch gefälscht werden (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, Reithmayer 2011). Gekennzeichnet wird der Herkunftsschutz mit der Markierung „g.g.A.“. Dies steht für geschützte, geografische Angabe und setzt folgende Ansprüche voraus:

- „gesicherte Herkunft der Kürbiskerne aus einem geografisch definierten Gebiet in Österreich“
- „Kürbiskernöl hergestellt in heimischen Ölmühlen“
- „100% reines Kürbiskernöl aus Erstpressung“ (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, <http://www.kuerbiskernoelshop.com/EU-Herkunftsschutz> Stand 2.10.2015)

Des Weiteren ist im EU-Register festgehalten, dass eine schonende Erwärmung der gemahlten Kerne unumgänglich für die Bezeichnung von „Steirischem Kürbiskernöl“ ist (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Laut Landwirtschaftskammer Steiermark (2013) stellt die Aufnahme von Traditionslebensmitteln in den EU-Herkunftsschutzregister einerseits eine der löblichsten Auszeichnungen dar, benötigt jedoch andererseits große Ausdauer während des nationalen und EU weiten Antragsverfahren. Die Bauern stehen jedoch während der laufenden Antragsverfahren, sowie auch nach der Antragsgenehmigung nicht alleine da. Produzenten und Erzeugerorganisationen werden durch die Landwirtschaftskammer sowohl organisatorisch, fachlich und rechtlich bei Neuansuchen, Behördengängen, Umsetzung, Mahnungen, sowie auch bei der Information der Kunden etc. beraten (Landwirtschaftskammer Steiermark 2013). Das Steirische Kürbiskernöl, das bereits seit 1996 als geschützte geografische Angabe im EU-Register aufscheint, zählt somit nicht nur zu den bekanntesten österreichischen Schmankerln sondern auch zu den am längsten unter Schutz stehenden Produkten der Steiermark. Neben dem Steirischen Kürbiskernöl schaffte es der Steirische Kren g.g.A. 2008 in den EU-Register, während Qualitätsprodukte wie die Steirische Käferbohne, die Pöllauer Hirschbirne, das Sulmtaler Huhn oder der Ennstaler Steirerkas sich noch im Antragsstadium befinden (Landwirtschaftskammer Steiermark 2013, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Für eine eindeutige Erkennung des Steirischen Kürbiskernöls wurde die Banderole (siehe Abbildung 2B) ins Leben gerufen. Sie weist einerseits das offizielle Symbol für „geschützte geographische Angabe“ auf und ist andererseits mittels Kontrollnummer und Mengenangabe versehen. Mit Banderole gekennzeichnete Falschen versichern dem Kunden, dass es sich um ein, von einer unabhängigen, staatlich befugten Stelle geprüfetes Kernöls handelt (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, <http://www.kuerbiskernoelshop.com/EU-Herkunftsschutz> Stand 2.10.2015). Insgesamt 2000 Landwirte und Ölmüller gehören der Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. an. Zu ihren Aufgaben gehören neben der Aufrechterhaltung der Qualitätsstandards des Steirischen Kürbiskernöls g.g.A. auch das Aufspüren von Produktfälschungen (Baldauf 2010 TC: 05:56). Die geografisch definierten Anbaugebiete (siehe Abbildung 2A) für die Herstellung von Steirischem Kürbiskernöl g.g.A. beschränken sich

auf die südliche Steiermark mit den Bezirken Deutschlandsberg, Graz, Graz-Umgebung, Hartberg-Fürstenfeld, Leibnitz, Südoststeiermark (=ehemalige Bezirke Radkersburg und Feldbach), Voitsberg und Weiz, das südliche Burgenland mit den Bezirken Jennersdorf, Güssing und Oberwart, sowie Teile Niederösterreichs mit den Bezirken Hollabrunn, Horn, Mistelbach, Melk, Gänserndorf (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Zistersdorf), und Korneuburg-Stockerau (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Stockerau) (Verordnung (EU) Nr. 1151/2012). Ebenso darf der Vorgang der Pressung nur in der Steiermark, sowie im Südburgenland durchgeführt werden, wobei nur Öl aus Erstpressung (100% rein) die Banderole erhält (Reithmayer 2011).

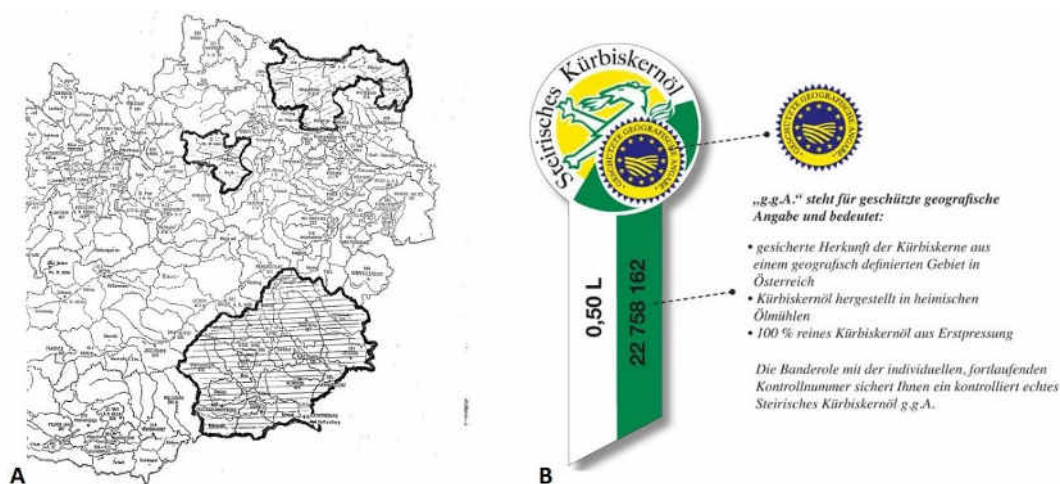


Abbildung 2: A: Geografisch definierte Anbauggebiete des Steirischen Kürbiskernöls g.g.A.. Die Gebiete sind mit schwarzer Linie dick umrandet und betreffen die südliche Steiermark mit den Bezirken Deutschlandsberg, Graz, Graz-Umgebung, Hartberg-Fürstenfeld, Leibnitz, Südoststeiermark, Voitsberg und Weiz, das südliche Burgenland mit den Bezirken Jennersdorf, Güssing und Oberwart, sowie Teile Niederösterreichs mit den Bezirken Hollabrunn, Horn, Mistelbach, Melk, Gänserndorf (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Zistersdorf), und Korneuburg-Stockerau (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Stockerau) (Verordnung (EU) Nr. 1151/2012). B: Die Banderole des Steirischen Kürbiskernöls mit offiziellem Symbol „g.g.A.“ für geschützt geografische Angabe, sowie der fortlaufenden Kontrollnummer und der Mengenangabe in Liter. (<http://www.kuerbiskernoelshop.com/EU-Herkunftsschutz> Stand 2.10.2015)

1.6 Hauptanwendungen und Wirkungen des Steirischen Kürbiskernöls

Beim Steirischen Kürbiskernöl handelt es sich um ein naturbelassenes Produkt, welches gänzlich ohne chemische Zusätze produziert und abgefüllt wird. Nach dem österreichischen Lebensmittelcodex dürfen Naturprodukte nur durch „mechanische oder physikalische Prozesse“ gewonnen werden und „keine sonstigen Zutaten“ beinhalten (<http://members.aon.at/gkwald/gesund.htm> Stand 15.12.2015, Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Neben dem nussigen Aroma (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl 2011) beinhaltet das Steirische Kürbiskernöl unter anderem auch das fettlösliche Vitamin E (Kulmer und Weber 1990), welches für Zellmembranen, Hormonhaushalt und Blutbildung eine wichtige Rolle spielt und als Radikalfänger auch an Entgiftungsprozessen teilhat. Daneben wurden auch geringe Mengen an wasserlöslicher Antioxidantien im Steirischen Kürbiskernöl entdeckt (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl 2011). Mit mehr als 80% ungesättigter Fettsäuren (unter anderem auch Linol- und Linolensäure (Ardabili et al. 2011, Kerschbaum und Schweiger 2001) die vom Körper selbst nicht gebildet werden können (Löw 2003)) zählt das Steirische Kürbiskernöl zu den besonders hochwertigen, cholesterinfreien Ölen und wird aufgrund seiner Inhaltsstoffe und seines Fettsäuremusters als vorbeugende Maßnahme gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen angesehen. (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011, <http://members.aon.at/gkwald/gesund.htm> Stand

15.12.2015). Neben der Hauptanwendung des Steirischen Kürbiskernöls in der Kulinarik kommt es auch in der Medizin zunehmend zum Einsatz pflanzlicher Heilmittel wie z.B. der Kürbiskernsamen in Zusammenhang mit der benignen Prostatahyperplasie (gutartige Prostatavergrößerung) (Steigmeier et al. 2001, Reiterer und Reiterer 1994). Aufgrund des hohen Anteils an Delta-7-Sterolen in den Kürbiskernsamen wirken diese sowohl entzündungshemmend als auch entwässernd und tragen zu einer Normalisierung prostatistischer Stoffwechselfparameter bei (http://www.pharma-networx.de/vdl/asp/17_prostatbehandl.asp?user=105 Stand 15.12.2015; <http://members.aon.at/gkowald/gesund.htm> Stand 15.12.2015). Die positiven Effekte der Kürbiskernsamen und des steirischen Kürbiskernöls auf benigne Prostatahyperplasie und diverse damit verbundene Blasenleiden sowie die genaue Wirkung der Delta-7-Sterole sind jedoch größtenteils noch nicht bekannt. Fachkreise vermuten ein Zusammenspiel verschiedenster Inhaltsstoffe (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011). Weitere wohltuende Inhaltsstoffe sind Carotinoide, Spurenelemente, Mineralstoffe, Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und diverse Aromastoffe. Neben dem ausgezeichneten Geschmack, den vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten in der Kulinarik und den positiven Auswirkungen einzelner Inhaltsstoffe auf die Gesundheit des Menschen, hat sich das Steirische Kürbiskernöl mittlerweile auch im Wellness und Schönheitsbereich etabliert. In der steirischen Thermenregion findet das wertvolle Öl Anwendung in der magischen 8-Kürbisölmassage (http://www.thermen.at/therme-41/therme-bad-waltersdorf_beauty-wellness.htm Stand 9.5.2016). Eine Massage mit dem Öl soll eine entspannende, entschlackende, sowie Haut-pflegende Wirkung haben und verdauungsfördernd sein (Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. 2011).

1.7 Die wichtigsten Krankheitsbilder des Steirischen Ölkürbisses

1.7.1 Vektoren und Parasiten

Einen der wichtigsten Vektoren von Phytopathogenen am Steirischen Ölkürbis stellt die Saatfliege *Delia* subsp. dar, welche ihre Eier auf keimenden Kürbispflanzen ablegt. Insbesondere bei kühler Witterung kann häufig ein vermehrter Saatfliegenbefall auftreten. Problematisch sind dabei die frisch geschlüpften Larven, die sich hauptsächlich von auf der Blattoberfläche lebenden Bakterien ernähren, jedoch auch das Blattgewebe anfressen (<http://www.ages.at/themen/schaderreger/saatenfliegen/> Stand 13.1.2016, Huss 2014b). Die frischen Wunden stellen eine natürliche Eintrittspforte für bakterielle, virale und fungale Phytopathogene dar (Hallmann et al. 2007). Neben den *Delia* subsp. nehmen vor allem auch die Blattläuse eine wichtige Funktion als Vektoren viraler Erreger, wie z.B. des Zucchini gelbmosaikvirus, ein (Huss 2011a, Huss 2014b). Sowohl die schwarzen Blattläuse (*Aphis fabae*), als auch die weiße Fliege (*Allyrodina*), können jedoch zusätzlich zur Übertragung von Phytopathogenen durch das Anstechen der Blätter und Ansaugen des Saftes Schäden am Blätterdach verursachen. Wurzelblattläuse (*Pemphigus*) hingegen sorgen vor allem für Probleme an der Basis der Pflanzen (Brancucci und Bränziger 2003). Laut Huss und Christian (2008) kann auch der sogenannte Gartenkugelspringer (*Bourletiella hortensis*) zu Schäden am Blätterdach führen. Diese Art der Springschwänze frisst mit ihren scharfen Schneidezähnen kleine Grübchen in die Ober- und Unterseite insbesondere der Keimblätter, aber auch der ersten Folgeblätter. Verherende Folgen für die Pflanze bleiben jedoch meist aus, da ältere Blätter von einem Befall nicht betroffen sind (Huss und Christian 2008). Des Weiteren können auch Nacktschnecken, sowie Feldhase und Feldmäuse insbesondere für Jungpflanzen eine große Gefahr darstellen. Während Nacktschnecken und Feldhasen es vor allem auf das Grün der Pflanzen abgesehen haben, können Feldmäuse in seltenen Fällen

durch das Anknabbern und Aushöhlen der Früchte von der Unterseite große Schäden anrichten (Brancucci und Bränziger 2003).

1.7.2 Virale Erreger

Als viraler Erreger erlangte vor allem das Zucchiniigelbmosaikvirus große Bedeutung, welches im Jahre 1997 zu einem epidemieartigen Auftreten bei Ölkürbis, Melonen, Gurken, Zucchini und Speisekürbissen in Österreich führte (Huss und Winkler 2009, Huss 2011a). Beim Zucchiniigelbmosaikvirus, das seit 1981 als Virus anerkannt ist, handelt es sich um ein single-strand RNA Potyvirus, welches hauptsächlich über Blattläuse oder mechanisch übertragen wird (Zitter et al. 1996). Beim Ölkürbis sind vor allem die Blätter von der Infektion betroffen. Typische Symptome sind oft dunkelgrüne, blasenartig aufgewölbte Blattpartien (Huss und Winkler 2009, Zitter et al. 1996) und steif aufrecht stehende Blätter (Huss 2011a). Die Blätter bleiben häufig klein und deformiert (Zitter et al. 1996). Auf größeren Blättern hingegen sind mosaikartige Flecken (Müller et al. 2006), Adernaufhellungen und Adernbänderungen die Regel. Die Ränder der Blätter können sich nach oben einrollen. Im fortgeschrittenen Stadium der Infektion sind große Teile der Blätter vergilbt und nekrotisch (Huss und Winkler 2009). Schäden an den Früchten zeigen sich vor allem durch Deformierungen (Müller et al. 2006) und verlangsamtes Wachstum (Huss und Winkler 2009). Häufig ist mit der Infektion eine Reduktion der Samenproduktion verbunden, wobei die Samen teilweise auch deformiert sein können (Zitter et al. 1996). Maßnahmen gegen das Virus können einerseits in der Bekämpfung der Vektoren liegen oder durch Züchtung von resistenten Sorten erworben werden. Diese sind jedoch häufig Stamm-spezifisch, wodurch der Ausbruch der Krankheit aufgrund anderer Pathotypen des Virus nicht unterbunden werden kann (Zitter et al. 1996). Weitere Viren, die beim Ölkürbis eine Rolle spielen, sind das Wassermelonenmosaikvirus II sowie das Gurkenmosaikvirus. Beide treten häufig mit dem Zucchiniigelbmosaikvirus als Mischinfektion auf (Müller et al. 2006, Huss und Winkler 2009), wodurch es häufig schwierig ist den ursächlichen krankheitsauslösenden Erreger zu ermitteln (Zitter et al. 1996).

1.7.3 Bakteriosen

Neben Insekten und viralen Erregern spielen auch verschiedenste Bakterien eine Rolle im Kürbisanbau. Die wichtigsten bakteriellen Erreger beim Ölkürbis sind *Pectobacterium* [=Erwinia] *carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium* [=Erwinia] *carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *Pseudomonas syringae* und *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Huss 2014b, Zitter et al. 1996)

Insbesondere die beiden nah verwandten Stämme *Pectobacterium* [=Erwinia] *carotovorum* subsp. *carotovorum* und *Pectobacterium* [=Erwinia] *carotovorum* subsp. *atrosepticum* zählen in Zusammenhang mit *Didymella bryoniae* zu den gefürchtetsten Erregern im Kürbisanbau. Es handelt sich dabei um Gram-negative, stäbchenförmige, fakultativ aerobe Weichfäule-erregende Bakterien, die vor allem bei Kohlgemüse, Salaten, Karotten und Kartoffeln bekannt sind (Huss et al. 2009, Huss 2014b). Laut Huss et al. (2009) traten bei den Kürbisgewächsen insbesondere bei der Gurke größere Schäden auf. Voraussetzungen für eine Infektion sind einerseits feuchtes Wetter im Juli, andererseits das Vorhandensein von Eintrittspforten. Dabei kann es sich um Verletzungen der jungen Früchte oder um pilzliche Infektionsstellen handeln. Insbesondere *Didymella bryoniae* kann hier als Vektor fungieren (Grube et al. 2011, Huss et al. 2009, Huss 2011b). Infektionsquellen können sowohl verseuchte Böden, sowie übrig gebliebene befallene Kürbisreste sein. Ausgehend von diesen Resten sorgen z.B. Fliegen für eine Verbreitung der bakteriellen Erreger (Huss et al. 2009). Im Anfangsstadium der

Infektion weist die Schale der Kürbisfrüchte einen wassergetränkten Eindruck auf (Zitter et al. 1996). Ansonsten können im Vergleich zur *Didymella bryoniae* ausgelöster Fruchtfäule keine äußerlichen Symptome festgestellt werden. Die Bakterien verursachen durch ihre Fähigkeit des Pektinabbaus eine Auflösung der Zellverbände des pflanzlichen Gewebes, wodurch es in weiterer Folge zu einer Zersetzung des Fruchtfleisches kommt. Aufgrund des Stabilitätsverlustes der Frucht kann die Fruchtwand bereits durch geringen Fingerdruck durchbrochen werden. Im Endstadium der Infektion sackt die gesamte Frucht in sich zusammen. Der Fruchtstiel ist häufig nur mehr lose oder gar nicht mit der Frucht verbunden. Die Frucht stößt einen säuerlich, mehligem Geruch aus, der sich in späterer Folge durch sekundäre Ansiedelung saprophytischer Bakterien zum typischen Fäulnisgeruch wandelt (Huss et al. 2009, Huss 2014b)

Unter den Pseudomonaden spielt vor allem *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* als Erreger der eckigen Blattfleckenkrankheit eine wichtige Rolle im Kürbisbau. Die Bakterien sind samenbürtig oder können in infizierten, alten Pflanzenresten im Boden überwintern. Als Eintrittspforten dienen sowohl Verletzungen als auch Stomata und Hydathoden. Typische Symptome sind zunächst durchscheinende, unregelmäßige Flecken auf den Blättern, die sich mit der Zeit braun verfärben und zu den Blattadern hin eine eckige Abgrenzung bilden. Die einzelnen Blattflecken können ineinander zusammenfließen (<http://www.ages.at/en/topics/harmful-organisms/eckige-blattfleckenkrankheit-der-kuerbisgewaechse/> Stand 30.9.2015). Ältere Blattflecken brechen häufig aus, wodurch das befallene Blatt ein löchriges Aussehen erhält (Huss 2014b). Typischerweise bildet sich bei ausreichender Feuchtigkeit auf der Blattunterseite Bakterienschleim, der während anhaltender Trockenheit eine weiße Kruste bildet. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den infizierten Stängeln (<http://www.ages.at/en/topics/harmful-organisms/eckige-blattfleckenkrankheit-der-kuerbisgewaechse/> Stand 30.9.2015). Neben *Pseudomonas syringae* trat mit *Pseudomonas viridiflava* laut Huss und Mavridis (2007) ein weiterer bakterieller Erreger beim Ölkürbis auf. Das Bakterium löst eine Blattfleckenkrankheit aus, die mit Vergilbungen und Nekrotisierungen der Blätter einhergeht. Die Blattflecken sind zunächst relativ klein und eckig, können jedoch zu größeren Flecken zusammenfließen. Ebenso charakteristisch ist der Austritt eines wässrig, milchigen Exsudats auf der Blattunterseite nach Zugabe von Wasser (Huss und Mavridis 2007). Ein weiterer Erreger bakterieller Krankheiten an Kürbisgewächsen ist *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*. Dabei handelt es sich um ein Gram-negatives, samenbürtiges Bakterium. Im Gegensatz zu *Pseudomonas syringae* bleiben, die durch *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* hervorgerufenen Blattflecken eher kleiner und weisen durchwegs stärkere Vergilbungen an den Rändern der Flecken auf. Die nekrotischen Stellen brechen jedoch nicht aus dem Gewebe aus. Auf den Früchten bilden sich zu Beginn kleine, ölig umrundete Flecken. Bei stärkerem Befall der Früchte kann ein korkig, rissiges Bild der Fruchtwand entstehen (http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Cucurbitae/Cucurbitae_Xanthomonas_campestris_pv_cucurbitae/ Stand 30.9.2015, Huss 2014b).

1.7.4 Pilzliche Erreger

Zu den wichtigsten pilzlichen Krankheitserregern am steirischen Ölkürbis zählen neben *Didymella bryoniae*, der in weiterer Folge noch genauer beschrieben wird, *Phytophthora capsici* (Zitter et al. 1996), *Fusarium* subsp. (Zitter et al. 1996), *Sclerotinia sclerotiorum* (Babadoost und Zitter 2009) und *Pseudoperonospora cubensis* (Huss 2014b). Während erstere von größerer Bedeutung sind, sind Infektionen mit *Sclerotinia sclerotiorum* und *Pseudoperonospora cubensis* eher seltener bzw. sorgen im Falle von *Pseudoperonospora cubensis* bei Ölkürbis für keine großen Probleme (Huss 2014b).

Die Fusarien Fruchtfäule hingegen zählt zu den häufigsten Pre- und Post-Ernte Erkrankungen von Kürbissen (Babadoost und Zitter 2009). Bei Fusarien handelt es sich um Vertreter der vaskulären Welkepilze (Agrios 1988) und bodenbewohnende Erreger der Frucht- und Kronenfäule an Kürbisgewächsen. Die Symptomatik der Fruchtfäule variiert in Abhängigkeit vom vorliegenden Stadium der Läsionen und kann somit von kleinen, verkorkten Flecken auf der Epidermis bis hin zu größeren, eingesunkenen, mit weißem bis grauen Mycel überzogenen Flächen reichen. Bei der Kronenfäule hingegen welken die Blätter, wodurch die Pflanze innerhalb weniger Tage abstirbt. Ebenso zeigen die oberen Anteile der Pfahlwurzeln eindeutige Anzeichen nekrotischer Fäule. *F. solani* ist bei ausreichend feucht/nassem Wetter zu einer direkten Penetration der Frucht fähig (Babadoost und Zitter 2009). Da es sich um bodenbewohnende Arten handelt, erfolgt eine Infektion meist über Kontakt der Frucht mit dem Boden oder über Verwundung des Wirts (Department of Crop Sciences 2012). Samenbürtigkeit ist mitunter bei *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* bekannt. Eine Vermehrung von *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* erfolgt hauptsächlich über seine anamorphe Form (Ausbildung asexueller Sporentypen: Mikrokonidien, Makrokonidien und bewegliche Chlamydosporen). Bei Vorhandensein von passenden Paarungstypen kann auch ein sexuelles Stadium gebildet werden. Dabei kommt es zur Ausbildung von weißen bis orangen Perithezien mit insgesamt acht zweizelligen Ascosporen pro Ascus. Vorbeugende Maßnahmen können einerseits das Einhalten einer dreijährigen Fruchtfolge, andererseits vorsichtige Handhabung zur Verhinderung von Verwundung der Früchte während der Ernte, Verpackung und Lagerung sein (Babadoost und Zitter 2009).

Phytophthora capsici, der Erreger der Phytophthora Fäule (Phytophthora blight) ist ein Vertreter der Oomyceten und befällt über 50 Spezies 15 verschiedener Pflanzenfamilien. Zu den wichtigsten Wirten zählen neben dem Pfeffer (*Capsicum annuum*), an welchem der Krankheitserreger erstmals entdeckt wurde, Melonen, Kürbisse und diverse Gartenkürbisarten (*Cucurbita pepo* var.). Sein weltweites Vorkommen in temperierten, subtropischen und tropischen Kürbisangebieten führt zu Infektionen der Früchte, Blätter und Ranken. Da das Pathogen bodenbürtig ist, entwickelt sich die Fruchtfäule ausgehend von den, am Boden aufliegenden Stellen bzw. durch Kontakt der Frucht mit anderen bereits infizierten Pflanzenteilen. Für die Ausbreitung des Pathogens auf die Oberseite der Früchte spielen vor allem auftreffende Regentropfen eine wichtige Rolle. Erste Symptome einer Erkrankung sind Wasser-getränkte Läsionen, die sich im Laufe der Infektion ausbreiten. Die Frucht wird mit einem weißen Hyphengeflecht überzogen. Zahlreiche asexuelle Sporangien mit biflagellaten Zoosporen können auf den infizierten Früchten gefunden werden. Die Sporangien können einerseits keimen und direkt eine Infektion des Wirtsgewebes hervorrufen oder andererseits Zoosporen entlassen, welche ihrerseits eine Infektion setzen können. *Phytophthora capsici* überdauert als sexuelle Oospore im Boden oder als Mycel in Pflanzenresten (Babadoost und Zitter 2009).

Im Unterschied zu *Didymella bryoniae*, der einen sehr engen Wirtskreis besitzt, verfügt *Sclerotinia sclerotiorum* unter den Kulturpflanzen einen sehr breiten Wirtskreis. Laut Boland und Hall (1994) ist *Sclerotinia sclerotiorum* in der Lage 408 Pflanzenarten aus insgesamt 75 Pflanzenfamilien zu befallen. Da der Pilz insbesondere an Sonnenblumen und Raps erhebliche Schäden hervorrufen kann, ist der Anbau von Kürbis in der Nähe dieser Kulturarten eher zu vermeiden. Ähnlich wie bei einem Befall mit Fusarien kann *Sclerotinia sclerotiorum* sowohl zur Pre- als auch Post-Ernte-Fruchtfäule führen. Ein eindeutiges Identifizierungsmerkmal einer *Sclerotinia sclerotiorum* Infektion ist das Vorhandensein von Sklerotien, mit welchen der Pilz einerseits im Boden bis zu drei Jahren überdauern kann und welche ihm andererseits im Frühjahr als Ausgangspunkt für eine neue Infektion dienen. Zu Beginn der Infektion bildet sich zunächst ein weißes, flaumartiges Mycel um die wassergetränkte

Infektionsstelle, während sich in weiterer Folge im Inneren der Stängel bzw. der Früchte neue Sklerotien ausbilden (Department of Crop Sciences 2012, Huss 2014b).

1.7.5 *Didymella bryoniae*

1.7.5.1 Systematik und Vorkommen

Didymella bryoniae (Auersw.)Rhem (syn. *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & J. C. Walker) ist ein Vertreter der Abteilung der Ascomycota und gehört zu den echten Schlauchpilzen (Pezizomycotina) (<http://www.hortipendium.de/Gummist%C3%A4ngelkrankheit> Stand 22.2.2016), in die Klasse der Dothideomycetes zur Ordnung der Pleosporales. Der Pilz wird in die Familie der Didymellaceae (Aveskamp et al. 2010, <http://www.pilze-deutschland.de/organismen/didymella-bryoniae-fuckel-rehm> Stand 9.5.2016) zur Gattung *Didymella* eingeteilt (Keinath 2011). *Didymella bryoniae* wurde in Deutschland 1869 unabhängig voneinander von Bernhard Auerswald und Karl Fuckel erstmals an einem wild wachsenden Kürbisgewächs (Zaunrübe oder *Bryonia* subsp.) entdeckt. Der Pilz wurde anschließend von den beiden Forschern unterschiedlichen Gattungen zugeordnet. Den Artnamen „*bryoniae*“ wählten sie jedoch den Grundregeln der systematischen Einteilung entsprechend nach dem Gattungsnamen des pflanzlichen Wirtes. Die Gattung *Didymella* wurde jedoch erst 1880 von Pier Andrea Saccardo ins Leben gerufen. 1891 wurde *D. bryoniae* auf Kürbis (*Cucumis sativus* L.) in New York, auf Kürbis in Frankreich und auf Wassermelone in Delaware entdeckt. Da lediglich Pyknidien gefunden wurden wählten die Forscher als Gattungsnamen Namen Anamorpher Pilze *Phyllosticta cucurbitacearum* Sacc., *Ascochyta cucumis* Fautr. & Roum. und *Phyllosticta citrullina* (Keinath 2011). Die heutige Bezeichnung der Anamorphen Form von *Didymella bryoniae* *Phoma cucurbitacearum* leitet sich wahrscheinlich von einem *Didymella bryoniae* Fund von Elias Fries 1823 ab. Er nannte den Pilz *Sphaeria cucurbitacearum*. Der Gattungsname *Sphaeria* wurde damals von Mykologen für Pilze verwendet, die Pyknidien als asexuelle Fruchtkörper oder Perithezien als sexuelle Fruchtkörper ausbildeten. In der Annahme, dass Fries somit Pyknidien entdeckt hat, übernahm Saccardo den Spezies Beinamen als Basis für den Namen der Anamorphe *Phoma cucurbitacearum*. Basierend auf molekularen Analysen postulierten Aveskamp et al. (2010) aufgrund einer Teilung der *Phoma* Spezies einen neuen Namen für *Phoma cucurbitacearum*: *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Keinath 2011, <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> Stand 2.3.2016, Farr und Rossmann 2010). Einige Jahrzehnte vergingen bis ein Zusammenhang zwischen *Didymella bryoniae* und seiner asexuellen Form gesehen wurde (Keinath 2011). Am Ende des 19. Jahrhunderts stellte der Pilz in Frankreich und Italien erstmals Probleme an den Kulturpflanzen Wassermelone und Gurke dar (Zitter et al. 1996, Huss 2011c, Huss 2014b). Heute zählt *Didymella bryoniae* laut Huss et al. (2007) zu den weltweit verbreiteten Pilzen, der sowohl in den tropischen, subtropischen sowie auch temperaten Regionen der Erde als Verursacher von Krankheiten an Cucurbitaceen Bekanntheit erlangte. Optimale Wachstumsbedingungen des Pilzes liegen bei 24°C, wobei Wachstum des Pilzes zwischen 12 und 32°C dokumentiert sind (Zitter et al. 1996). Der Pilz wurde mittlerweile auf sechs Kontinenten, bei mindestens zwölf Gattungen und 23 Arten der Cucurbitaceen gefunden (Keinath 2011). Zu den gängigsten Wirten zählen *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita* sp. wie z.B. *C. maxima*, *C. pepo* oder *C. moschata*, aber auch *Lagenaria vulgaris*, *Momordica charantia*, *Luffa cylindrica* und *Bryonia alba* (Farr und Rossmann 2010). In Österreich blieb *Didymella bryoniae* aufgrund ausbleibender schwerwiegender Schäden lange Zeit unbeachtet. Aufmerksam wurde man erstmals im Rahmen von Infektionen von Glashaus- und Folientunnelkulturen bei Gurken. Eine ausreichend weite Fruchtfolge verhinderte jedoch ernstzunehmende

Ernteauffälle durch *Didymella bryoniae*, wodurch der Pilz eher in „Vergessenheit“ geriet. In der Steiermark sorgte *Didymella bryoniae* 2004 erstmals für starke Ernteauffälle beim steirischen Ölkürbis und konnte seither regelmäßig nachgewiesen werden (Huss 2011c, Huss 2014b).

1.7.5.2 Morphologische Merkmale von *Didymella bryoniae*

Allgemein unterscheidet man bei Pilzen zwischen zwei Fruchtkörpertypen: bei den asexuellen Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* handelt es sich um dunkelbraune bis schwarze Pyknidien. Mit einer Größe von 120 bis 180 µm sind die kugeligen, bräunlichen bis schwarzen Fruchtkörper im Laufe der Vegetationsperiode auf sämtlichen oberirdischen Pflanzenorganen zu finden (Zitter et al. 1996, Huss 2007). Sie beinhalten laut Huss (2014b) zahlreiche, in Schleim eingebettete asexuelle Sporen (Pyknosporen), die großteils einzellig, in seltenen Fällen auch zweizellig sind. Die hyalinen, länglich-zylindrischen Sporen besitzen eine ungefähre Größe von 6-13 µm x 3,3 (± 0,36) µm (Zitter et al. 1996, Huss 2014b). Eine Verbreitung der Pyknosporen erfolgt über den Regen. Bei feuchtem Wetter quillt der, die Sporen umgebende Schleim, wodurch die Sporen in laichenartigen Schnüren aus dem Fruchtkörper heraus geschoben werden. Durch auftreffenden Regentropfen werden die asexuellen Sporen am Feld verbreitet (Huss 2011c, Ferreira und Boley 1992).

Neben den asexuellen Fruchtkörper bildet *Didymella bryoniae* auch eine sexuelle Fruchtkörperform. Die Teleomorphe des Pilzes tritt prinzipiell jedoch seltener auf als seine Anamorphe Form *Phoma cucurbitacearum* (Huss 2011a, Keinath 2011). Bei den, in der Teleomorphe gebildeten Fruchtkörpern, handelt es sich um dunkle Pseudothecien, die sich mit einer ungefähren Größe von 125 bis 213 µm (Zitter et al. 1996) nicht wesentlich von der Größe der Pyknidien unterscheiden. Die Pseudothecien konnte bis jetzt auf Blättern, Stängeln und Ranken, jedoch nicht auf den Früchten entdeckt werden (Huss 2011c, Huss 2014b).

Die in den Hauptfruchtkörpern enthaltenen Sporen werden in bitunicaten Asci gebildet (Zitter et al. 1996). Pro Ascus werden acht transparente Ascosporen gebildet (Zitter et al. 1996), welche zwei-zellig bzw. monoseptiert sind (Huss 2011c, Huss 2014b, Zitter et al. 1996). Im Bereich des Septums ist die Ascospore etwas nach innen eingeschnürt (Zitter et al. 1996). Die obere Zelle der Ascospore ist meist breiter als die untere Zelle (Keinath 2013b). Die Sporen weisen eine Größe von 14-18 x 4-6 µm auf (Zitter et al. 1996).

Aufgrund dieser Merkmale sind die Ascosporen eindeutig von den asexuellen Pyknosporen unterscheidbar. Eine Ausbreitung der sexuellen Sporen erfolgt über aktives Ausschleudern aus den Asci und anschließende Verbreitung mittels Wind (Sudisha et al. 2006, Huss 2014b). Dabei zerbricht vor dem Abschuss der Sporen die starre äußere Wand des bitunicaten Ascus, wodurch sich die innere dehnbare Wandschicht streckt und die Sporen durch einen winzigen, ringartigen Apikalapparat abschießt (Henssen und Jahns 1974, Scheuer 2014). Die Ascosporen dienen dem Pilz somit auch als Ausbreitungsmöglichkeit über größere Distanzen (Huss 2014b).

1.7.5.3 *Didymella bryoniae* verursachte Krankheitsbilder des Steirischen Ölkürbisses

Laut Huss (2011a) galt der steirische Ölkürbis in Bezug auf vorkommende Krankheiten vor ca. 20 Jahren noch als gesunde Kulturart. Neben dem Befall mit Mehltau, der jedoch wirtschaftlich zu keinen schwerwiegenden Ausfällen führte, kannte man keine ernstzunehmenden Krankheitserreger. Ein epidemisches Auftreten des Zucchiniigelbmosaikvirus im Jahre 1997 änderte dieses Bild. Seither treten neben viralen Erkrankungen immer mehr Bakteriosen und Pilzinfektionen auf (Huss 2011a).

1.7.5.4 *Didymella bryoniae* als Auslöser der Blattdürre und Blattflecken

Insbesondere seit 2004 zieht ein neuer Schaderreger die gesamte Aufmerksamkeit auf sich. Der Pilz *Didymella bryoniae*, der vor allem in den Tropen und Subtropen beheimatet ist und bereits lange Zeit zuvor als wichtiger Krankheitserreger an Melonen bekannt war, eroberte 2004 erstmals Freilandkulturen des steirischen Ölkürbisses in massivem Ausmaß (Huss 2011a) und trat seitdem regelmäßig in Kürbisfeldern auf (Huss 2014b).

Ernteaufschläge aufgrund von Fruchtfäule sind großteils *Didymella bryoniae* zuzuschreiben (Huss 2011a). Laut Huss (2011a) ist die durch *Didymella bryoniae* hervorgerufene Fruchtfäule jedoch nicht das einzige Problem das durch den Schadpilz auftreten kann. Neben der Fruchtfäule sorgt der Pilz für das Auftreten von Blattflecken und das Erscheinungsbild der Blattdürre. Während erstere zwar häufig beobachtet werden können, schädigen sie die Pflanzen im geringeren Ausmaß. Bei einer Blatinfektion mit *Didymella bryoniae* kommt es zum Absterben des Blattgewebes, wodurch das Blatt zunächst vergilbt und sich ein zelliges Blattfleckenmuster abzeichnet (Huss 2011a, Huss 2014b). Innerhalb der Blattflecken können sowohl asexuelle, als auch sexuelle Fruchtkörper auftreten (Huss 2007). Da es sich bei *Didymella bryoniae* um einen nekrotrophen Pilz handelt, bilden sich die Fruchtkörper zunächst im Zentrum bzw. in den älteren Teilen der Läsionen aus (Keinath 2011). Keinath (2011) beschreibt eine mittlere Anzahl von Fruchtkörpern pro Quadratzentimeter Blattläsion von 222 ± 58 und 579 ± 58 , wobei es keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kürbis Spezies gab. Die Blattflecken können sowohl vom Blattrand her auftreten, als auch auf der Blattspreite entstehen (Huss 2014b). Die Blätter werden entweder direkt über die Cuticula oder durch interzelluläre Räume an der Basis von Trichomen penetriert (Zitter et al. 1996).

Die Blattdürre hingegen ist das Endprodukt einer mangelhaften Wasserzufuhr (Huss 2011c). Durch die Infektion des Blattstieles kommt es zu einer Fäulnis des Stieles meist oberhalb der Stielmitte und folglich zum Abknicken des befallenen Stieles (Huss 2011c). In diesem Bereich entwickeln sich zahlreiche schwarze, ins Gewebe eingesenkte meist asexuelle Fruchtkörper des Pilzes (Huss 2007). Der *Didymella bryoniae* Befall der Blattstiele endet in einer Zerstörung des Gewebes, wodurch der Stängelabschnitt zunächst eine wässrige Braunverfärbung aufweist und anschließend kollabiert (Huss 2007). Aufgrund des Fäulnisprozesses in den Gefäßbündeln kommt es zu einer Unterbindung der Wasserzufuhr (Huss 2011c). Die daraus resultierende wirtschaftlich gravierende Blatttrockenheit bzw. Blattdürre ist die Folge. (Huss 2011c). Die Infektion der Blattstiele betrifft scheinbar zuerst ältere Blattstiele und setzt sich auf die nächst jüngeren fort (Huss 2011a).

1.7.5.5 *Didymella bryonia* als Auslöser der Gummistängelkrankheit

Ein ähnliches Bild zeigt sich infolge einer *Didymella bryoniae* Infektion der Stängel. Die Stängel verlieren aufgrund des Fäulnisprozesses ihre Festigkeit, werden gummiartig weich und bleichen aus. Die Beschädigung der Gefäßbündel aufgrund der Fäulnis resultiert in einer verminderten Wasserzufuhr. Diese Symptome werden auch unter dem Namen Gummistängelkrankheit zusammengefasst und treten meist an der Stängelbasis auf. Fruchtkörper können im Bereich der Gummistängel auftreten, werden jedoch seltener beobachtet (Huss 2014a). Die Penetration der Stängel erfolgt laut Zitter et al. (1996) über Wunden an den Stängeln.

1.7.5.6 *Didymella bryoniae* als Auslöser der Fruchtfäule

Neben Blättern, Blattstielen und Stängeln wird auch die Frucht von *Didymella bryoniae* befallen. Die sogenannte Fruchtfäule oder auch Schwarzfäule bzw. „black rot“ (Huss 2014b) genannte Erkrankung der Früchte kann einerseits bereits junge Früchte betreffen, tritt jedoch deutlich verstärkt bei älteren Früchten während

fortgeschrittener Vegetationsdauer auf (Huss et al. 2009). Hohe Ertragsausfälle aufgrund von Fruchtfäule setzten feuchtes Wetter während des Sporenflugs und Sporenkeimung voraus. Ein feuchter Juli ist somit ausschlaggebender als feuchtes Herbstwetter (Huss 2014b). Laut Huss (2014b) kann es unter optimalen Bedingungen zu Ertragsausfällen von 50% kommen. Als möglichen Infektionsweg fasst Huss (2014b) einerseits die Fruchtwand, andererseits auch die weibliche Blüte ins Auge. Zitter et al. (1996) geben Wunden oder in der Zeit der Bestäubung die Narbe als potentielle Penetrationsstellen an. An der Gurke (*Cucumis sativus*) entdeckte Neergaard (1989b) einen möglichen Infektionsweg von *Didymella bryoniae*. Neergaard (1989b) konnte zeigen, dass die Infektionshyphe durch Narbe und Griffel wächst und dem Weg des Pollenschlauches folgt. Das Wachstum erfolgt zunächst interzellulär, jedoch kommt es scheinbar rasch zu einer intrazellulären Ausbreitung von *Didymella bryoniae*. Des Weiteren beschrieb Neergaard (1989b) ein Eindringen des Pilzes über das Nektarium bzw. nektarialen Poren.

Symptome der Fruchtfäule sind hellbraune, mit der Zeit größer werdende Flecken, innerhalb welcher sich die Kürbiswand im fortgeschrittenen Stadium der Fäulnis schwarz verfärbt (Huss und Pucher 2007). Bei genaueren Untersuchungen kann man im Bereich der schwarzen Flecken punktförmige asexuelle Fruchtkörper (Pyknidien) erkennen (Huss 2014b, Huss 2011c). Häufig sind diese in konzentrischen Ringen angeordnet, wobei die jüngeren, in der Peripherie liegenden Fruchtkörper bräunlich sind, während sich die älteren, im Zentrum liegenden Pyknidien bereits schwarz verfärbt haben (Huss et al. 2007). Von der Fruchtfäule befallene Früchte sacken laut Huss et al. (2007) beim Erreichen dieses Stadiums aufgrund des Stabilitätsverlustes in sich zusammen. Weitere beobachtete Symptome sind kleine, meist grün gesäumte, runde Flecken, in welchen ebenso Pyknidien beobachtet werden können. Jedoch werden diese im Zuge der Abwehr der Pflanze mit Hilfe eines Geweberinges umschlossen, wodurch die Pflanze eine Ausbreitung des Erregers in benachbartes gesundes Gewebe verhindert. Diese Symptome können vor allem bei Spätinfektionen beobachtet werden (Huss 2011c, Huss 2014b) Vereinzelt konnte am Ölkürbis auch das Phänomen des „Gummiflusses“ dokumentiert werden. Dabei kommt es laut Huss (2014b) zum Austreten von gummiartigen bis harzigen Substanzen im Bereich der Infektion.

1.7.5.7 Ernteausfälle des Steirischen Ölkürbisses aufgrund von *Didymella bryoniae* in den vergangenen Jahren

Laut Huss (2014b) lagen 2008, aufgrund eines überdurchschnittlich regenreichen Julis und eher trockenem August und September, hohe Ernteausfälle aufgrund von Fäulnis (ausgelöst durch *Didymella* und *Erwinia*) vor. Die Landwirtschaftskammer Steiermark (2013) verzeichnete 2008 ca. 20 % gefaulte Kürbisse. Ebenso konnten im Rahmen von Blüteninfektionsversuchen an der Versuchsstation Lambach/Stadl-Paura 19,4 % gefaulte Früchte nachgewiesen werden (Huss 2014b). Untersuchungen der AGES am Versuchsstandort Knocking bei Pöchlarn in Niederösterreich führten im Jahr 2008 beim Gleisdorfer Ölkürbis zu 27 % gefaulten Früchten (Huss et al. 2009). Zwei Jahre danach (2010) zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Nach einem ungewöhnlich trockenem Juli und feuchtem Wetter im August betrug der Fäulnis-Ausfall lediglich 2% (Huss 2014b). Untersuchungen der Ernteausfälle aufgrund von Fruchtfäule zwischen den Jahren 2010 und 2013 zeigten Schwankungen von 3 bis 30% (siehe Tabelle 1) (<http://www.versuchsreferat.com/presse.html> Stand 2.3.2016). Unter optimalen Bedingungen für *Didymella bryoniae* kann es jedoch auch zu Ertragsausfällen von bis zu 50% kommen (Huss 2014b).

Tabelle 1: Anzahl der gefaulten Früchte [%] der Jahre 2010-2013. Die Anzahl der gefaulten Früchte der einzelnen Sorten wurden gemittelt. Die untersuchten Sorten waren Diamant, Gleisdorfer Ölkürbis, Beppo, Global, Opal, Rustikal (2010). Die Einzelwerte der unterschiedlichen Sorten (2010: Beppo 42,79 % gefault, Diamant 16, 81% gefault) schwanken jedoch enorm (<http://www.versuchsreferat.com/presse.html> Stand 2.3.2016).

Jahr	Gefaulte Früchte in %
2010	28,67
2010, 2011+*	20,67
2012**	6,35
2013***	3,49

+Mittelwert der gefaulten Früchte aus den Jahren 2010 und 2011

*ohne Diamant

**ohne Diamant, mit Classic und Maximal

*** ohne Dimant und Gleisdorfer Ölkürbis, mit Classic, Luna und Maximal

1.7.5.8 Präventivmaßnahmen zur Verhinderung eines erhöhten Infektionsdruckes durch *Didymella bryoniae*

Da der Pilz feuchtes Klima für die Ausbreitung und Keimung der Sporen benötigt, sollten feuchte Lagen wie z.B. Nebel- und Dunstreiche Talsenken, in welchen sich die Feuchtigkeit relativ lange in den Tag hinein hält prinzipiell vermieden werden (Huss 2011c, Zitter et al. 1996). Des Weiteren sind gewisse Regionen in der Steiermark ungünstig, da windverbreitete Ascosporen von *Didymella bryoniae* bei einer hohen Kürbisbaudichte eine größere Gefahr für die Verbreitung des Erregers darstellen (Huss und Pucher 2007, Huss 2014b). Da *Didymella bryoniae* insbesondere auch auf zurückbleibenden Pflanzenresten, wie z.B. nicht eingearbeitetes Kürbissstroh, überwintern kann, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko aufgrund verfrühter Entstehung von Hauptfruchtkörpern. Ebenso zeigte sich, dass *Didymella bryoniae* als Mycel in Kürbissstroh im Boden bis zu zwei Jahren überdauern kann (Huss 2011c, <http://aquaponik-forum.de/attachment.php?aid=507> Stand 9.5.2016). Zur Verhinderung eines erhöhten Infektionsdruckes sind somit das Einhalten einer drei-jährige Fruchtfolge (Keinath 2002, Zitter et al. 1996) sowie Maßnahmen zum raschen Abbau von Kürbissstroh im Boden zu bevorzugen (Huss 2011c).

1.8 Arabinogalaktan-Proteine

1.8.1 Struktur und Vorkommen in der Pflanze

Arabinogalaktan-Proteine (AGPs) gehören zu den Glykoproteinen, die man in drei Klassen einteilen kann. Prolin-reiche nicht glykosylierte bzw. gering glykosylierte Proteine (PRPs), moderat glykosylierte Extensine (Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine, HRGPs) und stark glykosylierte Arabinogalaktan-Proteine (AGPs) (Richter 1998). AGPs können sowohl in der Zellwand (Richter 1998), in der Plasmamembran (Ellis et al. 2010), in Sekreten (bsp. Oberfläche der Narbe (Clarke et al. 1979) und Wundexsudaten (Ellis et al. 2010, Seifert und Roberts 2007)) und im apoplastischen Raum (Ellis et al. 2010) gefunden werden. Des Weiteren vermuten Borner et al. (2005) ein Vorhandensein von AGPs in Cholesterin-reichen Bereichen der Zellmembran (Lipid rafts). Die AGPs können mit Hilfe eines synthetisch hergestellten Farbstoffs (β -D-glucosyl Yariv Reagenz) detektiert werden (Yariv et al. 1962). Bis Datum ist jedoch der genaue Mechanismus der Bindung nicht bekannt, wobei die Anwesenheit der Kohlehydratketten, als auch des Proteingerüsts essentiell zu scheinen sein (Ellis et al. 2010).

sich dabei um einen allgemeinen Abwehrmechanismus im Rahmen einer, durch Verwundung oder Pathogenbefall ausgelösten Stressantwort (Kovacs 2002). Laut Clarke et al. (1979) vermuten Wissenschaftler in der Wasser-rückhaltenden Eigenschaft der Gummi-Exsudate eine Isolierende Funktion bei Pathogen infiziertem Gewebe. Diese isolierende Funktion würde einerseits die Ausbreitung des Pathogens verhindern und andererseits den Feuchtigkeitsverlust des beschädigten Gewebes reduzieren. Ob es sich bei dem Phänomen des Gummiflusses nun um pflanzliche Stoffwechselprodukte des Sekundärmetabolismus handelt oder ob diese Ergebnisse von nekrotischem Gewebe sind, bleibt jedoch ungeklärt. Ihre Eigenschaft der Rückhaltung von Wasser scheint jedoch auch in anderen Bereichen, wie z.B. in der Frost Toleranz oder Trockenheitsresistenz gewisser Pflanzen von essentieller Bedeutung zu sein. Trockenstress führt so beispielsweise bei manchen Algen zur Ausbildung von Gelschichten, die die Zellen umhüllen. Weitere Eigenschaften, die auf potentielle Funktionen hinweisen könnten, sind Haftfähigkeit und Assoziationsfähigkeit mit anderen Makromolekülen. Aufgrund des Nachweises der Assoziation von AGs mit Pektinen und deren Vorkommen in der Mittellamelle vermutet man in Wissenschaftskreisen, dass den AGs der Mittellamelle eine mögliche Funktion als Haft- bzw. Verbindungselementen zugrunde liegt. AGPs konnten auch an der Protoplastenoberfläche, sowie an der Schnittstelle zwischen Zellmembran und Zellwand festgestellt werden, was auf eine Assoziation mit der Membran und einen eventuellen Schutz vor Austrocknung deuten könnte. Eine weitere Rolle könnten die AGP-Bestandteile des klebrigen Narbenoberflächensekrets in der Anhaftung der Pollen an der Narbenoberfläche spielen (Clarke et al. 1979). Des Weiteren scheinen AGPs eine wichtige Funktion im Wachstum der Zelle bzw. der Zellteilung zu spielen. Laut Serpe und Nothnagel (1994) kommt es durch eine Bindung der AGPs mit dem β -D-glucosyl Yariv Phenylglycosid zu einer Wachstumsinhibition der Zellen, während durch Zugabe von α -D-galactosyl oder β -D-mannosyl Yariv Reagenz, die keine Bindung mit den AGPs eingehen, keine Wachstumsinhibition festgestellt werden können. Neben den Auswirkungen der AGPs auf die Zellteilung postulieren Hengel und Roberts (2002) anhand der *mur1* Arabidopsis Mutante eine Funktion der AGPs im Längenwachstum der Zelle.

1.9 Zielsetzung

Im Rahmen der Arbeit wurden Untersuchungen der Wirt-Pathogen-Beziehung zwischen *Didymella bryoniae* und dem, in der Steiermark wirtschaftlich wichtigen Steirischen Ölkürbisses durchgeführt. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag dabei in Freilanduntersuchungen der Wirt-Pathogen-Interaktion an der, zu Raumberg-Gumpenstein angehörigen, Außenstation Lambach/Stadl Paura. Das Ziel der Freilanduntersuchungen beinhaltete die Erstellung eines Felddesigns für die Analyse der Wirt-Pathogen-Beziehung, sowie unterschiedliche Inokulationsansätze zur Untersuchung der Eintrittspforten und Ausbreitungswege von *Didymella bryoniae* im Steirischen Ölkürbis und dessen vegetativen Pflanzenteilen. Die Auswirkungen der Infektionen sollten unter den vorherrschenden Wetterbedingungen (mit Stütze von meteorologischen Daten der Wetterstation Kremsmünster) dokumentiert und interpretiert werden. Die Anwesenheit des Pilzes in infiziertem Gewebe sollte mikroskopisch diagnostiziert werden. Schwerpunkte der Arbeit im Labor wurden in den Bereichen Physiologie und Mikroskopie gesetzt. Im Rahmen einer physiologischen Messreihe sollten die Auswirkungen einer Pilzinfektion vor allem auf den essentiellen Bereich des Photosyntheseapparats studiert werden.

2 Material und Methoden

Mit Ausnahme der Freilanduntersuchungen wurden alle Versuche unter Laborbedingungen am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführt. Die Freilanduntersuchungen hingegen fanden an der Versuchsstation Lambach-Stadl-Paura (Institut für biologische Landwirtschaft der HBLFA Raumberg-Gumpenstein) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Herbert Huss statt. Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich (wenn nicht anders deklariert) um Institutchemikalien in p.a. Qualität der Firmen Roth, Sigma-Aldrich oder Merck.

2.1 Kultivierung und Isolatauswahl von *Didymella bryoniae*

Es wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen experimentell getestet, um optimierte Kultivierungsbedingungen für die Herstellung von infektiösem Sporenmateriale zu erhalten. Parallel wurden dafür drei verschiedene *Didymella bryoniae* (*D. bryoniae*) Isolate kultiviert. Die Isolate GL1, SP2 und A-220-2b stammten aus dem Stammkulturdepot der Technischen Universität Graz und waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Dr. Gabriele Berg vom Institut für Umweltbiotechnologie. Die Isolate wurden wie im „Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL1“ beschrieben gezogen. Aufgrund des unterschiedlichen Wachstums der Isolate wurde das Isolat GL1 für die weiteren Kultivierungs- und anschließenden Inokulationsversuche ausgewählt.

2.2 Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL1

Für die Vermehrung des *D. bryoniae* Isolats GL1 wurde jeweils mit einem Skalpell ein ca. 1*1 cm großes Mycel-haltiges Agarstück vom Randbereich der Ausgangsplatten entnommen und mit dem Mycel nach oben in die Mitte frischer Potato dextrose Agarplatten (PDA) plaziert. Die Platten wurden anschließend mit Parafin verschlossen und übereinander gestapelt im Labor gelagert. Die Raumtemperatur (RT) schwankte dabei entsprechend der vorherrschenden Außentemperaturen (von 21°C-38°C). Bis zum Anwachsen des Mycels wurden die Platten mit dem Deckel nach oben positioniert. Anschließend wurden die Platten umgedreht.

2.3 Optimierter Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL1

Für eine optimierte Kultivierung von *D. bryoniae* wurde die Vermehrung des Isolats GL1 wie im „Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL1“ beschrieben unternommen. In Abwandlung zur oben beschriebenen Methode wurden die beimpften Platten im Klimaschrank bei Langtagbedingungen (15 Stunden Licht, 9 Stunden Dunkelheit) gezogen. Die Tagestemperatur betrug 25°C, die Nachttemperatur 21°C. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug ca. 70 %.

2.4 Herstellung der *Didymella bryoniae* Konidiensuspension

Bei der Durchführung der Ernte waren die Platten bis zum Rand mit Pilzmycel und Fruchtkörpern bewachsen. Die Petrischalen wurden mit destilliertem Wasser gespült und der Fruchtkörperrasen mit der scharfen Schneidefläche des Skalpells abgekratzt. Das Mycel- bzw. Fruchtkörper-Wasser-Gemisch wurde in 50ml Falcon Tubes aufgefangen und für einige Sekunden (s) stark gevortext. Anschließend wurden die Mycelreste mittels Miraclothnetz von der Suspension getrennt. Die Suspension wurde einer Vitalfärbung mit Methylenblau

unterzogen und mikroskopisch auf Konidien untersucht. Für die Bestimmung der Sporenanzahl in der Suspension wurden die Sporen mittels Zählkammer am Hämocytometer ausgezählt.

2.5 Berechnung der Sporenanzahl mittels Zählkammer am Hämocytometer

Für die Berechnung der Sporenanzahl wurde die Konidiensuspension 1:100 verdünnt. Bei der Vorbereitung der Zählkammer wurde ein Tropfen der verdünnten Konidiensuspension seitlich aufpipettiert. Das Deckglas wurde vorsichtig aufgelegt und bis zur Entstehung von Newtonschen Ringen verschoben. Insgesamt wurden vier große Quadrate ausgezählt. Die Werte wurden anschließend gemittelt und die Sporenanzahl hochgerechnet.

Bei einer Neubauer Zählkammer mit 0,1mm Tiefe und 0,0025mm² Fläche ergibt sich folgende Berechnung:

$$\underbrace{0,0025\text{mm}^2 * 16}_{X} * 0,1\text{mm} * \text{Verdünnungsfaktor der Suspension} * 10^4 = \text{Sporen/ml Suspension}$$

X= Mittelwert der ausgezählten Sporen

2.6 Herstellung von Kryostocks für die Pilzkonservierung

Das Pilzkonservierungsprotokoll stammte von der Arbeitsgruppe Dr. Gabriele Berg vom Institut für Umweltbiotechnologie der Technischen Universität Graz. Die Einzelkomponenten der Pilzkonservierungslösung (Glycerin ≥98% wasserfrei, Glucose 50%, Pepton 20% und Hefeextrakt 10%) wurden separat autoklaviert und anschließend vereinigt. Pro Eppi wurde ein Milliliter der fertigen Lösung mit zwei bis drei kleinen *D. bryoniae*-Agarstücken versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7 Vorinokulationsversuch von Cucurbita pepo var. styrica mit Didymella bryoniae

Für sämtliche Inokulationsversuche unter Laborbedingungen wurden ungebeizte Kürbissamen der Sorte Gleisdorfer Ölkürbis von der Saatgut Firma Austroaat in Agra-Vermiculite angezogen und nach 10 Tagen in Erde (Gramoflor Profisubstrat) getopft. Pro Topf wurde jeweils eine Jungpflanze gesetzt.

Für den Vorinokulationsversuch wurden die Pflanzen im Klimaschrank bei einem Tag/Nacht Zyklus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit für einen Monat gezogen. Die Luftfeuchtigkeit betrug konstant 70 %. Zwischen Tag und Nacht wurde ein Temperaturunterschied von 4°C gewählt (Tag 22°C, Nacht 18°C). Für die Inokulation wurden die Pflanzen bis zum Vorhandensein von fünf Folgeblättern kultiviert. Pro Pflanzen wurden jeweils drei Blätter inokuliert. Dafür wurden die Blätter mit einem Skalpell angeritzt. Anschließend wurde die Konidiensuspension (Konzentration: 10⁷ Sporen/ml; pro Blatt 100 µl Suspension) mit Hilfe einer nadellosen Spritze auf die geritzten Flächen appliziert und verteilt. Parallel wurden für die Kontrollen angeritzte Blätter mittels dest. Wasser benetzt. Der Verlauf der Inokulation wurde in einem 3-Tages-Rhythmus kontrolliert.

Neben den Blatinokulationen wurden an denselben Pflanzen Blüteninokulationen vorgenommen. Bei einem Teil der aufgeblühten, offenen, männlichen Blüten wurde Konidiensuspension (Konzentration: 10⁷ Sporen/ml; 1 ml bzw. 500 µl) in den Blütenboden pipettiert. Der Rest der Blüten (offene, geschlossene und bereits verwelkte Blüten) wurde mittels Pilzmycel behandelt. Dafür wurde mittels Skalpell ein ca. 1*1 cm großes Quadrat aus dem

Randbereich der Agarplatten ausgeschnitten und auf den Blütenboden gelegt. Das Mycelstück wurde jeweils mit 500 µl dest. Wasser benetzt. Parallel wurden die Kontrollblüten nur mit dest. Wasser behandelt. Die Blüten wurden für den Erhalt der Feuchtigkeit in durchsichtige Gefrierbeutel verpackt.

2.8 Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die physiologische Messreihe

Für die Hauptinokulation wurden die Kürbissamen unter den gleichen Bedingungen, wie beim Vorinokulationsversuch beschrieben, gezogen. Die Pflanzen wurden in der Klimakammer bei einem Tag/Nacht Zyklus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % gehalten. Die Temperatur betrug 23°C am Tag und wurde auf 21°C in der Nacht abgesenkt. Pro Pflanze wurde jeweils das fünfte Folgeblatt mit einer *D. bryoniae* Konidiensuspension (Konzentration: 10⁶ Sporen/ml) bis zum Abtropfen besprüht. Die inokulierten Blätter wurden zum Erhalt des Feuchtigkeitsfilms auf den Blättern in durchsichtige Gefrierbeutel verpackt. Die Kunststoffsäckchen wurden einen Tag nach der Inokulation zu Beginn der physiologischen Messreihe entfernt.

2.9 Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die Herstellung mikroskopischer Totalpräparate

Die ausgewählten Klimaparameter der Klimakammer waren identisch zu jenen der Hauptinokulation für die physiologische Messreihe. Für die Inokulation wurden junge Blätter ausgewählt und mit einer *D. bryoniae* Konidiensuspension (Konzentration: 10⁷ Sporen/ml) bis zum Abtropfen besprüht. Die inokulierten Blätter wurden zum Erhalt des Feuchtigkeitsfilms auf den Blättern in durchsichtige Gefrierbeutel verpackt. Die Blätter verblieben bis zur Ernte für die Totalpräparation in den Kunststoffsäckchen.

2.10 Hauptinokulationen von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* unter Freilandbedingungen

Die Hauptinokulationen wurden an der Versuchsstation Lambach-Stadl-Paura (Institut für biologische Landwirtschaft der HBLFA Raumberg-Gumpenstein) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Herbert Huss durchgeführt. Für die Freilandversuche wurde ein Anbauplan, untergliedert in insgesamt vier Feldern, mit einer Gesamtgröße von 1400 m² entworfen. Pro Feld wurden drei verschiedene Anbautermine (1.5., 14.5. und 28.5.) ausgewählt und in unterschiedlichen Kombinationen nebeneinander gelegt. Jeweils drei Parzellen mit drei unterschiedlichen Anbauterminen wurden für eine der drei Inokulationsversuche (Inokulation der Früchte, Inokulation der Blüten und Sprosse, sowie Kontrollen) aneinander gereiht. Der Ansatz wurde insgesamt dreimal in unterschiedlichen, nebeneinander liegenden Kombinationen wiederholt (siehe Tabelle 1). Pro Parzelle wurden 10 Samen der Sorte Gleisdorfer Ölkürbis (Kupfer-gebeizt) von der Firma Saatzucht Gleisdorf GmbH gesetzt. Der Abstand zwischen den Samen bzw. Pflanzen betrug 80 cm. Der Abstand zwischen den einzelnen Parzellen wurde auf 3,5 m festgelegt. Aufgrund des schlechten Auflaufens der Pflanzen, insbesondere des ersten Anbautermins (1.5.), konnte die geplante systematische Auswahl der Versuchsobjekte in Abhängigkeit von den drei verschiedenen Anbauterminen (1.5., 14.5. und 28.5.) nicht durchgeführt werden. Somit entfiel der Vorteil der Inokulation der Früchte zu drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien unter denselben klimatischen Bedingungen. Stattdessen wurde bei der Suche der Früchte, Sprosse bzw. Blätter ein randomisierter Ansatz verwendet. Für sämtliche Inokulationsversuche wurde die Konidiensuspension auf eine Konzentration von 10⁶

Sporen/ml mit Wasser verdünnt. Die Suspension wurde entweder mittels Injektionsspritze direkt injiziert oder mittels Sprühflasche äußerlich appliziert.

Tabelle 2: Anbauplan Gleisdorfer Ölkürbis für Freilandversuche. Pro Feld wurden drei verschiedene Anbautermine (1.5., 14.5. und 28.5.) ausgewählt und in unterschiedlichen Kombinationen aneinander gereiht. Jeweils drei Parzellen (eine Parzelle entspricht einer Spalte) mit drei unterschiedlichen Anbauterminen wurden für eine der drei Inokulationsversuche (Inokulation der Früchte, Inokulation der Blüten und Sprosse, sowie Kontrollen) nebeneinander gelegt. Der Ansatz wurde insgesamt dreimal in unterschiedlichen, nebeneinander liegenden Kombinationen wiederholt. B, S= Blüte, Spross, F= Frucht, 0= Kontrollen.

14.5.	28.5.	1.5.	1.5.	14.5.	28.5.	14.5.	28.5.	1.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.
B, S	B, S	B, S	F	F	F	0	0	0	0	0	0	B, S	B, S	B, S	F	F	F	F
1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.	1.5.	14.5.	28.5.
0	0	0	B, S	B, S	B, S	F	F	F	F	F	F	0	0	0	B, S	B, S	B, S	B, S

2.10.1 Inokulation der Blätter

Beim Inokulationsversuch der Blätter wurden sowohl jüngere (an den Seitenzweigen der Pflanze) als auch ältere Blätter (im Zentrum der Pflanze) mit der Konidiensuspension inokuliert. Für die Inokulation wurde unter die ausgewählten Blätter ein Karton gehalten, um das Runtertropfen der Suspension auf benachbarte Blätter zu minimieren (siehe Abbildung 4 A und B). Die Blätter wurden bis zum Abtropfen mit Konidiensuspension besprüht. Für die Kontrollen wurden unbehandelte Blätter markiert.

