



# Beteiligung von energieabhängigen Efflux-Transportern an der multiplen Fungizidresistenz des Grauschimmelerregers *Botrytis cinerea* in französischen und deutschen Weinanbaugebieten

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades *Doktor der Naturwissenschaften* eingereichte

# Dissertation

Vorgelegt von Dipl. Biol. Matthias Kretschmer

Kaiserslautern, März 2009

Vorsitzender der Prüfungskommission: Herr Prof. Dr. E. Neuhaus

> Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Hahn Frau Prof. Dr. R. Hakenbeck

"Die Natur liebt es, sich zu verbessern"

Heraklit um 500 v.Chr.

1	. Einleitung	1
	1.1. Allgemeine Biologie des Grauschimmelerregers Botrytis cinerea	1
	1.2. Bekämpfung von <i>B. cinerea</i> in der Landwirtschaft	3
	1.3. Arten der Fungizidresistenz	5
	1.3.1. Die Target Site Resistenz	6
	1.3.2. Resistenzen gegen einen Wirkstoff ohne Beteiligung einer Target Site Mutation	6
	1.3.3. Die Multidrug Resistenz (MDR)	7
	1.3.3.1. ABC-Transporter	7
	1.3.3.2. MFS-Transporter	9
	1.3.3.3. Regulation von MDR-Transportproteinen	10
	1.4. MDR-Phänomene bei Pflanzenpathogenen	11
	1.5. Aufgabenstellung	13
		10
2.	Material und Methoden	14
	2.1. Medien und Lösungen	14
	2.2. Allgemeine Methoden und Arbeiten	18
	2.3. Vermehrung und Ernten von Botrytis cinerea-Konidien	18
	2.4. Gewinnung genomischer Botrytis-DNA	18
	2.5. Transformationsmethode für B. cinerea	19
	2.6. B. cinerea-Infektionstest	20
	2.7. Vegetative Wachstumsanalysen	20
	2.8. Keimungsverhalten bei oxidativem Stress	21
	2.9. Konkurrenzanalyse von MDR-Stämmen im Freiland	21
	2.9.1. Konkurrenzversuch von sensitiven und MDR3-Stämmen in Weinbergen	22
	2.10. Isolierung von <i>B. cinerea</i> -Isolaten	23
	2.11. Fungizidsensitivitäts-Test	24
	2.11.1. Ermittlung der Fungizidresistenzverteilung in einer <i>Botrytis</i> -Population	24
	2.11.2. Fungizidtests zur Wiederfindung von im Freiland ausgebrachten Stämmen	25
	2.11.3. Fungizidtest zur Ermittlung des $EC_{50}$ -Wertes	26
	2.11.4. Einfluss von Transportermodulatoren auf die MDR	27
	2.12. Vorbereitungen zur Macroarray-Analyse	29
	2.13. Präparation von RNA	29
	2.13.1. Anzucht der Keimlinge - Methode 1-	29
	2.13.2. RNA-Präparation für die Macroarray-Analyse	30
	2.14. RNA-Präparation für Northern-, Realtime-PCR- und Microarray-Analysen	30
	2.15. DNase-Behandlung der Total-RNA	31
	2.16. Reverse Transkription der Total-RNA mittels oligo dT-Primern	31
	2.17. Herstellung einer $\alpha^{32}$ P-[dCTP] markierten cDNA oder DNA Sonde	32
	2.18. Spotten von PCR-Fragmenten auf eine Nylonmembran	32
	2.19. Macroarray-Hybridisierung nach Denhardts	33
	2.20. Northern- und Southern-Blot-Hybridisierung nach Church	34
	2.20.1. Southern-Blot-Hybridisierung	34
	2.20.2. Northern-Blot-Hybridisierung	34
	2.20.3. Aufbau der RNA/DNA-Transfer-Blots und anschließende Hybridisierung	34
	2.21. Realtime-PCR zur Analyse der Genexpression	35
	2.22. Microarray-Analyse	36
	2.23. Statistische Auswertung der Daten	36
	<i>o</i>	
3.	Ergebnisse	37
	3.1. Auftreten von MDR bei B. cinerea in französischen und deutschen Weinbaugebieten	37
	3.2. Einzelresistenzen der <i>Botrytis</i> -Population entlang der Deutschen Weinstraße	38

	20
3.3. EC <sub>50</sub> -Resistenzwerte der <i>B. cinerea</i> -Stämme	39
3.4. Häufigkeit der Fungizidresistenzen an den Probenahmestandorten	40
3.5. Kombination von Fungizidresistenzmechanismen	41
3.6. Genetische Diversität der MDR-Stämme	42
3. 7. Molekulare Grundlage der MDR in <i>B. cinerea</i> -Freilandisolaten	43
3.7.1. Untersuchungen zur Fungizidakkumulation	43
3.7.2. Suche nach MDR-assoziierten Effluxtransporter-Genen	44
3.8. Charakterisierung der identifizierten Efflux-Transporter	47
3.8.1. Der ABC-Transporter BcatrB als Auslöser des MDR1-Phänotyps	47
3.8.1.1. Northern- und Realtime-PCR-Expressionsanalysen von <i>bcatrB</i>	47
3.8.1.2. Induktionsmuster von <i>bcatrB</i> in sensitiven Stämmen	48
3.8.1.3. Deletion von <i>bcatrB</i> in MDR1-Stämmen	49
3.8.1.4. Suche nach Mutationen, die zur Überexpression von <i>bcatrB</i> führen	51
3.8.2. Der MFS-Transporter Bcmfs19 ist nicht der Auslöser des MDR2-Phänotyps	54
3.8.2.1. Expressions analyse des MFS-Transporters <i>bcmfs19</i>	54
3.8.2.2. Deletion und Überexpression von <i>hcmfs19</i> im Laborstamm B05.10	56
3.9 Microarray-Analyse zur Identifikation des Auslösers des MDR2-Phänotyps	57
3 10 Der MES-Transporter BemfsM2 ist für den MDR2-Phänotyn verantwortlich	57
3 10.1 Expressions analyse des MFS-Transporters <i>hemfsM</i> ?	57
3.10.2 Bedeutung des MFS-Transporters BemfsM2 für den MDR2-Phänotyn	59
3 11 Fitness der MDR-Stämme	59
3.12 Konkurrenzfähigkeit der MDR-Phänotypen im Freiland	63
3.12. Überlebensfähigkeit des MDR-Stamms während einer Winterneriode	6A
3.14 Finfluss von ABC-Transporter-Modulatoren auf die MDR	65
3.14.1 Eigentovizität der ABC Transporter Modulatoren	66
2.14.2. Eludiovonilregistenz der verwendeten Stömme	66
2.14.2. Finfluss putativer APC Transporter Modulatoron ouf die Eungizidregistenz	67
2.14.4. Unterdefieltung des MDD1. Dhängtyre guf infigierten Dlättern	60
5.14.4. Unterdruckung des MDR1-Phanotyps auf Infizierten Blattern	09
4 Dickussion	71
4. Diskussioni 4.1. Evolutionära Entstahung von Eurgizidragistanzmachanisman	71
4.1. Evolutionale Entstehung von Fungizialesistenzmechanismen	71
4.2. Fungizidresistenz dei <i>B. cinered</i> entiang der Deutschen weinstraße	12
4.3. Molekulare Grundlagen der drei MDR-Phanolypen in <i>B. cinerea</i>	70
4.3.1. BeatrB als Austoser des MDR1- und seine Beteinigung am MDR3-Phanolyp	/8
4.3.2. BemisM2 als Ausloser des MDR2- und seine Beteiligung am MDR3-Phanotyp	82
4.3.3. Modell der molekularen Grundlage der MDR bei <i>Botrytis</i>	83
4.3.4. Gefahr der Entstehung weiterer MDR-Phanotypen	84
4.4. Modulation des MDR1-Phanotyps durch putative ABC-Transporter-Inhibitoren	85
4.5. Fitnesseigenschaften der MDR-Phanotypen <i>in vitro</i>	88
4.6. Konkurrenzfahigkeit von MDR-Stammen im Freiland	91
5 Zusammanfassung	03
5. Zusanmenrassung	93
6. Literaturverzeichnis	95
6.1. Eigene Veröffentlichungen	107
6.3. Internetauellen	107
······································	/
7. Anhang	108
7.1. Abkürzungsverzeichnis	108
7.2. In dieser Arbeit verwendete Plasmide, Bakterien-, Pilzstämme und Oligonukleotide	108
7.3. Kombinierte Fungizidresistenzen entlang der Deutschen Weinstraße	123

7.4. Kladogramme der MFS-Transporter Bcmfs19, BcmfsM2	124
7.5. Erzeugung der <i>bcmfs19</i> Mutanten	125
7.6. Überexprimierte Gene in MDR2-Stämmen	127
7.7. Lebenslauf	129

# 1. Einleitung

# 1.1. Allgemeine Biologie des Grauschimmelerregers Botrytis cinerea

*Botrytis cinerea* Pers.:Fries, der Erreger der Graufäule, stellt die anamorphe Form von *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel dar. Dieses nekrotrophe Pflanzenpathogen aus der Klasse der Ascomyceten gehört mit *Sclerotinia sclerotiorum*, dem Weißschimmel, zur Familie der *Sclerotiniaceae* (van Kan, 2006). Das Wirtsspektrum von *B. cinerea* umfasst mehr als 230 Pflanzenarten, wobei vor allem seneszente und geschwächte Pflanzengewebe infiziert werden können (Jarvis, 1977; Edlich et al., 1989). Wichtige Kulturpflanzen wie Tomaten, Paprika, Gurken, Bohnen, Erdbeeren oder Weintrauben werden von *B. cinerea* befallen (Abb. 1; Coley-Smith et al., 1980; Elad und Shtienberg, 1995). *B. cinerea* verursacht bei klimatisch förderlichen Umweltbedingungen jährlich einen beträchtlichen wirtschaftlichen Schaden (Jarvis, 1977; Droby und Lichter, 2004; Pezet et al., 2004).



Abb. 1: Wirtspflanzenspektrum und Vermehrung von *B. cinerea*. A: *B. cinerea* infizierte Erdbeere; B: Sclerotien und Apothecien von *Botrytis*; C: *B. cinerea* infizierte Paprika; D: *B. cinerea* infizierte Weintraube; E: Graufäule auf einer Weinbeere; F: Keimende *Botrytis*-Konidien auf einer Weinbeere (Bild aufgenommen von Herrn H.H. Kassemeyer).

Bisher sind mehr als 20 *Botrytis*-Spezies bekannt, von denen besonders die Art *B. cinerea* aufgrund ihres großen Wirtspflanzenspektrums als polyphages Pflanzenpathogen bezeichnet werden kann (Jarvis, 1980; Beever und Weeds, 2004; Staats et al., 2005).

*B. cinerea* ist gekennzeichnet durch ein mehrkerniges somatisches Myzel (Grindel, 1979; Shirane et al., 1988), das zur Verbreitung zahlreiche Makrokonidien an Konidiophoren bildet. Die Konidien können durch Insekten (Louis et al., 1996), den Menschen oder durch Wind und Regen großflächig verbreitet werden (Jarvis, 1962; Fitt et al., 1985; Fermaud und Le Menn, 1989). Vor allem die Verbreitung der Sporen durch die Luft führt zu einer ubiquitären Ausbreitung dieses Pathogens. Neben diesen kurzlebigen Makrokonidien (Moyano und Melgarejo, 2002) kann *B. cinerea* jedoch auch Sklerotien, eine Anhäufung von Myzel zur Überdauerung ungünstiger Witterungsverhältnisse, bilden (Willetts, 1971; Willetts 1997). Diese können in der darauffolgenden Vegetationsperiode als Inokulum für eine Neuinfektion dienen (Thomas et al., 1983; Nair und Nadtotchei, 1987). Von *Botrytis* gebildete Spermatien, die so genannten Mikrokonidien, können mit Zellen des Sklerotiums verschmelzen und nach der Entstehung eines Apotheciums Ascosporen freisetzen (Abb. 1B, Abb. 2; Lorenz und Eichorn, 1983; Fukumori et al., 2004). Dieses sexuelle Stadium wird als *B. fuckeliana* bezeichnet. In freier Natur wird es nur selten beobachtet (Lorbeer, 1980).



Abb. 2: Lebens- und Infektionszyklus von B. cinerea (Agrios, 2005).

Für eine erfolgreiche Infektion einer Pflanze oder eines Pflanzenteils, z.B. der Blüte, der Blätter oder der Frucht, müssen sich Sporen von *B. cinerea* zuerst auf der Wirtsoberfläche anheften (Verhoeff, 1980). Dies geschieht zunächst über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Cuticula und nach Keimung der Spore durch die Sekretion eines Adhäsions-Kissen (Doss, et al., 1993; Doss et al., 1995). Wichtig für die Keimung der Sporen sind eine hohe relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 90% (Blakeman, 1980), eine harte Oberfläche, das Vorhandensein von Nährstoffen und die Hydrophobizität der Oberfläche (Doehlemann et al., 2006). Verwundungen, ausgelöst durch Insektenfraß oder Hagel, aber auch natürliche

Öffnungen, stellen für *B. cinerea* eine leichte Eintrittspforte in das Pflanzengewebe dar (Prins et al., 2000). Allerdings kann B. cinerea auch aktiv durch appressorienähnliche Strukturen (Holz et al., 2004) oder über Infektionskissen (Kunz et al., 2006) in unverwundete Wirtszellen eindringen. Wahrscheinlich ist die Sekretion verschiedener zellwandabbauender Enzyme (CDWE, cellwall degrading enzymes) mitverantwortlich für die Penetration der Wirtsoberfläche (Salinas und Verhoeff, 1995). Für einzelne Cutinasen oder Lipasen konnte bisher keine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Penetration nachgewiesen werden (Comménil et al., 1999; Kars und van Kan, 2004; Reis et al., 2005). Nach dem Eindringen in die Wirtspflanze verfällt Botrytis oft in eine Ruhephase, die Latenz, bei der die pflanzliche Abwehr das pilzliche Wachstum zeitweise unterdrückt (Pezet et al., 2003; Pezet et al., 2004). Mit beginnender Seneszenz der Pflanze verringert sich z.B. die Phytoalexinkonzentration (Goetz et al., 1999; Keller et al., 2003), wodurch die Latenz überwunden wird. Anschließend tötet Botrytis die Pflanzenzelle durch die Freisetzung von Toxinen, z.B. dem Sesquiterpen Botrydial (Sievers et al., 2005), durch die Sekretion von Oxalsäure (van Kan, 2006) oder mit Hilfe von ROS (Rolke et al., 2004) ab und ernährt sich anschließend von den freigesetzten Nährstoffen. Danach beginnt die Expansionsphase in das umgebende Gewebe. Dies wird durch die Sekretion zellwandabbauender Enzyme, die zu einer Mazeration des Gewebes führen, ausgelöst (Kars und van Kan, 2004). Für die Endopolygalakturonase Bcpg1 konnte eine Beteiligung an der Mazeration nachgewiesen werden (Ten Have et al., 1998). Neben dieser stellt auch die Xylanase Xyn11A ein Virulenzenfaktor von B. cinerea dar (Brito et al., 2006). Anschließend bilden sich an der Pflanzenoberfläche Konidiophoren und es beginnt die asexuelle Reproduktion. Mit der Erzeugung neuer Konidien und deren Verbreitung schließt sich der Infektionszyklus von B. cinerea (Abb. 2).

#### 1.2. Bekämpfung von B. cinerea in der Landwirtschaft

*B. cinerea* verursacht bei einer Vielzahl von landwirtschaftlichen Erzeugnissen einen beträchtlichen Schaden. Im Weinbau werden jährliche Verluste von zwei Milliarden US-Dollar angenommen (Vivier und Pretorius, 2002). Deshalb werden gegen *B. cinerea* verschiedene Maßnahmen durchgeführt, um die Befallshäufigkeit und -stärke unter der Schadensschwelle zu halten. Unter kulturtechnische, Infektionsdruck-vermindernde Aspekte fallen die Reduktion von Blattflächen und das Teilen von Blütenständen, um ein schnelleres Abtrocknen der Pflanzenteile zu gewährleisten. Dies verringert durch kürzere Phasen mit hoher relativer Luftfeuchtigkeit die Keimungs- und Infektionsfähigkeit von *B. cinerea* (English et al., 1989; Vail und Marois, 1991).

Verschiedene Antagonisten, z.B. *Trichoderma harzianum* oder *Ulocladium atrum* wurden zur Kontrolle von *B. cinerea* eingesetzt (Shtienberg und Elad, 1997; Kohl et al., 1995; Leibinger et al., 1997). Bakterien, z.B. *Cupriavidus campinensis*, die das von *B. cinerea* als Virulenzfaktor sekretierte Oxalat abbauen können, wurden ebenfalls als Antagonisten identifiziert (Schoonbeek et al., 2007). Auch die Pflanzenzüchtung liefert immer wieder neue Sorten, die resistent gegen *B. cinerea* sind. Die Weinsorte Gamaret (Goetz et al., 1999) oder Kreuzungen von wilden Tomatenarten mit kommerziellen Tomatensorten (Finkers et al., 2008) zeigen beispielsweise quantitative Resistenzen gegen *Botrytis*. Allerdings sind Resistenzen gegen *Botrytis* relativ selten, sodass die am häufigsten verwendete Methode zur Kontrolle von *Botrytis* der Einsatz von Fungiziden ist. Pro Jahr werden im Weinbau bis zu 20 Pestizidbehandlungen (Leroux, 2004).



**Abb. 3: Chemische Struktur verschiedener Botrytizide.** Angriffspunkte sind die Osmoregulation, die Aminosäurebiosynthese, die pilzliche Respiration, die Ergosterolbiosynthese und die Cytoskelettformation. A: Phenylpyrrol, Fludioxonil; B: Anilinopyrimidin, Cyprodinil; C: Carboxamid, Boscalid; D: Hydroxyanilid, Fenhexamid; E: N-Phenyl-Carbamat, Diethofencarb.

Fungizide lassen sich je nach ihrer Wirkungsweise in verschiedene Wirkstoffgruppen einteilen. Es gibt in Pilzen neun wichtige Angriffspunkte (Targets) für Fungizide. Diese Angriffspunkte sind die DNA/RNA-, die Zellwand-, die Plasmamembran- oder die Melaninbiosynthese. Bei *B. cinerea* gehören die in der Landwirtschaft und im Weinbau eingesetzten Wirkstoffe jedoch zu Fungiziden, die entweder die Zellteilung, die pilzliche Respiration, die Signaltransduktion der Osmoregulation, die Ergosterolbiosynthese oder die Aminosäurebiosynthese beeinträchtigen (Leroux, 2002a; Leroux, 2004).

Die Zellteilung bzw. die Formation des Cytoskeletts wird durch die in den sechziger Jahren eingeführten Fungizide der Gruppe der MBC (Methyl-Benzimidazol-Carbamate), Benomyl oder Carbendazim, und der N-Phenyl-Carbamate, Diethofencarb (Abb. 3E), beeinträchtigt.

Beide Stoffklassen binden an die ß-Tubulin-Untereinheit des pilzlichen Cytoskeletts und stören so dessen Formation (Davidse, 1986; Davidse und Ishii, 1995).

Zur Stoffgruppe, die die pilzliche Respiration hemmen, zählen die Carboxamide, z.B. Boscalid (Abb. 3C; Stammler und Speakman, 2006; Avenot et al., 2008) oder die QoI-Fungizide (Quinone outside inhibitor) der Strobilurine (Sauter et al., 1999; Kim et al., 2003; Sierotzki et al., 2007). Boscalid inhibiert die Succinat-Dehydrogenase in Komplex II (Matsson und Hederstedt, 2001; Horsefield et al., 2006) und die Strobilurine den Cytochrombc1-Komplex bzw. die Ubiquinon-Oxidase in Komplex III (Sauter et al., 1999; Ziegler et al., 2003; Kim et al., 2003; Sierotzki et al., 2007) der pilzlichen mitochondrialen Atmungskette.

Eine dritte Gruppe von Fungiziden beeinträchtigt die mit der Osmoregulation assoziierte Signaltransduktion. Beispiele sind die Phenylpyrrole, z.B. Fludioxonil (Abb. 3A) oder die Dicarboximide, z.B. Iprodion. Die Dicarboximide scheinen durch eine Interaktion mit der Histidin-Kinase BcOS1 die Signaltransduktion zu stimulieren (Oshima et al., 2002; Cui et al., 2004; Liu et al., 2008). Dadurch wird die Fähigkeit des Pathogens sich an osmotische Umweltveränderungen während der Keimung und der Pathogenese anzupassen stark beeinträchtigt. Auch die Phenylpyrrole scheinen diesen Signalweg zu beeinflussen. Jedoch werden neben dem HOG1- zusätzlich der Calcineurin- und der Mpk1-Signalweg beeinträchtigt (Kojima et al., 2006). Fludioxonil-resistente *Penicillium digitatum*-Stämme zeigen eine Glycerinakkumulation und dadurch eine Osmosensitivität (Kanetis et al., 2008).

Die Fungizidklasse der Anilinopyrimidine, Cyprodinil (Abb. 3B), Pyrimethanil oder Mepanipyrim, beeinflussen die Methioninbiosynthese und dadurch die Aminosäureversorgung des Pathogens. Die genaue Wirkungsweise dieser Fungizide ist nicht bekannt (Fritz et al., 1997).

Zu den Fungiziden, die die Ergosterolbiosynthese unterbinden, gehören sowohl die DMIs (Demethylierungs-Inhibitoren), z.B. Tebuconazol oder Prochloraz, als auch das Hydroxyanilid Fenhexamid (Abb. 3D). Fenhexamid inhibiert die C4-Demethylierung durch die 3-Keto-Reduktase Erg27 (Rosslenbroich und Stuebler, 2000; Leroux et al., 2002b; Fillinger et al., 2008). Die DMIs interagieren mit der Cyp51-Monooxigenase bei der C14-Demethylierung (Kwok und Loeffler, 1993; Albertini et al., 2002).

#### 1.3. Arten der Fungizidresistenz

Gegen fast alle oben aufgeführten Fungizide, mit Ausnahme von Fludioxonil, sind resistente *B. cinerea* Feld- oder Gewächshausisolate beschrieben worden (Baudoin, 1994; Stehmann und de Waard, 1996; Leroux, 2002c; Leroux 2004, Myresiotis et al., 2007; Baroffio et al.,

2003). Fungizidresistenzen gegen eine Wirkstoffgruppe (Einzelresistenz) können entweder durch eine Target Site Mutation, eine Überexpression von Proteinen, die die toxischen Substanzen metabolisieren oder durch Plasmamembranveränderungen hervorgerufen werden. Eine durch verstärkten Export ausgelöste Resistenz gegen verschiedene Substanzen wird als Multidrug Resistenz (MDR) bezeichnet.

#### 1.3.1. Die Target Site Resistenz

Durch eine Punktmutation im Gen, die zu einem Aminosäureaustausch im Targetprotein des Fungizids führt, wird der Wirkort des Fungizids verändert. Hierdurch geht der Angriffspunkt des Wirkstoffs verloren. Diese Mutationen führen oft zu Nachteilen, da die Funktion des Proteins beeinträchtigt werden kann (Raposo et al., 2000; Ziogas et al., 2005; Markoglou et al., 2006). Einzelresistenzen gegen einen Wirkstoff resultieren in einer hohen Insensitivität dieser Stämme (Leroux, 2004). Da *B. cinerea* eine hohe genetische Diversität und eine hohe Reproduktionsrate zeigt (Giraud et al. 1997; Moyano et al., 2003; Kretschmer und Hahn, 2008; Karchani-Balma et al., 2008; Váczy et al., 2008), treten Target Site resistente Stämme häufig auf.

Gegen das Ende der sechziger Jahre eingeführte Fungizid Carbendazim entwickelte *B. cinerea* im Freiland und im Gewächshaus innerhalb weniger Vegetationsperioden eine Resistenz durch einen Basenaustausch im Codon 198 bzw. 200 des ß-Tubulingens (Leroux and Clerjeau, 1985; Park et al., 1997). Dies führt zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Alanin bzw. Phenylalanin zu Tyrosin, wodurch das Fungizid nicht mehr mit dem ß-Tubulin interagieren kann (Koenraadt und Jones, 1993; Yarden und Katan, 1993; Leroux et al., 1999). Dies führt zu einer 500-1000fach höheren Resistenz gegenüber Carbendazim im Vergleich zu sensitiven Stämmen (Leroux et al., 1999).

Auch gegen Fenhexamid oder gegen das 2004 eingeführte Fungizid Boscalid sind schon resistente Stämme aufgetreten, die eindeutig mit einer Punktmutation im Target Site Gen korreliert sind (Fillinger et al., 2008; Stammler, persönliche Mitteilung).

#### 1.3.2. Resistenzen gegen einen Wirkstoff ohne Beteiligung einer Target Site Mutation

Durch eine Überexpression von Cytochrom-P450-Monooxigenasen können Fungizide metabolisiert und dadurch inaktiviert werden. Die Fenhexamidresistenzphänotypen HydR1 und HydR2 sind durch eine Metabolisierung des Wirkstoffs durch eine Cytochrom-P450-Monooxigenase entstanden (Leroux et al., 2002b; Leroux et al., 2002a). Auch für die

Azolfungizidresistenz von *Monilinia fruticola* ist eine Überexpression einer Cytochrom-P450-Monooxigenase verantwortlich. Ausgelöst wird diese durch eine Promotorveränderung, wobei durch Insertion des 65bp großen repetetiven Elements ,Mona' neue Promotortranskriptionsfaktorbindestellen entstanden (Luo et al., 2008). Auch eine verringerte Aufnahme von Azolfungiziden durch Veränderung der Plasmamembranpermeabilität wurde bei *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Mago und Khuller, 1989; Mukhopadhyay et al., 2002).

#### 1.3.3. Die Multidrug Resistenz (MDR)

Neben den oben beschriebenen Einzelresistenzen stellt die MDR einen weiteren Resistenzmechanismus dar. Dieser wirkt sich auf viele Wirkstoffe, die sich in ihrer chemischen Struktur und Spezifität unterscheiden, aus (Ghannoumi und Rice, 1999). Die MDR ist bei Krebszellen (Cole et al., 1992; Gottesman et al., 2002) und humanpathogenen Mikroorganismen wie *Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans* oder *Cryptococcus neoformans* weit verbreitet. Sie führt bei immungeschwächten Patienten zur ineffektiven Bekämpfung der Pathogene (Alexander und Perfect, 1997; Kontoyiannis und Lewis, 2002). An diesem speziellen Fungizidresistenzmechanismus sind Membranproteine aus den Klassen der ABC- (ATP binding cassette) und MFS-Transporter (Major facilitator superfamily) beteiligt (Cole et al., 1992; Sanglard et al., 1995; Sanglard et al., 1997; Gottesman et al., 2002; Skatrud, 2002).

#### 1.3.3.1. ABC-Transporter

ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Exportern (Andre, 1995). Sie nutzen die aus der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie zur Energetisierung des Transports (Del Sorbo et al., 1997; Del Sorbo et al., 2000; Lage, 2003). ABC-Transporter sind in allen Organismen weit verbreitet (Higgins, 1992; Paulsen, 2003). Nur wenige dieser Transportproteine sind für die Aufnahme von Substanzen, z.B. von Eisen (Krewulak und Vogel, 2008), verantwortlich. Die Mehrzahl dieser Proteine exportiert toxische Substanzen (Saier, 2000; Stergiopoulos et al., 2002). Sie zeigen meistens eine geringe Substratspezifität und sind in der Lage Alkaloide, Terpenoide, schwermetallhaltige Chelate, aber auch Fungizide, Anti-Tumor-Medikamente und andere therapeutische Wirkstoffe zu transportieren (Del Sorbo et al., 2000; Stergiopoulos et al., 2002; De Waard et al., 2006). Die ABC-Transporter sind in der Plasmamembran oder in

der Membran anderer intrazellulärer Kompartimente lokalisiert und entsorgen dort toxische Substanzen (Theodoulou, 2000).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur von ABC- (A) und MFS-Transportern (B).** Modifiziert nach Sa-Correia et al. (2009).

Funktionelle Domänen der ABC-Transporter sind zwischen allen Reichen hoch konserviert. Auf der cytoplasmatischen Seite besitzen sie zwei Nukleotidbindedomänen (NBF), die durch die Walker A und B Motive charakterisiert werden. Das Walker A Motiv ist Glycin-reich und hat die Struktur G-(X)4-G-K-(T)-(X)6-I/V, während Walker B eine hydrophobe Struktur R/K-(X)3-G-(X)3-L-(hydrophob)4-D aufweist (Walker et al., 1982). Des Weiteren weisen ABC-Transporter eine dritte auffällige Sequenz, die ABC-Signatur L-S-G-G-(X)3-R-hydrophob-Xhydrophob-A der ABC-Domäne auf (Walker et al., 1982; Hyde et al., 1990; Croop et al., 1993). Verankert werden die Transportproteine in der Membran durch je zwei hydrophobe Bereiche mit sechs bis sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices. Für ihre Funktionalität sind immer zwei Transmembrandomänen und zwei NBFs erforderlich (Abb. 4A), wobei zwei Konformationen, [TMD6-NBD]<sub>2</sub> und [NBD-TMD6]<sub>2</sub>, auftreten (Ambudkar et al., 1992).

Als erster pilzlicher an der MDR-beteiligter ABC-Transporter wurde Pdr5 aus *S. cerevisiae* beschrieben (Balzi et al., 1994; Kolaczkowski et al., 1996). Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* konnten weitere 28 putative ABC-Transporter-Gene identifiziert werden (Taglicht and Michaelis, 1998; Bauer et al., 1999), unter anderem die an der MDR beteiligten Transporter Snq2, Ycf1 und Yor1 (Balzi et al., 1994; Jungwirth et al., 2000; Rogers et al., 2001). Pdr5 führt zu einer Resistenz gegen DMI-Fungizide, Strobilurine, Herbizide, Antibiotika und Antikrebs-Wirkstoffe (Kolaczkowski et al., 1998). Die Pdr5 Homologe Cdr1 und Cdr2 aus *C. albicans* sind ebenfalls für eine Resistenz gegen DMI-Fungizide verantwortlich (Prasad et al., 1995; Sanglard et al., 1995; Sanglard et al., 1997).

In etlichen pflanzenpathogenen filamentösen Pilzen, wie zum Beispiel *Magnaporthe grisea* (Urban et al., 1999; Gupta und Chattoo, 2008), *Mycosphaerella graminicola* (Zwiers und de Waard, 2000) und *Penicillium digitatum* (Nakaune et al., 1998) konnte nachgewiesen werden, dass ABC-Transporter bei sensitiven Stämmen zur basalen Fungizidresistenz und zur Pathogenese der Organismen beitragen.