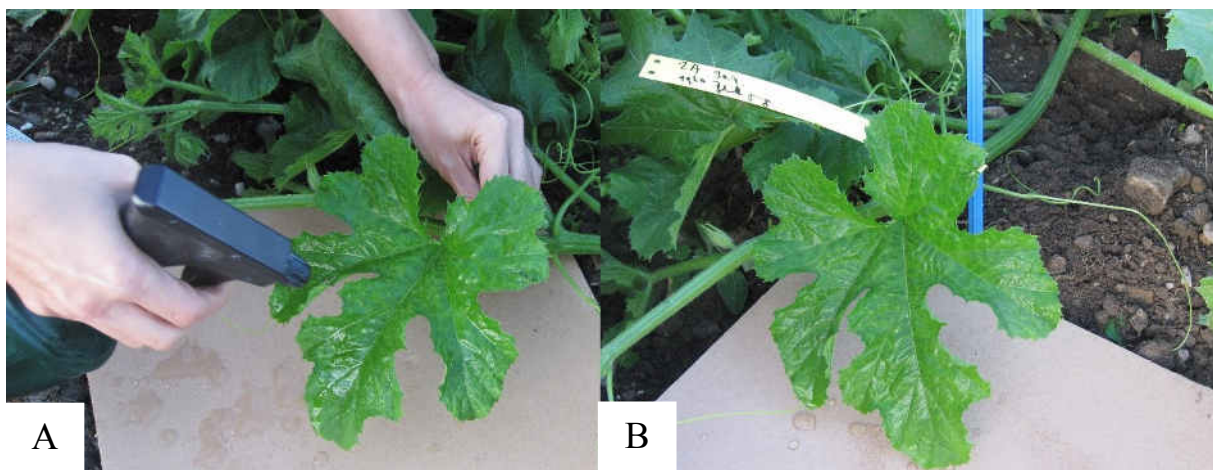


Abbildung 4: Inokulation der Kürbisblätter mittels Konidiensuspension. Als Abtropfasse wurde ein Karton verwendet. A: Auftragung der Suspension mittels Sprühflasche bis zum Abtropfen. B: Markierung des inokulierten Blattes im Feld.

2.10.2 Inokulation der Blattstiele und Stängel

Bei der Inokulation der Blattstiele und Stängel wurde jeweils mit einer Injektionsnadel bis zum Eindringen in die Markhöhle eingestochen. Die Einstichstelle wurde jeweils mittig gesetzt (siehe Abbildung 5A). Mit einer zweiten Injektionsnadel wurde durch den gestochenen Injektionskanal 1 ml der Konidiensuspension in die Markhöhle injiziert (siehe Abbildung 5B). Es wurde eine Blattstielinokulationen, sowie eine

Stängelinokulationen jeweils am selben Seitenzweig der Pflanze durchgeführt. Bei den Kontrollen wurde parallel dazu Wasser in die Markhöhle injiziert.

Weitere Blattstiele und Stängel wurden bis zum deutlichen Abtropfen mit Konidiensuspension besprüht (siehe Abbildung 5C und D). Wiederum befanden sich die infizierten Blattstiele und Stängel jeweils am selben Seitenzweig der Pflanze. Für die Kontrollen wurden unbehandelte Blattstiele und Stängel markiert

Eine weitere Inokulationsvariante beinhaltete die Inokulation der Stängel von freiliegenden Seitentrieben. Dafür wurde eine kleine Rinne (ca. 5 cm lang, 0,5 cm tief) in der Erde gezogen und die Konidiensuspension in die Rinne gesprüht. Der Stängel wurde anschließend in die Suspension in der Vertiefung gelegt.



Abbildung 5: Inokulation der Blattstiele und Stängel. A: Wahl der mittigen Einstichstelle bei der Inokulation eines Blattstiels. B: Inokulation eines Blattstiels mit Injektionsnadel und Applizierung der Konidiensuspension in die Markhöhle. Die Konidiensuspension tritt teilweise an der Einstichstelle heraus. Applizierung der Konidiensuspension mittels Sprühflasche C: auf einem Blattstiel und D: auf einem Stängel.

2.10.3 Vergleich der Inokulation von mechanisch beschädigten Stängeln und unbeschädigten Stängeln

Für die Inokulation der mechanisch beschädigten Stängel wurden Abschnitte an freiliegenden Seitenzweigen der Pflanze ausgewählt (siehe Abbildung 6A). Die Stängel wiesen deutliche Hagelschäden auf, die bereits mittels Abschlussgewebe von der Pflanze wieder verschlossen worden waren. Die ausgewählten Stängel wurden von einem bis zum nächsten Knotenpunkt durch Besprühen mit Konidiensuspension infiziert. Besprüht wurde wiederum bis zum deutlichen Abtropfen. Der besprühte Bereich wurde durch Markierung der beiden Knotenpunkte mittels Sprühlack gekennzeichnet (siehe Abbildung 6A). Des Weiteren wurden am Ende

derselben Seitenzweig unverletzte Stängel bis zum Abtropfen mit Konidiensuspension besprüht (siehe Abbildung 6B) und die Knotenpunkte mit Sprühlack markiert.

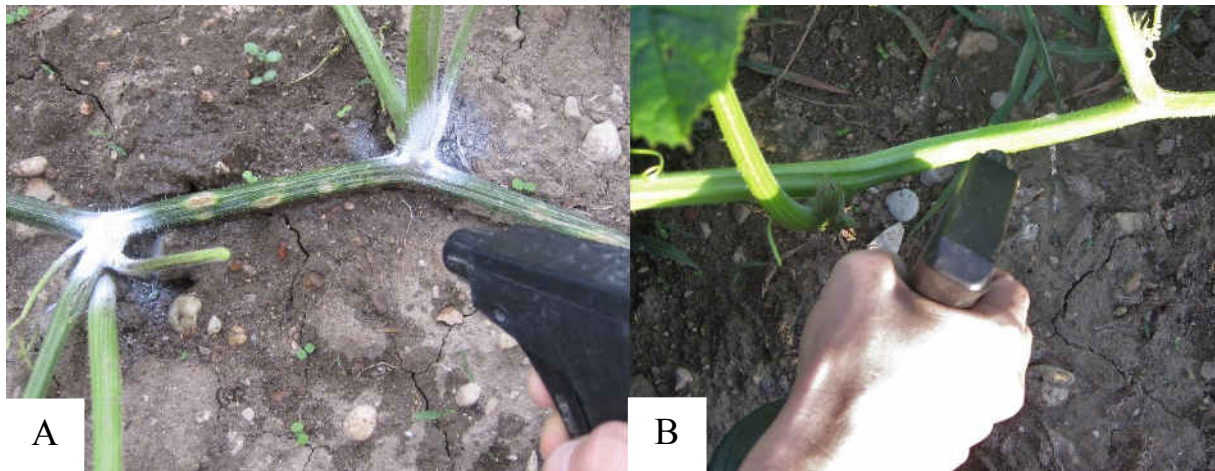


Abbildung 6: Inokulation eines mechanisch beschädigten Stängels, sowie eines unbeschädigten Stängels am selben freiliegenden Seitenzweig einer Pflanze. A: Der inokulierte Bereich befindet sich zwischen den, mit weißem Sprühlack markierten Knotenpunkten. B: Inokulation eines unbeschädigten, jungen Stängelabschnittes. Die Knotenpunkte wurden noch nicht markiert.

2.10.4 Inokulation der männlichen Blütenstiele

Für die Inokulation der männlichen Blütenstiele wurde der Blütenstiel mit Hilfe einer Injektionsnadel durchstochen. Die Stichführung erfolgte dabei schräg, sodass die Konidiensuspension bei der Applizierung sowohl an der Eintrittsstelle als auch an der Austrittsstelle heraustropfte. Pro Blütenstiel wurde 1 ml Konidiensuspension injiziert.

2.10.5 Inokulation der männlichen und weiblichen Blüten

Für die Inokulation der männlichen Blüten wurden geöffnete Blüten ausgesucht. Die Konidiensuspension wurde mit einer Injektionsnadel auf den Stempel getropft (siehe Abbildung 7A). Die Suspension sammelte sich im Blütenboden. Pro Blüte wurde 1 ml Suspension verwendet.

Parallel dazu wurde eine Inokulation der weiblichen Blüten durchgeführt. Dafür wurden geöffnete weibliche Blüten ausgewählt und mit 1 ml Konidiensuspension infiziert. Die Applizierung erfolgt mit Hilfe einer Injektionsnadel direkt auf die Narbe (siehe Abbildung 7B). Die Suspension sammelte sich wiederum im Blütenboden.

Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Blüten wurden nach der Inokulation die Blütenblätter mit der Hand vorsichtig zugekehrt. Die inokulierten Blüten wurden mittels Sprühlack am Knotenpunkt zum Stängel markiert. Unbehandelte weibliche und männliche Blüten wurden als Kontrollen markiert.



Abbildung 7: Inokulation einer männlichen und einer weiblichen Blüten von *Cucurbita pepo* var. *styrica*. A: Applikation der Konidiensuspension mittels Injektionsnadel auf dem Stempel einer männlichen Blüte. B: Applikation der Konidiensuspension auf die Narbe der weiblichen Blüte.

2.10.6 Keimungsversuch der Samen nach Inokulation mit *Didymella bryoniae*

Es wurden insgesamt 30 ungebeizte Samen (jeweils 10 Samen pro Wiederholung) in Konidiensuspension getaucht und anschließend im Freiland gepflanzt. Als Kontrollen dienten 30 unbehandelte Samen. Die Abstände der Samen eines Ansatzes zueinander, sowie die Abstände zwischen den Wiederholungen betragen 20 cm. Die Abstände zwischen den Inokulationsansätzen und den Kontrollansätzen betragen 80 cm.

Der Keimungsversuch wurde unter Laborbedingungen mit insgesamt 300 Samen wiederholt. 100 unbehandelte Samen dienten als Kontrollen. Die restlichen 200 Samen wurden mit Konidiensuspension mit einer Konzentration von 10^6 Sporen/ml behandelt. Dafür wurden 100 Samen in der Konidiensuspension kurz geschwenkt und weitere 100 für 10 Minuten in der Konidiensuspension eingelegt. Alle 300 Samen wurden in Vermiculite angezogen und bei 24°C unter Langtagbedingungen bis zur Keimung der Pflanzen gehalten. Der Keimungsversuch unter Laborbedingungen wurde insgesamt zweimal wiederholt.

2.10.7 Inokulation der jungen Früchte

Die Früchte wurden der Länge nach vom Stielansatz bis zum Blütenboden mittels Maßband vermessen (siehe Abbildung 7A). Es wurden Früchte mit einer Länge von 5-13 cm inokuliert. Die Früchte wurden auf bereits vorhandene Schäden untersucht und bis zum Abtropfen mittels Konidiensuspension besprüht. Des Weiteren wurden unbehandelte, junge Früchte als Kontrollen markiert.

2.10.8 Inokulation der älteren Früchte ohne mechanische Verwundung/ nach mechanischer Verwundung

Die Früchte wurden wiederum der Länge nach vermessen (siehe Abbildung 8A). Es wurden Früchte mit einer Mindestgröße von 18 cm und einer maximalen Größe von 28 cm (Messungen erfolgten jeweils vom Stielansatz bis zum Blütenboden) für die Inokulation ausgewählt. Ein Teil der Früchte wurde mit Hilfe einer Muskatnussreibe künstlich beschädigt (siehe Abbildung 8B). Dabei wurden die Früchte ca. 2,5-5 mm tief eingeritzt. Die Ritzfläche war quadratisch mit einer Seitenlänge von ca. 5 cm. Sowohl die künstlich verletzten, als auch die nicht beschädigten Früchte wurden auf etwaige bereits vorhandene mechanische Beschädigungen

untersucht. Die Früchte wurden bis zum Abtropfen mit Konidiensuspension besprüht. Für die Kontrollen wurden wiederum unbehandelte Früchte mit definierter Größe ausgewählt und markiert.

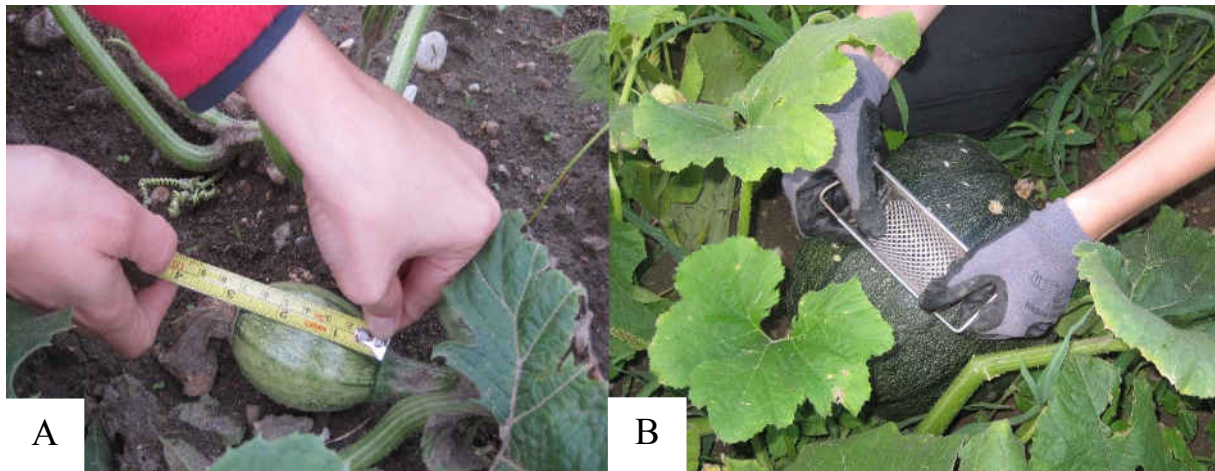


Abbildung 8: Vorbereitungsarbeiten für die nachfolgende Inokulation. A: Vermessung einer jungen Frucht mittels Maßband. Vom Stielansatz bis zum Blütenboden beträgt die gemessene Länge ca. 3 cm. B: Einritzen einer älteren Frucht mittels Muskatnussreibe für die Schaffung einer künstlich erzeugten Eintrittsstelle.

2.10.9 Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle

Die Früchte wurden wiederum vermessen und mechanische Schäden wurden dokumentiert. Anschließend wurden die Früchte mittels Muskatnussreibe wie unter „Inokulation der älteren Früchte ohne Verwundung/ nach mechanischer Verwundung“ beschrieben eingeritzt. Die Früchte wurden bis zum Abtropfen mit Konidiensuspension besprüht. Des Weiteren wurde ein Stück Küchenrolle in der Mitte gefaltet und auf die Ritzstelle gelegt (siehe Abbildung 9A). Das Stück Küchenrolle wurde bis zur kompletten Durchnässung mit Konidiensuspension besprüht. Anschließend wurde ein durchsichtiger Gefrierbeutel auf die Größe der zusammengefalteten Küchenrolle zugeschnitten und darüber gelegt. Die Kunststoffolie wurde mittels Textilklebeband an allen Seiten abgeklebt.

2.10.10 Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle

Die Inokulation erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode der „Inokulation älterer Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle“. Die Früchte wurden jedoch nach der Applikation der Konidiensuspension auf die Ritzstelle nicht mit Küchenrolle abgedeckt. Alternativ wurde das Stück Kunststoff mit Konidiensuspension besprüht und auf die eingeritzte Stelle gelegt (siehe Abbildung 9B). Anschließend wurde die Kunststoffolie wiederum mittels Textilklebeband an allen vier Seiten abgeklebt.

2.10.11 Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle

Als Abwandlung zu den oben durchgeführten Inokulationen nach künstlicher Verletzung wurden dieselben Versuche ohne künstlich applizierte mechanische Beschädigung durchgeführt. Dafür wurden die Früchte vermessen, auf etwaige Hagelschäden untersucht und anschließend mittels Konidiensuspension bis zum

Abtropfen besprüht. Des Weiteren wurde ein Stück Küchenrolle in der Mitte gefaltet und ebenso mit Konidien suspension bis zum Abtropfen besprüht. Das getränkte Stück Küchenrolle wurde auf die Früchte gelegt, mit einem Stück Kunststoffolie abgedeckt und zugeklebt (siehe Abbildung 9C).

2.10.12 Inokulation der älteren Früchte ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, sowie ohne künstliche Verletzung

Die Inokulation erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode der „Inokulation der älteren Früchte mit Abdunkelung der Inokulationsstelle ohne künstlicher Verletzung“. Alternativ wurden die Früchte jedoch nicht mit Küchenrolle abgedeckt sondern wie bei der Methode der „Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle“ beschrieben nur mit dem Stück Kunststoff abgedeckt (siehe Abbildung 9D).



Abbildung 9: Inokulationsvarianten der älteren Früchte. A: Inokulation einer älteren Frucht nach künstliche Verwundung (durch Küchenrolle am Bild nicht sichtbar) mittels Muskatnussreibe und Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Küchenrolle wurde mit Konidien suspension besprüht. B: Inokulation einer älteren Frucht nach künstlicher Verwundung mittels Muskatnussreibe ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kunststoffolie wurde für eine zusätzliche Befeuchtung mit Konidien suspension besprüht. C: Inokulation einer älteren Frucht ohne künstliche Verwundung, jedoch mit Abdunkelung der Infektionsstelle. Die Küchenrolle wurde mit Konidien suspension besprüht. D: Inokulation einer älteren Frucht ohne künstliche Verwundung, sowie ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kunststoffolie wurde mit Konidien suspension besprüht.

2.10.13 Inokulation der älteren Früchte-Vergleich Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation

Die Früchte wurden vermessen und auf Hagelschäden untersucht. Anschließend wurden auf jeder Frucht zwei Verwundungsstellen (einmal L mit Balken nach rechts und einmal L jedoch mit Balken nach links zeigend) mit einer Muskatnussreibe gesetzt. Die L-förmige Wunde (Balken nach rechts, siehe Abbildung 10B) wurde mittels Konidiensuspension besprüht. Die andere Wunde blieb unbehandelt (siehe Abbildung 10A). Der Verlauf der Reaktion wurde über mehrere Tage täglich kontrolliert. Die Früchte wurden Ende August geerntet und für die Extraktion, der aus den Wunden austretenden Arabinogalaktan-Proteine (AGPs), nach Graz gebracht.

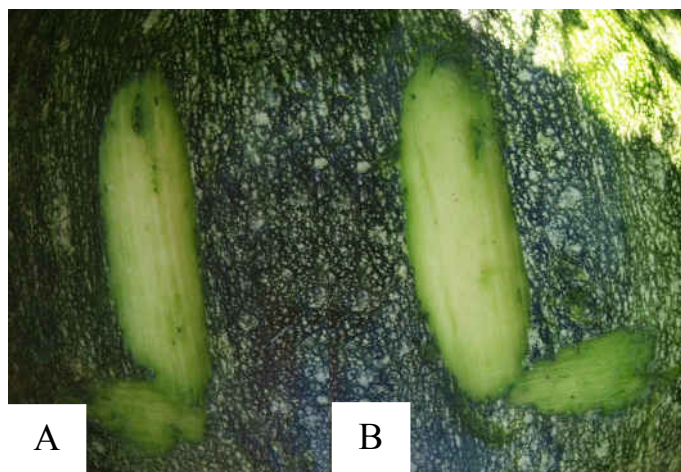


Abbildung 10: Vergleich der nicht inokulierten Verwundungsstelle mit einer inokulierten Verwundungsstelle. A: Kontroll-Verwundungsstelle B: inokulierte Verwundungsstelle.

2.11 Synthese des 1,3,5-tri-(p-β-d-glucosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene (β-D-glucosyl Yariv Reagenz)

Die Synthese wurde unter Anleitung und Hilfestellung von Herrn Dr. Jörg Schrittwieser des Instituts für Organische Chemie der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführt. Die Synthese des β-D-glucosyl Yariv Reagenzes (Yariv Reagenz) wurde nach Ganjian I. und Basile D. (1997) durchgeführt. Eine 4-Aminophenol β-D-glucopyranosid Lösung (100 mg, 0,37 mmol; der Firma Sigma-Aldrich) in 0,5 M Salzsäure (2,3 ml) wurde bis zum Erreichen einer Temperatur von 0-5°C in einem Eisbad heruntergekühlt. Eine Natriumnitritlösung (25,5 mg, 0,37 mmol) in 1,5 ml Wasser wurde auf dieselbe Temperatur gebracht und unter ständigem Rühren über einen Zeitraum von 10 min tropfenweise zur Glucosidelösung hinzugefügt. Die Temperatur wurde während der Diazotierung durch Zugabe weniger kleiner Eisstücke unter 5°C gehalten. Es wurde eine Probe von 10 µl der resultierenden blass gelblichen, klaren Lösung entnommen und mit 20 µl Wasser verdünnt. Die verdünnte Probe wurde auf Stärke-Jodid Papier aufgebracht, wobei eine blass blaue Färbung die gewünschte Anwesenheit eines leichten Überschusses an salpetriger Säure anzeigte. Eine Reaktion zwischen der so hergestellten Diazoniumsalzlösung mit dem Phloroglucin wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Phloroglucinlösung (14,9 mg, 0,12 mmol) in 5 ml Wasser wurde auf einem Eisbad auf eine Temperatur von 0-5°C herunter gekühlt und wurde anschließend unter ständigem Rühren über einen Zeitraum von 30 min tropfenweise der Diazoniumsalzlösung hinzugefügt. Die Lösung nahm eine orange-rote Färbung an und wurde für 1 h bei RT gerührt, wodurch sich die Farbe der Lösung intensivierte. Die Lösung wurde wiederum mittels eines Eisbades

auf eine Temperatur von 0-5°C gebracht und durch Zugabe einer 0,5 M wässriger NaOH auf einen pH Wert von 9,0 gebracht. Die Lösung (ca. 10 ml) wurde mit dem gleichen Volumen Ethanol verdünnt und über Nacht im Kühlschrank gelagert, wodurch sich ein rotes Präzipitat formte. Da das Präzipitat für eine Isolation durch Filtration mit einer Glasfritte des Feinheitsgrades Nr. 3 zu fein war, wurde der Feststoff wieder in Wasser aufgelöst und auf ein Volumen von 4 ml durch Verdampfen unter vermindertem Druck konzentriert. Die resultierende Lösung wurde mit Wasser auf 7 ml verdünnt und mit 7 ml Ethanol versetzt, wodurch sich unmittelbar dunkelrote Präzipitate bildeten. Die Mischung wurde für eine vollständige Präzipitation erneut über Nacht im Kühlschrank gelagert und anschließend auf Mikrozentrifugenröhrchen aufgeteilt. Der Feststoff wurde bei 14.000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Die Pellets wurden in einem 1:1 Wasser/Ethanol Gemisch resuspendiert und erneut bei 14.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während der Feststoff in eine Kristallisationsschale überführt wurde und in einem Exikkator über wasserfreiem Kalziumchlorid über Nacht getrocknet wurde. Das gewonnene Reagenz (gelöst in DMSO-d₆) wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (300 MHz) untersucht. Die erhaltenen Signale wurden mit Hilfe der Strukturformel zugeordnet und die Werte mit der Literatur verglichen.

2.12 Extraktion der Arabinogalaktanproteine (Kürbis)

Für die Extraktion der Arabinogalaktan-proteine (AGPs) wurden zwei Ansätze gewählt: bei fünf Früchten wurden sowohl bei der infizierten Wunde, als auch bei der nicht infizierten Wunde (Kontrolle) lediglich die ausgetretenen, eingetrockneten, harzigen und bernsteinfärbigen Substanzen herunter gekratzt (→Ansatz AGPs). Bei den restlichen fünf Früchten wurden sowohl bei der infizierten Wunde, als auch bei der nicht infizierten Wunde (Kontrolle) neben den ausgetretenen, eingetrockneten, harzigen und bernsteinfärbigen Substanzen auch ein Teil des darunter liegenden Gewebes mitentnommen (→Ansatz AGPs + Gewebe).

Das Extraktionsprotokoll stammte von Herrn Dr. Wolfgang Schühly des Instituts für Zoologie der Karl-Franzens-Universität Graz (mündliche Mitteilung) und wurde mit Ausnahme der Menge an eingesetztem Material unverändert verwendet. Für die Extraktion der AGPs + Gewebe wurden ca. 50 g Frischgewicht im Trockenschrank bei 70°C für einen Tag getrocknet, während für die Extraktion der AGPs lediglich ca. 0,5-1 g als Ausgangssubstanzen dienten. Die getrockneten Materialien wurden anschließend in der Retsch MM 400 Kugelmühle bei einer Frequenz von 30 1/s und 6 min zu einem feinen Pulver vermahlen. Für die Extraktion wurden pro Probe 15 ml Aceton zugegeben, kurz gevortext und 30 min mazeriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Nutsche abfiltriert und der Filterkuchen mit Aceton nachgespült. Das Filtrat wurde verworfen, während der Filterkuchen insgesamt 2 Mal mit 15 ml Diethylether durchmischt wurde und nach 30 minütiger Mazeration mittels Büchnertrichter filtriert wurde. Der Filterkuchen wurde mit Diethylether nachgewaschen und mit 30 ml (Ansatz AGPs + Gewebe) bzw. 10 ml (Ansatz AGPs) destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Mazeration erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Suspension erneut filtriert und mit dest. Wasser nachgewaschen. Der Filterkuchen wurde verworfen, während das Filtrat mit Hilfe des Gefrier Trockners SP Scientific Virtis BenchTop 6K gefriergetrocknet wurde. Die gefriergetrockneten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.13 Extraktion der Arabinogalaktanproteine (Efeu)

Die Extraktion wurde laut Van Holst und Clarke (1985) durchgeführt. 1,6 g frische Eufeublätter wurden unter flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zermahlen und mit 6 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH= 8, 10 mM EDTA, 2 mM Na₂S₂O₅, 1% w/v Triton X-100) extrahiert. Die Probe wurde stets auf Eis gehalten und nach 10 min bei 10.000 g für 5 min auf 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für den Single Radial Diffusion Assay verwendet.

2.14 Single Radial Diffusion Assay

Der Single Radial Diffusion Assay wurde laut Van Holst und Clarke (1985) mit den folgenden Abwandlungen durchgeführt: eine Agarlösung (1% w/v Agarose, 0,15 M NaCl, 0,02% w/v NaN₃ und 20 µg/ml Yariv Reagenz) wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 3 gebracht und anschließend bis zum Kochen erhitzt. Die Lösung wurde in Glaspetrischalen (ø = 15 cm) gegossen und zum Abkühlen bei RT stehen gelassen. Die Geldicke betrug ca. 2 mm. Es wurden Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm aus dem Agar ausgestanzt. Die Löcher wurden mit jeweils 20 µl der Standardverdünnungen bzw. Probenverdünnungen gefüllt. Die Inkubation erfolgte über drei Tage bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtekammer. Die entstandenen Halo-Durchmesser wurden unter dem Stereomikroskop Olympus SZX16 und der Kamera Olympus CAM-XC50 mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms cellSens Entry zweifach ausgemessen. Die zwei Halo-Durchmesser wurden gemittelt und zum Quadrat genommen.

Als Standardlösungen wurden Verdünnungen von Gummi arabicum (gum arabic) mit den Konzentrationen 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 15 mg/ml, 25 mg/ml und 50 mg/ml hergestellt. Für die Proben (AGPs, AGPs + Gewebe) wurden Verdünnungen der Konzentrationen 15 mg/ml, 25 mg/ml und 50 mg/ml hergestellt. Der Überstand der Efeu-AGP Extraktion wurde unverdünnt verwendet.

2.15 Physiologische Messreihe

Die physiologische Messreihe (Photosynthesemessung, Chlorophyllfluoreszenzmessung, Pigmentmessung, Messung der Antioxidativen Kapazität, Wasserstoffperoxid-Nachweis) wurde jeweils an denselben Folgeblättern 20 infizierter Pflanzen und 20 Kontrollen durchgeführt. Für die Durchführung der Inokulation siehe Methoden „Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die physiologische Messreihe“.

2.15.1 Photosynthese- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Die Photosynthesemessungen wurden mit dem LI-COR LI6400 Portable Photosynthesis System durchgeführt. Die CO₂ Zufuhr wurde über Umarex 12 g CO₂ Patronen geregelt. Für die Photosynthesemessungen wurden folgende Einstellungen ausgewählt: Flussrate (Flussrate durch die Probenkammer) (µmol/s)= 500, CO₂ Volumen (eingeleitete CO₂ Menge in der Referenzkammer) (µmol CO₂/mol)= 400, Quantum Flux (Photonenstromdichte = Photosynthetically Active Photon Flux Density) (µmol Photonen/m²/s)= 400.

Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden mit dem Portable Chlorophyllfluorometer PAM-2000 unternommen. Für die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden folgende Einstellungen ausgewählt: Measuring Light Intensity= 3, Gain= 3, Damping= 5, Actinic Light Intensity= 9, Actinic Light Width (s)= 0, Far Red Light

Intensity= 6, Far Red Light Width (s)= 3, Saturation Pulse Intensity= 8, Saturation Pulse Width (ms)= 8, Slow Induction Delay (s)= 40, Slow Induction Clock (s)= 20, Slow Induction AI-Width (s)= 330.

Die UV-Stärke in der Klimakammer wurde mit Hilfe des PQS1 PAR Quantum Sensors (Sensitivity 4,85 $\mu\text{V}/\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) bestimmt.

Vor der ersten Photosynthesemessung wurde die UV-Stärke in der Klimakammer auf der Höhe der Blätter für die Messreihe bestimmt. Die Photosynthesemessungen und Chlorophyllfluoreszenzmessungen erfolgten jeweils am 1., 3., 5., 7., und 9. Tag nach der Inokulation. Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden jeweils nach einer 20 minütigen Phase der Abdunkelung durchgeführt. Nach der 5. Photosynthesemessung und 5.

Chlorophyllfluoreszenzmessung am 9. Tag nach der Inokulation wurden die Blätter durch Abtrennung des Blattstiels vom Spross mittels einer Rasierklinge geerntet. Mit Hilfe eines Korkbohrers ($\varnothing = \text{ca. } 15 \text{ mm}$) wurde pro Blatt für den Wasserstoffperoxid-Nachweis ein Kreis ausgestochen. Die Blätter wurden in Papiersäcken in flüssigem Stickstoff schock gefroren und mittels SP Scientific Virtis BenchTop 6K Gefriertrockner gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Blätter wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.15.2 Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels Diaminobenzidin

Der H_2O_2 Nachweis wurde nach Großkinsky et al. (2012) modifiziert. Die mit Hilfe eines Korkbohrers ausgestochenen Blattkreise wurden in 6er Multiwellplatten überführt und über Nacht bei RT in 4 ml einer wässrigen Diaminobenzidin (DAB) Lösung (1 mg/ml) eingelegt. Für die Entfärbung des Chlorophylls wurden die Blattkreise anschließend in 70 % Ethanol überführt und für zwei Tage auf 37°C gestellt.

2.15.3 Pigmentbestimmung mittels Photometrie

Die Extraktion der Pigmente wurde nach Pfeifhofer (1989) modifiziert. Die eingefrorenen, gefriergetrockneten Proben wurden im Exsikkator über Trocknungsmittel (Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator; 1-3 mm) auf Raumtemperatur gebracht. Das Material wurde mit der Retsch MM 400 Kugelmühle gemahlen. Anschließend wurden ca. 50 mg gefriergetrocknetes Probenpulver in dunkle Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen und eine Spatelspitze CaCO_3 hinzugefügt. Pro Probe wurde 1 ml gekühltes (4°C) Extraktionsmittel (reiner Methanol) zugegeben und über Nacht der Mazeration überlassen. Anschließend wurde eine Minute mit dem Vortex-Schüttler gemischt und 10 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in graduierte 10 ml Röhrchen dekantiert und verschlossen, sowie abgedunkelt auf Eis gestellt. Der Extraktionsschritt wurde mit dem Pellet weitere vier Mal wiederholt, wobei die Durchmischung mit dem Vortex-Schüttler und der Zentrifugationsschritt direkt nach Zugabe des Lösungsmittels erfolgten. Die Überstände einer Probe wurden jeweils vereinigt und auf 5 ml mit dem Extraktionsmittel aufgefüllt. Die Extrakte wurden durch kurzes vortexen gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung in dunklen Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Die Proben wurden während der gesamten Extraktion auf Eis gelagert.

Die photometrische Dreifachbestimmung erfolgte gegen Methanol bei 665,2 nm (für Chlorophyll a), 652,4 nm (für Chlorophyll b) und 470 nm (für Gesamt-Carotinoide) am Spektrophotometer U-3000.

2.15.4 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität mittels Photometrie

Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität erfolgte nach Stabentheiner et al. (2014). Der Standard Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure) wurde mit Methanol auf die Konzentrationen 0 μM , 100 μM , 500 μM , 1500 μM und 2000 μM gebracht. Als Probenlösungen wurden die Extrakte für die „Pigmentbestimmung mittels Photometrie“ verwendet. 30 μl der Messlösungen (Standardlösungen und Probenlösungen) wurden mit 1,5 ml 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)-Lösung (120 μM in Methanol) versetzt und im Dunkeln für 15 min inkubiert. Die Photometrische Messung erfolgte bei 515 nm gegen Methanol am Spektrophotometer U-3000.

2.16 Mikroskopische Untersuchungen

2.16.1 Kratzpräparate

Fruchtkörper und Hyphen des Pilzes wurden mit dem Skalpell von frischem Pflanzenmaterial bzw. PDA-Nährböden aus Petrischalen gekratzt und in einen Tropfen Wasser auf einem Objektträger überführt.

2.16.2 Quetschpräparate

Frisches Pflanzenmaterial wurde per Hand möglichst dünn geschnitten, auf einen Objektträger in einen Tropfen Wasser überführt und mit leichtem Druck auf das Deckglas gequetscht.

2.16.3 Totalpräparate

Die Präparation der Totalpräparate wurde in Abwandlung zu Gerlach (1969) durchgeführt. Die Blätter wurden dafür wie in „Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die mikroskopischen Totalpräparate“ beschrieben inokuliert. Die Ernte erfolgte am 2., 3. Und 4. Tag nach der Inokulation. Die Blattfluoreszenz wurde zunächst unter UV-Licht bei 366 nm untersucht. Anschließend wurden die Blätter in 70 % Ethanol entfärbt. Danach wurden die Blätter in Lactophenolanilinblau (40 ml Glycerin, 20 ml Milchsäure, 20 ml dest. Wasser, 20 g Phenol, 100 mg Anilinblau) überführt, kurz aufgeköcht und ca. 2 min in der heißen Lactophenolanilinblau-Lösung belassen. Die Blätter wurden anschließend in Chloralhydrat (100% w/v) entfärbt. Die Chloralhydratlösung wurde einmal gewechselt. Analog dazu wurden unbehandelte Blätter (Kontrollen) präpariert und anschließend mikroskopiert.

2.16.4 Handschnitte

Die Handschnitte wurden mit Ethanol (70 %)-fixiertem Pflanzenmaterial angefertigt. Das Material wurde zunächst in kleine Blöcke geschnitten, für ca. 20 min in destilliertes Wasser überführt und in Styroporstücke, die als Schnitthilfe dienen, eingeklemmt. Anschließend wurden mit Hilfe von Rasierklingen Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einen Tropfen Wasser auf einen Objektträger überführt und unter dem Stereomikroskop Olympus SZX16 auf die geeignete Dicke überprüft.

2.16.5 Gefriermikrotomie-Schnitte

Die Gefriermikrotomie-Schnitte wurden am Leica CM 3000 Cryostat mit Ethanol (70 %)-fixiertem Pflanzenmaterial angefertigt. Das Material wurde zunächst in kleine Blöcke geschnitten und für ca. 20 min in

destilliertes Wasser überführt. Die Gewebelöckchen wurden anschließend auf kleinen Gefriermikrotom-Tischchen (Objektplatten) in Gefriermedium (Jung Tissue Freezing Medium for Frozen Tissue Specimens) eingebettet und eingefroren. Die Objektplatten wurden im Objektkopf eingespannt und Einzelschnitte mit einer Schnittdicke von 60 µm angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Raumtemperatur-warmen Objektträger aufgenommen.

2.16.6 Färbungen der mikroskopischen Schnitte

2.16.6.1 Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy

Die Kratzpräparate wurden am Objektträger in Bodipy ca. 5 min gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die gefärbten Präparate wurden in einem Tropfen Wasser mit dem UV-WAB Filter mikroskopiert.

2.16.6.2 Methylenblau-Färbung

Die Schnitte wurden am Objektträger in Methylenblau ca. 10 min gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in einem Tropfen Wasser mikroskopiert.

2.16.6.3 Färbung mit β -D-glucosyl Yariv Reagenz

Die Färbungen wurden in Abwandlung zur den Empfehlungen der Firma Biosupplies (http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf) durchgeführt. Gewebelöckchen wurden in einer β -D-glucosyl Yariv Reagenzlösung (2 mg/ml, gelöst in 0,15 M NaCl) über drei Tage eingelegt. Anschließend wurden Gefriermikrotomie-Schnitte angefertigt.

2.17 Mikroskopische Aufnahmen

Die mikroskopischen Präparate wurden (wenn nicht anders deklariert) mit dem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop mikroskopiert und mit der Kamera AxioCam MRc5 und der digitalen Bildverarbeitungssoftware Axio Vision aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL1

Beim ersten Kultivierungsversuch von *D. bryoniae* (Raumtemperatur, PDA-Platten übereinander gestapelt) wuchsen die Platten mit einem dichten, weißen und weichen Mycelrasen zu (siehe Bildtafel 1 Abbildung A rechte Petrischale). Das Mycel erreichte den Rand der Platten innerhalb einer knappen Woche. Fruchtkörper waren nicht sichtbar.

3.2 Optimierter Kultivierungsversuch von *Didymella bryoniae* Isolat GL 1

Der optimierten Kultivierungsversuch des Pilzes, bei welchem die Pilz-beimpften PDA Platten im Klimaschrank bei Langtagbedingungen, einer Tagestemperatur von 25°C und einer Nachttemperatur von 21°C gehalten wurden, resultierte in einem dichten Fruchtkörperrasen, welcher nach insgesamt einer Woche die gesamte Platte ausfüllte. Die Fruchtkörper waren dabei in konzentrischen Ringen um das Mycel-Ausgangsstück in der Mitte der PDA-Platte angeordnet. Bildtafel 1 Abbildung A linke Petrischale zeigt die, in den Agar leicht eingesenkten, hellbraunen Fruchtkörper, welche mit dem freien Auge leicht erkennbar sind. Mit fortschreitendem Alter der Platten änderte sich die Farbe der Fruchtkörper von der hellbraunen Färbung über eine dunkelbraune bis ins schwarze. Im Unterschied zum ersten Kultivierungsversuch des Pilzes konnte in diesem Fall kein dichter Mycelrasen entdeckt werden. Lediglich am Rand der Platten bildeten sich bei einem Teil der Platten kleine Mycelrasen aus (siehe Bildtafel 1 Abbildung B).

3.3 Herstellung der *Didymella bryoniae* Konidiensuspension

Beim Abkratzen der dicht bewachsenen PDA-Platten konnten rosafarbene Schleimwolken beobachtet werden. Das Mycel- bzw. Fruchtkörper-Wasser-Gemisch hatte eine bräunlich rosarote Farbe angenommen.

3.4 Berechnung der Sporenanzahl mittels Zählkammer am Hämocytometer

Für die Berechnung der Sporenanzahl in der Konidiensuspension wurden insgesamt vier große Quadrate ausgezählt. Der gemittelte Wert an ausgezählten Sporen aus den vier großen Quadraten betrug 200. Die Sporenanzahl in der Suspension wurde auf folgenden Wert berechnet:

$200 \cdot 0,1 \text{ mm} \cdot 10^4 \cdot 100$ (Verdünnungsfaktor bei der Auszählung der Sporen) = $2 \cdot 10^7$ Sporen/ ml Suspension. Da für sämtliche Inokulationsversuche eine Sporenkonzentration von 10^6 Sporen/ ml Suspension benötigt wurde, wurde die Suspension 1:20 verdünnt.

3.5 Vorinokulationsversuche von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae*

Bei den Vorinokulationsversuchen zeigten sich im Schnitt nach sieben Tagen die ersten Blattsymptome. Diese entstanden einerseits am Blattrand und andererseits im Bereich der inokulierten Stelle. Das Gewebe in diesen Bereichen vergilbte und verfärbte sich schlussendlich braun. Insbesondere im Bereich der inokulierten Stellen konnte bereits komplett nekrotische Bereiche entdeckt werden. Ebenso konnte ein Verlust der Festigkeit der braunen Stellen festgestellt werden (siehe Bildtafel 2 Abbildung B). Am zwölften Tag nach der Inokulation konnten ausgedehnte nekrotische Bereiche der Blätter gefunden werden (siehe Bildtafel 2 Abbildung C). Insbesondere im Bereich der Blattränder kam es zwischen dem siebten und zwölften Tag nach der Inokulation zu

einer massiven Ausbreitung von *D. bryoniae*, während eine Ausdehnung der Blattflecken im Innern kaum von statten ging. Des Weiteren begannen sich die nekrotischen Blattränder nach oben und innen einzurollen. Bildtafel 2 Abbildung D zeigt ein zum Großteil ausgebleichenes Blatt 18 Tage nach der Inokulation. Die inokulierte Stelle ist nekrotisch und dunkelbraun gefärbt. Eine Ausbreitung der Infektion von der inokulierten Stelle in Richtung Blattrand war bereits in Gange. Die Kontrollen (Ritzfläche mit Wasser behandelt) zeigten keine Blattflecken (siehe Bildtafel 2 Abbildung A). Die Vorinokulationsversuche der Blüten ergaben in beiden Fällen (Mycel und Konidien suspension) dasselbe Ergebnis. Sowohl jene männliche Kürbisblüten, die bei der Inokulation offen waren, als auch jene, die bereits wieder am Verblühen waren (geschlossene Blüten), waren komplett verfault und weich. Die angrenzenden Blütenstiele zeigten typische Symptome der Stiefäule, bei welcher die Blütenstiele in der Mitte bis leicht über der Mitte abknicken (siehe Bildtafel 2 Abbildung F). Des Weiteren waren die Blütenstiele komplett weich und im Bereich der Abknickstelle bräunlich bis schwarz verfärbt (siehe Bildtafel 2 Abbildung E). Bei den Kontrollblüten konnte keine Stiefäule nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.6 Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die physiologische Messreihe

Zu Beginn der physiologischen Messreihe waren alle inokulierten und nicht inokulierten Blätter vollkommen vital. Auf den inokulierten Blättern konnte direkt vor den Messungen noch ein Feuchtfilm nachgewiesen werden. Die Pflanzen zeigten keinerlei Symptome einer Erkrankung.

3.7 Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* für die Herstellung mikroskopischer Totalpräparate

Sämtliche Blätter zeigten bei der Ernte bereits erste Symptome einer Erkrankung. Bei der ersten Ernte der Blätter (zwei Tage nach der Inokulation) konnten Blattflecken auf der Blattspreite im Bereich der Blattspitze, sowie im Zentrum des Blattes gefunden werden. Das Gewebe war in diesen Bereich bräunlich verfärbt und weich. Vergilbungen konnten noch nicht festgestellt werden (siehe Bildtafel 25 Abbildung A). An den zwei folgenden Erntetagen verstärkten sich die Symptome, wobei vier Tage nach der Inokulation ein Großteil der Blattflecke vergilbt war. Flächige Nekrosen konnten festgestellt werden. Nicht inokulierte Blätter hingegen zeigten keinerlei Symptome (siehe Bildtafel 25 Abbildung B).

3.8 Hauptinokulation von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae* unter Freilandbedingungen

Sämtliche Ergebnisse der Hauptinokulationen von *C. pepo* mit *D. bryoniae* stehen in Bezug auf die, in den Sommermonaten vorherrschenden Wetterbedingungen.

3.8.1 Wetterdaten der Sommermonate Juli und August

Laut der ZAMG (<http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016) lag das Temperaturmittel in Österreich für den Juli 2015 deutlich über dem langjährigen Mittel (siehe Abbildung 11A). Die gemittelte Temperatur wich vom Durchschnittswert um 3,1°C ab. Damit war der Juli 2015 seit Beginn der Aufzeichnungen nicht nur der wärmste Juli, sondern regionsweise (Linz, Klagenfurt und Innsbruck) überhaupt

der wärmste Monat. Ähnliche Aussagen können über den August 2015 getroffen werden (siehe Abbildung 11B). Mit insgesamt $2,7^{\circ}\text{C}$ über dem Mittel konnten lediglich in den Jahren 1807, 1992 und 2003 höhere Temperaturmittelwerte verbucht werden. Die hohen Temperaturen gingen mit außerordentlich vielen Sonnenstunden einher. Was die Menge an Niederschlägen betrifft zeigte sich ein genau umgekehrtes Bild. Österreichweit war der August 2015 der regenärmste seit dem Jahr 1991. Die Niederschlagswerte waren in Bezug auf das langjährige Mittel der Jahre 1981-2010 um 35 % erniedrigt. Während in Teilen Österreichs (westliches Mühlviertel, Innviertel und Semmering-Wechselgebiet) Niederschlagseinbußen von 75 bis 83 % eingesteckt werden mussten, war die Regenmenge im restlichen Oberösterreich, in Teilen Niederösterreichs, der Steiermark und des Burgenlands ebenfalls um 50 bis 75 % vermindert (siehe Abbildung 12B). Ein ähnliches Bild zeigte sich für den Juli 2015. Insbesondere an der Nordseite der Alpen war die Niederschlagsmenge in Bezug auf das Mittel um 50 bis 77 % erniedrigt (siehe Abbildung 12A). Ähnlich wie im August 2015 gehörte das Bundesland Oberösterreich mit zu den trockensten Gebieten. Sowohl im Juli als auch im August 2015 wurden Ortschaften in Oberösterreich (Hörsching und Reichersberg) als relativ trockenste Orte bestimmt (siehe Tabelle 3) (<http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

Tabelle 3: Klimadaten der Monate Juli und August 2015 der Wetterstation Kremsmünster (Oberösterreich). T [$^{\circ}\text{C}$]= Lufttemperatur Monatsmittel, Nied_01= Anzahl der Tage mit Niederschlag $\geq 0,1$ mm, Nied [mm]= Monatssumme Niederschlag, öw. rel. trockenster Ort (Niederschlag M., Abweichung z. M.)= österreichweit relativ trockenster Ort (Niederschlag Monatssumme, Abweichung zum Mittel 1981-2010) (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

Datum	T [$^{\circ}\text{C}$]	Nied_01	Nied [mm]	öw. rel. trockenster Ort (Niederschlag M., Abweichung z. M.)
Juli	22,5	13	41	Hörsching (23 mm, -77 %)
August	22,1	9	36	Reichersberg (15 mm, -83 %)

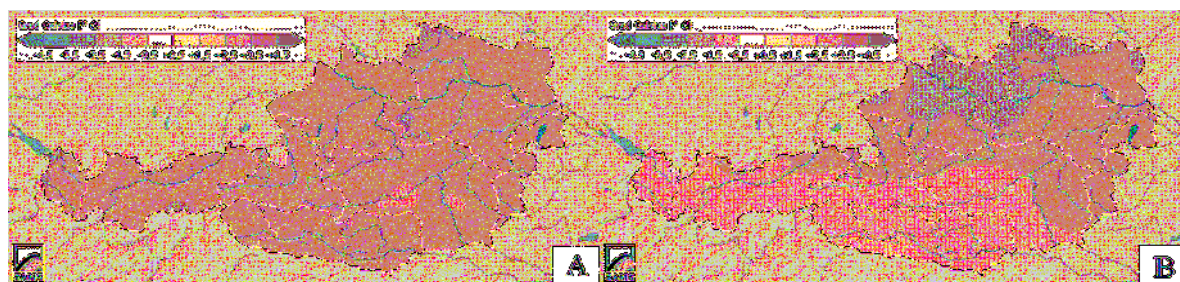


Abbildung 11: Temperaturabweichung für A: Juli 2015 und B: August 2015 in $^{\circ}\text{C}$ in Bezug auf das langjährige Mittel der Jahre 1981-2010 (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

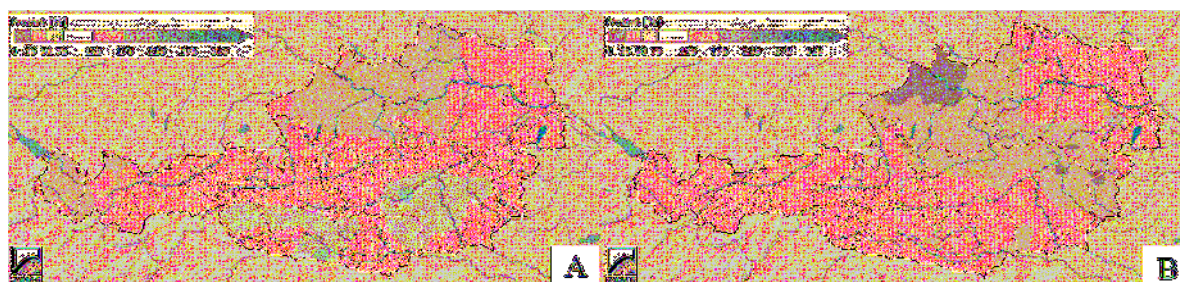


Abbildung 12: Prozent des Niederschlagsnormalwertes für A: Juli 2015 und B: August 2015 in Bezug auf das langjährige Mittel der Jahre 1981-2010 (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

3.8.2 Inokulation der Blätter

Bei der ersten Bonitur, 25 Tage nach der Inokulation der Blätter durch Besprühen mit Konidiensuspension zeigte ein Großteil der gefundenen jungen Blätter bei genauerem Betrachten erste Vergilbungen vom Randbereich (Daten nicht gezeigt) bzw. auf der Blattspreite (siehe Bildtafel 3 Abbildung A). Teilweise konnten vom Randbereich her bereits nekrotische Gewebeabschnitte gefunden werden. Diese vertrockneten Blattbereiche waren dabei leicht eingerollt (Daten nicht gezeigt). Neben den Vergilbungen auf der Blattspreite konnten in einem Fall bereits nekrotische Aufhellungen im Bereich der Leitbündel festgestellt werden, welche die Basis für das typische zellige Blattfleckenmuster bilden. Charakteristisch war auch die Bildung von kleinen, schwarzen, kugeligen Fruchtkörpern im Bereich dieser Flecken (siehe Bildtafel 3 Abbildung A). Die inokulierten älteren Blätter konnten bei der ersten Bonitur aufgrund des dichten Blätterdaches nicht gefunden werden.

Der Inokulationsversuch der jungen und alten Blätter sorgte bei der zweiten Bonitur für einige Probleme. Insgesamt konnten bei den jungen inokulierten Blättern nur zehn von fünfzehn Proben wieder gefunden werden, während bei älteren Blättern der Großteil im Feld nicht mehr auffindbar war (siehe Tabelle 4). Insgesamt zwei Blätter besaßen einen vitalen, satt-grünen Blattstiel, während die Blattfläche bereits großteils nekrotisch war. Anhand von Bildtafel 3 Abbildung B erkennt man ein durch *D. bryoniae* befallenes Blatt, dass sowohl vom Blattrand her als auch auf der Blattspreite großteils Blattflecken aufweist. Die Blattflecken befanden sich zwischen den Leitbündeln und waren zum Großteil bereits zusammengefließen. Sie wiesen ein braun schwarzes gesprenkeltes Muster auf. Die Ränder dieser Flecken waren meist durch eine gelbliche Zone gekennzeichnet. Im noch grün dominierten Bereich erkannte man die, zwischen den Gefäßbündeln entstehenden Vergilbungen (siehe Bildtafel 3 Abbildung B). Diese sorgten für das, im früheren Stadium der Infektion, typische Aussehen eines zelligen Blattfleckenmusters. Innerhalb der Blattflecken befanden sich oft zahlreiche Fruchtkörper von *D. bryoniae* (siehe Bildtafel 3 Abbildung C). Neben den typischen Blattflecken konnten auch Sekundärbefälle durch Mehltau dokumentiert werden. Dieser sorgte für ein weiß-gräuliches Aussehen der Blätter, das auf ein dichtes Mycel auf den Blättern zurück zu führen war. Das Blatt war komplett nekrotisch mit schwarzen Blattflecken und einer Ansammlung von *D. bryoniae* Fruchtkörpern. Die Gefäßbündel waren dunkelbraun verfärbt (siehe Bildtafel 3 Abbildung D_Bildausschnitt). Der angrenzende Blattstiel zeigte typische Symptome einer Stielfäule (siehe Bildtafel 3 Abbildung D). Das Gewebe war ausgebleicht und verfärbte sich bräunlich bis schwarz. Der Blattstiel war weich und etwas über der Blattstielmitte abgeknickt. Im Bereich der Abknickstelle bildeten sich Fruchtkörper des Pilzes. Das untere Ende des Blattstieles sowie auch der Stängel waren noch vital (im Bild nicht sichtbar). Während in fünf von zehn Fällen eine Blattstielfäule diagnostiziert werden konnte, waren drei weitere Blätter samt Blattstielen bereits komplett vertrocknet (siehe Tabelle 4). Bildtafel 3 Abbildung E zeigt einen komplett vertrockneten, braun bis schwarz verfärbten Blattstiel. Zwischen dem infizierten Blattstiel und dem gesunden Stängelgewebe war eine deutliche Grenze zu sehen. Das dazugehörige Blatt war ebenfalls bereits komplett vertrocknet, dunkelbraun bis schwarz verfärbt und wies zahlreiche Fruchtkörper des Pilzes auf. Anders als in Bildtafel 3 Abbildung E zeigt Bildtafel 3 Abbildung F eine mögliche Ausbreitung der Infektion vom Blatt über den Blattstiel bis zum angrenzenden Stängel. Dieser war ähnlich wie Blatt und Blattstiel bereits trocken und zäh. Fünf inokulierte junge Blätter, sowie zehn inokulierte alte Blätter konnten nicht mehr gefunden werden. Die restlichen fünf inokulierten alten Blätter wiesen in drei Fällen eine Blattstielfäule auf. Zwei Blattstiele waren bereits komplett vertrocknet. Die angrenzenden Stängel waren jedoch noch vital, dunkelgrün und fest.

Tabelle 4: Anzahl der erkrankten/gesunden Blätter und Blattstielabschnitte nach der zweiten Bonitur nach Aufsprühen von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf die Blattfläche.

	Junge Blätter	Ältere Blätter
Blatt nekrotisch; Blattstiel vital und grün	2	0
Stielfäule	5	3
Blattstiel vertrocknet	3	2
Nicht gefunden	5	10
Gesamtzahl	15	15

3.8.3 Inokulation der Blattstiele und Stängel

Bei der Inokulation der Stängel und Blattstiele wurden insgesamt vier Varianten durchgeführt: Inokulation durch Injektion der Konidiensuspension in die Markhöhle der Stängel und Blattstiele, durch Besprühen der Stängel und Blattstiele mit Konidiensuspension, sowie durch Sprühen der Suspension in eine künstlich gezogenen Rinne und anschließendes darüber drapieren des Stängels. Die vierte Variante beinhaltete das Besprühen von mechanisch beschädigten Stängeln mittels Konidiensuspension. Bei der dritten und vierten Inokulationsvariante wurden jeweils nur die Stängel künstlich inokuliert. Bei den beiden ersten Versuchsvarianten wurden sowohl Stängel, als auch Blattstiele inokuliert. Das infektiöse Material wurde dabei jeweils mittig (Blattstielmitte bzw. bei den Stängeln mittig zwischen zwei Knotenpunkten) gesetzt.

Die Inokulation der Stängel und Blattstiele durch Injektion von *D. bryoniae* Konidiensuspension in die Markhöhle zeigte im Fall der Stängel in drei von zehn Fällen keinerlei Krankheitssymptome (siehe Tabelle 5). Die Stängel wiesen die typische satte dunkelgrüne Färbung und eine hohe Festigkeit auf (siehe Bildtafel 4 Abbildung A). Des Weiteren konnte bei drei Stängeln auf kleineren und größeren Verletzungen bzw. Hagelschäden, die bereits vor der Inokulation von den Pflanzen verschlossen wurden, *D. bryoniae* Fruchtkörper gefunden werden (siehe Bildtafel 4 Abbildung D). Die Fruchtkörper waren mit freiem Auge als kleine, runde, dunkelbraune bis schwarze Punkte, die ins Gewebe eingesenkt sind, erkennbar. Die Hagelschäden waren von einer deutlichen beige-bräunlichen Zone vom gesunden Gewebe abgegrenzt. Wie anhand der Bildtafel 4 Abbildungen B und C erkennbar, beginnt sich das Gewebe zwischen den beiden Hagelschäden dunkelbraun bis schwarz zu verfärben. Erste Fäule-Symptome konnten in diesem Bereich nachgewiesen werden. Die Stängel selbst schienen ansonsten keine Krankheitssymptome der Gummistängelkrankheit aufzuweisen. Insgesamt konnte nur ein Stängel im Stadium einer beginnenden Infektion gefunden werden. Der Stängel wies eine leichte Abänderung der Farbe von dunkelgrün auf hellgrün bis bräunlich auf (siehe Bildtafel 4 Abbildung D). Die verschlossenen Wunden waren durch hellbraune Zonen vom scheinbar gesunden Gewebe abgegrenzt (siehe Bildtafel 4 Abbildung E). Die verschlossenen Oberflächen der ehemaligen Verletzungen wiesen zahlreiche Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf (siehe Bildtafel 4 Abbildung D). Das Gewebe unter den Fruchtkörpern war schwarz verfärbt. Auf Bildtafel 4 Abbildung F kann man einen von der Gummistängelkrankheit betroffenen Stängel erkennen. Der Stängel war dunkelbraun bis schwarz verfärbt und weich. Innerhalb der schwarzen Bereiche konnten zahlreiche Fruchtkörper des Pilzes gefunden werden. Bildtafel 5 Abbildung A zeigt die

Ausbreitung des Pilzes von der eigentlichen Infektionsstelle im Stängel. Der Stängel, samt Knotenbereich und angrenzendem Blattstiel war bereits ausgebleichen und bräunlich verfärbt. Im Bereich des Knotenpunktes proximal zur Infektionsstelle kam es zur Ausbildung erster Fruchtkörper. In Folge trat ein Verlust der Festigkeit auf. Der angrenzende Blattstiel war mit einem dichten, weißen, fädigen Mycel durchzogen (siehe Bildtafel 5 Abbildung B). Ein weiterer infizierter Stängel zeigte nach erfolgtem Abreißen des Stängels schwarz verfärbte, gefaulte Gefäßbündel (siehe Bildtafel 5 Abbildung D). Das Gewebe oberhalb der Gefäßbündel war beige bis braun verfärbt und mit Fruchtkörpern von *D. bryoniae* übersät (siehe Bildtafel 5 Abbildung C). Das restliche Gewebe schien noch vital. Bei den Blattstielen zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Während bei den Stängeln jedoch keiner der zehn untersuchten Objekte bereits vertrocknet war, konnten bei den Blattstielinfektionen drei von zehn als komplett vertrocknet eingestuft werden. Die Blattstiele waren schwarz verfärbt, nekrotisch und zeigten eine stark verdrillte Form. Fruchtkörper des Pilzes konnten in den vermuteten Abknickstellen, sowie an der Blattstielbasis gefunden werden (siehe Bildtafel 6 Abbildung D und E). Wie anhand von Bildtafel 6 Abbildung E erkennbar, ist der angrenzende Stängel vital. Des Weiteren konnte durch Abreißen des Blattstieles an der Blattbasis festgestellt werden, dass das Gewebe im Bereich des Knotenpunktes keine Krankheitssymptome aufwies (siehe Bildtafel 6 Abbildung F). Neben den vertrockneten Blattstielen konnten zwei Blattstiele mit einer *D. bryoniae* Stiefäule dokumentiert werden. Die Blattstiele waren weich und wiesen einen wässrigen Branton auf (siehe Bildtafel 6 Abbildung C). In Teilbereichen waren sie komplett schwarz verfärbt. Die Abknickstelle befand sich mittig bis kurz oberhalb der Blattstielmitte. Die dazugehörige Blattfläche war bereits komplett nekrotisch. Die beginnende Blattstiefäule zeichnet sich durch ähnliche Symptome wie die beginnende Gummistängelkrankheit aus. Die Blattstiele blichen aus und veränderten ihre Farbe über gelb und hellbraun (siehe Bildtafel 6 Abbildung A) zu den Farben der späteren Stadien der Infektion (dunkelbraun, schwarz). Im Bereich von ehemaligen Verletzungen konnten auch diesmal wieder Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden (siehe Bildtafel 6 Abbildung B). Zwei Blattstiele zeigten äußerlich noch keine Symptome einer Stiefäule (siehe Bildtafel 5 Abbildung E). Vereinzelt konnten lediglich auf kleinen verheilten Wunden Fruchtkörper gefunden werden. Ein Blattstiel zeigte an der Abrissstelle zum Blatt erste Symptome einer Stiefäule (siehe Bildtafel 5 Abbildung F).

Tabelle 5: Übersicht der Anzahl der erkrankten/gesunden Stängel- und Blattstielabschnitte durch Injektion von *Didymella bryoniae* Pyknosporen in die Markhöhle der Stängel und Blattstiele. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

	Stängel	Blattstiele
Keine Infektion	3	0
Keine Infektion; DB FK auf verschlossenen Verletzungen	3	2
Beginnende Infektion	1	3
Infektion	3	2
Vertrocknet	0	3
Gesamtanzahl	10	10

Neben der Infektion der Stängel und Blattstiele durch Injektion der Konidiensuspension in die Markhöhle, wurden weitere Stängel und Blattstiele mittels Konidiensuspension besprüht. Die Applikation der Konidiensuspension auf jenen freiliegenden Seitenzweigen der Pflanzen resultierte bei den Blattstielen in insgesamt acht von zehn Fällen in einer Infektion, während *D. bryoniae* bei keinem der zehn Stängel eine Infektion setzen konnte (siehe Tabelle 6). Auf einem Großteil der Stängel konnten jedoch Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf verschlossenen Wunden gefunden werden. In Bildtafel 7 Abbildung B und C sind die Fruchtkörper von *D. bryoniae* als kleine, schwarze, ins Gewebe eingesunkene Punkte zu erkennen. Das Gewebe unter den Fruchtkörpern begann sich dunkel zu verfärben (siehe Bildtafel 7 Abbildung B). Die Fruchtkörper bildeten sich auf ehemaligen Wunden der Stängel, die bereits bei der künstlichen Applikation der Konidiensuspension von der Pflanze verschlossen waren. Sowohl in Bildtafel 7 Abbildung B, als auch in Bildtafel 7 Abbildung C sind deutliche bräunliche Zonen um die verschlossenen Wunden erkennbar. Lediglich zwei Stängel zeigten keinerlei Anzeichen einer Infektion (siehe Tabelle 6). Sie wiesen die für gesunde Stängel typische dunkelgrüne Farbe und hohe Festigkeit auf. Ein Stängel fiel durch eine leichte Abänderung der Farbe von dunkelgrün auf hellgrün-bräunlich auf (siehe Bildtafel 7 Abbildung A). Die Festigkeit des Stängels war jedoch noch gegeben. Bei den Blattstielen zeigte sich ein anderes Bild. Bei insgesamt acht der zehn künstlich inokulierten Blattstiele konnte *D. bryoniae* eine Infektion setzen. Fünf Blattstiele zeigten typische Fäulnissymptome (siehe Bildtafel 7 Abbildung F), während die restlichen drei bereits vollkommen vertrocknet waren (Daten nicht gezeigt).

Die bereits vertrockneten Blattstiele waren komplett schwarz und stark verdreht. Sowohl bei den gefaulten, als auch bei den bereits vertrockneten Blattstielen konnten Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden. Die gefaulten Blattstiele wechselten ihre Farbe von einem vitalen satten hellgrün über eine wässrige Braunverfärbung zu schwarz. In diesen Bereichen konnten auch zahlreiche ins Gewebe eingesunkene dunkelbraune bis schwarze Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden. Ein Abknicken der weichen Blattstiele erfolgte in allen acht Fällen mittig der Blattstiele bis kurz oberhalb der Mitte der Blattstiele. Die Abknickstelle war meistens bereits dunkelbraun bis schwarz verfärbt (siehe Bildtafel 7 Abbildung F). Die Blattflächen der zehn künstlich inokulierten Blattstiele waren sowohl bei den gefaulten bzw. vertrockneten Blattstielen als auch bei den gesunden Blattstielen komplett nekrotisch. Teilweise konnten auch Fruchtkörper des Pilzes auf den Blättern gefunden werden. Bei einem der zwei restlichen Blattstiele konnten *D. bryoniae* Fruchtkörper auf einer kleinen bereits verschlossenen Wunde gefunden werden (siehe Bildtafel 7 Abbildung E). Der Blattstiel selbst zeigte noch keine Fäulnissymptome (siehe Bildtafel 7 Abbildung D). Lediglich auf einem der zehn untersuchten Blattstiele konnten weder Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden, noch zeigte der Blattstiel irgendwelche Veränderungen, die auf eine Infektion mit dem Pilz deuten würden. Die Blattfläche dieses gesunden Blattstieles wies jedoch Krankheitssymptome auf.