In *B. cinerea* wurden bisher 46 ABC-Transporter identifiziert (Yoder und Turgeon, 2001; eigene Arbeiten), von denen 14 auf eine Induktion der Genexpression nach Fungizidbehandlung hin untersucht wurden (Vermeulen et al., 2001; Stergiopoulos et al., 2002; Schoonbeek et al., 2003). Am besten untersucht sind die Transporter BcatrB, BcatrD und Bmr1. Die Expression des ABC-Transporters *bcatrB* kann in sensitiven Stämmen durch das Phenylpyrrol Fludioxonil und andere Fungizide induziert werden (Schoonbeek et al., 2001; Vermeulen et al., 2001). *BcatrB*-Deletionsmutanten reagieren in Fungizidtests sensitiver auf Fludioxonil, Cyprodinil, DMIs und die Pflanzenabwehrstoffe Resveratrol oder Eugenol. Dieser Transporter stellt also einen klassischen MDR-Transporter mit einem weiten Substratspektrum dar (Schoonbeek et al., 2001; Vermeulen et al., 2001; Dieser Transporter ist *bcatrD*, dessen Expression durch DMIs, Dicarboximide, Anilinopyrimidine und das Antibiotikum Cycloheximid induziert wird. Mutanten von *bcatrD* zeigen in Fungizidtests jedoch, dass BcatrD nur ein Substratspektrum von Azolfungiziden der DMI-Klasse, z.B. Tebuconazol, Prochloraz oder Oxpoconazol, transportier (Hayashi et al., 2001, Hayashi et al., 2002a).

Die Expression von *bmr1*, auch *bcatrK* genannt, wird ebenfalls durch Fludioxonil- und DMI-Fungizid-Behandlung induziert. In Fungizidtests wird jedoch nur eine erhöhte Sensitivität der Mutanten gegenüber Polyoxin und Iprobenfos festgestellt (Nakajima et al., 2001).

#### 1.3.3.2. MFS-Transporter

Die MFS-Transporter nutzen nicht direkt das primäre Energieäquivalent ATP als Energiequelle. Sie werden durch einen elektrochemischen Gradienten, z.B. die "protone motive force" (pmf), energetisiert (Sa-Correia et al., 2009). Wie die ABC-Transporter kommen auch die MFS-Transporter in allen Organismen vor (Busch and Saier, 2002). Sie bilden die größte Transporterfamilie. Etwa 25% aller eukaryotischen Membrantransportproteine gehören zu dieser Gruppe (Saier et al., 1999). Sie können Ionen, Zucker, Fungizide, Nukleoside, Aminosäuren und Peptide transportieren (Lewis, 1994; Law et al., 2008). MFS-Transporter bestehen aus 400-800 Aminosäuren und besitzen kaum konservierte Domänen. In der Regel bestehen sie aus zwölf oder 14 transmembranspannenden  $\alpha$ -Helices (Abb. 4B) und im cytoplasmatischen Teil des Proteins zwischen TMH2 (Transmembran-Helix) und TMH3 oder TMH8 und TMH9 ist in MDR-MFS-Transportern ein DRXXRR Motiv lokalisiert (Law et al., 2008).

Die am besten untersuchten MDR-MFS-Transporter in *S. cerevisiae* sind Aqr1, Tpo1, Flr1 und Atr1 (Kanazawa et al., 1988; Tenreiro et al., 2002; Albertsen et al., 2003; Teixeira et al., 2008; Sa-Correia et al., 2009).

In filamentösen Pilzen werden durch MFS-Transporter eine Vielzahl natürlicher, aber auch synthetischer Stoffe gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Cytosol exportiert (Del Sorbo et al., 2000; Stergiopoulos et al., 2002; Roohparvar et al., 2007b). In Cercospora kikuchii ist der Transporter Cfp für den Cercosporinexport verantwortlich (Callahan et al., 1999). In Acremonium chrysogenum erhöht das CefT-Transportprotein die Cephalosporin-C-Produktion (Ullan et al., 2002; Nijland et al., 2008). Einer der ersten in einem pflanzenpathogenen Pilz untersuchte MDR-MFS-Transporter ist Bcmfs1 von B. cinerea (Stergiopoulos et al., 2002; Hayashi et al., 2002b). Anilinopyrimidine und DMI-Fungizide steigern die Expression von bcmfs1. In Fungizidtests zeigen Deletionsmutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Camptothecin und Cercosporin. Die Fungizidempfindlichkeit gegenüber DMIs, Anilinopyrimidinen, Dicarboximiden und Fenhexamid wird jedoch nur bei einer Überexpression von *bcmfs1* beeinflusst (Hayashi et al., 2002b).

#### **1.3.3.3. Regulation von MDR-Transportproteinen**

Für das Verständnis der Entstehung von MDR-Phänomenen ist neben der Identifizierung der verantwortlichen Transportproteine auch die Regulation der Expression dieser Gene besonders interessant.

Der Modellorganismus *S. cerevisiae* besitzt ein sehr komplexes MDR-Netzwerk bestehend aus Transkriptionsregulatoren, ABC- und MFS-Transportern (Kanazawa et al., 1988; Balzi et al., 1994; Kolaczkowski et al., 1996; Piper et al., 1998; Jungwirth et al., 2000; Rogers et al., 2001; Tenreiro et al., 2002; Albertsen et al., 2003; Teixeira et al., 2008; Sa-Correia et al., 2009). Zurzeit sind mehr als 70 an der MDR beteiligte Gene bekannt, von denen zehn für einen Transkriptionsfaktor kodieren (Moye-Rowley, 2003; Sa-Correia et al., 2009). Pdr1 ist unter diesen der Wichtigste, gefolgt von seinem funktionellen Homolog Pdr3 (Delaveau *et al.*, 1994). Durch diese Transkriptionsfaktoren werden die ABC-Transportergene *pdr5*, *snq2* und *yor1*, aber auch die MFS-Transportergene *tpo1* und *flr1* reguliert (DeRisi et al., 2000; Sa-Correia et al., 2009). Pdr1 und Pdr3 gehören zur Gal4-Transkriptionsfaktor-Gruppe und üben die Kontrolle der Genexpression durch eine Interaktion mit einem cis-acting Element PDRE

10

(pleiotropic drug response element) aus (Delahodde *et al.*, 1995; Katzmann *et al.*, 1996). Pdr1 scheint direkt als Sensor für toxische Substanzen zu dienen, da die Wirkstoffe direkt mit Pdr1 interagieren und dadurch die Expression der MDR-Transporter induziert wird (Thakur et al., 2008).

Ähnlich wie *S. cerevisiae* zeigt *C. albicans* in azolresistenten MDR-Stämmen eine Überexpression der Pdr5 Homologen ABC-Transporter Cdr1 und Cdr2. Jedoch wurde auch eine Überexpression des MFS-Transporters CaMDR1 mit einer Azolresistenz korreliert (Fling et al., 1991; Sanglard et al., 1995; Sanglard et al., 1997; White et al., 1998; Sanglard und Odds, 2002). Für die Regulation von *cdr1* und *cdr2* wurde ein DRE (drug responsive element) identifiziert (De Micheli et al., 2002), das mit dem Transkriptionsaktivator Tac1 interagiert (Coste et al., 2004). In azolresistenten *Candida*-Isolaten sind verschiedene Mutationen in Tac1 für die Überexpression von *cdr1* und *cdr2* verantwortlich (Coste et al., 2006).

Die konstitutive Überexpression von CaMDR1 in klinischen Isolaten ist ebenfalls ausreichend für eine Azolresistenz (Fling et al., 1991; Wirsching et al., 2000; Hiller et al., 2006a). Durch Promotordeletionsanalysen konnten mehrere Bindestellen für cis-acting Transkriptions-faktoren identifiziert werden (Hiller et al., 2006b; Rogon et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor Mrr1 (multidrug resistance regulator) interagiert mit diesen Bindestellen. Mutationen in diesem Transkriptionsfaktor sind für die Überexpression von *caMDR1* und den MDR-Phänotyp verantwortlich (Morschhäuser et al., 2007).

# 1.4. MDR-Phänomene bei Pflanzenpathogenen

Bisher gibt es für das Vorkommen von MDR-Phänotypen bei pflanzenpathogenen Mikroorganismen in der Landwirtschaft nur sehr wenige Anhaltspunkte. Nur Nakaune et al. (1998) beschrieb bisher in *Penicillium digitatum* eine Überexpression des Pdr5 homologen ABC-Transporters *pmr1* als Auslöser einer DMI-Resistenz in Freilandisolaten. Reimann und Deising (2005) zeigten bei *Pyrenophora tritici-repentis* durch den Einsatz von ABC-Transportermodulatoren indirekt den Einfluss der ABC-Transporter auf die Fungizidresistenz. MDR-Phänomene bei Freilandisolaten eines wichtigen landwirtschaftlichen Pflanzenpathogens wurden phänotypisch bisher nur bei *B. cinerea* beobachtet. Leroux et al. (1999) beschrieb in Frankreich AniR2(MDR1)- und AniR3(MDR2)-Stämme aus Weinanbaugebieten, die eine leichte bis mittlere Resistenz gegen verschiedene Fungizide und andere Substanzen aufwiesen. MDR1-Stämme zeigten eine erhöhte Toleranz gegenüber den Wirkstoffen Fludioxonil, Cyprodinil und Tolnaftat, wohingegen MDR2-Stämme resistenter gegenüber Fenhexamid, Tolnaftat, Iprodion und Cyprodinil waren.



**Abb. 5: Verstärktes Auftreten dreier** *Botrytis*-**MDR-Phänotypen in der Champagne.** Häufigkeit von MDR1- (····), MDR2- (---) und MDR3-Stämmen (-·-) an der Gesamtrate der MDR (---) in der Champagne (Leroux et al., nicht veröffentlicht).

Diese Stämme sind seit deren Entdeckung in der Champagne Anfang der neunziger Jahre mit ständig steigenden Häufigkeiten identifiziert worden (Abb. 5). Später wurde ein dritter MDR-Phänotyp beobachtet. Diese MDR3-Stämme zeigten die vereinigten Fungizidresistenzspektren der MDR1- und MDR2-Stämme, weswegen postuliert wurde, dass diese Stämme ein Resultat einer natürlichen Kreuzung aus MDR1- und MDR2-Stämmen darstellen. Durch eine Kreuzung eines MDR1- mit einem MDR2-Stamm konnte bewiesen werden, dass diese Hypothese zutrifft (Chapeland-Leclerc, 2000). Die Nachkommen dieser Kreuzung (F1) setzten sich aus 23 sensitiven, 29 MDR1-, 17 MDR2- und 25 MDR3-Stämmen zusammen. Diese nahezu 1:1:1:1 Segregation zeigt neben der Möglichkeit, durch Kreuzung MDR3-Stämme zu erzeugen, dass für die beiden MDR1- und MDR2-Phänotypen nur zwei unabhängig segregierte und co-dominante Genloci verantwortlich sind. In den letzten Jahren erreichten die MDR-Phänotypen in der Champagne eine Häufigkeit von über 50% an der Gesamtpopulation und stellen deshalb eine große Gefahr für die künftige Effektivität der Fungizidbehandlungen dar (Abb. 5). Bisher wurden MDR-Phänotypen außerhalb Frankreichs nur in Freiburg i. Br. identifiziert (Kretschmer und Hahn, 2008). Hier traten jedoch nur MDR1-Phänotypen mit ca. 1% an der Gesamtpopulation auf.

# 1.5. Aufgabenstellung

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Auftreten von MDR-Phänomenen bei *B. cinerea* entlang der Deutschen Weinstraße. In den Jahren 2006 bis 2008 wurde ein Fungizidresistenz-Monitoring durchgeführt. Hierdurch sollte das Vorkommen und die Verbreitung von MDR-Phänotypen entlang der deutschen Weinstraße ermittelt werden. Isolate mit MDR-Phänotypen sollten aufgrund ihrer Fungizidresistenzspektren mit den bekannten französischen MDR-Isolaten verglichen werden.

Der zentrale Aspekt dieser Arbeit stellt die Aufklärung der molekularen Grundlage der MDR bei *Botrytis* dar. Durch Macro- und Microarrayuntersuchungen sollten in MDR-Stämmen überexprimierte Efflux-Transporter-Gene identifiziert werden. Durch Deletionsanalysen dieser Transportergene sollte ein funktioneller Zusammenhang zwischen Überexpression der Transportergene und MDR hergestellt werden. Abschließend sollten Mutationen, die zur MDR führen, identifiziert werden.

Der dritte Teil der Arbeit diente der Analyse der ökologischen Fitness und der Konkurrenzfähigkeit der MDR-Stämme. Mit Wachstumsanalysen auf künstlichen Nährmedien, z.T. unter Stressbedingungen, und Infektionsuntersuchungen auf verschiedenen Wirtspflanzen, sollte die allgemeine Fitness der Stämme bestimmt werden.

In einem Versuch in einem kommerziell genutzten Weinberg sollte die Konkurrenzfähigkeit der MDR-Stämme im Vergleich mit sensitiven Stämmen unter Freilandbedingungen analysiert werden.

Abschließend sollte untersucht werden, ob es möglich ist MDR-Stämme für Fungizide zu resensibilisieren. Durch die Kombination von Fungiziden mit Chemikalien, die in der Lage sind ABC-Transporter zu inhibieren, sollten Substanzen identifiziert werden, die eine bessere Bekämpfung von *B. cinerea*-MDR-Stämmen ermöglichen.

# 2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen: Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Difco (Franklin Lakes, USA), Duchefa (Niederlande), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Hartmann Analytic (Braunschweig), Merck (VWR International; Darmstadt, Deutschland), NEB (Frankfurt am Main), Quanta Bioscience (VWR International; Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland).

Die untersuchten Fungizide Amistar® (S), Teldor® (B), Celest® (S), Cantus® (BA), Rovral® (BA) und Chorus® (S) wurden freundlicherweise von der Bayer AG (B, Leverkusen, Deutschland), der BASF SE (BA, Ludwigshafen, Deutschland) und Syngenta Agro GmbH (S, Maintal, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Wirkstoff Tebuconazol wurde von der DLR in Mussbach erhalten. Die Substanz Carbendazim und der Wirkstoff Tolnaftat, sowie das Antibiotikum Cycloheximid wurden als Reinstchemikalie von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Reaktions-Kits verwendet:

NE-Blot® Kit NucleoSpin® Extract II Kit QIAprep® Miniprep Kit RNAeasy plant mini Kit Sigma AMP-D1 B-R SYBR Green Super Mix for iQ Verso cDNA Kit New England Biolabs (Frankfurt) Macherey-Nagel (Düren) Qiagen GmbH (Hilden) Qiagen GmbH (Hilden) Qiagen GmbH (Hilden) Quanta BioScience (Darmstadt) Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

# 2.1. Medien und Lösungen

Die Medien und Lösungen wurden für 20min autoklaviert, wenn nicht anders angegeben.

Medien:

Malt-Extract-Broth (HA; Difco):15g<br/>ad 11Malz-Agar-Platten (HA-Platten):10g Malzextrakt<br/>4g Glukose<br/>4g Hefeextrakt<br/>ad 11 mit Wasser (pH 5,5)<br/>15g Agar

Tomaten-Malz-Agar-Platten (TMA-Platten):	125g zerkleinerte Tomatenblätter 15g Malzextrakt ad 11 mit Wasser (pH 5,5) 15g Agar
Glukose-Minimalmedium-Agar-Platten (GMAP):	3,052g l <sup>-1</sup> Gamborg B5 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5mM Glukose ad 11 mit Wasser (pH 5,5) 15g Agar
Glukose-Minimalmedium (GMM):	3,052g I <sup>-1</sup> Gamborg B5 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM Glukose ad 11 mit Wasser (pH 5,5)
Fruktose-Minimalmedium (FMM):	3,052g I <sup>-1</sup> Gamborg B5 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10mM Fruktose ad 11 mit Wasser (pH 5,5)
Infektions-Medium:	3,052g $I^{-1}$ Gamborg B5 25mM Glucose 10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 11 mit Wasser (pH 5,5) sterilfiltrieren
LB-Medium (Duchefa):	25g Bestehend aus: 10g Trypton 10g NaCl 5g Hefeextrakt ad 11 Wasser (pH 7,2) 15g Agar
LB-Selektions-Medium:	LB-Medium Ampicillin 100µg ml <sup>-1</sup>
YBA:	20g Natriumactetat 10g Bacto Pepton 10g Hefeextrakt ad 11
Lösungen:	
DNA-Extraktion: CTAB-DNA-Extraktions-Puffer:	2,5g Sorbitol 1,0g N-Lauryl Sarcosin 0,8g Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide 4,7g NaCl 1,0g Na-EDTA 1,0g Polyvinylpyrollidone ad 100ml
6x DNA-Gelladepuffer:	0,2% (w/v) Bromphenolblau

60% (v/v) Glycerin 60mM EDTA nicht autoklaviert **TE-Puffer:** 

20x SSPE:

Material und Methoden

242g l<sup>-1</sup> Tris Base 50x TAE-Puffer: 5,71% (v/v) Essigsäure 50mM EDTA (pH 8) nicht autoklaviert 10mM Tris-HCl 1mM EDTA (pH 7,4) Hybridisierung: Denaturierungslösung: 0,5M NaOH 1,5M NaCl nicht autoklaviert Neutralisierungslösung: 1M Tris-HCl 1,5M NaCl (pH 7,5) nicht autoklaviert 20x SSC Puffer: 3M NaCl 0,3M Na-Citrat (pH 7,0) Stripping Solution: 0,2M NaOH 0,1% (w/v) SDS nicht autoklaviert nach Denhardts: 175,3g NaCl 26,7g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,4g EDTA (pH 7,4) ad 11 50x Denhardts: 5g Ficoll 5g PVP 5g BSA (Fraktion V) ad 500ml filtrieren und einfrieren 10mg ml<sup>-1</sup> Salmon sperm DNA: Prähybridisierungslösung: 5x SSPE 5x Denhardts 0,4% SDS 300µl denat. Salmon sperm DNA 7,5ml Prähybridisierungslösung Hybridisierungslösung: 300µ1 denat. Slamon sperm DNA 55µl denaturierte Sonde 6x Waschlösung: 6x SSC 1% (w/v) SDS 2x Waschlösung: 2x SSC 0,1 % (w/v) SDS 0,5x Waschlösung: 0.5x SSC 0,1% (w/v) SDS nach Church: Phosphatpuffer: 137mM NaCl 2,7mM KCl 8,5mM Na/K Phosphat (pH 7,2)

Church-Puffer:

Waschpuffer I:

Waschpuffer II:

Polyacrylamidgel: 30% Acrylamid-Stammlösung (30:1):

10x TBE-Puffer:

<u>RNA-Extraktion:</u> Citratgepufferter RNA-Zelllysepuffer:

**RNA-Proteinpräzipitationspuffer:** 

**RNA-Gelladepuffer:** 

RNase-freies Wasser:

10x Northern-Laufpuffer:

*Botrytis*-Transformation: KC-Lösung:

PEG-Lösung:

1% BSA (Fraktion V) 1mM EDTA 7% SDS 0,25M NaHPO<sub>4</sub> (pH 7,2)

0,5% BSA (Fraktion V) 1mM EDTA 5% SDS

40mM Natriumphosphat (pH 7,2) 1mM EDTA 1% SDS

58,4g Acrylamid 1,6g Bisacrylamid ad 200ml mit Wasser nicht autoklaviert

107,81g Tris base 7,44g EDTA 55,3g Borsäure ad 11 mit Wasser (pH 8,3) nicht autoklaviert

2% (w/v) SDS 68mM (tri) Natrium-Citrat 132mM Zitronensäure 10mM EDTA (pH 3,5) 0,1% (v/v) DEPC über Nacht schütteln

4M NaCl 17mM (tri) Natrium-Citrat 33mM Zitronensäure (pH3,5) 0,1% (v/v) DEPC über Nacht schütteln

7,5ml Formamid 1,5ml 10x Northern-Laufpuffer 2,4ml 37 % Formaldehyd 1,0ml H<sub>2</sub>O (DEPC-behandelt) 1,0ml Glycerin 0,8ml 10% Bromphenolblau nicht autoklaviert

100ml Millipore-Wasser 0,1% (v/v) DEPC über Nacht schütteln

0,2M MOPS 50mM Na-Acetat 10mM EDTA (pH 6,8)

0,6M KCl 50mM CaCl<sub>2</sub> (dihydrat)

25% (w/v) PEG 3350 50mM CaCl<sub>2</sub> (dihydrat) 10mM Tris-HCl (pH 7,4) Glucanex-Lösung:

SH-Agar:

0,6M Saccharose 5mM Tris-HCl (pH 6,5) 1mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8% (w/v) Bacto-Agar

0,5% (w/v) Glucanex ad 30ml mit KC-Lösung sterilfiltrieren

#### 2.2. Allgemeine Methoden und Arbeiten

Grundlegende molekularbiologische Methoden und Arbeitsweisen wie PCR-Reaktionen, Restriktionsverdaue, Ligationen, Isolierung von Plasmiden, Aufreinigen von PCR-Fragmenten, Herstellen von Agarose-, Polyacrylamid-, denaturierenden RNA-Agarosegelen und deren Gelelektrophorese, Hydrolyse von Total-RNA für Macroarray-Untersuchungen, Kultivierung und Transformation von *E. coli*-Zellen wurden nach Sambrook et al. (2001) durchgeführt.

Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit deutschen (aus dem Jahr 2006) und französischen Stämmen (A.S. Walker, INRA Versailles) mindestens in technischen Triplikaten durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

#### 2.3. Vermehrung und Ernten von Botrytis cinerea-Konidien

Zur Vermehrung der *Botrytis*-Isolate wurden 20-25µl einer Glycerinkonidiensuspension auf einer 9cm HA- oder TMA-Platte ausplattiert und für etwa 10 Tage wachsen gelassen. Die Sporulation wurde dann durch Schwarzlicht induziert. Die Konidien einer mit sporulierendem Myzel bewachsenen Agar-Platte wurden mit 10ml sterilem Wasser und mit Hilfe eines Drygalskispatels abgeschwemmt. Dann wurde die Konidiensuspension abgenommen und durch ein abgeschnittenes, mit Glaswolle gefülltes, 15ml Falcon filtriert, um sie vom verbleibenden Myzel zu befreien. Die Konidien wurden 3x mit H<sub>2</sub>Omilli gewaschen und je bei 3000rpm für 3min abzentrifugiert. Die Sporenkonzentration wurde mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden die Sporen in 25%-igem Glycerin aufgenommen und dann bei -70°C gelagert.

### 2.4. Gewinnung genomischer Botrytis-DNA

Zur Isolation genomischer DNA wurden etwa  $1 \times 10^7$  *B. cinerea*-Sporen in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit etwas Seesand aufgeschlossen. Die gemörserte

Probe wurde in 400µl CTAB-DNA-Extraktions-Puffer überführt und für 15-30sec leicht gevortext. Anschließend folgten 2 Chloroformextraktions-Schritte mit je 1Vol Chloroform. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1Vol Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Probe für 15min bei 14.000rpm zentrifugiert und die DNA dadurch pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 0,5Vol 70% EtOH gewaschen und die luft-getrocknete DNA in 40µl TE gelöst.

#### 2.5. Transformationsmethode für B. cinerea

Die Transformation von *B. cinerea*-Protoplasten erfolgte nach einem veränderten Protokoll nach J. van Kan und S. Fillinger (Universität Wageningen, Niederlande und INRA Versailles, Frankreich). Zur Gewinnung von Protoplasten wurden zunächst *Botrytis*-Keimlinge angezogen. Hierzu wurden zwei 100ml Erlenmeyerkolben mit 30ml 1% Malzextraktmedium mit je  $2x10^7$  Sporen für 16h bei 140rpm bei RT inkubiert.

Die Keimlinge wurden in 50ml Falcons für 5min bei 3000rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden sie einmal mit H<sub>2</sub>Omilli und zweimal mit KC-Lösung gewaschen. Die Protoplastierung erfolgte in 30ml Glucanex-KC-Lösung unter leichter Agitation auf dem Rocky-3D (Stufe 3) bei RT für maximal 2h. Zum Abstoppen der Protoplastierung wurden die Protoplasten durch ein 25 $\mu$ m Nylon-Mesh filtriert und das Falcon mit eiskalter KC-Lösung auf 50ml aufgefüllt. Die Protoplasten wurden für 5min bei 750g und 4°C pelletiert und das Pellet weitere zweimal mit eiskalter KC-Lösung gewaschen. Mit einer Neubauerzählkammer wurde die Protoplastenausbeute bestimmt und auf 1x10<sup>8</sup> Protoplasten ml<sup>-1</sup> eingestellt.

Zu  $10^7$  eisgekühlten Protoplasten wurde der 5min auf Eis vorgekühlte Transformationsansatz (xµl zweifache KC-Lösung, xµl zu transformierendes DNA-Fragment (5-12µg), 5µl 25µM Spermidin, ad 100µl H<sub>2</sub>Omilli) zugegeben. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 5min auf Eis gekühlt, 100µl PEG-Lösung zugesetzt und alles für 20min bei RT inkubiert. Danach wurden weitere 500µl PEG-Lösung zugegeben und weitere 10min bei RT inkubiert. Abschließend wurden nochmals 200µl KC-Lösung hinzugefügt und der gesamte Ansatz in 200ml SH-Agar (45°C), der mit 40-50µg Hygromycin ml<sup>-1</sup> versetzt war, gegeben. Anschließend wurden ausplattiert. Die ersten Transformanten wurden nach vier bis maximal 14d erhalten und auf HA-Agarplatten mit 70µg Hygromycin ml<sup>-1</sup> transferiert.

#### 2.6. B. cinerea-Infektionstest

Für Infektionstests wurden abgetrennte Tomaten-, Bohnen- und verwundete Weinblätter mit 20 $\mu$ l Tropfen einer 1-2h in Infektionsmedium vorinkubierten Sporensuspension (1x10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>) inokuliert. Die Pflanzengewebe wurden in einer feuchten Kammer bei künstlichem Licht und 20°C inkubiert. Weitere Infektionstests wurden mit verwundeten Weinbeeren, Äpfeln und intakten Gerberapetalen durchgeführt. Die Verwundung der Weintrauben erfolgte mit Hilfe einer Lanzette. Danach wurden 5 $\mu$ l der Sporensuspension direkt auf die Verwundungen aufgebracht. Die Äpfel wurden mittels eines Korkbohrers (7,5mm x 4mm) präpariert und je 20 $\mu$ l der Sporensuspension direkt auf die Gerberapetalen wurden mit 10 $\mu$ l Sporensuspension inokuliert. Ausgewertet wurden die Infektionstests mit Hilfe einer elektronischen Schieblehre, mit deren Hilfe der Durchmesser der Läsionsausbreitung innerhalb von 96h alle 24h ermittelt wurde.

#### Infektionstest zur Analyse von ABC-Transporter-Modulatoren

Der Infektionstest wurde unter den oben beschriebenen Konditionen auf primären Bohnenblättern durchgeführt. Mit einer Airbrush-Pistole wurden jeweils fünf Bohnenblätter mit verschiedenen Lösungen behandelt. Ein Teil der Blätter wurde mit einer 18µg ml<sup>-1</sup> Chlorpromazinlösung besprüht. Andere Blätter wurden mit einer 50:50 Mischung bestehend aus Fludioxonil und Cyprodinil mit den Endkonzentrationen 1µg ml<sup>-1</sup>, 2µg ml<sup>-1</sup> und 4µg ml<sup>-1</sup> behandelt. Diese Behandlungen wurden nochmals mit weiteren Bohnenblättern durchgeführt. Allerdings wurde zu diesen Fungizidmischungen jeweils zusätzlich Chlorpromazin in der Konzentration 18µg ml<sup>-1</sup> zugegeben. Es wurden pro Quadratzentimeter etwa 12,5µl Lösung aufgebracht. Die Lösungen wurden auf den Blättern trocknen gelassen. Anschließend wurden die behandelten Bohnenblätter und die unbehandelten Kontrollblätter mit jeweils 15µl Tropfen der Sporensuspensionen verschiedener Stämme inokuliert. Nach 2,5d Wachstum wurde der Läsionsdurchmesser ermittelt.

#### 2.7. Vegetative Wachstumsanalysen

Zur Analyse des vegetativen Wachstums unter verschiedenen Bedingungen wurden standardmäßig geerntete Sporen verschiedener *B. cinerea*–Stämme auf einen Titer von  $1 \times 10^5$  Konidien pro ml in H<sub>2</sub>Omilli eingestellt. Es wurden 10µl Tropfen ins Zentrum der jeweiligen zu testenden Agarplatte aufgebracht. Nach Antrocknen der Inokulationstropfen wurden die Platten bei 4°C (Kältestress), 20°C oder bei 30°C (Hitzestress) inkubiert. Getestet wurden

TMA-, HA- und GM-Agar-Platten (GMAP), die mit osmotisch wirksamen Substanzen (0,5M NaCl, 0,5M Sorbitol) oder 0,05%  $H_2O_2$  (einer 30%  $H_2O_2$ -Lsg.), 3mM Paraquat oder 15µM Menadion supplementiert wurden. Die tägliche radiale Wachstumsrate der jeweiligen Myzelien wurde durch eine Messung der Koloniedurchmesser vom dritten auf den vierten Tag ermittelt.

Um die Akkumulation der Biomasse der zu untersuchenden Stämme der verschiedenen Phänotypen zu analysieren wurden  $1 \times 10^6$  Sporen in 10ml HA-broth Medium gegeben und unter Schütteln (120rpm) für 2d wachsen gelassen. Nach dem Lyophilisieren wurde das Trockengewicht bestimmt.

Um die Sporulationsfähigkeit der Stämme zu analysieren wurden  $5 \times 10^5$  Sporen auf einer 9cm HA-Platte ausplattiert und für 16d wachsen gelassen. Die Sporulation wurde durch eine Schwarzlichtstimulation nach 12d für eine Nacht gefördert. Die entstandenen Sporen wurden geerntet und mit einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

#### 2.8. Keimungsverhalten bei oxidativem Stress

Um den Einfluss der MDR-Phänotypen auf die Keimung bei oxidativem Stress hin zu analysieren, wurde ein Keimungstest in GMM mit den Substanzen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0075% einer 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lsg.), Paraquat (3mM) und Menadion (15 $\mu$ M) in sterilen 24-Well-Platten aus Polystyrol durchgeführt. In jedes Well wurde mit Hilfe einer Pinzette ein rundes Deckglas vorgelegt. Die Sporenkonzentration der zu testenden Stämme wurde auf 5x10<sup>5</sup> Sporen ml<sup>-1</sup> eingestellt. 25 $\mu$ l der Sporensuspension wurden in ein Well gegeben und 475 $\mu$ l der Testlösungen zugesetzt. Die Keimungsrate von 100 Sporen wurde nach 6h Inkubation bei 20°C im Dunkeln für jeden Stamm und jede Testbedingung ermittelt. Als gekeimt wurden bei Stresssubstanzen alle Sporen mit einem deutlichen Keimschlauchansatz gewertet. Bei der Kontrolle musste dieser mindestens eine Länge entsprechend der Sporenlänge aufweisen.

#### 2.9. Konkurrenzanalyse von MDR-Stämmen im Freiland

In einem Vorversuch auf Weintrauben wurde die Konkurrenzfähigkeit von Stämmen mit verschiedenen Phänotypen (sensitiv, MDR1, MDR2 und MDR3) ohne und mit Fungizidbehandlung analysiert. Auf Grund dieser Daten wurden der sensitive Stamm 06.5-25 und der MDR3-Stamm 06.7-33 für den Freilandversuch ausgewählt. Beide Stämme zeigten ohne Fungizidbehandlung eine gute und vergleichbare Konkurrenzfähigkeit.

# 2.9.1. Konkurrenzversuch von sensitiven und MDR3-Stämmen in Weinbergen

In den Jahren 2007, Herrenletten, und 2008, Schloßberg, wurden in kommerziell genutzten Riesling Rebanlagen des DLR Neustadt 24 bzw. 48 Weinpflanzen für den Versuch verwendet.

Sowohl 2007 als auch 2008 wurde in den Rebanlagen eine Botrytizidbehandlung mit normaler Anwendungskonzentration des Wirkstoffs Fenhexamid zum Zeitpunkt BBCH-ES 77 durchgeführt. Während der Vegetationsperiode wurden weiterhin übliche kulturtechnische Maßnahmen ausgeführt.

Die Rebfläche wurde in sechs gleichgroße Parzellen à 4 Pflanzen im Jahr 2007 bzw. 8 Pflanzen im Jahr 2008 aufgeteilt. Drei dieser Wiederholungen wurden zum Zeitpunkt BBCH-ES 81 mit einer üblichen Anwendungskonzentration des Fungizids switch®, einer Mischung aus den Wirkstoffen Fludioxonil und Cyprodinil, mit einer Tunnelspritze behandelt. Drei Parzellen blieben unbehandelt.

Kurz vor bzw. nach der zweiten Fungizidbehandlung wurden alle sechs Parzellen mit einer 50:50 Sporenmischung des sensitiven und des MDR3-Stamms inokuliert. Pro Weinpflanze wurden 2007 und 2008 je  $8,5x10^6$  Sporen ausgebracht.

Im Herbst (Ende September), kurz vor der Ernte, wurden 2007 aus jedem Teilversuch 50 und 2008 90 verschimmelte Rieslingbeeren gesammelt und *B. cinerea*-Isolate aufgereinigt. Für Vergleichszwecke wurden aus einem nicht inokulierten und nicht mit Fungizid behandelten Bereich des Weinbergs 50 bzw. 90 Proben gesammelt.

# Wetter während des Versuchs

Während des Ausbringens der Sporen herrschten 2007 und 2008 Temperaturen zwischen 25°C und 29°C bei Sonnenschein. 2007 lagen die Temperaturen in den fünf darauffolgenden Tagen zwischen 21°C und 25°C bei bewölktem Himmel. 2008 lagen die Tageshöchsttemperaturen der fünf Folgetage bei 19-28°C bei ebenfalls bewölktem Himmel.

Die durchschnittliche Temperatur betrug im August 2007 18,5°C, im September 2007 13,8°C und der Niederschlag der beiden Monate lag bei 54,4mm bzw. 33,1mm bei einer relativen Luftfeuchte von 72% bzw. 76%. 2008 betrug die durchschnittliche Temperatur im August 19,3°C, im September 13,7°C. Der Niederschlag betrug 74,4mm bzw. 72,7mm und die relative Luftfeuchte lag bei 74% bzw. 80%.

Im Winter 2007/08 lag die tiefste durchschnittliche Tagestemperatur bei -6,2°C.

# 2.10. Isolierung von B. cinerea-Isolaten

In den Jahren 2006, 2007 und 2008 wurden im Herbst *B. cinerea*- Isolate von verschimmelten Weinbeeren isoliert. Es wurden Proben von sechs Standorten entlang der Deutschen Weinstraße genommen (Abb. 6). Die sechs Standorte lagen zwischen den Koordinaten 49°14'N/8°7'O (Walsheim, Standort 6) und 49°31'N/8°11'O (Dackenheim, Standort 5).



Abb. 6: Lage des Weinanbaugebietes Pfalz und Probenahmestellen entlang der Deutschen Weinstraße. (A) Lage des Weinanbaugebietes (http://www.schweikhard-weine.de/images/weinbauregionen.jpg). (B) Die sechs in dieser Arbeit untersuchten Probenahmestandorte entlang der Deutschen Weinstraße (http://maps.google.de).

Beim Monitoring wurde ungefähr eine Fläche von 150km<sup>2</sup> abgedeckt. An jedem Standort wurden auf einer Fläche von etwa 500m<sup>2</sup> zwischen 30 und 40 Proben entnommen. Die Weinberge waren alle kommerziell genutzt und mit Weiß- und Rotweinsorten bepflanzt.

Mit einer Pinzette wurden einzelne Konidienträger von den verschimmelten Weinbeeren abgenommen und auf 6cm HA-Platten ausgelegt, bei stark mit *Penicillium spec.*, Hefen oder *Drosophila spec.* kontaminierten Beeren wurde eine Isolierung auf dem Spezialmedium Kerssies durchgeführt (Kerssies, 1990). Nach Anwachsen der Stämme wurden zur Vereinzelung und zum Eliminieren von Kontaminationen einige Hyphen aus dem Agar ausgestochen und auf eine neue HA-Platte transferiert. Diese wurden dann, bis die Isolate sporulierten, bei 20°C und Dauerlicht inkubiert.

Für genetische Untersuchungen wurden Einzelsporisolate erzeugt. Die Isolierung der *Botrytis*-Stämme von Rindenstücken wurde direkt auf dem Spezialmedium Kerssies durchgeführt. Ansonsten wurde die Isolation wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.11. Fungizidsensitivitäts-Test

Um die Resistenzlevel der verschiedenen *Botrytis*-Isolate gegenüber Fungiziden, Antibiotika und dem pflanzlichen Eugenol zu ermitteln, wurden Agar-Plattentests und ein auf Mikrotiterplatten basierender optischer Test angewendet.

Hierfür wurde zuerst eine Fungizidstammlösung mit 1mg Wirkstoff ml<sup>-1</sup> der verschiedenen Fungizide angesetzt. Um diese Konzentration herzustellen, wurden 10mg Wirkstoff mit 10ml organischem Lösungsmittel versetzt. Da die verwendeten Fungizide eine Formulierung aufwiesen und dadurch der Wirkstoffanteil am Fungizid variabel war, wurde für alle Fungizide die Ausgangsmenge bestimmt, die 10mg Wirkstoff entsprachen. Beim Antibiotikum Cycloheximid und dem pflanzlichen Abwehrstoff Eugenol wurden 10mg Wirkstoff ml<sup>-1</sup> gelöst. Als Lösungsmittel der Wirkstoffe wurde im Allgemeinen 100% Ethanol gewählt, mit Ausnahme des Wirkstoffes Carbendazim, der in DMSO gelöst wurde.

Um die Wirkstoffe aus den unlöslichen Beistoffen zu eluieren, wurde alles mit einem Kunststoffpistill homogenisiert und anschließend die Beimischungen für 5min bei 4100rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

# 2.11.1. Ermittlung der Fungizidresistenzverteilung in einer Botrytis-Population

Um die Fungizidresistenzspektren der entlang der Deutschen Weinstraße vorgefundenen Stämme zu analysieren, wurde in einem 96-Wellplatten-Test mit den folgenden diskriminatorischen Fungizid-Konzentrationen: Carbendazim 5µg ml<sup>-1</sup>; Cyprodinil 5µg ml<sup>-1</sup>; Fludioxonil 3µg ml<sup>-1</sup>; Fenhexamid 5µg ml<sup>-1</sup>; Iprodion 5µg ml<sup>-1</sup>; Tebuconazol 7µg ml<sup>-1</sup>; Boscalid 5µg ml<sup>-1</sup> und Tolnaftat 5µg ml<sup>-1</sup>, die verschiedenen Einzelresistenzen identifiziert. Um MDR-Stämme zu unterscheiden wurden weiterhin die folgenden Konzentrationen der verschiedenen Wirkstoffe eingesetzt: Cyprodinil 0,03µg ml<sup>-1</sup> und 0,1µg ml<sup>-1</sup>; Fludioxonil 0,3µg ml<sup>-1</sup>; Fenhexamid 0,4µg ml<sup>-1</sup>; Carbendazim 0,3µg ml<sup>-1</sup> und Cycloheximid 35µg ml<sup>-1</sup>. Mit diesen Konzentrationen und der Kombination der verschiedenen Fungizide war es möglich nach Tab. 1 eine Zuordnung der vorgefundenen Stämme zu den verschiedenen Phänotypen: sensitiv, Einzelresistenz, MDR1, MDR2 oder MDR3 vorzunehmen.

**Tab. 1: Wachstum der vorgefundenen** *Botrytis*-Stämme in verschiedenen Fungizidenthaltenden Medien zur Klassifizierung der Fungizidresistenz-Phänotypen. Sensitive Stämme ohne Resistenz können in diesen Konzentrationen nicht mehr wachsen (-). MDR-Stämme zeigen je nach Klasse bei den dargestellten Fungiziden ein Wachstum (+; oder z.T. eingeschränkt +/-). Cyp= Cyprodinil; Flu= Fludioxonil; Fen= Fenhexamid; Carb= Carbendazim; Ip= Iprodion; Tol= Tolnaftat; Cyc= Cycloheximid; sens.= sensitive Stämme.

Phänotyp	Wirkstoffkonzentration [µg ml <sup>-1</sup> ]									
	Сур	Сур	Flu	Fen	Carb	lp	Tol	Сус		
	0,03	0,1	0,3	0,4	0,3	5	5	35		
sens.	-	-	-	-	-	-	-	-		
MDR1	+	+	+	-	+	-	+	-		
MDR2	+	+/-	-	+	-	+	+	+		
MDR3	+	+	+	+	+	+	+	+		

# 2.11.2. Fungizidtests zur Wiederfindung von im Freiland ausgebrachten Stämmen

Für die Identifikation des ausgebrachten MDR3- und des sensitiven Vergleichsstamms wurden bewachsene Agarblöcke der isolierten Stämme auf verschiedene fungizidhaltige Medien ausgelegt. Als Wachstumskontrolle dienten HA-Platten ohne Fungizidzugabe. Zur Identifikation der MDR3-Stämme dienten Fludioxonil-HA-Platten mit 0,5µg Wirkstoff ml<sup>-1</sup> und Iprodion-HA-Platten mit 6µg ml<sup>-1</sup>. Um den sensitiven Stamm wiederzufinden, wurden die Isolate zusätzlich auf 5µg ml<sup>-1</sup> Carbendazim-HA-Platten ausgelegt. Die Auswertung erfolgte anhand des Wachstums nach 2 Tagen bei 20°C.

MDR3-Stämme zeigten auf Iprodion-HA-Platten ein normales, bei Fludioxonil-HA-Platten ein verzögertes und auf Carbendazim-HA-Platten kein Wachstum. Der ausgebrachte sensitive Stamm zeigte auf Carbendazim-HA-Platten normales und auf Fludioxonil- und Iprodion-HA-Platten kein Wachstum.

Die endogene Population zeigte entweder auf allen Medien kein (sensitive Stämme) oder nur auf einem Medium, Fludioxonil (putative MDR1-Stämme), Iprodion (putativ Iprodionresistente Stämme), Carbendazim (Carbendazim-resistente endogene Stämme) oder auf unterschiedlichen Medien wie Fludioxonil und Carbendazim (putativ MDR1-Stämme mit Carbendazim-Resistenz) oder auf allen Testmedien ein Wachstum (putative MDR2-, putative MDR1-Stämme mit Einzelresistenz gegen Carbendazim und Iprodion).

Die untersuchten ausgebrachten und putativ wiedergefundenen MDR3-Stämme ergaben eine hundertprozentige genetische Identität zum ausgebrachten MDR3-Stamm. Carbendazim-Resistenz wurde 2007 in der nicht mit dem Sporengemisch inokulierten Kontrollfläche bei 12% Prozent der Stämme vorgefunden. Nach einer Winterperiode trat eine Carbendazim-Resistenz bei 7,7% und im Herbstversuch 2008 bei 5,8% der Stämme auf. Durch genetische Analysen der putativen ausgebrachten Carbendazim-resistenten und wiedergefundenen sensitiven Stämme konnte 2007 bei 85% der Stämme eine Identität mit dem ausgebrachten Stamm nachgewiesen werden. Die endogene Population wies eine Rate von 15% Carbendazim-resistenten Stämmen auf. Dieser Wert ist annähernd identisch mit der phänotypisch ermittelten Rate in der Kontrollfläche. Die durchschnittliche Carbendazim-Resistenz der Population wurde anteilig vom Ergebnis des Versuchs abgezogen.

### 2.11.3. Fungizidtest zur Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes

Für die Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes eines jeden Stammes und jeder Substanz wurden die in Tab. 2 dargestellten Konditionen gewählt. Für die Fungizide Cyprodinil und Boscalid musste aufgrund ihrer speziellen Wirkungsweise jeweils ein Spezialmedium eingesetzt werden, um die Wirkungsweise der Fungizide nicht zu umgehen. Für Cyprodinil wurde ein GMM ohne endogene Aminosäuren und für Boscalid das YBA-Medium ohne vergärbare C-Quelle verwendet (Stammler und Speakman, 2006).

Die geernteten Konidien wurden in GMM oder HA, abhängig vom getesteten Fungizid, für 2h mit einer Konzentration von  $2x10^5$  Konidien ml<sup>-1</sup> präinkubiert, um eine physiologische Keimung zu induzieren. Danach wurden 5µl der Konidiensuspension in acht Wells einer 96-Wellplatte vorgelegt. Zu den Konidien wurden je 95µl der Fungizid/Wirkstoff-Lösung in steigender Konzentration hinzugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden in einer feuchten Kammer für 48-96h bei 20°C inkubiert und anschließend mikroskopisch und optisch, mittels eines 96-Well-Plattenreaders, ausgewertet. Die mit dem Plattenreader ermittelte optische Dichte OD<sub>600</sub> wurde benötigt, um mit der "sigmoid fitting" Funktion der Software Origin6.0<sup>®</sup> (Origin Lab Cooperation, USA) den EC<sub>50</sub>-Wert zu bestimmen.

Tab. 2. Enges	etzte winkstonkonzentrationen zur Ermittung u	er EC50-Werte. Die Test-							
Medien und die verwendeten Lösungsmittel zur Herstellung der Wirkstoffstocklösungen sind									
angegeben. HA: Malz-Extrakt-broth; GMM: Glucose-Minimalmedium.									
Wirkstoff	Wirkstoffverdünnungen	Fungizidtest-Medium/							

Tab 2. Fingesetzte Winkstoffkongentuetionen zun Ermittlung den EC. Wente Die Test

WIRKSLOII	[μg ml <sup>-1</sup> ]								Lösungsmittel der Wirkstoffe	
Carbendazim	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	HA	DMSO
Fludioxonil	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	HA	EtOH
Fenhexamid	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	HA	EtOH
Cyprodinil	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	GMM	EtOH
Boscalid	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	YBA	EtOH
Azoxystrobin	0	0,1	0,3	1	3	6,5	10	15	HA	EtOH
Iprodion	0	0,1	0,3	1	3	6,5	10	15	HA	EtOH
Tebuconazol	0	0,1	0,3	1	3	6,5	10	15	HA	EtOH
Tolnaftat	0	0,1	0,3	1	3	6,5	10	15	HA	EtOH
Cycloheximid	0	2,5	7,5	15	30	50	75	100	HA	EtOH
Eugenol	0	2,5	5	10	25	50	100	250	HA	EtOH

# Um zu testen ob es möglich ist, mit verschiedenen ABC-Transporter-Modulatoren die MDR-

2.11.4. Einfluss von Transportermodulatoren auf die MDR

Phänotypen für das Fungizid Fludioxonil zu resensibilisieren, wurde zuerst für jeden untersuchten Stamm ein Fludioxonil Resistenzfaktor (Rf<sub>FluStammX</sub>) ermittelt, indem der Resistenzlevel eines jeden Stamms als Vielfaches der Resistenz des sensitiven Laborstamms B05.10 ausgedrückt wurde.

# **Rf**<sub>FluStammX</sub>= EC<sub>50</sub> (Flu) Stamm x/ EC<sub>50</sub>(Flu) B05.10

Weiterhin wurde der Effekt von elf verschiedenen als ABC-Transporter-Blocker beschriebenen Substanzen (Ponte-Sucre, 2007) auf sensitive Stämme und Stämme, die den MDR1- und MDR2- Phänotyp zeigen, untersucht.

Getestet wurden Chlorpromazin, Verapamil, Amylorid, Reserpin, Progesteron, Dipyridamol, Quinin, Lidocain, Naringenin und die nicht-ionischen Detergentien TritonX100 und Tween20. Um die Eigentoxizität der einzelnen putativen Transporter-Blocker zu testen und dadurch Konzentrationen zu ermitteln, die alleine ohne Fungizid keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstum von *B. cinerea* haben, wurde für jede Substanz der EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt (Tab. 3). Als Test-Medium wurde HA-Broth gewählt.

Wirkstoff	W	Stocklösung [mg ml <sup>-1</sup> ]							
Fludioxonil	0	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3	0,6	1	1 in EtOH
Amylorid	0	100	200	250	300	450	600	750	10 in HA
Dipyridamol	0	25	50	100	200	250	400	500	10 in EtOH
Chlorpromazin	0	5	10	15	20	25	30	50	1 in HA
Lidocain	0	750	1000	2000	4000	5000	7500	10000	10 in HA
Verapamil	0	250	300	450	500	600	700	1000	10 in HA
Reserpin*	0	50	75	100	130	150	200	400	10 in EtOH
Progesteron	0	2,5	4	5	10	25	50	100	1 in EtOH
Quinin	0	75	125	150	175	200	250	500	10 in EtOH
Naringenin	0	50	75	100	150	250	400	500	10 in EtOH
TritonX100	0	0,01	0,1	1	5	10	15	20	20% in HA
Tween20	0	1	2	5	10	12,5	15	20	20% in HA

Tab. 3: Wirkstoffkonzentrationen zur Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der ABC-Transporter-Modulatoren.

\* Vorgelöst in 100µl Chloroform und mit 900µl EtOH aufgefüllt.

Ausgehend von den  $EC_{50}$ -Werten der untersuchten Stämme wurden folgende Konzentrationen für die weitere Untersuchung gewählt: Amylorid 250µg ml<sup>-1</sup>, Dipyridamol 200µg ml<sup>-1</sup>, Chlorpromazin 15µg ml<sup>-1</sup>, Lidocain 2mg ml<sup>-1</sup>, Verapamil 500µg ml<sup>-1</sup>, Reserpin 130µg ml<sup>-1</sup>, Progesteron 5µg ml<sup>-1</sup>, Quinin 150µg ml<sup>-1</sup>, Naringenin 150µg ml<sup>-1</sup>, TritonX100 0,15% und Tween20 5%. Bei den meisten Substanzen wurde eine Konzentration von 75% des durchschnittlichen  $EC_{50}$ -Wertes für die weitere Untersuchung eingesetzt. Bei Substanzen, die bei diesen Konzentrationen auskristallisierten, was die optische Dichte-Bestimmung beeinträchtigt hätte, wurden geringere Konzentrationen gewählt (TritonX100, Tween20, Progesteron, Naringenin und Lidocain).

Um zu testen ob die ausgewählten putativen ABC-Transporter-Modulatoren in der Lage sind, den MDR-Phänotyp zu beeinflussen und so die Fungizidresistenz gegenüber Fludioxonil zu verringern, wurde ein Fungizidtest mit steigender Fungizidkonzentration (wie oben beschrieben) und gleichbleibender ABC-Transporter-Modulatorkonzentration durchgeführt. Nach zweitägigem Wachstum wurde ebenfalls die OD<sub>600</sub> pro Well ermittelt und der EC<sub>50</sub>-Wert für die verschiedenen Wirkstoffe kombiniert mit Fungizid berechnet.

Für jeden Stamm wurde dann ein kombinierter Fludioxonil ABC-Transporter-Modulator-Resistenzfaktor ( $Rf_{Flu+ModYStammX}$ ) ermittelt.

Der erhaltene EC<sub>50</sub>-Wert für die Kombination Fungizid mit Modulator wurde als Vielfaches der ursprünglichen Fludioxonil-Resistenz des sensitiven Laborstamms B05.10 ausgedrückt:

Rf<sub>Flu+ModYStammX</sub>= EC<sub>50</sub> (Flu+ModY) Stamm X/ EC<sub>50</sub> (Flu) B05.10

# 2.12. Vorbereitungen zur Macroarray-Analyse

Um in *B. cinerea* putative MDR-Transporter aus den Klassen der ABC- und MFS-Transporter zu identifizieren, wurde eine Datenbankrecherche des *B. cinerea* B05.10-Genoms durchgeführt (http://www.broad.mit.edu/). ABC-Transporter konnten durch eine Suche mit dem blastp Algorithmus, mit Walker A und der ABC-Signatur als Suchsequenz, identifiziert werden. Es wurden für die weitere Untersuchung 29 putative ABC-MDR-Transporter ausgewählt.

Da die MFS-Transporter keine typischen Domänen besitzen, wurde das Genom mit der blastp Funktion nach Ähnlichkeiten zu bekannten MFS-Transportern (2.A.1.) aus der Transporter Classification Database (TCDB; http://www.tcdb.org/) hin untersucht. Mit verschiedenen blast Algorithmen wurden 18 potentielle MFS-MDR-Transporter Kandidaten ausgewählt.

# 2.13. Präparation von RNA

# 2.13.1. Anzucht der Keimlinge -Methode 1-

Die RNA zur Durchführung der Macroarray-Analyse wurde basierend auf einer citratgepufferten Methode isoliert. Zur Keimungsinduktion wurden  $5x10^6$  Sporen in 1ml HAbroth für 2h vorinkubiert und nach Abzentrifugieren in 10ml GMM in eine 9cm Petrischale überführt. Anschließend wurden die Sporen für 24h bei 20°C unter ständigem Schwenken (140rpm) inkubiert. Nach dem Anziehen des Myzels wurde dieses einer 30minütigen Fungizidbehandlung unterzogen. Das Myzel wurde mit den Fungiziden Fludioxonil, Cyprodinil und Fenhexamid in einer Konzentration von je 0,1µg ml<sup>-1</sup> behandelt. Pro Isolat wurde eine Probe unbehandelt belassen. Das Myzel wurde in ein Sarstedt-Röhrchen überführt und anschließend für 5min bei 9000rpm (Festwinkelrotor) abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde noch zweimal mit H<sub>2</sub>Omilli gewaschen und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Probe konnte nun bis zur RNA-Präparation bei -70°C gelagert werden.

#### Anzucht der Keimlinge -Methode 2-

Für Northern-, Realtime-PCR- und Microarray-Analysen wurde die RNA mit dem RNAeasy plant mini Kit der Firma Qiagen isoliert.  $2x10^6$  Sporen wurden für 1h in 1ml HA-broth vorinkubiert und danach mit 22,5ml FMM auf eine mit  $10\mu g \text{ cm}^{-2}$  Apfelwachs (selbst isoliert) beschichtete 9cm Petrischale gegeben und für 15h bei 20°C stehend inkubiert. Die Fungizidbehandlung/Stressinduktion erfolgte für 30min mit Fludioxonil, Cyprodinil, Carbendazim, Fenhexamid und Boscalid mit einer Konzentration von je  $1\mu g \text{ ml}^{-1}$ . Für die Fungizide Iprodion und Tebuconazol wurden je  $10\mu g \text{ ml}^{-1}$  und für das Antibiotikum Cycloheximid 70 $\mu g \text{ ml}^{-1}$  verwendet. Wasserstoffperoxid wurde in einer Konzentration von 0,05% eingesetzt. Anschließend wurden die Keimlinge mit einem Spatel abgeschabt und für 5min bei 4100rpm abzentrifugiert. Die Keimlinge wurden nun einmal mit H<sub>2</sub>Omilli gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in flüssigem Stickstoff und Seesand in einem Mörser aufgeschlossen und für die RNA-Extraktion eingesetzt.

#### 2.13.2. RNA-Präparation für die Macroarray-Analyse

Die Keimlinge wurden wie in Methode 1 beschrieben angezogen. Durch Zerkleinern der Probe in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser, mit einer Spatelspitze Seesand, wurden die Zellen aufgebrochen. Das gefrorene Pulver wurde mit einem Spatel in 1ml citratgepufferteren RNA-Zelllysepuffer eingerührt. Anschließend wurden 340µ1 Proteinpräzipitationspuffer zugegeben. Nach Zugabe des Proteinpräzipitationspuffers wurde die Probe ca. zehnmal invertiert oder kurz gevortext und für 5min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden als weiße Trübung sichtbar. Diese und der restliche Seesand konnten nun für 10min bei 13.000rpm und RT abzentrifugiert werden. Es wurde ein festes Pellet, das Zelltrümmer, DNA und Proteine beinhaltet, erhalten. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1Vol Isopropanol und gutem Mischen wurde die RNA für mindestens 15min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei -20°C gefällt. Das resultierende RNA-Präzipitat wurde für 5min bei 13.000rpm abzentrifugiert und das RNA-Pellet in 75% EtOH gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in 40µl H<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen.

#### 2.14. RNA-Präparation für Northern-, Realtime-PCR- und Microarray-Analysen

Die Keimlinge wurden wie bei Methode 2 beschrieben angezogen und anschließend mit Flüssigstickstoff aufgebrochen. Die RNA wurde mit dem RNAeasy plant mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Nach dem Aufschließen der Proben wurden diese in 600µl RLT-Puffer, dem zuvor 10µl β-Mercaptoethanol ml<sup>-1</sup> zugesetzt wurde, aufgenommen. Zur besseren Lyse der Zellen wurden die Proben für 2min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine QIAshredder-Säule aufgeladen und für 2min bei 13000rpm zentrifugiert. Der klare Überstand des Durchflusses wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 0,5Vol EtOH versetzt. Anschließend wurden die Proben auf eine RNA-Bindesäule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 15sec bei 10000rpm wurde der Durchfluss verworfen und die Membran mit 700µl RW1-Puffer und anschließend zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Nach zweiminütigem Trocknen der Membran wurde die RNA mit 50µl RNase-freiem Wasser eluiert.

#### 2.15. DNase-Behandlung der Total-RNA

Um Kontaminationen der Total-RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine DNase-Behandlung mit dem Sigma AMP-D1 Kit durchgeführt. 10µg Total-RNA wurden in 8µl DEPC-Wasser gelöst, mit 1µl Reaktionspuffer und 1µl DNaseI versetzt und nach dem Mischen bei RT für 15min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1µl Stopsolution (50mM EDTA) beendet und das Enzym durch Erhitzen für 10min bei 70°C inaktiviert.

#### 2.16. Reverse Transkription der Total-RNA mittels oligo dT-Primern

Zur Erzeugung eines Templates für die anschließende radioaktive Markierung der mRNA wurde mittels reverser Transkription die mRNA durch oligo dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Für die RT wurden je Probe 10µg Total-RNA (11µl der DNase-Behandlung) eingesetzt. Diese wurde mit 1µg oligo(dT)18-Primer versetzt und mit Wasser auf 16,5µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 70°C für 5min wurde die Probe auf Eis abgekühlt und folgende Reagenzien zugegeben: 6µl 5x Reaktionspuffer, 3µl 10mM dNTP-Mix, 30u RNase-Inhibitor. Anschließend wurde der Ansatz mit DEPC-Wasser auf 28,5µl aufgefüllt und nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurde dem RT-Ansatz 1,5µl (300u) RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas, Vilnius, Litauen) zugegeben. Nach dem Mischen wurde die RT bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Zum Abstoppen dieser Reaktion wurde die Probe für 10min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert.

Für die Gen-Expressionsanalyse mittels Realtime-PCR wurden 500ng Total-RNA nach dem Protokoll des Herstellers mit dem Verso TM SYBR Green 2-Step QRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben.
# 2.17. Herstellung einer $\alpha^{32}$ P-[dCTP] markierten cDNA oder DNA Sonde

Für die Herstellung einer radioaktiven Sonde für die Macroarray-, die Northern- oder die Southern-Blot-Hybridisierung wurde die cDNA bzw. ein PCR-Fragment mit Hilfe des NE-Blot®-Kits (New England Biolabs, Franfurt am Main) mit  $\alpha^{32}$ P-[dCTP] markiert. Bevor die cDNA markiert wurde, musste durch alkalische Lyse die Total-RNA nach Sambrook et al. (2001) hydrolysiert werden.

Die in 30µl gelöste cDNA oder 150ng eines aufgereinigten PCR-Produkts wurde für 5min bei 100°C denaturiert und dann auf Eis abgeschreckt. Nach Zentrifugation wurden 5µl Reaktionspuffer, 6µl dNTP-Mix (ohne dCTP), 1µl DNA PolymeraseI und 50µCi  $\alpha^{32}$ P-[dCTP] zugegeben. In einer anschließenden enzymatischen Reaktion (90min bei 37°C) wurde die cDNA oder das PCR-Fragment in eine  $\alpha^{32}$ P-[dCTP] markierte DNA-Sonde umgeschrieben. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5µl 0,5M EDTA-Lösung wurde die nicht inkorporierte Radioaktivität mit Hilfe einer ProbeQuantTM G-50 Sephadex-Säule (Amersham Biosciences, England) entfernt.

## 2.18. Spotten von PCR-Fragmenten auf eine Nylonmembran

DNA-Fragmente für die Macroarray-Untersuchung wurden mittels einer Standard-PCR unter der Verwendung genspezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Die Konzentration der Genfragmente wurde direkt vom Agarosegel abgeschätzt. 50ng der Genfragmente der Transporter und der Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden in 30µl Volumen mittels dem Minifold Spot-Blot (Whatman® Schleicher & Schuell; Dassel, Deutschland) auf eine Nylonmembran (Nytran SuperCharge, Whatman® Schleicher & Schuell; Dassel, Deutschland) aufgebracht (Tab. 4). Die DNA auf der Membran wurde durch Cross-linken fixiert. Anschließend wurde die DNA für 15min in Denaturierungslösung denaturiert, für ebenfalls 15min neutralisiert und in 2x-SSC gewaschen. ABC-Transporter-Fragmente bcatr

**Tab. 4: Anordnung der Transporter-Genfragmente auf der Nylonmembran.** Von jedem Fragment wurden 50ng PCR-Produkt im Duplikat aufgetragen. Neben den Transportern wurden auch die Positivkontrollen der *Botrytis* Gene für Aktin, Phosphoglyceratkinase, Hexokinase, 18S rDNA und die Negativkontrollen *Vitis* Stilben Synthase, PR1 und PR4 von *Arabidopsis thaliana* mehrfach im Duplikat aufgetragen.