Tabelle 6: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängel- und Blattstielabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pyknosporen. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

	Stängel	Blattstiele
Keine Infektion	2	1*
Keine Infektion; DB FK auf verschlossenen Verletzungen	7	1

Beginnende Infektion	1	0
Infektion	0	5
Vertrocknet	0	3**
Gesamtanzahl	10	10

*Blatt zeigt bereits Krankheitssymptome, **DB FK auf Blattstielen gefunden

Als dritte Inokulationsvariante wurde die Konidiensuspension in eine künstlich gezogene Rinne von 0,5 x 5cm gesprüht und der Stängel anschließend darauf gelegt. Die Applikation von *D. bryoniae* Pyknosporen im Bereich der Stängelunterseite von freiliegenden Seitenzweigen ergab unter den vorherrschenden Wetterbedingungen zum Großteil keine Infektion (siehe Tabelle 7). An drei Stängelabschnitten konnte *D. bryoniae* keine Infektion setzen. Sowohl an der Stängeloberseite, als auch an der Stängelunterseite konnten keine Fruchtkörper gefunden werden. Die Stängel zeigten eine für gesunde Pflanzen übliche satte, dunkelgrüne Färbung und waren fest. Massive Verletzungen auf den Stängelunterseiten wurden von der Pflanze vor der Applikation der Konidiensuspension erfolgreich verschlossen. Die potentiellen Eintrittspforten konnten somit von *D. bryoniae* nicht genutzt werden. Die Bereiche neben den Verletzungen waren vollkommen vital und wiesen die typische hellgrüne Färbung der gesunden Stängelunterseite auf. Bei fünf weiteren Stängelabschnitten konnten zwar keine Zeichen einer Stängelfäule gefunden werden, jedoch wiesen die Stängel im Bereich bereits bestehender, verschlossener Verletzungen Fruchtkörper des Pilzes auf. Ein Stängelabschnitt zeigte eine möglicherweise beginnende Stängelinfektion. Die Farbe des Stängelabschnittes war deutlich heller als jene der gesunden Stängel. Ein Verlust der Festigkeit konnte jedoch noch nicht festgestellt werden. Die angrenzenden Blattstiele waren ebenso am Beginn der Vergilbung. Die, auf der Unterseite des Stängels vorhandene Verletzung war durch eine bräunliche Zone umrandet.

Einer von zehn untersuchten Stängeln wies deutliche Anzeichen einer Stängelfäule auf. Nahe des Knotenpunktes konnte ein länglicher nekrotischer Bereich dokumentiert werden, der Fruchtkörper von *D. bryoniae* aufwies. Der Stängelabschnitt war weich (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 7: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pyknosporen im Bereich der Stängelunterseite. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Keine Infektion	3
Keine Infektion; DB FK auf verschlossenen Verletzungen	5
Beginnende Infektion	1
Infektion	1
Gesamtanzahl	10

3.8.4 Vergleich der Inokulation von mechanisch beschädigten Stängeln und unbeschädigten Stängeln

Bei der vierten Inokulationsvariante der Stängel und Blattstiele wurden mechanisch beschädigte Stängel (Hagel+) ausgesucht und der Bereich zwischen zwei Knotenpunkten mit Konidien suspension besprüht. Zum Vergleich wurden am selben Seitenzweig distal zum Zentrum der Pflanze Stängelabschnitte ohne Hagelschäden (Hagel-) ausgewählt und ebenfalls mit Konidien suspension besprüht. Dabei konnte *D. bryoniae* bei sechs der elf ausgewählten Stängel keine Infektion setzen. Auf diesen Stängeln waren lediglich Fruchtkörper auf den Hagelschäden zu beobachten, während der restliche Stängel vital erschien (siehe Tabelle 8). Die verschlossenen, mit Fruchtkörper besetzten Verletzungen sind mit hellbraunen Zone vom restlichen gesunden Gewebe abgetrennt. Im Bereich eines abgetrennten Blattstiels konnten *D. bryoniae* Fruchtkörper gefunden werden. Das Gewebe im Bereich dieses Knotenpunktes begann sich bräunlich zu verfärben. Die Pflanze sonderte im Bereich der Abrissstelle eine tropfenförmige, bernsteinfärbige, harzige Substanz ab (siehe Bildtafel 8 Abbildung C). Anhand von Bildtafel 8 Abbildungen A und B sieht man den Unterschied zwischen einem massiven Hagelschaden und einer kleineren, oberflächlichen Verletzung. In beiden Fällen war die Verletzung bereits vor der Behandlung der Stängel mit der Konidien suspension verschlossen. Sowohl im Falle des massiven Hagelschadens, als auch bei der oberflächlichen Verletzung konnte der Pilz keine Infektion setzen. Es wurden lediglich Fruchtkörper auf den ehemaligen Wunden gefunden. Im Vergleich dazu zeigt Bildtafel 8 Abbildung D das Resultat einer Inokulation eines Stängels mit frischem, während der Applikation der Sporen nicht verschlossenen Hagelschaden (Hagelschaden auf Bildtafel 8 Abbildung D nicht sichtbar). Der Stängelabschnitt war bräunlich bis schwarz verfärbt und komplett vertrocknet. Pilzfruchtkörper konnten auf der Stängeloberseite gefunden werden. Im Inneren des Stängels bzw. in der ehemaligen Markhöhle des Stängels wurde ein weißes, fädiges Mycel gefunden (siehe Bildtafel 8 Abbildung E).

Insgesamt konnten drei Hagel+ Stängelabschnitte mit einer potentiellen beginnenden Gummistängelkrankheit gefunden werden. In allen drei Fällen war das Ergebnis jedoch nicht eindeutig. Einer dieser Stängel war beiderseits der Hagelschäden noch sattgrün und vital. Das Gewebe begann jedoch proximal zum Knotenpunkt weich zu werden und sich bräunlich zu verfärben. Ebenso konnten Fruchtkörper auf den Hagelschäden gefunden werden. Ein weiterer Stängelabschnitt mit potentieller beginnender Stängelfäule zeigte den beginnenden Prozess des Ausbleichens im Zuge einer Stängelfäule. Die Festigkeit des Stängels war jedoch noch gegeben. Der benachbarte Blattstielabschnitt zeigt ebenfalls Symptome einer beginnenden Stielhäule, während der angrenzende Blütenstiel bereits komplett verfault und mit Pilzfruchtkörpern übersät war. Im Bereich des Knotenpunktes grenzte sich das scheinbar noch gesunde Stängelgewebe vom gefaulten Blütenstielgewebe durch eine bräunliche Zone ab.

Im Falle der jüngeren Stängelabschnitte ohne Hagelschäden konnte *D. bryoniae* keine Infektion setzen (siehe Tabelle 8). Drei Stängelabschnitte zeigten keinerlei Symptome eines Krankheitsbildes. Die restlichen sieben Stängelabschnitte wiesen im Bereich kleiner oberflächlicher Verletzungen Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf. Die Stängel an sich waren jedoch gesund und wiesen eine satte hell- bis dunkelgrüne Farbe auf, die typisch für jüngere Stängelabschnitte ist. Anhand eines Stängels konnte die Ausbreitung einer Infektion ausgehend von einem gefaulten Blattstiel beobachtet werden. Das Gewebe im Übergangsbereich zwischen Blattstiel und Stängel war orange-bräunlich bis schwarz verfärbt (siehe Bildtafel 8 Abbildung F) mit einer Ansammlung von pilzlichen Fruchtkörpern. Der Fäulnisprozess begann distal zum Knotenpunkt fortzuschreiten.

Tabelle 8: Übersicht der Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pykno­sporen im Bereich der Stängeloberseite zwischen zwei Knotenpunkten. Pro Seitenzweig wurden zwei Stängelabschnitte (Hagel+ und Hagel-) infiziert. Hagel+= älterer Stängelabschnitt mit Hagelschaden, Hagel-= jüngerer Stängelabschnitt ohne Hagelschaden. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

	Hagel+	Hagel-
Keine Infektion	0	3
Keine Infektion; DB FK	6	7
Beginnende Infektion	3	0
Infektion	1*	0
Vertrocknet	1	0
Gesamtzahl	11	10

*Übergang einer beginnenden Infektion zur tatsächlichen Gummistängelkrankheit

3.8.5 Inokulation der männlichen Blütenstiele

Neben der Inokulation der Stängel und Blattstiele wurde auch eine künstliche Inokulation der männlichen Blütenstiele durchgeführt. Die Blütenstiele selbst waren in allen Fällen komplett vertrocknet (siehe Tabelle 9). Sie wiesen eine dunkelbraune bis schwarze Farbe auf und waren in den meisten Fällen stark verdreht. Auf allen Blütenstielen konnten Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden (siehe Bildtafel 9 Abbildung E). Diese befanden sich teilweise mittig des Blütenstiels, im Bereich der Einstich- bzw. Ausstichstelle der Injektionsnadel für die Inokulation der Konidien­sus­pen­sion, sowie an der Basis der Blütenstiele oder über den gesamten Blütenstiel verteilt. Großteils zeigten die, den Blütenstielen angrenzenden Stängel keinerlei Symptome einer Stängelfäule. Im Bereich der Knotenpunkte war ein deutlicher Farbübergang zwischen gesundem Stängelgewebe und infiziertem bzw. vertrocknetem, mit Fruchtkörpern besetztes Blütenstielgewebe zu erkennen. In diesem Übergangsbereich kam es zur Ausbildung einer ringartigen Barriere zwischen gesundem und erkranktem Gewebe (siehe Bildtafel 9 Abbildung A). Des Weiteren konnte ein tropfenartiges Austreten einer bernsteinfärbigen, harzigen Substanz an der Abbruchstelle von Blüten- oder Blattstielen beobachtet werden (siehe Bildtafel 9 Abbildung A). Bei zwei Proben konnte am Blütenstiel angrenzenden Stängel eine beginnende Stängelfäule festgestellt werden. Der Stängel zeigte eine erste Aufhellung im Bereich des Knotenpunktes. Das Gewebe um den Knotenpunkt herum begann sich bräunlich zu verfärben (siehe Bildtafel 9 Abbildung C). Die Festigkeit des Stängels war jedoch noch erhalten. An der Blattstiel- und Blütenstielbasis, sowie mittig des Blütenstiels (siehe Bildtafel 9 Abbildung E) waren Fruchtkörper des Pilzes zu erkennen. Ebenso konnte man das beginnende Ausbleichen im Rahmen einer Stängelfäule erkennen (siehe Bildtafel 9 Abbildung B). Der Stängel verfärbte sich dabei distal zum Blütenstiel angrenzenden Knotenpunkt gelblich. In einem Fall konnte *D. bryoniae* erfolgreich eine Infektion setzen und die Gummistängelkrankheit auslösen, die in diesem Fall bereits in ihrem Endstadium zu sehen ist (siehe Bildtafel 9 Abbildung D). Der betroffene Blütenstiel, sowie der angrenzende Stängel waren bereits komplett vertrocknet. Sie wiesen eine dunkelbraune bis schwarze Verfärbung

auf. Während Fruchtkörper auf dem Blütenstiel nachgewiesen werden konnten, schien der Stängel keine Fruchtkörper aufzuweisen.

Tabelle 9: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension in die Markhöhle männlicher Blütenstiele. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul, ang. Stängel vt= angrenzender Stängel vertrocknet.

Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK	12
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel beg. Stängelf	2
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel f bzw. vt	1
Gesamtzahl	15

Inokulation der männlichen und weiblichen Blüten

Eine Inokulation der männlichen Blüten mittels Konidiensuspension ergab in zehn von fünfzehn Fällen keine Infektion der angrenzenden Stängel (siehe Tabelle 10). Die Blütenstiele hingegen waren alle komplett vertrocknet, schwarz verfärbt und mit Fruchtkörpern besetzt. Diese konnten wiederum an der Blütenstielbasis, mittig der Blütenstiele bzw. am gesamten Blütenstiel verteilt gefunden werden. Blüten und Blütenstiele waren bereits voneinander getrennt (siehe Bildtafel 10 Abbildung A). Insgesamt zweimal konnten erste Anzeichen einer Stängelfäule dokumentiert werden. Ähnlich wie in den vorhergehenden Infektionsversuchen zeigte sich die beginnende Stängelfäule durch ein beginnendes Ausbleichen der Stängel (siehe Bildtafel 10 Abbildung B). Die Festigkeit der Stängel war jedoch in beiden Fällen noch gegeben. Drei der insgesamt fünfzehn untersuchten männlichen Stängelabschnitte waren gefault bzw. bereits vertrocknet (siehe Bildtafel 10 Abbildung C). Fruchtkörper konnten sowohl an den gefaulten, als auch an den vertrockneten Stängeln gefunden werden. Im Gegensatz zu den infizierten Blütenstielen zeigten die Kontrollen (= unbehandelte männliche Blütenstiele) in zwölf von fünfzehn Fällen keine Anzeichen einer Gummistängelkrankheit (siehe Tabelle 10). Bei einer Kontrolle konnte eine beginnende Stängelfäule festgestellt werden, während zwei weiter faulig, weich bzw. bereits vertrocknet waren. Die Blütenstiele selbst waren ähnlich wie bei den infizierten komplett vertrocknet. Fruchtkörper konnten in einigen Fällen auf den Blütenstielen gefunden werden, auf anderen jedoch nicht.

Tabelle 10: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf Antheren der männlichen Blüten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Blüten. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul.

	Künstlich infiziert	Kontrollen
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK	10	12
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel beg. Stängelf	2	1
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel f	3	2
Gesamtzahl	15	15

Neben einer künstlichen Inokulation der männlichen Blüten wurden insgesamt auch fünfzehn weibliche Blüten mit Konidien suspension behandelt. Die Suspension wurde dafür auf die Narbe der weiblichen Blüte getropft. Eine inokulierte Blüte konnte bei der Bonitur nicht mehr gefunden werden (siehe Tabelle 11). Im Vergleich zur Infektion der männlichen Blüten, bei welcher alle Blütenstiele vertrocknet waren, konnten bei der Infektion der weiblichen Blüten insgesamt drei ohne Blütenstielinfektion diagnostiziert werden (siehe Tabelle 11 und Bildtafel 10 Abbildung D). In diesen Fällen entwickelte sich aus dem Blütenstiel der Fruchstiel. Dieser war jeweils vital, symptomlos und dunkelgrün gefärbt. Ebenso konnte der Pilz keine Schwarzfäule bei der sich bildenden Frucht auslösen. Die angrenzenden Stängel zeigten keine Symptome einer Stängelfäule. In insgesamt fünf von fünfzehn Fällen kam es zu einer Infektion der Blütenstiele. Diese waren vollkommen vertrocknet, schwarz verfärbt und wiesen Fruchtkörper von *D. bryoniae* über den Blütenstiel verteilt auf. Bei einem Großteil der vertrockneten Blütenstiele befanden sich zahlreiche Fruchtkörper an der Blütenstielbasis (siehe Bildtafel 10 Abbildung E). Bei Entfernung des Blütenstiels war das darunterliegende gräulich bis schwarz verfärbte, kollabierte Gewebe im Bereich des Knotenpunktes sichtbar (siehe Bildtafel 10 Abbildung F). Bei genauerem Betrachten war ein dünnes Geflecht aus Hyphen zu erkennen. Der Stängel schien rund um den Knotenpunkt aufgeheilt aus. In insgesamt zwei Fällen konnte ein Übergang von einer, auf den Blütenstiel begrenzten Infektion zu einer beginnenden Stängelfäule diagnostiziert werden. Der Blütenstiel selbst war vertrocknet und mit Fruchtkörpern des Pilzes übersät. Das Gewebe im Bereich des Knotenpunktes war bräunlich verfärbt und faul. Der Stängel begann sich gelblich zu verfärben. In vier von fünfzehn Fällen konnte der Pilz neben einer Blütenstielinfektion auch den angrenzenden Stängel infizieren. Blütenstiel und Frucht waren komplett vertrocknet. Der Stängel war gelblich bis braun verfärbt, wies eine weiche Konsistenz auf bzw. war vollkommen vertrocknet. Im Vergleich dazu wiesen auch zwei der sieben Kontrollen (= unbehandelte Blüten) eine Stängelfäule auf. Einer der beiden Stängel war dabei bereits vollkommen vertrocknet. Bei den restlichen fünf Kontrollen konnten sich große, vitale Früchte entwickeln (siehe Tabelle 11). Sowohl die Früchte als auch die Fruchstiele und angrenzenden Stängel waren gesund.

Tabelle 11: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf die Narbe der weiblichen Blüten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Blüten. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul.

	Inokuliert	Kontrollen
Gesunder Fruchstiel bzw. Frucht	3	5
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; Stängel gesund	5	0
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel beg. Stängelf	2	0
Vertrockneter Blütenstiel mit DB FK; ang. Stängel f	4	2
Nicht gefunden	1	0
Gesamtzahl	15	7

3.8.6 Keimungsversuch der Samen nach Inokulation mit *Didymella bryoniae*

Sowohl bei den infizierten, als auch bei den nicht infizierten Samen wurde eine sehr geringe Keimungsrate festgestellt (siehe Tabelle 12). Die Keimungsrate unter Freilandbedingungen betrug bei den inokulierten Samen ca. 23 %, während sie bei den Kontrollen lediglich 7 % erreichte. Das Wachstum der Pflanzen war dabei unterschiedlich weit fortgeschritten (Anzahl der Folgeblätter variierte zwischen zwei und vier). Bei den infizierten Samen zeigten alle Keimblätter, der aus den Samen entstandenen Pflanzen, Blattflecken. Diese waren in den einzelnen Fällen unterschiedlich weit fortgeschritten und vollstreckten sich meist einseitig von der Blattbasis bis zur Blattspitze einschließlich des Blattstielansatzes und des Blattstiels (siehe Bildtafel 11 Abbildung B). Das Gewebe im Bereich der Blattflecken war meist bereits vollkommen nekrotisch und vertrocknet. Die Bereiche um die Blattflecken waren vergilbt (siehe Bildtafel 11 Abbildung C). Die Ränder der Blattflecken rollten sich häufig nach oben ein (siehe Bildtafel 11 Abbildung C und D). Eine Ausbreitung der Infektion in gesundes Blattgewebe konnte anhand von Bildtafel 11 Abbildung C festgestellt werden. Das Gewebe an der Blattstielbasis war weich und grün-bräunlich verfärbt. Die Blattflecken konnten bei den meisten Keimblätter-Paaren auf den gegenüberliegenden Blattinnenseiten gefunden werden (siehe Bildtafel 11 Abbildung C). Im Bereich der Blattflecken konnten teilweise auch tropfenförmige, bernsteinfarbige, harzige Substanzen festgestellt werden (siehe Bildtafel 11 Abbildung C). Die Fruchtkörper bildeten sich hauptsächlich im Zentrum der Blattflecken (siehe Bildtafel 11 Abbildung B und D) und ordneten sich häufig in typischen konzentrischen Ringen an (siehe Bildtafel 11 Abbildung B_Bildausschnitt). Ein Teil der Keimblätter wies zusätzlich Fraßspuren von Gartenkugelspringern auf (siehe Bildtafel 11 Abbildung B), auf welchen bei genauerer Betrachtung ebenfalls Fruchtkörper des Pilzes gefunden werden konnten. Die Keimblätter der Kontrollpflanzen hingegen (nicht infizierte Samen) wiesen keine Blattflecken auf (siehe Bildtafel 11 Abbildung A). Die erste Versuchswiederholung unter Laborbedingungen resultierte in einer 65%igen Keimungsrate der Kontrollen (siehe Abbildung 13 und Bildtafel 11 Abbildung E), während bei den beiden anderen Ansätzen (Samen in Konidien suspension [c]= 10⁶ Sporen/ml kurz geschwenkt bzw. 10 Minuten in Konidien suspension [c]= 10⁶ Sporen/ml eingelegt) keine gekeimten Samen gefunden wurden (siehe Bildtafel 11 Abbildung F). Die Keimungsrate betrug somit in beiden Fällen 0% (siehe Abbildung 13). Des Weiteren wiesen die Keimblätter der Kontrollen keine Blattflecken auf. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei der zweiten Versuchswiederholung ab. Dabei konnte im Fall der Kontrollen eine Keimungsrate von 35% bestimmt werden, während bei den inokulierten Samen wiederum keine Samen gekeimt waren (siehe Abbildung 14).

Tabelle 12: Anzahl der aufgegangenen Pflanzen, sowie das Wachstumsstadium der Pflanzen der drei Versuchswiederholungen A, B und C. FB= Folgeblätter.

Wiederholungen	Inokuliert	Kontrollen
A	2 (2FB; 4FB)	2 (4FB; 4FB)
B	4 (2FB; 3FB; 4FB; 4FB)	-
C	1 (2FB)	-

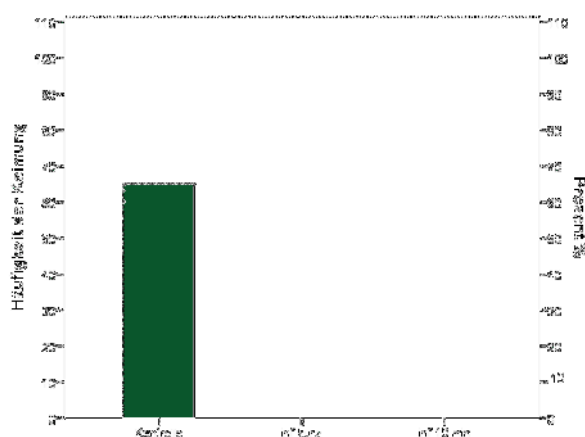


Abbildung 13: Keimungsrate der Versuchswiederholung 1 unter Laborbedingungen. inf kurz= Samen kurz in Konidien suspension [c]= 10^6 Sporen/ml eingelegt, inf 10 min= Samen für 10 Minuten in Konidien suspension [c]= 10^6 Sporen/ml geschwenkt.

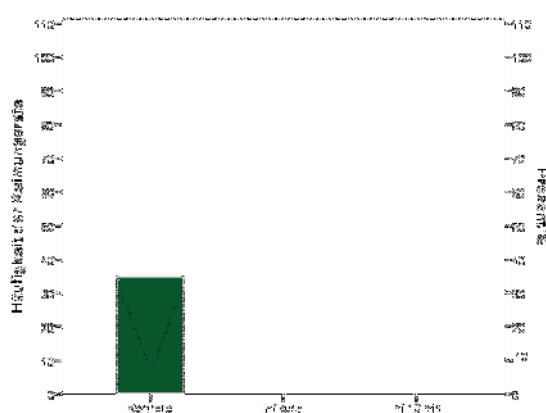


Abbildung 14: Keimungsrate der Versuchswiederholung 2 unter Laborbedingungen. inf kurz= Samen kurz in Konidien suspension [c]= 10^6 Sporen/ml eingelegt, inf 10 min= Samen für 10 Minuten in Konidien suspension [c]= 10^6 Sporen/ml geschwenkt.

3.8.7 Inokulation der jungen Früchte

Bei den Kontrollen konnten in zwölf von fünfzehn Fällen keine Anzeichen einer Infektion gefunden werden. Bei den inokulierten Früchten hingegen betrug die Anzahl der gesunden Früchte lediglich sieben (siehe Tabelle 13). Die gesunden Früchte wiesen eine dunkelgrüne bis orange Färbung, sowie eine feste Konsistenz auf (siehe Bildtafel 12 Abbildung A). Bei ein paar der gesunden inokulierten Früchten konnten jedoch bernsteinfarbige, tropfenförmige, harzige Substanzen auf der Fruchtschale bzw. am Blütenboden nachgewiesen werden (siehe Bildtafel 12 Abbildung B). Bildtafel 12 Abbildung C zeigt dieselben Strukturen, die einen dichten Verschluss um eine Wunde bildeten. Das Vorhandensein von Fruchtkörpern im Bereich der Knotenpunkte bzw. auf benachbarten Blattstielansätzen führte großteils zu keiner Ausbreitung der Infektion in die Fruchstiele bzw. die Frucht selbst. Der Knotenpunkt schien eine essentielle Barriere für die Ausbreitung von *D. bryoniae* darzustellen. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den inokulierten Früchten konnten nur eine geringe Anzahl an Früchte mit typischen Schwarzfäule-Symptomen gefunden werden. Bildtafel 12 Abbildung D zeigt eine inokulierte komplett gefaulte Frucht. Das Fruchtfleisch war weich. Die Frucht war aufgrund eines Konsistenzverlustes komplett zusammengesackt. Auf der weichen Fruchtschale konnten ins Gewebe eingesunkene, schwarze, kugelige Fruchtkörper von *D. bryoniae* entdeckt werden. Das Gewebe unter den Fruchtkörpern war braun verfärbt und nahm stellenweise bereits die typische schwarze Färbung an (im Bild nicht

sichtbar), die der Fruchtfäule auch den Namen Schwarzfäule verleiht. Während bei den Kontrollen lediglich eine vertrocknete Frucht gefunden werden konnte, waren bei den inokulierten Früchten insgesamt sieben komplett vertrocknet und schwarz verfärbt (siehe Bildtafel 12 Abbildung E). Fruchtsiel und Frucht waren stets voneinander getrennt. Sowohl auf den Fruchtsielen (siehe Bildtafel 12 Abbildung F) als auch auf den Früchten selbst konnten Fruchtkörper des Pilzes nachgewiesen werden. Mikroskopische Untersuchungen bestätigten im Falle einer Frucht neben den häufig vorkommenden Pyknidien auch das Vorhandensein von Pseudothecien mit bereits reifen Ascosporen.

Tabelle 13: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte zwischen den inokulierten und nicht inokulierten (Kontrollen) jungen Früchten.

	Inokuliert	Kontrollen
Gesund	7	12
Faul	1	2
Vertrocknet	7	1
Gesamtanzahl	15	15

3.8.8 Inokulation ältere Früchte ohne mechanische Verwundung/mit mechanischer Verwundung

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Früchten ohne mechanische Verwundung bzw. mit mechanischer Verwundung wies ein Großteil der Früchte keine Anzeichen einer Infektion auf (siehe Tabelle 14). Die Früchte waren groß, wiesen die typische Form des Ölkürbisses im reifen Zustand auf und waren in den meisten Fällen bereits gelb bis orange verfärbt (siehe Bildtafel 13 Abbildung A). Auf manchen bereits vor der Inokulation verschlossenen Hagelschäden konnten vereinzelt Fruchtkörper des Pilzes gefunden werden. Im Vergleich dazu konnten bei allen Früchten mit mechanischer Verwundung massivste Ansammlungen von Fruchtkörpern auf den künstlichen Wunden festgestellt werden (siehe Bildtafel 14 Abbildungen E und F). Das Gewebe im Bereich dieser Wunden erschien durch die Ansammlung der Fruchtkörper gräulich bis schwarz. Die Früchte an sich waren jedoch vollkommen vital (Früchte wiesen bei Druck mit Finger eine harte Konsistenz der Schale auf, waren groß, rundlich und gelb bis orange gefärbt). Bei manchen inokulierten Früchten (ohne mechanische Verwundung) konnten Ansammlungen von bernsteinfärbigen, harzigen, tropfenförmigen Substanzen im Bereich des Blütenbodens (siehe Bildtafel 13 Abbildung C) oder auf bereits verschlossenen Hagelschäden (siehe Bildtafel 13 Abbildung D) gefunden werden. Ebenso bildeten orange-bräunliche Zonen um die verschlossenen Hagelschäden eine Barriere zwischen dem sekundären Wundgewebe und der gesunden Fruchtschale (siehe Bildtafel 13 Abbildung B). Auf einer gesunden Frucht ohne mechanische Verwundung konnte Ende August eine Gewebsveränderung festgestellt werden, die man als Sonnenfleck bezeichnet. Das Gewebe im Bereich des Fleckes hellte sich dabei auf und nahm eine weiße Farbe an. Im Zentrum des Fleckes konnten wulstartige, weiße Verhärtungen der Fruchtschale festgestellt werden (siehe Bildtafel 13 Abbildung E). Auf diesen bildeten sich später zahlreiche Fruchtkörper des Pilzes (siehe Bildtafel 13 Abbildung F). Teilweise konnten sich auch Schwärzepilze auf diesem Gewebeabschnitt etablieren. Die Ausbildung von pilzlichen Fruchtkörpern im Bereich des Sonnenflecks ließ das Gewebe gräulich erscheinen. Bildtafel 13 Abbildung F zeigt im unteren Bereich des Sonnenflecks eine rissige Struktur. Lediglich eine Frucht (ohne mechanische Verwundung) zeigte bereits Ende

August Anzeichen einer Fäule. Ähnlich wie zuvor bildeten sich zahlreiche Fruchtkörper von *D. bryoniae*, sowie von diversen Schwärzepilzen auf einem kreisrunden, großen Sonnenfleck. Das Gewebe im Bereich des Sonnenflecks war bereits weich und bräunlich-schwarz verfärbt. Mit fortschreitender Vegetationsdauer konnte eine Ausbreitung der Infektion auf Sonnenfleck-freie Bereiche der Fruchtschale festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ein gleiches Phänomen zeigte sich in den zwei Fällen der Kontrollen, bei welchen eine beginnende Fäule diagnostiziert wurde. Bildtafel 14 Abbildungen A bis F zeigen den, vom Kürbis induzierten Verschluss der künstlichen mechanischen Verwundung. Am ersten Tag nach der Verwundung konnten in der Früh massivste Ansammlungen von durchsichtigen bis milchigen Tropfen entdeckt werden (Bildtafel 14 Abbildung A). Am selben Tag zu Mittag waren die Substanzen großteils ins Gewebe eingesickert und bildeten einen glänzenden Verschluss der Wunde (Bildtafel 14 Abbildung B). Zwei Tage später hatte der Film eine orange-bernsteinfärbige Farbe angenommen (Bildtafel 14 Abbildung C). Die Ausbildung von schwarzen, kugeligen, ins Gewebe leicht eingesunkenen Fruchtkörpern von *D. bryoniae* konnten einen Tag später auf der verschlossenen Wunde dokumentiert werden. Durch die Ansammlung der Fruchtkörper veränderte sich die Farbe des Wundgewebes und nahm einen gräulichen Schimmer an (Bildtafel 14 Abbildungen D und E). Ca. Zwanzig Tage danach konnte ein Abblättern des bereits rissig gewordenen Wundverschlusses nachgewiesen werden. Das Gewebe unter den abblätternden Schichten war glatt und frei von pilzlichen Strukturen (Bildtafel 14 Abbildung F).

Tabelle 14: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte ohne mechanische Verwundung, nach mechanischer Verwundung und den Kontrollen. Die Kontrollen sind unbehandelte ältere Früchte. DB FK = *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

	Ohne Verwundung	Mit Verwundung	Kontrollen
Gesund	14**	15*	13
Beginnende Fäule	1	0	2
Schwarzfäule	0	0	0
Gesamtanzahl	15	15	15

*DB FK zahlreich auf verschlossenen Verwundungsstellen vorhanden, **eine Frucht mit Sonnenflecken

3.8.9 Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle

Bei den künstlich verletzten Früchten mit Abdunkelung der Inokulationsstelle konnte lediglich eine gesunde Frucht gefunden werden. Auf der Verwundungsstelle konnten zahlreiche Fruchtkörper von *D. bryoniae* dokumentiert werden. Die Frucht wies jedoch keine weiteren Anzeichen einer Infektion auf (Daten nicht gezeigt). Bildtafel 15 Abbildungen A-D zeigen eine Frucht mit einer beginnenden Fäule. Zunächst bildete sich einige Tag nach der Inokulation ein glänzender Film über der Verwundungsstelle, der diese dicht abschloss (Bildtafel 15 Abbildung A). Ende August konnte leicht seitlich unterhalb der Verwundungsstelle ein Sonnenfleck (Bildtafel 15 Abbildung B) mit Fruchtkörpern von *D. bryoniae* diagnostiziert werden. Das Gewebe im Bereich der Fruchtkörper war bräunlich-schwarz verfärbt (Bildtafel 15 Abbildung C). Eine Ausbreitung der Infektion auf das, Sonnenfleck benachbarte Gewebe ist in Bildtafel 15 Abbildung D zu erkennen. Das Gewebe verfärbte sich aufgrund der massiven Ausbildung von *D. bryoniae* Fruchtkörpern, sowie Ansiedelung von Schwärzepilzen schwarz. Die Fruchtschale bzw. die Frucht waren jedoch noch hart. Ein Großteil der Früchte war mit Ende der Vegetationsperiode komplett gefault (siehe Tabelle 15). Bildtafel 15 Abbildungen E und F zeigen

den Beginn der Entwicklung der Fäule. Zunächst konnte seitlich neben allen Verwundungsstellen die Ausbildung von Sonnenflecken dokumentiert werden. In diesen Bereichen verfärbte sich das Gewebe komplett weiß. Die Struktur der Fruchtschale veränderte sich im Bereich der Sonnenflecken und bildete eine relativ gleichmäßig glatte bis leicht samtige Oberfläche. Das Gewebe unter dem Sonnenfleck sackte nach und nach ein (Bildtafel 15 Abbildung E). Auf den Sonnenflecken bildeten sich mit fortschreitender Vegetationsperiode Fruchtkörper von *D. bryoniae*, sowie von Schwärzepilzen (Bildtafel 15 Abbildung F). In weiterer Folge kollabierte das Gewebe unter dem Sonnenfleck gänzlich und brach ein. In diesem Stadium war das Fruchtfleisch im Inneren fast bis unter die Fruchtschale gefault. Die dunkelorange gefärbte Fruchtschale blieb als leere Hülle zurück. Durch Berührung brachen große Stücke der Fruchtschale ab. Die Fruchtschale machte einen wassergetränkten Eindruck. Die Frucht war vom Fruchts蒂el getrennt und verströmte den typischen Fäulnisgeruch (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 15: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte zwischen den Früchten ohne ritz hell, ohne ritz dunkel, ritz hell, ritz dunkel und den Kontrollen. Ohne ritz hell= ältere Früchte ohne künstliche Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ohne ritz dunkel= ältere Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle, ritz hell= ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ritz dunkel= ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kontrollen sind unbehandelte ältere Früchte.

	Ohne ritz hell	Ohne ritz dunkel	Ritz hell	Ritz dunkel	Kontrollen
Gesund	3*	4**	2***	1***	13
Beginnende Fäule	1	2	2	1	2
Fäule	6	4	6	8	0
Gesamtzahl	10	10	10	10	15

*kein Sonnenfleck, **in drei von vier Fällen kein Sonnenfleck, ***DB FK auf Verwundungsstelle, kein Sonnenfleck

3.8.10 Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle

In insgesamt zwei der zehn untersuchten Früchte mit Verwundung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle konnten keine Anzeichen einer Infektion gefunden werden. Die Früchte wiesen auf den Verwundungsstellen zahlreiche Fruchtkörper des Pilzes auf (Bildtafel 16 Abbildung C). Die Struktur im Bereich der Verwundungsstelle zeigte große Risse. Bei genauer Betrachtung konnten tropfenförmige, bernsteinfärbige Substanzen auf den Wunden festgestellt werden. Die Früchte selbst waren am Ende der Vegetationsperiode vital, komplett entwickelt und zeigten die schöne orange Färbung der reifen Früchte. Im Unterschied zu den Früchten mit einer beginnenden Fäule zeigten diese beiden Früchte jedoch keine Sonnenflecken (Bildtafel 16 Abbildung A). Bildtafel 16 Abbildung B hingegen zeigt eine Frucht mit einer beginnenden Fäule. Auf dem ausgedehnten Sonnenfleck bildeten sich zahlreiche Fruchtkörper von *D. bryoniae*, sowie von diversen Schwärzepilzen. Durch die Verfärbung des Gewebes im Bereich der Fruchtkörper ist die ursprüngliche weiße Färbung des Sonnenflecks nur mehr zu erahnen. Sowohl das Gewebe des Sonnenflecks, als auch jenes der Verwundungsstelle wies grobe, lange Risse auf und zeigte stellenweise die typische schwarze Färbung. In sechs von zehn Fällen waren die Früchte am Ende der Vegetationsperiode gefault (siehe Tabelle 15). Bildtafel 16 Abbildung D zeigt eine Frucht

mit einem einseitig seitlich ausgebildeten Sonnenfleck, der sich mit zunehmender Vegetationsperiode um die gesamte Verwundungsstelle ausdehnte und zunehmend mit *D. bryoniae*, sowie anderen Pilzen besiedelt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Entwicklung der Fäule lief analog zu jener, in „Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle“ beschrieben, ab. Des Weiteren konnte wiederum zahlreiche tropfenförmige, bernsteinfärbige Substanzen auf den Verwundungsstellen festgestellt werden. Ebenso war die Verwundungsstelle durch eine dunkelorange-bernsteinfärbige Zone vom umgebenden Sonnenfleckgewebe abgetrennt (Bildtafel 16 Abbildung E). Bildtafel 16 Abbildung F zeigt eine komplett kollabierte, faule Frucht, die bereits zu vertrocknen begann. Die Frucht war vom Fruchtsiel getrennt. Während der Fruchtsiel ebenso faul war, zeigte der angrenzende Stängel keine Anzeichen einer Infektion.

3.8.11 Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle

Bei der Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle konnten insgesamt vier gesunde Früchte gefunden werden. Drei der vier Fälle wiesen keinerlei Sonnenflecken auf. Bei einer gesunden Frucht konnten auf einer Quer- und einer Längsseite der Inokulationsstelle Sonnenflecken im Bereich der ehemaligen Klebebandstelle dokumentiert werden (Bildtafel 17 dunkel Abbildung A). Eine Besiedelung dieser Stellen mit *D. bryoniae* Fruchtkörpern konnte mit fortschreitender Vegetationsperiode beobachtet werden (Bildtafel 17 dunkel Abbildung B). Der Sonnenfleck selbst dehnte sich nicht mehr aus. Die Frucht wies äußerlich keine Anzeichen einer Infektion des Fruchtgewebes auf. Im Unterschied dazu zeigen Bildtafel 17 Abbildungen C und D eine eventuell beginnende Fruchtfäule. Das Gewebe im Bereich der Sonnenflecken war durch die Ansammlung von pilzlichen Fruchtkörpern dunkelschwarz gefärbt und tief eingesunken. Der Sonnenfleck selbst war durch eine dunkelorange Zone vom gesunden Gewebe abgetrennt. Die Festigkeit der Frucht war noch gegeben. In Bildtafel 17 Abbildung D ist eine Nahaufnahme der auf den Sonnenflecken ausgebildeten Fruchtkörper von *D. bryoniae* dargestellt. Das Gewebe um die Fruchtkörper war bräunlich und faul. In lediglich vier von zehn Fällen konnten gefaulte Früchte dokumentiert werden (siehe Tabelle 15). In allen vier Fällen waren Sonnenflecken im Ausgangsbereich der Fäule zu finden. Bildtafel 17 Abbildung E zeigt das Einbrechen des Gewebes im Bereich des Sonnenflecks. Die Fruchtschale machte einen bräunlichen, wassergetränkten Eindruck. Gegen Ende der Vegetationsperiode war das Fruchtfleisch komplett verfault. Von der zurückgebliebenen, orangen Fruchtschale brachen bei leichtem Druck große Stücke ab (Bildtafel 17 Abbildung F).

3.8.12 Inokulation der älteren Früchte ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, sowie ohne künstliche Verletzung

Bei der Inokulation der älteren Früchte ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, sowie ohne künstliche Verletzung konnten wiederum drei komplett gesunde Früchte gefunden werden (siehe Tabelle 15). Alle drei wiesen weder Sonnenflecken noch Anzeichen von *D. bryoniae* auf (Daten nicht gezeigt). In einem Fall konnte ausgehend von einem seitlich entstandenen Sonnenfleck eine beginnende Fäule dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Symptome waren identisch zu jenen oben beschriebenen (siehe beginnenden Fäule bei den drei anderen Inokulationsvarianten, künstliche Verletzung jedoch ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle, Abdunkelung der Inokulationsstelle jedoch ohne

künstliche Verletzung). Sechs von zehn Früchten waren gefault (Daten nicht gezeigt). Die Symptome waren wiederum identisch mit jenen aus den andern drei Inokulationsvarianten.

3.8.13 Inokulation der älteren Früchte-Vergleich Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation

Bei dem Vergleich der Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation konnten bereits einen Tag nach der Inokulation bei einem Großteil der Früchte Arabinogalaktan-Proteintropfen entdeckt werden (bei insgesamt sieben der zehn inokulierten Verwundungsstellen, sowie bei fünf der zehn nicht inokulierten Verwundungsstellen). Die Tropfen waren durchsichtig bis milchig weiß und unterschiedliche groß (siehe Bildtafel 18 Abbildung B). Bei zwei Früchten konnten sowohl bei den inokulierten, als auch bei den nicht inokulierten Verwundungsstellen noch keine wesentlichen hervorquellenden Substanzen dokumentiert werden. Die Verwundungsstellen waren jedoch in beiden Fälle glänzend und feucht. Am dritten Tag nach der Inokulation konnten bei allen Früchten (inokulierte bzw. nicht inokulierte Verwundungsstelle) Arabinogalaktan-Proteintropfen gefunden werden. Das Gewebe unter den Tropfen war bereits dunkel orange verfärbt. Die Tropfen hatten sich zu einem dichten, die Wunde verschließenden Meer zusammengeschlossen (siehe Bildtafel 18 Abbildung C). Einige Tage später war ein Großteil der zuvor ausgequollenen Substanzen wieder ins Gewebe eingesickert, um die Wunde vollkommen zu verschließen. Der Rest der AGPs bildete eine feste, blättrige Schicht, die durch die hohen Außentemperaturen zunehmend brüchig wurde (siehe Bildtafel 18 Abbildung D). In diesem Stadium konnten auf beiden Verwundungsstellen Fruchtkörper von *D. bryoniae* nachgewiesen werden. Bei einem direkten Vergleich der inokulierten mit den nicht inokulierten Verwundungsstellen konnten direkt nach der Verwundung keine Unterschiede zwischen den Wunden festgestellt werden (siehe Bildtafel 18 Abbildung A). Am ersten Tag nach der Inokulation wiesen die inokulierten Verwundungsstellen von insgesamt fünf Früchten deutlich mehr Tropfen auf als die nicht inokulierten Verwundungsstellen (siehe Tabelle 16). Bei zwei weiteren Früchten zeigte sich ein umgekehrtes Bild (siehe Bildtafel 18 Abbildung E). In insgesamt drei Fällen konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Am dritten Tag nach der Inokulation zeichnete sich ein bereits deutlicheres Bild ab. Während bei insgesamt acht der zehn Früchte bei den inokulierten Verwundungsstellen die Menge an austretenden Arabinogalaktan-Proteinen eindeutig höher war, konnte keine nicht inokulierte Verwundungsstelle mit einer mengenmäßig Überlegenheit an austretenden Arabinogalaktan-Proteine gefunden werden. Lediglich zwei Früchte zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen der inokulierten und der nicht inokulierten Wunde (siehe Bildtafel 18 Abbildung F).

Tabelle 16: Anzahl der Verwundungsstellen, aus welchen am 1. Tag nach der Verwundung, sowie am 3. Tag nach der Verwundung visuell mehr Arabinogalaktan-Proteintropfen austraten. J = nicht inokulierte Verwundungsstelle, L = inokulierte Verwundungsstelle, 1. Tag n. V. = 1. Tag nach der Verwundung, 3. Tag n. V. = 3. Tag nach der Verwundung.

	1. Tag n. V.	3. Tag n. V.
Kein Unterschied	3*	2
J	2	0
L	5	8
Gesamtzahl	10	10

*in zwei Fällen keine Bildung tropfenförmiger Arabinogalaktan-Protein sichtbar

3.9 Synthese Yariv Reagenz

Bei der Synthese des Yariv Reagenzes (siehe Abbildung 15) wurde eine Ausbeute von 53 mg (46 %) β -D-glucosyl Yariv Reagenz in Form eines dunkelroten-rotbraunen kristallinen Feststoffes erhalten. Die NMR (Kernspinresonanzspektroskopie) Daten stimmten mit jenen der Literatur überein. Sie wurden einerseits mit den Werten des β -D-glucosyl Yariv Reagenz aus Ganjian und Basile (1997) (für die aromatischen Signale) verglichen und andererseits mit den Werten für phenyl- β -D-Glucopyranosid aus Okamoto, Akiyama und Kobayashi (2004) (Glucose Signale). Der Schmelzpunkt lag bei 210-212°C und stimmte mit dem Schmelzbereich aus Ganjian und Basile (1997) (Schmelzbereich: 205-208°C) somit relativ gut überein.

Beim $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 300 MHz= Resonanzfrequenz für Wasserstoff) konnten für δ [ppm] folgende Signale erhalten werden: 3.16–3.69 (15H, m; Überlappung mit Peak für Wasser), 3.71 (3H, dd, $J = 10.5$ Hz, 5.2 Hz), 4.61 (3H, t, $J = 5.7$ Hz), 4.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 5.05 (3H, d, $J = 5.1$ Hz), 5.12 (3H, d, $J = 3.8$ Hz), 5.37 (3H, d, $J = 4.5$ Hz), 7.18 (6H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.7 (6H, d, $J = 8.7$ Hz), 15.9 (3H, s) ($^1\text{H-NMR}$ Sepktrum siehe Anhang).

DMSO-d_6 = sechsfach deuteriertes DMSO, δ = Änderung der Resonanzfrequenz= chemische Verschiebung, ppm= parts per million, H= Wasserstoff, J = Kopplungskonstante, m= Multiblett, t= Triplett, d= Dublett, dd= dupliziertes Dublett, s= Singulett

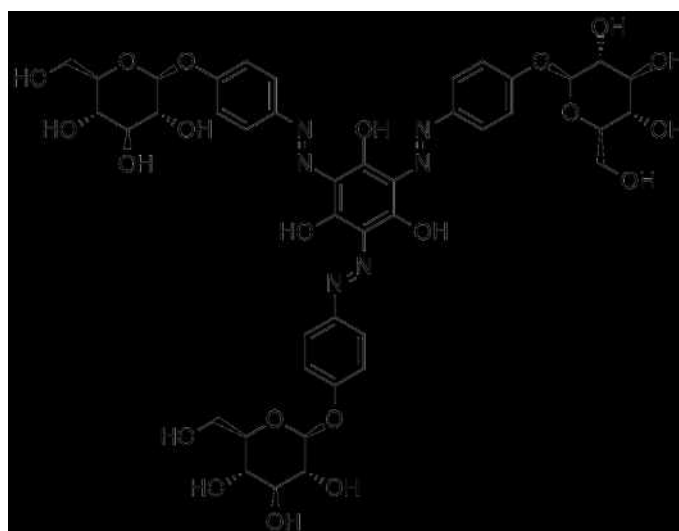


Abbildung 15: Strukturformel von β -D-glucosyl Yariv Reagenz (gezeichnet in Chemdraw von Dr. Jörg Schrittwieser).

3.10 Extraktion Arabinogalaktan-Protein (Kürbis)

Die Extraktion der Arabinogalaktan-Proteine resultierte sowohl im Falle der reinen Arabinogalaktan-Proteine, als auch der Arabinogalaktan-Proteine + darunter liegendes Gewebe in unterschiedlich beige bis leicht gelbliche Lösungen. Nach der Gefriertrocknung blieben bräunlich-bernsteinfärbige Fäden-artige Strukturen zurück, die für die weiterführenden Analysen wieder leicht in Lösung gebracht werden konnten.

3.11 Extraktion Arabinogalaktan-Protein (Efeu)

Die Extraktion der Arabinogalaktan-Proteine aus frischen Efeublättern ergab eine dunkelgrüne Lösung, die im Unterschied zu den Arabinogalaktan-Protein Extrakten des Kürbisses direkt weiter analysiert wurde.

3.12 Quantifizierung Arabinogalaktan-Proteine mittels Single Radial Diffusion Assay

Der Single Radial Diffusion Assay lieferte sowohl für den Standard Gummi arabicum, als auch für eine Großteil der Proben orange Hali (siehe Bildtafel 19 Abbildungen A, B und C). Der Arabinogalaktan-Protein Extrakt aus Efeu ergab ebenso orange Hali (Daten nicht gezeigt). Ein Teil der Hali war eher grau-bläulich gefärbt (siehe Bildtafel 19 Abbildung B). Die Intensität der Präzipitationslinien schwankte in Abhängigkeit von den einzelnen Proben. Neben den gut sichtbaren Hali konnten bei einigen Proben kreisrunde Aufhellungen um die Hali festgestellt werden (siehe Bildtafel 19 Abbildungen A und B). Aufgrund einer linearen Beziehung zwischen den gemessenen quadrierten Halodurchmessern des Single Radial Diffusion Assays und den Konzentrationen an Arabinogalaktan-Proteinen (Van Holst und Clarke 1984) wurde mit Hilfe des Standards Gummi arabicum eine lineare Regressionsgerade gezeichnet. Mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung ($y = 5,86 + 2,11 \cdot x$) konnten die quadrierten Halodurchmesser der Proben in Konzentrationswerte umgerechnet werden (siehe Abbildung 16). Zwischen den reinen Arabinogalaktan-Protein Proben (reine AGPs) und den Proben, wo zusätzlich zu den austretenden, bernsteinfärbigen, harzigen Substanzen auch Teile des darunterliegenden Gewebes mit analysiert wurden konnten keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede der AGPs festgestellt werden. Lediglich in einem Fall (Mittelwert der Kontrollen bei eingewogenen 25 mg/ml Probenmenge) lag der gemittelte Absolutwert der Arabinogalaktan-Protein Konzentration der AGPs + darunterliegendes Gewebe unter dem gemittelten Absolutwert der reinen AGPs (siehe Tabelle 17).

Sämtliche andere Absolutwerte der Konzentrationen der AGPs + darunterliegendes Gewebe lagen sowohl bei den inokulierten Proben, als auch bei den nicht inokulierten Proben wenig über den Absolutwerten der reinen AGPs. Sowohl bei den reinen AGP Proben als auch bei den AGPs + darunterliegendes Gewebe lagen die gemittelten AGP Konzentrationen bei allen drei Verdünnungsstufen (15 mg/ml, 25 mg/ml und 50 mg/ml) der inokulierten Proben höher als bei den nicht inokulierten Proben (siehe Abbildung 17). Die Unterschiede zwischen den inokulierten Proben und den nicht inokulierten Proben sind jedoch nicht statistisch signifikant. Die gemittelten Absolutwerte der AGP Konzentrationen waren zueinander nicht linear (siehe Tabelle 17). Während sowohl bei den reinen AGPs als auch bei den AGPs + darunterliegendes Gewebe der inokulierten Proben mit 23 bzw. 24 mg/ml annähernd die eingewogenen 25 mg/ml erreicht wurden, ergaben sich bei der höheren Konzentration (50 mg/ml eingewogenes Probenpulver) lediglich 34 mg/ml (reine AGPs) und 37 mg/ml für die AGPs + darunterliegendes Gewebe. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den nicht inokulierten Proben. Hier lagen die gemittelten Absolutwerte der AGP Konzentrationen im Vergleich zu den inokulierten Proben jeweils etwas niedriger.

Tabelle 17: Gemittelte Arabinogalaktan-Protein Konzentrationen in mg/ml. Die Werte wurden jeweils auf ganze Zahlen gerundet. AGP= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen (reine AGP Probe), AGP + Gewebe= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen + darunter liegendes Gewebe.

	Gemittelte Konzentrationen der Arabinogalaktan-Proteine [mg/ml]					
	Inokuliert			Nicht inokuliert		
	15 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	15 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml
AGP	18	23	34	13	20	27
AGP + Gewebe	19	24	37	15	19	30

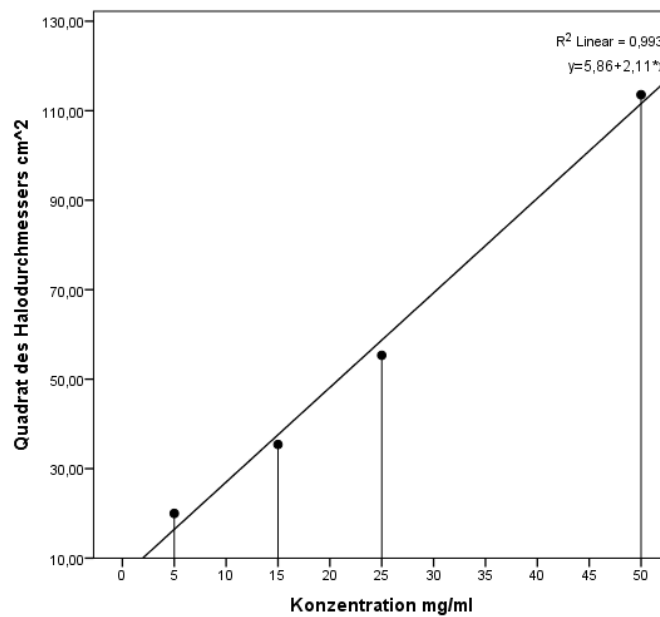


Abbildung 16: lineare Regressionsgerade des Standards Gummi arabicum zur Bestimmung der Konzentration der Arabinogalaktan-Proteine.
Die Konzentrationen der Arabinogalaktan-Proteine wurden mit der Geradengleichung $y=5,86+2,11*x$ berechnet.

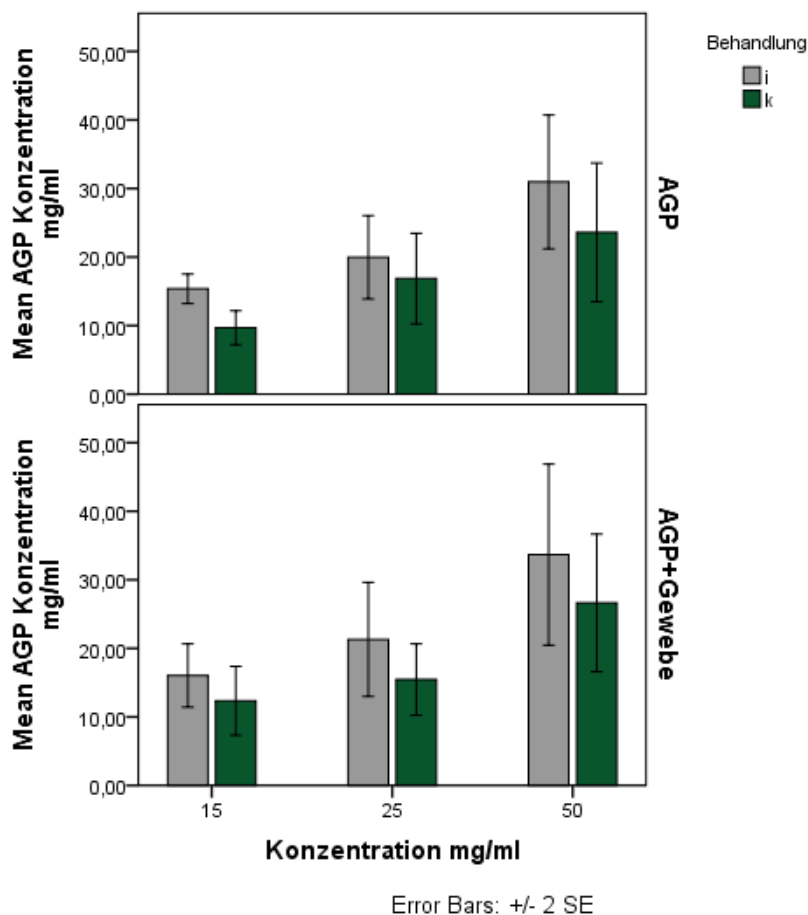


Abbildung 17: Gemittelte Arabinogalaktan-Protein Konzentration in mg/ml. AGP= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen (reine AGP Probe), AGP + Gewebe= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen + darunter liegendes Gewebe, i= inokuliert, k= Kontrollen (nicht inokulierte Verwundungsstelle).

3.13 Physiologische Messreihe

3.13.1 Photosynthesemessung

Die gemittelten Photosyntheseraten lagen über alle fünf Messungen hinweg bei den Kontrollen höher als bei den inokulierten Pflanzen. Im Rahmen der photosynthetischen Messreihe konnten für die ersten drei Messungen sowohl für die Kontrollen als auch für die inokulierten Pflanzen stetig steigende Photosyntheseraten dokumentiert werden. Während der ersten beiden Messungen verhielt sich die relative Zunahme der Photosyntheserate zwischen den Kontrollen und den inokulierten Pflanzen gleich. Bei der dritten Messung war die Zunahme der Photosyntheserate bei den Kontrollen im Vergleich zu den inokulierten Pflanzen stärker. Ab der vierten Messung kam es bei den inokulierten Pflanzen und den Kontrollen zu einer Abnahme der Photosyntheserate, die jedoch bei den inokulierten Pflanzen deutlich stärker abfiel als bei den Kontrollpflanzen (siehe Abbildung 18 und Tabelle 18). Die Unterschiede zwischen den Einzelwerten, als auch zwischen den Medianen der inokulierten Pflanzen und den Kontrollen waren dabei ab der vierten Messung statistisch signifikant.

Tabelle 18: Gemittelte Photosyntheserate in $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet. i= inokuliert, k= Kontrollen.

Gemittelte Photosyntheserate in $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$					
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
i	7,2	7,6	8,0	5,7	3,9
k	8,4	8,9	9,8	9,2	7,9

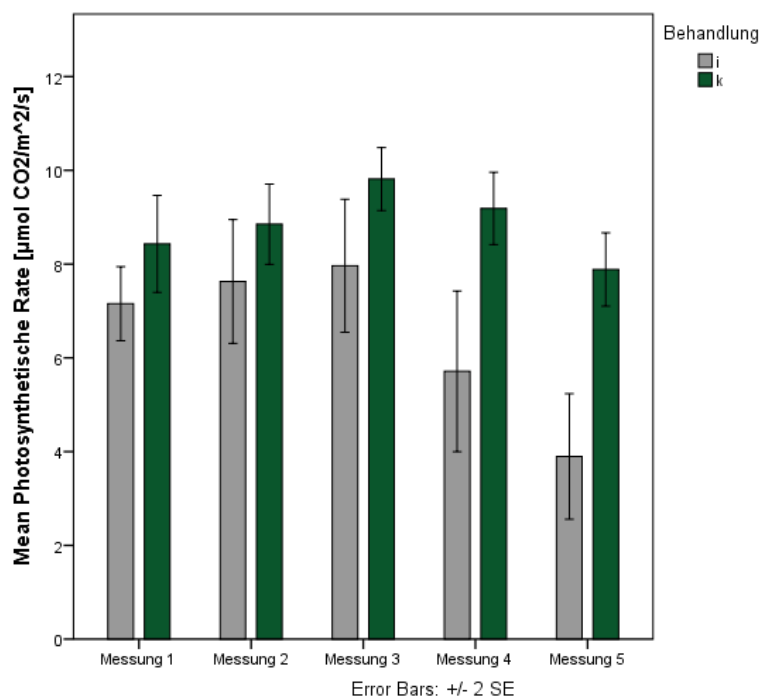


Abbildung 18: Gemittelte Photosyntheserate in $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$. Die Messungen fanden jeden zweiten Tag statt. Die erste Messung wurde am ersten Tag nach der Inokulation durchgeführt. i= inokuliert, k= Kontrollen.

3.13.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen (Photochemische Effizienz)

Die Chlorophyllfluoreszenz lag am Tag der ersten Messung mit Werte um 0,8 sowohl bei den Kontrollen als auch bei den inokulierten Pflanzen im Normalbereich (Schmitt et al. 2012). Eine Abnahme der gemittelten Chlorophyllfluoreszenz für die inokulierten Pflanzen konnte ab der zweiten Messung festgestellt werden und setzte sich über die folgenden Messungen fort. Die gemittelte Chlorophyllfluoreszenz für die Kontrollen hingegen blieb konstant im Bereich 0,8. Während die Unterschiede für die gemittelten Werten der Chlorophyllfluoreszenz zwischen den Kontrollen und den inokulierten Pflanzen bei den Messungen zwei, drei und vier relativ gleich blieben, konnte bei der letzten Messung ein größerer Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 19). Die Abnahme der gemittelten Chlorophyllfluoreszenz der inokulierten Pflanzen bei der letzten Messung ist jedoch vor allem auf drei Einzelproben zurück zu führen, welche bei der Messung bereits starke Symptome eines Befalls mit *D. bryoniae* aufwiesen. In diesen drei Fällen konnte keinerlei Chlorophyllfluoreszenz mehr nachgewiesen werden. Die restlichen Pflanzen zeigten durchwegs ähnliche Werte wie die Kontrollen.

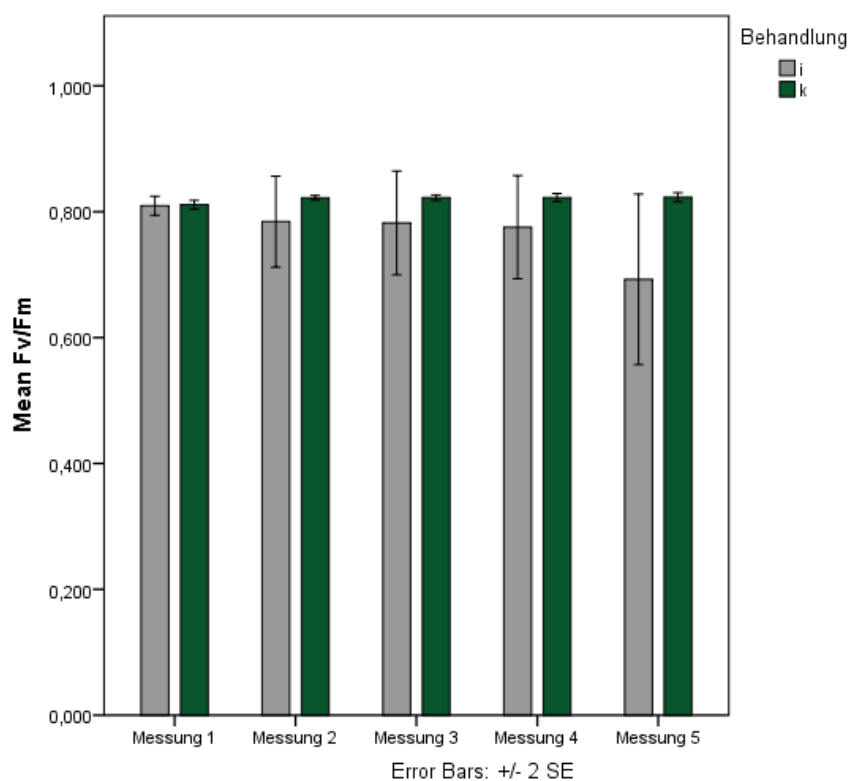


Abbildung 19: Gemittelte Photochemische Effizienz (Fv/Fm). i= infiziert, k= Kontrollen.

3.13.3 Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels Diaminobenzidin

Beim Wasserstoffperoxid-Nachweis (H_2O_2 Nachweis) mittels DAB konnten Anzeichen der H_2O_2 Akkumulation neun Tag nach der Inokulation mit *D. bryoniae* in Form von dunkelbraunen Flecken bzw. Arealen auf den Blättern sichtbar gemacht werden. Problematisch war in manchen Fällen die unvollständige Entfärbung der Blätter mittels Ethanol, wodurch die grüne Färbung der Blätter zurück blieb. Eine Beurteilung der H_2O_2 Akkumulation konnte in diesen Fällen nicht durchgeführt werden (Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 3 und 4).

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den inokulierten Pflanzen zeigten die ausgestanzten Blätter an den Rändern eine Akkumulation von H_2O_2 (siehe Bildtafel 20 Abbildung A_Schale 1 und 3, sowie Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 6). Ebenso konnten bei den Kontrollen dunkelbraune Areale entlang der Blattadern nachgewiesen werden (Bildtafel 20 Abbildung A_Schale 1). Ansonsten zeigten die Kontrollen keine Anzeichen der H_2O_2 Akkumulation bzw. keine ausgedehnten DAB gefärbten Areale (siehe Bildtafel 20 Abbildung A_Schale 2). Ebenso zeigten manche inokulierte Pflanzen kaum DAB gefärbte Flecken (Bildtafel 20 Abbildung B_Schale 1). Im Unterschied dazu zeigten die ausgestanzten Blätter in Bildtafel 20 Abbildung B_Schale 2 und 3, sowie Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 6 DAB Färbungen in Form von dunkelbraunen mehr oder weniger runden Flecken, die im Fall von Bildtafel 20 Abbildung B_Schale 2 und Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 6 zu größeren Arealen zusammen geflossen waren. Bei zwei Blättern war die gesamten ausgestanzte Blattfläche dunkelbraun gefärbt (Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 2 und 5), während sie bei einem weiteren Blatt durchwegs hellbraun gefärbt war (Bildtafel 20 Abbildung C_Schale 1).