А		В		С		D		F	
	Α		В		С		D		F
G		I		К		0		BMR3	
	G		- 1		K		0	BN	1R3
KL1		KL2		KL3		KL4		KL5	
	KL1	K	L2		KL3		KL4	I	KL5
KL6		KL7		KL8		KL9		KL10	
	KL6	K	L7		KL8		KL9	K	L10
KL11		KL12		KL13	}	KL14	ł	KL15	
ŀ	KL11	KL	.12	l	KL13		KL14	K	L15
KL16	6	KL17		KL18	3	KL19	)		
ł	KL16	KL	.17	I	KL18		KL19		

MFS-Transporter	bcmfs
-----------------	-------

1		5		6	
	1		5		6
7		8		9	
	7		8		9
10		11		12	
	10		11		12
13		14		15	
	13		14		15
16		17		18	
	16		17		18
19		20		21	
	19		20		21

# 2.19. Macroarray-Hybridisierung nach Denhardts

Die Membran wurde zur Hybridisierung in eine vorgewärmte Hybridisierungsröhre mit der **DNA-Seite** innen platziert und mit ebenfalls vorgewärmten nach 15mlPrähybridisierungslösung (Denhardts) benetzt, der zuvor 300µl denaturierte (Inkubation für 10min bei 90°C, anschließend Abkühlung auf Eis) Lachs-DNA zugegeben wurde. Die Prähybridisierung erfolgte bei 65°C für 1-3h. Im Anschluss wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und durch Hybridisierungslösung ersetzt und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde das Sondengemisch aufgefangen und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Anschließend folgten verschiedene stringente Waschschritte. Zuerst wurde die Membran für 5min in Waschlösung1 bei 65°C, dann 30min in Waschlösung2 und für ebenfalls 30min in Waschlösung3 inkubiert. Zur Exposition und Detektion wurden die Membranen in eine Röntgenstrahlungs-Detektions-Kassette (HyperkassetteTM; Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) überführt und mit einem radioaktiv-sensiblen Screen (Multisensitive, Medium, Typ: MS; Perkin ElmerTM life sciences, Boston, USA) abgedeckt. Zur Exposition wurde der Screen im Dunkeln bei RT gelagert. Die Expositionszeit betrug 24-48h. Der Screen konnte mit dem Phosphoimager (CycloneTM Storage Phosphor Screen; Packard Bioscience Company, Dreieich, Deutschland) ausgelesen werden.

Die Auswertung der Expressionslevel der verschiedenen Gene erfolgte mit der Optiquant Software 5.0 (PerkinElmer, USA). Die erhaltenen Daten wurden auf die Aktin-Expression normalisiert.

#### 2.20. Northern- und Southern-Blot-Hybridisierung nach Church

## 2.20.1. Southern-Blot-Hybridisierung

Zur Bestätigung verschiedener Deletionsmutanten und zur Ermittlung der Kopienzahl von bcatrB in wt, MDR1- und MDR3-Stämmen wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurden 5-10µg genomischer DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und auf einem 1-1,5% Agarosegel bei 90V für 1-2h aufgetrennt. Anschließend wurden die doppelsträngigen Restriktionsfragmente mit Denaturierungslösung 2x für 15min denaturiert, kurz in Wasser gewaschen, mit Neutralisierungslösung 2x für 15min neutralisiert und dann in 2x SSC äquilibriert. Der Transfer der denaturierten DNA-Fragmente auf die positiv geladene Nylonmembran (Nytran SuperCharge, Whatman® Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) erfolgte in 20x SSC mittels eines downward Blots.

#### 2.20.2. Northern-Blot-Hybridisierung

Zur Analyse der Genexpression in verschiedenen *B. cinerea*-Stämmen wurden Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. 4-12µg der Total-RNA wurden auf einem einprozentigen denaturierenden Agarosegel bei 90V für 1-2h aufgetrennt. Anschließend wurde das Formaldehyd durch zweimaliges Waschen des Gels in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>Omilli für je 15-20min ausgewaschen. Bevor nun die RNA auf die positiv geladene Nylonmembran (Nytran SuperCharge, Whatman<sup>®</sup> Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) mittels 10x SSC transferiert werden konnte, wurde das Gel in 10x SSC äquilibriert.

#### 2.20.3. Aufbau der RNA/DNA-Transfer-Blots und anschließende Hybridisierung

Zum Transfer der verschiedenen Nukleinsäuren auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde ein downward Blotting durchgeführt. Ein 5cm Stapel an saugfähigen Papiertüchern wurde mit zwei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatman-Papier auf eine feste und waagrechte Arbeitsfläche gelegt. Auf diesen Papierstapel wurden nun in folgender Reihenfolge die jeweils äquilibrierte Nylonmembran, das Agarosegel, zwei Lagen WhatmanPapier und abschließend die Puffertransfer-Brücke, die mit ihren zwei Enden in den Transferpuffer reichte, gestapelt. Um Luftblasen zu entfernen, die den Transfer der Nukleinsäuren stören könnten, wurde zwischen den einzelnen Komponenten des Blots die Luft herausgedrückt und der fertige Blot mit einer Kunststoffplatte abgedeckt und beschwert. Der Nukleinsäure-Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Die Membranen wurden dann für 1-3h in vorgewärmtem Church-Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisiert. Nach dieser Zeit wurde die denaturierte  $\alpha^{32}$ P-[dCTP]-markierte Sonde mit neuem Church-Hybridisierungspuffer zu den Membranen gegeben und für 12-16h bei 65°C hybridisiert. Anschließend folgten verschiedene stringente Waschschritte. Zuerst wurde die Membran für 2-5min in Church-Waschlösung1 gewaschen. Danach wurde die Membran 2x für je 30min in Church-Waschlösung2 gewaschen. Die Detektion der Hybridisierungssignale wurde wie bei der Macroarrayhybridisierung beschrieben durchgeführt. Die Expositionszeit variierte zwischen 1h und 12h.

#### 2.21. Realtime-PCR zur Analyse der Genexpression

Die Realtime-PCR zur Quantifizierung der Genexpression verschiedener Transportergene wurde in 96-Wellplatten mit dem Biorad Realtime iQ5 detection System (Biorad, München) durchgeführt. Ein Realtime-PCR-Ansatz bestand aus  $2\mu$ l 1:5 verdünnter cDNA (5ng Total-RNA), jeweils  $2\mu$ l 2,5pM forward und revers Primern, und dem 2x konzentrierten Reaktionspuffer, der bereits Puffersalze, dNTPs und das Polymerase-Enzym enthielt. Als Referenzgene wurden der Elongationsfaktor *efla* und das Aktingen *act* von *B. cinerea* gewählt.

	5 min.	95℃	erste Denaturierung
Zyklus	15 sek.	95℃	
2-4:45			
	25 sek.	60 <i>°</i> C	Fluoreszenz wird
			gemessen
	35 sek.	72 ℃	Fluoreszenz wird
			gemessen
	1 min.	95℃	
	1 min.	50 <i>°</i> C	Schmelzkurvenanalyse
91 x	10 sek.	↑ 1/2℃	

Tab. 5: Programm für die Realtime-PCR.

Nach der Realtime-PCR wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel auf Identität und genomische DNA-Kontamination hin analysiert.

## Auswertung der Daten

Die Quantifizierung der Daten erfolgte nach Pfaffl (2001). Für die PCR-Effizienz wurde der Faktor 2 gewählt, da die Primereffizienz aller getesteten Kombinationen immer mindestens 90% betrug. Die Primereffizienzen der konstitutiv und stabil exprimierten Kontrollgene *ef1a* und *act* betrugen 93% bzw. 101%.

Relative Expression =  $\frac{(E_{\text{Testgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Testgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$ 

E= Effizienz der PCR CP= "crossing points" Testgen= auf seine Expression hin zu untersuchendes Gen Referenzgen= stabil und konstitutiv exprimiertes Gen Kontrolle= Vergleichsstadium des Organismus Probe= Behandeltes Stadium des Organismus

## 2.22. Microarray-Analyse

Zur globalen Expressionsanalyse aller *Botrytis*-Gene wurde eine Micorarray-Analyse mit zwei sensitiven (B05.10 und 06.6-15) und zwei MDR2-Stämmen (06.2-6 und 06.6-5) durchgeführt. Hierzu wurden 20µg Total-RNA von der Firma Nimblegen (Reykjavik, Island) auf einen 72k Kunden-Microarraychip hybridisiert.

# 2.23. Statistische Auswertung der Daten

Alle Daten wurden mit der T-Test-Analyse-Funktion der Software Excel<sup>®</sup> (Microsoft, USA) auf ihre Signifikanz hin analysiert. Als Vertrauensintervall wurde p<0,05 gewählt.

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Auftreten von MDR bei B. cinerea in französischen und deutschen Weinbaugebieten

In Frankreich wurden Anfang der 1990er Jahre erstmals bei einem Pflanzenpathogen MDR-Phänomene beobachtet (Leroux et al., 1999). *B. cinerea*-Isolate aus Weinbergen der Champagne ließen sich anhand ihrer Fungizidresistenzspektren in drei MDR-Phänotypen einteilen. Zu Beginn der Untersuchung wiesen nur einige wenige Stämme entweder den MDR1(AniR2)- oder den MDR2(AniR3)-Phänotyp auf. Mit der Einführung der Fungizide Fludioxonil, Cyprodinil und Fenhexamid zu Beginn bzw. Mitte der 90iger Jahre begannen diese Stämme immer häufiger aufzutreten, wobei sowohl MDR1- als auch MDR2-Phänotypen etwa gleich oft beobachtet wurden. Mit einer zeitlichen Verzögerung von vier bis fünf Jahren traten dann erstmals MDR3-Stämme auf (Charakterisierung der Fungizidresistenzen siehe nachfolgende Kapitel). Seit 2006 zeigten bereits mehr als 50% der Stämme einen der drei beschriebenen MDR-Phänotypen (Abb. 5, Abb. 7A, P. Leroux und A.S. Walker, unveröffentlicht).



Abb. 7: Verstärktes Auftreten dreier *Botrytis*-MDR-Phänotypen in der Champagne und in deutschen Weinanbaugebieten. (A) Häufigkeit von MDR1- (····), MDR2- (--) und MDR3-Stämmen (-·-) an der Gesamthäufigkeit der MDR (--) in der Champagne (Leroux et al., nicht veröffentlicht; siehe Abb. 5). (B) Häufigkeit der MDR-Phänotypen in deutschen Weinanbaugebieten, 2004 in Freiburg i. Br. (Kretschmer und Hahn, 2008) und 2006 bis 2008 entlang der Deutschen Weinstraße (diese Arbeit).

In einer Studie, durchgeführt 2004 in Freiburg i. Br., zeigte nur etwa ein Prozent der Stämme den MDR1-Phänotyp. Die beiden anderen MDR-Phänotypen wurden damals nicht beobachtet (Kretschmer und Hahn, 2008). Zu diesem Zeitpunkt waren die MDR-Phänomene im deutschen Weinbau anscheinend noch relativ selten. Durch das Fungizidresistenz-Monitoring entlang der Deutschen Weinstraße wurden in den Jahren 2006 bis 2008 *Botrytis*-Stämme, die einen der aus Frankreich beschriebenen MDR-Phänotypen aufwiesen, immer häufiger beobachtet (Abb. 7B). Im Unterschied zur Champagne wurden in der Pfalz fast ausschließlich MDR1-Phänotypen vorgefunden. Dieser Phänotyp war in den Jahren 2006 bis 2008 mit

Anteilen von 17%, 31% und 28% an der Gesamtpopulation vertreten. Die anderen MDR-Phänotypen waren nur selten anzutreffen. 2008 zeigten acht Prozent der Stämme den MDR2-Phänotyp (Abb. 7B). Insgesamt lässt sich jedoch, wie in der Champagne, auch entlang der Deutschen Weinstraße ein kontinuierlicher Trend zur Akkumulation von MDR-Phänotypen beobachten, wobei 2008 bereits 38% der Gesamtpopulation einen MDR-Phänotyp zeigten.

#### 3.2. Einzelresistenzen der Botrytis-Population entlang der Deutschen Weinstraße

In den Jahren 2006, 2007 und 2008 wurden an sechs Standorten (Abb. 6) entlang der Deutschen Weinstraße die Fungizidresistenzspektren von 170, 144 und 187 *B. cinerea*-Stämmen ermittelt.

Jeweils nur 5-10 Prozent der Stämme zeigten im Mittel der Jahre eine hohe Resistenz gegen Carbendazim, Cyprodinil, Fenhexamid bzw. Boscalid. Gegen Iprodion, Fludioxonil und Tebuconazol waren nur selten oder überhaupt keine hoch resistenten Stämme zu beobachten. Insgesamt lässt sich feststellen, dass nur geringe Raten an Einzelresistenzen in den Jahren 2006-2008 beobachtet werden konnten (Abb. 8).



Abb. 8: Fungizidresistenzen von *B. cinerea* entlang der Deutschen Weinstraße in den Jahren 2006 (□), 2007 (■) und 2008 (■). Es wurden die Gesamthäufigkeiten an Einzelresistenzen gegen Carb= Carbendazim; Cyp= Cyprodinil; Fen= Fenhexamid; Bos= Boscalid; Ip= Iprodion; Flu= Fludioxonil; Teb= Tebuconazol und die vorgefundene Häufigkeit an MDR-Phänotypen dargestellt.

Für das 2004 eingeführte Fungizid Boscalid wurden von 2006 bis 2008 vermehrt hochresistente Stämme beobachtet. Im Jahr 2006 waren nur drei Prozent der Population, 2007 bereits neun und 2008 sogar 13% der Stämme Boscalid-resistent. Dies lässt auf eine häufigere Verwendung dieses Fungizids seit Einführung auf dem Markt und damit verbunden eine starke Selektion von Boscalid-resistenten Stämmen schließen.

Die MDR stellt entlang der Deutschen Weinstraße den häufigsten Resistenzmechanismus dar (Abb. 8).

## 3.3. EC<sub>50</sub>-Resistenzwerte der *B. cinerea*-Stämme

Man unterscheidet Resistenzen gegen einen Wirkstoff, die zu einer sehr hohen Resistenz (Faktor 1000x) führen können, von der im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Multidrug Resistenz (MDR), einer gleichzeitigen Resistenz gegen verschiedene Wirkstoffe (Ghannoumi und Rice, 1999).

In Tabelle 6 sind die Fungizidresistenzlevel gezeigt, anhand derer deutsche und französische Isolate in sensitive, einzelresistente oder in MDR-Stämme eingeteilt wurden.

Die basale Fungizidsensitivität der Population entlang der Deutschen Weinstraße zeigte, dass *Botrytis*-Stämme sehr empfindlich gegenüber den Fungiziden Cyprodinil, Fludioxonil, Carbendazim, Fenhexamid und Boscalid waren. Weniger wirksame Wirkstoffe waren Tolnaftat, Tebuconazol, Azoxystrobin, Iprodion, das Antibiotikum Cycloheximid und die pflanzlichen Abwehrstoffe Camalexin und Eugenol (Tab. 6).

Einige Isolate weisen eine Resistenz gegen ein einzelnes Fungizid auf (z.B. Target Site Resistenz). Diese Stämme waren in der Lage, die in Tabelle 6 aufgeführten Wirkstoffkonzentrationen zu überleben. Einzelresistenzen gegen Fenhexamid oder Carbendazim führten zu einer Erhöhung der Toleranz im Vergleich mit sensitiven Stämmen von mindestens einhundertfach. Bei Cyprodinil-resistenten Stämmen überschritt der Resistenzfaktor das Achthundertfache.

Die in Frankreich und Deutschland vorkommenden MDR-Isolate ließen sich durch ihre Fungizidresistenzlevel in drei MDR-Phänotypen unterscheiden (Tab. 6).

Der MDR1(AniR2)-Phänotyp zeigte im Vergleich mit sensitiven Stämmen eine erhöhte Toleranz gegenüber Tolnaftat, Cyprodinil, Fludioxonil und Carbendazim und nur leicht erhöhte Toleranzen gegenüber Fenhexamid, Boscalid, Iprodion und gegen die pflanzlichen Abwehrstoffe Eugenol und Camalexin. MDR2(AniR3)-Stämme wiesen in der Regel erhöhte Resistenzlevel gegenüber Tolnaftat, dem Antibiotikum Cycloheximid, Fenhexamid, Cyprodinil, Iprodion und Fludioxonil auf. Außerdem konnten leicht erhöhte Toleranzen gegenüber Boscalid, Tebuconazol und Azoxystrobin beobachtet werden.

Die MDR3-Stämme waren besonders resistent gegen Tolnaftat, Fludioxonil, Fenhexamid, Cyprodinil und Cycloheximid. Bei diesen Substanzen überschritt die Resistenz im Vergleich mit sensitiven Stämmen den Faktor zehn. Bei Iprodion, Carbendazim, Boscalid, Tebuconazol, Azoxystrobin und den pflanzlichen Abwehrstoffen Eugenol oder Camalexin bewegten sich die Resistenzfaktoren zwischen 1,1 und 6,4. Die MDR3-Stämme zeigten im Vergleich mit sensitiven Stämmen das am weitesten gefächerte Fungizidresistenzspektrum mit den höchsten beobachteten Fungizidresistenzleveln. MDR3-Stämme wiesen die vereinigten Fungizidresistenzspektren der MDR1- und MDR2-Stämme auf.

**Tab. 6: EC**<sub>50</sub>-Werte von je fünf sensitiven, MDR1(AniR2)-, MDR2(AniR3)- und MDR3-Stämmen. Die analysierten Stämme stammen aus Frankreich (Anne-Sophie Walker, INRA Versailles) und Deutschland. Stämme aus den beiden Ländern unterscheiden sich nicht in ihren Resistenzwerten. Alle in dicker Schrift aufgeführten Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich zu Werten der sensitiven Stämme (p<0,05). Zusätzlich rot eingefärbte Werte überschreiten den Resistenzfaktor fünf. Die Standardabweichungen sind angegeben. Wirkstoffabkürzungen: Cyp= Cyprodinil; Flu= Fludioxonil; Fen= Fenhexamid; Carb= Carbendazim; Ip= Iprodion; Tol= Tolnaftat; Cyc= Cycloheximid; Bos= Boscalid; Teb= Tebuconazol; Azo= Azoxystrobin; Eug= Eugenol; Cam= Camalexin (für Camalexinwerte siehe Stefanato et al., 2009); sens.= sensitive Stämme ohne jegliche Fungizidresistenz; TSR= Einzelresistenz; PH= Phytoalexine; AB= Antibiotikum; n.t.= nicht getestet.

Phänotyp	EC <sub>50</sub> -Wert [μg ml <sup>-1</sup> ]											
				F	ungizid	le				PH		AB
	Flu	Fen	Сур	Carb	Bos	lp	Teb	Tol	Azo	Eug	Cam	Сус
sens.	0,03 ±0,01	0,05 ±0,01	0,01 ±0,00	0,04 ±0,01	0,08 ±0,01	1,03 ±0,08	0,66 ±0,31	0,65 ±0,08	0,84 ±0,20	<b>81,6</b> ±4,15	8,7± 0,34	<b>3,2</b> ±0,68
TSR	>3	>5	4-5	>5	>5	>5	5-7	>5	>15	n.t.	n.t.	n.t.
	Res	istenzfa	aktor al	s Vielfa	aches d	ler EC <sub>5</sub>	o-Werte	e sensit	iver Sta	ämme		
MDR1	<b>8,1</b> ±1,3	1,6 ±0,5	<b>18,2</b> ±4,5	<b>2,8</b> ±0,2	<b>1,6</b> ±0,2	<b>1,4</b> ±0,3	0,7 ±0,4	<b>20,4</b> ±2,3	1,0 ±0,2	<b>1,1</b> ±0,0	<b>1,3</b> ±0,1	0,7 ±0,1
MDR2	<b>2,6</b> ±0,3	<b>9,8</b> ±0,6	<b>6,2</b> ±2,8	<b>1,1</b> ±0,1	<b>2,0</b> ±0,8	<b>5,4</b> ±1,0	<b>1,8</b> ±0,2	>25	<b>1,5</b> ±0,3	<b>1,0</b> ±0,0	n.t.	<b>13,7</b> ±1,5
MDR3	<b>11,4</b> ±1,9	<b>14,7</b> ±3,2	<b>25,7</b> ±5,2	<b>3,1</b> ±0,5	<b>3,5</b> ±0,9	<b>6,4</b> ±1,0	<b>2,3</b> ±0,6	>25	<b>1,6</b> ±3,4	<b>1,1</b> ±0,0	n.t.	<b>14,1</b> ±0,3

Die in Frankreich und Deutschland vorkommenden MDR-Stämme wiesen keine sehr hohen Resistenzlevel (bis zu 25x) auf und zeigten ein sehr breites, sich zum Teil überlappendes, Resistenzspektrum.

Deutsche und französische MDR-Stämme ließen sich phänotypisch anhand der Fungizidresistenzspektren und –level nicht voneinander unterscheiden. Die in Frankreich und Deutschland auftretenden MDR-Phänotypen sind also identisch.

# 3.4. Häufigkeit der Fungizidresistenzen an den Probenahmestandorten

Fungizidresistenzen, z.B. gegen Carbendazim, Cyprodinil und Fenhexamid, waren fast immer mit geringen, jedoch von Jahr zu Jahr schwankenden Raten an allen Standorten vorzufinden (Abb. 9A). Es gab auch Fungizidresistenzen, die nur einmal z.B. gegen Tebuconazol im Jahr 2008 am Standort fünf oder relativ selten an wechselnden Standorten, wie z.B. die Iprodion-Resistenz, beobachtet wurden. Hochresistente Stämme gegen Fludioxonil traten nie auf. Die Boscalid-Resistenz war 2006 nur an drei Standorten im Jahr 2007 an vier und 2008 an allen sechs Standorten zu beobachten. Die Resistenz gegen Boscalid nahm also zu und breitete sich aus, allerdings gab es zwischen den Jahren an einem Standort teilweise erhebliche Schwankungen. Am Standort eins z.B. waren in den Jahren von 2006 bis 2008 6,7%, 35,3% bzw. 3,3% der gesammelten *Botrytis*-Stämme hochresistent gegen Boscalid.

Hochresistente Isolate waren daher nicht über das gesamte Beprobungsgebiet gleichmäßig häufig zu beobachten (Abb. 9A).



Abb. 9: Auftreten von Einzelresistenzen und MDR-Phänotypen an den Beprobungsstandorten entlang der Deutschen Weinstraße in den Jahren 2006 bis 2008.
(A) Häufigkeit von Einzelresistenzen gegen Carbendazim (■); Fenhexamid (■); Cyprodinil (■); Boscalid (■); Iprodion (■); sensitiv (□). (B) Verbreitung der MDR-Phänotypen entlang der Deutschen Weinstraße: sensitiv (□); MDR1 (■); MDR2 (■); MDR3 (■).

Von den MDR-Phänotypen konnte der MDR1-Phänotyp immer an allen Standorten nachgewiesen werden, er war also in der Population sehr weit verbreitet. MDR2-Phänotypen wurden 2006 nur an drei Standorten, 2007 nur an einem Standort und 2008 an fünf Standorten nachgewiesen. Der MDR2-Phänotyp scheint sich langsam auszubreiten und erreichte 2008 mit acht Prozent an der Gesamtpopulation erstmals erhöhte Häufigkeiten. MDR3-Stämme wurden in allen Jahren nur relativ selten und punktuell beobachtet (Abb. 9B).

#### 3.5. Kombination von Fungizidresistenzmechanismen

Die Kombination verschiedener Einzelresistenzen konnte wie bei Myresiotis et al., 2007 beschrieben, ebenfalls beobachtet werden, war jedoch selten und umfasste nie mehr als zwei Fungizide. MDR-Stämme zeigten maximal zwei weitere Einzelresistenzen. MDR1-Stämme wiesen häufiger eine Carbendazim- oder Fenhexamid-Resistenz auf. Auch Resistenzen gegen Iprodion oder Boscalid waren manchmal mit dem MDR1-Phänotyp einhergehend. Bei MDR2-Stämmen wurde sowohl bei allen Stämmen aus 2006 als auch 2007 gleichzeitig eine Carbendazim-Resistenz beobachtet. 2008 trat bei 60% der gefundenen MDR2-Stämme diese Resistenz nicht mehr auf. MDR3-Stämme zeigten selten eine weitere Einzelresistenz. Nur 2008 waren 50% der Stämme gleichzeitig resistent gegen Carbendazim (Tab. S5).

## 3.6. Genetische Diversität der MDR-Stämme

Um zu untersuchen, ob sich MDR-Stämme hauptsächlich asexuell, also als Klone verbreiten, wie es für das Pathogen *Puccinia striiformis f.sp. tritici* in Europa beschrieben wurde (Hovmøller et al., 2002; Brown und Hovmøller, 2002), sollte deren genetische Diversität analysiert werden. *B. cinerea*-Freiland-Populationen sind generell bekannt für ihre hohe genetische Diversität (Giraud et al., 1997; Moyano et al., 2003; Kretschmer und Hahn, 2008). Zeigt sich in der Population eine geringe Häufigkeit an Klonen, kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen, die zu den MDR-Phänotypen führen, mehrfach unabhängig entstanden sind.

**Tab. 7: Genetische Muster der aus der Pfalz stammenden sensitiven und MDR-Stämme.** PCR-RFLP-Analyse der IGS (intergenic spacer) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Hinf*I (nach Kretschmer und Hahn, 2008) und Mating Typ-Analyse. sens.= sensitive Stämme; -= nicht aufgetretene Muster.

Ge	netische	Marker	Häufigkeit der Phänotypen [%]									
IGS	IGS Mating Typ		sens.		MDR1		MDR2		MDR3			
<i>Bam</i> HI	Hinfl	Mat : HMG	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007		
			n=31	n=24	n=26	n=42	n=4	n=1	n=3	n=1		
0	0	0:1	-	8,3	3,9	4,8	-	-	-	_		
0	0	1:0	-	-	3,9	7,1	-	-	-	-		
0	2	0:1	3,2	4,2	-	2,4	-	-	-	-		
0	3	1:0	-	-	3,9	-	-	-	-	-		
0	5	0:1	-	8,3	-	-	-	-	-	-		
0	5	1:0	-	8,3	7,7	4,8	-	-	-	-		
0	12	0:1	-	-	-	2,4	-	-	-	-		
0	12	1:0	3,2	-	-	-	-	-	-	-		
1	0	0:1	16,1	29,2	3,9	19,0	-	-	-	-		
1	0	1:0	19,4	20,8	19,2	16,7	-	-	-	-		
1	1	1:0	-	-	3,9	-	-	-	-	-		
1	2	0:1	32,3	16,7	26,9	35,7	75,0	100	33,3	100		
1	2	1.0	19,4	-	23,1	7,1	25,0	-	66,7	-		
1	8	0:1	-	-	3,9	-	-	-	-	-		
1	8	1:0	6,5	-	-	-	-	-	-	-		
1	12	1:0	-	4,2	-	-	-	-	-	-		

2006 konnten die sensitiven Stämme in sieben und die MDR1-Stämme in zehn Klassen unterteilt werden. Die MDR2 und MDR3-Stämme ließen sich mit diesen Markern nur in zwei Klassen einteilen. 2007 zeigten die sensitiven Stämme acht, die MDR1- neun und die MDR2- und MDR3-Stämme nur je ein genetisches Muster (Tab. 7). Mit diesen drei genetischen Markern war es möglich, sowohl die sensitiven, als auch die MDR1-Stämme in verschiedene Gruppen einzuteilen, während sich die MDR2- und MDR3-Populationen nicht gut differenzieren ließen.

Die MDR-Stämme, vor allem die MDR1-Phänotypen, sind also genetisch divers und haben sich nicht nur durch Klone in der Population verbreitet. Es ist deshalb davon auszugehen, dass sich Mutationen, die zum MDR1-Phänotyp führen, mehrfach unabhängig ereignet haben. Mutationen, die zum MDR2-Phänotyp führen, scheinen sich seltener ereignet zu haben. Allerdings waren die Stichproben zu gering um eine endgültige Aussage treffen zu können.

#### 3. 7. Molekulare Grundlage der MDR in B. cinerea-Freilandisolaten

Die Herangehensweise an diese Untersuchung umfasste den Nachweis des verstärkten Fungizidexports bei MDR-Stämmen, Identifikation der überexprimierten Transportergene in den MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämmen, Herstellen eines Zusammenhangs zwischen Überexpression und MDR-Phänotyp durch Deletionsmutanten und Analyse der Regulation der Transportergene um die Mutationen, die zur Transporterüberexpression führen, zu identifizieren.

#### 3.7.1. Untersuchungen zur Fungizidakkumulation

Durch Fungizidaufnahmeversuche mit <sup>14</sup>C-markiertem Fludioxonil sollte angelehnt an die Arbeiten um Maarten de Waard (Hayashi, et al., 2001; Hayashi et al., 2002b) gezeigt werden, dass die beobachteten MDR1-Phänotypen erstens eine geringere Akkumulation des Fungizids zeigen und zweitens, dass die Veränderungen der Fungizidakkumulation auf einen energieabhängigen Exportprozess zurückzuführen sind.

Sensitive Stämme zeigten nach Fungizidzugabe anfangs eine starke Akkumulation des Wirkstoffs (Abb. 10). Nach etwa 20 Minuten nahm die Fungizidakkumulation wieder stark ab und erreichte nach 60 Minuten einen basalen Wert. Diese transiente Fungizidakkumulation in sensitiven Stämmen deutet auf die Induktion von Exportsystemen nach Fungizidzugabe hin. Nach der Induktion und der Synthese der Transporterproteine wird das Fungizid exportiert. Nach etwa 20 Minuten ist die Exportkapazität höher als der Fungizideinstrom. Die

Fungizidkonzentration sinkt und es stellt sich ein Gleichgewicht von Einstrom und Export ein. Im Gegensatz zur transienten Aufnahme zeigten MDR1-Isolate von Anfang an eine geringe Fungizidakkumulation (Abb. 10). Dies deutet auf eine konstitutive Überexpression von Exportsystemen in MDR1-Stämmen hin, die eine Fungizidakkumulation von Anfang an unterbindet. Durch CCCP-Zugabe stieg die Fungizidkonzentration bei allen Stämmen stark an. Die Entkopplung der Atmungskette reduzierte die ATP-Konzentration, wodurch der Fungizidexport verringert wurde. Dies zeigt die Energieabhängigkeit der Fungizidexportprozesse.



Abb. 10: Fungizidakkumulationsversuch mit <sup>14</sup>C-markiertem Fludioxonil, durchgeführt mit einem sensitiven (—) Laborstamm und zwei MDR1-Freilandisolaten (·····/---). Nach 90min wurde CCCP; ein Protonophor; zugegeben. Die Standardabweichungen sind angegeben (durchgeführt von H.j. Schoonbeek).

Für MDR2-Stämme konnte von A. Mosbach durch Fungizidakkumulations-Untersuchungen mit Bitertanol und Cyproconazol ebenfalls ein verstärkter Export nachgewiesen werden.

Diese Analysen zeigten, dass die MDR-Phänotypen bei *B. cinerea* auf einen verstärkten Export zurückzuführen sind.

## 3.7.2. Suche nach MDR-assoziierten Effluxtransporter-Genen

Durch die 2006 durch das Broad Institut (www.broad.mit.edu/annotation/ genome/botrytis\_cinerea/) veröffentlichte Annotation des *B. cinerea*-Genoms (B05.10) wurde die Grundlage für die Identifikation der ABC- und MFS-Transporter aus *B. cinerea* gelegt. Mit verschiedenen bioinformatischen Suchalgorithmen (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/; www.tcdb.org; www.godatabase.de) wurden im *B. cinerea*-Genom ABC- und MFS-Transporter identifiziert und deren putative Funktion ermittelt. Im *B. cinerea* B05.10-Genom konnten so 42 putative ABC- und 294 putative MFS-Transporter identifiziert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit zu bereits bekannten MDR-relevanten Transportproteinen konnten 29 putative MDR-relevante ABC- und 82 MDR-relevante MFS-Transporter extrahiert werden. Um an der MDR beteiligte Transportproteine zu identifizieren wurde eine Macroarray-Untersuchung mit einer Auswahl an putativen MDR-relevanten Exportern durchgeführt.

	ser	ısitiv	MI	DR1	MDR2	MDR3
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	unbehandelt
ABC- Transporter		bcatrB				
MFS- Transporter					bcmfs19	$\odot$

Abb. 11: Expression der 29 ABC- und der 18 MFS-Transportergene bei sensitiven (n=4), MDR1- (n=5), MDR2- (n=3) und MDR3-Stämmen (n=3). Bei den ABC-Transportern ist *bcatrB* und bei den MFS-Transportern *bcmfs19* hervorgehoben. Die Expression der Gene wurde in Duplikaten untersucht. Bei drei sensitiven und zwei MDR1-Stämmen wurde eine Fungizidbehandlung (je 0,1 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Fludioxonil, Fenhexamid, Cyprodinil) durchgeführt. Die Expressionsmuster der analysierten Kontrollgene sind nicht gezeigt. Auftragung der PCR-Fragmente siehe Tab. 4.

In MDR1-Isolaten wurde der ABC-Transporter *bcatrB* als konstitutiv stark überexprimiert identifiziert (Abb.11). Allerdings zeigten auch andere ABC-Transportergene (*bcatrK*, *bmr3*, *bcatrD* und *bcatrF*) eine leicht konstitutive Überexpression (Abb.12). Der identifizierte ABC-Transporter *bcatrB* war in sensitiven Stämmen durch eine Fungizidbehandlung ebenfalls induzierbar. In MDR2-Stämmen wurde der MFS-Transporter *bcmfs19* als konstitutiv überexprimiert identifiziert (Abb. 11). Eine Fungizidbehandlung mit einer Mischung bestehend aus Fludioxonil, Fenhexamid und Cyprodinil reprimierte in MDR2-Stämmen dieses Transportergen (Daten nicht gezeigt).

Die MDR3-Stämme zeigten eine konstitutive Überexpression der aus MDR1- und MDR2-Stämmen identifizierten Transporter *bcatrB* und *bcmfs19* (Abb. 11, Abb. 12). Im weiteren Verlauf der Arbeit bestätigte sich der MFS-Transporter *bcmfs19* als Auslöser des MDR2-Phänotyps nicht.



von vier unbehandelten sensitiven (■), fünf MDR1- (□), drei MDR2- (■) und drei MDR3- (■) Stämmen. Für differenziell exprimierte Gene wurden die Standardabweichungen angegeben. Die Expressionslevel der Positiv- und Negativkontrollen, außer für Aktin (act), sind nicht gezeigt.

# 3.8. Charakterisierung der identifizierten Efflux-Transporter

# 3.8.1. Der ABC-Transporter BcatrB als Auslöser des MDR1-Phänotyps

# 3.8.1.1. Northern- und Realtime-PCR-Expressionsanalysen von bcatrB

In verschiedenen MDR1- und MDR3-Stämmen wurde durch die Macroarray-Analyse *bcatrB* als konstitutiv stark überexprimiert identifiziert. Diese Ergebnisse konnten durch Northern-Blot-Hybridisierung und Realtime PCR-Analyse bestätigt werden (Abb. 13).



Abb. 13: Expression des ABC-Transporters *bcatrB* in sensitiven, MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämmen. Eine Fludioxonilbehandlung (+;  $1\mu g ml^{-1}$  für 30min) wurde bei sensitiven und MDR1-Stämmen durchgeführt. (A) Northern-Blot-Analyse der Expression von *bcatrB*. Je 4µg Total-RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stamm aufgetragen. (B) Realtime-PCR-Analyse der Expression von *bcatrB* von je drei Stämmen. (---)= Schwelle bei zweifach erhöhter Expression im Vergleich zur Genexpression in unbehandelten sensitiven Stämmen. Die Expressionswerte wurden mit *ef1a* und *act* normalisiert und auf die Expression in unbehandelten sensitiven Stämmen. (C) Zeitliche Expression von *bcatrB* in einem sensitiven und einem MDR1-Stamm. Total-RNA-Menge wie bei A beschrieben.

Bei sensitiven und MDR2-Stämmen war ohne Induktion keine Expression des *bcatrB*-Gens zu beobachten. Nach Induktion mit dem Wirkstoff Fludioxonil (1 $\mu$ g ml<sup>-1</sup> für 30min) wurde dieser Transporter in sensitiven Stämmen jedoch sehr stark exprimiert (Abb. 13A). Eine Realtime PCR-Analyse ergab eine Induktion der Expression von *bcatrB* in sensitiven Stämmen nach Fludioxonilbehandlung von 306±31. MDR1-Stämme zeigten eine leicht

konstitutive Expression dieses Gens, um den Faktor 40±6 höher als bei sensitiven Isolaten, wobei bei MDR3-Stämmen jedoch eine konstitutive Überexpression von 141±21 im Vergleich mit sensitiven Stämmen zu beobachten war (Abb. 13A, Abb. 13B). Wie sensitive Stämme sind auch MDR1-Stämme durch eine Fungizidinduktion zusätzlich noch in der Lage, die Expression des Transporters um etwa 225±43 zu steigern. Jedoch ist diese Induktion geringer als bei sensitiven Stämmen (Abb. 13B).

Da sich der MDR-Phänotyp besonders stark in der Keimungsphase der Sporen ausprägt (Leroux et al., 1999) wurde angenommen, dass auch zu diesem Zeitpunkt die Expression von *bcatrB* besonders hoch ist. Durch die Northern-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass in sensitiven Stämmen bereits in ungekeimten Sporen das *bcatrB* Transkript vorliegt. Jedoch verringerte sich die Menge dieses Transkripts während der Keimung und des Myzelwachstums. In MDR1-Stämmen war dagegen eine kontinuierliche Steigerung der Transkriptmenge von der Spore, über die Keimung bis hin zum Myzelwachstum zu beobachten (Abb. 13C). Die stärkste Expression von *bcatrB* in MDR1-Stämmen ist demnach in der Myzelphase zu beobachten.

## 3.8.1.2. Induktionsmuster von *bcatrB* in sensitiven Stämmen

Um das Induktionsspektrum von *bcatrB* zu untersuchen wurde die Induktion des Transportergens im Laborstamm B05.10 mit folgenden Substanzen getestet: Fludioxonil, Cyprodinil, Iprodion, Carbendazim, Fenhexamid, Boscalid, Tebuconazol, Wasserstoffperoxid und Cycloheximid. Ungekeimte Sporen zeigten eine leichte Expression von *bcatrB* (Abb. 13C). Wenn allerdings die Keimung induziert wurde, war keine Expression von *bcatrB* mehr zu beobachten. Die besten Induktoren für *bcatrB* waren Fludioxonil, Cyprodinil, gefolgt von Iprodion, Fenhexamid, Tebuconazol und Cycloheximid (Abb. 14).

B05.10									
16h	Flu	Сур	lp	Carb	Fen	Bos	Teb	$H_2O_2$	Сус
							<b>W</b>		
]]	T	=	2	H	2	H	E		ji

Abb. 14: Expression von *bcatrB* nach Fungizidbehandlung. Je 4µg Total-RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stadium aufgetragen. 16h= Anzucht der Keimlinge nach Methode 2; alle Behandlungen wurden 30min mit diesem Stadium durchgeführt. Flu= Fludioxonil, Cyp= Cyprodinil, Carb= Carbendazim, Fen= Fenhexamid und Bos= Boscalid wurden mit 1µg ml<sup>-1</sup> behandelt; Ip= Iprodion und Teb= Tebuconazol mit 10µg ml<sup>-1</sup>; Cycloheximid mit 70µg ml<sup>-1</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 0,05%.

Obwohl Carbendazim aufgrund des MDR1-Phänotyps als Substrat von BcatrB postuliert wurde (Tab. 6), stellt es keinen Induktor von *bcatrB* dar. Auch Boscalid und Wasserstoffperoxid führten nicht zu einer substratspezifischen *bcatrB* Induktion. Andererseits konnte durch Cycloheximid *bcatrB* induziert werden, obwohl für diese Substanz anhand des MDR1-Phänotyps kein Transport nachweisbar war.

## 3.8.1.3. Deletion von *bcatrB* in MDR1-Stämmen

Um nachzuweisen, dass die Überexpression des ABC-Transporters *bcatrB* für den MDR1-Phänotyp verantwortlich ist, wurde *bcatrB* in zwei MDR1-Stämmen deletiert. Das verwendete Deletions-Konstrukt ist in Abb. 15A dargestellt.



Abb. 15: Konstrukt zur Deletion des *bcatrB* Transporters in MDR1-Freilandisolaten. (A) Mit den Primern P1: BcatrB\_f und P3: BcatrB\_r wurde das Konstrukt (*oliC*= Promotor; *hph*= Hygromycinphosphotransferase; *tubB*= Tubulin Terminator) aus einer bereits existierenden *bcatrB* Deletionsmutante des sensitiven Laborstamms B05.10 amplifiziert (Schoonbeek et al., 2001). Durch eine Reamplifikation mit den Primern P2: BcatrB\_f\_nes und P3: BcatrB\_r\_nes wurde das zu transformierende Endkonstrukt erzeugt (Wiwiorra, 2007). Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: E= EcoRI; X= XbaI; B= BamHI; S= SaII; Mit dem abgebildeten Sondenfragment wurde die Deletion des *bcatrB*-Gens verifiziert. (B) Southern-Blot-Hybridisierung der Deletionsmutanten. Die 1259bp große Sonde wurde mit den Primern BcatrB-southern\_f und BcatrB-southern\_r amplifiziert. Je 10µg gDNA eines Stamms wurde mit *Eco*RI und *Bam*HI restriktionsverdaut. Für wt Stämme wurde ein Fragment von 3420bp und für Deletionsmutanten von 2189bp erwartet. M= 1kb Marker; MDR1 wt= Stamm 06.5-16 und ko1-3 unabhängige Deletionsmutanten; MDR1 wt2= Stamm 06.3-27 und ko1 dessen Deletionsmutante. sens.wt-wt3= sensitive Stämme B05.10, 06.2-15 und 06.6-15; MDR1= Stamm MK375 und MDR3= Stamm 06.7-39.

Die Fungizidsensitivität der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten ging für die Fungizide Carbendazim, Cyprodinil und Tolnaftat auf die basale Empfindlichkeit von sensitiven Isolaten zurück. Für die Fungizide Fludioxonil, Fenhexamid und Iprodion wurde eine Hypersensitivität (Faktor 3x, 2x, bzw. 2,5x) festgestellt (Tab. 8). Bei Boscalid, Tebuconazol und Azoxystrobin war keine Veränderung der Fungizidsensitivität zwischen den MDR1-Elternstämmen und den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten zu beobachten. Auch die erhöhte Resistenz der MDR1-Elternstämme gegenüber pflanzlichen Abwehrstoffen wurde aufgehoben, wobei auch hier für Eugenol und Camalexin eine stärkere Empfindlichkeit als bei sensitiven Isolaten festgestellt wurde (Tab. 8). Eine Veränderung der Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Cycloheximid war bei den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten im Vergleich zu den MDR1-Elternstämmen nicht zu beobachten.

**MDR1-Elternstämme** Tab. 8: EC<sub>50</sub>-Werte der und der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten. Alle in dicker Schrift aufgeführten Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich Werten der MDR1-Elternstämme zu den (p<0,05). Die Standardabweichungen sind angegeben. Wirkstoffabkürzungen siehe Tab. 6. n.t.= nicht getestet.

Phänotyp		EC <sub>50</sub> -Wert [μg ml <sup>-1</sup> ]										
				Fι	ungizide	е				Р	Н	AB
	Flu	Fen	Сур	Carb	Bos	lp	Teb	Tol	Azo	Eug	Cam	Сус
sens.	<b>0,03</b> ±0,01	0,05 ±0,01	0,006 ±0,00	0,04 ±0,01	0,08 ±0,01	1,03 ±0,08	<b>0,66</b> ±0,31	0,65 ±0,08	0,84 ±0,20	81,6 ±4,2	8,7 ±0,3	3,2 ±0,7
MDR1 06.5-16	<b>0,31</b> ±0,01	0,08 ±0,02	0,039 ±0,01	0,11 ±0,00	0,16 ±0,02	1,45 ±0,2	0,19 ±0,06	17,8 ±1,00	0,82 ±0,15	92,5 ±2,4	10,9 ±0,1	<b>3,0</b> ±0,5
∆ <i>bcatrB</i> 1-3	<b>0,01</b> ±0,00	<b>0,02</b> ±0,00	<b>0,004</b> ±0,00	<b>0,05</b> ±0,00	0,14 ±0,03	<b>0,37</b> ±0,08	0,19 ±0,02	<b>0,48</b> ±0,04	0,85 ±0,02	<b>71,1</b> ±1,4	<b>6,5</b> ±0,2	<b>3,0</b> ±0,3
										<b>I</b>		
MDR1 06.3-27	0,27 ±0,01	0,05 ±0,01	0,336 ±0,00	0,10 ±0,01	0,13 ±0,00	0,70 ±0,05	0,16 ±0,00	<b>9,27</b> ±1,30	0,87 ±0,22	94,3 ±0,01	n.t.	n.t.
∆bcatrB	<b>0,01</b> ±0,00	<b>0,03</b> ±0,00	<b>0,006</b> ±0,00	<b>0,04</b> ±0,02	0,14 ±0,01	<b>0,40</b> ±0,01	0,19 ±0,01	<b>0,45</b> ±0,05	0,85 ±0,06	<b>64,2</b> ±3,4	n.t.	n.t.

Durch die Deletion des ABC-Transportergens *bcatrB* in zwei unabhängigen MDR1-Freilandisolaten (Wiwiorra, 2007) konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieses Transporters alleinig für den beobachteten MDR1-Phänotyp verantwortlich ist (Tab. 8).

Bei einer Fungizidakkumulationsuntersuchung zeigten die MDR1 bcatrB Deletionsmutanten einen starken Anstieg der Fungizidkonzentration, die auf einem hohen Niveau stagnierte. Es war keine transiente Fungizidaufnahme, wie sie bei sensitiven Stämmen beobachtet wurde, sichtbar. Der MDR1-Elternstamm zeigte nur eine geringe Fungizidakkumulation auf niedrigem Niveau (Abb. 16).



Abb. 16: Fungizidakkumulationsversuch mit <sup>14</sup>C-markiertem Fludioxonil, durchgeführt mit dem MDR1-Stamm 06.5-16 (—) und zweier MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten (---). Standardabweichungen sind angegeben (durchgeführt von H.j. Schoonbeek).

Da in den Deletionsmutanten die Fungizidkonzentrationen auf einem hohen Akkumulationslevel verweilen, kann davon ausgegangen werden, dass BcatrB eines der wichtigsten Exportsysteme für Fludioxonil darstellt.

### 3.8.1.4. Suche nach Mutationen, die zur Überexpression von bcatrB führen

Unter nicht induzierenden Bedingungen sind Gene für ABC-Transporter auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert (Abb. 13). Bei einer Stimulation in Form bestimmter toxischer Substanzen werden sie in kurzer Zeit stark exprimiert (Abb. 13B). Diese Induktion wird durch regulatorische Mechanismen kontrolliert.

Für eine Überexpression eines Transportergens gibt es folgende Ursachen: 1. Gen-Amplifikation, 2. Promotormutationen und 3. Mutationen in regulatorischen Proteinen.

Aus Krebszellen ist die Genamplifikation bekannt (Cole et al., 1992). Dies konnte durch die Southern-Blot-Hybridisierung als Ursache für die Überexpression von *bcatrB* in MDR1- und MDR3-Stämmen ausgeschlossen werden (Abb. 15B).

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer konstitutiven Überexpression des Transporters führen könnte, sind Veränderungen im Promotorbereich des Gens, wie sie beispielsweise für eine erhöhte Expression einer Cyp-P450-Monooxigenase bei der Azolresistenz von *Moninilia* und *Penicillium* beschrieben wurden (Luo et al., 2008; Hamamoto et al., 2000). Es traten Promotormutationen zwischen den Stämmen der verschiedenen Fungizidresistenzphänotypen auf, jedoch waren diese nicht mit einem MDR-Phänotyp korreliert (Abb. 17). Promotormutationen bei MDR1- und MDR3-Stämmen konnten somit als Ursache für den MDR1- bzw. MDR3-Phänotyp bei *Botrytis* ebenfalls ausgeschlossen werden.

n.	 1802 ota -	-1757/55 -1747	-1613	-1258	-857	-709	-489	-412	-67/66 0	3
B05.10		•••	•	•	•	•	•	•	••	•
T4		• • •	•	•	•	•	•	•	• •	
sens. 8		• • •	•	•/•	•/•	•	•	•	• •	
MDR1 7		• •/• •	•/•	•	•	•	•	•	• •	
MDR3 3		n.t. n.t. n.t.	n.t.	•	•	•	•	•	••	

Abb. 17: Promotoruntersuchung des ABC-Transportergens *bcatrB* bei den Laborstämmen B05.10 und T4, sowie bei sensitiven (n=8), MDR1- (n=7) und MDR3- (n=3) Freilandstämmen. Die Lage der veränderten Basen im putativen Promotorbereich des Transporters wurde als negative Zahl angegeben. Das Start atg des Transporter ist als Position null definiert. Das Stopp gta zeigt das Ende des vorigen Gens an. Farbcode für die Nukleotide:  $\bullet$ =C;  $\bullet$ =G;  $\bullet$ =T;  $\bullet$ =A; n.t.= dieser Bereich wurde nicht analysiert.

Die letzte mögliche Ursache für eine konstitutive Überexpression von *bcatrB* liegt in Mutationen in regulatorischen Proteinen, beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Mutationen in Tac1 aus *C. albicans* führten zur Überexpression der ABC-Transporter *cdr1* und *cdr2* und somit zum beobachteten MDR-Phänotyp (Coste et al., 2004; Coste et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass, wie durch die Macroarray-Untersuchung bereits angedeutet, mindestens zwei weitere ABC-Transporter-Gene, *bcatrK* und *bmr3*, in MDR1-Stämmen im Vergleich mit sensitiven Stämmen leicht überexprimiert und damit mit *bcatrB* koreguliert werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Überexpression putativ mit** *bcatrB* **koregulierter ABC-Transporter in MDR1-Stämmen.** (----)= Schwelle bei zweifach erhöhter Expression im Vergleich zur Genexpression in unbehandelten sensitiven Stämmen. Expressionswerte wurden mit *ef1a* und *act* normalisiert und auf die Expression in unbehandelten sensitiven Stämmen kalibriert. Standardabweichungen sind angegeben.

Neben *bcatrB* wurden bei sensitiven Stämmen durch eine Fungizidbehandlung mit Fludioxonil auch die ABC-Transportergene *bmr3*, *bcatrK* und *bcatrA* induziert (Abb. 19).



Abb. 19: Expression von ABC-Transportergenen nach Fludioxonilbehandlung von sensitiven Stämmen. Fludioxonilbehandlung  $1\mu g ml^{-1}$  für 30min. (----)= Schwelle bei zweifach erhöhter Expression im Vergleich zur Genexpression in unbehandelten sensitiven Stämmen. Expressionswerte wurden mit *ef1a* und *act* normalisiert und auf die Expression in unbehandelten sensitiven Stämmen kalibriert. Standardabweichungen sind angegeben.

Da die Transportergene *bcatrB*, *bcatrK* und *bmr3* sowohl nach einer Fungizidbehandlung von sensitiven Stämmen, als auch konstitutiv in MDR1-Phänotypen induziert bzw. überexprimiert wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass deren Expression durch einen gemeinsamen Regulator (Transkriptionsfaktor) kontrolliert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, z.B. die konstitutive Überexpression mehrerer ABC-Transportergene *bcatrB*, *bcatrK* und *bmr3* in MDR1-Phänotypen oder auch die gleichzeitige Induktion dieser Transportergene in sensitiven Stämmen, die mit Fludioxonil behandelt wurden, lassen den Schluss zu, dass sehr wahrscheinlich eine Mutation in einem Regulatorprotein für den MDR1-Phänotyp verantwortlich ist. In Fortführung dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen S. Fillinger, A.S. Walker, P. Leroux (INRA Versailles), D. Mernke und M. Leroch (unsere Arbeitsgruppe) ein "map based cloning" Ansatz zur Identifikation des Transkriptionsfaktors durchgeführt.

Hierfür wurde die Segregation verschiedener molekularer Marker, z.B. Mikrosatelliten, mit den MDR-Phänotypen in verschiedenen Kreuzungen korreliert. F. Chapeland und S. Fillinger führten verschiedene Kreuzungen mit sensitiven und MDR-Stämmen durch. Die F1-Generationen dieser Kreuzungen erhalten mit einer 50:50 Wahrscheinlichkeit die molekularen Marker ihrer Eltern. Co-segregiert ein solcher Marker in den Nachkommen mit einem Resistenzphänotyp, muss sich der Auslöser dieses Phänotyps in der Nähe dieses Markers befinden. In einer Kreuzung zeigte der Mikrosatellitenmarker Bc274 eine Co-Segregation von 92% mit dem MDR1-Phänotyp. In dessen Nähe wurde der Transkriptionsfaktor bc*mrr1* identifiziert. Dieser wies in MDR1- und MDR3-Stämmen verschiedene Mutationen auf. Durch Deletion dieses Transkriptionsfaktors in MDR1-Stämmen wurde Bcmrr1 als Auslöser

der Überexpression von *bcatrB* und damit des MDR1-Phänotyps identifiziert (A. Mosbach, mündliche Mitteilung).

Da bei sensitiven Fludioxonil-behandelten Stämmen jedoch neben den ABC-Transportergenen *bcatrB*, *bcatrK* und *bmr3* noch zusätzlich *bcatrA* induziert wurde, ist davon auszugehen, dass weitere Regulationsmechanismen bei der Regulation von *bcatrB* eine Rolle spielen. In *S. cerevisiae* wurde bereits beschrieben, dass die Regulation der MDR-Transporter sehr komplex ist (Sa-Correia et al., 2009).

## 3.8.2. Der MFS-Transporter Bcmfs19 ist nicht der Auslöser des MDR2-Phänotyps

### 3.8.2.1. Expressions analyse des MFS-Transporters bcmfs19

Durch die Macroarray-Analyse wurde die Überexpression von *bcmfs19*, einem MFS-Transporter, als potentieller Auslöser des MDR2-Phänotyps identifiziert.

Dies konnte im weiteren Verlauf der Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. In einer ersten Northern-Blot-Analyse, bei der die Sporen in hoher Dichte keimten und das Myzel ebenfalls in hoher Dichte angezogen wurde, zeigten sowohl sensitive Stämme als auch MDR2- und MDR3-Stämme eine Expression dieses Transporters. Außerdem waren die Expressionslevel in sensitiven Stämmen niedriger als in MDR2- und MDR3-Stämmen (Abb. 20).



Abb. 20: Northern-Blot-Analyse der *bcmfs19* Expression in je zwei sensitiven, MDR2und MDR3-Stämmen. Anzuchtbedingungen mit hoher Sporendichte (Methode 1). Je  $12\mu g$ Total-RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stamm aufgetragen.

Bei weiteren Northern-Blot-Analysen mit veränderten Anzuchtbedingungen (Methode 2) und einer geringeren Sporendichte zeigten MDR2-Stämme weiterhin eine leichte Überexpression von *bcmfs19*. Diese war in MDR3-Phänotypen jedoch nicht mehr zu detektieren (Abb. 21). Da in der Zwischenzeit durch Kreuzungen von MDR3-Stämmen mit sensitiven Stämmen nachgewiesen werden konnte, dass die Kreuzung von MDR1- mit MDR2-Stämmen zum MDR3-Phänotyp führt (S. Fillinger, Versailles), kann dieser Transporter aufgrund des Fehlens einer Überexpression bei den MDR3-Stämmen nicht mit dem MDR2- und MDR3-Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Allerdings zeigte der Exporter *bcmfs19* neben der leichten konstitutiven Überexpression in MDR2-Stämmen auch eine starke Induktion durch den Wirkstoff Boscalid. Er könnte deshalb trotzdem zur allgemeinen, basalen Fungizidresistenz von *B. cinerea* beitragen.



Abb. 21: Northern-Blot-Analyse der Expression des MFS-Transporters *bcmfs19* in sensitiven, MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämmen mit und ohne Fungizidinduktion. Anzuchtbedingungen mit niedriger Sporendichte (Methode2). Je  $12\mu g$  Total-RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stamm aufgetragen. += Fungizidbehandlung  $1\mu g$  Boscalid ml<sup>-1</sup> für 30min.

Zur weiteren Charakterisierung dieses Transportproteins wurde die Induktion dieses Transporters durch verschiedene Substanzen getestet. Eine Induktion war im Myzelstadium nur für Boscalid und möglicherweise Cyprodinil zu beobachten. Eine Behandlung mit Carbendazim, Fenhexamid oder Wasserstoffperoxid zeigte keine Veränderung der Genexpression. Bei den Fungiziden Fludioxonil, Iprodion, Tebuconazol und dem Antibiotikum Cycloheximid war eine Repression von *bcmfs19* im Vergleich zur 16h Kultur zu beobachten (Abb. 22).



Abb. 22: Expressionsanalyse von *bcmfs19* unter verschiedenen Bedingungen. Je 8µg Total-RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stamm aufgetragen. 0= ungekeimte Sporen;  $4h(1)=2*10^6$  Sporen in einer apfelwachsbeschichteten Petrischale ( $\emptyset$  9cm) in 22,5ml Fruktose-Minimal-Medium (stehend; Keimung 100%);  $4h(2)=4*10^6$  Sporen in 50ml 1% Malzextrakt (schüttelnd, Keimung 96,6%);  $4h(3)=2*10^7$  Sporen in einer apfelwachsbeschichteten Petrischale ( $\emptyset$  9cm) in 22,5ml Fruktose-Minimal-Medium (stehend, Keimung 0%);  $4h(4)=6*10^7$  Sporen in 10ml 1% Malzextrakt (schüttelnd, Keimung 37,8%);  $16h=2*10^6$  Sporen in einer apfelwachsbeschichteten Petrischale ( $\emptyset$  9cm) in 22,5ml Fruktose-Minimal-Medium (stehend; Keimung 100%);  $4h(4)=6*10^7$  Sporen in 10ml 1% Malzextrakt (schüttelnd, Keimung 37,8%);  $16h=2*10^6$  Sporen in einer apfelwachsbeschichteten Petrischale ( $\emptyset$  9cm) in 22,5ml Fruktose-Minimal-Medium (stehend; Keimung 100%);  $4h(4)=6*10^7$  Sporen in 10ml 1% Malzextrakt (schüttelnd, Keimung 37,8%);  $16h=2*10^6$  Sporen in einer apfelwachsbeschichteten Petrischale ( $\emptyset$  9cm) in 22,5ml Fruktose-Minimal-Medium (stehend; Keimung 100%); alle weiteren Behandlungen wurden für 30min mit diesem Stadium durchgeführt (wie in Abb. 14 beschrieben).

In ungekeimten Sporen und in keimenden Sporen bei geringer Sporendichte war keine *bcmfs19* Expression zu beobachten. Die stärkste Expression von *bcmfs19* wurde bei der Sporenkeimung unter hoher Dichte beobachtet. Auch bei verbesserter Versorgung der Sporen mit Sauerstoff war unter diesen Bedingungen eine starke Expression von *bcmfs19* zu sehen (Abb 22). Geringe Sauerstoffversorung ist also nicht der Grund für die Überexpression, sondern alleinig die hohe Sporendichte.

## 3.8.2.2. Deletion und Überexpression von bcmfs19 im Laborstamm B05.10

Um zu analysieren, ob dieser Transporter zur basalen Fungizidresistenz bei *B. cinerea* beiträgt, wurde dieses Gen im Laborstamm B05.10 deletiert und andererseits in einem abgewandelten B05.10 Stamm (B05.HYG-3; Noda et al., 2007), der eine halbe Hygromycinresistenzkassette besitzt, überexprimiert (Abb. S6). *Bcmfs19* Deletionsmutanten zeigten eine um den Faktor zwei geringere Resistenz gegenüber Boscalid im Vergleich zu den Laborstämmen und bei einer Überexpression ebenfalls eine um den Faktor zwei erhöhte Toleranz. Die Deletion von *bcmfs19* führte nur zu einer sehr schwachen Verringerung der Resistenz gegenüber Cycloheximid, jedoch war bei einer Überexpression eine um den Faktor zwei erhöhte Toleranz gegenüber diesem Stoff im Vergleich zum Laborstamm zu beobachten (Tab. 9). Alle anderen getesteten Fungizidresistenzwerte waren unverändert (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: EC <sub>50</sub> -Werte der B05.10/B05.HYG-3 Stämme und der bcmfs19 De	eletions- und
Überexpressionsmutanten. Alle in dicker Schrift aufgeführten Werte sir	nd statistisch
signifikant unterschiedlich zu den Laborstämmen (p<0,05). Die Standardabwei-	chungen sind
angegeben. $\Delta bcmfs19$ (1-2)= Deletionsmutanten 1 und 2; $Ovbcmfs19$	(oliC 1-2)=
Überexpressionsmutanten mit konstitutivem <i>oliC</i> -Promotor 1 und 2.	