3.13.4 Pigmentbestimmung mittels Photometrie

Im Zuge der Pigmentbestimmung mittels Photometrie konnten sowohl für Chlorophyll a, Chlorophyll b als auch für die Gesamt-Carotinoide keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den inokulierten Pflanzen festgestellt werden (siehe Abbildung 20). Die gemittelten Pigmentmengen waren im Falle des Chlorophyll a, sowie der Carotinoide für die Kontrollgruppe im Vergleich zu den inokulierten Pflanzen minimalst erhöht. Bei der Bestimmung des Chlorophyll b zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Hier konnte für die Gruppe der inokulierten Pflanzen in Bezug auf die Kontrollpflanzen ein minimal erhöhter Pigmentgehalt festgestellt werden. Der Chlorophyll a Gehalt lag sowohl bei den Kontrollen als auch bei den inokulierten Pflanzen mit 11 mg/g Trockengewicht deutlich über dem Gehalt für das Pigment Chlorophyll b, sowie für die Gesamt-Carotinoide. Für diese beiden Gruppen konnte ein Gehalt von ca. 4 mg/g Trockengewicht ermittelt werden.

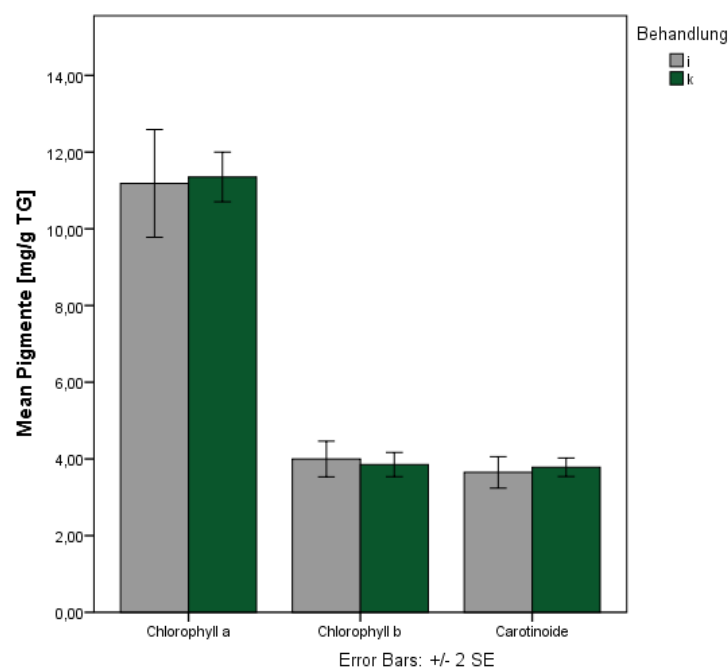


Abbildung 20: Vergleich der Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Gesamt-Carotinoide in mg/g Trockengewicht zwischen den Gruppen k und i. Für die Bestimmung der Pigmente wurden Einzelwerte der Gruppen gemittelt. k= Kontrollen, i= inokuliert.

3.13.5 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität mittels Photometrie

Bei der Bestimmung der Antioxidativen Kapazität wurden zwei Ansätze verwendet. In einem Fall wurden die Einzelwerte der Kontrollgruppe mit den Einzelwerten der inokulierten Pflanzen verglichen. Im zweiten Fall wurde die Antioxidative Kapazität als anti radical power (ARP in %) zwischen den gemittelten Werten der beiden Gruppen ausgedrückt. Beim Vergleich der Einzelwerte wurde die Geradengleichung ($y = 1,38 \cdot 10^{-4} x$) des Standards Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure) für die Berechnung der Konzentrationen herangezogen (siehe Abbildung 21). Die Antioxidantien-Konzentrationen der einzelnen Pflanzen schwankten sowohl bei den Kontrollen als auch bei den inokulierten Pflanzen. Ein Großteil der Werte der inokulierten Pflanzen lag jedoch im gleichen Bereich der Werte der Kontrollen (siehe Abbildung 22). Lediglich zwei Einzelwerte schienen im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht. Im gleichen Zug jedoch ergaben zwei andere Pflanzen in Bezug auf die Kontrollen erniedrigte Werte. Ebenso zeigte sich beim ARP in % kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollen und den inokulierten Pflanzen (siehe Abbildung 23). Der ARP lag für die inokulierten Pflanzen leicht über jenem für die Kontrollen. Für beide Gruppen wurde ein ARP von ca. 8 % ermittelt.

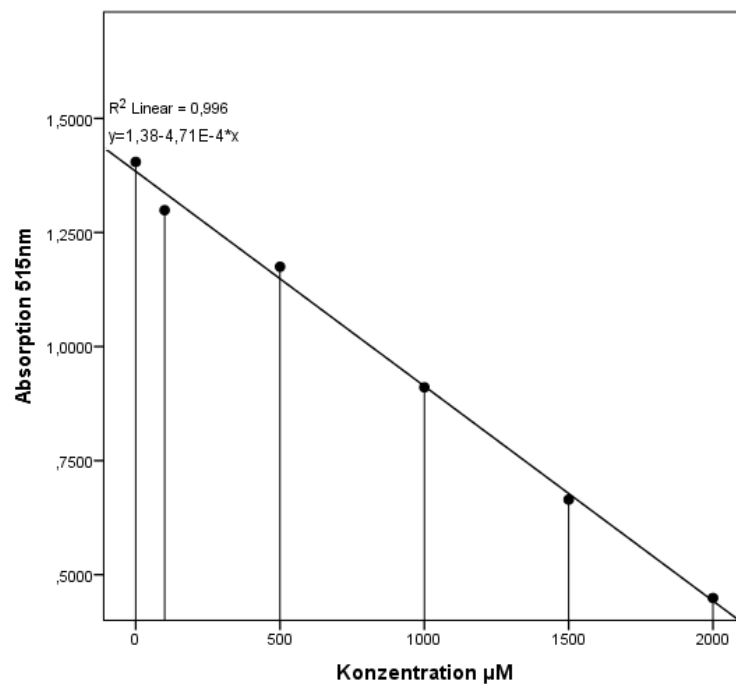


Abbildung 21: lineare Regressionsgerade des Standards Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure). Durch Zugabe von DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) nimmt die Absorption mit steigender Standardkonzentration ab.

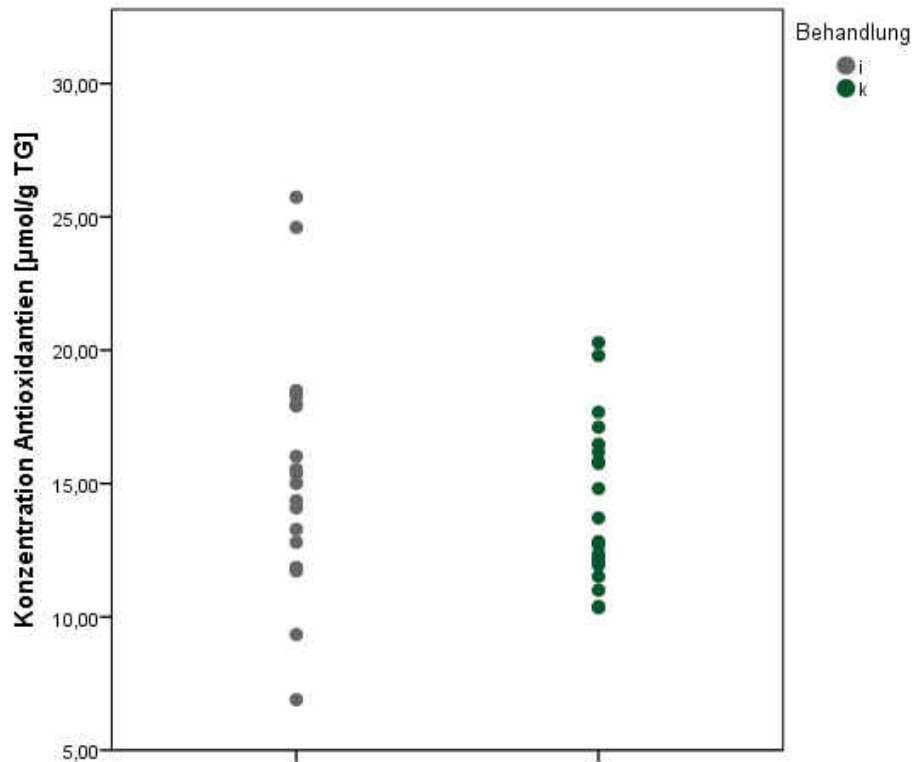


Abbildung 22: Vergleich der Einzelwerte der Antioxidantien-Konzentration in $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht zwischen den Gruppen k und i. k= Kontrollen, i= inokuliert.

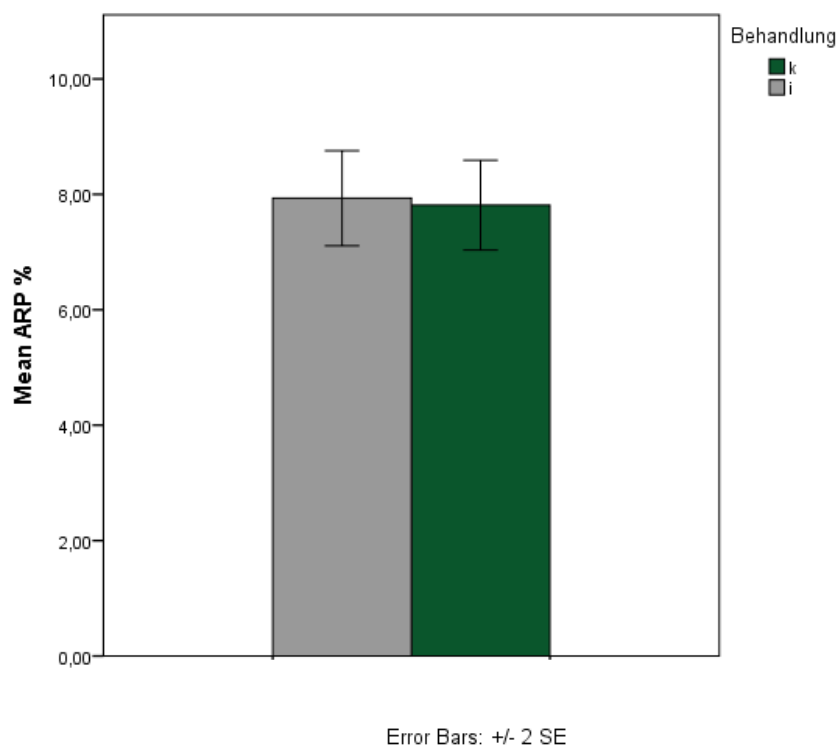


Abbildung 23: Vergleich der Antioxidativen Kapazität (ARP %) zwischen den Gruppen k und i. Für die Bestimmung des ARP (anti radical power) wurden die Einzelwerte der Gruppen gemittelt. k= Kontrollen, i= inokuliert

3.14 Mikroskopische Untersuchungen

3.14.1 Untersuchung der Morphologie von *Didymella bryoniae*

Der Vegetationskörper von *D. bryoniae* besteht aus fadenförmigen Hyphen, die mehrfach septiert sind. Die Hyphen können sich einerseits verzweigen (Bildtafel 21 Abbildung A) oder über längere Strecken unverzweigt wachsen. Bildtafel 21 Abbildung B zeigt eine auswachsende Hyphe, die im wachsenden Bereich noch keine Septen eingezogen hat. Der Durchmesser der Hyphen variiert relativ stark. Untersuchungen des Pilzgeflechts aus Petrischalen zeigten Hyphen mit unterschiedlichen Durchmessern (ca. 10 µm, 5 µm und 2,5 µm) (Bildtafel 21 Abbildung C). Im Cytoplasma der Hyphenzellen (Bildtafel 21 Abbildung C), sowie im umgebenden Medium konnten zahlreiche kugelförmige Strukturen gefunden werden, die unter UV Anregung grün fluoreszierten (Bildtafel 21 Abbildung D). Die asexuellen Fruchtkörper von *D. bryoniae* sind kugelig, hellbraun bis dunkelbraun und ins Wirts-Gewebe eingesenkt. Die Größe der Pyknidien kann stark variieren (Bildtafel 22 Abbildung A). Sie verfügen über eine zentrale, runde Ostiole. Über diese werden die asexuellen Sporen in laichenartigen Schleimschnüren freigesetzt (Bildtafel 23 Abbildung A). Bildtafel 23 Abbildung B zeigt die Freisetzung eines Konidien-Schwalls aus der Ostiole. Die hyalinen, unseptierten Konidien von *D. bryoniae* bilden dabei einen dichten Sporenstrang. Bildtafel 22 Abbildungen A und B zeigen asexuelle Fruchtkörper von *D. bryoniae* in Aufsicht, sowie nach einem Querschnitt durch infiziertes Wirts-Gewebe. Zellschichten unter den Fruchtkörpern sind stark beschädigt. Die Epidermiszellen des Wirtsgewebes werden durch die Ausbildung des Fruchtkörpers unterbrochen und leicht nach oben gewölbt, wodurch der Fruchtkörper ins Wirtsgewebe eingebettet ist (Bildtafel 22 Abbildung B). Die freigesetzten Konidien kommen auf benachbarten Epidermiszellen des Wirts-Gewebes zu liegen (Bildtafel 22 Abbildung A). Neben den asexuellen Fortpflanzungsorganen existieren auch sexuelle Pseudothecien, welche sich äußerlich von den Pyknidien kaum unterscheiden. Die äußere Pseudotheciumwand besteht aus eckigen hellbraun bis dunkelbraun gefärbt Zellen. Auf der Erhöhung des Fruchtkörpers befindet sich wiederum eine Ostiole, über welche die Ascosporen ins Freie gelangen. Die hyalinen, monoseptierten Ascosporen werden in hyalinen, zylindrischen Asci gebildet (Bildtafel 21 Abbildung E), welche meistens gerader oder leicht gebogen sein können. Pro Ascus entstehen acht Ascosporen, welche zweizellig und bauchig sind (siehe Bildtafel 21 Abbildung F). Die obere Zelle der Ascospore ist meist etwas dicker als die untere.

3.14.2 Mikroskopische Untersuchung: Vorinokulationsversuche von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae*

Bei der Vorinfektion von *C. pepo* mit *D. bryoniae* sollte festgestellt werden, ob der Pilz tatsächlich eine Infektion gesetzt hatte. Dafür wurden die Blätter und Blüten zunächst auf Symptome untersucht (siehe Ergebnisse „Vorinokulationsversuche von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae*“) und anschließend nach erfolgter Färbung mikroskopiert. Es konnten bei allen inokulierten Pflanzenorganen (Blüten, Blätter und Sprosse) verzweigt, mehrfach septierte Pilzhyphen nachgewiesen werden. Diese waren im Gewebe blau gefärbt (siehe Bildtafel 24 Abbildungen A und B). Bildtafel 24 Abbildung B zeigt Pilzhyphen mit unterschiedlichen Durchmessern im Bereich eines Leitbündels. Die Hyphen wachsen intrazellulär in den Tracheen.

3.14.3 Mikroskopie der Totalpräparate

Bevor die Blätter für die Herstellung von Totalpräparaten entfärbt wurden, wurden sie unter UV-Licht betrachtet, um die Chlorophyllfluoreszenz des gesamten Blattes zu untersuchen. Dabei zeigten nicht inokulierte Blätter eine dunkelrote Fluoreszenz (siehe Bildtafel 25 Abbildung D), während bei den Blättern am zweiten Tag nach der Inokulation stärkere bzw. hellere Fluoreszenzerscheinungen sichtbar waren. Des Weiteren fielen nicht fluoreszierende, grüne, unterschiedlich große Bereiche an der Blattspitze, sowie am linken und rechten Blattlappen auf (siehe Bildtafel 25 Abbildung C). Bei Betrachtung der gleichen Blätter im sichtbaren Licht konnte man an den diesen Stellen erste Symptome eines Befalls mit *D. bryoniae* erkennen. Die Blätter waren in diesen Bereichen bräunlich verfärbt und weich (siehe Bildtafel 25 Abbildung A). Die Kontrollen hingegen wiesen keine Blattflecken auf (siehe Bildtafel 25 Abbildung B). Die Helligkeit der Fluoreszenz der inokulierten Blätter war am dritten Tag nach der Inokulation am intensivsten, während sie am vierten Tag wieder abnahm (siehe Bildtafel 25 Abbildung E und F). Hier waren die Blätter bereits großteils nekrotisch (siehe Bildtafel 25 Abbildung F). Unter sichtbarem Licht zeigten diese Blätter starke Vergilbungen bzw. Aufhellungen des Blattgrüns.

Bei der Mikroskopie der Totalpräparate (der Kürbisblätter) konnten anschließend zahlreiche dunkelblau gefärbte Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf der Blattfläche (siehe Bildtafel 26 Abbildung A), sowie entlang der Gefäßbündel (siehe Bildtafel 26 Abbildung B) festgestellt werden. In Aufsicht sind die Ostiolen der Fruchtkörper gut sichtbar. Bildtafel 26 Abbildung B zeigt Fruchtkörper, die ins Gewebe der Gefäßbündel eingesunken sind. Im Bereich des Fruchtkörpers wölbte bzw. weitete sich das Leitbündelgewebe nach außen, wodurch der Fruchtkörper Großteils im Gewebe eingebettet war. Bei höherer Vergrößerung konnte man Hyphen erkennen, die seitlich vom Fruchtkörper wegliefen (siehe Bildtafel 26 Abbildung B_Bildausschnitt). Des Weiteren konnten entlang der Gefäßbündel blau gefärbte, teilweise verzweigte Hyphen schemenhaft erkannt werden (siehe Bildtafel 26 Abbildung A). Bei höherer Vergrößerung konnten parallel verlaufende teilweise verzweigte, mehrfach septierte und blau gefärbte Hyphen im Bereich der Gefäßbündel gefunden werden (siehe Bildtafel 27 Abbildung A und B). Ebenso konnten auskeimende Ascosporen auf den Epidermiszellen eines Blattes gefunden werden (siehe Bildtafel 28 Abbildung B). Eine weitere Aufnahme zeigt das Wachstum einer Hyphe durch eine Spaltöffnung in das Innere eines Blattes (siehe Bildtafel 28 Abbildung A). Zusätzlich wurde eine serielle Aufnahme durchgeführt, die das Wachstum einer bzw. mehrerer Hyphen von der Keimung der Spore auf der Blattoberfläche bis zum Wachstum in einem mehrzelligen Kürbishaar zeigt (siehe Bildtafel 29 Abbildung A-E). Zunächst sieht man eine ausgekeimte Spore (siehe Bildtafel 29 A). Die Hyphe wuchs in Richtung der mehrzelligen Basis des Kürbishaares (siehe Bildtafel 29 Abbildung B). In der Nähe des Kürbishaares bogen sich die Hyphen scheinbar in Richtung der Basiszellen (siehe Bildtafel 29 Abbildung C). Bildtafel 29 Abbildung D zeigt die Anwesenheit einer Hyphe im Bereich der ersten Zelle des Haares. Des Weiteren wuchsen zwei septierte Hyphen in Richtung der Basiszellen des Haares. Die nächsten Aufnahmen zeigen das zahlreiche Vorhandensein von Hyphen unterschiedlichster Durchmesser in den, den Basiszellen des Haares angrenzenden Zellen (siehe Bildtafel 29 Abbildung E). Während die dickeren Hyphen sehr kurze Abstände zwischen den Septen aufwiesen, hatten die dünnen Hyphen durchwegs längere Internodien. In Bildtafel 29 Abbildung E sieht man den Übergang der Hyphen von einer in die nächste Zelle des Haares. Die Kontrollblätter hingegen zeigten nach der Färbung mit Lactophenolblau keine Auffälligkeiten. Es konnten weder Fruchtkörper auf der Blattspreite oder entlang der Leitbündel gefunden werden, noch blau gefärbte Hyphen im Bereich der Leitbündel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.14.4 Hyphenverlauf in der Frucht von *Cucurbita pepo* var. *styriaca*

Anhand der Bildtafel 30 Abbildungen A und B kann man das, von Hyphen dicht durchwachsene Fruchtfleisch des Ölkürbisses erkennen. Die Hyphen waren blau gefärbt und wuchsen kreuz und quer intrazellulär in den Zellen des Perikarps (siehe Bildtafel 30 Abbildung A). Im Bereich des Exokarps (äußeres Abschlussgewebe des Perikarps), sowie bei Teilen des darunterliegenden Mesokarps waren die Zellwände komplett aufgelöst. Das Gewebe war vollständig kollabiert. Bei höherer Vergrößerung der Zellen des Mesokarps konnte man den Übergang der Hyphen zwischen den Zellen erkennen (siehe Bildtafel 30 Abbildung B).

3.14.5 Mikroskopische Aufnahmen der β -D-glucosyl Yariv Reagenz gefärbten Schnitte des Fruchtfleisches

Der Farbstoff β -D-glucosyl Yariv Reagenz zeigte unter dem Mikroskop unterschiedliche hellrote bis dunkelrote Kristalle, die zum Großteil eine längliche Eiskristall-ähnliche Form aufwiesen oder einen isometrischen Habitus zeigten (siehe Bildtafel 19 Abbildung D). Bei der Untersuchung des Fruchtfleisches mittels Yariv Reagenz wurden infizierte Fruchtfleischstücke ohne Färbung (Daten nicht gezeigt) und nach erfolgter Färbung (siehe Bildtafel 19 Abbildung E) mikroskopiert. Die ungefärbten Schnitte wiesen keine Färbung auf, während die Zellen der mit Yariv gefärbten Schnitte im Bereich des Exokarps dunkelrot bis leuchtend orange gefärbt waren. Die Zellen des gefärbten Exokarps waren vollständig zusammen gesunken. Die Zellwände der Mesokarpzellen erschienen gelblich bis orange. Dunkelrote ausgewaschene große Präzipitate konnten im Mikroskopiemedium (siehe Bildtafel 31 Abbildung B), sowie im Bereich der Schnitte (siehe Bildtafel 19 Abbildung E) gefunden werden. Des Weiteren konnten diese dunkelroten Präzipitate entlang der Zellwände vitaler Mesokarp-Zellverbände gefunden werden (siehe Bildtafel 31 Abbildung A).

4 Diskussion

Die unterschiedlichen Kultivierungsversuche von *Didymella bryoniae* zeigten, dass die Ausbildung von dichten Fruchtkörpern insbesondere von den vorherrschenden Lichtbedingungen abhängig sind. Die Kultivierung des Pilzes unter normalen Lichtverhältnissen (Lagerung der Platten übereinander gestapelt) führte zur Entstehung eines dichten Mycelrasens, während unter kontrollierten Bedingungen im Klimaschrank bei Langtagbedingungen ein dichter, in konzentrischen Ringen angeordneter Fruchtkörper entstand. Laut Hinker und Seibert (2013) erhöht UV-Licht die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Fruchtkörpern bei Ascomyceten. Die Ausbildung von Fruchtkörpern in konzentrischen Ringen unter UV-Licht (Langtagbedingungen) bzw. die Entstehung eines dichten Mycelrasens unter schlechten Lichtbedingungen ist auf einen gewissen Rhythmus im Hyphenwachstum der Pilze zurück zu führen (Lysek 1984). Laut Lysek (1984) ist die Abwechslung zwischen Licht- und Dunkelphasen der entscheidende Punkt, da das Wachstum der Hyphen unter Lichtbedingungen stark vermindert ist oder gänzlich zum Stillstand kommt. Dies betrifft jedoch nur oberflächlich liegende Hyphen, während jene Hyphen im Kulturmedium von dem darüber liegenden Mycel beschattet werden und dadurch auch unter Lichtbedingungen weiter wachsen. Sie bilden eine neue Wachstumsfront, wodurch eine Wiederaufnahme des Wachstums der alten Front unterbunden wird. Dadurch entsteht der erste Ring, der häufig erst durch die Ausbildung der Fruchtkörper sichtbar wird. Diese entwickeln sich im Zuge der Umstellung des Stoffwechsels von der Nährstoffaufnahme aus dem Substrat zur Nährstoffversorgung durch Mobilisierung von Reservestoffen wachstumstillstehender Hyphen (Lysek 1984).

Bei der Herstellung der Konidiensuspension konnten beim Abkratzen des Fruchtkörpern rosafarbene Schleimwolken beobachtet werden. Diese Entwicklung dokumentierte Neergaard (1989b) als eine, den Nährboden bedeckende rosa Sporenmasse, die fast ausschließlich aus Konidien besteht. Bei ausreichend feuchtem Wetter löst sich laut Cupp und Sherf 1960 die gelartige Matrix des Fruchtkörpers auf und die Sporen werden in langen rosafarbenen Sporensträngen aus den Fruchtkörpern entlassen. Diese asexuellen Sporen sind nach Huss (2011c) in Schleim eingebettet, wodurch sie in laichenartigen Strängen aus den Fruchtkörpern herausquellen.

Die Vorinfektionsversuche von *C. pepo* mit *D. bryoniae* sollten der Überprüfung der Infektiosität des Pilzes dienen. Bei den infizierten Blüten konnte eine Blütenstielfäule diagnostiziert werden, welche zur typischen wässrigen Braunverfärbung und zum Abknicken der Blütenstiele kurz oberhalb der Blütenstielmitte führt (Huss 2007). Die entstandenen Blattsymptome deckten sich ebenfalls mit jenen in der Literatur beschriebenen. Die Blattflecken bildeten sich insbesondere auch im Randbereich der Blätter und breiteten sich von diesen relativ rasch aus. Unter anderem beschreiben Zitter et al. (1996) ein erstes Auftreten der hellbraunen bis dunkelbraunen Blattflecken an den Rändern der Blätter, sowie einer raschen Ausbreitung dieser auf die gesamte Blattspreite. Des Weiteren bestätigten die mikroskopischen Aufnahmen der inokulierten Sprosse, Blätter und Blüten die Infektiosität von *D. bryoniae* GL1. Nach den Färbungen mit Methylenblau konnten blaue verzweigte intrazellulär wachsende Hyphen im Wirtsgewebe nachgewiesen werden. In Sprossquerschnitten konnten innerhalb der Xylem-Elemente unterschiedlich dicke Hyphen nachgewiesen werden. Diesen Hyphen-Dimorphismus zeigte Neergaard (1989b) bereits in Kürbis. Epidermale und parenchymatische Zellen waren in den Sprossabschnitten bereits komplett degradiert. Neergaard (1989a) konnte an infizierten Stängelabschnitten kollabierte Epidermis- und Parenchymzellen nachweisen, während Sklerenchymzellen und Xylem-Elemente aufgrund der lignifizierten Zellwände länger erhalten bleiben.

Im Rahmen der Inokulationsversuche sollten potentielle Eintrittspforten und Ausbreitungswege von *D. bryoniae* untersucht werden. Die Wetterbedingungen im Sommer 2015 sorgten jedoch für erschwerte Infektionsbedingungen. Ausbrüche der Gummistängelkrankheit sind stark abhängig von den vorherrschenden Umweltbedingungen, wie z.B. von der relativen Luftfeuchtigkeit oder den Temperaturen (Van Steekelenburg 1985), wodurch starke Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Jahren auftreten (Gusmini et al. 2005). Optimale Bedingungen für *D. bryoniae* liegen bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C (Zitter et al. 1996, Department of Crop Sciences 2012). Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion sind jedoch vor allem auch feuchte Wetterbedingungen, sowie ein länger anhaltender Feuchtigkeitsfilm auf den oberirdischen Pflanzenteilen während der Infektionszeit (Department of Crop Sciences 2012). Ist dem Pilz erst Mal eine Infektion gelungen, scheint eine gewisse Toleranz gegen Austrocknung vorhanden zu sein (Keinath 2011). Anhand der aufgezeichneten Wetterdaten kann somit bereits festgestellt werden, dass die Voraussetzungen für die Infektion von *C. pepo* mit *D. bryoniae* nicht gegeben waren. Sowohl der Juli als auch der August 2015 zählten zu den wärmsten Monaten im Vergleich zum langjährigen Mittel (<http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016). In Bezug auf die Niederschlagsmengen wurden für Oberösterreich Einbußen von min. 50 % dokumentiert (<http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016). Die typischen Schwarzfäulesymptome konnten daher nicht untersucht werden. Ebenso kam es zu Verzögerungen in der Symptomausbildung. Die Ausbildung von Symptomen, die laut Newark et al. (2011) innerhalb von sieben bis zwölf Tagen stattfindet, verzögerte sich bei den, unter Freilandbedingungen inokulierten Blättern. Nach 25 Tagen konnten erste Symptome festgestellt werden. Dieser Zeitraum entspricht jedoch jenem aus Keinath (2014), welcher im Jahr 2009 (unter Freilandbedingungen) drei Wochen nach der ersten Inokulation Symptome auf den oberirdischen Organen von Kürbisgewächsen fand. Am Ende der Vegetationsperiode wiesen jedoch alle inokulierten Blätter typische Blattflecken über die gesamte Blattspreite auf. Des Weiteren konnten auf diesen Blättern auch Fruchtkörper von *D. bryoniae* gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre, dass *D. bryoniae* unter den vorherrschenden Wetterbedingungen direkt nach der Inokulation der Früchte, Blätter, Stängel, Blatt- und Blütenstiele nur in wenigen Fällen eine Infektion setzen konnte, sich jedoch der Infektionsdruck mit Ausbildung erster Fruchtkörper anschließend stetig steigerte, wodurch am Ende der Vegetationsperiode trotzdem viele Blätter, Blattstiele und Stängel Anzeichen von Infektionen zeigten. Verheerende Folgen durch die Gummistängelkrankheit bzw. Blattdürre blieben jedoch vermutlich aus, da die diese (aufgrund einer Unterbindung der Wasserzufuhr in den Leitbündeln (Huss 2007 und Huss 2011c)) insbesondere im frühen Stadium der Frucht- und Samenentwicklung durch die Zerstörung des Blätterdaches zu größeren Schäden führt. Die Symptome, die am Ende der Vegetationsperiode bei allen Blättern nachgewiesen werden konnten, stimmten mit jenen in der Literatur beschriebenen überein. Newark et al. (2011) beschrieben beispielsweise ein Auftreten von Vergilbungen an den Blatträndern im frühen Stadium der Infektion, welche auch in diesen Fällen die Infektionen erstmals sichtbar machten. Ähnlich wie bei Huss 2007 bildete sich bei einigen Blättern auch ein zelliges Blattfleckenmuster, welches zunächst die Gefäßbündel ausspartete und anschließend zu großen Flecken zusammenfloss. Van Steekelenburg (1985) postulierte, dass Verwundungen bei älteren Blättern für die Ausbildung einer Infektion essentiell seien, während diese bei jüngeren Blättern keine Rolle spielen sollten. Chiu und Walker (1949) hingegen demonstrierten an nicht verletzten Keimblättern einen massiven Unterschied zwischen Wassermelonen und Kürbis. Während bei den Keimblättern der Wassermelone eine direkte Penetration beobachtet werden konnte, kam es auf der Oberseite der Kürbiskeimblätter zwar zu einem Wachstum der Keimschläuche der Pyknozoosporen, eine Penetration blieb jedoch vollkommen aus. Auf der

Unterseite der Kürbiskeimblätter fand von Zeit zu Zeit eine Penetration in den Interzellularraum statt. Untersuchungen von Chiu und Walker (1949) zeigten stark erhöhte Wahrscheinlichkeiten einer Infektion nach Inokulation von verletzten Keimblättern im Vergleich zu unverletzten Keimblättern. Ebenso konnten Svedelius und Unestam (1978) eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber *D. bryoniae* Infektionen bei mechanischen Verletzungen zeigen. Sie konnten nachweisen, dass die Infektionsrate bei beschädigten Pflanzenteilen erhöht ist, da durch die Freisetzung von Nährstoffen aus den beschädigten Zellen die Nährstoffversorgung von *D. bryoniae* gewährleistet ist. Intakte Kürbisblätter, die nach der Inokulation wiederholt mit Nährstoffen besprüht wurden, zeigten ähnlich hohe Infektionsraten wie beschädigte Kürbisblätter (Svedelius und Unestam 1978). Diese Untersuchungen stützen die Ergebnisse aus den Vorinfektionsversuchen, bei welchen die Blätter vor der Inokulation mittels Skalpell mechanisch verletzt wurden. Bei all diesen Blättern bildeten sich innerhalb weniger Tage Blattflecken, die sich zunehmend ausbreiteten und vom Rand her stark einrollten. Unterschiede zwischen den Infektionen von jungen und alten Blättern unter Freilandbedingungen konnten leider nicht festgestellt werden, da ein Großteil der alten Blätter bei der Bonitur nicht mehr gefunden werden konnte. Es zeigten jedoch sowohl die jungen als auch die älteren (gefundenen) Blätter die typischen Blattfleckensymptome, obwohl keine der beiden Gruppen zuvor mechanisch beschädigt wurde. Ein potentieller Grund dafür könnten ein erhöhter Infektionsdruck gegen Ende der Vegetationsperiode gewesen sein. Da es sich um eine polyzyklische Erkrankung handelt reichen laut Keinath (2008) bereits geringe Inokulumsmengen aus, um am Ende der Vegetationszeit eine flächendeckende Entwicklung der Gummistängelkrankheit zu erreichen. Untersuchungen von Van Steekelenburg (1985) zeigten auch, dass höhere Konidienkonzentrationen die Wahrscheinlichkeit einer Infektion verbesserten. Sofern die Sporendichte des Inokulums hoch genug ist, ist eine Verwundung der Blätter nicht mehr notwendig (Svedelius und Unestam 1978). Laut Neergaard (1989a) sind die Konidien prinzipiell in der Lage die Epidermis aufzulösen, wodurch bei hoher Sporenkonzentration eine direkte Penetration der Kutikula möglich ist. Insbesondere ohne Feuchtfilm auf den Blättern postulierte Van Steekelenburg (1985) jedoch eine zehnfach höhere Konidienkonzentration um ein gleiches Infektionspotential hervorzurufen wie bei anhaltend feuchten Blättern. Eine Abhängigkeit der Infektiosität von der vorhandenen Konidienkonzentration und der relativen Feuchtigkeit zeigte sich auch bei der Inokulation der Blätter für die physiologische Messreihe, sowie für die Herstellung mikroskopischer Totalpräparate. Bei ersterer betrug die Konidienkonzentration, die in der Literatur angegebene Konzentration von 10^6 Sporen/ml (Amand und Wehner 1995, Keinath 2008, Nga et al. 2010). Bei der Inokulation der Blätter für die Herstellung der mikroskopischen Totalpräparate hingegen war die Konzentration um ein tausendfaches erhöht. Des Weiteren wurde der Feuchtfilm auf den Blättern bis zur Ernte der Blätter für die Totalpräparation aufrechterhalten. Während die Blätter für die Totalpräparation zwei Tage nach der Inokulation alle Blattflecken aufwiesen, konnten bei den Blättern für die physiologische Messreihe bei einigen inokulierten Blättern selbst nach einigen Tagen keine wesentlichen Blattflecken nachgewiesen werden.

Neben Wunden stellen jedoch auch natürliche Öffnungen wie Hydathoden (Yadeta und Thomma 2013) und Stomata (Nga et al. 2010) Eintrittspforten für *D. bryoniae* dar. Die eindringenden Hyphen entwickeln sich laut Nga et al. (2010) zu dicken intra- und interzellulär wachsenden Hyphen, die eine Kolonisation des Blattes mit sich bringen. Untersuchungen der Infektionswege von *D. bryoniae* am Totalpräparat nach Färbung mittels Lactophenolblau zeigten, dass neben den Stomata eventuell auch die Trichome als Eintrittspforten dienen könnten. Ein Großteil der Trichome wies intrazellulär wachsende Hyphen von *D. bryoniae* auf. Gusmini et al.

(2005) vermuten ebenfalls, dass *D. bryoniae* über beschädigte Trichome in das Innere der Blätter vordringen kann. Die Beschädigung scheint jedoch wiederum essentiell zu sein, da laut Chiu und Walker (1949) gekeimten Pyknosporen nicht in der Lage waren die intakte Basis eines Trichoms zu penetrieren. Eine Beschädigung der Trichome fand bei der Durchführung der Präparation zum Totalpräparat zwar nicht explizit statt, erfolgte jedoch höchstwahrscheinlich durch Berührung der Blätter mittels Pinzette im Zuge der zahlreichen Präparationsschritte.

Neben der Untersuchung der Blattinfektionen sollte durch die Inokulation der Blätter eine mögliche Ausbreitung einer bestehenden Infektion auf den Blattstiel untersucht werden. Bei acht von zehn gefundenen unter Freilandbedingungen inokulierten jungen Blättern, sowie bei allen gefundenen inokulierten alten Blättern waren die Blattstiele im Stadium einer Fäule oder bereits vertrocknet. Im Vergleich dazu wiesen nicht inokulierte Blätter gesunde Blattstiele auf. Eine Ausbreitung über die Gefäßbündel vom infizierten Blatt in den Blattstiel wäre eine Möglichkeit. Laut Yadeta und Thomma (2013) gelangen vaskuläre Pathogene über die kortikalen Zellen der Stängel und einem interzellulären Wachstum der Hyphen zu den vaskulären Parenchymzellen. Von dort erfolgt eine Kolonisation des Xylems (Yadeta und Thomma 2013). Neergaard (1989b) konnte Hyphen in Blütengewebe von Kürbis jedoch nur ab und zu in Phloem und Xylem Elementen beobachten. Lediglich einmal konnte eine Hyphe in einer Siebröhrenzelle gefunden werden. Im Unterschied dazu wies Neergaard (1989a) Hyphen von *D. bryoniae* in unterschiedlichen Geweben von Kürbistängeln nach. Er fand Hyphen sowohl in epidermalen, parenchymatischen, sowie sklerenchymatischen Zellen, als auch im Xylem. Ebenso beschreibt Huss (2007) ein Wachstum von *D. bryoniae* Hyphen in Wasser leitenden Elementen der Blattstiele. Das Wachstum im vaskulären Gewebe fördert die Verbreitung des Pathogens und bietet Schutz unter trockenen Wetterbedingungen (Neergaard 1989a). Studien zufolge kolonisieren vaskuläre Pathogene vor allem das Nährstoff-arme Xylem, da die lebenden Zellen des Phloems zwar reicher an gelösten Stoffen (z.B. Zucker) sind, jedoch der hohe osmotische Druck die Penetration erschwert. Die toten Tracheen hingegen weisen einen relativ niedrigen osmotischen Druck auf, wodurch ein Eindringen der Hyphen im Vergleich zu den Siebröhren erleichtert ist. Sind die Hyphen erstmal im Xylem etabliert, folgt eine starke Ausbreitung der Infektion in der Pflanze (Yadeta und Thomma 2013). Diese Ausbreitung über das Xylem ist jedoch nur bei empfänglichen Pflanzen möglich, da resistente Pflanzen eine Produktion von Tylose (blasenartigen Auswüchse innerhalb des Xylems; ausgebildet von Xylem anliegenden Parenchymzellen) rechtzeitig induzieren, welche die Gefäße verstopfen und dadurch die Pilzhypen einschließen. Solange die Anzahl der betroffenen Gefäße limitiert ist, bleibt ein Trockenstress der Pflanze aus. In Empfänglichen Pflanzen hingegen kann die gebildete Tylose keinen Pfropfen bilden, der den Pilz an der weiteren Ausbreitung hindern würde (Yadeta und Thomma 2013). Unter anderem spricht auch der Prozess des Abknickens der faulen Blattstiele für eine vaskuläre Invasion von *D. bryoniae* in Xylemzellen. Im Xylem, welches neben seiner Hauptfunktion des Langstreckentransports von Wasser auch der mechanischen Verfestigung des Gewebes dient (Yadeta und Thomma 2013), kommt es durch eine Fäule im vaskulären System zum Verlust der Stängel- bzw. Blattstielkonsistenz und schlussendlich zu einem Abknicken dieser (Huss 2007). Eine Feststellung der Richtung der Ausbreitung von *D. bryoniae* über die Gefäßbündel konnte leider nicht eindeutig herausgefunden werden, da bei den meisten infizierten Blattstielen und Stängelabschnitten ein Übergang in die benachbarten Internodien nicht stattgefunden hat. In manchen Fällen zeigten die Blattstiele und Stängel jedoch beiderseits der mittig gesetzten Inokulationsstelle Symptome. Dies würde für eine basipetale und akropetale Ausbreitung der Infektion sprechen, wie sie Neergaard (1989a) beobachtet hatte. Er vermutete jedoch, dass Symptome unterhalb der ersten Infektionsstelle eine Folge von Sekundärinfektionen durch Sporenverbreitung sind. Diese Vermutung deckt sich durch Beobachtungen von Huss

(2007), der einen Fortschritt der Symptomentstehung von den ältesten Blattstielen hin zu den jüngeren beschrieb. Insbesondere bei den inokulierten Blattstielen konnte eine Ausbreitung der Infektion in die Blattfläche (Blatt komplett vertrocknet, Nachweis von *D. bryoniae* Fruchtkörpern auf der Blattspreite) nachgewiesen werden, während in den meisten Fällen der Knotenpunkt der Infektion eine Grenze setzte. Häufig konnte an den Grenzen der infizierten Blattstiele zum gesunden Stängelgewebe eine bräunliche Zone erkannt werden, die scheinbar eine Barriere für die Ausbreitung der Infektion darstellte. Des Weiteren konnten diese isolierenden bräunlichen Zonen um verschlossene, oberflächliche Wunden, sowie massivere Hagelschäden gefunden werden, welche mit Fruchtkörper von *D. bryoniae* besiedelt waren. Ein ähnliches Phänomen beschrieben Huss und Pucher (2007) an den Früchten, bei welchen isolierende Geweberinge *D. bryoniae* an der Ausbreitung hinderten. Neergaard (1989b) beschreibt die Anwesenheit von granulären Substanzen in gewissen Zellen, die eine abgrenzende einzellige Schicht zwischen infiziertem und nicht infiziertem Wirtsgewebe bildeten. Diese Substanzen konnten sowohl in Früchten, als auch im Griffel und im Narbengewebe gefunden werden (Neergaard 1989b). Ob es nun einen Zusammenhang zwischen diesen granulären Substanzen und den, in diesen Fällen beobachteten Zonen gibt bzw. ob diese Zonen nun tatsächlich einen isolierenden Effekt haben, oder ob sie bereits erste Anzeichen einer ausbreitenden Infektion sind, bleibt ungeklärt.

Anhand der Freilanduntersuchungen der Stängel- und Blattstielinokulationen kam die Vermutung auf, dass sich die Hyphen vor allem in den Xylem-Elementen des Leitgewebes befinden und sich über diese auch verbreiten. Diese Theorie der Verbreitung des Pilzes entlang der Leitbahnen wurde bereits von Neergaard (1989a) formuliert, der in dieser Art der Verbreitung einen Überlebensmechanismus unter trockenen klimatischen Bedingungen und niedrigen Sporenkonzentrationen sah. Laut Keinath (2011) zeigt *D. bryoniae* nach erfolgreicher Infektion eine gewisse Toleranz gegen Austrocknung. Die Untersuchungen von infizierten Blättern anhand von Totalpräparaten zeigten anschließend das Vorhandensein von Hyphen innerhalb des Leitgewebes. In der Frucht konnten Hyphen vor allem im parenchymatischen Gewebe nachgewiesen werden. Dies deckt sich sehr gut mit Dokumentationen von Neergaard (1989a), der Hyphen in unterschiedlichsten Gewebetypen nachweisen konnte. Er fand Hyphen in der Epidermis, im Xylem und im Sklerenchym, dass vor allem bei den Stängeln und Blattstielen eine Stützfunktion darstellt. Des Weiteren dokumentierte Neergaard (1989a) ein starkes Hyphenwachstum im parenchymatischen Gewebe. Die Penetration der Frucht, sowie der Nachweis der Hyphen in epidermale Gewebe konnten in diesem Fall nicht mehr verfolgt werden, da die Epidermiszellen, die Zellen des Exokarps, sowie einige wenige Zellschichten des darunter liegenden Mesokarps bereits komplett aufgelöste Zellwände aufwiesen, wodurch der Verlauf der Hyphen in diesen Zellschichten nicht verfolgt werden konnte. Im Parenchym hingegen konnte ein dichtes Geflecht aus intrazellulär wachsende Hyphen mit unterschiedlichen Durchmessern beobachtet werden. Dieser Hyphen Dimorphismus wurde bereits im Rahmen von Untersuchungen der Kürbisblüten (Neergaard 1989b) und bei Untersuchungen des Stängel-Gewebes von Kürbis (Neergaard 1989a) dokumentiert. In der Blüte konnten Hyphen mit unterschiedlichen Durchmessern in der Narbe, im Griffel, in der Samenanlage, sowie in der Frucht nachgewiesen werden (Neergaard 1989b). Messungen der Dicke der Hyphen (2,5-10 μm) im Rahmen der morphologischen Untersuchungen deckten sich mit den Dokumentationen von Neergaard (1989b), welcher Hyphen mit unterschiedlichen Dimensionen von 2,4-12,8 μm beschrieb. Hinter den unterschiedlichen Durchmessern der Hyphen vermutet Neergaard (1989a) zwei essentielle Funktionen. Die dünnen Hyphen bezeichnet er als sogenannte „runner Hyphen“, da sie vor allem in der Erschließung neuen Wirtsgewebes eine Rolle spielen sollen (Neergaard 1989a) und dadurch die dicken Hyphen mit Nährstoffen versorgen können (Fellwos 1928). Die dicken Hyphen hingegen („feeder Hyphen“)

sollen hauptsächlich für die Absorption und Speicherung von Nährstoffen verantwortlich sein (Neergaard 1989a). Auffällig waren bei den Untersuchungen auch kugelförmige, relativ große Strukturen im Cytoplasma der Hyphen, die bei Färbung mit Bodipy unter Anregung bei 505nm grün fluoreszierten. Aufgrund der unpolaren Struktur von Bodipy bindet der Fluoreszenzfarbstoff an lipophilen Strukturen und kann daher als Marker für Öl und andere unpolare Lipide herangezogen werden (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3922> Stand 26.4.2016). Derartige Öltröpfchen wurden bereits bei Zitter et al. (1996) als Merkmal der „Footballförmigen“ Konidien von *Phomopsis cucurbitae* beschrieben, bei welchen an beiden Ende jeweils ein Öltröpfchen vorkommt. Bei genauerem Betrachten von Bildtafel 21 Abbildung C kann man ebenfalls erkennen, dass häufig jeweils ein Öltröpfchen nahe der Septen liegt. Diese Öltröpfchen dienen Pilzen neben Glykogen bekanntermaßen als Reserve-Nährstoff Stock (<http://biologyboom.com/kingdom-fungi/> Stand 25.4.2016). Bei geringen Nährstoffkonzentrationen auf intakten Blattoberflächen konnten Svedelius und Unestam (1978) zeigen, dass die Infektiosität von *D. bryoniae* beeinträchtigt wird. Bei ausreichender Nährstoffversorgung (in vitro durch Besprühen intakter Blätter mittels Kürbisblatt-Extrakt, in vivo durch Freisetzung von Nährstoffen aus beschädigten Zellen im Rahmen von Verwundungen) hingegen kommt es ohne vorherige Keimschlauchbildung zur direkten Formierung von dicken, zur Nährstoffaufnahme befähigten Hyphen, die mit Vakuolen und Öltröpfchen gefüllt sind (Svedelius und Unestam 1978). Innerhalb des Wirtsgewebes lebt *D. bryoniae* als nekrotropher Pilz und produziert zahlreiche Enzyme wie Pektinmethylesterase, Cellulasen (Neergaard 1989a), Polygalakturonasen, Amylasen, Lipasen, Proteasen und Ureasen (Tsay, Tzen und Tung 1996, Neergaard 1989a), die einerseits für den Abbau der Wirtszellen verantwortlich sind und andererseits wichtige Nährstoffquellen erschließen können. Die Ausbreitung von einer zur nächsten Zelle erfolgt über direkte Penetration.

Der direkte Vergleich der drei Inokulationsvarianten der Stängel (Injektion von *D. bryoniae* Konidiensuspension in die Markhöhle, Besprühen der Stängelabschnitte mit *D. bryoniae* Konidiensuspension und Applikation von *D. bryoniae* Konidiensuspension auf der Stängelunterseite) zeigte, dass ein Besprühen ohne vorhergehende Verletzung des Stängelabschnittes zu keiner Infektion führte, während bei direkter Injektion der Konidiensuspension eine geringe Anzahl der Stängelabschnitte eine Gummistängelkrankheit entwickelte. Offene Wunden scheinen daher für *D. bryoniae* insbesondere unter heißen und trockenen Wetterbedingungen essentiell zu sein. Neergaard (1989b) konnte 1989 zwar zeigen, dass Konidien prinzipiell in der Lage sind, die Epidermis aufzulösen und vor allem bei hohen Sporenkonzentrationen über direkte Penetration der Kutikula in die Wirtspflanze vorzudringen, jedoch Wunden und natürliche Öffnungen als Eintrittspforten bevorzugt werden (Neergaard 1989b). Die Wunden können sowohl durch biotische (vor allem Verwundung durch andere Pathogene) als auch durch abiotische Faktoren (z.B. mechanische Verletzungen durch Umwelteinflüsse wie Hagelschlag) verursacht werden (Agrios 1988). Der Versuchsansatz mit Besprühen der Stängelunterseite resultierte in einem Fall in einer Infektion des Stängelabschnittes. Dies könnte eventuell auf einen etwas länger anhaltenden Feuchtigkeitsfilm auf dem Stängel zurückzuführen sein, der die Wahrscheinlichkeit einer Infektion erhöht (Carol und Randall 1991, Van Steekelenburg 1985). Da jedoch lediglich einer der zehn inokulierten Stängel eine Infektion aufwies, kann daraus geschlossen werden, dass frische Wunden unter heißen und trockenen Wetterbedingungen von noch größerer Bedeutung sind, als bei optimalen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen für den Pilz. Ein Vergleich der Inokulationsmethoden der Blattstiele brachte keine großen Unterschiede zwischen den Inokulationsvarianten.

Im Rahmen der vierten Inokulationsvariante der Stängel sollte herausgefunden werden, ob vorhandene Wunden die Wahrscheinlichkeit einer *D. bryoniae* Infektion erhöhen. Ähnlich wie bei den vorhergehenden

Versuchsansätzen zeigten die intakten Stängelabschnitte (Hagel-) keine Anzeichen von Infektionen. Oberflächliche, kleine Abschürfungen der intakten Stängelabschnitte wiesen zwar vereinzelt Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf, waren jedoch ansonsten vollkommen vital. Wiederum scheint das Vorhandensein von frischen Wunden insbesondere unter den heißen und trockenen Wetterbedingungen essentiell zu sein. Untersuchungen der Hagel+ Stängelabschnitte bestätigten die Notwendigkeit von frischen Wunden. Sowohl massivste Hagelschäden, als auch oberflächliche Verletzungen, die bereits vor der Inokulation durch Sekundärgewebe verschlossen waren, stellten keine Eintrittspforten für *D. bryoniae* dar. Präventionsmaßnahmen gegen post Ernte Schwarzfäule empfehlen unter anderem auch ein Aushärten der Speisekürbisse bei 23-29°C, um eventuell vorhandene Wunden zu schließen (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/d_bryon.htm Stand 8.4.2016). Ebenso schreibt Zitter (1992), dass sich verwundete Areale unter geeigneten Bedingungen durch die Produktion von Korkgewebe selbst verschließen können.

Potentielle Eintrittspforten für *D. bryoniae* sind unter anderem auch Narbe und Griffel (Neergaard 1989b). Unter Freilandbedingungen waren elf der fünfzehn untersuchten Blüten/Blütenstiele infiziert bzw. bereits vertrocknet. Lediglich drei wiesen keine Infektion auf und konnten gesunde Früchte ausbilden. Bei den Untersuchungen fiel auf, dass die weiblichen Kürbisblüten innerhalb kürzester Zeit (ein bis zwei Tage nach der Blüte) von den Fruchtsansätzen getrennt waren. Die Keimung der Konidien auf den Papillen der Blüten findet laut Neergaard (1989b) bereits innerhalb weniger Stunde nach der Inokulation statt, wobei die Keimhype dem Weg des Pollenschlauches durch Narbe und Griffel folgt. Für den Weg von der Blüte in die Frucht benötigt der Pilz jedoch zwei Tage (Ferguson et al. 2009). Der relativ rasche Abstoßungsprozess der Blüte kann daher eine Infektion in manchen Fällen möglicherweise verhindern. Des Weiteren konnte Neergaard (1989b) feststellen, dass es bei hohen Sporenkonzentrationen und bestäubten Blüten zu einem Wettkampf zwischen Keimhype und Pollenschlauch kommen kann. Dieses Phänomen könnte die zweigeteilte Entwicklung des Inokulationsversuches der weiblichen Blüten unter relativ hohen Sporenkonzentrationen (10^6 Sporen/ml) erklären. Einerseits konnten sich Früchte entwickeln, die keine Anzeichen einer Infektion aufwiesen und andererseits konnten komplett vertrocknete Früchte gefunden werden. Diese vertrockneten Früchte waren im Durchmesser sehr klein, was auf eine rasche Ausbreitung von *D. bryoniae* unmittelbar nach der Befruchtung und einer Hemmung des Wachstums der jungen Frucht schließen lässt. Beeinträchtigungen des Fruchtwachstums im Zuge der Gummistängelkrankheit nach *D. bryoniae* Befall sind bereits länger bekannt (Huss 2014b). Ebenso kann ein Verstopfen des Xylems durch Pathogen Biomasse Trockenstress in der Pflanze hervorrufen (Yadeta und Thomma 2013), wodurch die Früchte klein bleiben. Genaue Untersuchungen der Ausbreitung der Infektion von der befruchteten Blüte in die Frucht waren jedoch nicht möglich, da zum Zeitpunkt der Bonitur das Endstadium der Infektion bereits erreicht war. Laut Neergaard (1989b) beschreitet jedoch die Hype nach der Durchquerung von Narbe und Griffel den Weg durch das Pollenschlauch-Wachstum lenkende Gewebe in die oberen Teile der Frucht, wo sie den Fäulnisprozess des Fruchtfleisches einleitet. Die Sporenkonzentration scheint auch für die Entwicklung einer internen Fruchtfäule entscheidend zu sein. Laut Ferguson et al. (2009) kommt es unter hohen Sporenkonzentrationen häufiger zur Abstoßung von Früchten, während unter niedrigeren Sporenkonzentrationen die Wahrscheinlichkeit einer internen Fruchtfäule steigt. Dies würde erklären, warum bei mehr als der Hälfte der inokulierten weiblichen Blüten keine Frucht ausgebildet wurde. Die Blüten waren in diesen Fällen von den Blütenstielen getrennt. Die Blütenstiele waren in allen Fällen komplett vertrocknet und mit Fruchtkörpern von *D. bryoniae* übersät. In manchen, jedoch nicht in allen Fällen konnte eine Infektion des angrenzenden Stängelabschnittes dokumentiert werden. Ob diese Stängelabschnitte tatsächlich durch eine Ausbreitung der

Infektion von den infizierten Blütenstielen betroffen waren, oder ob sie durch Sekundärinfektionen von außen infiziert wurden bleibt zu diesem Zeitpunkt ungeklärt.

Neben Narbe und Griffel sind die Nektarien eine weitere natürliche Öffnung, über die *D. bryoniae* eine Infektion auslösen kann (Neergaard 1989b). Da sowohl die männlichen als auch die weiblichen Blüten des Kürbisses für die Anlockung von Bestäubern reich an Nektar sind (Teppner 2000) spielen die Nektarien bei den männlichen Blüten vermutlich eine wichtige Rolle als Eintrittspforte von *D. bryoniae*. Inokulationen der männlichen Blüten, sowie der männlichen Blütenstiele im Rahmen der Freilandversuche führten in allen Fällen zu infizierten Blütenstielen. Jedoch zeigte der angrenzende Stängel nur bei einem Drittel der inokulierten Blüten Anzeichen einer Infektion.

Von vaskulären Pathogenen ist bekannt, dass sie bodenbürtig sind und meist über die Wurzeln über Wunden oder Rissen an lateralen Seitenwurzeln in die Pflanzen eindringen (Yadeta und Thomma 2013). Laut Huss (2011a) kann *D. bryoniae* bis zu zwei Jahre im Boden überdauern und konnte auch schon in den Wurzeln nachgewiesen werden. Des Weiteren ist eine Samenbürtigkeit von *D. bryoniae* bei *C. pepo* und Wassermelone und der Ausbruch einer Gummistängelkrankheit bei Wassermelonen Keimlingen im Gewächshaus gut bekannt (Keinath 2013a). Im Zuge des Keimungsversuches der Samen nach Inokulation mit *D. bryoniae* Konidien suspension sollte die Auswirkung einer Infektion auf Keimpflanzen festgestellt werden. Leider konnten unter Freilandbedingungen keine Trends festgestellt werden, da aufgrund des heißen, trockenen Wetters wenige bis gar keine Samen keimen konnten. Bei den aufgegangenen Kontrollpflanzen konnten jedoch keine Blattflecken diagnostiziert werden, während bei allen Keimpflanzen, die sich aus inokulierten Samen entwickelten, runde bis irregulär geformte Blattflecken abzeichneten. Dabei fiel auf, dass die Blattflecken stets auf den Innenseiten der Keimblätter zu finden waren, welche bei der Keimung zuerst aus der Samenhülle gedrückt werden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die auf der Oberfläche der Samen haftenden Sporen bei der Keimung der Samen auf die Keimblätter abgestreift werden und zwischen den zahlreichen feinen Haaren haften bleiben. Die entstandenen Symptome stimmten mit jenen aus den Versuchen der Empfänglichkeit der Keimlinge gegenüber *D. bryoniae* von Chiu und Walker (1949) überein. Sie beschrieben grau-grüne später dunkelbraun werdende runde oder irregulär geformte Flecken, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer Fäule des gesamten Blattes führen konnten (Chiu und Walker 1949). In manchen Fällen konnten auch tropfenförmige Absonderungen von bernsteinfärbigen Substanzen im Bereich der Blattflecken auf den Keimblättern des Ölkürbisses festgestellt werden. Dieses Phänomen des Gummiflusses konnte bereits bei Chiu und Walker (1949) im Bereich der Inokulationsstellen bei Wassermelonen, sowie bei Ferguson et al. (2009) als bernsteinfärbiges, gummiartiges Saftexudat bei infizierten Stängeln und im Zentrum von Läsionen bei Früchten beobachtet werden. Gummosis ist insbesondere auch bei Obstbäumen in Bezug auf Infektionen ein häufig dokumentiertes Symptom und wird beispielsweise sowohl an Pfirsichbäumen nach *Botryosphaeria dothidea* (Weaver 1974, www.ent.uga.edu/peach/peachhbk/fungal/fungal.pdf Stand 11.4.2016), als auch bei Marille nach *Eutypa armeniaca* (Carter 1957), *Botryosphaeria dothidea* (Li et al. 1995) und *Lasiodiplodia theobromae* (Li et al. 1995) beobachtet. Ebenso ist eine bakterielle Gummosis bei Kirschen bekannt (Wilson 1931). Das Auftreten dieses bernsteinfärbigen, gummiartigen Saftes scheint somit eine eher unspezifische Reaktion von Pflanzen auf Pathogen Befall zu sein.

Huss (2014b) beschreibt bei Kürbissen in manchen Fällen ein Auftreten von Fruchtkörpern von *D. bryoniae* bereits auf den Keimblättern. Wassermelonen hingegen scheinen prinzipiell jedoch empfänglicher für *D.*

bryoniae zu sein, wie Infektionsstudien durch Besprühen der Keimblätter mit Sporensuspension von Chiu und Walker (1949) zeigten. Im Zuge von Studien konnten Chiu und Walker (1949) eine direkte Penetration bei unverletzten Keimblättern der Wassermelone beobachten, während diese beim Kürbis ausblieb. Dort kam es zwar auf der Oberseite der Keimblätter zu einem Wachstum der Keimschläuche der Pyknosporen, eine Penetration blieb jedoch vollkommen aus. Auf der Unterseite der Kürbiskeimblätter fand von Zeit zu Zeit eine Penetration in den Interzellularraum statt. Chiu und Walker (1949) postulieren jedoch generell auch, dass es zu einer schnellen Zunahme der Resistenz mit fortschreitendem Alter der Blätter kommen würde, was sich mit Ergebnissen anderer Studien bezüglich einem Vorhandensein von Wunden als Notwendigkeit für die Entwicklung einer Infektion bei älteren Blättern (Van Steekelenburg 1985) sehr gut decken würde. Unter Laborbedingungen führte der Keimungsversuch der Samen nach Inokulation mit *D. bryoniae* zu extremen Unterschieden zwischen inokulierten und nicht inokulierten (Kontrollen) Samen. Während diese im ersten Versuchsansatz eine relativ hohe Keimrate aufwiesen, konnten beide inokulierten Samenansätze keine Keimlinge hervorbringen. *D. bryoniae* verhindert somit scheinbar die Keimung der Samen. Ein kompletter Ausfall der Samenkeimung wird jedoch unter natürlichen Bedingungen kaum vorkommen, da so hohe Sporenkonzentrationen in der Natur (Neergaard 1989b) und somit auch auf den Samen nicht vorkommen. Eine geringere Keimrate (35 %) der Kontrollen bei der Versuchswiederholung unter Laborbedingungen ist vermutlich auf ein zu fortgeschrittenes Alter des Saatguts zurück zu führen.

Die Inokulationsversuche der älteren Früchte führten ebenfalls zu dem Schluss, dass Wunden essentiell für die Ausbildung der externen Fruchtfäule sind. Vergleicht man den Inokulationsversuch der älteren Früchte ohne Verwundung mit jenem mit mechanischer Verwundung wird man erkennen, dass *D. bryoniae* sich nur bei den verwundeten Früchten ansiedeln konnte. Laut Svedelius und Unestam (1978) begünstigen mechanische Verletzungen das Eindringen von *D. bryoniae* mehr aufgrund der Freisetzung von Nährstoffen aus den beschädigten Zellen als durch die Beschädigung der Cutin-Schutzschicht. Ähnlich wie bereits bei den Blättern zeigten Studien an Früchten, dass Verwundung für den Ausbruch von externer Fruchtfäule ausschlaggebend ist. Hierbei scheinen der Durchmesser, sowie die Tiefe der Verletzung von Relevanz zu sein (Van Steekelenburg 1982). Van Steekelenburg (1982) zeigte, dass unverwundete Früchte sowie Früchte nach Punktur mit einer Nadel mit 1 mm Durchmesser keine Fruchtfäule ausbildeten, während Verwundungen mittels Korkbohrer (Durchmesser 5 mm) zur externen Fruchtfäule führte. Dabei nehmen laut Van Steekelenburg (1982) der prozentuelle Anteil der Läsionen, sowie der Durchmesser der Läsionen mit zunehmender Tiefe der Verwundung zu. Aufgrund dieser Untersuchungen postulierte Van Steekelenburg (1982), dass die Schale eine mechanische bzw. physiologische Barriere gegenüber Pilzinfektionen darstellt. Trotz einer ausreichend tiefen Verwundung (ca. 2,5 bis max. 5 mm) und großflächigem Durchmesser der Verwundung waren, die im Bereich der Verwundungsstelle mit Fruchtkörpern übersäten Früchte jedoch vollkommen vital. Eine Möglichkeit wäre, dass die vorherrschenden Wetterbedingungen (hohe Temperaturen und Trockenheit) die Keimung der Pyknosporen verlangsamt. Untersuchungen von Carol und Randall (1991) zeigten, dass bei über 30°C die Anzahl der gekeimten Konidien nach vier bis acht Stunden bei 20 bis 40 % liegt, während sie bei Temperaturen zwischen 20-28°C 30-60 % beträgt. Die, durch die Verringerung der Geschwindigkeit der Keimung gewonnene Zeit könnte für die Ausbildung eines provisorischen Wundverschluss des Kürbisses ausreichen. Bei den Freilanduntersuchungen fiel bei den mechanisch verwundeten Früchten die extrem rasche Ausbildung einer Schutzschicht über die frische Wunde auf. Innerhalb eines Tages war die Wunde durch den Austritt von klaren bis milchigen tropfenförmigen Substanzen verschlossen. Noch am selben Tag waren diese Substanzen Großteils

wieder ins Gewebe zurück eingesunken, wodurch sich eine relativ glatte Oberfläche gebildet hatte. Am vierten Tag nach der Verwundung waren Fruchtkörper von *D. bryoniae* auf der bereits dunkelorange gefärbten, verschlossenen Wunde zu erkennen. Interessant war dabei auch, dass das überschüssige Wundmaterial mit der Zeit rissig wurde und anschließend samt der darauf gebildeten Fruchtkörper von der verschlossenen Wunde abblätterte. Ob dies nun ein spezialisierter Mechanismus zum Entfernen der Fruchtkörper von der Frucht und dadurch zum Vermindern des Sekundärinfektionsdruckes aufgrund von reifen Sporen darstellt oder ob die Risse durch die lange anhaltenden hohen Temperaturen zustande kamen bleibt jedoch ungeklärt.

Die Inokulation der jungen Früchte hingegen scheint weniger von Verwundung abzuhängen. Hier wiesen unter denselben heißen und trockenen Wetterbedingungen zumindest etwas mehr als die Hälfte der inokulierten Früchte Symptome einer Fäule bzw. waren zum Zeitpunkt der Bonitur bereits vollkommen vertrocknet. Ob die Fäule in diesen Fällen tatsächlich von *D. bryoniae* ausgegangen war, konnte im Nachhinein nicht herausgefunden werden. Neben diverssten Schwärzepilzen, sowie Bakterien konnten mikroskopisch jedoch auch asexuelle und sexuelle Sporen von *D. bryoniae* festgestellt werden. Neergaard (1989a) zeigte bereits an Blättern, dass die Konidien prinzipiell in der Lage sind die Epidermis aufzulösen, wodurch es bei hoher Sporenkonzentration zu einer direkten Penetration der Kutikula kommt. Laut Zhang et al. (2014) spielen Zellwand abbauende Enzyme bei der Ausbildung einer Infektion eine wesentliche Rolle. Diese Enzyme verändern die Struktur der Zellwand und erhöhen dadurch die Verfügbarkeit der Zellwandkomponenten (Substrate) für andere Enzyme (Kikot et al. 2009). Studien zufolge sind Pektinasen auch häufig die ersten Enzyme, die bei Kultivierung von Pilzen auf Zellwänden gebildet werden (Kikot et al. 2009). Laut Zhang et al. (2014) konnten sowohl in Schüttelkulturen mit Cantaloupe-Melonengewebe als einzige Kohlenstoffquelle als auch in *D. bryoniae* gefaultem Gewebe Aktivitäten von Polygalacturonasen, β -Galactosidasen und Cellulasen festgestellt werden. Zusätzlich konnten Aktivitäten von Pektin Lyasen und Pektatlyasen in *D. bryoniae* gefaultem Gewebe detektiert werden, wobei sämtliche Enzym-Aktivitäten (sowohl in Kultur als auch im gefaulten Gewebe) für hoch virulente Stämme höher waren im Vergleich zu moderat virulenten Isolaten (Zhang et al. 2014). Da Polygalacturonaseaktivitäten lediglich in gefaulten Früchten, nicht jedoch in gesunden nachgewiesen werden konnte, schrieben Zhang et al. (1999) das Vorhandensein der Polygalacturonase und deren Aktivität *D. bryoniae* zu. Chilosi und Margo (1998) fanden bereits in ungekeimten Sporen unter anderen vier basische Pektin-Lyasen. Sie beobachteten einen durch *D. bryoniae* induzierten Anstieg des pH Wertes im Wirtsgewebe, der vermutlich aufgrund einer erhöhten Aktivität der Pektin Lyasen bei der Induktion der Pathogenese eine wichtige Rolle spielt (Chilosi und Margo 1998). Trotz dieser Fähigkeit der direkten Penetration konnten unter Freilandbedingungen etwas weniger als die Hälfte der jungen Früchte nicht infiziert werden, da vermutlich auch in diesen Fällen durch die vorherrschenden Umgebungsbedingungen (hohe Temperaturen, Trockenheit, kein anhaltender Feuchtigkeitsfilm auf der Oberfläche der Früchte) erschwerte Infektionsbedingungen für *D. bryoniae* vorlagen.

Bei den vier Inokulationsvarianten der älteren Früchte (ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte ohne künstliche Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle) resultierte die Variante mit künstlicher Verletzung, sowie mit Abdunkelung der Inokulationsstelle in den meisten Fällen in einer Fäule. Im Vergleich dazu wies die Variante mit künstlicher Verletzung, jedoch ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle eine geringere Anzahl an gefaulten Früchten auf. Svedelius und Unestam (1978) konnten bereits zeigen, dass in

kontinuierlicher Dunkelheit gehaltenen Pflanzen mit mechanisch verletzten Kürbisblättern bereits bei sehr niedrigen Konidienkonzentrationen infiziert werden können. Die Bestrahlung der Pflanzen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten beeinflusste die Anzahl an Konidien, die für eine Infektion benötigt wurden (Svedelius und Unestam 1978). Studien zufolge hat Sonnenlichte, insbesondere UV-B Strahlung (280-315 nm), inhibitorische Wirkungen auf das Wachstum von Pilzen (Hughes et al. 2003). Gunasekera et al. (1997) konnte durch Anwendung von Polyesterfilter, welche eine Exklusion von UV-B Strahlung von 75-85% bewirken, eine Erhöhung der Anzahl an reifen und unreifen Infektionsstellen im Zuge der „Blister Blight“ Erkrankung von Tee durch *Exobasidium vexans* bewirken. Hughes et al. (2003) zeigten, dass ein dreistündiger Einfluss der Sonnenstrahlung >287 nm die Extension der Hyphen unterschiedlicher Pilzarten im Vergleich zu dunkel gehaltenen Kontrollen reduziert. UV-A Strahlung bewirkte Ähnliches, der Hemmeffekt ist jedoch insgesamt geringer. Jene, in diesem Fall verwendeten Kunststofffolien (zur Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitsfilms während der Infektion), bestehen hingegen aus UV-durchlässigem Polyethylen (Kamweru et al. 2014), wodurch die geringere Anzahl an Infektionen beim Versuchsansatz „Verwundung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle“ im Vergleich zum Ansatz „Verwundung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle“ erklärt werden könnte. Ein Vergleich zwischen dem Ansatz „ohne Verwundung, ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle“ mit dem Ansatz „ohne Verwundung jedoch mit Abdunkelung der Inokulationsstelle“ zeigte ein umgekehrtes Bild. Hier war die Anzahl der faulen Früchte beim Ansatz ohne Abdunkelung höher. Allgemein war sie jedoch etwas niedriger als bei den Ansätzen mit Verwundung, was auf die fehlenden Eintrittspforten (frische Wunden) zurück zu führen sein könnte. Umgekehrt war die Anzahl der gesunden Früchte bei den unverletzten Früchten höher als bei den künstlich verletzten, was wiederum für die häufig postulierte Theorie der essentiellen Verwundung für die Ausbildung einer Infektion spricht. Betroffen sind von der UV-Strahlung vor allem oberflächlich wachsende Hyphen, während jene im Substrat von den Einflüssen der Sonnenstrahlung geschützt zu sein scheinen. Hughes et al. (2003) konnten für *Mortierella parvispora* eine Reduktion des Hyphenwachstums von 100% feststellen, während jene von *Phoma herbarum* um 33% reduziert war. Die Extension der submers liegende Hyphen hingegen war für *Mortierella parvispora* um 16% und für *Phoma herbarum* lediglich um 12% reduziert. Ist eine Infektion nun erstmal geglückt, hat die Sonneneinstrahlung kaum mehr Auswirkungen auf die Ausbreitung des Pathogens. Gunasekera et al. (1997) vermuten, dass Pathogene nach der Penetration durch das Wachstum im Wirtsgewebe von direkter UV-B Strahlung geschützt sind, wodurch die Ausdehnung von Symptomen unbeeinflusst der UV-Strahlung von statten geht. Durch Einsatz von UV-Filter zeigten Caesar und Pearson (1983) unter Freilandbedingungen eine Verminderung der Sterblichkeit der Ascosporen von *Sclerotinia sclerotiorum* auf Bohnenblättern. Effekte des Sonnenlichts auf die Keimung bzw. das Überleben der Sporen scheint stark von den Schutzeinrichtungen der Sporen abzuhängen. Maddison und Manners (1972) beschrieben einen inhibitorischen Einfluss des Sonnenlicht auf die Keimung von *Puccinia striiformis*, nicht jedoch auf jene von *Puccinia graminis*, dessen Sporen dunkelbraun pigmentiert sind. Ebenso spricht Leach (1971) von einer höheren Resistenz der Sporen gegen UV-Strahlung im Vergleich zu den Hyphen, da Sporen häufig pigmentiert sind. Den hyalinen Sporen von *D. bryoniae* fehlt jeglicher Schutz durch Pigmentierung, wodurch eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht bzw. Sonnenstrahlung gegeben sein könnte. *Phoma herbarum* zeigt beispielsweise unter UV-Strahlung innerhalb 24 Stunden eine Induktion der Produktion von braunen Pigmenten, die UV-Schäden der Zellen vorbeugen sollen (Hughes et al. 2003). Auffällig ist hierbei auch, dass *D. bryoniae* sowohl dunkelpigmentierte Pyknidien, als auch dunkelpigmentierte Pseudothecien ausbildet. Diese dunkle Pigmentierung könnte auch hier ein Schutz der hyalinen Sporen vor UV-

Belastung darstellen, welche bei klarem Wetter (Sonnentagen) stark erhöht ist. Die Sporen hingegen quellen nur bei Regen aus den Fruchtkörpern (Huss 2014b), was die Theorie der Pigmentierung als Sonnenschutz unterstützt, da an Regentagen eine dichte Bewölkung die UV-Strahlenbelastung minimiert (<http://www.uni-kiel.de/med-klimatologie/uvinfo.html> Stand 25.4.2016). Während UV-Licht auf das Wachstum der Hyphen (Hughes et al. 2003), sowie die Keimung von Sporen (Caesar und Pearson 1983) negative Auswirkungen hat, scheinen diese für die Fruktifikation auszubleiben. Laut Hughes et al. (2003) bildet *Phoma herbarum* Konidien als Antwort auf UV-Strahlung. Ebenso zeigte Leach (1962), dass eine kontinuierliche Exposition diversester Pilze (z.B. *Eppicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma spp.* etc.) mit Licht (310-400 nm) über drei bis zehn Tage zur Sporulation führt. Das Herausfiltern der blauen Anteile des Lichts, sowie der nahen UV-Anteile führte jedoch zu einem Ausbleiben oder starken Reduktion der Sporulation (Leach 1962). Des Weiteren fiel bei den vier Versuchsansätzen (ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte ohne künstliche Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ältere Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle) auf, dass alle Früchte, die eine Fäule entwickelt hatten, sogenannte Sonnenflecken aufwiesen. Bei den gesunden Früchten hingegen fehlten diese Flecken gänzlich. Auffällig war dabei, dass sich die Ausbildung der „Sonnenflecken“ stets auf eine Seite beschränkte. Dabei handelt es sich vermutlich um jene Seite, die am längsten der Sonne ausgesetzt ist bzw. den stärksten Sonnenstunden ausgeliefert ist. Laut Huss (mündliche Mitteilung) konnten durch Aufnahmen mittels einer Wärmebildkamera Temperaturen von 59°C auf der Oberfläche der Früchte festgestellt werden. Ähnliche Temperaturen zeigten sich auch bei den Untersuchungen von *C. pepo* von Barber und Sharpe (1971), welche für dunkelgrüne und gelb-orange Früchte Oberflächentemperaturen zwischen 59 und 50°C feststellten, während weiße Früchte hingegen Temperaturen von 45°C aufwiesen. Je heller die Früchte desto mehr Strahlung konnte von den Früchten reflektiert werden. Zusätzlich konnten Barber und Sharpe (1971) zeigen, dass kleine dunkelgrüne Früchte (trotz der lediglich geringen Unterschiede des prozentuellen Anteils an reflektierter Strahlung) eine höhere Resistenz gegenüber Sonnenflecken zeigen als große dunkelgrüne Früchte, da die Effizienz des konvektiven Verlustes erhöht ist, wodurch es zu einer Reduktion der Temperatur kommt. Möglich wäre, dass die Veränderungen des Gewebes (Ausbildung von weißen Flecken an heißen Stellen der Kürbisoberfläche) bei hohen Temperaturen als Schutzmaßnahme eingeleitet werden, um eine weitere Erwärmung der Früchte zu verhindern, da weiße Oberflächen am wenigsten Sonnenlicht absorbieren und dadurch der Grad der Erwärmung wesentlich geringer ist, als bei dunklen Flächen (<http://www.fis.uni-bonn.de/recherchetools/infobox/profis/was-ist-fernerkundung/reflexion-und-absorption> Stand 25.4.2016). Hinzu kommt, dass im Vergleich zu Blättern die Anzahl der Stomata, über welche eine Kühlung der Oberfläche durch Evaporation von Wasser stattfindet, bei großen Früchten eher gering ist und dadurch der Kühlungseffekt stark verringert ist. Es scheint als gäbe es einen Zusammenhang zwischen den Sonnenflecken und einer entstehenden Fruchtfäule. Die Untersuchungen zeigten zumindest, dass die Ausbildung von Fruchtkörpern für *D. bryoniae* sowie anderer Schwärzepilze auf den strukturell veränderten Oberflächen der Sonnenflecken erleichtert zu sein scheint. Ob dieses Gewebe in späterer Folge aufgrund der Pilze einsackt, oder aus anderen Gründen bleibt jedoch ungeklärt. Die entstandene Fruchtfäule ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit multimikrobiellen Ursprungs, da nach Einbruch der Fruchtwand das Fruchtfleisch auch für andere Pilze und Bakterien zugänglich wird. Veränderungen des Gewebes im Bereich der Sonnenflecken wurden teilweise bereits von Hödl (2015) im Rahmen eines Projektlabors untersucht. Sie konnte mikroskopisch zeigen, dass die ersten fünfzehn bis zwanzig

Zellreihen deformiert und abgeflacht sind. Zusätzlich konnte sie durch Färbungen mit FCA verholzte Zellwände im Bereich der sechsten bis ca. fünfzehnten Zellreihe dokumentieren. Die Zellen des Mesokarps hingegen zeigten laut Hödl (2015) keine Veränderungen.

Im Rahmen der Freilandversuche sollte unter anderem auch festgestellt werden, ob *D. bryoniae* die Menge an ausquellenden Substanzen im Rahmen einer provisorischen Verschiebung einer Wunde erhöht. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, welcher chemischen Klasse von Molekülen die ausquellenden Substanzen angehören. Der erste Punkt wurde sowohl visuell direkt am Feld als auch im Labor mittels Single Radial Diffusion Assay überprüft. Während bei insgesamt acht der zehn Früchte bei den inokulierten Verwundungsstellen die Menge an austretenden Substanzen eindeutig höher war, konnte keine nicht inokulierte Verwundungsstelle mit einer mengenmäßig Überlegenheit an austretenden Substanzen gefunden werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass *D. bryoniae* den Austritt von Substanzen, die an einem Wundverschluss beteiligt sind, verstärkt. Nachdem die Substanzen große Ähnlichkeit mit einem, bei Obstbäumen bekanntem Phänomen des Gummiflusses zeigten und in großen Mengen aus beschädigten Zellen austraten, wurden Arabinogalaktan-Proteine (AGPs), die auch in der Stessresistenz eine Rolle spielen sollen (Pickard 2013), als Verursacher dieses Wundverschlusses in Betracht gezogen.

Diese AGPs gehören vermutlich in die Gruppe der Typ II Arabinogalaktane, zu welcher auch die Arabinogalaktane (AGs) der Lärche und die AGs der Gummi Exudate, wie z.B. jene von Gummi arabicum gehören (Clarke et al. 1979). Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen der Typ II Arabinogalaktane lassen sich laut Clarke et al. (1979) nur in der Variabilität der Glycosyl-Reste festlegen, die die Seitenketten substituieren. Über die genauen Funktionen der AGPs (Guan und Nothnagel 2004), sowie über die Zellen und Gewebetypen, in denen sie vorkommen (Clarke et al. 1979) ist noch relativ wenig bekannt. Laut Guan und Nothnagel 2004 ist eine Lokalisation von AGPs an der Plasmamembran, der Zellwand und im Medium von Zellkulturen möglich. Aufgrund ihrer Präsenz in Pektin-Fraktionen, die in der Mittellamelle vorkommen, vermutet man für Arabinogalaktane auch eine Funktion als Adhäsive zwischen den Zellen (Clarke et al. 1979). Ein Vorhandensein von Typ II Arabinogalaktanen in Samen, Blättern, Wurzeln und Früchten, sowie auch in Nadelhölzern, Saft- und Gummieuxudaten ist schon länger bekannt. Insbesondere letztere kommen in vielen Pflanzen, hauptsächlich jedoch in Angiospermen wie z.B. in den Familien Mimosaceae, Rosaceae, Meliaceae, Apiaceae und Rutaceae vor (Clarke et al. 1979). Die Gummi-artigen Exudate von *C. pepo*, die im Zuge der Verwundung auftraten, zeichneten sich durch eine leicht klebrige Konsistenz aus, wie sie auch bei Clarke et al. (1979) für Gummi Arabinogalaktan-Proteine und Arabinogalaktane der Lärche beschrieben wurden. Des Weiteren beschreiben Clarke et al. (1979), dass diese klebrigen, flüssigen Tropfen zu klaren festen Gebilden trocknen und sich mit fortschreitender Zeit visuell verändern, was die Wissenschaftler auf Enzyme in den Gummi Exudaten zurückführen. Ein äußerst ähnliches Verhalten legten die ausgequollenen Substanzen von *C. pepo* Wunden vor, die zunächst visköse Tropfen bildeten, später jedoch aushärteten und ihre Farbe von glasig-durchsichtig bis zu bernsteinfärbig veränderten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den, bei *C. pepo* aufgetretenen Substanzen um große, stark substituierte Arabinogalaktan-Proteine handelt ist sehr hoch, da eine zunehmende Viskosität mit zunehmendem Molekulargewicht und Proteingehalt einhergehen (Anderson und Rahman 1967). Die Untersuchungen an *C. pepo* zeigten unter anderem auch, dass die AGPs beim Wundverschluss eine wichtige Rolle spielen, sowie auch eine Reaktion auf Pilze darstellen. In der Literatur findet man ebenso zahlreiche Hinweise auf Gummifluss in Wund-Exudaten (Ellis et al. 2010) und als Antwort auf Pilz Infektionen (Pusey 1993, Kovacs 2002), bakterielle Infektionen oder andere pathologische Bedingungen

(Clarke et al. 1979). Sie treten von Rissen und Spalten der Rinde von Bäumen aus (Gosh und Purkayastha 1962) und konnte aber auch schon auf der Oberfläche von unversehrten Pflirsichfrüchten gefunden werden (Clarke et al. 1979). Ähnliche Beobachtungen konnten im Rahmen dieser Studie an *C. pepo* gemacht werden, wo Gummi-Exudate vereinzelt auch auf gesunden Früchten im Bereich des Blütenbodens, sowie auf der intakten Fruchtschale auftraten. Anderson und Dea (1971) zeigten bereits an *Acacia senegal*, dass die Produktion von Gummi Exudaten nicht unbedingt von Verwundung oder Mikroorganismen abhängig ist, sondern offenbar auch im gesunden Zustand stattfinden kann. Gummi Exudate im Bereich von Wunden scheinen vor allem durch die Wasser-rückhaltenden Kapazitäten der AGPs eine wichtige Rolle zu spielen, wodurch sie einerseits einem Feuchtigkeitsverlust an der verletzten Stelle vorbeugen und andererseits durch die Versiegelung der Wunde Infektion abhalten bzw. die Ausbreitung von Infektionen verhindern können (Clarke et al. 1979). Guan und Nothnagel (2004) konnten durch Präzipitation der Arabinogalaktan-Proteine mittels β -glucosyl Yariv Reagenz auch ähnliche Reaktionen nachstellen, wie sie im Zuge von mechanischen Verwundungen oder pilzlichen Infektion vorkommen. Daher vermuten sie, dass Yariv-induzierte Aggregation von Plasmamembran-AGPs Stress verursacht, der zu Membranschäden führt, die mit Schäden durch mechanische Verwundung oder Pathogenbefall vergleichbar sind (Guan und Nothnagel 2004).

Für den Nachweis der Arabinogalaktan-Proteine wurde der Single Radial Diffusion Assay ausgewählt, bei welchem mit Hilfe des β -glucosyl-Yariv Reagenz die Arabinogalaktan-Proteine in einem Agarosegel präzipitiert werden können (Holst und Clarke 1985). Das Präzipitations-Antigen β -glucosyl-Yariv Reagenz [1,3,5-tris(4- β -glucospyranosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzen] (Yariv et al. 1962) wurde dafür nach der Anleitung von Ganjian und Basile (1997) synthetisiert. Die, im Rahmen der Überprüfung der Substanz erhaltene Signale für H^+ der Kernspinresonanzspektroskopie konnten mit Hilfe von Dr. Jörg Schrittwieser jenen H^+ Molekülen aus dem β -glucosyl-Yariv Reagenz zugeordnet werden. Das fertige Reagenz bindet und präzipitiert Arabinogalaktan-Proteine (Ganjian und Basile 1997), wodurch im Single Radial Diffusion Assay rot gefärbte Hali entstehen (http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf Stand 2.3.2016). Für die Bindung der AGPs sind jedoch sowohl der Kohlehydratanteil als auch der Proteinanteil notwendig (Ellis et al. 2010). Sowohl bei den Standards (*Gummi arabicum*) als auch bei den Extrakten aus Kürbis und Efeu wurden im Single Radial Diffusion Assay dunkelorange Hali erhalten, wodurch der Schluss auf Arabinogalaktan-Proteine als Hauptanteil der austretenden Substanzen im Zuge des Wundverschlusses gezogen werden kann. Laut Holst und Clarke (1985) besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge an Arabinogalaktan-Proteinen in der Probe und der Präzipitationsfläche (quadrierter Halo-Durchmesser) im Single Radial Diffusion Assay. Die quantifizierten Mengen sollten jedoch mit Vorsicht genossen werden, da laut Yariv et al. (1967) erst bei einem 1:1 Verhältnis (bezogen auf das Gewicht des β -glucosyl-Yariv Reagenz und der Polysaccharide) von Farbstoff zu Polysacchariden mehr als 90% von den Polysacchariden im Präzipitat gebunden werden kann. Folglich wäre bei einem falschen Verhältnis (zu wenig Farbstoff auf die Menge an AGPs) der Farbstoff aufgebraucht, wodurch höhere AGP Konzentrationen trotzdem zu keiner stärkeren Färbung bzw. keinem größeren Halodurchmesser führen würden. Die Vermutung, dass das verwendete Verhältnis zwischen Farbstoff und AGPs in der Probe nicht ideal war, wird deutlich, wenn man die quantifizierten Mengen der drei Konzentrationen (15 mg/ml, 25 mg/ml und 50 mg/ml) betrachtet. Ein linearer Anstieg zwischen 25 mg/ml und 50 mg/ml war nicht der Fall. Des Weiteren konnten auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den reinen AGPs und den AGPs + darunter liegendes Gewebe festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass durch die Verwundung bereits der Großteil an AGPs ausdringen konnte, wodurch zwischen den beiden Probenansätzen keine wesentlichen mengenmäßigen

Unterschiede quantifiziert werden konnten. Ob bei dem Wundverschluss sowohl Zellwand-gebundene Arabinogalaktan-Proteine (Guan und Nothnagel 2004) bzw. Arabinose und Galaktose reiche Glykoproteine (Clarke et al. 1979) als auch Membran-assoziierte AGPs (Guan und Nothnagel 2004, Clarke et al. 1979) beteiligt sind, bleibt ungeklärt.

Prinzipiell konnten zwar bei allen *D. bryoniae* inokulierten Wunden im Vergleich zu den nicht inokulierten Wunden höhere Konzentrationen an AGPs festgestellt werden, statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht herausgefunden werden. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an der verwendeten Quantifizierungsmethode, da das Ausmessen des Halodurchmessers visuell vom jeweiligen Betrachter abhängig ist. Scharfe Halogrenzen, wie sie bei Holst und Clarke (1985) oder Anderson et al. (1977) zu sehen sind, konnten mit dem Single Radial Diffusion Assay und den AGPs aus *C. pepo* nicht erreicht werden. Hinzu kommt, dass bei einem Großteil der Proben zusätzlich zum ausgemessenen Halo ein sehr heller (nur bei genauer Betrachtung sichtbarer) größerer Halo auftrat, der eine Ungenauigkeit der Methode vermuten lässt. Bereits bei Holst und Clarke (1985) traten bei manchen AGPs zwei unterschiedliche Halos auf, einer eher diffus, der andere mit einer scharfen Grenze. Weitere genauere Untersuchungen sind daher mit Sicherheit noch erforderlich. Ein Trend zum Pathogen-verstärkten Wundverschlusses kann jedoch trotzdem erkannt werden.

Neben der Extraktion der Arabinogalaktan-Proteine und deren Nachweis mittels Single Radial Diffusion Assay wurde der β -glucosyl-Yariv Farbstoff auch zur Lokalisation der AGPs in Kryoschnitten herangezogen. Die Färbungen wurden nach den Empfehlungen von der Firma Biosupplies durchgeführt (http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf Stand 2.3.2016). Im Mikroskopiemedium konnten große dunkelrote Präzipitate gefunden werden, die ein Vorhandensein von AGPs bestätigten. Die Bereiche unter der Epidermis, in welchen die Präzipitate vermutet wurden waren nur teilweise dunkelorange bis rot gefärbt. Da die AGPs für gewöhnlich wasserlöslich sind (Clarke et al. 1979) ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass aus der Zellwand ausgetretenen AGPs während der Präparation aus dem Schnitt ausgewaschen wurden. Clarke et al. (1979) beschreiben einen alternativen Ansatz zur Lokalisation von AGPs, bei welchem das Gewebe vor der Färbung mit dem Yariv Reagenz mit einer Mischung eines kationischen Detergens und einem Aldehyd Fixiermittel behandelt wird. Durch eine solche Fixierung könnte das Problem der Wasserlöslichkeit eventuell umgangen werden. Ob es sich bei den dunkelorange bis rot gefärbten Bereichen unter der Epidermis um Yariv-gebundene AGPs handelt, bleibt ungewiss. Laut Biosupplies (http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf Stand 2.3.2016) kann eine Variation der Farbe von braun-rot bis hellrot bzw. leuchtend rot in Abhängigkeit vom vorhandenen Gewebe auftreten. Die Zellwand-gebundenen AGPs aus tiefer liegenden parenchymatischen Gewebeanteilen zeigten hingegen schöne dunkelrote Präzipitate entlang der Zellwände.

Im Zuge der Physiologischen Messreihe sollte Auswirkungen von *D. bryoniae* auf den Photosyntheseapparat, Veränderungen der Pigmentzusammensetzung der Blätter, sowie die Antioxidative Kapazität und die Bildung von Wasserstoffperoxid untersucht werden. Letzteres wird bekanntlich häufig als Reaktion auf Pathogenbefall gebildet (Nga et al. 2010, Shetty et al. 2008) und übernimmt diverse Funktionen im Rahmen der Pathogenabwehr, wie z.B. ein Aufhalten der Pathogen-Penetration (Wu et al. 1995) oder die Aktivierung der Abwehrreaktion in der Pflanze (Wu et al. 1997). Dieses Aufhalten bzw. Verhindern der Pathogen-Penetration durch die Akkumulation von H_2O_2 an der Penetrationsstelle, konnte Nga (2007) ebenfalls an Wassermelone und *D. bryoniae* Befall nachweisen. Im Rahmen der physiologischen Untersuchungen konnten sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den *D. bryoniae* inokulierten Blättern H_2O_2 -Ansammlungen festgestellt werden. Die

Größe und Intensität der H₂O₂ Flecken waren jedoch bei den inokulierten Blättern deutlich ausgeprägter. Die Flecken traten einerseits auf den Blattspreiten und andererseits entlang der Leitbündel auf und könnten eine Reaktion auf keimende Sporen oder Ausbreitung von *D. bryoniae* darstellen. Laut Wu et al. (1995) zählt die Ansammlung von H₂O₂ zu den frühesten Anzeichen der Erkennung einer Wirt-Pathogen Interaktion, wobei H₂O₂ eine Rolle in unterschiedlichen Abwehrreaktionen, wie z.B. in der Aktivierung der Biosynthese der Phytoalexine, sowie in der Induktion der Vernetzung von Hydroxyprolin-reichen Zellwand Glykoproteinen, spielt. Des Weiteren soll H₂O₂ inhibitorische Wirkung auf pektolytische Enzyme haben, die in der Infektionsbiologie im Rahmen des Zellwand-Abbaus eine wichtige Rolle spielen (Wu et al. 1995). H₂O₂ Akkumulationen können mittels Diaminobenzidin nachgewiesen werden, da dieses nach Oxidation mit H₂O₂ (unter Anwesenheit von Peroxidasen) einen braunen, wasserunlöslichen Niederschlag bildet (Thordal-Christensen et al. 1997). Großkinsky et al. (2012) dokumentierten für *Pseudomonas syringae* inokulierte Blätter von *Arabidopsis thaliana* ein Auftreten von kleinen hellbraun gefärbten Arealen bereits 12 Stunden (avirulenter Stamm) bzw. 24 Stunden (virulenter Stamm) post Inokulation. Ebenso beschreiben Thordal-Christensen et al. (1997) bei epidermalen Zellen ein erstes Auftreten von H₂O₂ im Zuge des HR (hypersensitive response) 15 Stunden post Inokulation. Die frühe Akkumulation von ROS (reactive oxygen species) soll im Zuge des HR den Zelltod induzieren, um eine Ausbreitung des Pathogens einzuschränken (Großkinsky et al. 2012). Nga et al. (2010) konnten ebenfalls nachweisen, dass H₂O₂ lediglich in den frühen Stadien der Wirt-Pathogenbeziehung inhibitorische Wirkungen auf das Pathogen ausübt, während im späteren Stadium die H₂O₂ Wirkung vermutlich zu gering ist oder vom Pathogen überwunden werden kann. Laut Nga et al. (2010) führt H₂O₂ zu einer Inhibition des Wachstums und der Entwicklung von biotrophen Pathogenen, während gleiches vorteilhaft für die Infektion und Ausbreitung von nekrotrophen Pathogenen ist. Im Rahmen von Blüteninfektionen zeigte Neergaard (1989b) symptomloses interzelluläres Wachstum von *D. bryoniae*, was auf einen biotrophen Lebensabschnitt von *D. bryoniae* zurück zu führen ist (Nga et al. 2010). *D. bryoniae* zählt somit zu den fakultativ nekrotrophen Pathogenen (Svedelius 1990), wodurch H₂O₂ in den frühen Phasen der Interaktion (biotrophe Phase des Pilzes) eine inhibitorische Wirkung ausüben könnte (Nga et al. 2010). Da in diesem Fall der H₂O₂ Nachweis erst neun Tage post Inokulation stattfand, können keine klaren Schlüsse über die Auswirkungen von H₂O₂ auf *D. bryoniae* gezogen werden. Nachdem die Anzahl und das Ausmaß der Blatt-Symptome sich in Grenzen hielten, ist eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *D. bryoniae* nicht ausschließbar. Wachstums-inhibitorische Wirkungen von H₂O₂ auf Pathogene konnten bereits von Wu et al. (1995) bei *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* und *Phytophthora infestans* festgestellt werden, die bei Anwesenheit von 100 µM H₂O₂ stark reduziertes oder kein Wachstum zeigten. Ebenso konnte die Sporenkeimung von *Peronospora tabacina*, *Cladosporium cucumerinum* und *Colletotrichum lagenarium* durch H₂O₂ (2,61*10⁻⁵ M) verhindert werden (Peng und Kuc 1992). Für eine Beurteilung der Auswirkungen von H₂O₂ auf *D. bryoniae* wäre vermutlich der H₂O₂ Nachweis zu mehreren Zeitpunkten post Inokulation notwendig. Des Weiteren könnte man ein Screening der unterschiedlichen Peroxidase Isoformen während der verschiedenen Stadien der Infektion durchführen, da Peroxidase Isoformen während der frühen Stadien vermutlich in der Abwehr beteiligt sind, während andere Isoformen gegen Ende der Infektion aufgrund von zellulärem Stress an der Entfernung von H₂O₂ beteiligt sind (Nga et al. 2010). Im Rahmen dieser Untersuchungen liegt die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass ein Ausbleiben der Blatt-Symptome nicht allein auf die Wirkung von H₂O₂ zurück zu führen ist, sondern das *D. bryoniae* die unverletzten Kürbisblätter nicht ausreichend infizieren konnte.

Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenzmessungen und Messungen der Photosyntheserate sollte überprüft werden, ob ein Infektionsnachweis von *D. bryoniae* vor der Entstehung der ersten Symptome möglich ist. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits bei Rolfe und Scholes (2010) vorgestellt und resultierten in Abhängigkeit von den vorliegenden Wirt-Pathogen-Interaktionen in unterschiedlichen Ausgängen. Typische frühe Reaktionen der Wirtspflanzen (sowohl bei Interaktionen zwischen Pflanzen und Viren, Bakterien oder Pilzen) sind eine Verminderung der Effizienz des Photosystems II (PSII), eine Zunahme im „non photochemical quenching“ (NPQ) und eine Abnahme im Verhältnis F_v/F_m , während im späteren Stadium der Infektion aufgrund der Zerstörung des Photosyntheseapparats in allen Parametern eine Abnahme erfolgt (Rolfe und Scholes 2010). Einflüsse von *D. bryoniae* auf *C. pepo* sollten durch Bestimmungen des Verhältnisses F_v/F_m , welches Aussagen über Stresszustände in Blättern zulässt (Baker 2008), und durch Messungen der Photosyntheseraten über den Verbrauch von CO_2 untersucht werden.

Wenn Blätter Licht ausgesetzt sind, das ausreicht um Photosynthese zu betreiben, wird das Licht vom Chlorophyll absorbiert. Dies treibt einerseits die Photosynthese an und steht andererseits mit der Abgabe der Energie in Form von Hitze (Verbrauch der Chlorophyllanregungsenergie in Form von Hitzeabstrahlung= non photochemical quenching) und Fluoreszenz in Konkurrenz. Während die letzten beiden Prozesse überschüssige Anregungsenergie abbauen und dadurch die Bildung von schädigenden freien Radikalen verhindern (Murchie und Lawson 2013), dient die Photosynthese der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie (Arnon et al. 1954). Durch Licht angeregte Chlorophyllmoleküle des PSII übertragen jeweils ein, von der Wasserspaltung abstammendes Elektron über den initialen Akzeptor Phäophytin auf den Elektronenakzeptor Q_A . Solange dieser das Elektron nicht an den nächsten Elektronenakzeptor (Q_B) in der Elektronentransportkette weitergegeben hat, kann Q_A keine weiteren Elektronen übernehmen. In diesem Zustand ist das Reaktionszentrum geschlossen. Eine kurzzeitige Verminderung der Effizienz des PSII ist die Folge. Dieser Zustand wird bei der Bestimmung von F_v/F_m ausgenutzt. Dunkel adaptierte Blätter (PSII Reaktionszentren sind geschlossen, kein NPQ) werden einem „measuring light“ ausgesetzt, dessen Intensität zu gering ist, um den Elektronentransport in Gang zu setzen. Dadurch wird die minimale Chlorophyllfluoreszenz (F_0) bestimmt. Durch die Auslösung eines Sättigungsimpulses schließen sich alle Reaktionszentren, wodurch die maximale Chlorophyllfluoreszenz (F_m) erhalten wird. Die Differenz zwischen F_0 und F_m ergibt die variable Fluoreszenz F_v . Das Verhältnis zwischen F_v und F_m widerspiegelt die maximale Quantenausbeute des PSII (Murchie und Lawson 2013, Baker 2008). In gesunden Blättern liegt der Quotient zwischen F_v und F_m ca. bei 0.83 (Scholes und Rolfe 2009, Rolfe und Scholes 2010, Scherf 2012, Murchie und Lawson 2013, Baker 2008) während Stress in den meisten Fällen eine Reduktion des Wertes F_v/F_m zur Folge hat (Murchie und Lawson 2013), wodurch der Wert als Stressparameter in Betracht gezogen werden kann (Scherf 2012).

Bei den Bestimmungen der Photosyntheserate von *C. pepo* ergaben zunächst sowohl die Kontrollen als auch für die inokulierten Pflanzen im Zeitverlauf einen Anstieg in der Photosyntheserate, bevor dieser ab der vierten Messung bei den inokulierten Pflanzen absank. Dieser Anstieg ist vermutlich auf ein Wachstum der Blätter zwischen den einzelnen Messungen zurückzuführen, da diese zu Beginn der Messungen noch relativ klein waren. Die Verwendung älterer Blätter zeigte sich in einem vorherigen Durchlauf als unbrauchbar, da diese bereits relativ früh Anzeichen von Altersseneszenz zeigten. Geht man von einer erfolgreichen Infektion aus, könnte eine Verstärkung der vorhandenen intakten grünen Bereiche einen Anstieg in der Gesamt-Photosyntheserate bewirken. Scholes und Rolfe (2009) zeigten an *Mycosphaerella graminicola* Infektionen von Weizen eine Abnahme der Parameter F_v/F_m und PSII Effizienz innerhalb der Pilzläsionen, während in umgebenden

grünen Gewebeanteilen die Photosyntheserate im Vergleich zu den Kontrollen sogar erhöht war. Hinter dem Anknüpfen der Photosyntheserate vermuten sie eine Kompensationsreaktion auf den Verlust von grünem Blattgewebe (Scholes und Rolfe 2009). Berger et al. (2004) hingegen postulieren diesen Anstieg als Bereitstellung von Energie für Abwehrreaktionen. Da für die Photosynthesemessungen an *C. pepo* prinzipiell die grünen, vitalen Blattstellen bevorzugt wurden, könnte dies einen vorzeitigen Anstieg der Photosyntheseleistung erklären. In späterer Folge waren ein Großteil der inokulierten Blätter bereits welk bzw. zeigten ausgedehnte Blattflecken, die aufgrund von Schäden des Photosyntheseapparates eine Reduktion in der Photosyntheserate bewirkten (Scholes und Rolfe 2009, Aldea et al. 2006). In anderen Fällen konnte hingegen gezeigt werden, dass Einflüsse von Pathogenen auf die Effizienz des PSII auch Regionen außerhalb der Symptomzone betreffen können. Pilzinfektionen von *C. canadensis* resultierten in einer Reduktion der PSII Effizienz von 22%, wobei die Schäden sich weit ins optisch nicht beeinflusste Gewebe ausbreiteten (Aldea et al. 2006). Extreme Unterschiede ergeben sich scheinbar auch zwischen biotrophen und nekrotrophen Pathogenen. Nekrotrophe Pathogene bauen Wirtsgewebe mit Hilfe von Zellwand-abbauenden Enzymen ab und produzieren nicht selten Phytotoxine, die negative Einflüsse auf den Photosyntheseapparat ausüben. Bei biotrophen bzw. hemi biotroph/nekrotrophen Pathogenen erfolgt das Wachstum in der biotrophen Phase ohne sichtbare Symptome, wobei Untersuchungen der Effizienz des PSII, des NPQ und das Verhältnis F_v/F_m keine Auffälligkeiten zeigten (Scholes und Rolfe 2009). Vermutung liegen daher nahe, dass während der biotrophen Phase keine Schäden des Photosyntheseapparats auftreten (Scholes und Rolfe 2009). *D. bryoniae* ist ein fakultativ nekrotropher Pilz (Svedelius 1990), der relativ rasch von der biotrophen in die nekrotrophe Wachstumsphase übergeht (Neergaard 1989b), wodurch ein Abfall in der Photosyntheserate in frühen Stadien bereits erwartet werden kann. Aldea et al. (2006) konnten jedoch auch zeigen, dass Verminderungen der Photosynthese Effizienz nur teilweise auf Schäden der PSII Reaktionszentren (F_v/F_m) zurück geführt werden können und zu einem großen Teil das Ergebnis von verstärkter Energie-Abführung durch NPQ sind. Diese Überlegungen würden eine Erklärung für die ausbleibenden Abfälle von F_v/F_m in den Chlorophyllfluoreszenzmessungen von *C. pepo* bieten. Ohne Berücksichtigung des NPQ wäre erwartungsgemäß ein Abfall im Verhältnis F_v/F_m analog zu den erniedrigten Raten der Photosynthese die Folge. In der Realität hingegen zeigte sich, dass mit Ausnahme der stark befallenen, komplett vertrockneten Blätter, kaum Unterschiede zwischen den Kontrollen und den inokulierten Pflanzen vorlagen. Die F_v/F_m Werte lagen durchwegs im Bereich 0,8. Die Ausnahme bildete eine Pflanze, die bereits bei der zweiten Chlorophyllfluoreszenzmessung einen Wert von 0,099 zeigte und daher bei den Berechnungen nicht berücksichtigt wurde. Der rasche Abfall dieser einen Pflanze in Analogie zu den ausgeprägten Symptomen ließ die Vermutung aufkommen, dass *D. bryoniae* bei den restlichen Pflanzen nicht gut infizieren konnte. Scherf (2012) konnte bereits an *Pseudoperonospora cubensis* infizierten Gurken zeigen, dass Pflanzen mit geringer bis moderater Schwere der Erkrankung F_v/F_m Werte von 0,8 aufweisen, wodurch moderate Infektionen keinen messbaren Stress in den Pflanzen auslösten. Die Messungen an *C. pepo* fanden ebenso wie bei den Bestimmungen der Photosyntheseraten innerhalb der grünen, vitalen Blattstellen statt. Berger et al. (2004) entdeckte bei Tomaten, ähnlich wie bei der Effizienz der Photosynthese, dass Abnahmen von F_v/F_m lediglich in den direkten Bereich der Läsionen gemessen werden konnten, während die restliche Blattfläche homogene Werte um 0,79 ergab. Weiterführende Untersuchungen an *C. pepo* mit *D. bryoniae* sollten daher Vergleiche zwischen Werten innerhalb der Blattflecken und jenen in grünen, vitalen Blattbereichen ziehen.

Die Zusammensetzung der Blattpigmente ändert sich durch Einwirkung von biotischen oder abiotischen Stressfaktoren (Blanchfield et al. 2006). Eine Reduktion der Chlorophylle als Antwort auf Trockenstress (Maroco et al. 2002) oder nach Virus-Infektionen (Hock und Elstner 2004) konnten bereits gezeigt werden. Analog zu den Untersuchungen der Chlorophyllfluoreszenz und der Photosyntheserate, sollte bei den Pigmenten untersucht werden, ob *D. bryoniae* Infektionen vor dem Auftreten von Blattsymptomen bereits in Änderungen der Blattpigment-Zusammensetzungen sichtbar werden. Ähnliche Versuche wurden bereits an Reblaus

befallenen Weintrauben von Blanchfield et al. (2006) durchgeführt, die einen reduzierten Chlorophyllgehalt und einen erhöhten Gehalt an photoprotektiven Pigmenten feststellen konnten. Der Gehalt an Gesamt-Carotinoiden war zwar erniedrigt, jedoch war das Verhältnis zwischen Gesamt-Carotinoiden und Chlorophyllpool erhöht, was Blanchfield et al. (2006) auf einen Anstieg der Xanthophylle zurückführten. Die Pigmentzusammensetzungen der *C. pepo* Blätter nach Inokulation mit *D. bryoniae* zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollen und inokulierten Pflanzen. Sowohl der Chlorophyll a, als auch Gesamt-Carotinoidgehalt waren bei den inokulierten Pflanzen minimalst reduziert. Die geringen Unterschiede zwischen den inokulierten Pflanzen und den Kontrollen könnten darauf zurückgeführt werden, dass Infektionen mit *D. bryoniae* vor der Symptomentwicklung nicht in der Zusammensetzung der Pigmente sichtbar werden oder dass die geringen Unterschiede der Pigmente zwischen den beiden Gruppen ein Resultat der fehlgeschlagenen Infektion widerspiegelt. Da mittels Photometrie lediglich der Gehalt an Gesamt-Carotinoiden bestimmt werden kann, konnten keine Unterschiede zwischen Carotinen und Xanthophyllen, sowie ein eventueller Anstieg der Xanthophylle sichtbar gemacht werden.

In der Literatur findet man zahlreiche Definitionen für Antioxidantien (Huang et al. 2005). In Huang et al. (2005) werden unterschiedliche Definitionen aufgegriffen, wobei eine biologisch relevante Definition Antioxidantien als synthetische oder natürliche Substanzen bezeichnet, welche eine Verzögerung oder Verhinderung einer Oxidation eines Stoffes durch Luftsauerstoff bewirken. Huang et al. (2005) schließen daraus, dass der Begriff „Antioxidantien“ sowohl enzymatische Antioxidantien (wie z.B. Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathion-Peroxidase) als auch nicht enzymatische Antioxidantien (wie z.B. oxidative Enzym Inhibitoren, ROS Radikalfänger oder Chelatoren) umfasst, wodurch eine Bestimmung der „gesamten Antioxidativen Kapazität“ mittels eines einzigen Assays unmöglich wird. Zellstress, ausgelöst durch Akkumulation von „reactive oxygen species“ (ROS) im Zuge von biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen oder anderen metabolischen Prozessen (Mishra et al. 2012), erfordert die Anwesenheit und das Mitwirken von verschiedenen antioxidativen Systemen (Veskoukis et al. 2012). Pilzinfektionen sollen beispielsweise in Blättern unterschiedliche Komponenten des Ascorbat-Glutathion Zykluses, sowie andere Antioxidantien aktivieren. Insbesondere der Gehalt an Glutathion ist im Zuge einer Pathogen-Infektion erhöht (Vanacker et al. 1998). Ebenso konnten Vanacker et al. (1998) bei *Hordeum vulgare* Blättern einen Aktivitätsanstieg der apoplastischen enzymatischen Antioxidantien des Ascorbat-Glutathion Zykluses (Ascorbat-Peroxidase, Monodehydroascorbat-Reduktase, Glutathion-Reduktase) im Zuge einer Inokulation mit *Blumeria graminis* zeigen. Die Untersuchung der Antioxidativen Kapazität von *C. pepo* nach Inokulation mit *D. bryoniae* wurde in diesem Fall mit dem DPPH Assay durchgeführt. DPPH ist ein stabiles Stickstoff-Radikal (Huang et al. 2005), das in methanolischer Lösung violett gefärbt ist (Mishra et al. 2012) und ein UV-vis Absorptionsmaximum bei 515 nm hat (Huang et al. 2005, Mishra et al. 2012). Im Assay wird ein H^+ Molekül vom Radikalfänger (Antioxidantien) auf das DPPH übertragen, wodurch dieses zum DPPH₂ reduziert wird. Im Zuge der Reduktionsreaktion tritt eine Änderung der Farbe von violett zu gelb auf, was mit einer Absorptionsabnahme bei 515 nm einhergeht. Der Farbumschlag kann mittels Spektrophotometrie verfolgt werden (Mishra et al. 2012). Der verbleibende Anteil an DPPH wird berechnet und ist proportional der Konzentration an Antioxidantien (Huang et al. 2005). Dabei gilt je geringer die Absorption desto höher die Konzentration an Antioxidantien (Kedare und Singh 2011). In diesem Fall konnten relativ geringe Konzentrationen an Antioxidantien festgestellt werden. Unterschiede zwischen den Kontrollen und den inokulierten Pflanzen konnten hierbei nicht ausgemacht werden. Lediglich zwei inokulierte Blätter, die bereits starke Symptome aufwiesen, zeigten im Vergleich zu den anderen leicht erhöhte

Antioxidantien-Konzentrationen. Die generell niedrigen Antioxidantien-Konzentrationen sind vermutlich wiederum auf eine geringe Infektionsrate während der physiologischen Untersuchungen zurück zu führen, auf welche bereits beim H_2O_2 Nachweis hingewiesen wurde. Da in diesem Falle der DPPH Assay als „fixed reaction time Assay“ angewandt wurde, bei welchem die Absorptionsabnahme nach einer fixen Zeitspanne (üblicherweise 30 min (Mishra et al. 2012); in diesem Fall bereits nach 15 min) photometrisch gemessen wird, konnten lediglich Antioxidantien mit einer schnellen bis maximal mittleren Kinetik („steady state“ wird unmittelbar → schnelle Kinetik bzw. nach bis zu 30 Minuten → mittlere Kinetik erreicht (Brand-Williams et al. 1995) bestimmt werden. Hinzu kommt eine Abhängigkeit der Kinetik von der vorliegenden Antioxidantien-Konzentration (Mishra et al. 2012). Curcumin (5-50 μ M) benötigt laut Mishra et al. (2012) beispielsweise mehr als 180 min für eine vollständige Reaktion. Antioxidantien mit langsamer Kinetik konnten somit nicht erfasst werden. Fortführende Untersuchungen sollten daher eher als „steady state measurements“ durchgeführt werden, bei welchen die Abnahme der DPPH Absorption bis zum Eintreten eines „steady states“ verfolgt wird (Mishra et al. 2012).

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der gefaulten Früchte [%] der Jahre 2010-2013. Die Anzahl der gefaulten Früchte der einzelnen Sorten wurden gemittelt. Die untersuchten Sorten waren Diamant, Gleisdorfer Ölkürbis, Beppo, Global, Opal, Rustikal (2010). Die Einzelwerte der unterschiedlichen Sorten (2010: Beppo 42,79 % gefault, Diamant 16, 81% gefault) schwanken jedoch enorm (<http://www.versuchsreferat.com/presse.html> Stand 2.3.2016).

Tabelle 2: Anbauplan Gleisdorfer Ölkürbis für Freilandversuche. Pro Feld wurden drei verschiedene Anbauermine (1.5., 14.5. und 28.5.) ausgewählt und in unterschiedlichen Kombinationen aneinander gereiht. Jeweils drei Parzellen (eine Parzelle entspricht einer Spalte) mit drei unterschiedlichen Anbauermine wurden für eine der drei Inokulationsversuche (Inokulation der Früchte, Inokulation der Blüten und Sprosse, sowie Kontrollen) nebeneinander gelegt. Der Ansatz wurde insgesamt dreimal in unterschiedlichen, nebeneinander liegenden Kombinationen wiederholt. B, S= Blüte, Spross, F= Frucht, 0= Kontrollen.

Tabelle 3: Klimadaten der Monate Juli und August 2015 der Wetterstation Kremsmünster (Oberösterreich). T [°C]= Lufttemperatur Monatsmittel, Nied_01= Anzahl der Tage mit Niederschlag $\geq 0,1$ mm, Nied [mm]= Monatssumme Niederschlag, öw. rel. trockenster Ort (Niederschlag M., Abweichung z. M.)= österreichweit relativ trockenster Ort (Niederschlag Monatssumme, Abweichung zum Mittel 1981-2010) (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

Tabelle 4: Anzahl der erkrankten/gesunden Blätter und Blattstielabschnitte nach der zweiten Bonitur nach Aufsprühen von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf die Blattfläche.

Tabelle 5: Übersicht der Anzahl der erkrankten/gesunden Stängel- und Blattstielabschnitte durch Injektion von *Didymella bryoniae* Pykno-sporen in die Markhöhle der Stängel und Blattstiele. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Tabelle 6: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängel- und Blattstielabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pykno-sporen. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Tabelle 7: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pykno-sporen im Bereich der Stängelunterseite. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Tabelle 8: Übersicht der Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach Applikation von *Didymella bryoniae* Pykno-sporen im Bereich der Stängeloberseite zwischen zwei Knotenpunkten. Pro Seitenzweig wurden zwei Stängelabschnitte (Hagel+ und Hagel-) infiziert. Hagel+= älterer Stängelabschnitt mit Hagelschaden, Hagel-= jüngerer Stängelabschnitt ohne Hagelschaden. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Tabelle 9: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension in die Markhöhle männlicher Blütenstiele. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul, ang. Stängel vt= angrenzender Stängel vertrocknet.

Tabelle 10: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf Antheren der männlichen Blüten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Blüten. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul.

Tabelle 11: Anzahl der erkrankten/gesunden Stängelabschnitte nach künstlicher Applikation von *Didymella bryoniae* Sporensuspension auf die Narbe der weiblichen Blüten. Als Kontrollen dienten unbehandelte Blüten. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper, ang. Stängel= angrenzender Stängel, beg. Stängelf= beginnende Stängelfäule, ang. Stängel f= angrenzender Stängel faul.

Tabelle 12: Anzahl der aufgegangenen Pflanzen, sowie das Wachstumsstadium der Pflanzen der drei Versuchswiederholungen A, B und C. FB= Folgeblätter.

Tabelle 13: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte zwischen den inokulierten und nicht inokulierten (Kontrollen) jungen Früchten.

Tabelle 14: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte ohne mechanische Verwundung, nach mechanischer Verwundung und den Kontrollen. Die Kontrollen sind unbehandelte ältere Früchte. DB FK= *Didymella bryoniae* Fruchtkörper.

Tabelle 15: Vergleich der Anzahl der gesunden und erkrankten Früchte zwischen den Früchten ohne ritz hell, ohne ritz dunkel, ritz hell, ritz dunkel und den Kontrollen. Ohne ritz hell= ältere Früchte ohne künstliche Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ohne ritz dunkel= ältere Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle, ritz hell= ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle, ritz dunkel= ältere Früchte mit künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kontrollen sind unbehandelte ältere Früchte.

Tabelle 16: Anzahl der Verwundungsstellen, aus welchen am 1. Tag nach der Verwundung, sowie am 3. Tag nach der Verwundung visuell mehr Arabinogalaktan-Proteintropfen austraten. \perp = nicht inokulierte Verwundungsstelle, \perp = inokulierte Verwundungsstelle, 1. Tag n. V. = 1. Tag nach der Verwundung, 3. Tag n. V. = 3. Tag nach der Verwundung.

Tabelle 17: Gemittelte Arabinogalaktan-Protein Konzentrationen in mg/ml. Die Werte wurden jeweils auf ganze Zahlen gerundet. AGP= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen (reine AGP Probe), AGP + Gewebe= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen + darunter liegendes Gewebe.

Tabelle 18: Gemittelte Photosynthesrate in $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$. Die Werte wurden auf eine Kommastelle gerundet. i= inokuliert, k= Kontrollen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: eingetragene Ölkürbissorten der österreichischen Sortenliste 2015, f= freiabblühende Sorte, h= Hybridsorte, ub= unbeschalt, += Sorten, die erstmals angeführt sind (<http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-sortenliste/> Stand 15.12.2015).

Abbildung 2: A: Geografisch definierte Anbauggebiete des Steirischen Kürbiskernöls g.g.A.. Die Gebiete sind mit schwarzer Linie dick umrandet und betreffen die südliche Steiermark mit den Bezirken Deutschlandsberg, Graz, Graz-Umgebung, Hartberg-Fürstenfeld, Leibnitz, Südoststeiermark, Voitsberg und Weiz, das südliche Burgenland mit den Bezirken Jennersdorf, Güssing und Oberwart, sowie Teile Niederösterreichs mit den Bezirken Hollabrunn, Horn, Mistelbach, Melk, Gänserndorf (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Zistersdorf), und Korneuburg-Stockerau (eingeschränkt auf Gerichtsbezirk Stockerau) (Verordnung (EU) Nr. 1151/2012). B: Die Banderole des Steirischen Kürbiskernöls mit offiziellem Symbol „g.g.A.“ für geschützt geografische Angabe, sowie der fortlaufenden Kontrollnummer und der Mengenangabe in Liter. (<http://www.kuerbiskernoelshop.com/EU-Herkunftsschutz> Stand 2.10.2015)

Abbildung 3: Strukturmodell der Arabinogalaktan-Proteine mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Membrananker. Die Polysaccharidketten sind mit den Hydroxyprolin-Resten über O-glykosidische Verbindungen mit dem Proteingerüst verbunden. Jede Arabinogalaktan-Kette besteht aus β -(1-3)-verknüpften Galaktose-Oligosaccharidketten. Weitere Hydroxyprolin-Reste sind mit kurzen Arabino-Oligosacchariden verbunden. Gal= Galaktose, Rha= Rhamnose, GlcA= Glucuronsäure, Ara= Arabinose, Ara oligosacc= Arabino-Oligosaccharidkette. Modifiziert von Ellis et al. (2010).

Abbildung 4: Inokulation der Kürbisblätter mittels Konidiensuspension. Als Abtropfasse wurde ein Karton verwendet. A: Auftragung der Suspension mittels Sprühflasche bis zum Abtropfen. B: Markierung des inokulierten Blattes im Feld.

Abbildung 5: Inokulation der Blattstiele und Stängel. A: Wahl der mittigen Einstichstelle bei der Inokulation eines Blattstiels. B: Inokulation eines Blattstiels mit Injektionsnadel und Applizierung der Konidiensuspension in die Markhöhle. Die Konidiensuspension tritt teilweise an der Einstichstelle heraus. Applizierung der Konidiensuspension mittels Sprühflasche C: auf einem Blattstiel und D: auf einem Stängel.

Abbildung 6: Inokulation eines mechanisch beschädigten Stängels, sowie eines unbeschädigten Stängels am selben freiliegenden Seitenzweig einer Pflanze. A: Der inokulierte Bereich befindet sich zwischen den, mit weißem Sprühlack markierten Knotenpunkten. B: Inokulation eines unbeschädigten, jungen Stängelabschnittes. Die Knotenpunkte wurden noch nicht markiert.

Abbildung 7: Inokulation einer männlichen und einer weiblichen Blüten von *Cucurbita pepo* var. *styrica*. A: Applikation der Konidiensuspension mittels Injektionsnadel auf dem Stempel einer männlichen Blüte. B: Applikation der Konidiensuspension auf die Narbe der weiblichen Blüte.

Abbildung 8: Vorbereitungsarbeiten für die nachfolgende Inokulation. A: Vermessung einer jungen Frucht mittels Maßband. Vom Stielansatz bis zum Blütenboden beträgt die gemessene Länge ca. 3 cm. B: Einritzen einer älteren Frucht mittels Muskatnussreibe für die Schaffung einer künstlich erzeugten Eintrittsstelle.

Abbildung 9: Inokulationsvarianten der älteren Früchte. A: Inokulation einer älteren Frucht nach künstliche Verwundung (durch Küchenrolle am Bild nicht sichtbar) mittels Muskatnussreibe und Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Küchenrolle wurde mit Konidiensuspension besprüht. B: Inokulation einer älteren Frucht nach künstlicher Verwundung mittels Muskatnussreibe ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kunststoffolie wurde für eine zusätzliche Befeuchtung mit Konidiensuspension besprüht. C: Inokulation einer älteren Frucht ohne künstliche Verwundung, jedoch mit Abdunkelung der Infektionsstelle. Die Küchenrolle wurde mit Konidiensuspension besprüht. C: Inokulation einer älteren Frucht ohne künstliche Verwundung, sowie ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle. Die Kunststoffolie wurde mit Konidiensuspension besprüht.

Abbildung 10: Vergleich der nicht inokulierten Verwundungsstelle mit einer inokulierten Verwundungsstelle. A: Kontroll-Verwundungsstelle B: inokulierte Verwundungsstelle.

Abbildung 11: Temperaturabweichung für A: Juli 2015 und B: August 2015 in °C in Bezug auf das langjährige Mittel der Jahre 1981-2010 (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

Abbildung 12: Prozent des Niederschlagsnormalwertes für A: Juli 2015 und B: August 2015 in Bezug auf das langjährige Mittel der Jahre 1981-2010 (modifiziert von <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016).

Abbildung 13: Keimungsrate der Versuchswiederholung 1 unter Laborbedingungen. inf kurz= Samen kurz in Konidiensuspension [c]= 10^6 Sporen/ml eingelegt, inf 10 min= Samen für 10 Minuten in Konidiensuspension [c]= 10^6 Sporen/ml geschwenkt.

Abbildung 14: Keimungsrate der Versuchswiederholung 2 unter Laborbedingungen. inf kurz= Samen kurz in Konidiensuspension [c]= 10^6 Sporen/ml eingelegt, inf 10 min= Samen für 10 Minuten in Konidiensuspension [c]= 10^6 Sporen/ml geschwenkt.

Abbildung 15: Strukturformel von β -D-glucosyl Yariv Reagenz (gezeichnet in Chemdraw von Dr. Jörg Schrittwieser).

Abbildung 16: lineare Regressionsgerade des Standards Gummi arabicum zur Bestimmung der Konzentration der Arabinogalaktan-Proteine. Die Konzentrationen der Arabinogalaktan-Proteine wurden mit der Geradengleichung $y=5,86+2,11*x$ berechnet.

Abbildung 17: Gemittelte Arabinogalaktan-Protein Konzentration in mg/ml. AGP= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen (reine AGP Probe), AGP + Gewebe= austretende, bernsteinfärbige, harzige Substanzen + darunter liegendes Gewebe, i= inokuliert, k= Kontrollen.

Abbildung 18: Gemittelte Photosyntheserate in $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$. Die Messungen fanden jeden zweiten Tag statt. Die erste Messung wurde am ersten Tag nach der Inokulation durchgeführt. i= inokuliert, k= Kontrollen.

Abbildung 19: Gemittelte Photochemische Effizienz (Fv/Fm). i= infiziert, k= Kontrollen.

Abbildung 20: Vergleich der Pigmente Chlorophyll a, Chlorophyll b und Gesamt-Carotinoide in mg/g Trockengewicht zwischen den Gruppen k und i. Für die Bestimmung der Pigmente wurden Einzelwerte der Gruppen gemittelt. k= Kontrollen, i= inokuliert.

Abbildung 21: lineare Regressionsgerade des Standards Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure). Durch Zugabe von DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) nimmt die Absorption mit steigender Standardkonzentration ab.

Abbildung 22: Vergleich der Einzelwerte der Antioxidantien-Konzentration in $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht zwischen den Gruppen k und i. k= Kontrollen, i= inokuliert.

Abbildung 23: Vergleich der Antioxidativen Kapazität (ARP %) zwischen den Gruppen k und i. Für die Bestimmung des ARP (anti radical power) wurden die Einzelwerte der Gruppen gemittelt. k= Kontrollen, i= inokuliert.

Abbildung 24: $^1\text{H-NMR}$ Sepktrum

7 Bildtafelverzeichnis

Bildtafel 1: Kultivierung von *Didymella bryoniae* auf potato dextrose agar (PDA). A: Anordnung der Fruchtkörper von *Didymella bryoniae* in konzentrischen Ringen um das Mycel-Ausgangsstück in der Mitte der PDA-Platte (linke Petrischale) und dichter, weißer Mycelrasen (rechte Petrischale). B: Nahaufnahme der, in konzentrischen Ringen angeordneten Fruchtkörper von *Didymella bryoniae*.

Bildtafel 2: Vorinokulation von Kürbisblättern und Blüten mit *Didymella bryoniae*. A: Kontrolle. Die eingeritzte Fläche wurde mit destilliertem Wasser behandelt. B, C und D: Ausbildung von Blattflecken an den Rändern (schwarze Pfeile), sowie im Bereich der eingeritzten Fläche (schwarze bzw. weiße Pfeile) B: sieben Tage, C: zwölf Tage und D: achtzehn Tage nach der Inokulation. E und F: Männliche Blüte nach Behandlung mit E: *Didymella bryoniae* Konidiensuspension und F: Pilzmycel. Die Abknickstelle befindet sich etwas über der Mitte des Blütenstiels (schwarzer Pfeil).

Bildtafel 3: Symptome der Blattflecken-Krankheit. A: junges, infiziertes Blatt 25 Tage nach Besprühen des Blattes mit *Didymella bryoniae* Konidiensuspension. Nekrotisches Blattgewebe im Bereich der Leitbündel mit Ausbildung von kleinen, schwarzen, kugeligen Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* (schwarzer Pfeil). Das Gewebe um die Nekrose ist vergilbt. B: vitaler, satt-grüner Blattstiel mit Großteils nekrotischer Blattfläche. C: nekrotische Blattunterseite mit Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae*. D: weicher, fauler Blattstiel mit Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* im Bereich der Abknickstelle und braun-schwarz gesprenkelten Blattflecken mit dunkelbraun verfärbten Leitbündeln (schwarzer Pfeil) (Bildausschnitt). E: vertrockneter Blattstielansatz mit angrenzendem vitalem Stängel. F: vertrocknetes Blatt, Blattstiel und Stängel.

Bildtafel 4: Symptome der Gummistängelkrankheit (nach Injektion von *Didymella bryoniae* Konidiensuspension in die Markhöhle der Stängel). A: gesunder, dunkelgrüner Stängelabschnitt. B: vitaler Stängelabschnitt mit massivem Hagelschaden. C: Nahaufnahme des Hagelschadens aus Abbildung B mit vereinzelter Ausbildung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf der verschlossenen Wunde. Das Gewebe zwischen den Verletzungen beginnt sich dunkelbraun bis schwarz zu verfärben (schwarze Pfeile). D: Stängelabschnitt mit beginnender Stängelfäule und Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf der verschlossenen Wunde (schwarzer Pfeil). E: Abgrenzung der verschlossenen Wunde vom gesunden Gewebe durch eine hellbraune Zone (schwarzer Pfeil). F: fauler, dunkelbraun bis schwarz verfärbter Stängelabschnitt mit massiver Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern.

Bildtafel 5: Symptome der Gummistängelkrankheit (nach Injektion von *Didymella bryoniae* Konidiensuspension in die Markhöhle der Stängel (Abbildungen A-D) bzw. Blattstiele (Abbildungen E-F)). A: bräunliche Verfärbung des Stängelgewebes, sowie des angrenzenden Blattstielgewebes (schwarzer Pfeil). B: Nahaufnahme des angrenzenden Blattstieles, welcher mit einem weißen und fädigen Pilzmycel durchzogenen ist (schwarzer Pfeil). C: Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf einem weichen, ausgebleichten Stängel und D: schwarz verfärbten Gefäßbündeln (schwarzer Pfeil). E: gesunder Blattstiel. F: satt-hellgrüner Blattstielabschnitt mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf einer kleinen, verschlossenen Wunde. Der Blattstiel zeigt an der Abrissstelle erste Symptome einer Stiefäule (schwarzer Pfeil).