Phänotyp	EC <sub>50</sub> -Wert [μg ml <sup>-1</sup> ]					
_	Fungizid	Antibiotikum				
	Boscalid	Cycloheximid				
B05.10/B05.HYG-5	0,08 ±0,01	7,7 ±0,7				
∆ <i>bcmfs19</i> (1-2)	<b>0,04</b> ±0,01	6,2 ±0,5				
Ovbcmfs19 (oliC1-2)	<b>0,14</b> ±0,03	<b>12,3</b> ±1,33				

## 3.9. Microarray-Analyse zur Identifikation des Auslösers des MDR2-Phänotyps

Da die durchgeführte Macroarray-Analyse nicht zur Identifikation des für den MDR2-Phänotyp verantwortlichen Transporters führte, wurde von der Firma Nimblegen (Reykjavik, Island) eine Microarrayhybridisierung mit zwei sensitiven Isolaten und zwei unabhängigen MDR2-Stämmen durchgeführt. Durch diese Analyse konnte ein weiterer MFS-Transporter als putativer Auslöser für den MDR2- und MDR3-Phänotyp identifiziert werden. Dieser Transporter, bezeichnet als *bcmfsM2*, zeigte eine 70fache konstitutive Überexpression in beiden MDR2-Stämmen im Vergleich mit den sensitiven Stämmen (Abb. 23).



Abb. 23: Vergleich der Genexpression zweier MDR2- mit zwei sensitiven Stämmen. Auswertung der Daten erfolgte mit der Software ArrayStar 2.1 (DNAStar, USA). Rot eingekreist ist der in MDR2-Stämmen überexprimierte MFS-Transporter *bcmfsM2*. Weiß markierte Gene zeigen eine achtfache Veränderung der Expression. Die grünen Linien geben die Schwelle für zweifach veränderte Expression wieder.

Neben diesem stark überexprimierten Transporter wurden in MDR2-Stämmen weitere überexprimierte Gene identifiziert, die putativ an Stressantworten beteiligt sind (Tab. S5).

# 3.10. Der MFS-Transporter BcmfsM2 ist für den MDR2-Phänotyp verantwortlich

## 3.10.1. Expressions analyse des MFS-Transporters bcmfsM2

*BcmfsM2* zeigte weder bei drei sensitiven noch bei drei MDR1-Stämmen eine durch Northern-Blot-Hybridisierung detektierbare Expression. Auch durch eine Fungizidbehandlung mit Boscalid oder Fludioxonil war keine Induktion des Transporters festzustellen (Abb. 24).



Abb. 24: Expression von *bcmfsM2* in sensitiven, MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämmen mit und ohne Fungizidinduktion. (A) Northern-Blot-Analyse. Je 4µg total RNA (unterer Teil der Abbildung als rRNA Ladekontrolle) wurden pro Stamm aufgetragen. += Fungizidbehandlung mit 1µg ml<sup>-1</sup> Boscalid für 30min. (B) Realtime-PCR-Analyse. += Fludioxonilbehandlung mit 1µg ml<sup>-1</sup> für 30min. (---)= Schwelle bei zweifach erhöhter Expression im Vergleich zur Genexpression in unbehandelten sensitiven Stämmen. Expressionswerte wurden mit *ef1a* und *act* normalisiert und auf die Expression in unbehandelten sensitiven Stämmen kalibriert. Standardabweichungen sind angegeben.

Durch eine Realtime-PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass *bcmfsM2* in sensitiven bzw. in MDR1-Stämmen nur schwach exprimiert ist. Im Gegensatz dazu wiesen MDR2- und MDR3-Stämme eine ca. 600fache, konstitutive Überexpression auf (Abb. 24B). Aufgrund der starken Überexpression dieses MFS-Transporters in MDR2- und MDR3-Phänotypen kann davon ausgegangen werden, dass *bcmfsM2* für den MDR2- und partiell für den MDR3-Phänotyp verantwortlich ist. Bisher konnte durch keine Behandlung die Expression von *bcmfsM2* in sensitiven Stämmen induziert werden (Abb. 24, Daten nicht gezeigt). Weder Substanzen, die durch den MDR2-Phänotyp als Substrat von BcmfsM2 identifiziert wurden, wie Fenhexamid, Cyprodinil, Iprodion, Cycloheximid, Boscalid oder Tebuconazol, noch Carbendazim oder Wasserstoffperoxid, waren in der Lage *bcmfsM2* zu induzieren. Der MFS-Transporter *bcmfsM2* wird in sensitiven Stämmen nur schwach exprimiert, ist scheinbar nicht induzierbar und zeigt ausschließlich in MDR2- und MDR3-Stämmen eine starke konstitutive Expression.

#### 3.10.2. Bedeutung des MFS-Transporters BcmfsM2 für den MDR2-Phänotyp

In Fortführung der vorliegenden Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe von A. Mosbach und M. Leroch durch Deletions- und Überexpressionsanalysen die Überexpression des MFS-Transporters *bcmfsM2* als Ursache des MDR2-Phänotyps nachgewiesen. Als Ursache für die Überexpression dieses Transporters wurde von D. Mernke eine Veränderung des *bcmfsM2* Promotors in MDR2- und MDR3-Stämmen identifiziert.

#### 3.11. Fitness der MDR-Stämme

Die Fitness der MDR-Stämme im Vergleich mit sensitiven Stämmen gibt Auskunft über ihre Überlebens- und Konkurrenzfähigkeit. Für viele Einzelresistenzen wurde beschrieben, dass die Resistenz einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Stämme hat (Raposo et al., 2000; Ziogas et al., 2003; Ziogas et al., 2005; Markoglou et al., 2006). Deshalb wurden das vegetative Wachstum auf Voll- und Minimalmedien, die Biomasseakkumulation, die Sporulation, das Wachstum bei ungünstigen Temperaturen, oxidativem oder osmotischem Stress und die Virulenz von jeweils fünf Stämmen der MDR-Klassen, der sensitiven Stämme und der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten analysiert.

Das vegetative Wachstum der MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämme war im Vergleich mit den sensitiven Stämmen weder auf Vollmedium (TMA und HA), noch auf GMAP (Glukose-Minimalmedium-Agar-Platten) negativ beeinträchtigt. MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten zeigten weder beim Wachstum auf HA noch auf GMAP eine Veränderung der Wachstumsrate. Lediglich bei TMA, dem zerkleinerte Tomatenpflanzen beigefügt sind, wuchsen die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten deutlich besser als die MDR1-Elternstämme.

Weder die Biomassenakkumulation, noch die Sporulation waren durch die Mutationen, die zu MDR-Phänotypen führen, im Vergleich mit sensitiven Stämmen beeinträchtigt (Tab. 10).

Bei Stresssituationen, Hitze, Kälte, hyperosmotischem Stress, ausgelöst durch Salz oder Zuckeralkohol, oder bei oxidativem Stress bedingt durch Wasserstoffperoxid oder dem Radikalbildner Paraquat, zeigten MDR-Stämme kein benachteiligtes vegetatives Wachstum im Vergleich zu sensitiven Stämmen. Die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten zeigten bei diesen Bedingungen ebenfalls keinen Unterschied im Vergleich mit den MDR1-Elternstämmen (Tab. 10). Lediglich bei Menadion (Vitamin K3), ebenfalls ein Radikalbildner, zeigten sowohl MDR1-, als auch MDR2- oder MDR3-Phänotypen eine höhere Wachstumsrate im Vergleich mit sensitiven Stämmen. Dies bestätigten auch die MDR1-Elternstämme der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten (Tab. 10).

Tab. 10: Fitnessparameter von je fünf Stämmen der verschiedenen MDR-Phänotypen im Vergleich mit fünf sensitiven Stämmen und Vergleich der MDR1-Elternstämme und deren MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten. Dargestellt ist das Radialwachstum in mm d<sup>-1</sup>. Alle in dicker Schrift aufgeführten Werte sind statistisch signifikant unterschiedlich zu den Werten der sensitiven bzw. der MDR1-Elternstämme (p<0,05). Die Standardabweichungen sind angegeben. n.t.= nicht getested.

_	B. cinerea Fungizidresistenzphänotyp								
	sens.	MDR1	MDR2	MDR3	MDR1 06.5-16	06.5-16 <i>∆bcatrB</i>	MDR1 06.3-27	06.3-27 <i>∆bcatrB</i>	
Vegetatives Wachstum [mm d <sup>-1</sup> ]									
ТМА	10,4	10,2	8,7	7,9	8,9	<b>10,8</b>	8,8	<b>10,8</b>	
	±1,5	±0,9	±1,2	±1,6	±0,0	±0,9	±0,1	±0,1	
HA	8,0	9,3	8,6	7,2	8,5	8,6	8,2	8,6	
	±1,8	±0,7	±0,9	±1,1	±0,3	±0,2	±0,5	±0,7	
GMAP	7,2	8,0	7,8	<b>7,8</b>	6,7	7,4	7,7	7,5	
	±0,5	±0,9	±0,5	±0,5	±0,6	±0,4	±0,5	±0,5	
Biomasse [mg 48h <sup>-1</sup> ]	54 ±12	<b>48</b> ±15	<b>49</b> ±12	47 ±16	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	
Sporulation [10 <sup>6</sup> cm <sup>-2</sup> ]	2,0 ±0,7	2,5 ±0,9	<b>1,4</b> ±0,7	2,2 ±1,0	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	
Vegetatives Wachstum unter Stresssituationen [mm d <sup>-1</sup> ]									
Temperatur Stress					T				
Kälte 4℃	<b>3,4</b>	3,5	4,0	<b>3,8</b>	4,1	<b>4,2</b>	3,7	4,0	
	±0,6	±0,8	±0,9	±0,5	±0,2	±0,2	±0,2	±0,3	
Hitze 30℃	<b>1,3</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	1,1	1,2	1,3	1,0	1,0	
	±0,7	±0,9	±0,8	±0,2	±0,3	±0,4	±0,3	±0,2	
Oxidativer Stress					n				
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [0,05%]	3,7	<b>3,6</b>	<b>4,4</b>	<b>4,2</b>	<b>3,9</b>	3,9	4,1	<b>4,3</b>	
	±0,4	±0,9	±0,5	±0,5	±0,1	±0,2	±0,2	±0,0	
Paraquat [3mM]	5,0	6,2	6,1	6,3	6,1	<b>6,2</b>	5,4	5,1	
	±0,6	±0,8	±1,8	±0,8	±0,3	±0,5	±0,2	±0,3	
Menadion [15µM]	3,0	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>5,7</b>	5,0	<b>4,0</b>	4,9	<b>4,0</b>	
	±0,5	±0,3	±1,1	±0,6	±0,2	±0,3	±0,2	±0,2	
Osmotischer Stress									
Sorbitol [0,5M]	8,0	<b>8,8</b>	8,7	<b>7,2</b>	8,5	9,2	8,5	<b>9,3</b>	
	±2,0	±1,0	±0,7	±1,7	±0,8	±1,4	±1,3	±2,1	
Salz [0,5M]	5,9	6,2	6,6	5,6	6,4	7,0	7,3	7,7	
	±0,7	±0,7	±0,9	±1,1	±0,4	±0,5	±0,6	±0,6	
Virulenz [mm d <sup>-1</sup> ]									
Gerberapetalen	5,3	5,7	5,2	4,2	5,2	6,0	5,2	5,7	
	±1,2	±1,3	±0,9	±1,1	±1,7	±0,7	±0,2	±0,6	
Weinbeeren	<b>3,8</b>	4,2	4,4	<b>4,4</b>	5,2	5,0	5,4	5,2	
	±0,5	±0,4	±0,4	±0,6	±0,4	±0,6	±0,4	±0,3	
Weinblätter	2,9	3,4	2,8	3,3	3,5	<b>1,4</b>	<b>3,2</b>	<b>1,3</b>	
	±0,4	±0,6	±0,6	±0,4	±0,8	±0,9	±0,5	±0,4	
Äpfel	3,1	3,0	2,6	2,0	2,7	2,7	<b>2,1</b>	2,1	
	±1,1	±1,2	±1,2	±1,4	±1,1	±0,8	±1,0	±0,7	
Bohnenblätter	<b>3,6</b> ±0,3	<b>3,3</b> ±0,5	n.t.	n.t.	3,3 ±0,5	3,2 ±0,4	n.t.	n.t.	
Tomatenblätter	2,2	<b>1,4</b>	1,9	<b>0,6</b>	1,3	<b>3,1</b>	1,3	<b>2,7</b>	
	±0,4	±0,3	±0,3	±0,2	±0,2	±0,3	±0,4	±0,1	

Auch bei Keimungstests ohne stressauslösende Substanzen waren keine Unterschiede bezüglich der Keimungsrate nach 6h zwischen den verschiedenen Phänotypen zu beobachten. Allerdings zeigten MDR-Stämme bei der Keimung in Medien, die Sauerstoffradikale oder Sauerstoffradikalbildner enthielten, eine schnellere Keimung der Sporen im Vergleich mit sensitiven Stämmen. Bereits nach 6h waren in einem Keimungstest mit Wasserstoffperoxid oder Paraquat bei allen MDR-Phänotypen 90-100% der Sporen gekeimt, während sensitive Stämme nur Keimungsraten von 55-65% erreichten. Bei Menadion waren bei den MDR-Phänotypen 25-45% der Sporen, bei sensitiven Stämmen jedoch nur 11-20% gekeimt, wobei MDR1- und MDR3-Stämme hierbei eine höhere Keimungsrate als MDR2-Stämme zeigten (Abb. 25A).



Abb. 25: Keimungsverhalten der MDR-Phänotypen im Vergleich mit sensitiven Stämmen unter oxidativem Stress. (A) Keimungsverhalten von sensitiven ( $\blacksquare$ ), MDR1- ( $\blacksquare$ ), MDR2- ( $\blacksquare$ ) und MDR3- ( $\Box$ ) Stämmen in GMM und GMM, das mit Wasserstoffperoxid (0,0075%), Paraquat (3mM) oder Menadion (15µM) supplementiert wurde. (B) Keimungsverhalten des MDR1-Elternstamms ( $\blacksquare$ ) und dessen *bcatrB* Deletionsmutanten 1( $\blacksquare$ ), 2( $\blacksquare$ ) und 3( $\Box$ ) in den in A angegebenen Medien. Die Keimungsraten der Stämme wurden nach sechs Stunden ermittelt und auf hundert Prozent Keimung bei GMM ohne stressauslösende Substanz kalibriert. \*=signifikant unterschiedlich (p<0,05), in (A) bezogen auf sensitive Stämme und in (B) auf den MDR1-Elternstamm der Deletionsmutanten.

Die Keimungsraten der *bcatrB* Deletionsmutanten des MDR1-Phänotyps wiesen sowohl bei Keimung in Gegenwart von Wasserstoffperoxid als auch von Paraquat eine um den Faktor 2,5 schlechtere Keimung als die Sporen des MDR1-Elternstamms auf. Bei Menadion keimten die Sporen des MDR1-Elternstamms sogar 5,8fach besser als die der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten (Abb. 25B).

Auf Gerberapetalen zeigten weder MDR1- noch MDR2- oder MDR3-Stämme eine verringerte Virulenz im Vergleich zu sensitiven Stämmen. Auf verwundeten Früchten, Äpfeln oder Weinbeeren waren die MDR-Phänotypen genauso virulent wie die sensitiven Stämme. Dies zeigten ebenso die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten im Vergleich zu ihren MDR1-Elternstämmen (Tab. 10). Auf verwundeten Weinblättern waren die MDR1- und MDR3-Stämme leicht, jedoch nicht signifikant, virulenter als sensitive oder MDR2-Stämme. Bei den



MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten zeigte sich im Vergleich mit den MDR1-Elternstämmen dagegen eine drastische Reduktion der Virulenz auf verwundeten Weinblättern (Tab. 10).





Abb. 26: Virulenz von sensitiven, MDR1-, MDR2-, MDR3-Stämmen und MDR1 bcatrB Deletionsmutanten auf unverwundeten Tomatenund Bohnenblättern. (A) sensitive, MDR1, MDR2 und MDR3-Stämme auf unverwundeten Tomatenblättern. (B+C) MDR1-Stämme und deren MDR1  $\Delta bcatrB$  Mutanten auf unverwundeten Tomaten- (B+C) und Bohnenblättern (C) nach 72hpi. \*= signifikant unterschiedlich (p<0,05) zu sensitiven oder Elternstämmen.

Auf intakten Tomatenblättern zeigten MDR2-Stämme keine negativ beeinflusste Virulenz im Vergleich zu sensitiven Stämmen. MDR1- und MDR3-Stämme waren beeinträchtigt in der Virulenz. Eine Beeinträchtigung der Virulenz auf Tomatenblättern zeigten auch die Elternstämme der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten. Hingegen wiesen die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten auf Tomatenblättern eine etwa 2,5fach so schnelle Läsionsausbreitung wie deren MDR1-Elternstämme auf. Bestandteile oder Inhaltsstoffe des Tomatenblätts scheinen also die Virulenz der MDR1-Stämme negativ zu beeinflussen (Abb. 26). Dies zeigte sich bereits beim vegetativen Wachstum auf TMA Medium (Tab. 10). Um zu testen, ob diese verringerte Virulenz auch bei intakten Blättern anderer Wirtspflanzen zu beobachten ist, wurde ein weiterer Infektionstest auf Bohnenblättern mit dem Laborstamm B05.10, den MDR1-Elternstämmen und den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten durchgeführt. Auf diesem Gewebe zeigten alle Stämme eine ähnliche Virulenz (Abb. 26C). Die beobachtete verringerte Virulenz der MDR1-Stämme auf Tomatenblättern ist deshalb mit dem MDR1-Phänotyp korreliert.

## 3.12. Konkurrenzfähigkeit der MDR-Phänotypen im Freiland

Um die Konkurrenzfähigkeit von MDR-Stämmen im Vergleich zu sensitiven Stämmen im Freiland ohne und mit Fungizidselektion zu untersuchen, wurden in den Jahren 2007 und 2008 ein sensitiver und ein MDR3-Stamm in einer 50:50 Mischung in einem mit der Sorte Riesling bepflanzten Weinberg ausgebracht. Die beiden verwendeten Stämme wurden nach Konkurrenzuntersuchungen, die unter Laborbedingungen durchgeführt wurden, ausgewählt (nach Kim et al., 2001; Daten nicht gezeigt).





Abb. 27: Konkurrenzfähigkeit des ausgebrachten sensitiven ( $\Box$ ), des MDR3- ( $\blacksquare$ ) Stammes und der endogenen Population ( $\blacksquare$ ) in unbehandelten und switch®-behandelten (Fludioxonil und Cyprodinil) Weinbergen. Ergebnisse der Jahre 2007 und 2008. (A) Sensitiver Stamm vs. MDR3-Stamm. (B) MDR3-Stamm vs. endogene Population. (C) Sensitiver Stamm vs. endogene Population.\*= Unterschiede zwischen unbehandelter und behandelter Variante sind signifikant (p<0,05); n.s.= nicht signifikant. Im Herbst 2007 wurden 193 und 2008 406 *Botrytis*-Stämme isoliert. Die Wiederfindungsrate der ausgebrachten Stämme betrug 2007 62%, im Versuch 2008 68%. Die Wiederfindungsrate in den unbehandelten Flächen betrug 2007 46%, 2008 64% und in behandelten Flächen 79% bzw. 71%.

Eine Hälfte des Weinbergs wurde mit einem Fungizidgemisch (switch®= Fludioxonil und Cyprodinil) behandelt, die andere Hälfte unbehandelt belassen. Ohne Fungizideinsatz zeigte sich keine Selektion zu Gunsten eines der beiden Phänotypen. Beide Stämme waren also gleich konkurrenzfähig. Die Fungizidbehandlung führte in beiden Jahren zu einer klaren Selektion zu Gunsten des MDR3-Stamms (Abb. 27A). Die Zunahme des Anteils des MDR3-Stamms zwischen unbehandelter und behandelter Variante bzw. die Abnahme der Häufigkeit

des sensitiven Stamms bei Fungizideinsatz, waren sowohl 2007 als auch 2008 signifikant unterschiedlich (p<0,01) bzw. (p=0,03).

Eine ähnliche Situation war vorzufinden, wenn man die Häufigkeit der endogenen Population mit der des ausgebrachten MDR3-Stammes verglich. Ohne Selektion durch Fungizide war 2007 die endogene Population stark vorherrschend. 2008 lagen die beobachteten Werte nahe einer 50:50 Verteilung. Wenn jedoch eine Fungizidbehandlung durchgeführt wurde, verschob sich diese Relation stark zu Gunsten des ausgebrachten MDR3-Stamms (Abb. 27B). Die Veränderungen waren 2007 hoch signifikant (p<0,01) und 2008 signifikant unterschiedlich (p=0,01).

Bei einem Vergleich der Häufigkeit des ausgebrachten sensitiven Stamms mit der endogenen Population zeigte sich sowohl 2007 als auch 2008 keine Veränderung der Häufigkeit in Abhängigkeit von der Fungizidbehandlung (Abb. 27C). Folglich war keine Selektion, weder zu Gunsten des sensitiven Stamms noch der endogenen Population, durch den Fungizideinsatz zu beobachten. Die Veränderung der Häufigkeit zwischen unbehandelter und behandelter Variante waren weder 2007 (p=0,48) noch 2008 (p=0,39) signifikant unterschiedlich.

Der MDR3-Stamm zeigte ohne Fungizidbehandlung eine hohe Konkurrenzfähigkeit und mit Fungizidbehandlung zum einen eine hohe Überlebensrate und zum zweiten eine klare Selektion gegenüber sensitiven Stämmen.

### 3.13. Überlebensfähigkeit des MDR-Stamms während einer Winterperiode

Der Versuch aus dem Jahr 2007 wurde durch den Winter hindurch weitergeführt. Im Herbst 2007 dominierte in der unbehandelten Variante sowohl der ausgebrachte sensitive Stamm als auch die endogene Population gegenüber dem MDR3-Stamm. Nach einer Fungizidbehandlung dominierte der MDR3-Stamm im Vergleich zu den beiden anderen Populationen. Ohne Fungizideinsatz war im Frühjahr der MDR3 gegenüber dem sensitiven Stamm dominant. In der fungizidbehandelten Variante wurde der sensitive Stamm fast vollständig verdrängt (Abb. 28A). Die Veränderung von Herbst auf Frühjahr sind in der nicht behandelten Fläche nicht signifikant (p=0,06) und in der behandelten Fläche signifikant unterschiedlich (p=0,02).

In den nicht behandelten Flächen dominierte die endogene Population sowohl im Herbst als auch im Frühjahr gegenüber dem MDR3-Stamm. In der fungizidbehandelten Fläche dominierte im Herbst der MDR3-Stamm, im Frühjahr die endogene Population. Die Veränderungen von Herbst auf Frühjahr sind in der nicht behandelten Fläche nicht signifikant (p=0,29), in der behandelten Fläche signifikant unterschiedlich (p=0,02; Abb. 28B).





Abb. 28: Überlebensfähigkeit des ausgebrachten sensitiven ( $\Box$ ), des MDR3- ( $\blacksquare$ ) Stamms und der endogenen Population ( $\blacksquare$ ) in einem Weinberg nach einer Winterperiode. (A) Sensitiver Stamm vs. MDR3-Stamm. (B) MDR3-Stamm vs. endogene Population. (C) Sensitiver Stamm vs. endogene Population.\*= Veränderungen der Häufigkeiten einer Variante (ehemals behandelt oder unbehandelt) zwischen Herbst und darauf folgendem Frühjahr sind signifikant unterschiedlich (p<0,05); n.s.= nicht signifikant. Im Frühjahr 2008 wurden 137 Stämme aus der im Herbst untersuchten Fläche isoliert. Die Wiederfindungsrate betrug in beiden Varianten 47%.

Bei einem Vergleich der Häufigkeit des sensitiven ausgebrachten Stamms mit der endogenen Population zeigte sich, dass sich in der unbehandelten Variante der Anteil des sensitiven Stamms von Herbst auf Frühjahr kaum veränderte. In der fungizidbehandelten Fläche war der sensitive Stamm im Frühjahr kaum noch zu detektieren. Die Veränderung der Häufigkeit von Herbst auf Frühjahr sind in der nicht behandelten Fläche nicht signifikant (p=0,28), in der behandelten Fläche signifikant unterschiedlich (p=0,04; Abb. 28C).

#### 3.14. Einfluss von ABC-Transporter-Modulatoren auf die MDR

Für einige Wirkstoffe aus der Humanmedizin wurde beschrieben, dass sie fähig sind, den Export von Substanzen durch ABC-Transporter zu verhindern (Hayashi et al., 2003; Ponte-Sucre, 2007; Roohparvar et al., 2007a). Da der MDR1-Phänotyp bei *B. cinerea* durch eine Überexpression des ABC-Transporters *bcatrB* ausgelöst wird, wurde durch den Einsatz von ABC-Transporter-Modulatoren/Inhibitoren versucht, die MDR *in vitro* und *in vivo* aufzuheben.

## 3.14.1. Eigentoxizität der ABC-Transporter-Modulatoren

Außer für TritonX100 mussten im Vergleich mit Fungiziden hohe bis sehr hohe Konzentrationen der Wirkstoffe eingesetzt werden, um eine Reduktion des Wachstums um 50% bei *Botrytis* zu erreichen (Tab. 11). Um einen möglichst großen Effekt bei der Blockierung der ABC-Transporter zu erzielen, wurden hohe nicht toxische Konzentrationen der putativen ABC-Transporter-Modulatoren (meist ca. 75% des  $EC_{50}$ -Wertes) für die weitere Untersuchung verwendet.

angegeben. Die Standardab weienangen sind angerant.							
Testsubstanz	EC <sub>50</sub> -Wert [μg ml <sup>-1</sup> ]	Eingesetzte Konzentration [µg ml <sup>-1</sup> ]					
TritonX100 [%]	1,4 ±0,3	0,15					
Tween20 [%]	25,7 ±2,0	5					
Reserpin	170,2 ±11,5	130					
Progesteron	<b>23,1</b> ±5,1	5					
Naringenin	311,3 ±26,1	150					
Amylorid	299,9 ±40,2	250					
Dipyridamol	247,2 ±40,2	200					
Quinin	<b>258,5</b> ±38,5	150					
Verapamil	628,2 ±24,6	500					
Lidocain	5671,9 ±483,0	2000					
Chlorpromazin	19,8 ±2,8	15					

Tab. 11: EC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen putativen ABC-Transporter-Modulatoren bei *Botrytis*. Die für die Untersuchung eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen sind angegeben. Die Standardabweichungen sind angeführt.

## 3.14.2. Fludioxonilresistenz der verwendeten Stämme

Die für diese Untersuchung verwendeten MDR1-Stämme zeigten gegenüber Fludioxonil, gegen das MDR1-Stämme eine signifikante Resistenz aufweisen, einen Resistenzfaktor ( $Rf_{Flu}$ ) von elf im Vergleich zu den ausgewählten sensitiven Stämmen. Der ausgewählte MDR2-Stamm zeigte eine um den Faktor ( $Rf_{Flu}$ ) 2,3 höhere Resistenz und die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten des MDR1-Stamms waren um den Faktor ( $Rf_{Flu}$ ) 2,5 empfindlicher als sensitive Vergleichsisolate (Abb. 29).



Abb. 29: Fludioxonil-Resistenzlevel der eingesetzten Stämme. *In vitro* Wachstum als optische Dichte  $[OD_{600}]$  von drei für die weitere Untersuchung verwendeten sensitiven Stämme (---), MDR1-Stämme (---), MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten (----) und eines MDR2-Stamms (----). Standardabweichungen sind angegeben.

#### 3.14.3. Einfluss putativer ABC-Transporter-Modulatoren auf die Fungizidresistenz

Die getesteten Transporter-Modulatoren ließen sich *in vitro* in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe der Modulatoren zeigte keinen Einfluss auf die Fungizidresistenz der untersuchten Stämme. Zu diesen Modulatoren zählen Amylorid und Dipyridamol (Abb. 30A). Eine zweite Gruppe von putativen ABC-Transporter-Inhibitoren zeigte bei allen Stämmen, unabhängig vom Resistenzphänotyp, eine Erhöhung der Fungizidresistenz. Dieser Effekt war bei Progesteron, Reserpin, Naringenin und besonders bei den beiden nicht-ionischen Detergenzien Tween20 und TritonX100 zu beobachten. Nur der verwendete MDR2-Stamm zeigte eine Reduktion der Fungizidresistenz (Faktor 5,75) durch die Kombination von Progesteron mit Fludioxonil (Abb. 30B).

Die dritte Gruppe an putativen ABC-Transporter-Modulatoren umfasst Substanzen, die in der Lage waren, den MDR1-Phänotyp in unterschiedlicher Stärke zu reduzieren. In aufsteigender Reihenfolge war dieser Effekt bei Quinin, Verapamil, Lidocain und Chlorpromazin zu beobachten. Diese Substanzen reduzierten spezifisch die Fungizidresistenz der MDR1-Stämme, hatten jedoch kaum oder nur einen geringen Einfluss auf die Fungizidresistenz der anderen Stämme bzw. Phänotypen. Am wirksamsten unter diesen Stoffen war Chlorpromazin, von dem nur ein Zehntel bis ein Hundertstel der Konzentration der anderen Wirkstoffe, bei gleichzeitig stärkerer Wirkung, eingesetzt werden musste. Dieser Wirkstoff ist in der Lage, die MDR um den Faktor 4,9 zu verringern (Abb. 30C).




putativen **ABC-Transporter-Modulatoren** Abb. 30: Effekt von auf die Fludioxonilresistenz (Rf<sub>Flu+Mod</sub>) von sensitiven, MDR1-, MDR2-Stämmen und den MDR1 bcatrB Deletionsmutanten. In allen drei Abbildungen ist der Resistenzfaktor der verschiedenen Phänotypen gegenüber Fludioxonil im Vergleich zum sensitiven Laborstamm B05.10 angegeben (Rf<sub>Flu</sub>; ■). (A) Keine Veränderung des Resistenzfaktors der untersuchten Phänotypen gegenüber Fludioxonil ( $Rf_{Flu+Mod}$ ) bei Zugabe von Amylorid ( $\Box$ ; 250µg ml<sup>-1</sup>) oder Dipyridamol (**1**; 200µg ml<sup>-1</sup>). (B) Erhöhung des Fludioxonilresistenzfaktors (Rf<sub>Flu+Mod</sub>) bei allen Phänotypen unabhängig vom Resistenzphänotyp durch Zugabe von TritonX100 (
; 0,15%); Tween20 (■; 5%), Reserpin (■; 130µg ml<sup>-1</sup>), Progesteron (■; 5µg ml<sup>-1</sup>), und Naringenin (■; 150µg ml<sup>-1</sup>). Bei Progesteron zeigte nur der MDR2-Stamm eine Reduktion der Fungizidresistenz. (C) Spezifische Reduktion des MDR1-Phänotyps durch Zugabe von Quinin ( $\Box$ ; 150µg ml<sup>-1</sup>), Verapamil ( $\blacksquare$ ; 500µg ml<sup>-1</sup>), Lidocain ( $\blacksquare$ ; 2000µg ml<sup>-1</sup>) oder Chlorpromazin (■; 15 µg ml<sup>-1</sup>) zum Fungizid Fludioxonil. \*= signifikante Unterschiede zwischen Fungizidbehandlung und Fungizidbehandlung kombiniert mit einem ABC-Transporter-Modulator (p<0,05). Standardabweichungen sind angegeben.