Bildtafel 6: Symptome der Gummistängelkrankheit (nach Injektion von *Didymella bryoniae* Konidiensuspension in die Markhöhle der Blattstiele). A: ausgebleicher Blattstiel im Stadium der beginnenden Stiefäule mit

komplett vertrocknetem Blatt. B: Nahaufnahme des Blattstiels in der Nähe der Blattstielbasis mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf einer kleinen, verschlossenen Wunde (schwarzer Pfeil). C: *Didymella bryoniae* ausgelöste Stiefäule mit Abknickstelle kurz oberhalb der Blattstielmitte und komplett nekrotischer Blattfläche. D: schwarz verfärbter Blattstiel mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern an der Abknickstelle (schwarzer Pfeil), sowie E: an der Blattstielbasis. Abgrenzung des infizierten Blattstielgewebes vom gesunden Stängelgewebe durch eine dünne bräunliche Zone (schwarzer Pfeil). F: Sicht auf das gesunde Gewebe (schwarzer Pfeil) im Bereich des Knotenpunktes nach Abreißen des infizierten Blattstiels.

Bildtafel 7: Symptome der Gummistängelkrankheit (nach Besprühen der Stängel (Abbildung A-C) bzw. der Blattstiele (Abbildungen D-E) mit *Didymella bryoniae* Konidiensuspension). A: Ausbleichen des Stängels von dunkelgrün zu hellgrün-bräunlich. B: scheinbar gesunder Stängelabschnitte mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf bereits verschlossenen oberflächlichen Verletzungen (schwarze Pfeile) und C: Ausbildung brauner Zonen um die, von Fruchtkörpern besiedelten Stellen (schwarze Pfeile). D: gesunder, satt-grüner, fester Blattstielabschnitt mit E: *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern im Bereich einer kleinen, bereits verschlossenen Verletzung (schwarzer Pfeil). F: gefaulter Blattstielabschnitt mit schwarzer Verfärbung des Blattstielgewebes im Bereich der Abknickstelle.

Bildtafel 8: Vergleich der Inokulation mechanisch beschädigter Stängel (Hagel+: Abbildungen A-E) mit unbeschädigten Stängeln (Hagel-: Abbildung F). A: gesunder Stängelabschnitt mit massivem Hagelschaden und *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf der verschlossenen Wunde. Die Stängelabschnitte links und rechts von der Wunde sind vital. B: gesunder Stängelabschnitt mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf oberflächlichen, verschlossenen Verletzungen (schwarzer Pfeil). C: abgetrennter Blattstiel mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern im Bereich des markierten Knotenpunktes und Absonderung von bernsteinfärbigen, harzigen Substanzen im Bereich der Abrissstelle (schwarze Pfeile). D: bräunlich-schwarz verfärbter und vertrockneter Stängelabschnitt mit Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern (schwarzer Pfeil). E: Markhöhle eines vertrockneten Stängelabschnittes, durchzogen mit weißem, fädigen Mycel (weißer Pfeil). F: gesunder Stängelabschnitt mit angrenzendem komplett verfaultem Blattstiel. Das Gewebe im Bereich des Knotenpunktes ist orange-bräunlich bis schwarz verfärbt (schwarzer Pfeil).

Bildtafel 9: Inokulierte männliche Blütenstiele und angrenzende Stängelabschnitte. A: gesunder, fester Stängelabschnitt. Die angrenzenden Blüten- und Blattstiele sind vertrocknet. Zwischen dem gesunden Stängelgewebe und dem infizierten Blütenstielgewebe kommt es zur Ausbildung einer ringartigen Barriere (weißer Pfeil). An einer Abbruchstelle eines Blüten- oder Blattstiels tritt eine bernsteinfärbige, harzige Substanz aus (schwarzer Pfeil). B: ausgebleichener Stängelabschnitt distal zum vertrockneten Blütenstiel (im Bild nicht sichtbar). C: vertrockneter Blattstiel- und Blütenstielansatz mit angrenzendem stellenweise ausbleichendem Stängelabschnitt. Im Übergangsbereich zwischen Blattstiel und Stängel beginnt sich das Gewebe bräunlich zu verfärben (schwarzer Pfeil). D: vertrockneter Blütenstiel mit angrenzendem vertrocknetem Stängelabschnitt. E: vertrockneter, schwarz verfärbter Blütenstielabschnitt mit zahlreichen schwarzen, ins Gewebe eingesenkten Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae*.

Bildtafel 10: Symptome der Gummistängelkrankheit (nach Inokulation der männlichen (Abbildungen A-C) und weiblichen Blüten (Abbildungen D-F) mit *Didymella bryoniae* Konidiensuspension). A: gesunder, dunkelgrüner, fester Stängelabschnitt. Die angrenzenden Blüten- und Blattstiele sind vertrocknet und mit Fruchtkörpern des

Pilzes besetzt. B: vertrocknete Blüten- und Blattstiele mit angrenzendem vergilbtem Stängelabschnitt. C: Endstadium der Gummistängelkrankheit mit komplett vertrocknetem Fruchtkörper-besetztem Kürbisstroh (schwarzer Pfeil). D: gesunder, dunkelgrüner und fester Fruchtstiel und uninfizierter Frucht. Der angrenzende Stängelabschnitt zeigt keinerlei Symptome einer Stängelfäule. E: Vertrockneter, bräunlich bis schwarz gefärbter weiblicher Blütenstiel mit massiver Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern an der Blütenstielbasis. Der angrenzende Stängel beginnt im Bereich des Knotenpunktes auszubleichen. Der Stängelabschnitt ist jedoch noch fest. F: gräulich verfärbtes Gewebe im Bereich des Knotenpunktes mit Geflecht aus Hyphen.

Bildtafel 11: Blattflecken-Symptome auf Keimblättern nach Inokulation der Samen mit *Didymella bryoniae* Konidiensuspension (Unter Freilandbedingungen: Abbildungen A-D, unter Laborbedingungen: Abbildungen E-F). A: gesundes Keimblatt (nicht inokulierter Samen). B: einseitig nekrotisches Gewebe (von der Blattbasis bis zur Blattspitze einschließlich des Blattstielansatzes und des Blattstiels) mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern (schwarzer Kreis) Nähe der Blattbasis und vereinzelt, kreisrunden Fraßspuren des Gartenkugelspringers (schwarze Pfeile). Anordnung der Fruchtkörper in konzentrischen Ringen (Bildausschnitt). C: Blattflecken auf den gegenüberliegenden Blattinnenseiten des Keimblattpaares mit tropfenförmigem Austritt bernsteinfärbiger, harziger Substanzen Nähe der Blattspitze (schwarzer Pfeil). D: einseitig bräunlich verfärbtes, weiches Blattgewebe mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern (schwarze Pfeile). Die Ränder des Blattes sind im Bereich der Blattflecken eingerollt. E: gesunde Keimlinge (nicht inokulierte Samen). F: ausbleibende Keimung der inokulierten Samen.

Bildtafel 12: Inokulation der jungen Früchte. A: gesunde, dunkelgrün bis orange gefärbte Frucht mit fester Fruchtschale. B: tropfenförmiger Austritt bernsteinfärbiger, harziger Substanzen im Bereich des Blütenbodens einer gesunden Frucht (schwarze Pfeile). C: Ausbildung eines dichten Wundverschlusses (schwarzer Pfeil). D: komplett gefaulte, zusammen gesackte Frucht mit weichem Fruchtfleisch und ins Gewebe eingesunkenen, schwarzen Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* (schwarzer Pfeil). E: komplett vertrocknete Frucht mit F: abgetrenntem vertrocknetem Fruchtstiel und *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern (schwarzer Pfeil).

Bildtafel 13: Inokulation älterer Früchte ohne mechanische Verwundung. A: gesunde, gelb bis orange gefärbte Frucht. B: Ausbildung einer orange-bräunlichen Barriere um einen Hagelschaden (schwarze Pfeile). C: tropfenförmige Ansammlung von bernsteinfärbigen, harzigen Substanzen im Bereich des Blütenbodens und D: im Bereich von Hagelschäden. E: weiße Gewebsveränderung mit zentraler wulstartiger Verhärtung der Fruchtschale auf einer gesunden Frucht (schwarzer Kreis) und F: Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern gegen Ende der Vegetationsperiode.

Bildtafel 14: Inokulation ältere Früchte mit mechanischer Verwundung. A-F: *Cucurbita pepo* induzierter Verschluss der künstlichen mechanischen Verwundung. A: erster Tag nach der Verwundung, morgens. Starkes tropfenförmiges Ausquellen von durchsichtigen bis milchigen Substanzen. B: erster Tag nach der Verwundung, mittags. Ausbildung eines glänzenden Wundverschlusses durch Einsickern der Substanzen ins Wundgewebe. C: dritter Tag nach der Verwundung. Der glänzende Film ist dunkelorange gefärbt. D: vierter Tag nach der Verwundung. Ausbildung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf der verschlossenen Wunde. E: 25 Tage nach der Inokulation der Wunde. Auf der Wundfläche entstehen erste Risse. F: 26 Tage nach der Inokulation der Wunde. Die rissig gewordene Struktur beginnt abzublättern (schwarzer Pfeil).

Bildtafel 15: Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung und Abdunkelung der Inokulationsstelle. A: Ausbildung eines glänzenden Films über der Verwundungsstelle. B: Entstehung eines Sonnenflecks seitlich unterhalb der Verwundungsstelle. C: Nahaufnahme des Sonnenflecks mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern. Das Gewebe im Bereich des Sonnenflecks beginnt sich schwarz zu verfärben. D: Ausbreitung der Infektion auf das Sonnenfleck benachbarte Gewebe gegen Ende der Vegetationsperiode. E und F: Entwicklung der Fäule ausgehend von einem Sonnenfleck.

Bildtafel 16: Inokulation der älteren Früchte nach künstlicher Verletzung ohne Abdunkelung der Inokulationsstelle. A: gesunde Frucht mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf der verschlossenen Wunde. B: ausgedehnter Sonnenfleck mit zahlreichen Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* und diversen Schwärzepilzen. Das Gewebe im Bereich des Sonnenflecks ist schwarz verfärbt. C: Nahaufnahme einer künstlich zugeführten Verletzung mit zahlreichen Fruchtkörpern von *Didymella bryoniae* auf der rissigen Oberfläche der Wunde. Teilweise sind tropfenförmige, bernsteinfärbige Substanzen auf der Oberfläche der Wunde erkennbar. D: Frucht mit großem Sonnenfleck um die verschlossene Verletzung. Das Gewebe beginnt im Bereich des Blütenbodens zu kollabieren. E: Nahaufnahme der Verwundungsstelle mit tropfenförmigen, bernsteinfärbigen Substanzen. Das Wundgewebe ist durch eine deutliche bernsteinfärbige Zone vom Sonnenfleck-Gewebe abgetrennt. F: komplett verfaulte Frucht. Fruchtsiel und Frucht sind voneinander getrennt.

Bildtafel 17: Inokulation der älteren Früchte ohne künstliche Verletzung mit Abdunkelung der Inokulationsstelle. A: gesunde Frucht mit zwei kleinen länglichen Sonnenflecken entlang der ehemaligen Klebestelle. B: gesunde Frucht gegen Ende der Vegetationsperiode mit Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern auf dem Sonnenfleck-Gewebe. Eine Ausbreitung der Sonnenflecken bzw. der Infektion auf gesundes Gewebe blieb aus. C: stark eingesunkenes Sonnenfleck-Gewebe mit massiver Ansammlung von *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern und diversen Schwärzepilzen. Das Gewebe ist schwarz verfärbt. D: Nahaufnahme der auf den Sonnenflecken ausgebildeten Fruchtkörper von *Didymella bryoniae*. E: faule Frucht mit Sonnenfleck im Ausgangsbereich der Fäule und wassergetränkter Schale. F: komplett gefaulte Frucht mit brüchiger Fruchtschale.

Bildtafel 18: Vergleich Verwundung und Verwundung nach erfolgter Inokulation. A: Verwundungsstelle ohne austretende Substanzen, ein Tag nach der Verwundung. Das Wundgewebe ist feucht und leicht glänzend. B: verstärkter tropfenförmiger Austritt von durchsichtigen bis milchigen Substanzen im Bereich der inokulierten Verwundungsstelle (weißer Pfeil), ein Tag nach der Verwundung. C: dritter Tag nach der Verwundung. Sowohl bei den inokulierten als auch bei den nicht inokulierten Verwundungsstellen bilden bernsteinfärbige Substanzen einen dichten Wundverschluss. D: rissige, abblätternde und brüchige Schicht mit *Didymella bryoniae* Fruchtkörpern (weißer Pfeil). E: verstärkter tropfenförmiger Austritt von durchsichtigen bis milchigen Substanzen im Bereich der nicht inokulierten Verwundungsstelle (schwarze Pfeile), ein Tag nach der Verwundung. F: kein wesentlicher Unterschied zwischen der Menge an austretenden bernsteinfärbigen Substanzen zwischen der inokulierten und der nicht inokulierten Verwundungsstelle, drei Tage nach der Verwundung.

Bildtafel 19: Nachweis der Arabinogalaktan-Proteine mittels Single Radial Diffusion Assay. A: Single Radial Diffusion Assay fünf verschiedener Früchte (AGPs + darunter liegendes Gewebe). Die Konzentrationen nehmen von links nach rechts zu (15, 25 und 50 mg/ml). Reihe 1: Frucht 1 inokuliert, Reihe 2: Frucht 3 inokuliert, Frucht 3 nicht inokuliert, Reihe 3: Frucht 5 inokuliert, Frucht 5 nicht inokuliert, Reihe 4: Gummi arabicum 1 mg/ml, 2,5

mg/ml, 5 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml, Reihe 5: Frucht 9 inokuliert, Frucht 9 nicht inokuliert, Reihe 6: Frucht 10 inokuliert, Frucht 10 nicht inokuliert, Reihe 7 Frucht 1 nicht inokuliert, Reihe 8: Kontrolle (Wasser, 0,15 M NaCl + 0,02 % (w/v) NaN₃). B: Single Radial Diffusion Assay fünf verschiedener Früchte (reine AGPs). Die Konzentrationen nehmen von links nach rechts zu (15, 25 und 50 mg/ml). Reihe 1: Frucht 2 inokuliert, Reihe 2: Frucht 4 inokuliert, Frucht 4 nicht inokuliert, Reihe 3: Frucht 6 inokuliert, Frucht 6 nicht inokuliert, Reihe 4: Gummi arabicum 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml, Reihe 5: Frucht 7 inokuliert, Frucht 7 nicht inokuliert, Reihe 6: Frucht 8 inokuliert, Frucht 8 nicht inokuliert, Reihe 7: Frucht 2 nicht inokuliert, Reihe 8: Kontrolle (Wasser, 0,15 M NaCl + 0,02 % (w/v) NaN₃). C: Single Radial Diffusion Assay des Standards Gummi arabicum mit den Konzentrationen 15, 25, 50, 50, 25 und 15 mg/ml (von links nach rechts). D: Mikroskopische Aufnahme des β -D-glucosyl Yariv Reagenz gelöst in destilliertem Wasser (0,15 M NaCl+ 0,02 % (w/v) NaN₃), Maßstab= 100 μ m. D: Gewebeabschnitt nach Färbung mit β -D-glucosyl Yariv Reagenz. Das Exokarp ist dunkelrot bis orange gefärbt. Dunkelrote ausgewaschene Präzipitate überlagern stellenweise den Schnitt. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 30 μ m.

Bildtafel 20: Wasserstoffperoxid-Nachweis mittels Diaminobenzidin neun Tage nach der Inokulation mit *Didymella bryoniae* Konidien suspension (Konzentration= 10⁶ Sporen/ml). A: Kontrollen (nicht inokulierte Blätter). B und C: inokulierte Blätter.

Bildtafel 21: Morphologische Merkmale von *Didymella bryoniae*. A: verzweigte Hyphe mit Septum unterhalb der Gabelung. Kratzpräparat. Maßstab= 50 μ m. B: auswachsende Hyphe. Die Hyphe ist im wachsenden Bereich unseptiert. Kratzpräparat. Maßstab= 50 μ m. C: aufgelockertes Hyphengeflecht mit Hyphen unterschiedlichster Durchmesser (10 μ m, 5 μ m und 2,5 μ m) und Ansammlung von kugelrunden Strukturen im Cytoplasma der Hyphen. Kratzpräparat. Maßstab= 20 μ m. D: grüne Fluoreszenzerscheinung der kugelrunden Strukturen nach Färbung mit Bodipy. Kratzpräparat. Maßstab= 20 μ m. E: Rand eines Pseudotheciums mit herausragenden Asci. Innerhalb der hyalinen Asci liegen die Ascosporen. Quetschpräparat. Maßstab= 10 μ m F: monoseptierte, hyaline und bauchige Ascosporen. Die obere Zelle ist etwas dicker als die unter. Quetschpräparat. Maßstab= 10 μ m.

Bildtafel 22: Morphologische Merkmale von *Didymella bryoniae*. A: Flächenschnitt des Perikarps mit Pyknidien von *Didymella bryoniae* mit massivem Ausströmen von asexuellen Pyknosporen. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 50 μ m. B: Querschnitt durch das Kürbis-Fruchtfleisch mit ins Gewebe eingesenktem asexuellem Fruchtkörper (Pyknidium) von *Didymella bryoniae* und Verlauf der Hyphen in den Zellen des Mesokarps. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 100 μ m.

Bildtafel 23: Morphologische Merkmale von *Didymella bryoniae*. A: hellbraun gefärbtes Pyknidium mit zentraler Ostiole. Die asexuellen Sporen quellen in laichenartigen Schnüren aus dem Fruchtkörper aus. Quetschpräparat. Maßstab= 30 μ m. B: Nahaufnahme eines Pyknidiums und aus der Ostiole ausquellendem, dichtem Sporenstrang. Quetschpräparat. Maßstab= 30 μ m.

Bildtafel 24: Mikroskopischer Nachweis der Vorinokulationsversuche von *Cucurbita pepo* var. *styriaca* mit *Didymella bryoniae*. A: Flächenschnitt eines Blütenblattes mit mehrfach septierten blau gefärbten Hyphen von *Didymella bryoniae*. Die Hyphen verzweigen sich mehrfach und bilden ein lockeres Hyphengeflecht. Handschnitte mit Methylenblau gefärbt. Maßstab= 20 μ m. B: Querschnitt eines Sprosses mit blau gefärbten,

intrazellulär wachsenden Hyphen unterschiedlicher Durchmesser im Bereich eines Leitbündels. Handschnitt mit Methylenblau gefärbt. Maßstab= 20 µm.

Bildtafel 25: Chlorophyllfluoreszenz der Blätter für die Präparierung zum Totalpräparat. A: inokuliertes Blatt (zwei Tage nach der Behandlung mit *Didymella bryoniae* Sporensuspension) unter Tageslicht. Erste Blattflecken sind im Randbereich des Blattes, sowie auf der Blattspreite erkennbar (schwarze Kreise). B: Kontrollblatt unter Tageslicht. C: inokuliertes Blatt (zwei Tage nach der Behandlung mit *Didymella bryoniae* Sporensuspension) unter UV-Anregung. Die Bereiche der Blattflecken zeigen keine Fluoreszenz (schwarze Kreise). D: Kontrollblatt unter UV-Anregung. E: inokuliertes Blatt (drei Tage nach der Behandlung mit *Didymella bryoniae* Sporensuspension) unter UV-Anregung. F: inokuliertes Blatt (vier Tage nach der Behandlung mit *Didymella bryoniae* Sporensuspension) unter UV-Anregung.

Bildtafel 26: Totalpräparation eines Blattes. A: dunkelblau gefärbte Fruchtkörper von *Didymella bryoniae* entlang der Leitbündel und auf der Blattspreite. Die Ostiolen der Fruchtkörper sind gut erkennbar. Blau gefärbte Hyphen befinden sich entlang der Leitbündel (schwarze Pfeile). Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 100 µm. B: Fruchtkörper eingesenkt ins Gewebe eines Leitbündels (schwarze Pfeile). Die Hyphen gehen seitlich und unterhalb des Fruchtkörpers weg (schwarze Pfeile) (Bildausschnitt). Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 100 µm (Bildausschnitt Maßstab= 20 µm).

Bildtafel 27: Totalpräparat eines Blattes. Teilweise parallel verlaufende verzweigte, mehrfach septierte und blau gefärbte Hyphen A: im Bereich einer Seitenrippe eines Blattes und B: im Bereich eines Leitbündels. Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 50 µm.

Bildtafel 28: Totalpräparat eines Blattes. A: Wachstum einer Hyphe durch eine Spaltöffnung (schwarzer Pfeil) in das Innere eines Blattes. Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 10 µm. B: auskeimende Ascospore auf den Epidermiszellen eines Blattes. Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 20 µm.

Bildtafel 29: Serielle Aufnahme eines Totalpräparats eines Blattes. A: auskeimende Spore (schwarze Pfeile) und B: Wachstum der Hyphe in Richtung der Basiszellen des Haares (schwarzer Pfeil). C: Biegung der Hyphen in Richtung der Basiszellen des Haares (schwarze Pfeile). D: intrazelluläres Wachstum einer Hyphe in der ersten Zelle eines mehrzelligen Kürbishaares, sowie Wachstum weiterer septierter Hyphen in Richtung der Basiszellen (schwarze Pfeile). E: Intrazelluläres Wachstum von Hyphen unterschiedlichster Durchmesser in einer Kürbishaarzelle und Übergang der Hyphen in die benachbarte Zelle (schwarze Pfeile). Färbung mittels Lacophenolblau. Maßstab= 20 µm.

Bildtafel 30: Hyphenverlauf von *Didymella bryoniae* im Fruchtfleisch von *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. A: blau gefärbtes dichtes Hyphengeflecht im Fruchtfleisch. Die Zellen des Exokarps und Teile des Mesokarps sind kollabiert. Färbung mit Methylenblau. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 100 µm. B: Nahaufnahme einiger Zellen des Mesokarps mit intrazellulär wachsenden Hyphen und Übergang der Hyphen zwischen den Zellen (schwarze Pfeile). Färbung mit Methylenblau. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 30 µm.

Bildtafel 31: Mikroskopische Aufnahmen der β -D-glucosyl Yariv Reagenz gefärbten Schnitte des Fruchtfleisches. A: Bildung dunkelroter Präzipitate entlang der Zellwände vitaler Mesokarp-Zellverbände.

Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 50 µm. B: dunkelrotes, ausgewaschenes Arabinogalaktan-Protein-Präzipitat im Mikroskopiemedium. Gefriermikrotomie-Schnitt. Maßstab= 50 µm.

8 Literaturverzeichnis

- Agrios G. (1988) Plant Pathology. 3. Auflage. Academic Press Verlag
- Aldea M., Hamilton J., Resti J., Zangerl A., Berenbaum M., Frank T. und DeLucia E. (2006) Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149: 221-232
- Amand P. und Wehner T. (1995) Eight Isolates of *Didymella bryoniae* from geographically diverse areas exhibit variation in virulence but no isolate by cultivar interaction on *Cucumis sativus*. *Plant Disease* 79: 1136-1139
- Anderson R., Clarke A., Jermyn M., Knox R. und Stone B. (1977) A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 4: 143-158
- Anderson D. und Dea I. (1971) Recent advances in the chemistry of *Acacia* gums. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 22: 61-76
- Anderson D. und Rahman S. (1967) Studies on uronic acid materials: Part XX. The viscosity-molecular weight relationship for *Acacia* gums. *Carbohydrate Research* 4: 298-304
- Ardabili G., Fahrenroosh R. und Khodaparast H. (2011) Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca*) grown in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13:1053–1063
- Arnon D., Whately F. und Allen M. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. II. Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy. *Journal of the American Chemical Society* 76: 6324-6329
- Aveskamp M., de Gruyter J., Woudenberg J., Verkley G. und Crous P. (2010) Highlights of Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1-60
- Babadoost M. und Zitter T. (2009) Fruit rots of pumpkin. A serious threat to the pumpkin industry. *Plant Disease* 93: 772-782
- Baker N. (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113
- Baldauf G. (2010) Genussland Österreich...vom Kernöl. Alpha Österreich ORF
- Barber H. und Sharpe P. (1971) Genetics and physiology of sunscald of fruits. *Agricultural Meteorology* 8:175-191
- Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W., Roitsch T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122:419–428
- Blanchfield A., Robinson S., Renzullo L. und Powell K. (2006) Phylloxera-infested grapevines have reduced chlorophyll and increased photoprotective pigment content-can leaf pigment composition aid pest detection? *Functional Plant Biology* 33: 507-514
- Boland G. und Hall R. (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93– 108
- Borner G., Sherrier J., Weimar T., Michaelson L., Hawkins N., MacAskill A., Napier J., Beale M., Lilley K., Dupree P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiology* 137: 104-116
- Brancucci M. und Bränziger E. (2003) Das große Buch vom Kürbis. 5. Auflage. Fona Verlag Lenzburg
- Brand-Williams W., Cuvelier M. und Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology* 28: 25-30
- Caesar A. und Pearson R. (1983) Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 73: 1024-1030
- Carol A. und Randall R. (1991) Effects of temperature and duration of surface wetness on spore production and infection of cucumbers by *Didymella bryoniae*. *Phytopathology* 81:206-209
- Carter M. (1957) *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany* 5: 21-35
- Chilosi G. und Margo P. (1998) Pectolytic enzymes produced in vitro and during colonization of melon tissue by *Didymella bryoniae*. *Plant Pathology* 47: 700-705
- Chiu W. und Walker J. (1949) Physiology and pathogenicity of the cucurbit black-rot fungus. *Journal of Agricultural Research* 78: 589-615

- Chupp C. und Sherf A. (1960) Vegetable diseases and their control. The Ronald Press Company
(von http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/d_bryon.htm)
- Clarke A., Anderson R. und Stone B. (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18: 521-540
- Department of Crop Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign (2012) Report on plant disease. The fruit rots of pumpkin. RPD No. 950. Online unter: http://extension.cropsciences.illinois.edu/fruitveg/pdfs/950_fruits_rot_pumpkin.pdf
- Ellis M., Egelund J., Schultz C. und Bacic A. (2010) Arabinogalactan-proteins: Key regulators at the cell surface. *Plant Physiology* 153: 403-419
- Farr D. und Rossman A. (2010) Fungal databases. Systematic mycology and microbiology laboratory. ARS. USDA. Online unter: <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>
- Fellows H. (1928) Some chemical and morphological phenomena attending infection of the wheat plant by *Ophiobolus graminis*. *Journal of Agricultural Research* 37: 647-661
- Ferguson G., Cerkauskas R. und Khosla S. (2009) Gummy stem blight of greenhouse cucumber. Factsheet 88-065. Online unter: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/09-051w.htm>
- Ferreira S. und Boley R. (1992) *Didymella bryoniae* gummy stem blight, black rot, canker (plant disease pathogen). Online unter: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/d_bryon.htm
- Ganjian I. und Basile D. (1997) Reductive syntheses of p-aminophenyl- β -D-glucoside and its conversion to β -glucosyl Yariv reagent. *Analytical Biochemistry* 246: 152-155
- Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A (2011) Steirische Versuchung. Das Steirische Kürbiskernöl und die besten Rezepte der heimischen Haubenköche. 2. Auflage. Gemeinschaft Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. Eigenverlag
- Gerlach D. (1969) Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Gosh S. und Purkayastha S. (1962) Anatomical studies of wood and bark of *Acacia senegal* Willd. Trees with Special Reference to Gum Exudation. *Indian Foresters* 88: 92-99
- Grebenšćikov I. (1950) Zur Kenntnis der Kürbisart *Cucurbita pepo* L. nebst einigen Angaben über Ölkürbis. *Der Züchter* 20:194–207
- Großkinsky D., Koffler B., Roitsch T., Maier R. und Zechmann B. (2012) Compartment-specific antioxidative defense in *Arabidopsis* against virulent and avirulent *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 102: 662-673
- Grube M., Fürnkranz M., Zitzenbacher S., Huss H. und Berg G. (2011) Emerging multi-pathogen disease caused by *Didymella bryoniae* and pathogenic bacteria on styrian oil pumpkin. *European Journal of Plant Pathology* 131: 539-548
- Guan Y. und Nothnagel E. (2004) Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like response in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* 135: 1346-1366
- Gunasekera T., Paul N. und Ayres P. (1997) The effects of ultraviolet-B (UV-B: 290-320 nm) radiation on blister blight disease of tea (*Camellia sinensis*). *Plant Pathology* 46: 179-185
- Gusmini G., Song R. und Wehner T. (2005) New sources of resistance to gummy stem blight in aatemelon. *Crop Science* 45: 582-588
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A. und Tiedemann A. (2007) Phytomedizin. Grundwissen Bachelor. 2. überarbeitete Auflage. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart
- Hammer K., Gladis T. und Hethke M. (2002) Kürbis, Kiwano & Co.-Vom Nutzen der Vielfalt. Band 1. Verlag Universitätsbibliothek Kassel
- Hengel A. und Roberts K. (2002) Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 32: 105–13
- Henssen A. und Jahns H. (1974) Lichenes: Eine Einführung in die Flechtenkunde. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Hinker M. und Seibert M. (2013) Pilze in Innenräumen und am Arbeitsplatz. Springer Verlag Wien
- Hock B. und Elstner E. (2004) Plant Toxicology. Fourth Edition. CRC press Verlag
- Hödl G. (2015) Morphologische und mikroskopische Untersuchungen der gesunden und mit „Sonnenflecken“erkrankten Fruchtwand des Steirischen Ölkürbis (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* GREB.). Projektlabor am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz
- Holst G. und Clarke A. (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Analytical Biochemistry* 148: 446-450
- Huang D., Ou B. und Prior R. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856

- Hughes K., Lawley B. und Newsham K. (2003) Solar UV-B radiation inhibits the growth of antarctic terrestrial fungi. *Applied and environmental Microbiology* 69: 1488-1491
- Huss H. (2007) *Didymella bryoniae* im Steirischen Ölkürbis: Neben Fruchtfäule auch Verursacher der Blattdürre. *Der Pflanzenarzt* 60: 10-11
- Huss H. (2011a) Krankheiten und Schädlinge im Ölkürbisbau. *Der fortschrittliche Landwirt* 3: 30-33
- Huss H. (2011b) Trockener Juli bremste Fruchtfäule. *Reifezeit* 1: 13
- Huss H. (2011c) Der Pilz *Didymella bryoniae* erobert die Kürbisfelder. *Gemüsebaupraxis* 18: 8-9
- Huss H. (2014a) „Gummistängel“ bei Ölkürbis. *Der Pflanzenarzt* 67: 16
- Huss H. (2014b) Untersuchungen zur Biologie von *Didymella bryoniae* und Monitoring der Krankheiten und Schädlinge des Steirischen Ölkürbisses in Österreich. Abschlussbericht Krakü Projekt Nr. 082361
- Huss H. und Christian E. (2008) Massives Auftreten des Gartenkugelspringers in Ölkürbis: Kugelrund & Gefräßig. *Der Pflanzenarzt* 61: 12-13
- Huss H. und Mavridis A. (2007) Bakterium *Pseudomonas viridiflava*: Neue Blattfleckenkrankheit am Steirischen Ölkürbis. *Der Pflanzenarzt* 60: 8-9
- Huss H. und Pucher R. (2007) Warum fault der Steirische Ölkürbis? *Der Fortschrittliche Landwirt* 20: 24-25
- Huss H. und Winkler J. (2009) Neue virusbedingte Krankheitsbilder bei Ölkürbis: Gefährlich schön gescheckt. *Der Pflanzenarzt* 4: 12-13
- Huss H., Mavridis A. Eitzinger J. (2009) Bakterien-Weichfäule bei Ölkürbis: Weiche Schale, keine Kerne. *Der Pflanzenarzt* 14: 14-15
- Huss H., Winkler J. und Greimel C. (2007) Der Pilz *Didymella bryoniae* schädigt Steirischen Ölkürbisbau: Fruchtfäule statt Kernöl. *Der Pflanzenarzt* 60: 14-16
- Kamweru P., Ndiritu F., Kinyanjui T., Muthui Z., Ngumbu R. und Odhiambo P. (2014) UV Absorption and dynamic mechanical analysis of polyethylene films. *International Journal of Physical Science* 9: 545-555
- Kedare S. und Singh R. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48: 412-422
- Keinath A. (2002) Survival of *Didymella bryoniae* in buried aatermelon vines in South Carolina. *Plant Disease* 86: 32-38
- Keinath A. (2008) Survival of *Didymella bryoniae* in infested muskmelon crowns in South Carolina. *Plant Disease* 92: 1223-1228
- Keinath A. (2011) From native plants in central europe to cultivated crops worlwide: The emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. *HortScience* 46: 532-535
- Keinath A. (2013a) Susceptibility of cucurbit rootstocks to *Didymella bryoniae* and control of gummy stem blight on grafted watermelon seedlings with fungicides. *Plant Disease* 97: 1018-1028
- Keinath A. (2013b). Diagnostic guide for gummy stem blight and black rot on cucurbits. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2013-1024-01-DG.
- Keinath A. (2014) Reproduction of *Didymella bryoniae* on nine species of cucubits under field conditions. *Plant Disease* 98: 1379-1386
- Kerschbaum S. und Schweiger P. (2001) Untersuchungen über die Fettsäure und Tocopherolgehalte von Pflanzenölen. Informationen für die Pflanzenproduktion. Sonderheft 1 Landesanstalt für Pflanzenbau Forchheim Rheinstetten
- Kikot G., Hours A. und Alconada T. (2009) Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* 49: 231-241
- Kovacs G. (2002) Blüten- und Fruchtmonilia an Steinobst: Strategie contra Biologie. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten. Jahrestagung 2002 in Klosterneuburg. Online unter: <http://www.alva.at/images/Publikationen/alva2002/tagung/post4.pdf>
- Kulmer G. und Weber J. (1990) *Der Kürbis. Anbau-Verarbeitung*. Leopold Stocker Verlag Graz
- Landwirtschaftskammer Steiermark (2013) Tätigkeitsbericht 2012. Zahlen und Fakten zur steirischen Land- und Forstwirtschaft. Online unter: https://www.google.at/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjO1bL0gs_MAhUiEJoKHYTUCUYQFggiMAA&url=https%3A%2F%2Fstmk.lko.at%2Fmedia.php%3Ffilename%3Ddownload%253D%252F2014.02.24%252F1393254018078678.pdf%26rn%3DLK%2520Steiermark%2520T%25E4tigkeitsbericht%25202012.pdf&usg=AFQjCNEXsltANcmktBE13U8Cv8hcF9ipw&bvm=bv.121421273,d.bGs

- Landwirtschaftskammer Steiermark (2016) Zahlen und Fakten. Steirisches Kürbiskernöl g.g.A.. Online unter: https://stmk.lko.at/media.php?filename=download%3D%2F2016.03.18%2F1458298383809125.pdf&rn=K%FCrbiskern%F61_Zahlen%20und%20Fakten.pdf.
- Leach C. (1962) Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Botany* 40: 151-161
- Leach C. (1971) A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. *Methods in Microbiology* 4: 609-664
- Li H.-Y., Cao R.-B. und Mu Y.-T. (1995) In vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14: 187-191
- Lieberei R. und Reisdorff C. (2012) *Nutzpflanzen*. 8. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart
- Löw H. (2003) *Planzenöle. Anbau und Verarbeitung der gängigen Ölpflanzen. Herstellung von Spezial- und Gewürzölen*. Leopold Stocker Verlag Graz
- Lysek G. (1984) Rhythmen bei Pilzen. Zur Deutung Hexenring-artiger Strukturen. *Zeitschrift für Mykologie* 50: 241-252
- Maroco J., Rodrigues M., Lopes C., Chaves M. (2002) Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought-metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology* 29: 451-459
- Mishra K., Ojha H. und Chaudhury N. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. *Food Chemistry* 130: 1036-1046
- Müller C., Bröther H., Barga S. und Büttner C. (2006) Zucchini yellow mosaic virus – incidence and sources of virus infection in field-grown cucumbers and pumpkins in the Spreewald, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113: 252–258
- Murchie E. und Lawson T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64: 3983-3998
- Neergaard E. (1989a) Studies of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm: Development in host. *Journal of Phytopathology* 127: 107-115
- Neergaard E. (1989b) Histological investigation of flower parts of cucumber infected by *Didymella bryoniae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 28-38
- Newark M., Paret M., Dufault N. und Freeman J. (2011) Management of gummy stem blight (black rot) on cucurbits in Florida. Dokument PP280. IFAS Extension. University of Florida
- Nga N. (2007) Defence responses and induced resistance in watermelon against *Didymella bryoniae*. PhD Thesis, Department of Plant Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark
- Nga N., Giau N., Long N., Lübeck M., Shetty N., Neergaard E., Thuy T., Kim P. und Jørgensen H. (2010) Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 567-582
- Pfeifhofer H. (1989) Evidence for chlorophyll b and lack of lutein in *Neottia nidus-avis* plastids. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 184: 55-61
- Pickard B. (2013) Arabinogalactan proteins- becoming less mysterious. *New Phytologist* 197: 3-5
- Pusey P. (1993) Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease* 77: 170-174
- Reiterer E. und Reiterer R. (1994) *Kürbis. Von den Früchten, den Kernen und ihrem Öl*. 1. Auflage. Brandstätter Verlag Wien
- Reithmayer B. (2011) EU-Herkunftsschutz: g.g.A/ g.U. am Beispiel Steirisches Kürbiskernöl g.g.A. und Steirischer Kren g.g.A. Netzwerk Land Seminar traditionelle/regionale Lebensmittel und Qualitätssicherung. Landwirtschaftskammer Steiermark
- Richter G. (1998) *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels*. 6. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart
- Rolfe S. und Scholes J. (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions *Protoplasma* 247: 163-175
- Rossrucker H. (1992) Die Trocknung von Ölkürbiskernen* (Cucurbits pepo L.). Online unter: <https://diebodenkultur.boku.ac.at/volltexte/band-43/heft-1/rossrucker.pdf>
- Scherf, A. (2012) Licorice, cucumber, downy mildew: tracing the secret. Interactions between the plant extract, the host and the pathogen. Dissertation im Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt
- Scheuer C. (2014) Vorlesungsunterlagen Evolution der Pilze. Sommersemester Kapitel 05_EBP_Asc0-2_2014

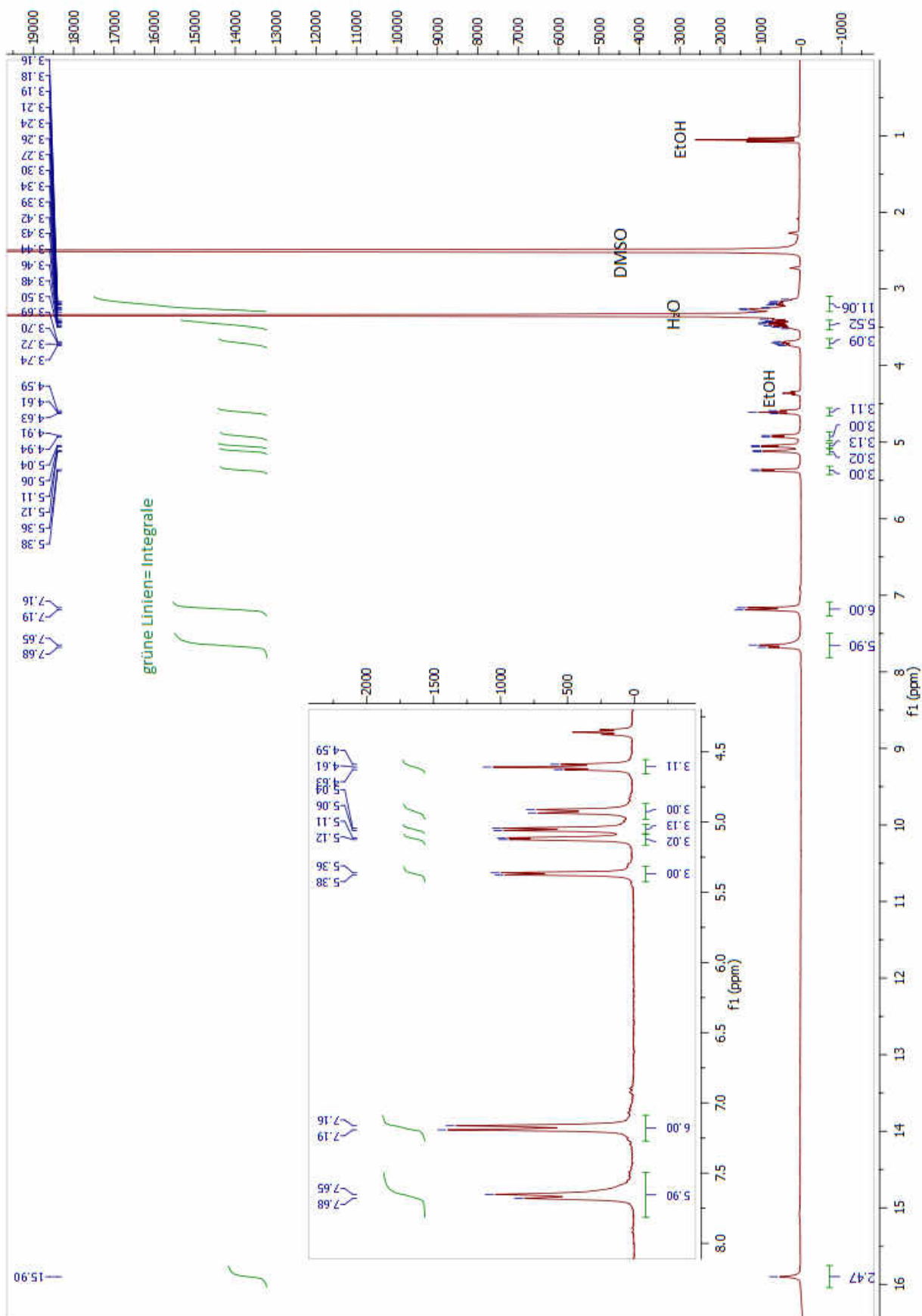
- Schmitt A., Orlik M. und Scherf A. (2012) Biologisches Pflanzenschutzmittel aus Süßholz-Einfluss auf Stresstoleranz und Pathogenabwehr in Gurkenpflanzen. Biological plant protection product from liquorice-effects on stress tolerance and defense against pathogens in cucumber plants. 58. Deutsche Pflanzenschutztagung
- Scholes J. und Rolfe S. (2009) Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective. *Functional Plant Biology* 36: 880-892
- Schuster W. (1977) Der Ölkürbis (*Cucurbita pepo* L.). Eine monographische Darstellung. Fortschritt in Acker- und Pflanzenbau 4. Paul Parey Verlag Berlin, Hamburg
- Seifert G. und Roberts K. (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58:137–61
- Serpe M. und Nothnagel E. (1994) Effects of Yariv phenylglycosides on *Rosa* cell suspensions: Evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. *Planta* 193: 542-550
- Shetty N., Jørgsen H., Jensen J., Collinge D. und Shetty H. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 267-280
- Stabentheiner E., Oberländer A. und Willfurth R. (2014) Microspore reprogramming in tobacco-effect of cold pretreatment on anther stress markers and embryogenic efficiency. *Phyton* 54: 321-332
- Steigmeier Y., Kreuter M., Sontag G. (2001) *Cucurbita pepo* L., Pumpkin. *Food Processing and Ingredients* 36:54-56
- Strasburger E. (2008) Lehrbuch der Botanik. Bresinsky A., Körner C., Kadereit J., Neuhaus G. und Sonnwald U. (Hrsg.). 36. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Sudisha J., Niranjana S., Umesh S., Prakash H., Shetty H. (2006) Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. *Biological Control* 37: 196-205
- Svedelius G. (1990) Effects of environmental factors and leaf age on growth and infectivity of *Didymella bryoniae*. *Mycological Research* 94: 885-889
- Svedelius G. und Unestam T. (1978) Experimental factors favouring infection of attached cucumber leaves by *Didymella bryoniae*. *Transactions of the British Mycological Society* 71: 89-97
- Teppner H. (1982) Der Steirische Ölkürbis und einige frühe Quellen über Kürbisanbau, Die Koralpe Beiträge zur Botanik, Geologie, Klimatologie und Volkskunde 57-63
- Teppner H. (1999) Notizen zur Geschichte des Kürbisses, Obst-Wein-Garten 36
- Teppner H. (2000) *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae)-History, seed coat types, thin coated seeds and their genetics, *Phyton* 40:1-42
- Teppner H. (2004) Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae)-Review and new contributions, *Phyton* 44: 245-308
- Teppner H. (2005) Botanisches über Flaschenkürbis (*Lagenaria*) und Kürbis (*Cucurbita*) In: Hörander E. und Hörander H. (Hrsg.), Halloween in der Steiermark und anderswo LIT Verlag Wien
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wie Y. und Collinge D. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194
- Vanacker H., Carver T. und Foyer C. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-1114
- Van Holst G. und Clarke A. (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Analytical Biochemistry* 148: 446-450
- Van Steekelenburg N. (1985) Influence of humidity on incidence of *Didymella bryoniae* on cucumber leaves and growing tips under controlled environmental conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 91: 277
- Van Steekelenburg N. (1984) Influence of ventilation temperature and low ventilation rates on incidence of *Didymella bryoniae* in glasshouse cucumbers. *Acta Horticulturae* 156: 187-197
- Van Steekelenburg N. (1982) Factors influencing external fruit rot of cucumber caused by *Didymella bryoniae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88: 47-56
- Verordnung (EG) Nr. 510/2006 Zum Schutz von geografischen Angaben und Ursprungsbezeichnungen für Agrarerzeugnisse und Lebensmittel
- Verordnung (EU) Nr. 1151/2012 Antrag zur Änderung der Spezifikation zur eingetragenen Bezeichnung „Steirisches Kürbiskernöl – g.g.A.“

- Veskoukis A., Tsatsakis A. und Kouretas D. (2012) Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones* 17: 11–21
- Weaver D. (1974) A gummosis disease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 64: 1429-1432
- Whitaker T., und Robinson R. (1986) Squash breeding. Breeding vegetable crops. AVI Publishing Co. Westport, Connecticut 209–242.
- Wilson E. (1931) A comparison of *Pseudomonas prunicola* with a canker producing bacterium of stone-fruit trees in California. *Phytopathology* 21: 1153-1161
- Winkler J. (2000) The origin and breeding of the hull-less seeded styrian oil-pumpkin varieties in Austria. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 23: 101-104
- Wu G., Shortt B., Lawrence E., León J., Fitzsimmons K. und Shah D. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology* 115: 427-435
- Wu G., Shortt B., Lawrence E., Levine E., Fitzsimmons K. und Shah D. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7: 1357-1368
- Yadeta K. und Thomma B. (2013) The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-12
- Yariv J., Lis H. und Katchalski E. (1967) Short communications. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* 105: 1c-2c
- Yariv J., Rapport M., Graf L. (1962) The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* 85: 383-388
- Zhang J., Bruton B. und Biles C. (2014) Cell wall-degrading enzymes of *Didymella bryoniae* in relation to fungal growth and virulence in cantaloupe fruit. *European Journal of Plant Pathology* 139: 749-761
- Zhang J., Bruton B., Miller M., und Isakeit T. (1999) Relationship of developmental stage of cantaloupe fruit to black rot susceptibility and enzyme production by *Didymella bryoniae*. *Plant Disease* 83: 1025-1032
- Zimmermann A. (1922) Die Cucurbitaceen. Beiträge zur Anatomie, Physiologie, Morphologie, Biologie, Pathologie und Systematik. Heft 2. Gustav Fischer Verlag Jena
- Zitter T. (1992) Vegetable crops. Fruit rots of squash and pumpkins. Fact Sheet Page 732.10. Vegetable MD Online. Online unter: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Cucurbit_FrtRots.htm
- Zitter T., Hopkins L. und Thomas C. (1996) Compendium of Cucurbit Diseases. The American Phytopathological Society APS Press

9 Internetverzeichnis

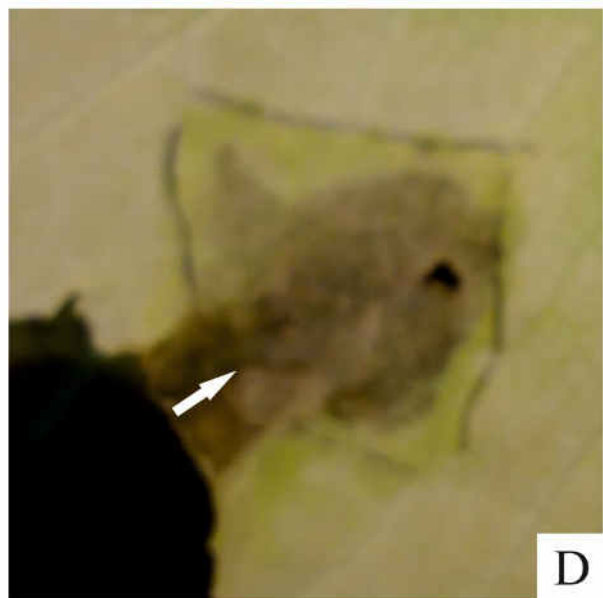
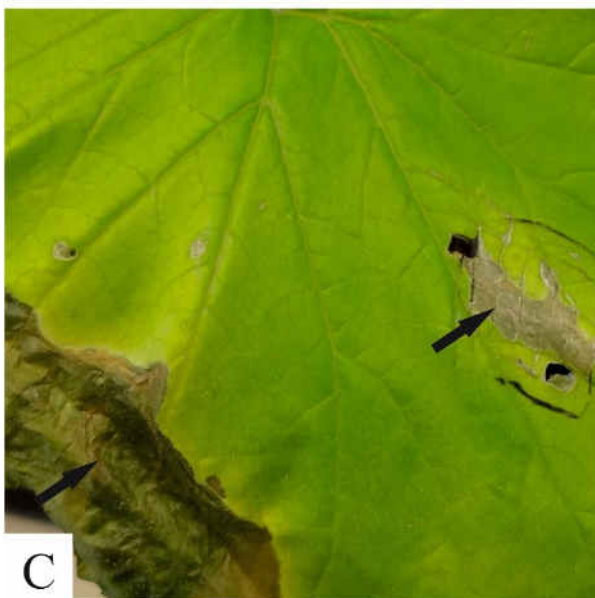
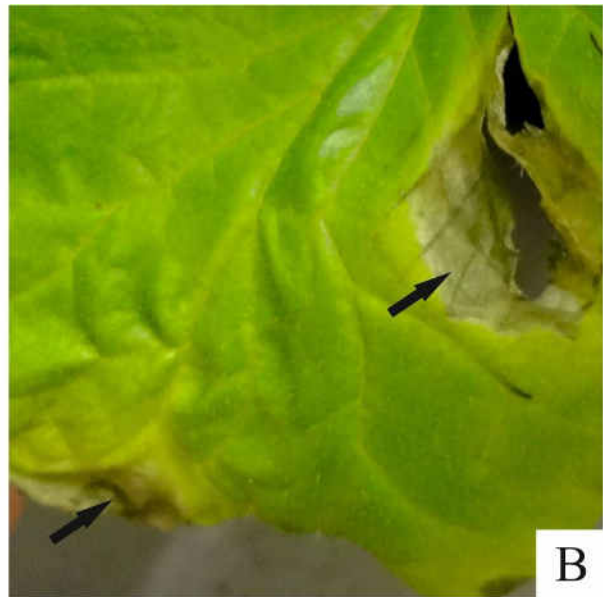
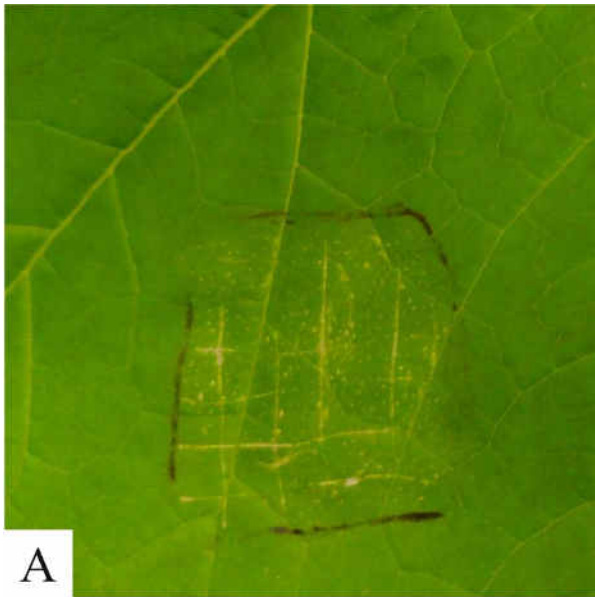
- <http://www.ages.at/themen/schaderreger/saatenfliegen/> Stand 13.1.2016
- <http://www.ages.at/en/topics/harmful-organisms/eckige-blattfleckenkrankheit-der-kuerbisgewaechse/> Stand 30.9.2015
- <http://www.agrarheute.com/traction/news/kernige-steiermark> Stand 9.5.2016
- http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Cucurbitae/Cucurbitae_Xanthomonas_campestris_pv_cucurbitae/ Stand 30.9.2015
- <http://www.alwera.at/kulturen/oelkuerbis-konsum/> Stand 17.12.2015
- <http://aquaponik-forum.de/attachment.php?aid=507> Stand 9.5.2016
- <http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-sortenliste/> Stand 15.12.2015
- <http://www.biofarm.ch/assets/files/Landwirtschaft/Merkblatt%20Bio-Oelkuerbis-Anbau.pdf> Stand 17.12.2015
- <http://biologyboom.com/kingdom-fungi/> Stand 25.4.2016
- http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf Stand 2.3.2016
- www.ent.uga.edu/peach/peachhbk/fungal/fungal.pdf Stand 11.4.2016
- http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/d_bryon.htm Stand 8.4.2016
- <http://www.fis.uni-bonn.de/recherchetools/infobox/profis/was-ist-fernerkundung/reflexion-und-absorption> Stand 25.4.2016
- http://www.foodscience.tugraz.at/ilct_old/pfannhauser/berichte.htm Stand 11.5.2016
- <http://www.hortipendium.de/Gummist%C3%A4ngelkrankheit> Stand 22.2.2016
- <http://www.kernoel.at/wissen/produktion.html> Stand 17.12.2015
- <http://www.kuerbiskernoelshop.com/EU-Herkunftsschutz> Stand 2.10.2015
- <http://www.landwirt.com/Oelkuerbis-Ernte-beginnt,,10665,,Bericht.html> Stand 17.12.2015
- <http://www.meinbezirk.at/korneuburg/wirtschaft/75000-kg-kuerbiskerne-geerntet-und-getrocknet-d38708.html> Stand 17.12.2015
- <http://members.aon.at/gkowald/gesund.htm> Stand 15.12.2015
- <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Stand 2.3.2016
- http://www.pharma-networx.de/vdl/asp/17_prostatbehandl.asp?user=105 Stand 15.12.2015
- <http://www.pilze-deutschland.de/organismen/didymella-bryoniae-fuckel-rehm> Stand 9.5.2016
- <http://www.saatzuchtgleisdorf.at/> Stand 15.12.2015
- <https://www.steirische-spezialitaeten.at/kulinarik/steirisches-kuerbiskernoel-gga.html#Kernöl> Gewinnung Stand 17.12.2015
- http://www.thermen.at/therme-41/therme-bad-waltersdorf_beauty-wellness.htm Stand 9.5.2016
- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3922> Stand 26.4.2016
- <http://www.traction-magazin.de/kuerbisernte-steiermark> Stand 17.12.2015
- <http://www.uni-kiel.de/med-klimatologie/uvinfo.html> Stand 25.4.2016
- <http://www.versuchsreferat.com/presse.html> Stand 2.3.2016
- <https://de.wikipedia.org/wiki/K%C3%BCrbiskern%C3%B6l> Stand 15.12.2015
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Pflanzeng%C3%BCchtung> Stand 15.12.2015
- <http://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick> Stand 31.3.2016

10 Anhang

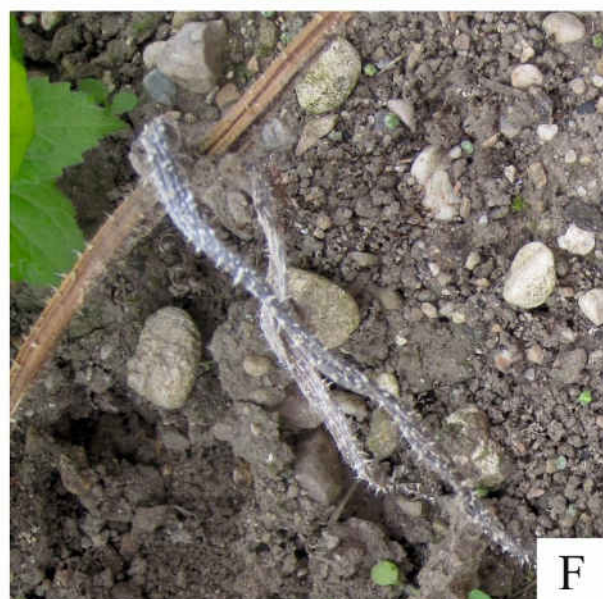
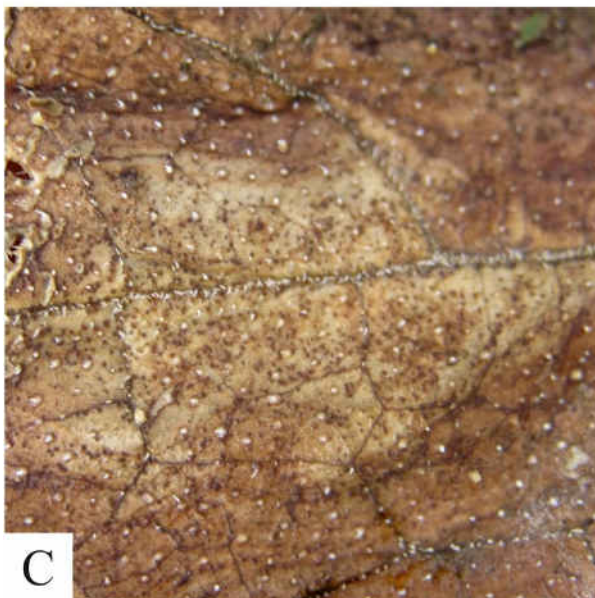
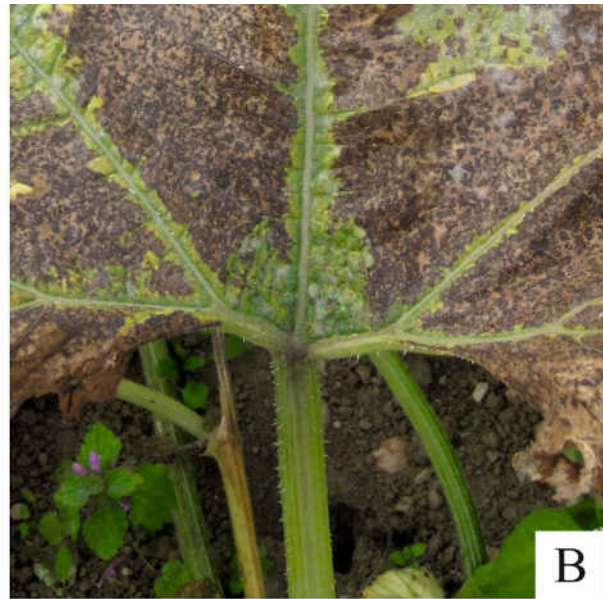
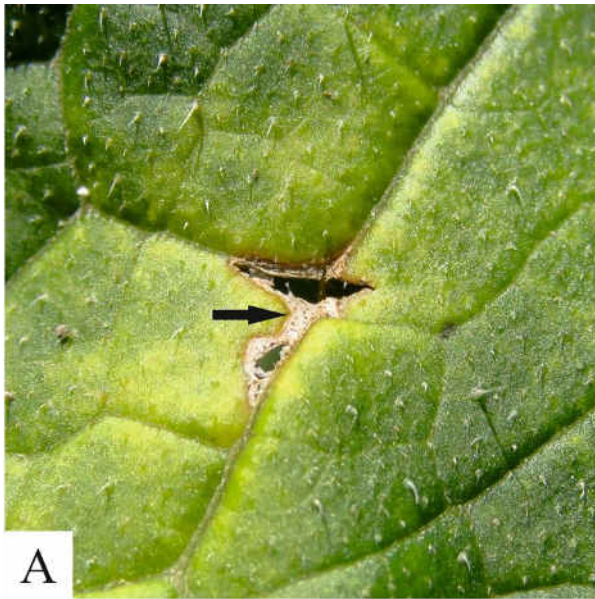
Abbildung 24: $^1\text{H-NMR}$ Sepktrum



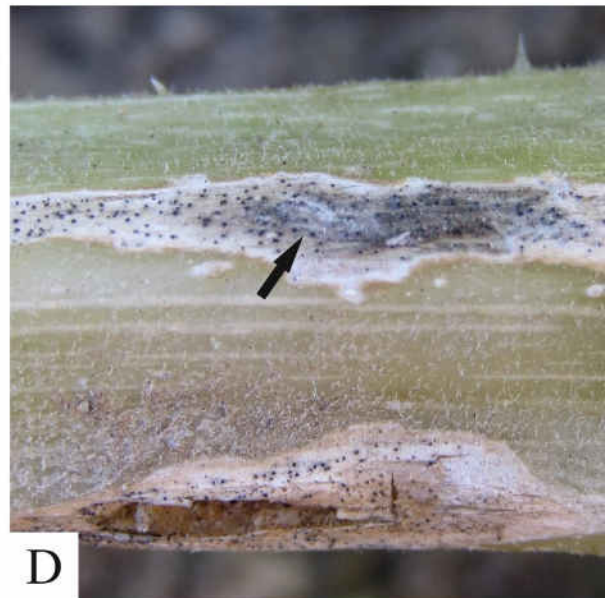
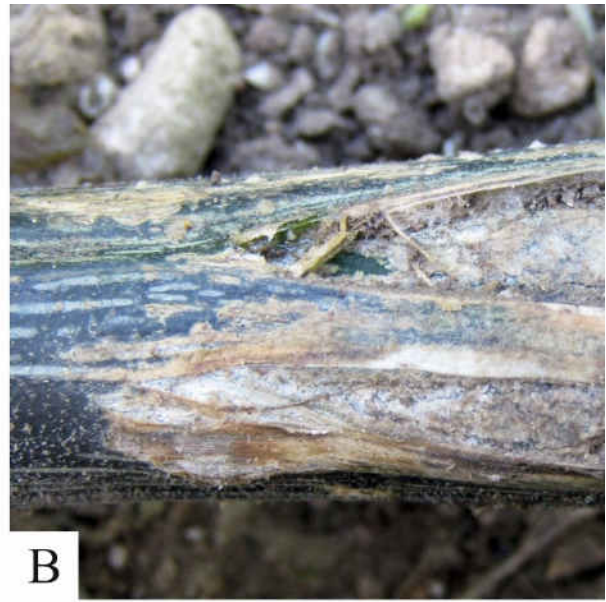
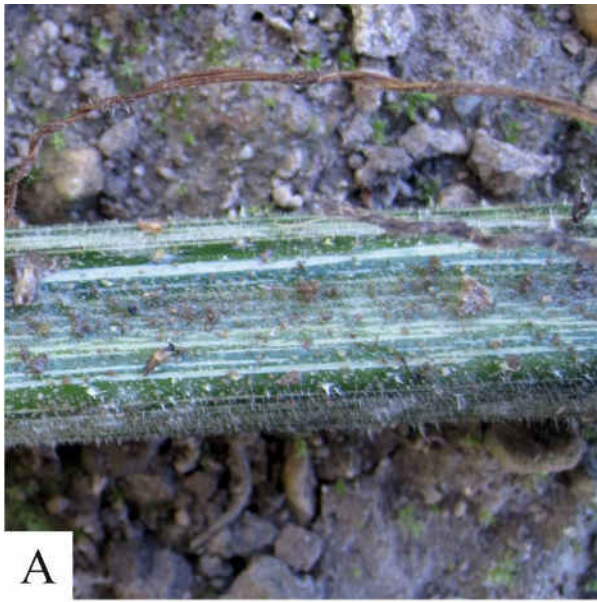
Bildtafel 1