Steigende Konzentrationen von Chlorpromazin hatten keinen Einfluss auf die Fungizidresistenz bei sensitiven oder MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten, ließen jedoch die Fungizidresistenz bei MDR1-Stämmen stark abnehmen (Abb. 31). Neben der Beobachtung, dass höhere Konzentrationen von Chlorpromazin in der Lage waren den MDR1-Phänotyp zu unterdrücken, konnte auch gezeigt werden, dass dieser Effekt dosisabhängig ist.



Abb. 31: Verringerung des **Resistenzfaktors** durch steigende **Rf**<sub>Flu</sub> Chlorpromazinkonzentrationen. MDR1-Stämme (- - -); sensitive Stämme (-—); MDR1 Deletionsmutante (....). Flu= Fludioxonil; Chl= Chlorpromazin. bcatrB Standardabweichungen sind angegeben.

## 3.14.4. Unterdrückung des MDR1-Phänotyps auf infizierten Blättern

Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass Chlorpromazin in der Lage ist den MDR1-Phänotyp zu unterdrücken. Es wurde deshalb untersucht, ob auch *in vivo* der Einsatz von Chlorpromazin zu einer Reduktion der Fungizidresistenz führt.

Der ABC-Transporter-Modulator Chlorpromazin hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Wirtspflanze Bohne (*Phaseolus spec.*). Chlorpromazin scheint unter diesen Bedingungen nicht pflanzentoxisch zu wirken. Außerdem hatte Chlorpromazin alleine keinen Einfluss auf die Virulenz von *B. cinerea*.

Ähnlich zu den Ergebnissen des *in vitro* Fungizidresistenztests zeigten vor allem MDR1-Stämme die Fähigkeit, auch bei höheren Fungizidkonzentrationen von ausgebrachten  $4\mu g ml^{-1}$ Fungizidmischung (je  $2\mu g ml^{-1}$  Cyprodinil und Fludioxonil) die Bohnenblätter noch zu infizieren. Bereits bei niedrigen Fungizidmengen auf dem Bohnenblatt konnten die MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten nur noch sehr eingeschränkt infizieren. Sensitive und MDR2-Stämme zeigten eine intermediäre Virulenz unter Fungizideinfluss (Abb. 32).

Bei einer Kombination aus Fungizidmischung und dem ABC-Transporter-Inhibitor Chlorpromazin konnte bei einem Infektionstest auf Bohnenblättern bei allen Stämmen eine verbesserte Wirkung der Fungizide und damit verbunden eine schlechtere Infektionsfähigkeit der Stämme beobachtet werden (Abb. 32). Durch die Zugabe von Chlorpromazin zur Fungizidmischung wurde bei den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten eine signifikante Reduktion der Virulenz im Vergleich mit den nur mit fungizidbehandelten Bohnenblättern um den Faktor 1,4 (p=0,04) beobachtet.



Abb. 32: Verringerte Virulenz von *B. cinerea* auf Bohnenblättern durch Kombination von Fungiziden mit Chlorpromazin. Virulenz (60hpi.) sensitiver (s), MDR1-, MDR2-Stämme und der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten ( $\Delta B$ ) bei steigender Fungizidkonzentration (Fludioxonil und Cyprodinil) auf Bohnenblättern und auf Bohnenblättern, die zusätzlich zu den Fungiziden mit 18µg ml<sup>-1</sup> Chlorpromazin (C) behandelt wurden. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen Primär- und Sekundärläsion an. Die Signifikanz der Unterschiede wurde nur für Messwerte, die über diesem Schwellenwert liegen, bestimmt (Ausnahme MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten). n.s.= nicht signifikant, \*=signifikant (p<0,05). Standardabweichungen sind angegeben.

Beim MDR2-Stamm kam es zu einer signifikanten Reduktion um den Faktor 1,5 (p=0,03). Bei sensitiven Stämmen wurde die Virulenz um den Faktor 1,3 (p=0,45) und bei MDR1-Stämmen hoch signifikant um den Faktor 2,0 (p<0,01) reduziert. Die Kombination eines ABC-Transporter-Blockers mit Fungiziden verringerte bei allen Stämmen die Virulenz, am stärksten jedoch bei MDR1-Phänotypen.

# 4. Diskussion

# 4.1. Evolutionäre Entstehung von Fungizidresistenzmechanismen

In Konkurrenzsituationen um Nahrungsquellen und Habitate werden von Bakterien und Pilzen toxische und antibiotische Substanzen wie Pyrrolnitrin (*Pseudomonas spec.*), Penicillin (*Penicillium spec.*) oder Tetracyclin (*Streptomyces spec.*) freigesetzt (Smith et al., 1990a; Smith et al., 1990b; Chopra und Roberts, 2001; Okada et al., 2005). Nur wenn sich ein Organismus gegen diese Substanzen schützen kann, ist er in der Lage sich gegen diese Konkurrenten zu behaupten (Del Sorbo et al., 2000).

Alle Lebewesen entwickelten während ihrer Evolution verschiedene Abwehrmechanismen gegen toxische Substanzen. Gegen das Antibiotikum Pyrrolnitrin, ein bei Ascomyceten wirkungsvolles Antibiotikum, zeigt beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* eine natürliche Resistenz, da das Ziel-Protein (Target) dieser Substanz in Hefe nicht vorhanden ist (Motoyama et al., 2005). Wird das Target-Protein dieses Wirkstoffs von sensitiven filamentösen Ascomyceten in Hefen eingebracht, zeigen diese eine erhöhte Sensitivität gegenüber dieser Substanz (Motoyama et al., 2005). Das Fehlen oder Verändern eines Target-Proteins kann also die Wirkung toxischer Substanzen verhindern.

Eine weitere Möglichkeit eines Organismus, sich gegen toxische Substanzen zu schützen, kann die Metabolisierung der Substanz z.B. durch Hydrolasen oder Cytochrom-P450-Monooxigenasen darstellen. Beispielsweise kann Penicillin durch die ß-Lactamase hydrolysiert werden (Slocombe und Sutherland, 1969). Das Enzym Avenacinase von *Gaeumannomyces graminis* ermöglicht die Entgiftung des pflanzlichen Saponins Avenacin und damit die Pathogenität auf Hafer (Bowyer et al., 1995).

Die dritte Möglichkeit, sich gegen schädliche Substanzen zu schützen, ist der Export der schädlichen Substanz aus dem Cytoplasma. Der ABC-Transporter Gpabc1 aus *Gibberella pulicaris* ist beispielsweise dafür verantwortlich, dass Phytoalexine der Kartoffel wie Rishitin und Lubimin vom Pathogen exportiert und damit detoxifiziert werden können (Fleißner et al., 2002). Der Transporter BcatrB aus *Botrytis cinerea* schützt beispielsweise gegen verschiedene Antibiotika (Phenazin) von *Pseudomonas*-Arten und ermöglicht so eine Konkurrenz mit diesen Bakterien (Schoonbeek et al., 2002). Diese Mechanismen ermöglichen Mikroorganismen sich auch gegen die im letzten Jahrhundert vermehrt synthetisch vom Menschen entwickelten Substanzen wie Antibiotika, Insektizide, Herbizide oder Fungizide zu schützen.

# 4.2. Fungizidresistenz bei B. cinerea entlang der Deutschen Weinstraße

*B. cinerea* ist ein im Weinbau gefürchtetes Pflanzenpathogen, das sowohl qualitative, als auch quantitative Verluste für die Weinerzeuger verursachen kann (Vivier und Pretorius, 2002). Deshalb werden im kommerziellen Weinbau bis zu drei Behandlungen mit speziellen Botrytiziden pro Vegetationsperiode durchgeführt. Hierfür stehen im Moment im deutschen Weinbau die Fungizide Teldor® (Wirkstoff Fenhexamid), Cantus® (Boscalid), Scala® (Pyrimethanil) und die Fungizidmischung switch® (besehend aus Cyprodinil und Fludioxonil) zur Verfügung. Früher wurden hauptsächlich Benzimidazole (Carbendazim) und das Dicarboximid Iprodion eingesetzt.

Angelehnt an Fungizidresistenz-Monitoring-Programme (Stehmann und de Waard, 1996; Pappas, 1997; Hilber und Hilber-Bodmer, 1998; Leroux et al., 2002a; Kretschmer und Hahn 2008) in verschiedenen europäischen Ländern wurden in dieser Arbeit in den Jahren 2006 bis 2008 die Fungizidresistenzspektren von sechs *B. cinerea*-Populationen entlang der Deutschen Weinstraße gegenüber den oben beschriebenen Fungiziden ermittelt. Insgesamt wurden nur geringe Raten an hochresistenten Stämmen gefunden, vergleichbar mit den Ergebnissen einer 2004 in Freiburg im Breisgau durchgeführten Studie (Kretschmer und Hahn, 2008).

Im Vergleich zu anderen Studien, bei denen 21-100% (Stegmann und de Waard, 1996) bzw. 60% (Baudoin, 1994) der Population eine Carbendazim-Resistenz aufwiesen, lag der Anteil entlang der Deutschen Weinstraße bei etwa 10%. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei einer Resistenz gegenüber dem Dicarboximid Iprodion. In Weinbergen in Virginia waren über 90% der Population resistent gegen dieses Fungizid (Baudoin, 1994). Stegmann und de Waard beschrieben 1996 Resistenzraten in verschiedenen europäischen Ländern von 25-71%. Entlang der Deutschen Weinstraße waren dagegen nur vereinzelt Stämme resistent gegenüber dem Fungizid Iprodion. Für beide Fungizide gilt, dass sie in den beprobten Gebieten nur noch selten oder nicht mehr eingesetzt werden (Abb. 34). In Baden-Württemberg wurden 2006 in Keltertrauben Iprodion- und Carbendazim-Rückstände in vier bzw. null Prozent der Proben nachgewiesen (cvuas.untersuchungsämter-bw.de/pdf/druck\_pest\_trauben2006.pdf). Die resistenten Stämme wurden daher nicht mehr selektiert und der Anteil der resistenten Stämme ging zurück. Dies deutet auf eine verringerte Fitness der resistenten Stämme hin.

Für die Fungizide Cyprodinil und Fenhexamid wurden ebenfalls nur geringe Raten an hochresistenten Stämmen gefunden, wobei die Rate an Fenhexamid-resistenten Stämmen im Jahr 2008 um den Faktor 2,5 stark zunahm (Abb. 8). In einer 2003 in der Schweiz durchgeführten Studie wurde ohne entsprechenden Fungizideinsatz weder gegen Cyprodinil noch gegen Fenhexamid hochresistente Stämme nachgewiesen (Baroffio et al., 2003).

Dagegen wurden aus Chile Cyprodinil-Resistenzraten von bis zu 38,5% berichtet (Latorre et al, 2002). Einzelresistenzen gegenüber Fludioxonil wurden entlang der Deutschen Weinstraße nie beobachtet. Gegen das 2004 eingeführte Fungizid Boscalid wurden erstmals hochresistente Stämme mit steigender Beobachtungshäufigkeit ausgehend von drei Prozent im Jahr 2006 auf 13% in 2008 beobachtet. In einer 2006 und 2008 in Baden-Württemberg durchgeführten Untersuchung war bereits in 33% bzw. 38% der Proben Boscalid nachzuweisen (Abb. 34). Dies zeigt den bereits häufigen Einsatz von Boscalid im deutschen Weinbau und die Selektion von Target Site resistenten Stämmen. In China zeigten sich in Gewächshäusern noch in den Jahren 2006 und 2007 keine Boscalid-resistenten Isolate (Zhang et al., 2007). Ebenfalls Myresiotis et al. (2008) berichteten bisher von keinen hoch resistenten Stämmen gegenüber Boscalid. Entlang der Deutschen Weinstraße ist deshalb davon auszugehen, dass bei weiter häufigem Boscalid-Einsatz die Rate an hochresistenten Stämmen weiterhin zunimmt und damit die Effizienz von Boscalid reduziert wird.

Wie in anderen Studien beschrieben, traten auch entlang der Deutschen Weinstraße vereinzelt Stämme mit mehr als einer Einzelresistenz auf (Leroux et al., 1999; Pappas, 1997). Jedoch waren nie mehr als zwei Einzelresistenzen kombiniert. Außerdem waren die hochresistenten Stämme nicht gleichmäßig über das Beobachtungsareal verteilt. Nur Stämme, die gegen Fenhexamid, Cyprodinil oder Carbendazim resistent sind, konnten in den drei Jahren mit unterschiedlichen Raten fast immer überall beobachtet werden (Abb. 9). Gegen alle anderen Fungizide wurden nur an manchen Standorten oder in manchen Jahren hochresistente Stämme beobachtet (Abb. 9). Es scheinen sich entlang der Deutschen Weinstraße je nach Fungizideinsatz Mikrohabitate zu bilden, in denen sich hochresistente Stämme durchsetzen und akkumulieren können (Abb. 33).

Weitere Studien zeigen, dass seit etwa 15 Jahren in der Champagne vermehrt Isolate vorgefunden werden, die einen MDR-Phänotyp aufweisen (Abb. 5). In den letzten Jahren bildeten diese Isolate einen immer größer werdenden Anteil an der *B. cinerea*-Freilandpopulation und erreichten in der Champagne 2005 und 2006 bereits einen Anteil von 50% an der Gesamtpopulation (Leroux et al., persönliche Mitteilung). Phänotypisch lassen sich MDR-Stämme aus der Pfalz wie in Frankreich in MDR1(AniR2)-, MDR2(AniR3)- und MDR3-Stämme einteilen (Leroux et al., 1999). Auch entlang der Deutschen Weinstraße waren in den Jahren 2006 bis 2008 sehr häufig MDR-Stämme, mit jährlich steigenden Raten vorzufinden (Abb. 7B). 2008 zeigten etwa 38% der Population einen MDR-Phänotyp.



Abb. 33: Modell der Entstehung verschiedener Fungizidresistenztypen bei *B. cinerea*. Die Dreiecke bei MBC's und Dicarboximiden spiegelt die geringere Verwendungshäufigkeit der Fungizide wieder. Bei den neueren Fungiziden geben sie den Zeitpunkt der Markteinführung der Wirkstoffklassen und ihre häufigere Verwendung an. Die Kurven zeigen den Verlauf der Resistenz-Entwicklung. Für z.B. Cyprodinil und Fenhexamid bestehen nur geringe Risiken einer Resistenzentstehung.

In der Champagne kommen die MDR1- und MDR2-Phänotypen etwa zu gleichen Teilen vor. Dagegen ist entlang der Deutschen Weinstraße klar der MDR1-Phänotyp dominierend. Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen der Studie, durchgeführt 2004 in Freiburg im Breisgau, überein, bei der nur MDR1-Stämme, jedoch mit sehr geringer Häufigkeit, beobachtet wurden (Kretschmer und Hahn, 2008). Dass der MDR1-Phänotyp entlang der Deutschen Weinstraße dominierend ist, zeigt sich z.B. auch darin, dass in den Jahren 2006 bis 2008 an allen Beprobungsstandorten immer MDR1-Phänotypen vorzufinden waren (Abb. 9B). Die beobachteten Häufigkeiten an den verschiedenen Standorten und Jahren schwankten zwischen 6% und 50% an der Gesamtpopulation. Im Mittel über die drei Jahre und die sechs Standorte zeigten 26% der Isolate den MDR1-Phänotyp.

Der zweithäufigste MDR-Resistenzmechanismus ist der MDR2-Phänotyp. 2008 gehörten acht Prozent der Population diesem Phänotyp an. Allerdings schwankte die Häufigkeit von Standort zu Standort und Jahr zu Jahr stark. Es wurden Häufigkeiten von null bis 17% beobachtet. Der MDR2-Phänotyp zeigte in den Jahren 2006 und 2007 jeweils bei 100% der Stämme eine gleichzeitige Resistenz gegen Carbendazim. Die Rate an Carbendazim-Resistenz liegt in der Population entlang Deutschen Weinstraße bei unter zehn Prozent. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der MDR2-Phänotyp entweder nur einmal in einem Carbendazim-resistenten Stamm entstanden ist oder dass er sich aus einem Gebiet mit hoher Rate an Carbendazim-Resistenz bis in die Pfalz verbreitet hat. Da MDR2-Stämme in der Champagne schon früh beobachtet wurden und dort die Carbendazim-Resistenzrate auch heute noch bei über 65% liegt (A.S. Walker, unveröffentlicht), ist es wahrscheinlich, dass MDR2-Stämme dort ihren Ursprung haben. Durch die vorherrschende Westwinddrift könnten sie vereinzelt nach Deutschland gelangt sein. Daher muss sich der MDR2-Phänotyp in der Pfalz durch Selektion und Vermehrung erst etablieren, um häufiger beobachtet zu werden. 2008 waren bereits vermehrt MDR2-Stämme anzutreffen. Da nur noch bei 40% der Stämme eine Resistenz gegen Carbendazim beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass diese Stämme teilweise durch sexuelle Reproduktionen entstanden sind. Auf längere Sicht wird sich bei gleichbleibender Fungizidselektion der MDR2-Phänotyp mit hoher Wahrscheinlichkeit auch entlang der Deutschen Weinstraße etablieren können.

Der MDR3-Phänotyp ist momentan entlang der Deutschen Weinstraße noch sehr selten und nur punktuell zu beobachten. Da dieser Phänotyp vermutlich das Ergebnis einer natürlichen Kreuzung aus MDR1- und MDR2-Stämmen darstellt und MDR2-Stämme sich erst in der Population entlang der Deutschen Weinstraße etablieren müssen, werden höhere Häufigkeiten erst in den nächsten Jahren erwartet.

Ähnlich wie in der Champagne stellt die MDR entlang der Deutschen Weinstraße den dominierenden Fungizidresistenzmechanismus bei B. cinerea dar. MDR-Phänotypen wurden mit großer Häufigkeit bisher nur entlang der Deutschen Weinstraße und in der Champagne beobachtet. In Gewächshäusern in Südfrankreich, im Weinanbaugebiet Bordeaux und entlang der Loire wurden bisher keine oder nur geringe Raten an MDR-Phänotypen beobachtet (A.S. Walker, persönliche Mitteilung). In Gewächshäusern werden häufig noch die älteren Fungizide Carbendazim, Diethofencarb oder Iprodion verwendet (A.S. Walker, persönliche Mitteilung). Diese Wirkstoffe führen zu einer Selektion von einzelresistenten, jedoch nicht von MDR-Stämmen. Entlang der Loire wird jährlich eine Behandlung mit Fenhexamid durchgeführt. Momentan sind dort 50% der Botrytis-Population resistent gegen Fenhexamid (Fillinger et al., 2008). Die alleinige Verwendung von Fenhexamid führt anscheinend zu einer Fenhexamid-resistenten In Selection von Stämmen. Bordeaux werden durch Anilinopyrimidin-Behandlungen vor allem hochresistente Stämme gegen diese Fungizidklasse selektiert (A.S. Walker, persönliche Mitteilung). Es stellt sich nun die Frage, warum in der Champagne und entlang der Deutschen Weinstraße durch den Einsatz derselben Fungizide die MDR und nicht die Einzelresistenzen selektiert werden. Dies dürfte mit dem Einsatz verschiedener Wirkstoffe und den Eigenschaften dieser Fungizide zusammenhängen. In der Champagne werden jährlich zwei bis drei Behandlungen gegen Botrytis durchgeführt. Typischerweise werden dazu abwechselnd Fludioxonil, Anilinopyrimidine und Fenhexamid

75

verwendet. Da gegen Fludioxonil bisher keine einzelresistenten Stämme im Weinbau bekannt sind und Labormutanten einen großen Fitnessnachteil besitzen (Ziogas et al., 2005), muss angenommen werden, dass es für *Botrytis* nicht möglich ist, eine Einzelresistenz gegen Fludioxonil unter Freilandbedingungen zu selektieren. Dies und der stetige Wechsel der Fungizide führt bei *B. cinerea* in der Champagne nicht zur Selektion von Einzelresistenzen. Eine Anhäufung von mehreren Einzelresistenzen in einem *B. cinerea*-Isolat wäre eine Möglichkeit, sich gegen mehrere Fungizide zu schützen. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich und dürfte zu gravierenden Fitnessnachteilen der Stämme führen. Der Wechsel der verschiedenen Wirkstoffe und die spezielle Wirkungsweise der Fungizide, vor allem von Fludioxonil, führen anscheinend zur Selektion von MDR-Stämmen, die eine signifikante Resistenz gegen Anilinopyrimidine, Fludioxonil und Fenhexamid zeigen.



Abb. 34: Häufigkeit von Botrytizid-Rückständen in Keltertrauben aus Baden-Württemberg. Daten der CVUA in Stuttgart (cvuas.untersuchungsämter-bw.de).

In einer Untersuchung des chemischen und Veterinäruntersuchungsamts Stuttgart wurden seit 2004 in Keltertrauben aus Baden-Württemberg Rückstände von Fludioxonil, Fenhexamid und Cyprodinil mit ansteigender Häufigkeit beobachtet (Abb. 34). 2006 waren 98% der Proben mit mehr als einem Wirkstoff belastet. Durchschnittlich wurden sieben bis acht, maximal 15 Wirkstoffe in einer Probe nachgewiesen (cvuas.untersuchungsämter-bw.de). Anhand dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass auch in der Pfalz bei den üblichen ein bis drei Botrytizidbehandlungen pro Vegetationsperiode diese Fungizide und deren Wechsel wie in der Champagne zur Selektion der MDR-Stämme führt.

MDR-Stämme werden bei *B. cinerea* im Weinbau demnach durch den Einsatz der neueren Fungizide mit z.T. komplexen Wirkmechanismen und dem Wechsel verschiedener Wirkstoffe selektiert (Abb. 33). Dieser Mechanismus würde bei einem gleichen Vorgehen wie in der Champagne oder entlang der Deutschen Weinstraße auch in anderen Weinanbaugebieten die

MDR-Phänotypen selektieren. Durch den hohen Anteil der MDR in der Champagne und in der Pfalz kann man bereits von einer Verschiebung der basalen Fungizidsensitivität der *B*. *cinerea*-Populationen in Richtung der erhöhten Werte der MDR-Stämme sprechen.

Eine Vorhersage bezüglich einer Selektion von Einzelresistenzen oder MDR-Phänotypen durch Fungizide, die in Zukunft im Markt eingeführt werden, ist sehr schwierig. Sowohl Boscalid, als auch Fenhexamid oder Cyprodinil selektieren, wenn sie alleine eingesetzt werden, eine Einzelresistenz. Bei einem Wechsel der Wirkstoffe Fenhexamid, Cyprodinil und Fludioxonil werden MDR-Stämme bevorzugt. Trotzdem führt das seit 2004 vermehrt im Wechsel mit Fludioxonil, Cyprodinil bzw. Fenhexamid eingesetzte Fungizid Boscalid zur Selektion einer Einzelresistenz, obwohl MDR2- und MDR3-Phänotypen eine schwache Resistenz gegen Boscalid zeigen.

# 4.3. Molekulare Grundlagen der drei MDR-Phänotypen in B. cinerea

Zu Beginn dieser Arbeit konnten nur Mutmaßungen über die molekularen Grundlagen der MDR bei *B. cinerea*-Freilandisolaten angestellt werden (Leroux et al., 1999; Kretschmer und Hahn, 2008). Ausgehend von dem aus der Humanmedizin gut dokumentierten Fungizidresistenzmechanismus der MDR (Multidrug Resistenz; Lehnert, 1994; Hiller et al., 2006a; Prasad et al., 2006; Kuo, 2007; Zhang und Fan, 2007; Mishra et al., 2007) wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch bei *B. cinerea* die Überexpression von Exportsystemen für die beobachteten MDR-Phänotypen verantwortlich sein könnten. Aufgrund dieser Hypothese sollte zunächst untersucht werden, ob bei MDR-Stämmen ein verstärkter Export von Fungiziden vorzufinden ist. Anschließend sollten durch Macro- und Microarray-Untersuchungen überexprimierte Transportergene identifiziert werden. Diese sollten anschließend durch Deletionsanalysen charakterisiert werden, wodurch der funktionelle Zusammenhang zwischen MDR und Transportergenüberexpression hergestellt werden sollte. Im letzten Teil dieser Untersuchung sollten mögliche Mutationen als Auslöser der MDR identifiziert werden.

# Fungizidakkumulation bei MDR-Stämmen und Identifizierung der überexprimierten Transportergene

Angelehnt an die Arbeiten um Hayashi et al. (2001, 2002a, 2002b) konnte für den MDR1und den MDR2-Phänotyp ein gesteigerter Export der Fungizide gezeigt werden. Sensitive Stämme zeigten eine transiente Fungizidakkumulation, während bei MDR-Stämmen von Anfang an nur eine sehr geringe Fungizidaufnahme zu verzeichnen war. Dies lässt auf eine konstitutive Überexpression der beteiligten Exportsysteme schließen. Nach Zugabe eines ATP-Synthese-Entkopplers zur Fungizidakkumulationsuntersuchung war sowohl bei sensitiven als auch bei MDR-Stämmen ein starker Anstieg der Fungizidakkumulation zu beobachten (Abb. 10). Diese Energieabhängigkeit des Exports lässt auf eine Beteiligung von Exportsystemen aus den Klassen der ABC- oder MFS-Transporter schließen.

Durch Genexpressions-Analysen wurden drei potentiell für die MDR-Phänotypen verantwortliche Exportsysteme in *B. cinerea* identifiziert (Abb. 11, Abb. 12). Ähnlich zur Situation in *Candida*, in der sowohl ABC- als auch MFS-Transporter in klinischen Isolaten zur MDR führen können (Prasad et al., 1995; Sanglard et al., 1997; Hiller et al., 2006b), wurde auch bei *B. cinerea* ein ABC-Transporter (*bcatrB*) in MDR1- und MDR3-Stämmen und ein MFS-Transporter (*bcmfsM2*) in MDR2- und MDR3-Phänotypen als konstitutiv stark überexprimiert identifiziert. Durch phänotypische Daten (Tab. 6) und Kreuzungen deutete sich bereits an, dass MDR3-Stämme die kombinierten Eigenschaften der MDR1- und MDR2-Stämme besitzen (Chapeland-Leclerc, 2000). Dies konnte auf molekularer Ebene ebenfalls nachvollzogen werden, wodurch endgültig bewiesen wurde, dass MDR3-Phänotypen aus der Kreuzung von MDR1- und MDR2-Stämmen hervorgehen (Abb. 13A, Abb. 24A). Das dritte überexprimierte Gen, *bcmfs19*, bestätigte sich später nicht als Auslöser des MDR2-Phänotyps.

#### 4.3.1. BcatrB als Auslöser des MDR1- und seine Beteiligung am MDR3-Phänotyp

# Expression von bcatrB in MDR-Stämmen

Sowohl MDR1- als auch MDR3-Stämme zeigten im Vergleich mit sensitiven Stämmen eine konstitutive Überexpression des ABC-Transporters *bcatrB*. Bei MDR3-Stämmen war die konstitutive *bcatrB* Überexpression 3,5fach höher als bei den MDR1-Phänotypen. Dies deutet neben der erworbenen additiven Resistenz der MDR3-Stämme, hervorgerufen von den MDR1- und MDR2-Mechanismen, auch auf eine weiterhin gesteigerte Expression des ABC-Transporters *bcatrB* in MDR3-Stämmen hin (Abb. 13B). Dies dürfte z.T. auch eine Erklärung für die beobachteten höheren Fungizidresistenzwerte der MDR3-Stämme im Vergleich mit MDR1- und MDR2-Stämmen sein. Gleichzeitig wird dadurch gezeigt, dass die konstitutive Überexpression in MDR1-Stämmen in Zukunft durch weitere Mutationen noch gesteigert werden kann.

Durch eine Fungizidinduktion war es möglich, die *bcatrB* Expression ebenfalls in sensitiven Stämmen drastisch zu erhöhen. Dagegen war in MDR1-Stämmen eine um ein Drittel geringere *bcatrB* Induktion durch Fludioxonil als bei sensitiven Stämmen zu beobachten. Durch den konstitutiv erhöhten Export der Fungizide durch BcatrB wird im Cytoplasma und im Zellkern von MDR1-Stämmen die Fungizidkonzentration im Vergleich zu sensitiven Stämmen auf einem niedrigeren Niveau gehalten. Dies zeigt erstens, dass der Sensor, der die Fungizide erkennt, nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist und lässt die Vermutung zu, dass, wie in Hefe für Pdr1 beschrieben, möglicherweise ein Transkriptionsfaktor direkt für die Erkennung des Fungizids über hydrophobe Taschen verantwortlich ist (Thakur et al., 2008). Da die *bcatrB* Induktion nach Fungizidbehandlung sehr schnell erfolgen muss, wäre eine solche direkte Interaktion mit einem Genexpressions-Aktivator von Vorteil, da die Erkennung des Fungizids durch einen Sensor, die Amplifikation des Signals durch Signalkaskaden und die Weiterleitung des Signals in den Zellkern wegfallen würden.

Die besten Induktoren von *bcatrB* sind die Fungizide Fludioxonil und Cyprodinil. Diese stellen auch die am häufigsten verwendeten Botrytizide dar und der MDR1-Phänotyp zeigt gegen beide Fungizide eine signifikante Resistenz. Durch die Überexpression von *bcatrB* umgeht *Botrytis* gleichzeitig zwei Schwierigkeiten. Erstens wird er resistenter gegen Fludioxonil, gegen das eine Selektion von Einzelresistenzen anscheinend unmöglich ist und zweitens wird für die zwei wichtigsten Botrytizide gleichzeitig die Toleranz erhöht.

Von Leroux et al. (1999) wurde beschrieben, dass sich die MDR vor allem bei der Keimung und beim Keimschlauchwachstum und weniger in der Myzelwachstumsphase ausprägt. Dies lässt sich durch die molekularen Ergebnisse der zeitabhängigen Expression von *bcatrB* in sensitiven und MDR1-Stämmen nicht nachvollziehen (Abb. 13C), da die Expression des Transporters im Myzel am stärksten ausgeprägt war. Wenn davon ausgegangen wird, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Expression und gebildeter Proteinmenge besteht, müsste der MDR-Phänotyp deshalb im Myzel am stärksten ausgeprägt sein. Ein Grund für die Unterschiede zwischen molekularen und phänotypischen Daten könnte darin begründet liegen, dass Sporen, also Ruhestadien, sich nicht so gut bzw. schnell an widrige Umweltbedingungen anpassen können wie das Myzel. Dieses scheint sich also plastischer und schneller mit veränderter Genexpression an die Stresssituation anpassen zu können als Ruhestadien.