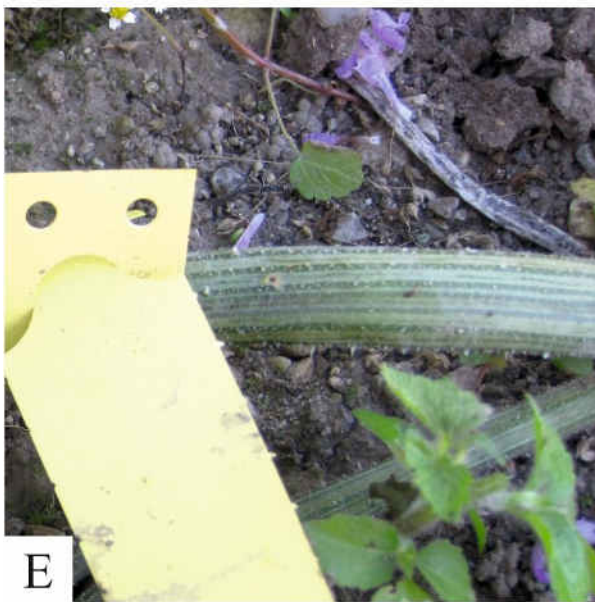
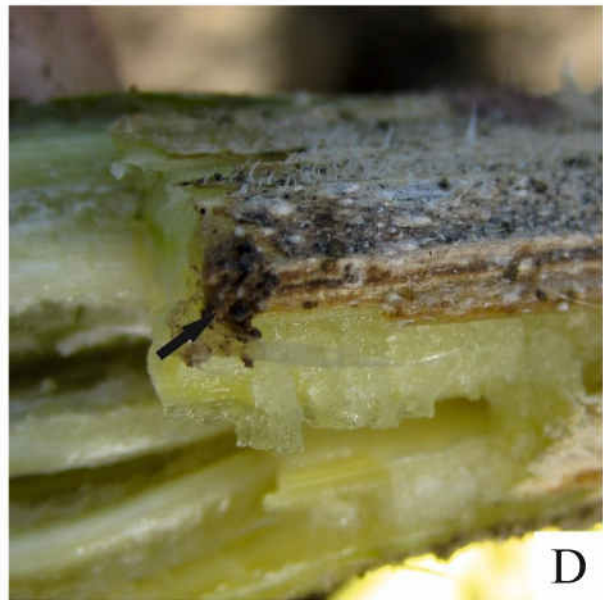
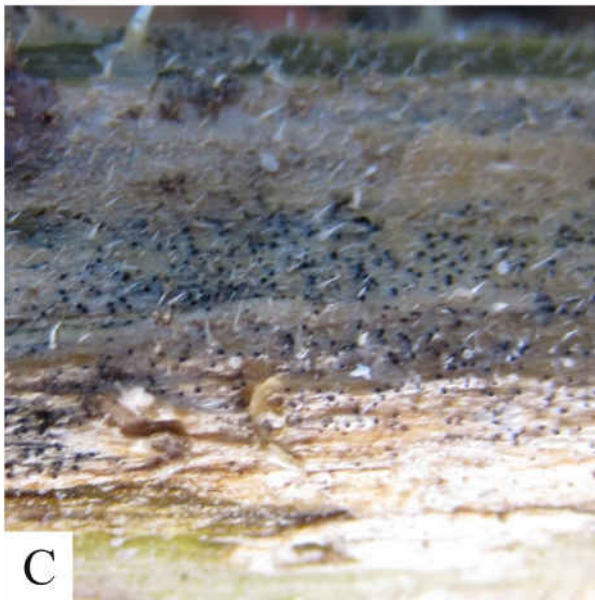
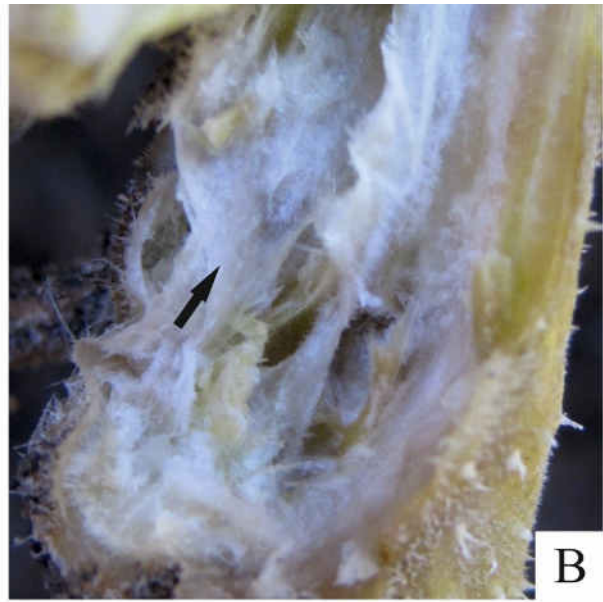
Bildtafel 2



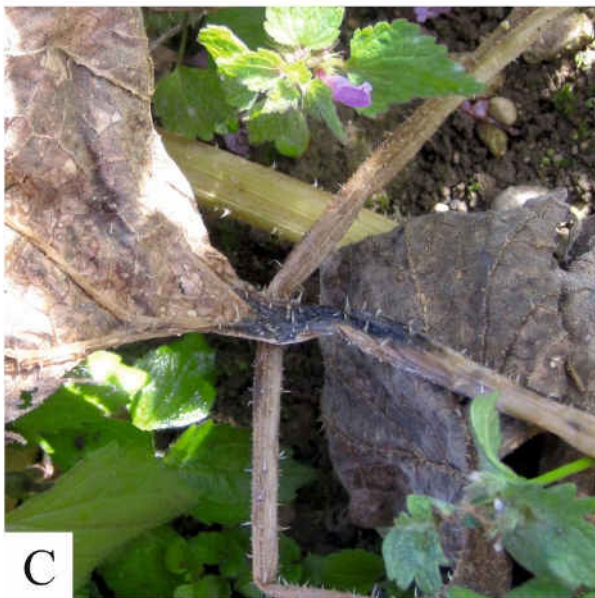
Bildtafel 3



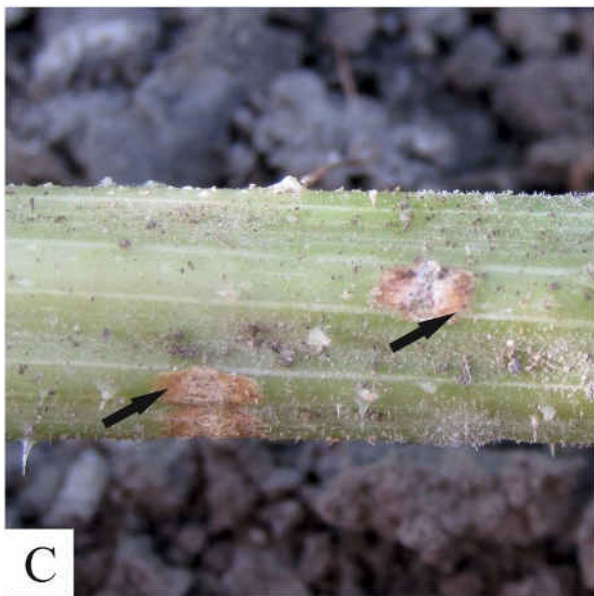
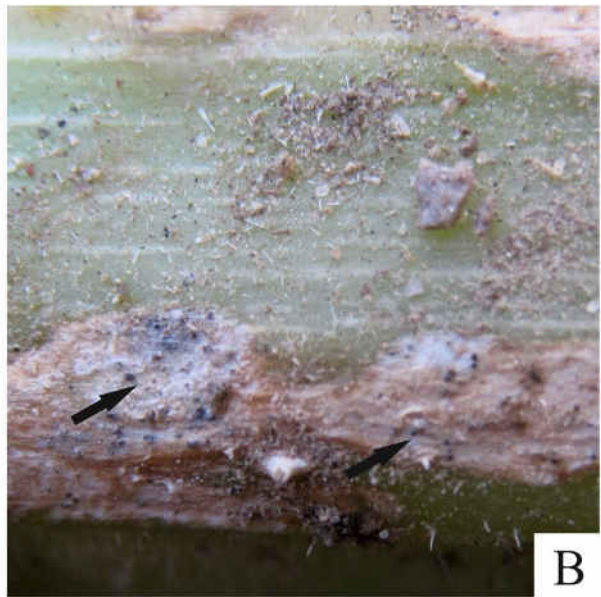
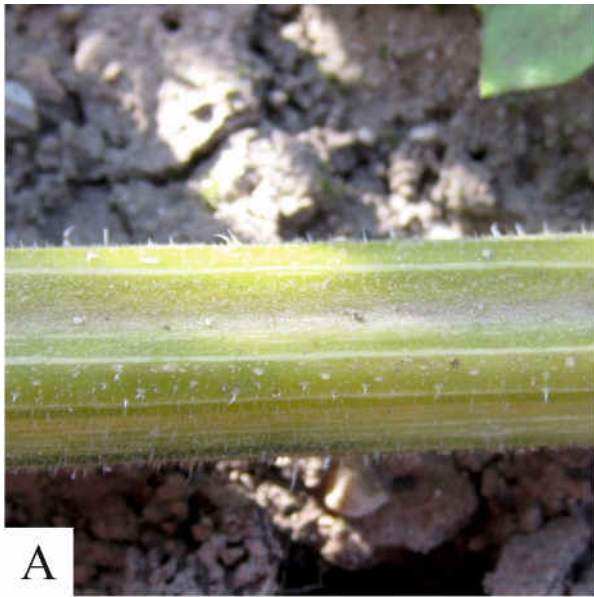
Bildtafel 4



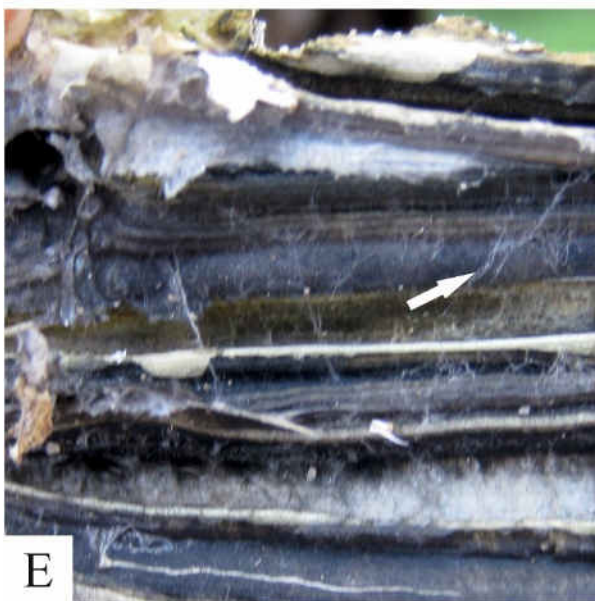
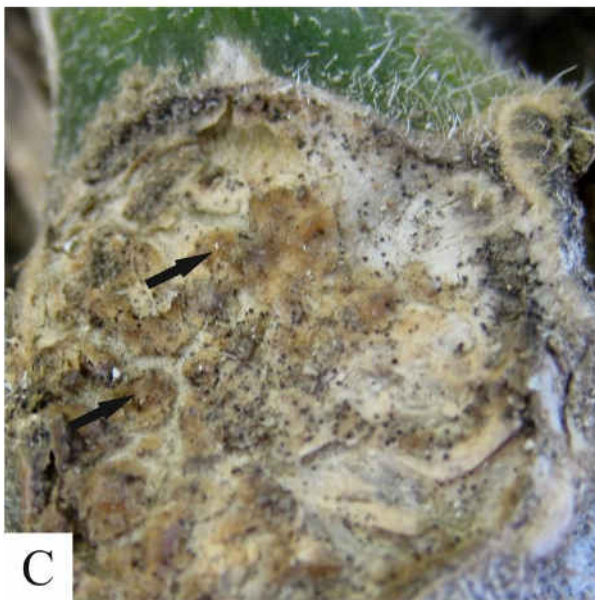
Bildtafel 5



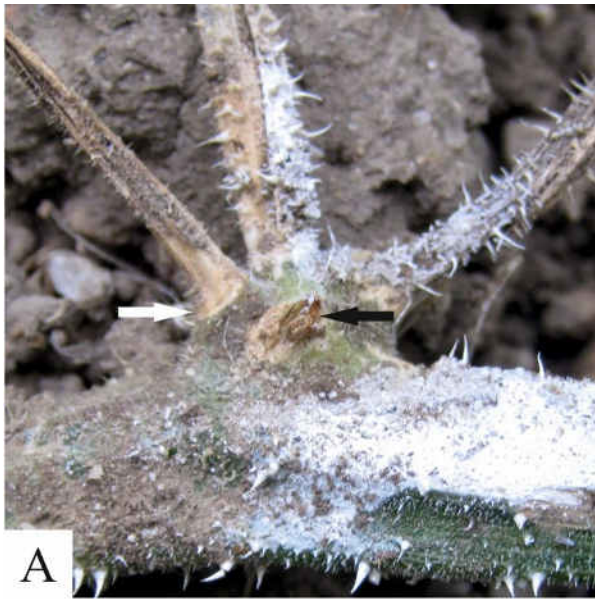
Bildtafel 6



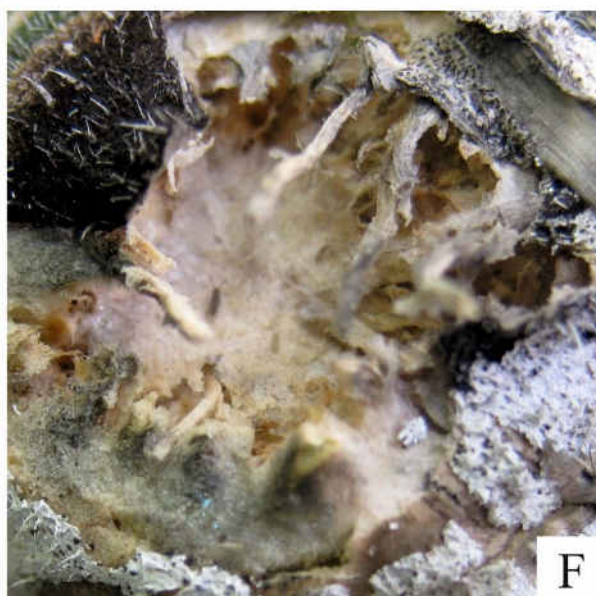
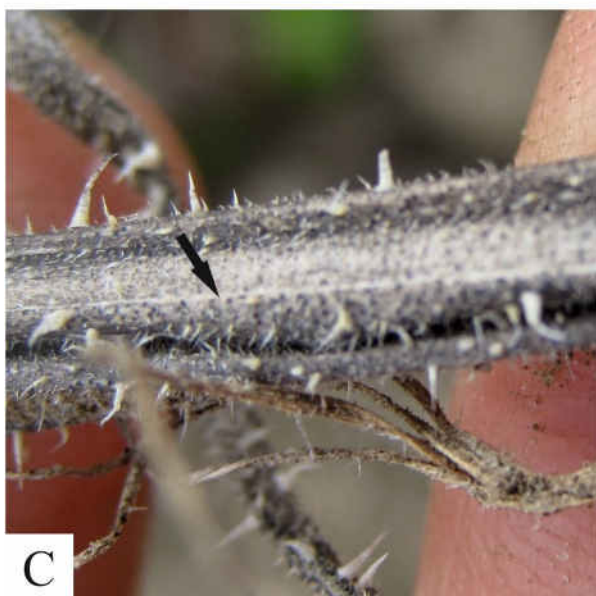
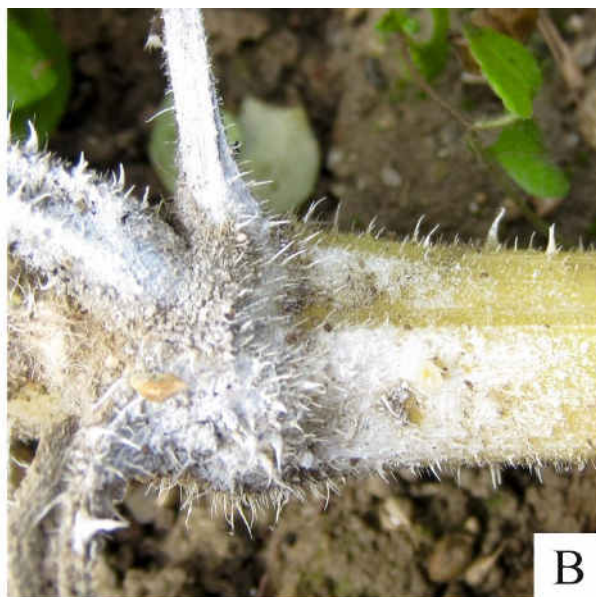
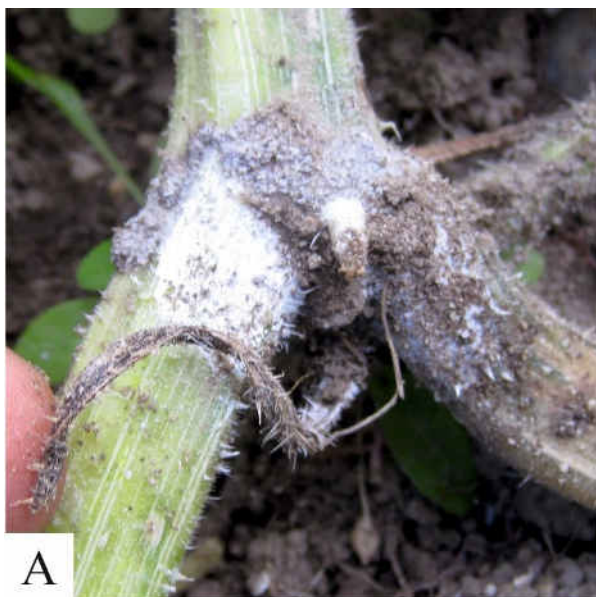
Bildtafel 7



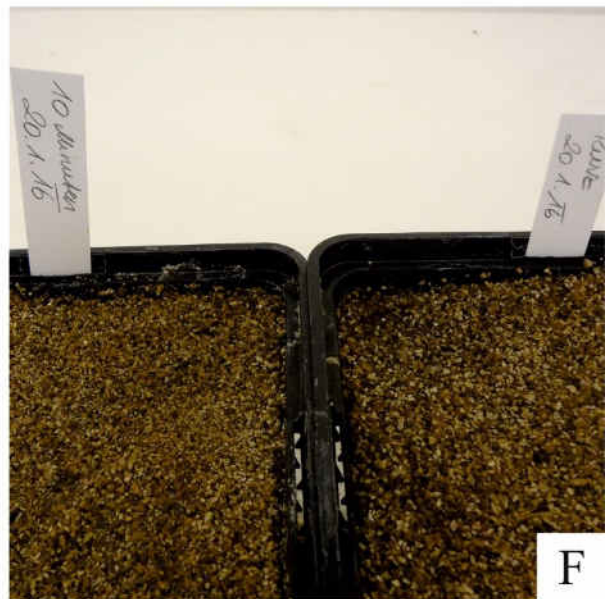
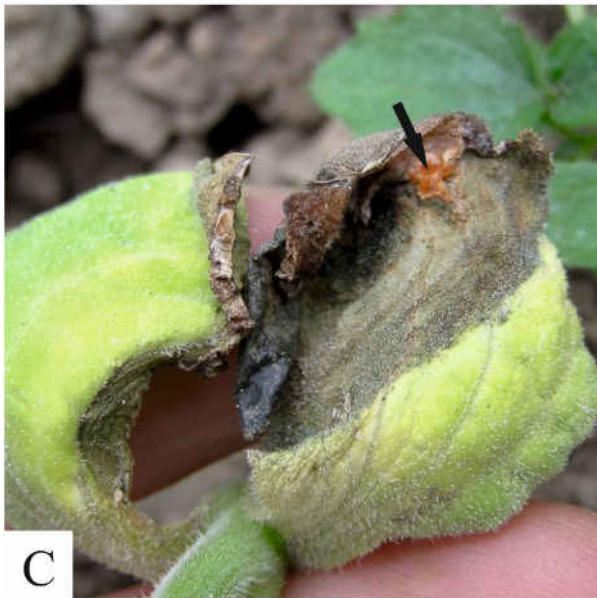
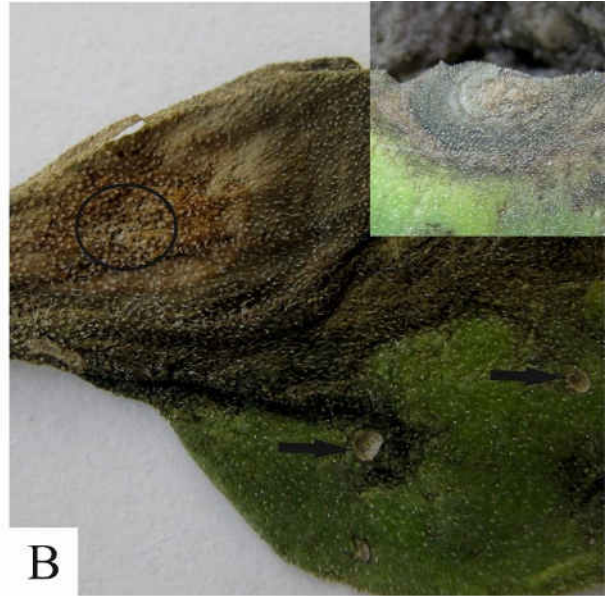
Bildtafel 8



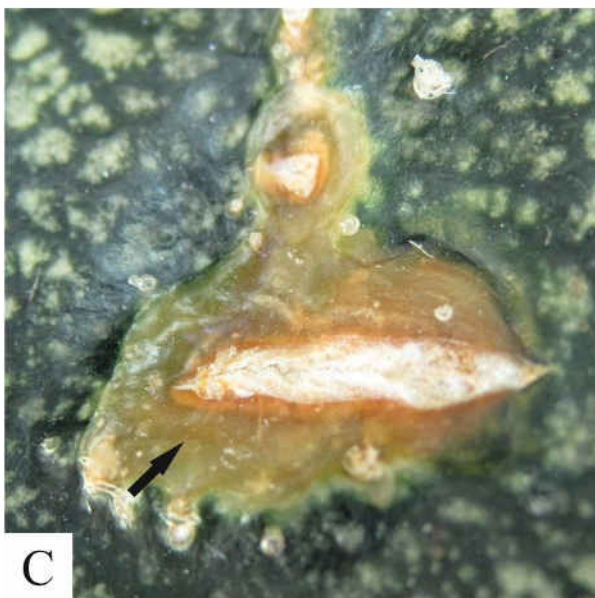
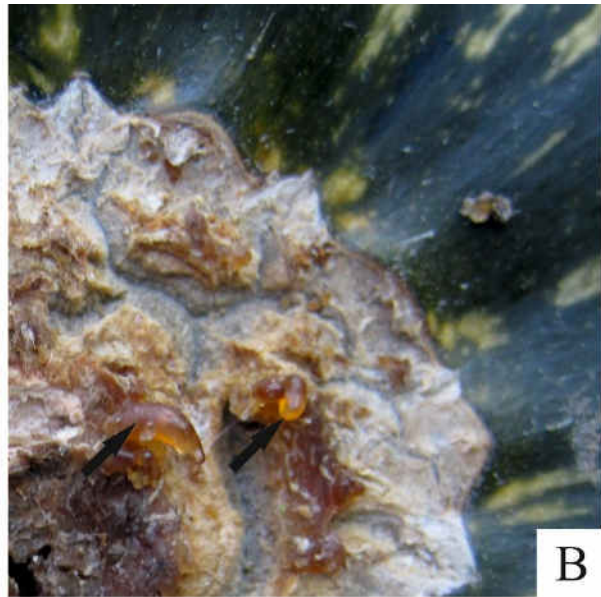
Bildtafel 9



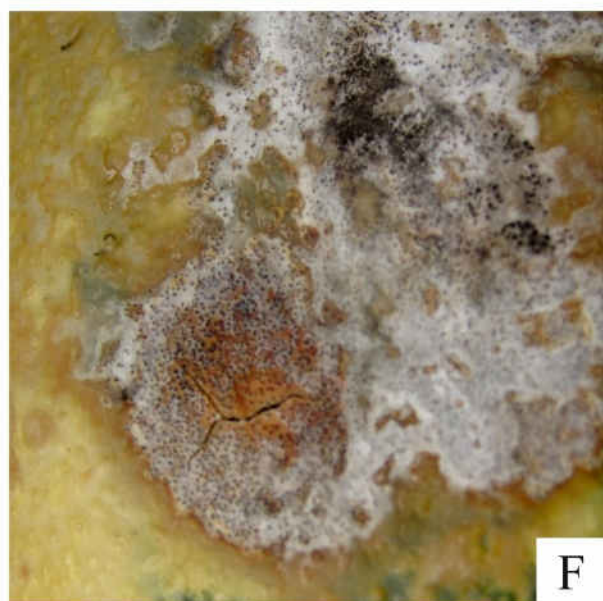
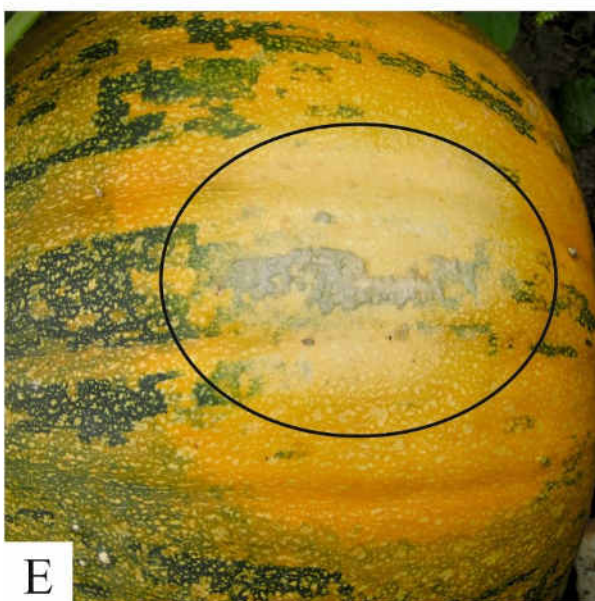
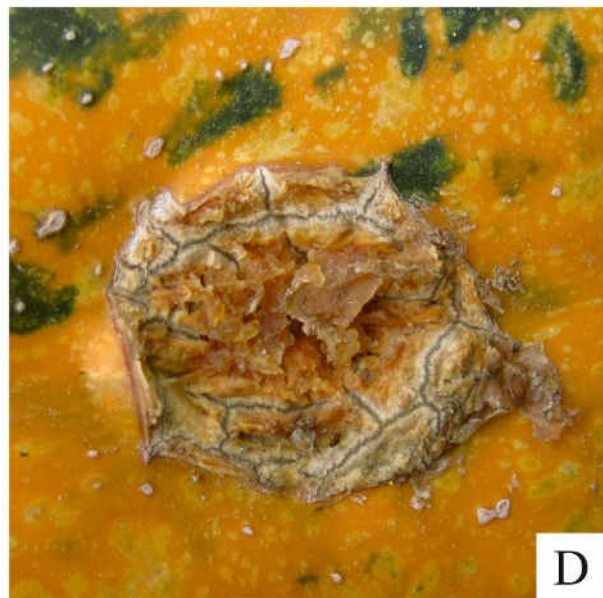
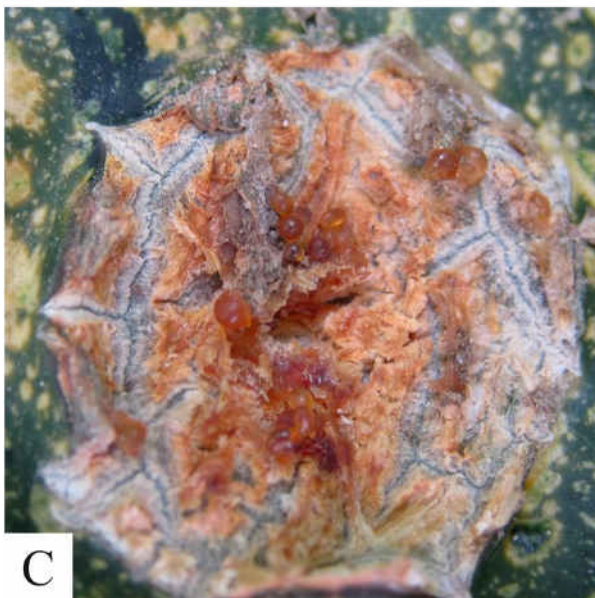
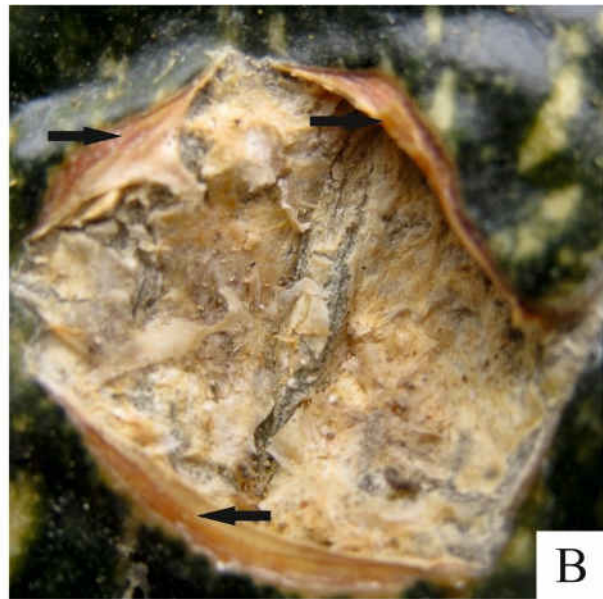
Bildtafel 10



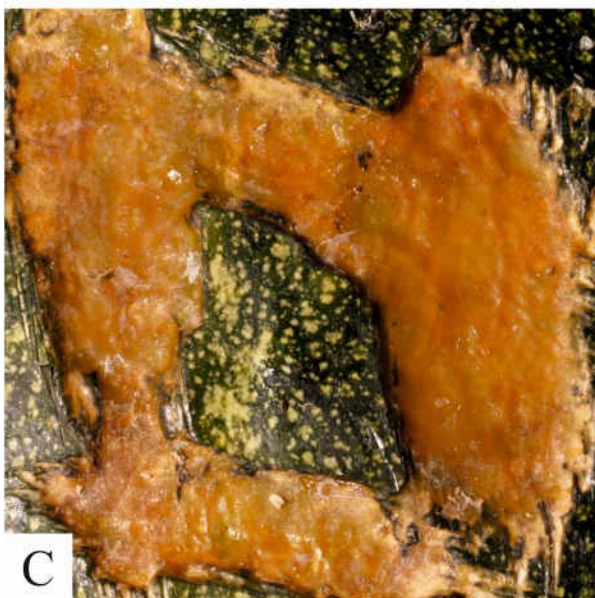
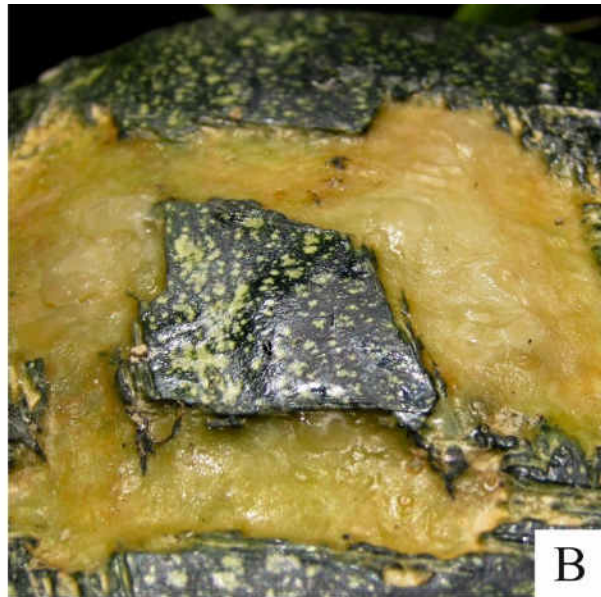
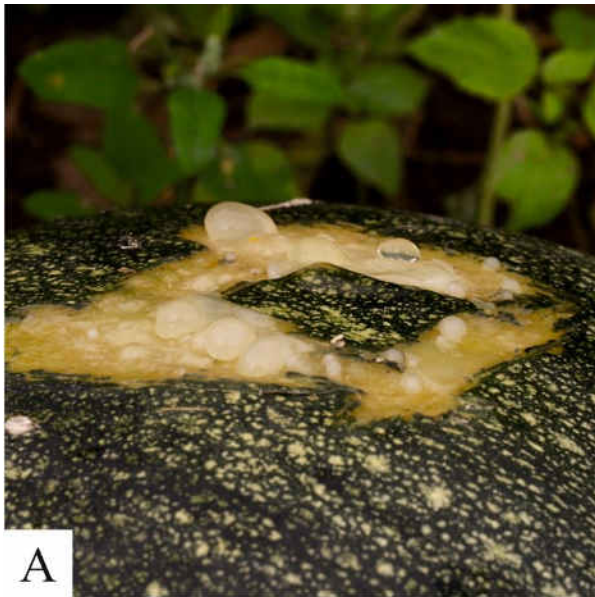
Bildtafel 11



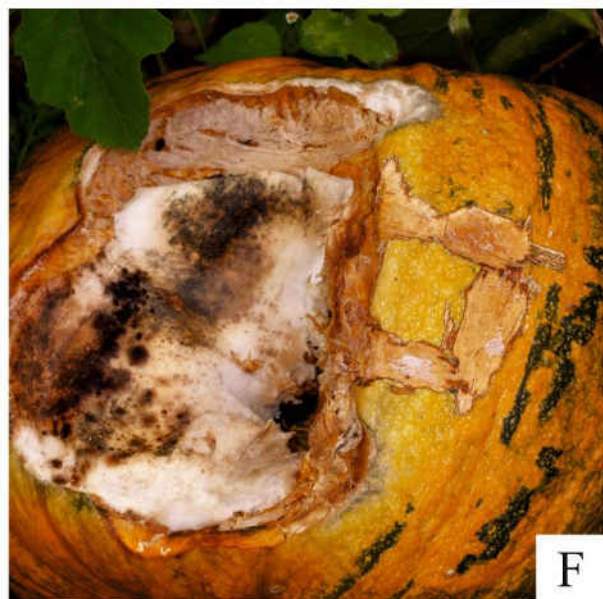
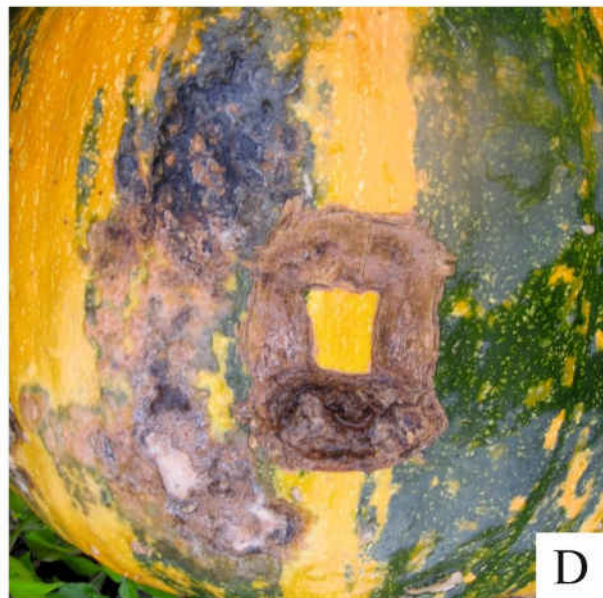
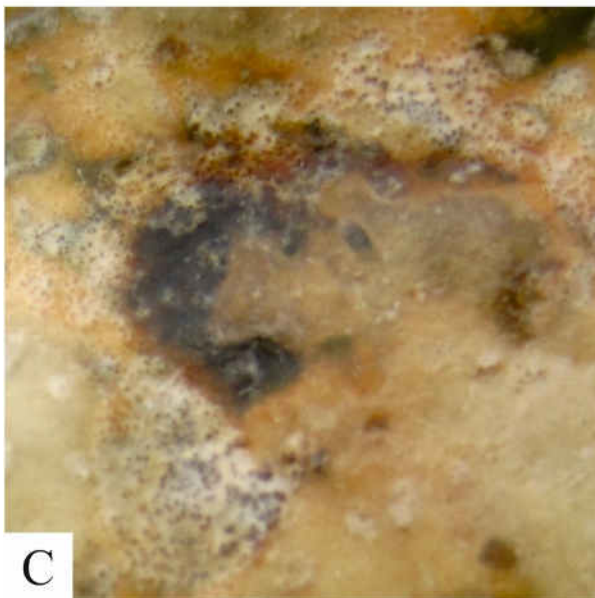
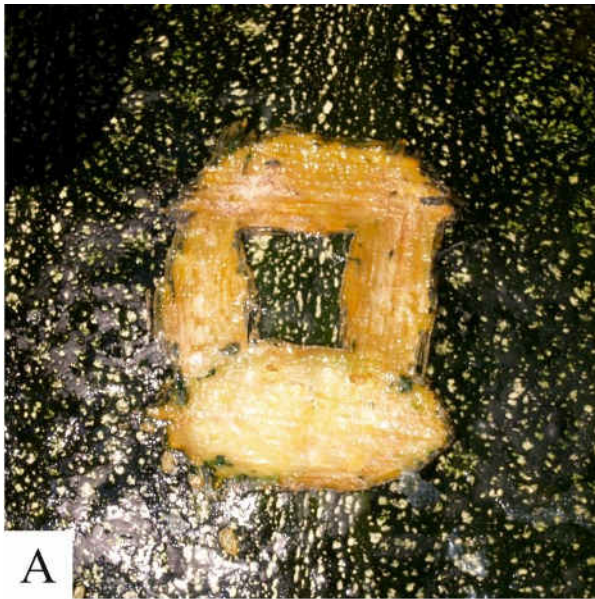
Bildtafel 12



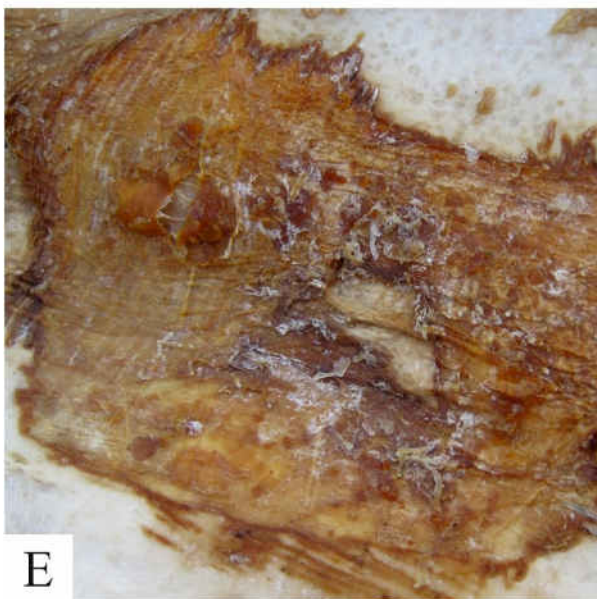
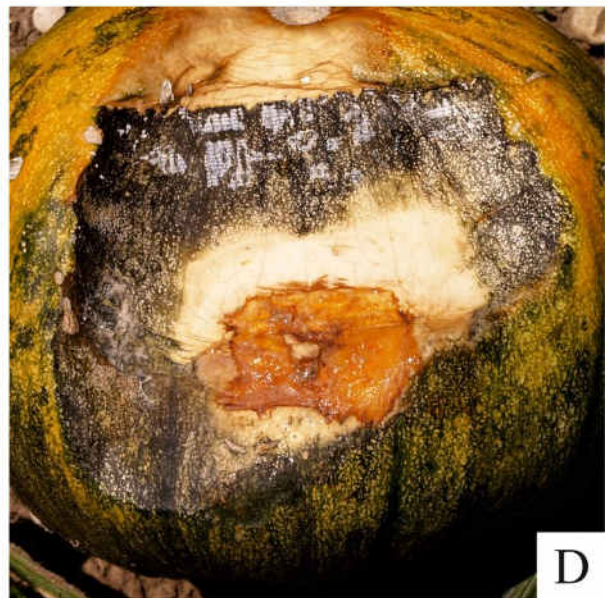
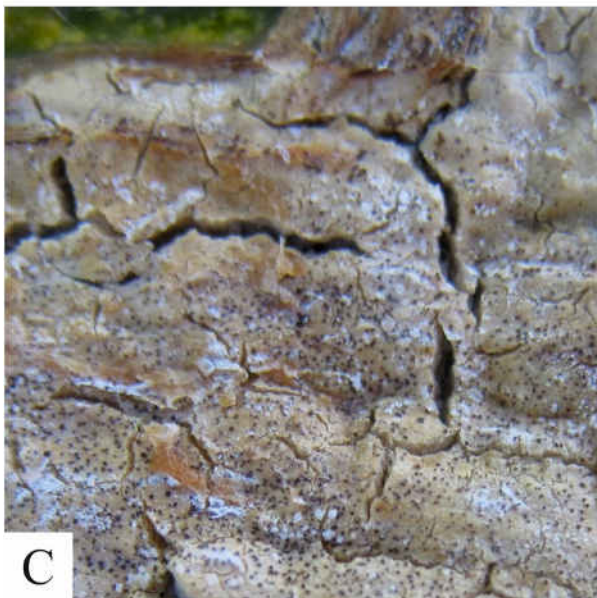
Bildtafel 13



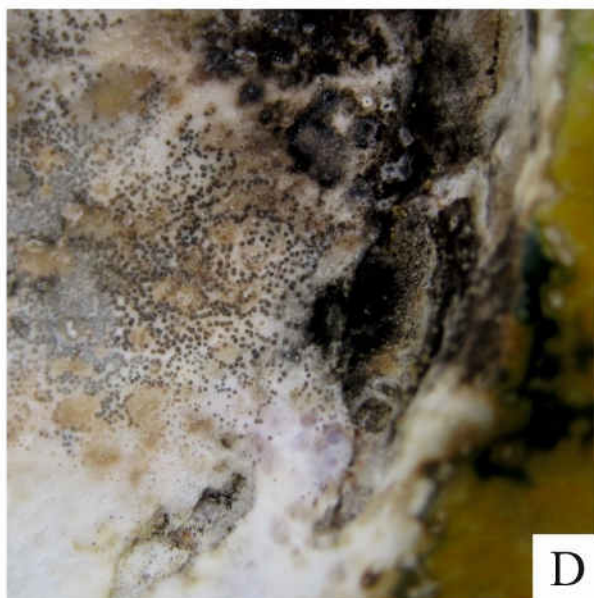
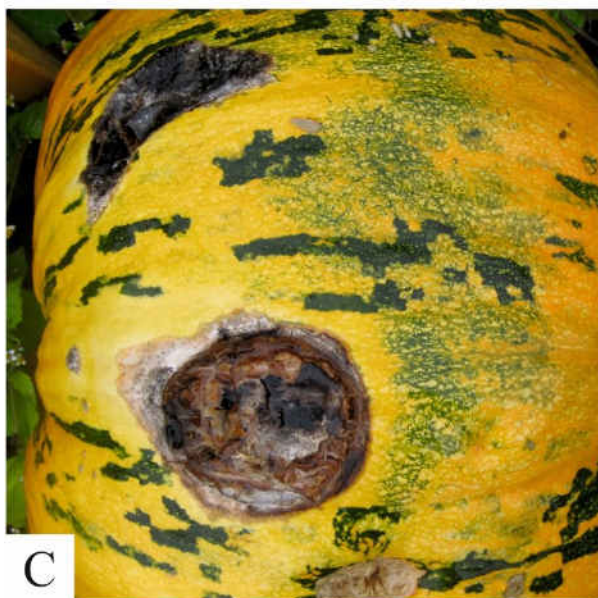
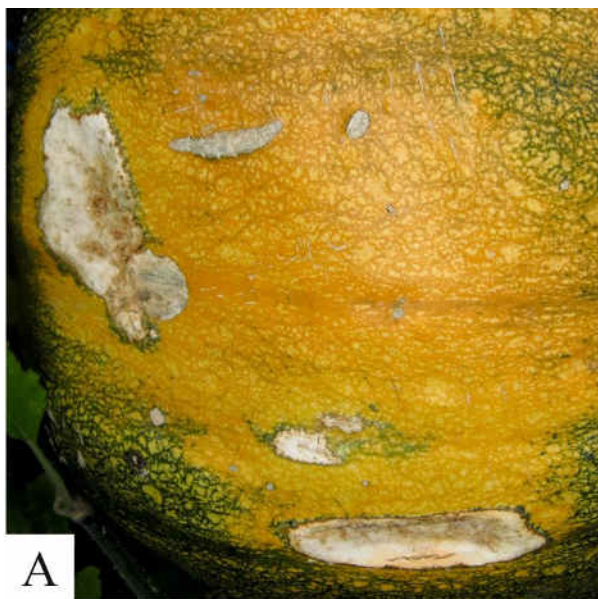
Bildtafel 14



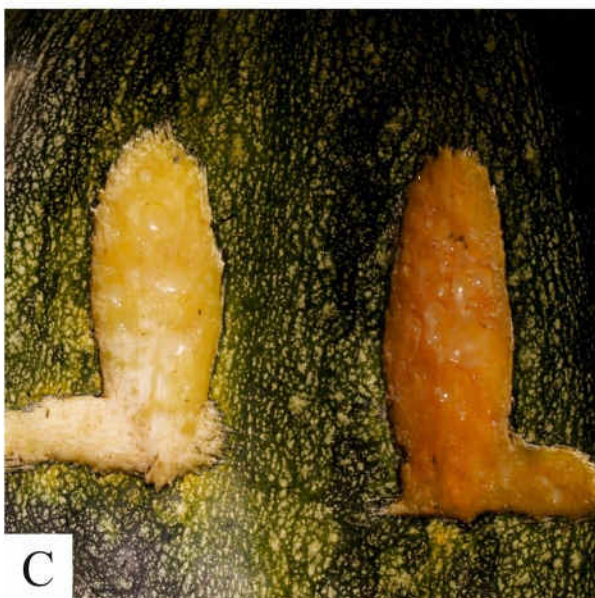
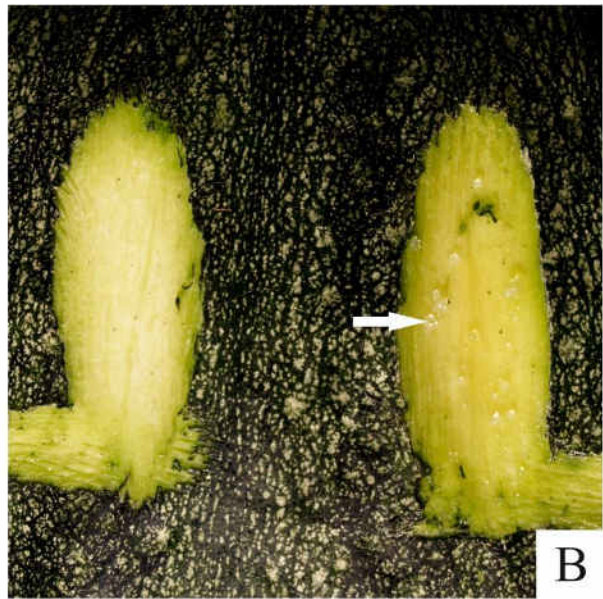
Bildtafel 15



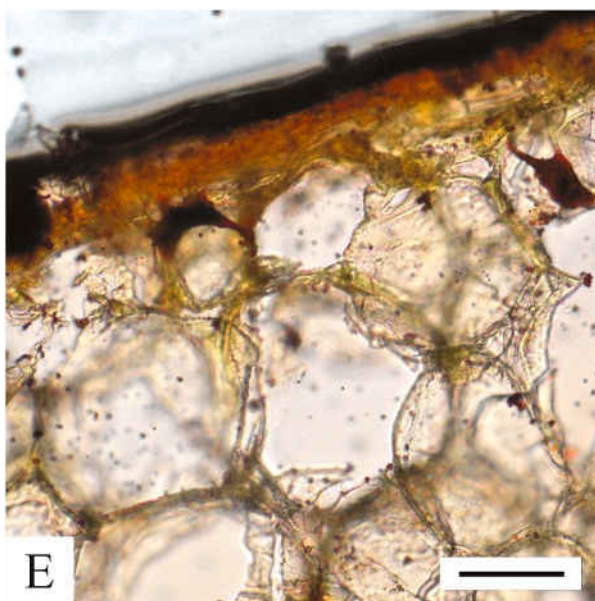
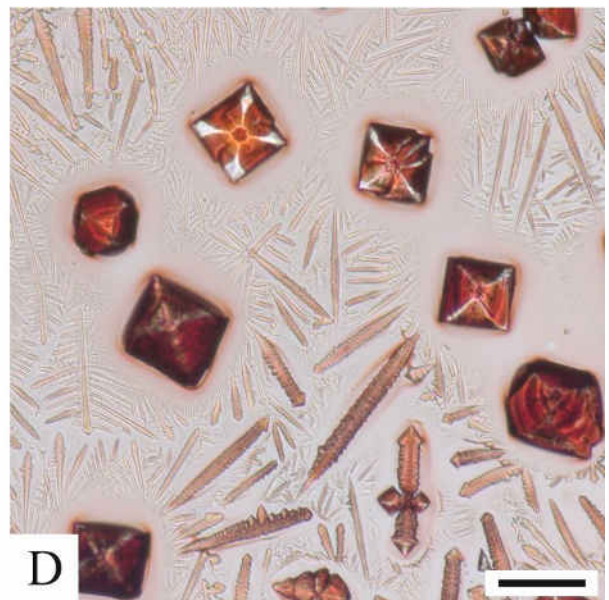
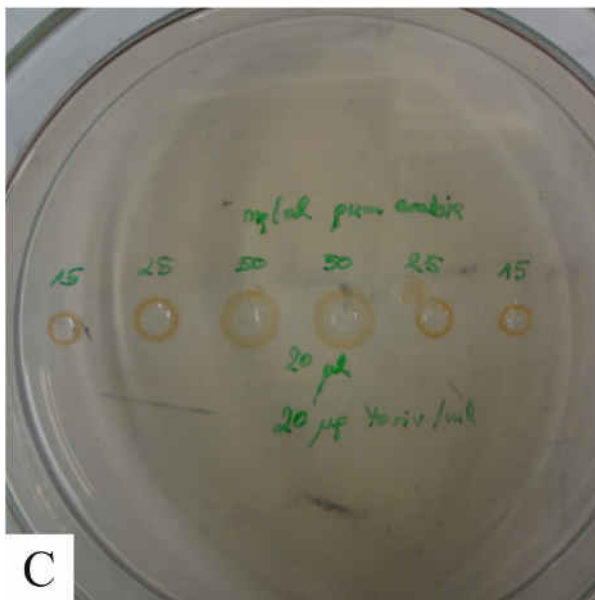
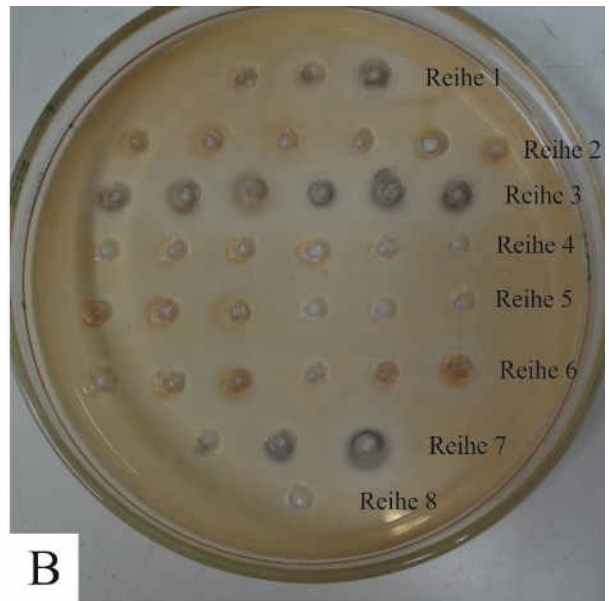
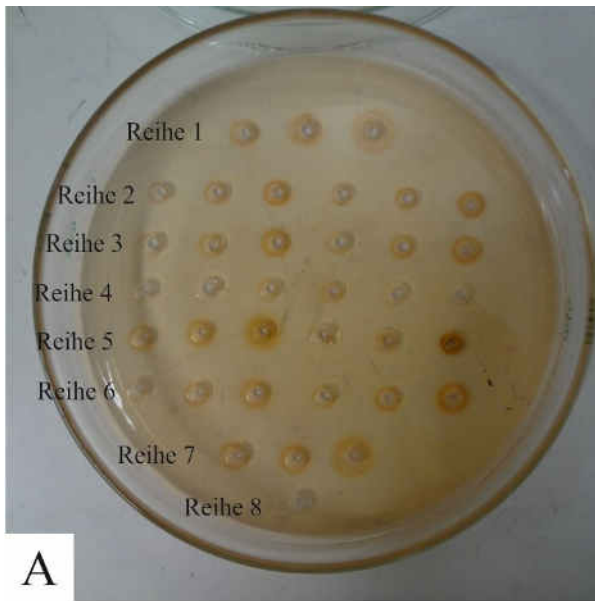
Bildtafel 16



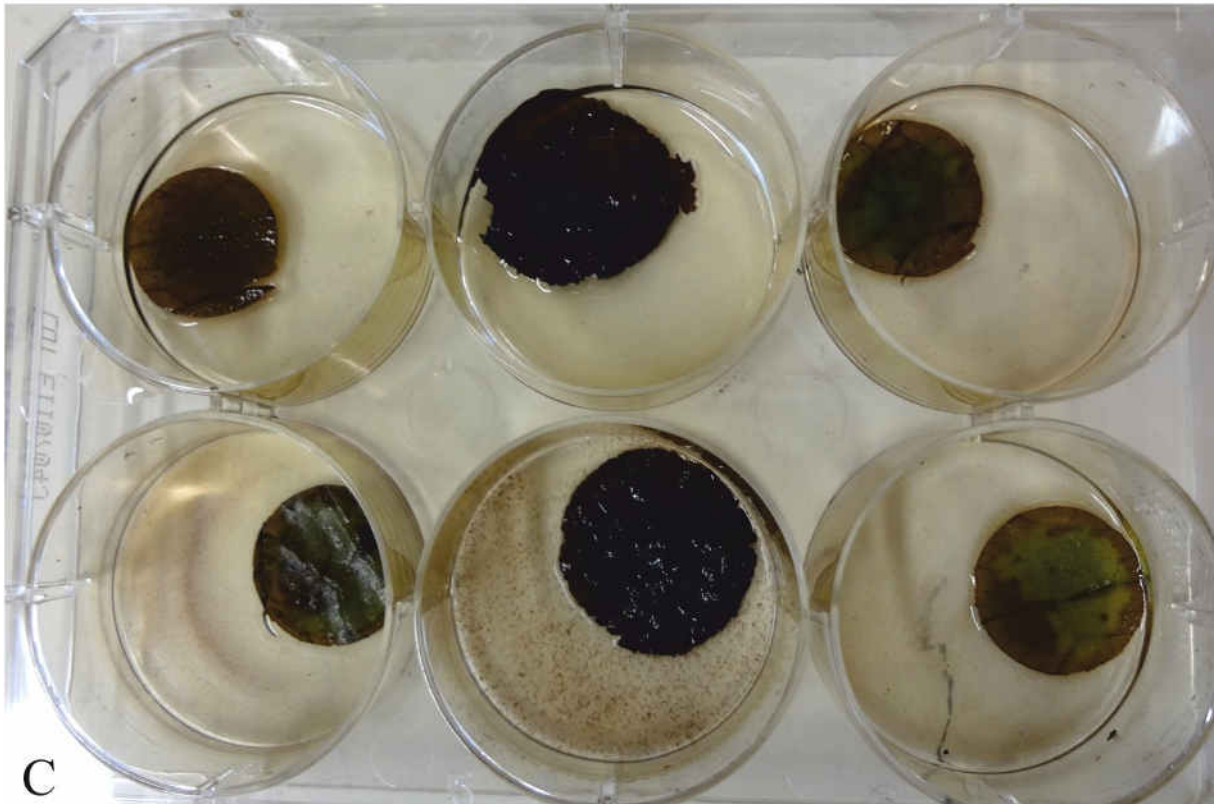
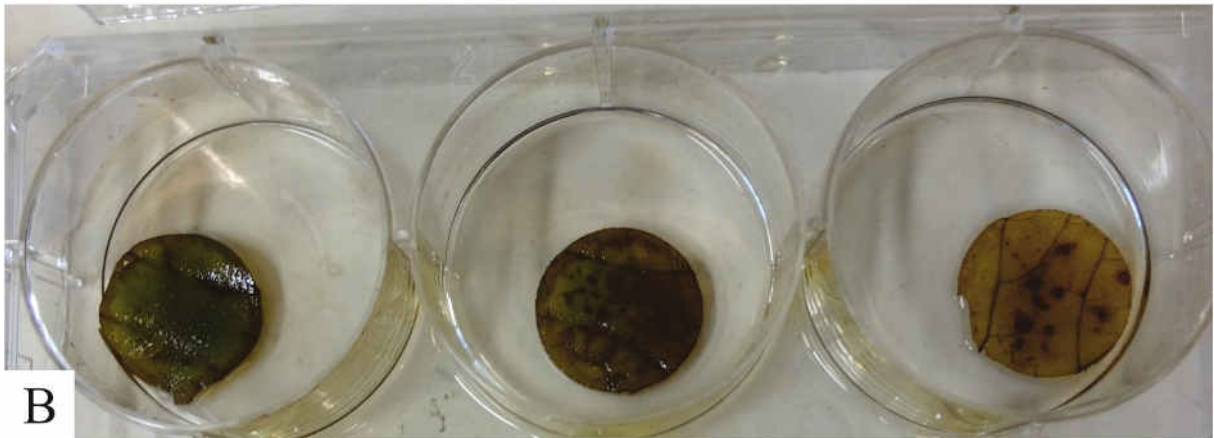
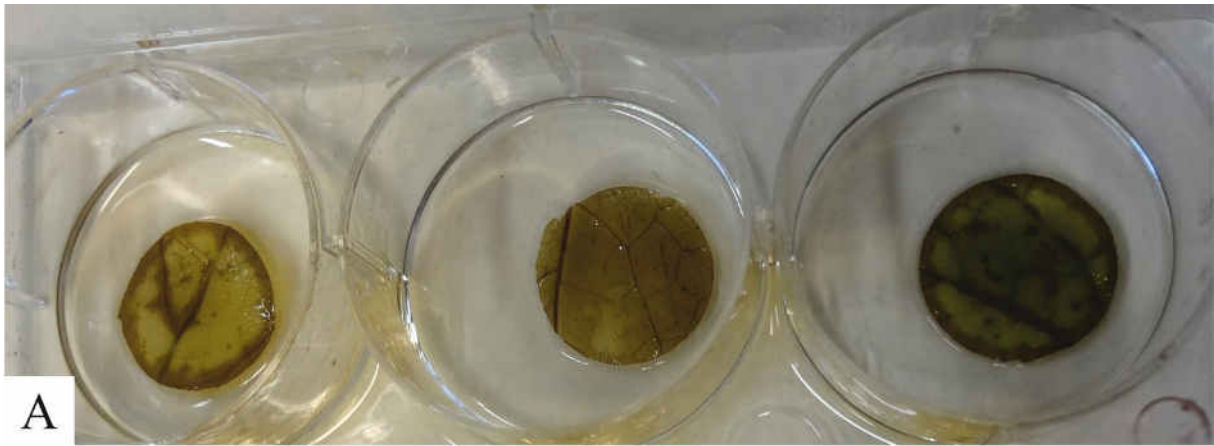
Bildtafel 17



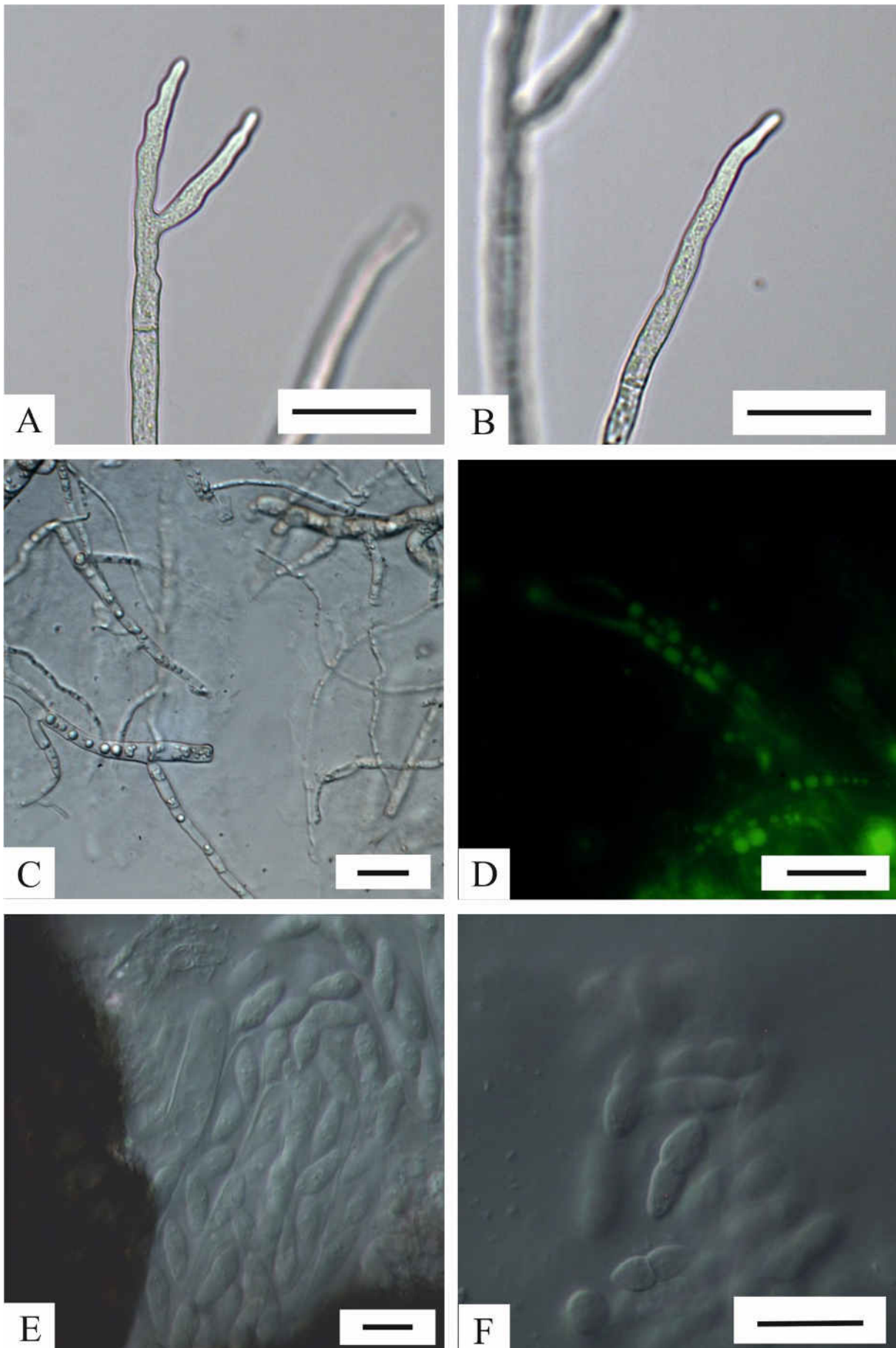
Bildtafel 18



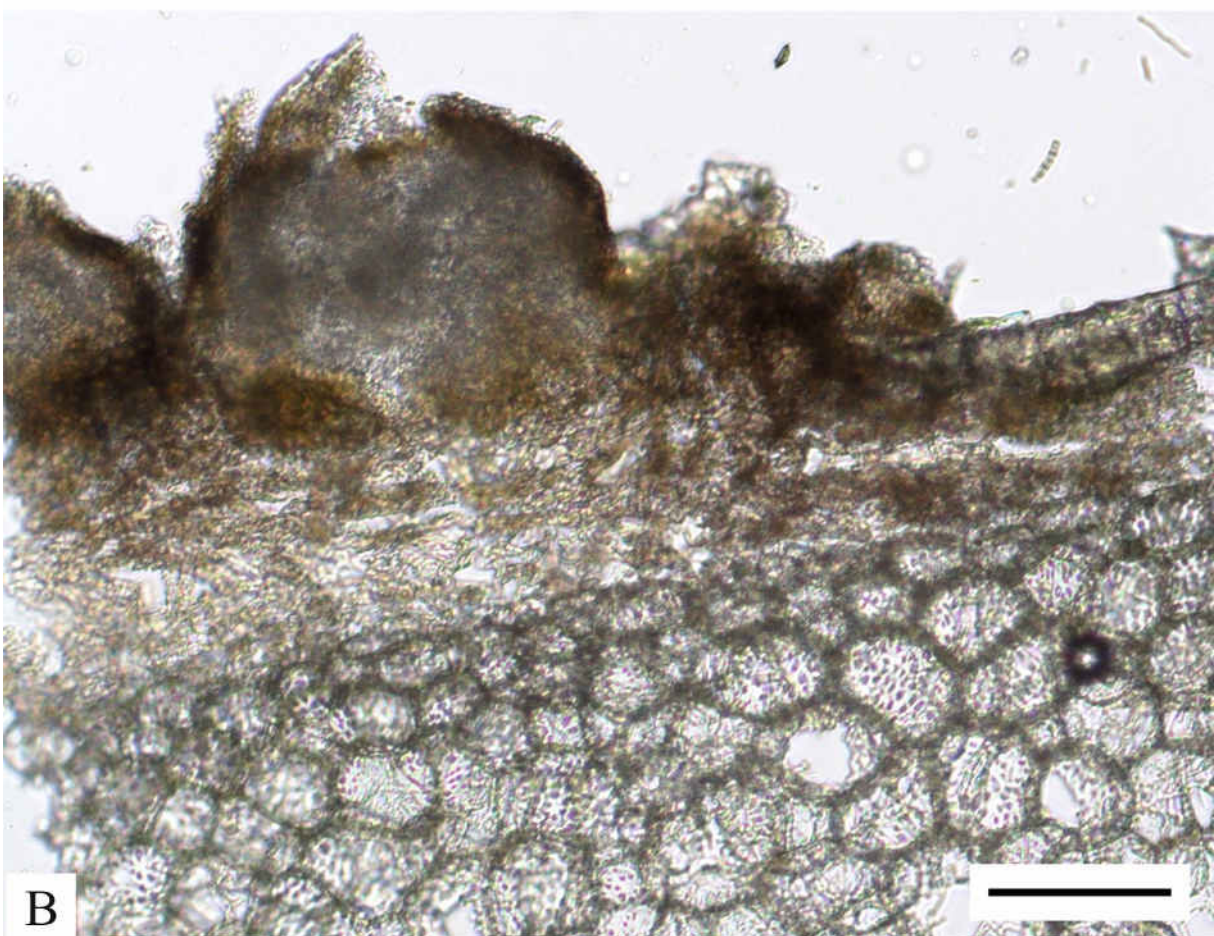
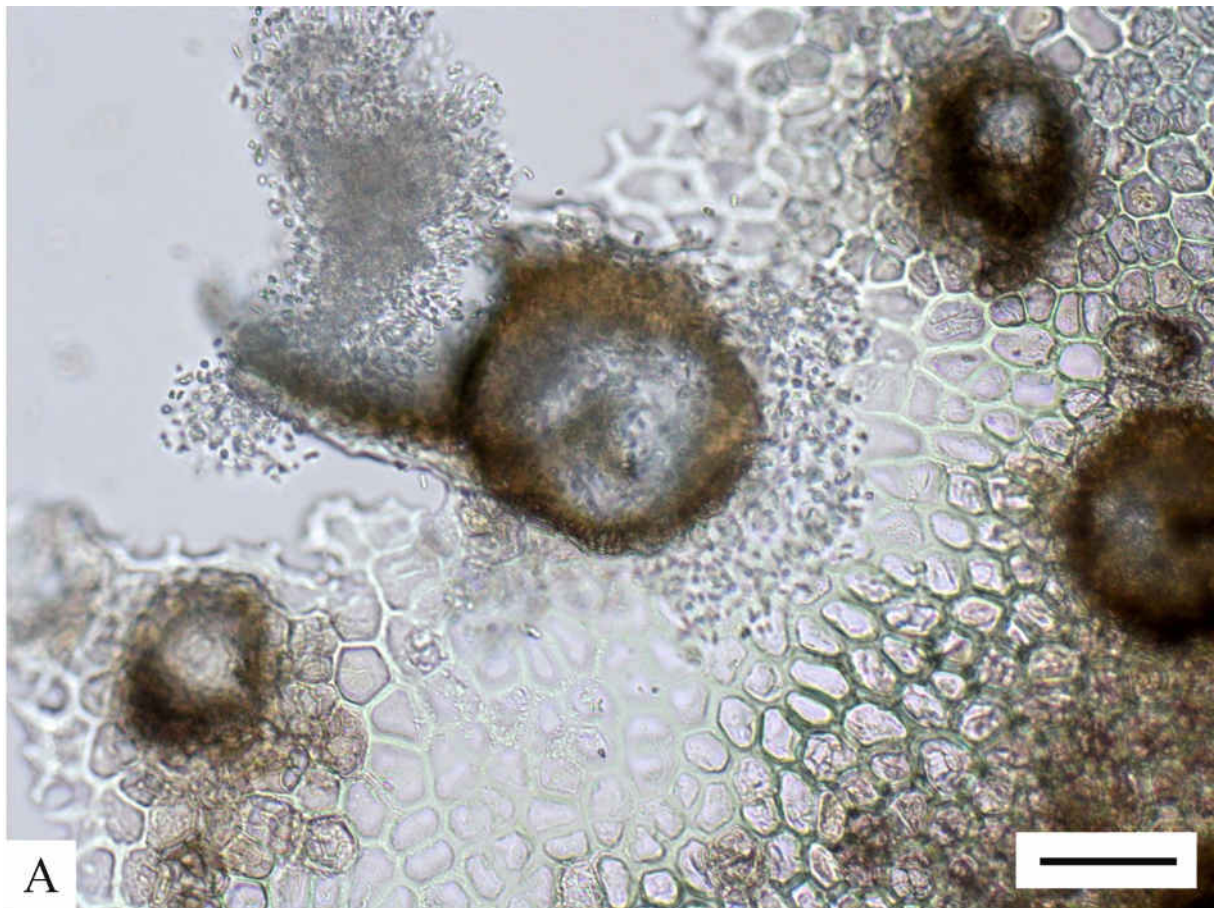
Bildtafel 19 D: Maßstab= 100 µm, E: Maßstab= 30 µm



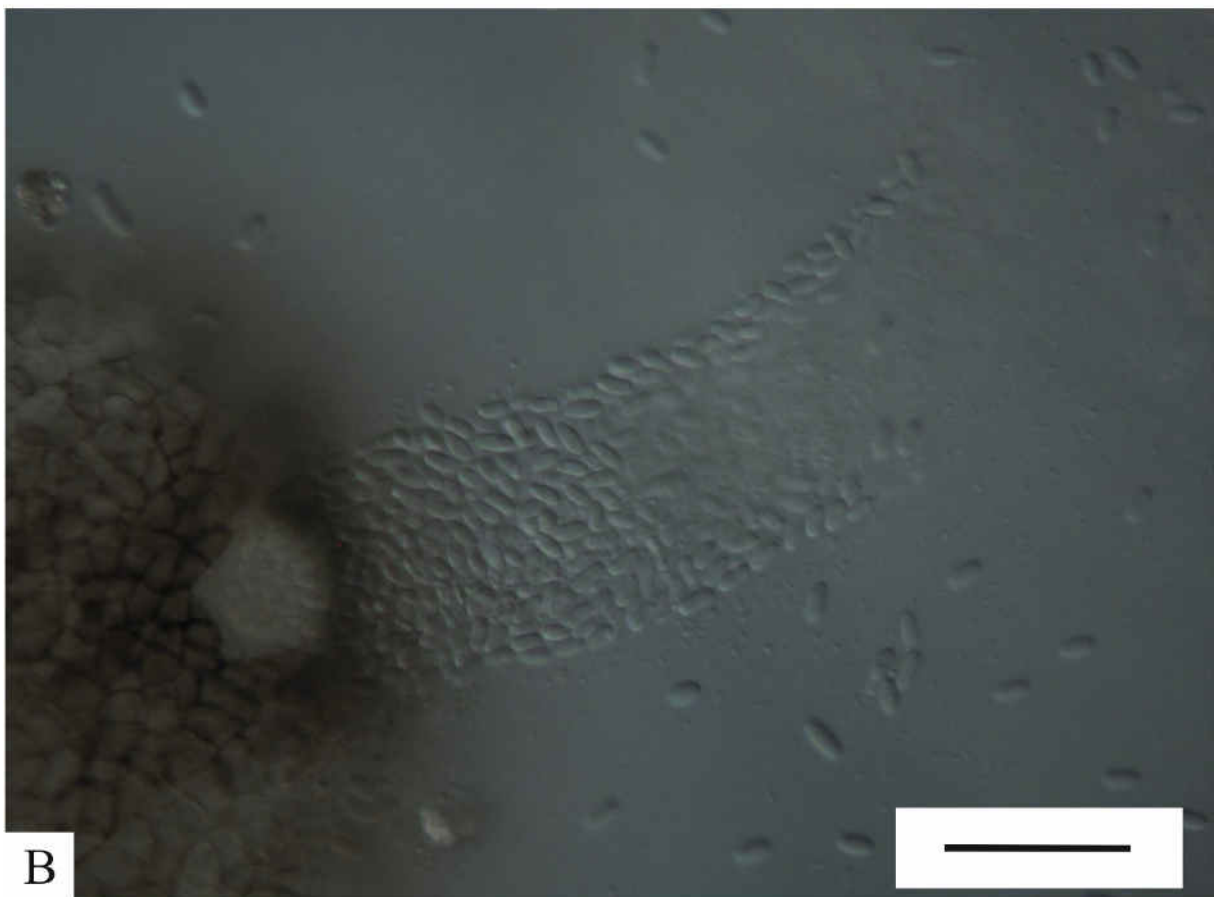
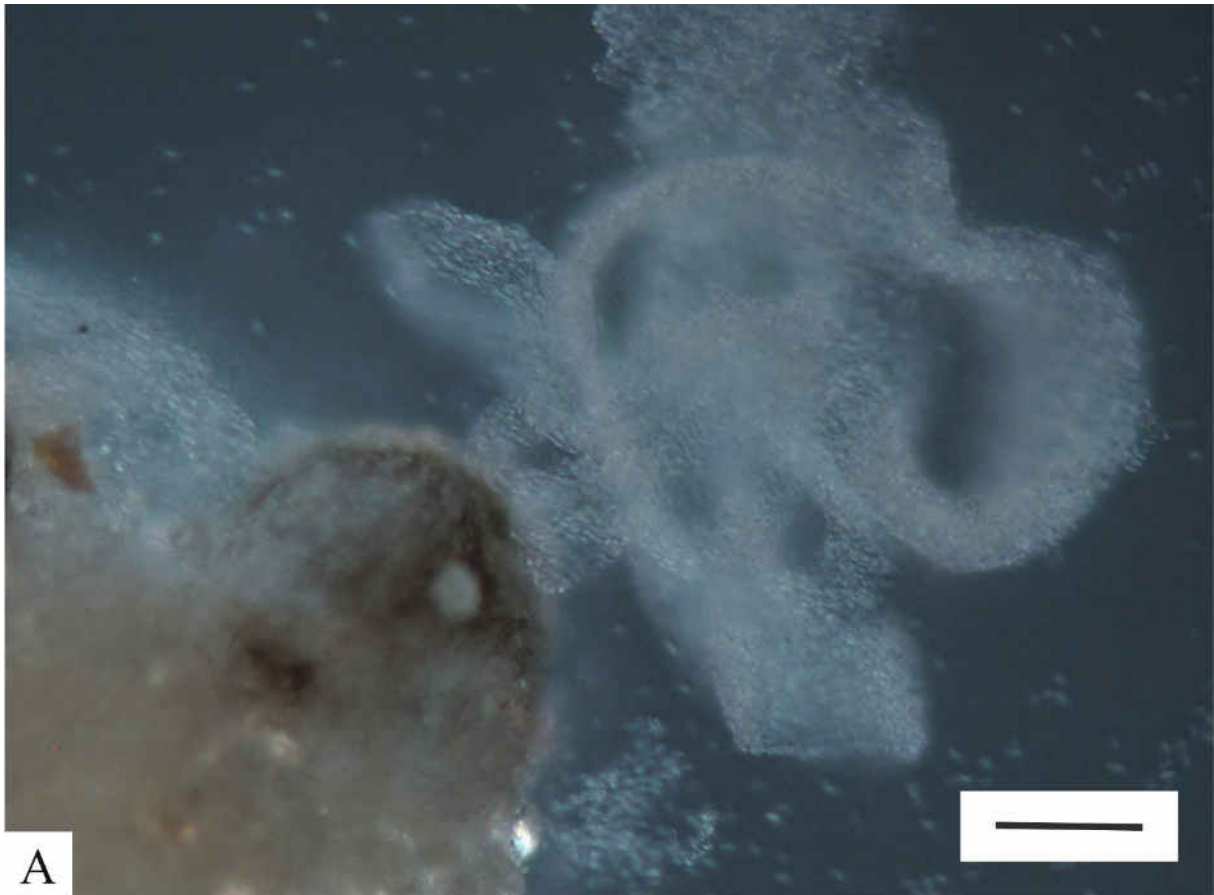
Bildtafel 20



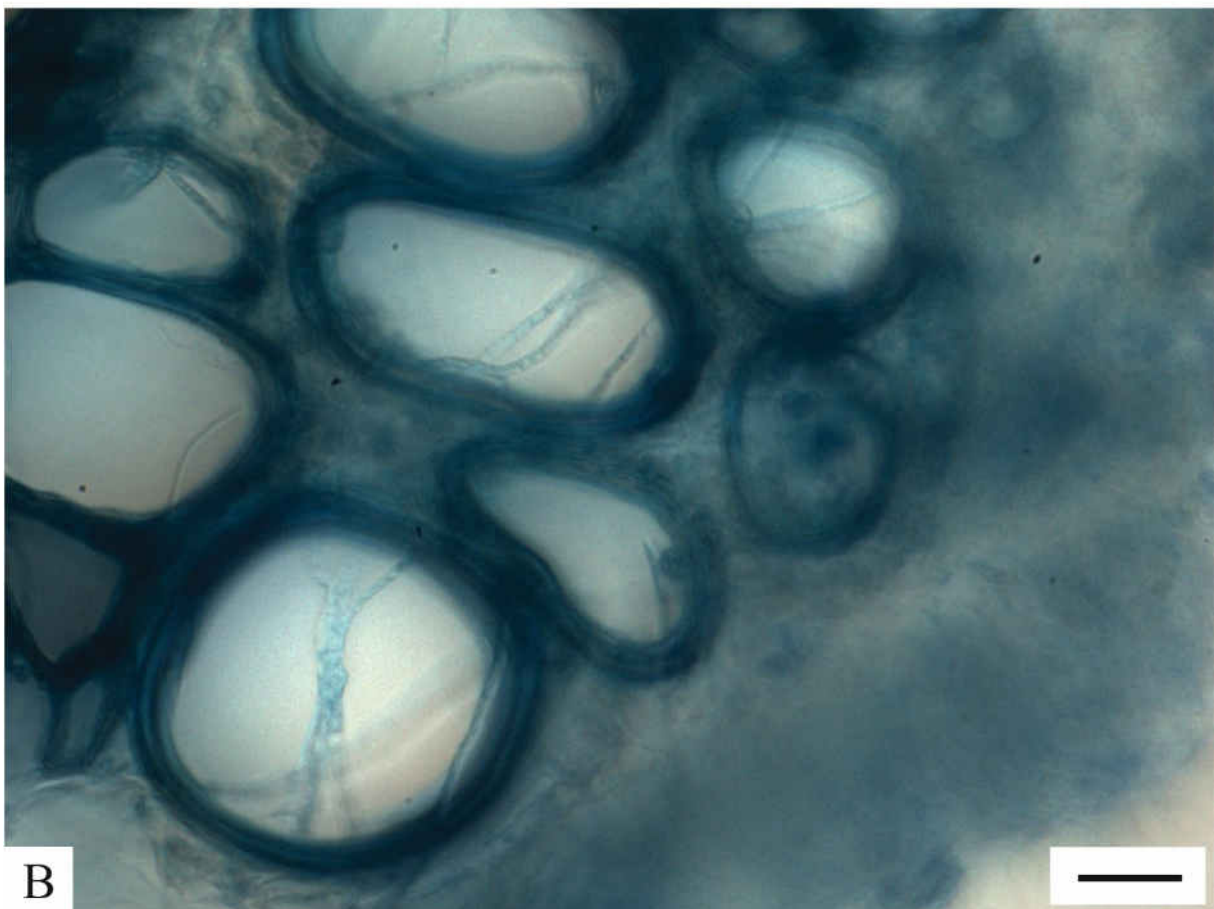
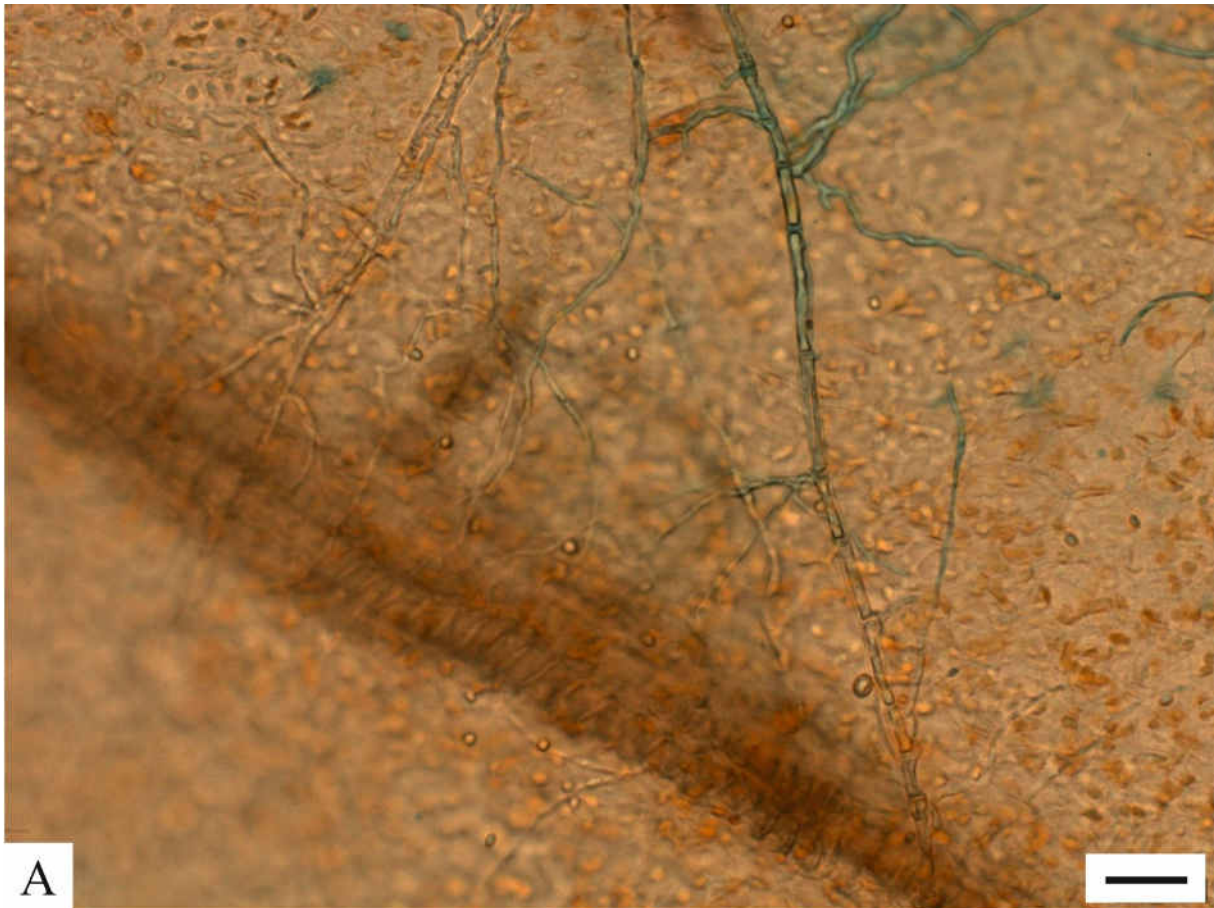
Bildtafel 21 A: Maßstab= 50µm, B: Maßstab= 50µm, C: Maßstab= 20µm, D: Maßstab= 20µm, E: Maßstab= 10µm, F: Maßstab= 10µm



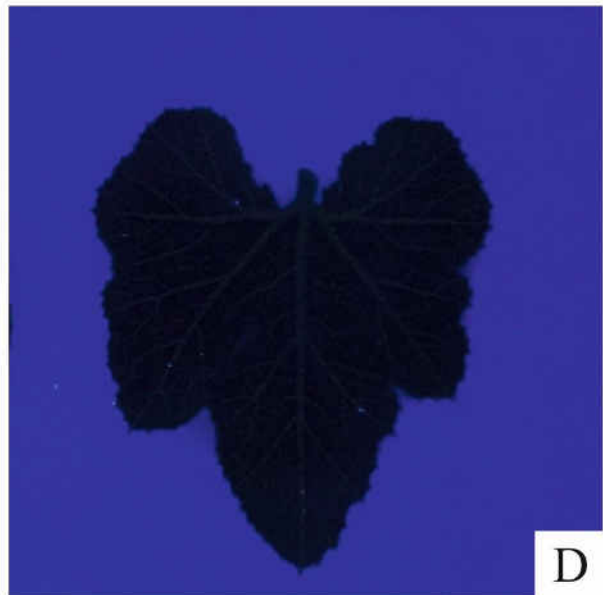
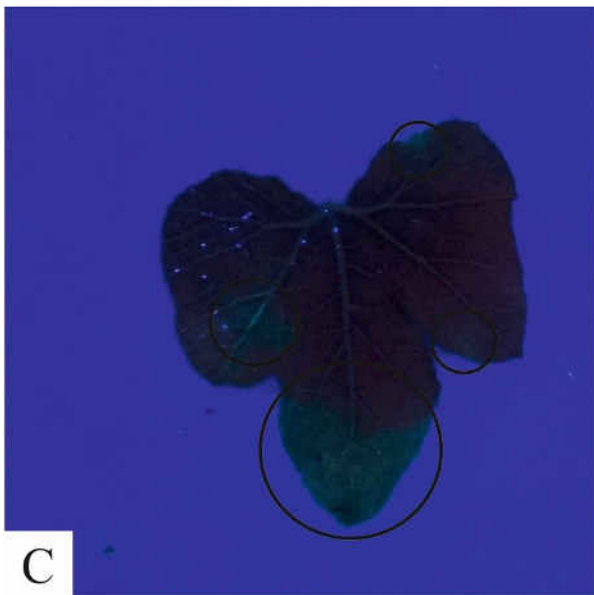
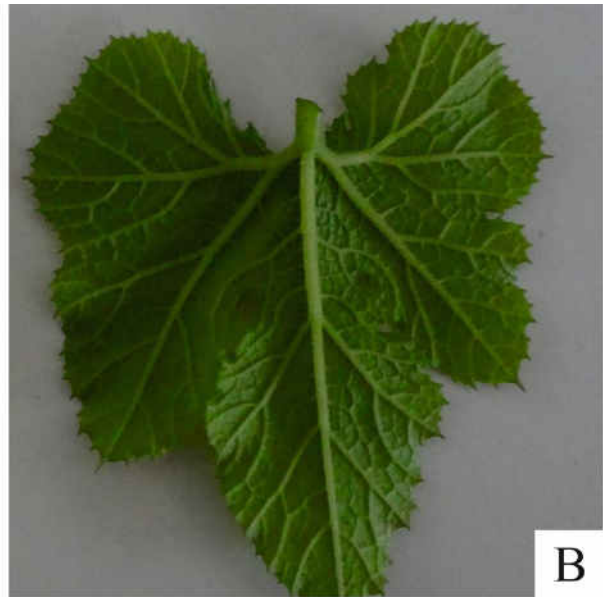
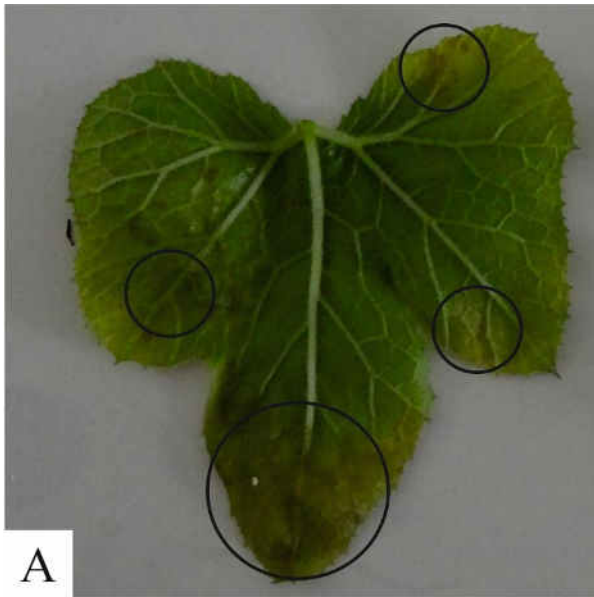
Bildtafel 22 A: Maßstab= 50µm, B: Maßstab= 100µm



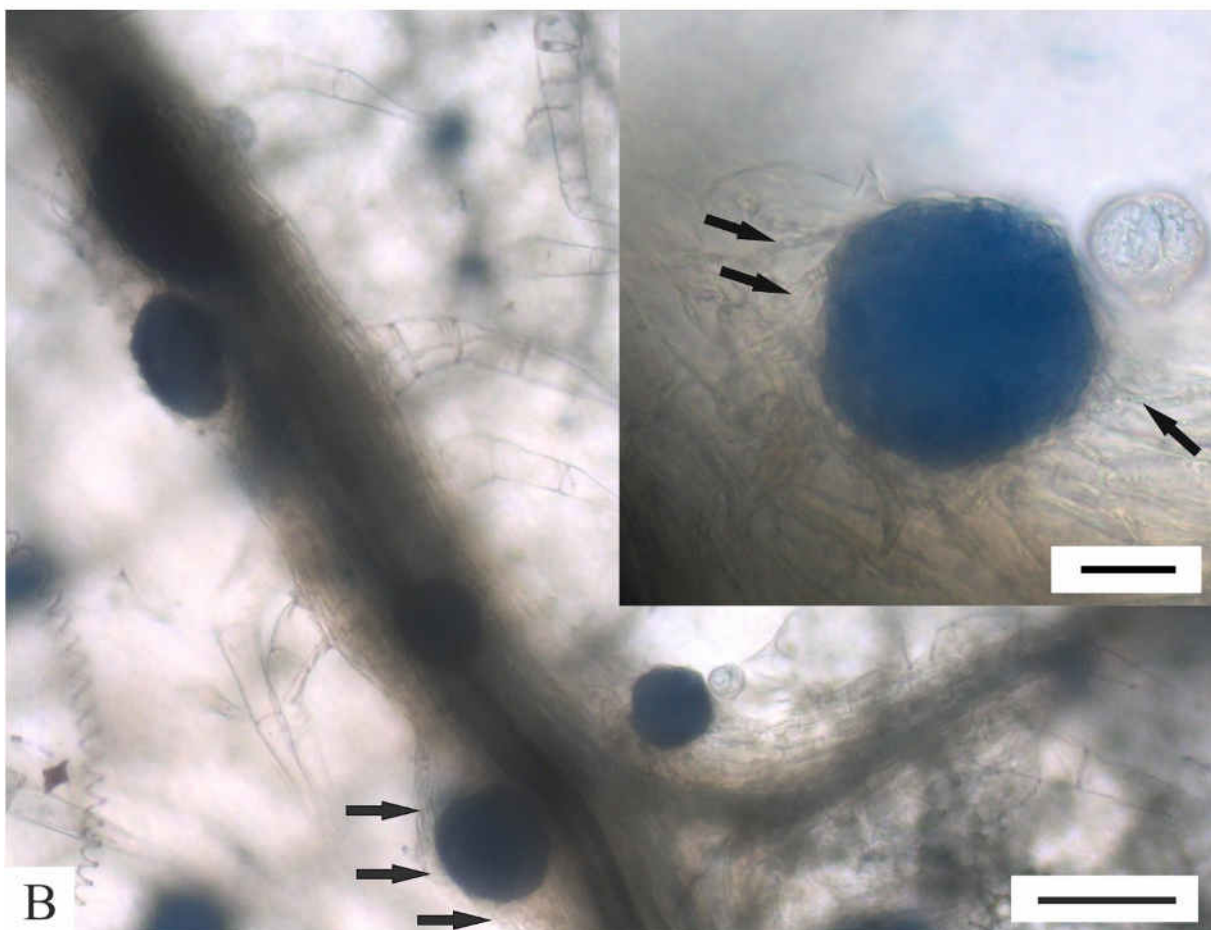
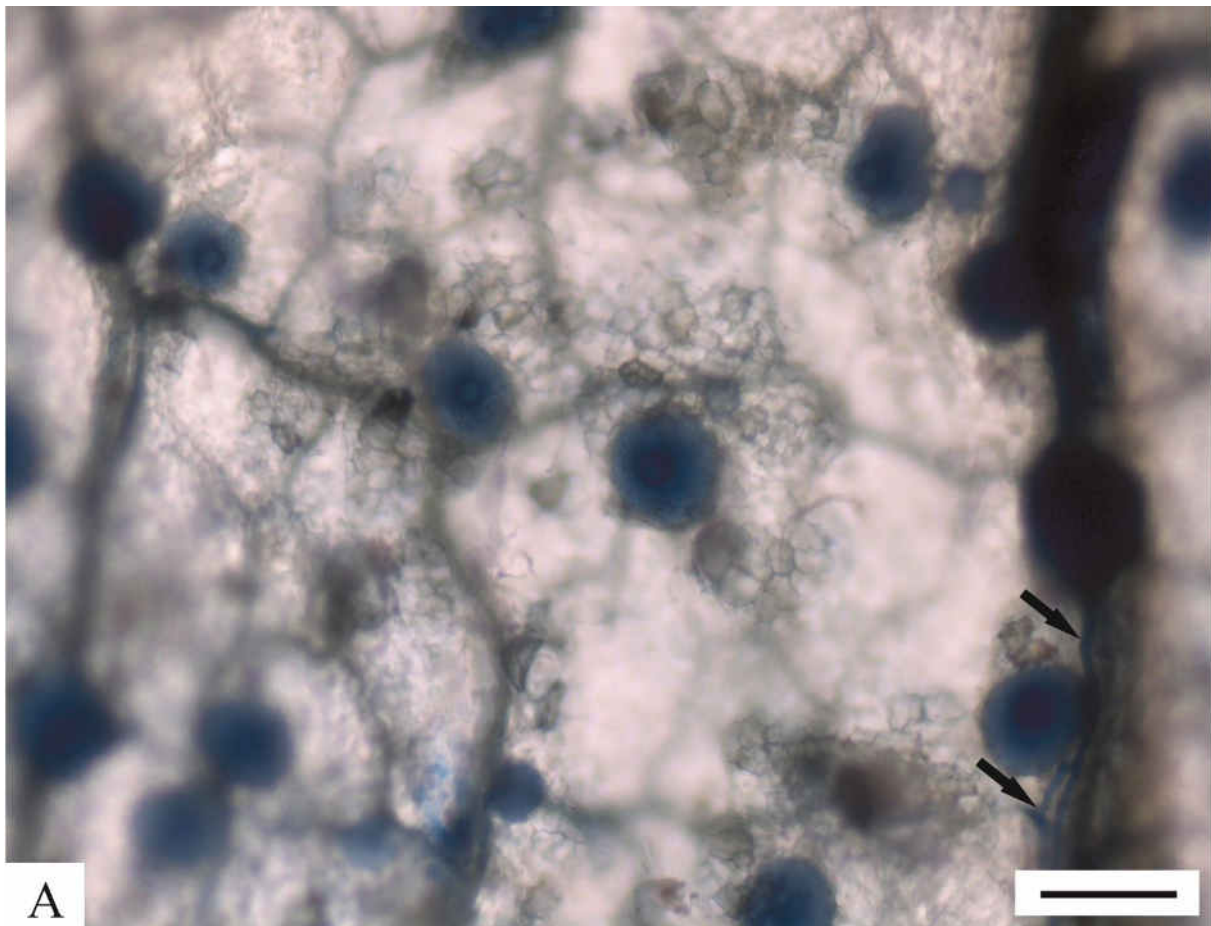
Bildtafel 23 Maßstab= 30µm



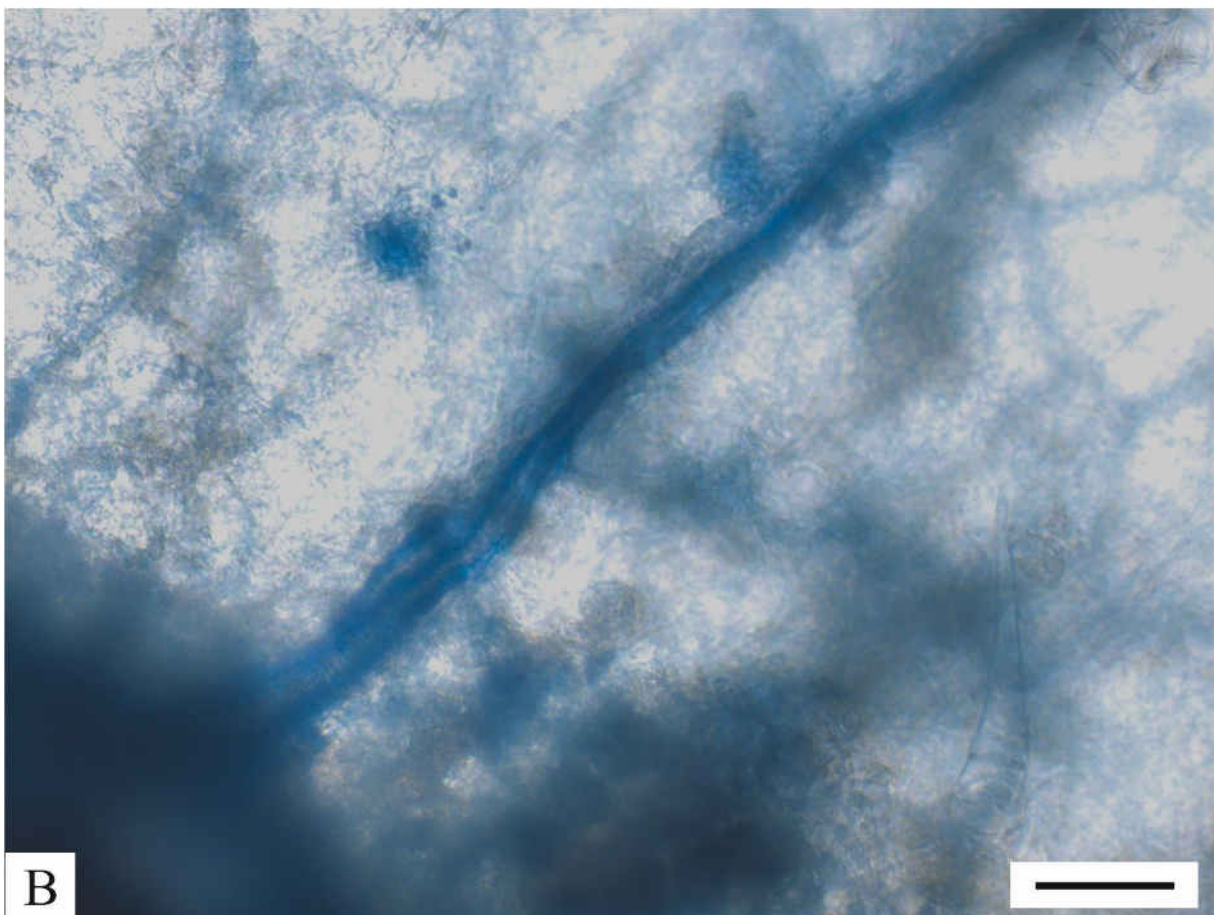
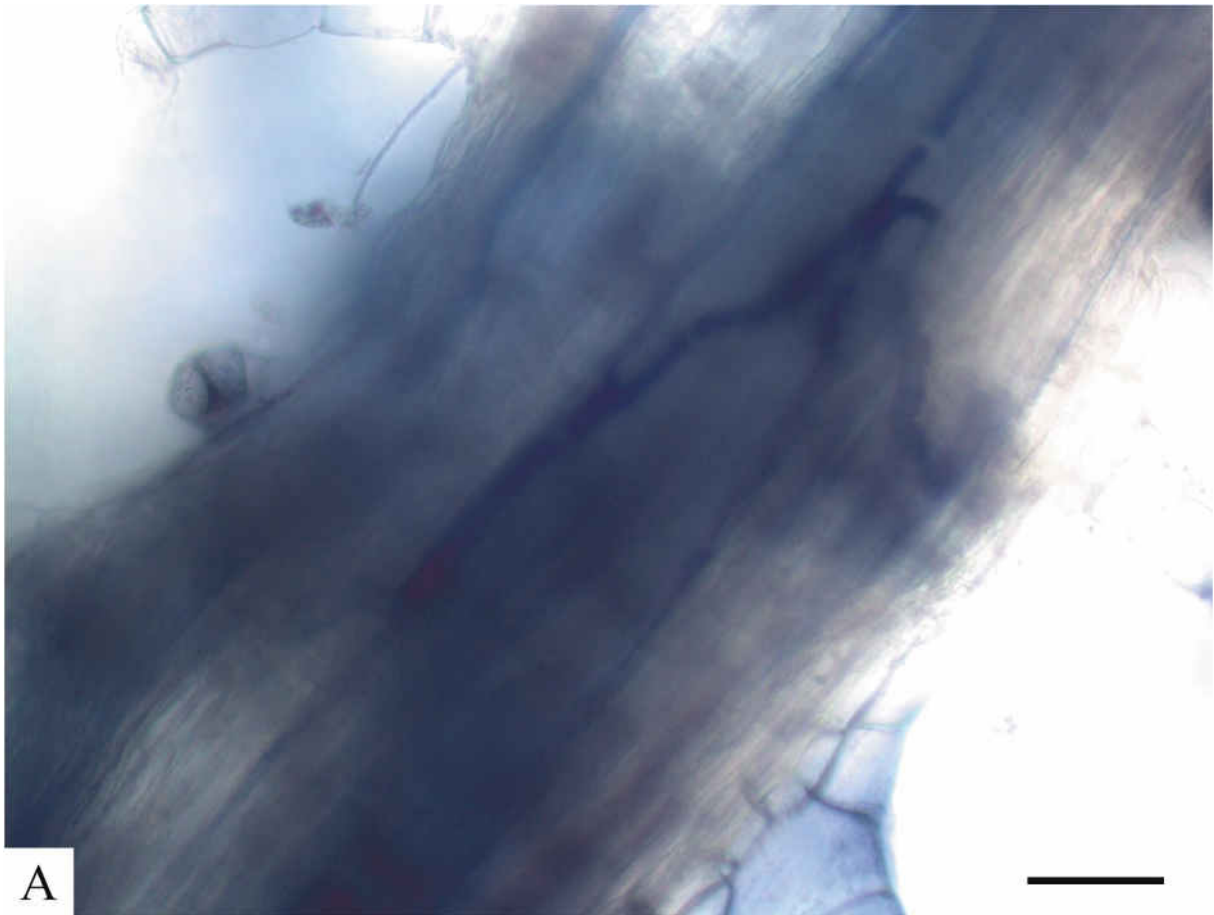
Bildtafel 24 Maßstab= 20µm



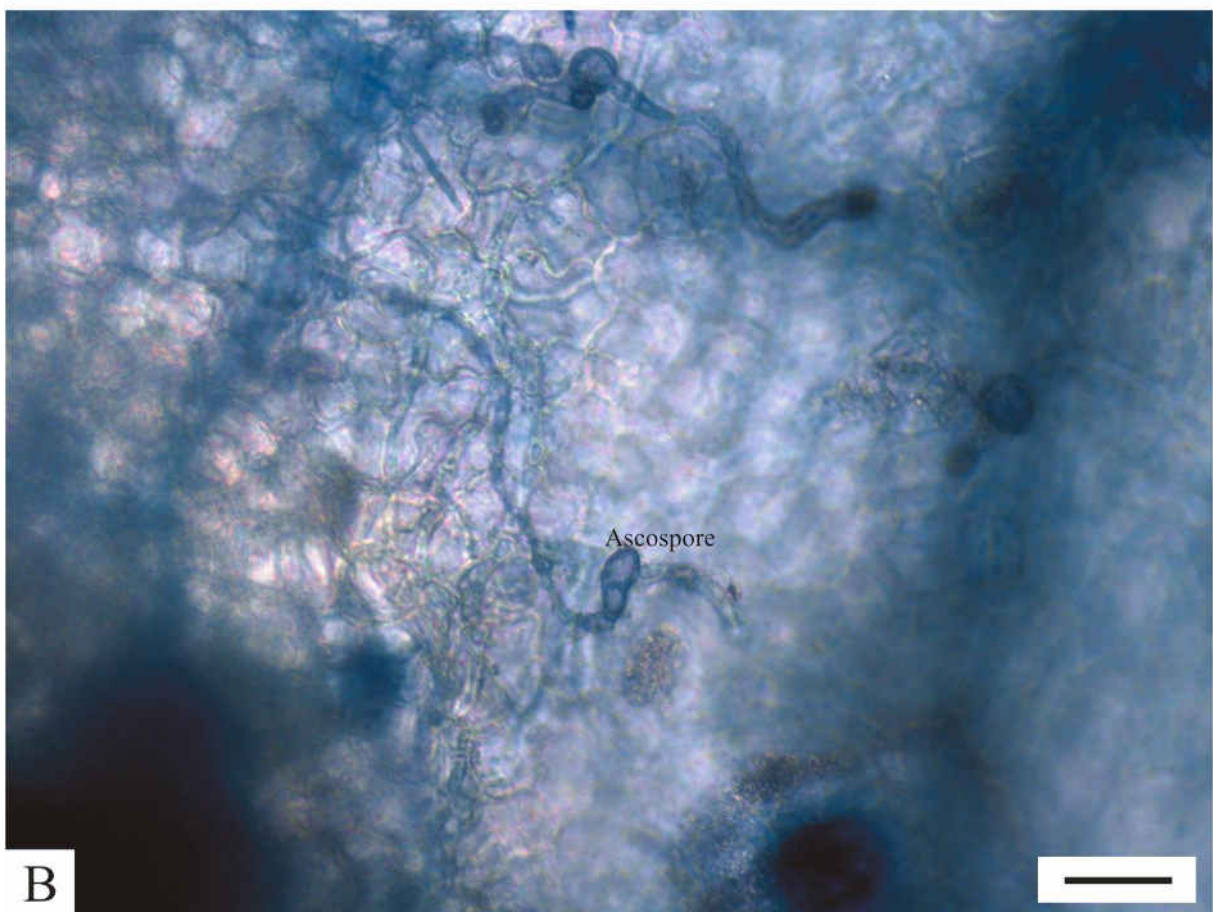
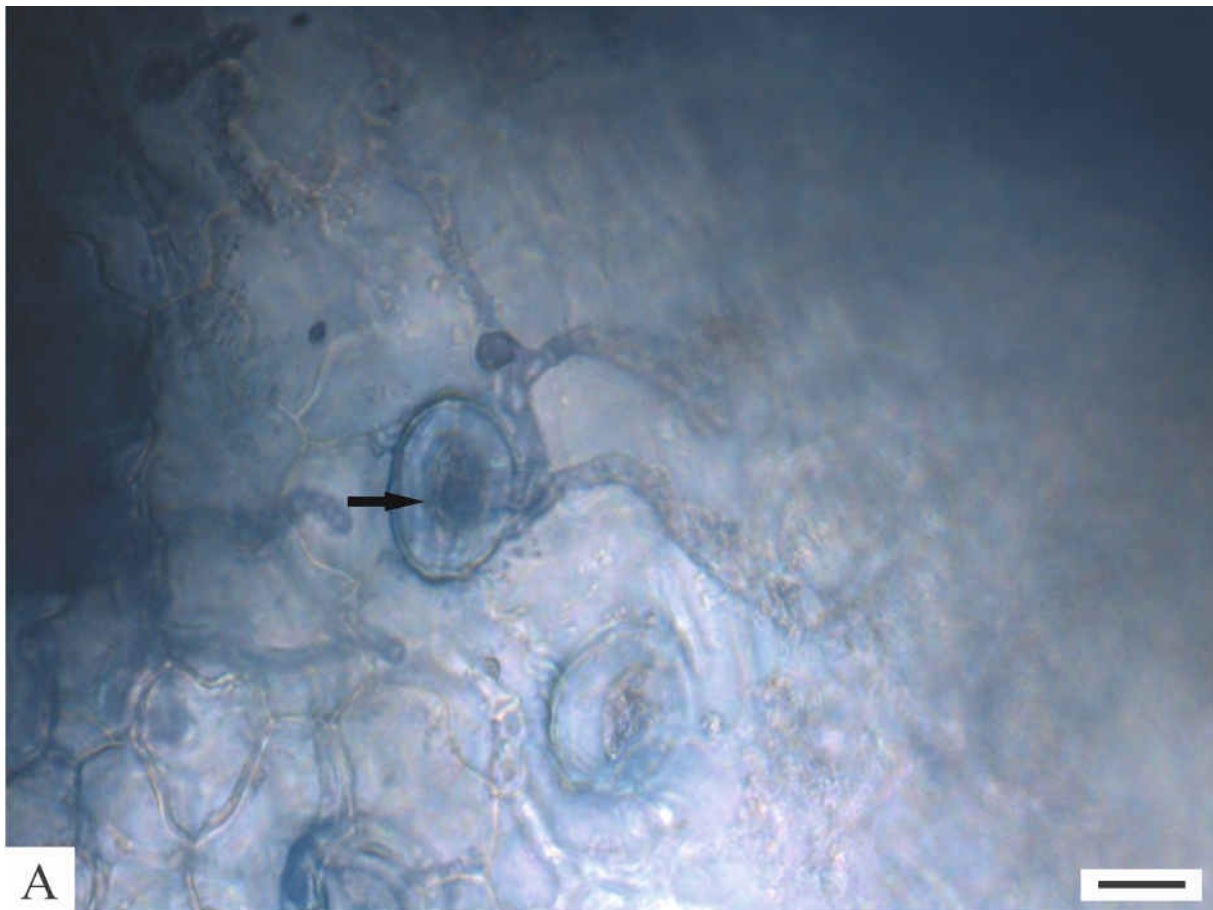
Bildtafel 25



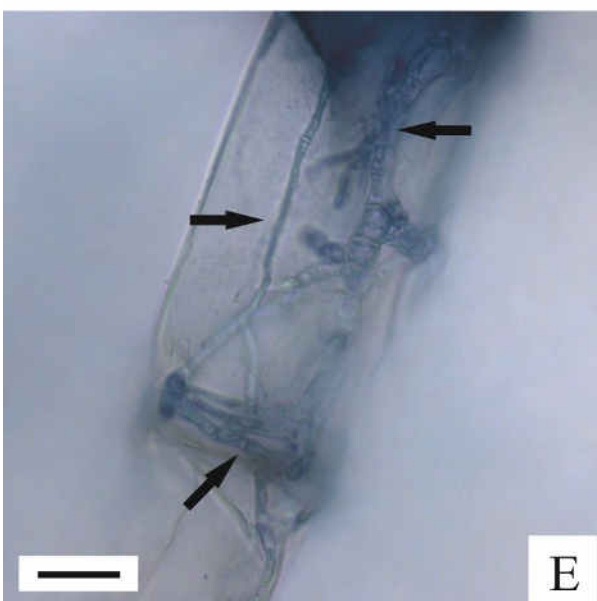
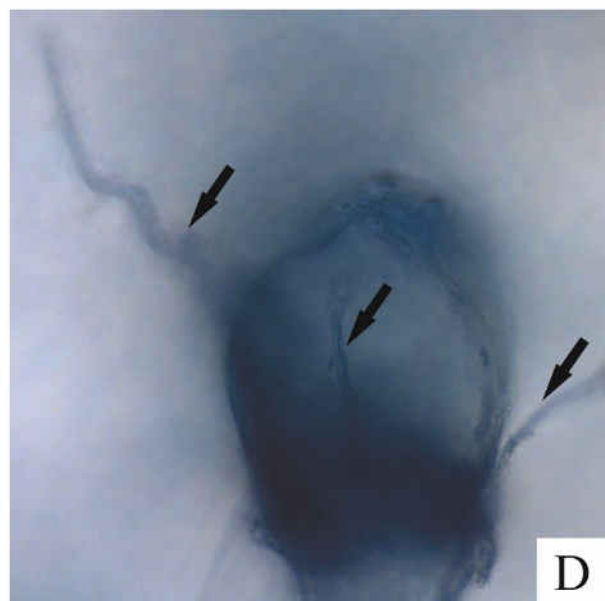
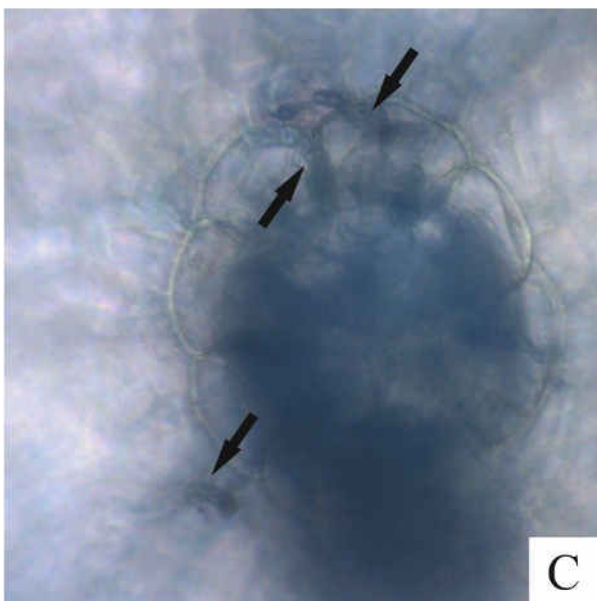
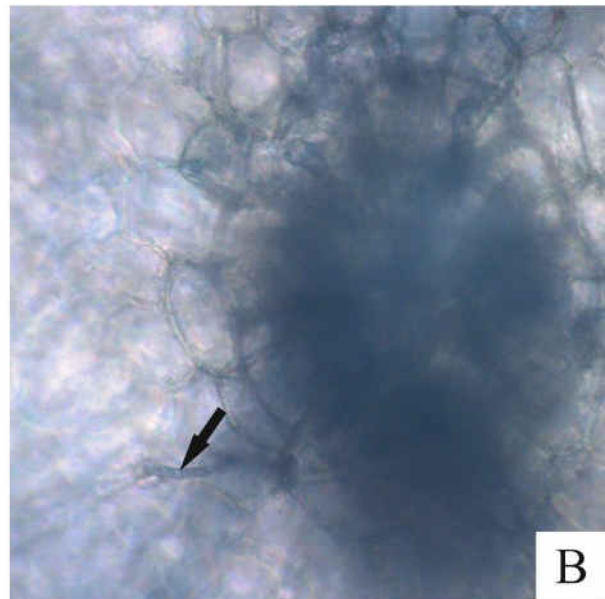
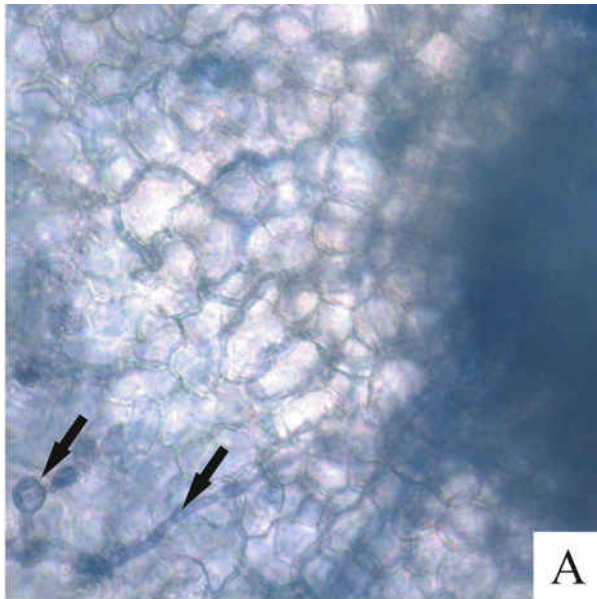
Bildtafel 26: A: Maßstab= 100µm, B: Maßstab= 100µm, B_Ausschnitt: Maßstab= 20µm



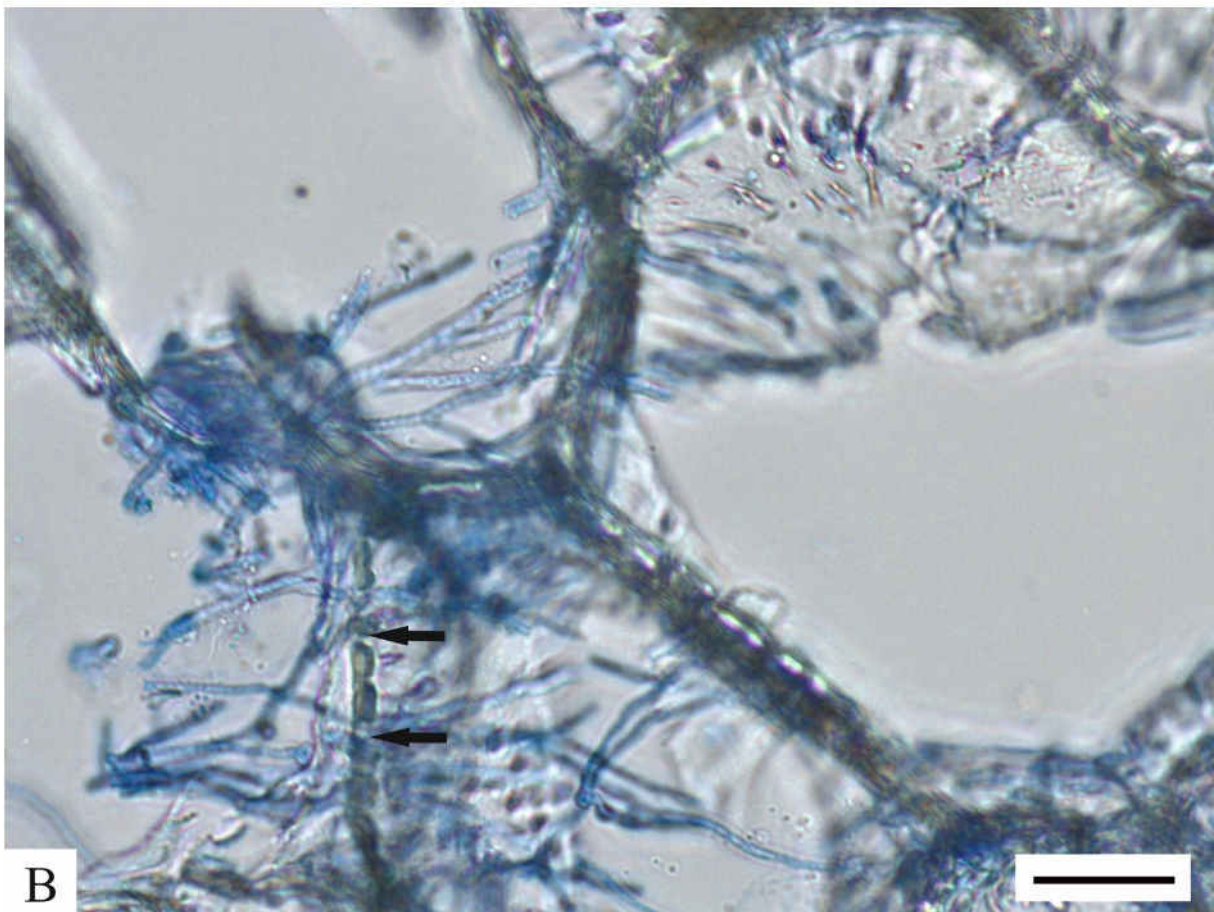
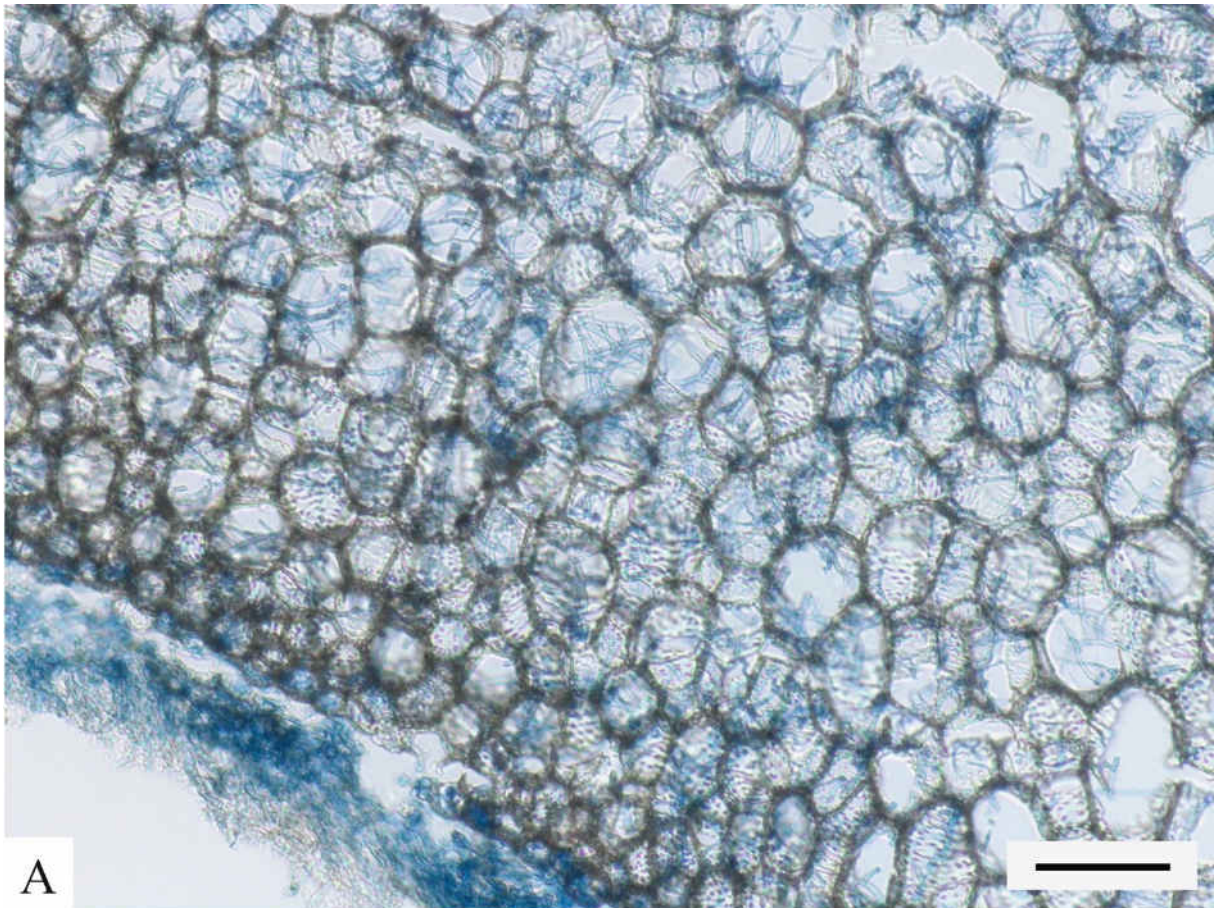
Bildtafel 27 Maßstab= 50µm



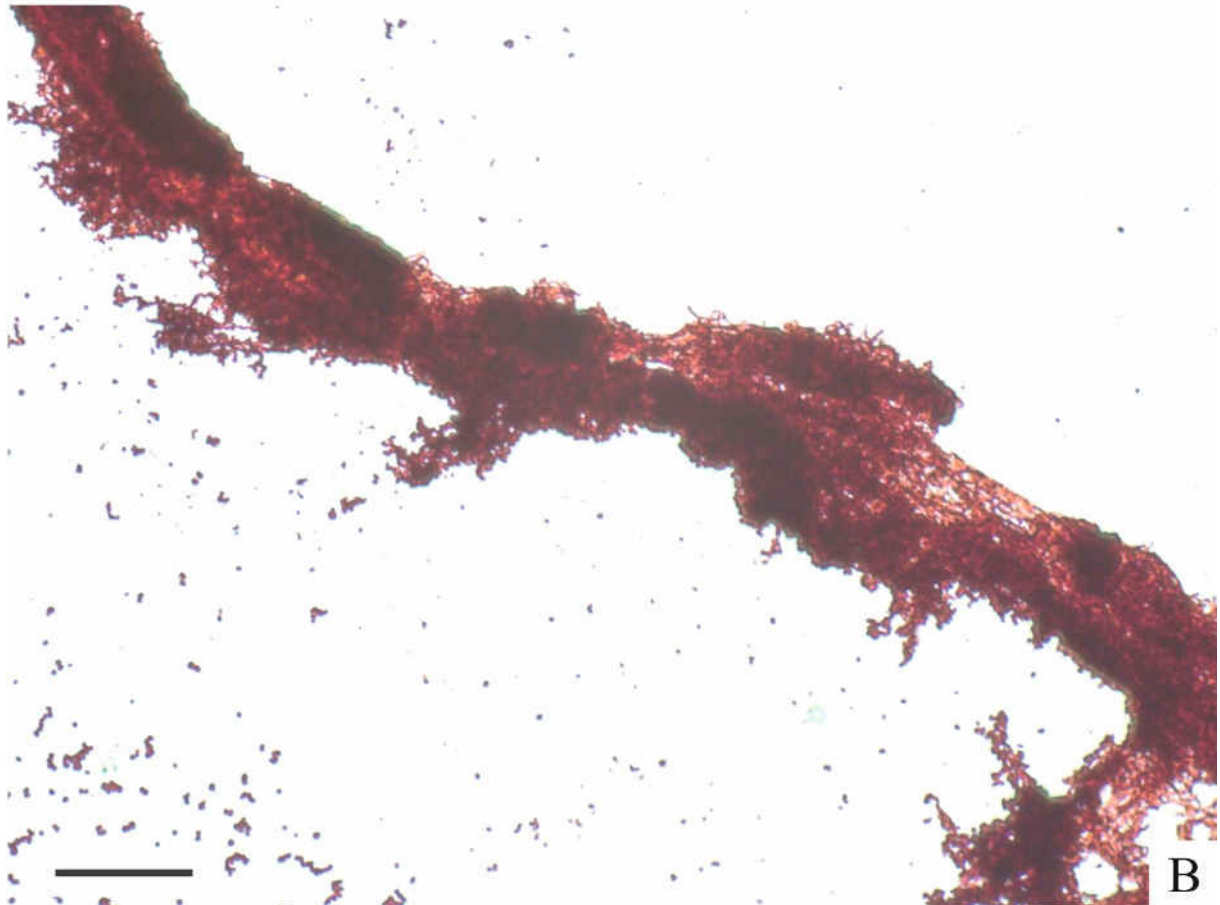
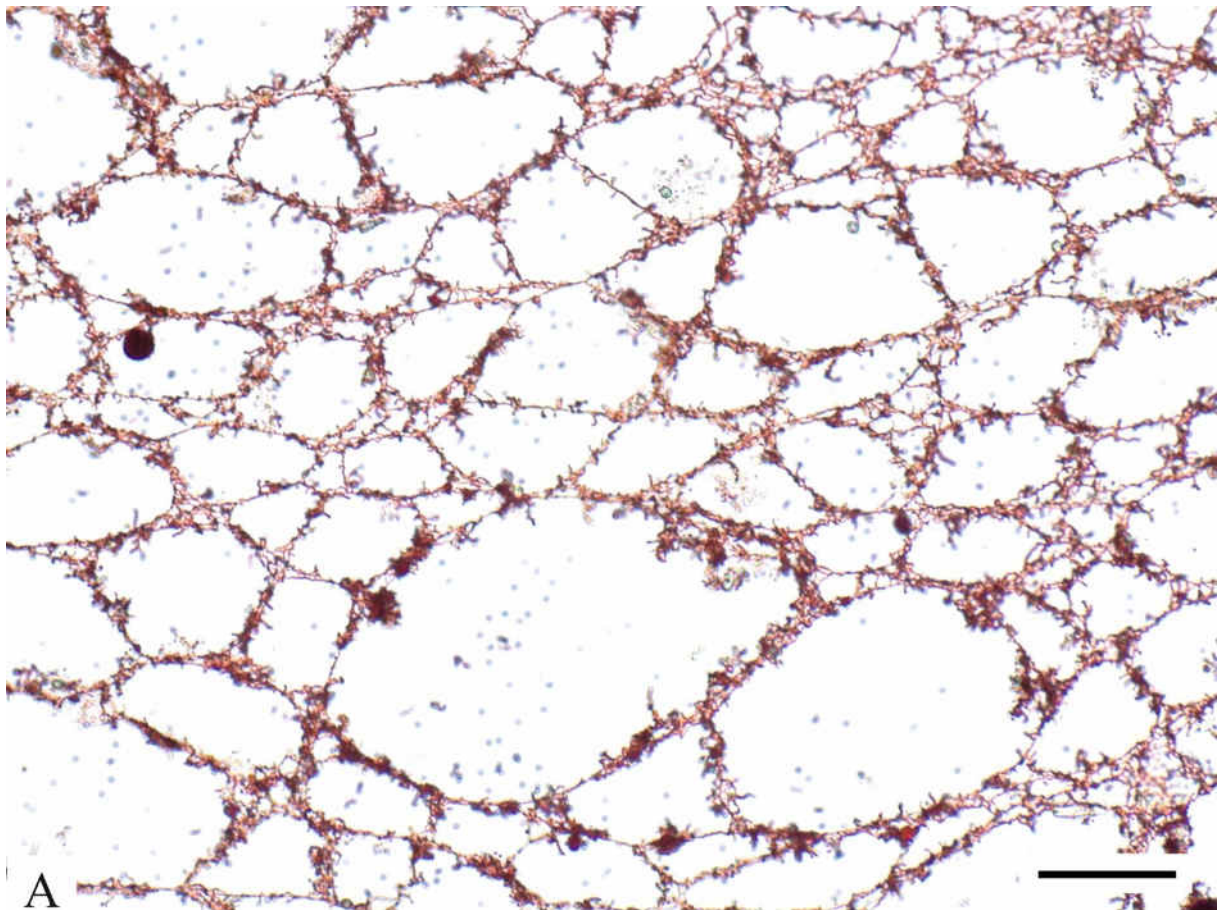
Bildtafel 28 A: Maßstab= 10µm, B: Maßstab= 20µm



Bildtafel 29 Maßstab= 20µm



Bildtafel 30 A: Maßstab= 100µm B: Maßstab= 30µm



Bildtafel 31 Maßstab= 50µm