# Deletion von bcatrB in MDR1-Stämmen

Durch die Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass in MDR1- und MDR3-Stämmen *bcatrB* überexprimiert ist. Deshalb wurde *bcatrB* in zwei unabhängigen MDR1-Freilandstämmen deletiert, um so einen funktionellen Zusammenhang zwischen MDR und Genüberexpression herzustellen. Die Deletion von *bcatrB* führte zum totalen Verlust des MDR1-Phänotyps (Tab. 8). Für die Fungizide Carbendazim oder Cyprodinil kehrten die Fungizidsensitivitätswerte der MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten auf das Niveau der sensitiven Stämme zurück. Für die basale Resistenz gegen diese Substanzen spielt BcatrB in sensitiven Stämmen daher wohl keine große Rolle, durch eine Überexpression von *bcatrB* kann die Resistenz gegen diese Substanzen jedoch signifikant gesteigert werden. Eine Hypersensitivität der Mutanten wurde gegenüber den Wirkstoffen Fludioxonil, Iprodion und den pflanzlichen Abwehrstoffen Eugenol oder Camalexin beobachtet. Diese Überempfindlichkeit von MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten im Vergleich zu sensitiven Stämmen wurde bereits für *bcatrB* Labormutanten von B05.10 beschrieben (Vermeulen et al., 2001; Schoonbeek et al., 2001). Dies veranschaulicht, dass auch in sensitiven Stämmen der ABC-Transporter BcatrB teilweise zur basalen Fungizidresistenz von *Botrytis* beiträgt.



Abb. 35: Modell der Funktionen von BcatrB in *B. cinerea*. BcatrB ist bei der Entgiftung von Antibiotika, pflanzlichen Abwehrstoffen, Fungiziden und an der MDR beteiligt.

In sensitiven Stämmen kann BcatrB nicht nur diese Substanzen exportieren, sondern viele Substrate des Transporters z.B. Fludioxonil, Cyprodinil und Fenhexamid sind gleichzeitig auch in der Lage, dessen Expression zum Teil drastisch zu induzieren (Abb. 14; Vermeulen et al., 2001). Aufnahmeversuche mit <sup>14</sup>C-markiertem Fludioxonil, durchgeführt mit MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten und deren MDR1-Elternstämmen, zeigten eine stark erhöhte Akkumulation des Fungizids in den Deletionsmutanten. Außerdem war keine durch Expression von weiteren Transportern ausgelöste transiente Fungizidaufnahme der Mutanten mehr zu beobachten. Dies zeigt, dass Fludioxonil mehr oder weniger ausschließlich durch BcatrB exportiert wird.

BcatrB nimmt bei *Botrytis* eine hervorgehobene Stellung bei der frühen Abwehr von Antibiotika, Fungiziden und pflanzlichen Abwehrstoffen ein. Durch die Fähigkeit sensitiver Stämme, nach einer Induktion schnell BcatrB zu exprimieren, wird eine erste Verteidigungslinie aufgebaut, die *Botrytis* ermöglicht, sich durch weitere Anpassungen gegen

diese Substanzen zu schützen. Eine konstitutive Überexpression von *bcatrB* führt zur MDR und ermöglicht es damit *B. cinerea*, sich gegen diese Substanzen, vor allem Fungizide, besser zu behaupten als sensitive Stämme (Abb. 35).

# Mutationen die zur Überexpression von bcatrB führen

Prinzipiell gibt es drei Auslöser, die zu einer Überexpression eines Gens führen können. Diese sind Genduplikation, Promotorveränderungen oder Mutationen in regulatorischen Proteinen (Cole et al., 1992; Hamamoto et al., 2000; Coste et al., 2004; Coste et al., 2006; Luo et al., 2008).

Durch Southern-Blot-Analyse konnte für bcatrB eine Genamplifikation, ebenso wie durch Sequenzanalysen eine Promotorveränderung als Auslöser des MDR1- bzw. MDR3-Phänotyps ausgeschlossen werden (Abb. 15B, Abb. 17). Schon während der Macroarray-Analyse zeigten MDR1- und MDR3-Stämme neben der starken konstitutiven Überexpression von bcatrB zusätzlich eine schwache, konstitutive Überexpression anderer ABC-Transportergene (Abb. 12). Dies bestätigte auch eine spätere Realtime-PCR-Analyse, sodass mindestens zwei weitere ABC-Transportergene, bmr3 und bcatrK (=bmr1), mit bcatrB im MDR1-Phänotyp koreguliert sind (Abb. 18). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein regulatorisches Protein, möglicherweise ein Transkriptionsfaktor, für den MDR1-Phänotyp verantwortlich ist. In Fortführung der vorliegenden Arbeit wurde von M. Leroch (unsere Arbeitsgruppe) und S. Fillinger (INRA, Versailles) der Bcmrr1 Transkriptionsfaktor als Auslöser des MDR1-Phänotyps identifiziert. Bcmrrl zeigt in MDR1-Stämmen verschiedene unabhängige Punktmutationen, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch führen. Ähnlich zu MDR1 bcatrB Deletionsmutanten zeigen auch MDR1 bcmrrl Deletionsmutanten einen Verlust des MDR1-Phänotyps (A. Mosbach). Die Überexpression eines mutierten bcmr1-Transkriptionsfaktors in einem sensitiven Stamm zeigt im Vergleich mit MDR1-Stämmen sogar eine weiterhin gesteigerte Fungizidresistenz (M. Leroch).

Allerdings deutet es sich an, dass, ähnlich zur Situation in Hefe, noch andere regulatorische Proteine wichtig für die Expression von *bcatrB* und den beiden anderen ABC-Transportern sind. Erstens wird bei sensitiven Stämmen nach einer Fungizidbehandlung nicht das identische Subset an ABC-Transportern induziert, das bei MDR1-Stämmen mit *bcatrB* koreguliert ist. Zweitens zeigte eine Realtime-PCR-Analyse mit MDR1 *bcmrr1* Deletionsmutanten weiterhin eine leichte Expression von *bcatrB* und eine Reduktion der Expression der MDR1 koregulierten ABC-Transporter *bmr3* und *bcatrK* nach einer Fludioxonilbehandlung.

81

In *B. cinerea*-Freilandstämmen des MDR1- und des MDR3-Phänotyps ist der mutierte Transkriptionsfaktor Bcmrr1 für die Überexpression von *bcatrB* verantwortlich. *BcatrB* wiederum ist maßgebend für die Resistenz der MDR1- und partiell der MDR3-Stämme gegenüber den wichtigen Botrytiziden Cyprodinil und Fludioxonil.

#### 4.3.2. BcmfsM2 als Auslöser des MDR2- und seine Beteiligung am MDR3-Phänotyp

#### Expression von *bcmfsM2* in MDR-Stämmen

Für den MDR2-Phänotyp konnte durch eine Microarray-Analyse eine Überexpression des MFS-Transporters *bcmfsM2* in MDR2-Stämmen im Vergleich mit sensitiven Stämmen und später durch Northern-Blot-Analyse auch eine Überexpression in MDR3-Stämmen beobachtet werden (Abb. 23, Abb. 24). Dieser MFS-Transporter besitzt nur wenige Homologe in anderen Ascomyceten (Abb. S2) und ist in sensitiven und MDR1-Stämmen nur schwach konstitutiv exprimiert (Abb. 24B). Dagegen werden in MDR2- und MDR3-Stämmen sehr hohe konstitutive Expressionslevel von etwa 600fach im Vergleich mit sensitiven Stämmen beobachtet (Abb. 24B). Auffällig für *bcmfsM2* ist, dass er mit keiner bisher getesteten Substanz in sensitiven Stämmen induziert werden kann. Dies und die geringe Expression von *bcmfsM2* in sensitiven Stämmen bedeutet, dass *bcmfsM2* bei *B. cinerea* in sensitiven Stämmen nicht wie BcatrB an der basalen Resistenz gegen Fungizide beteiligt ist. Außerdem deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass BcmfsM2 die molekulare Grundlage des MDR2- bzw. MDR3-Phänotyps ist.

# Deletion von bcmfsM2 in MDR2-Stämmen und Grundlage der Überexpression

Kürzlich wurden in unserer Arbeitsgruppe durch A. Mosbach und M. Leroch Deletions- und Überexpressionsmutanten von *bcmfsM2* hergestellt. MDR2 *bcmfsM2* Deletionsmutanten zeigten einen Verlust des MDR2-Phänotyps. Überexpressionsmutanten von *bcmfsM2* in einem sensitiven Stamm zeigten den bekannten MDR2-Phänotyp. Dies zeigt, dass die Überexpression von *bcmfsM2* in MDR2- und MDR3-Stämmen für deren MDR-Phänotyp verantwortlich ist.

Von D. Mernke wurde gezeigt, dass eine Insertion eines transposablen Elements in den Promotor des *bcmfsM2* Transporters in MDR2- und MDR3-Stämmen stattfand. Diese Insertion ist in allen MDR2- und MDR3-Stämmen gleichzeitig mit einer Deletion eines Teils des ursprünglichen Promotors verbunden. Alle bisher untersuchten MDR2- und MDR3-Stämme zeigen die Insertion an der identischen Position. Dies kann nur bedeuten, dass die Insertion dieses Transposons ein einzelnes Ereignis war und alle MDR2- und MDR3-Stämme

einen gemeinsamen Ursprung haben. Dies erklärt auch die geringere genetische Vielfalt der MDR2- und MDR3-Stämme. Der Ursprung der MDR2-Stämme liegt mit Sicherheit nicht in diesem Weinanbaugebiet (Ausführungen Kapitel 4.2), sondern wird in der Champagne oder in der Nähe der Champagne vermutet.

# 4.3.3. Modell der molekularen Grundlage der MDR bei Botrytis

Zwischen französischen und deutschen MDR-Stämmen gibt es weder bezüglich der phänotypischen Ausprägung, noch der molekularen Grundlagen der MDR Unterschiede, weswegen für die verschiedenen MDR-Phänotypen ein grundlegendes Modell angegeben werden kann (Abb. 36). Aus einer Kreuzung aus einem MDR1- mit einem MDR2-Stamm entstehen sensitive, MDR1-, MDR2- und MDR3-Phänotypen als Nachkommen (Chapeland-Leclerc, 2000). Ausgelöst werden die MDR-Phänotypen durch eine Überexpression der Transportergene *bcatrB* und *bcmfsM2*.



Abb. 36: Schematische Darstellung der Mutationen, die zu den verschiedenen MDR-Phänotypen in *B. cinerea* führen. Mutationen sind als Sterne gekennzeichnet. Überexprimierte Transportergene sind eingekreist. Unterbrechungslinien deuten an, dass zwischen den Genen keine räumliche Nähe auf der Genomsequenz besteht. Bcmrr1 reguliert die *bcatrB* Expression.

Der ABC-Transporter BcatrB ist für den MDR1- und partiell für den MDR3-Phänotyp, der MFS-Transporter BcmfsM2 für den MDR2- und ebenfalls partiell für den MDR3-Phänotyp verantwortlich. Die Mutationen, die zur Überexpression der Transporter führen, sind in MDR1-Stämmen Punktmutationen im Transkriptionsfaktor Bcmrr1 und in MDR2-Stämmen eine Insertion eines transposablen Elements im Promotorbereich von *bcmfsM2*. MDR3-

Stämme zeigen als Nachkommen der Kreuzung beide aus den MDR1- und MDR2-Elternstämmen bekannten Mutationen.

# 4.3.4. Gefahr der Entstehung weiterer MDR-Phänotypen

B. cinerea besitzt etwa 30 MDR-ABC-Transporter und ungefähr 100 MDR-MFS-Transporter. Die drei MDR-Phänotypen bei Botrytis konnten alle auf die Überexpression von bcatrB und bcmfsM2 zurückgeführt werden. In der Zukunft könnten durch Mutationen weitere Transportergene überexprimiert werden, die neue Fungizidresistenzspektren aufweisen könnten oder die bereits bestehende MDR bei den drei MDR-Phänotypen verstärken könnten. Eine Überexpression des MFS-Transporters Bcmfs1 in Laborstämmen führte beispielsweise zu einer MDR mit einer erhöhten Fungizidresistenz gegen Cyprodinil, DMIs, Iprodion und verschiedene Toxine (Hayashi et al., 2002b). Entlang der Deutschen Weinstraße traten in den Jahren 2006 bis 2008 2,5%, 3,5% bzw. 1% B. cinerea-Stämme auf, die eine leichte um den Faktor zehn erhöhte Resistenz gegen Tebuconazol aufwiesen. Eine geringe Erhöhung der Toleranz ist oft typisch für eine durch verstärkten Export ausgelöste Resistenz. Möglicherweise verbirgt sich hinter diesen Stämmen eine Überexpression des Pdr5homologen ABC-Transporters bcatrD. In bcatrD überexprimierenden B. cinerea-Labormutanten wurde eine Resistenz gegen DMIs, z.B. Tebuconazol, erreicht (Hayashi et al., 2002a). Nakaune et al. (1998) beschrieb für *Penicillium digitatum* eine Überexpression des Pdr5-homologen ABC-Transporters pmr1 in Freilandisolaten als Auslöser einer DMI-Resistenz dieser Stämme.

In MDR2-Stämmen wurde eine leichte Überexpression des MFS-Transporters *bcmfs19* beobachtet. Durch Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass Bcmfs19 möglicherweise beim Quorum sensing, einem aus Bakterien bekannten Selbsterkennungsmechanismus (Gray, 1997), eine Rolle spielen könnte. Bcmfs19 ist stark zwischen verschiedenen Ascomyceten konserviert (Abb. S1) und möglicherweise verantwortlich für den Export dieser Erkennungssignale. Diese Substanzen könnten eine Ähnlichkeit zum N-Acyl Homoserin Lacton der Bakterien (Kleerebezem et al., 1997) oder zu Farnesol, bekannt aus *C. albicans* (Hornby et al., 2001), zeigen. Allerdings führt die Überexpression von *bcmfs19*, auch wenn er nachweislich nicht für die drei MDR-Phänomene verantwortlich ist, zu einer leichten Resistenz gegen Boscalid und Cycloheximid (Tab. 9).

Diese Beispiele zeigen bereits, dass weitere MDR-Phänomene entstehen könnten, die möglicherweise die Resistenzlevel der bereits vorhandenen MDR-Phänotypen weiter erhöhen,

84

oder dass bisher unbekannte MDR-Phänotypen mit anderen Resistenzspektren entstehen könnten. Dies stellt für die Zukunft möglicherweise eine große Gefahr für die Effektivität der Fungizide dar.

#### 4.4. Modulation des MDR1-Phänotyps durch putative ABC-Transporter-Inhibitoren

Der durch den ABC-Transporter BcatrB ausgelöste MDR1-Phänotyp ist bei *B. cinerea* in der Champagne und entlang der Deutschen Weinstraße weit verbreitet. Die aus dem verstärkten Export verschiedener Fungizide wie z.B. Fludioxonil, Cyprodinil und Tolnaftat resultierenden Resistenzwerte sind *in vitro* nicht besonders hoch (Abb. 29), führen jedoch zur Selektion der MDR-Stämme und einer herabgesetzten Effektivität der Fungizidbehandlungen. Dadurch besteht die Gefahr, dass MDR-Stämme in der Zukunft nicht mehr effektiv bekämpft werden können. Das Hauptproblem bei der Bekämpfung dieser Stämme ist die gleichzeitige Resistenz gegen viele der heutigen und möglicherweise auch zukünftigen Botrytizide.

ABC-Transporter-Modulatoren werden bisher vor allem bei der Bekämpfung der MDR bei Krebszellen eingesetzt (Nobili et al., 2006; Shukla et al., 2008; Sharom, 2008). Diese Substanzen sollen die Zellen durch Blockade der Transporter für therapeutische Wirkstoffe resensibilisieren.

Ziel dieser Untersuchung war es, mit ABC-Transporter-Modulatoren die Transporteigenschaften von BcatrB zu modulieren und dadurch die MDR1-Stämme für Botrytizide zu resensibilisieren. Die genaue Wirkungsweise der Modulatoren ist bisher unbekannt. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass entweder die Hydrolyse des Energieträgers ATP verhindert (Ambudkar et al., 1999) oder der Wirkstofftransport beeinträchtig wird (Higgins, 2007). In vitro konnte bei pflanzenpathogenen Pilzen eine erhöhte Toxizität von Fungiziden bei einer Kombination mit ABC-Transporter-Inhibitoren gezeigt werden (Hayashi et al., 2003; Carrideo et al., 2004; Reimann und Deising, 2005; Roohparvar et al., 2007a). Für die vorliegende Untersuchung wurden folgende, aus der Humanmedizin stammende Substanzen Reserpin, Amylorid, Dipyridamol, Verapamil, Lidocain, Quinin, Chlorpromazin und Progesteron verwendet (Ponte-Sucre, 2007). Zusätzlich wurden die nicht-ionischen Detergentien Tween20 und TritonX100 und das Flavonoid Naringenin getestet (Hayashi et al., 2003; Roohparvar et al., 2007a: Ponte-Sucre, 2007). Alle Substanzen waren für B. cinerea nur schwach toxisch (Tab. 11). Jedoch würden für den Menschen bei den eingesetzten Konzentrationen von 5µg ml<sup>-1</sup> (Progesteron) bis 2mg ml<sup>-1</sup> (Lidocain) keine unmittelbaren Gefahren für die Gesundheit bestehen, da die LD<sub>50</sub>-Werte (intraperitoneal verabreicht) bei der Rate zwischen 85mg kg<sup>-1</sup> (Reserpin) und über 5000mg kg<sup>-1</sup> (Naringenin) liegen.

Amylorid und Dipyridamol zeigten weder bei sensitiven, noch MDR-Stämmen einen Einfluss auf die Fungizidresistenz.

Die Substanzen Naringenin, Progesteron, Reserpin und die nicht-ionischen Detergentien Tween20 und TritonX100 erhöhten die Fungizidresistenzwerte bei allen Stämmen durchschnittlich um den Faktor 3 bis 70 (Abb. 30B). Eine Ausnahme bildet Progesteron, das beim MDR2-Stamm in der Lage war, den MDR-Phänotyp um den Faktor 5,75 zu verringern. Da der MDR2-Phänotyp durch BcmfsM2 ausgelöst wird, sollte dieser Effekt nicht auftreten. Möglicherweise stellt Progesteron ein Transportsubstrat von BcmfsM2 dar und führt so zu einem kompetetiven Transport beider Substanzen. Bei Substratsättigung des Transporters stehen anteilig nur 50% der Transportkapazität für den Export von Fludioxonil zur Verfügung. Dies würde zu einer höheren Fludioxonilkonzentration im Cytosol führen.

Warum diese Substanzen zu einer Erhöhung der Fungizidresistenz führen ist unbekannt. Am Wahrscheinlichsten ist es, dass diese Substanzen mit dem Wirkstoff Fludioxonil interagieren und Fludioxonil dadurch in einer nicht bioaktiv verfügbaren Form vorlag. Die nicht-ionischen Detergenzien könnten auch die Zusammensetzung der Plasmamembran und damit verbunden die Fungizidaufnahmefähigkeit verändert haben. Ähnliche Beobachtungen wurden von Carriedo et al. (2004) in einer Studie bei *B. cinerea* bei der Kombination von Prenyl-Chrysin mit Fludioxonil gemacht.

Vor allem Chlorpromazin, jedoch auch Lidocain, Quinin und Verapamil, zeigten die erwartete Fähigkeit, die Fungizidresistenz des MDR1-Phänotyps durch eine Blockade des ABC-Transporters BcatrB *in vitro* zu verringern. Chlorpromazin war in der Lage, den MDR1-Phänotyp fast vollständig aufzuheben (Abb. 30C). Auch bei *bcatrD* überexprimierenden Labormutanten war diese Substanz besonders effektiv und konnte zumindest teilweise die Resistenz der Labormutante gegen DMI-Fungizide wieder aufheben (Hayashi et al., 2003). Während steigende Chlorpromazinkonzentrationen auf die Fungizidsensitivität von sensitiven und MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten keine Auswirkung hatte, nahm die Fludioxonilresistenz der MDR1-Stämme fast linear mit der eingesetzten Konzentration an Chlorpromazin ab (Abb. 31).

In einer Untersuchung mit künstlich infizierten Bohnenblättern wurde analysiert, ob Chlorpromazin in Kombination mit einer Fungizidmischung bestehend aus Fludioxonil und Cyprodinil (switch®) zur Kontrolle von *B. cinerea*-Stämmen des MDR1-Phänotyps auch in der Landwirtschaft genutzt werden könnte. Ohne Transportermodulator zeigten MDR1-Stämme auf Bohnenblättern, die mit einer Konzentration von  $4\mu g$  ml<sup>-1</sup> Fungizidmischung behandelt wurden, nur eine geringe Verringerung ihrer Infektionsfähigkeit im Vergleich zu

86

den anderen untersuchten Resistenzphänotypen (Abb. 32). Diese Stämme sind also wie *in vitro* schon gezeigt auch *in vivo* in der Lage höhere Fungizidkonzentrationen auszuhalten als z.B. sensitive Stämme und können deshalb auch Fungizid-behandelte Wirtspflanzen noch infizieren. Dagegen zeigte sich bei Bohnenblättern, die zusätzlich zum Fungizid auch noch mit Chlorpromazin behandelt wurden, dass die Virulenz der MDR1-Phänotypen im Vergleich zu den nur mit Fungizid behandelten Bohnenblättern um den Faktor zwei reduziert wurde, während sensitive, MDR2 und MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten nur eine Verringerung um den Faktor 1,5 aufwiesen (Abb. 32). Durch die Mischung von Fungiziden und ABC-Transporter-Inhibitor konnten MDR1-Stämme also auch auf Wirtspflanzen besser kontrolliert werden.

Die Kombination bestehend aus Fungiziden und ABC-Transporter-Inhibitor führte bei allen Stämmen zu einer Verringerung der Virulenz. Bei vielen Pilzen wurde beschrieben, dass ABC-Transporter bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen (De Waard et al., 2006; Roohparvar et al., 2007a). Diese ABC-Transporter könnten durch Chlorpromazin ebenfalls in ihrer Funktion beeinträchtigt worden sein, wodurch die Virulenz verringert wurde. Dies würde bei einer Kombination von ABC-Transporter-Inhibitoren mit Fungiziden neben der verbesserten Bekämpfung der MDR-Stämme zusätzlich eine verbesserte Kontrolle aller *B. cinerea*-Stämme mit sich bringen.

Diese Studie zeigt, dass der Einsatz von ABC-Transporter-Modulatoren zur besseren Bekämpfung der *B. cinerea* MDR1-Phänotypen grundsätzlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich ist. Allerdings besteht das größte Problem für den Einsatz dieser Substanzen in der Landwirtschaft in der Herkunft der Substanzen aus der Humanmedizin, weswegen diese Chemikalien in dieser Form nicht verwendet werden dürfen. Außerdem sind die Modulatorkonzentrationen, die nötig sind um einen Effekt zu erzielen, im Vergleich mit den niedrigen Fungizidkonzentrationen sehr hoch. Dies würde eine hohe Umweltbelastung und gleichzeitig eine Gefahr für die menschliche Gesundheit mit sich bringen. Deshalb müssten erst einige Vorraussetzungen erfüllt sein, um diese Substanzen effektiv in der Landwirtschaft einsetzen zu können. Erstens sollten die Wirkstoffe nicht aus der Humanmedizin stammen, wobei allerdings die Klasse der sekundären Pflanzenstoffe (Gibbons, 2005) bereits mögliche Inhibitoren bietet. Leider war für das untersuchte Flavonoid Naringenin keine Resensibilisierung der MDR1-Stämme zu beobachten. Zweitens müsste die Effektivität der Substanzen verbessert werden, um bereits mit geringen Modulatorkonzentrationen einen möglichst großen Effekt zu erzielen. Dies lässt einen solchen Ansatz zur Kontrolle der MDR- Phänotypen in der Landwirtschaft -zumindest im Moment- als nicht sehr viel versprechend erscheinen.

## 4.5. Fitnesseigenschaften der MDR-Phänotypen in vitro

Stämme, die gegen ein Fungizid hochresistent sind, zeigen oft negative Wachstums-, Sporulations-, Sporenkeimungseigenschaften oder eine verringerte Stresstoleranz. Dies konnte bisher für Iprodion- und Cyprodinil-resistente Freilandstämme sowie für Fludioxonilund Pyraclostrobin-resistente B. cinerea-Labormutanten gezeigt werden (Panayotakou und Malathrakis, 1983; Wang und Coley-Smith, 1986; Raposo et al., 2000; Baroffio et al., 2003; Ziogas et al., 2005; Markoglou et al., 2006). Zeigen resistente Stämme Fitnessnachteile, besitzen sie eine geringere Konkurrenzfähigkeit und werden von sensitiven Stämmen verdrängt. Bei menschlichen Patienten mit Candidiase können die ständigen Behandlungen mit Azolwirkstoffen die sensitiven Stämme unterdrücken, sodass sich resistente Stämme mit Fitnessnachteilen trotzdem behaupten können. Bei Pflanzenpathogenen im Feiland herrscht eine große Konkurrenz und ein Selektionsdruck, der resistente Stämme selektiert, ist nur für kurze Zeit vorhanden. Deshalb können sich nur resistente Stämme mit einer mit sensitiven Stämmen vergleichbaren Fitness behaupten. Für resistente Stämme mit einem Fitnessnachteil gibt es jedoch eine Möglichkeit sich gegen konkurrenzfähigere Stämme zu behaupten. Während der Selektion durch Fungizide könnten sie weitere Mutationen, die kompensatorisch wirken, erwerben und so die Fitness und die Konkurrenzfähigkeit erhöhen.

Über die Fitness der MDR-Phänotypen (Kretschmer und Hahn, 2008; Leroux et al., 1999) ist bisher kaum etwas bekannt. Je geringer die Fitnessnachteile der MDR-Stämme im Vergleich mit sensitiven Stämmen sind, desto konkurrenzfähiger sind sie. Ohne Fungizideinsatz würden sich die MDR-Stämme in der Population behaupten und bei Fungizidselektion könnten sie sich dann stark ausbreiten. Die Folgen wären eine Verringerung oder gar ein Verlust der Effektivität der heutigen und der zukünftigen Fungizide. Dies würde zu einer erschwerten Bekämpfung von *B. cinerea* in der Landwirtschaft und zu erheblichen ökonomischen Verlusten führen.

Bevor die Ergebnisse der Fitnessparameter diskutiert werden muss festgehalten werden, dass es sich bei den MDR-Stämmen nicht um Klone handelt, die alle die gleichen Eigenschaften aufweisen würden (Tab. 7). MDR1-Stämme zeigten eine gleichgroße genetische Diversität wie sensitive Stämme. *Bcmrr1*, der Auslöser der *bcatrB* Überexpression, wies bei MDR1-Stämmen mehrere unabhängige Punktmutationen auf. Dies bedeutet, dass der MDR1-Phänotyp mehrfach unabhängig, wie auch für *Candida* gezeigt (Coste et al., 2006), entstanden ist. Der MDR1-Phänotyp kann daher in allen landwirtschaftlich genutzten Regionen der Welt immer wieder neu entstehen. Dagegen waren MDR2- und MDR3-Stämme genetisch weniger divers als MDR1- oder sensitive Stämme (Tab. 7). Da der MDR2-Phänotyp durch ein singuläres Ereignis, der Insertion eines Transposons in den Promotorbereich von *bcmfsM2*, entstanden ist, erklärt sich so deren geringere genetische Diversität. MDR2-Stämme haben sich anscheinend häufiger als Klone verbreitet und schließlich durch sexuelle Vermehrung einen geringen Grad an genetischer Diversität erlangt. Dies bedeutet jedoch auch, dass sich diese Stämme phänotypisch wenig voneinander unterscheiden und dass sie sich nur durch abiotische oder biotische Faktoren in andere landwirtschaftlich genutzte Regionen ausbreiten können.

Bei sensitiven, MDR1-, MDR2-, MDR3-Stämmen und den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten wurden das vegetative Wachstum, die Sporulation, die Sporenkeimung, die Stresstoleranz und die Virulenz untersucht. Alle Stämme zeigten beim vegetativen Wachstum auf verschiedenen künstlichen Medien identische Wachstumsfähigkeiten. Lediglich auf TMA zeigten MDR1-Stämme im Vergleich zu den MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten ein verringertes Wachstum. Die Sporulation und die Biomasseerzeugung aller Phänotypen waren vergleichbar. Sämtliche getestete Stresssituationen, wie Hitze, Kälte, osmotischer oder oxidativer Stress, zeigten beim vegetativen Wachstum keinen Unterschied der Phänotypen (Tab. 10). Lediglich beim vegetativen Wachstum auf Menadion-haltigen Medien zeigten MDR1-, MDR2- und MDR3-Stämme ein besseres Wachstum. Möglichweise werden durch Menadion weitere für den Pilz toxische Reaktionen ausgelöst, so dass durch einen bei den MDR-Stämmen verstärkten Export ein verbessertes Wachstum dieser Stämme ermöglicht wird. Beim vegetativen Wachstum gibt es also keine negativen Auswirkungen der MDR-Mechanismen auf die Fitness der Stämme.

Bei der Keimung der Stämme ohne Stress war kein Unterschied zwischen den verschiedenen Phänotypen zu beobachten. MDR-Stämme zeigten jedoch bei der Keimung in Gegenwart von Sauerstoffradikalbildnern eine um 20-30% höhere Keimungsrate als sensitive Stämme. MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten keimten unter diesen Bedingungen schlechter als die MDR1-Elternstämme (Abb. 25). Da Wasserstoffperoxid weder in der Lage ist *bcatrB* noch *bcmfsM2* zu induzieren (Abb. 14, Daten nicht gezeigt), spielen die Transporter somit bei der Entgiftung der Sauerstoffradikale wohl keine direkte Rolle. Allerdings fiel bei einem Microarray mit MDR2- und sensitiven *Botrytis*-Stämmen auf, dass viele Gene, die mit Stressantwort verbunden sind, in MDR2-Stämmen überexprimiert sind (Tab. S6). Die erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoffradikalen scheint also ein pleiotroper Effekt der MDR zu sein. Auch bei *Magnaporthe grisea* wurde nachgewiesen, dass der ABC-Transporter Abc3 nicht nur bei der Pathogenese, sondern auch an der Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid direkt oder indirekt beteiligt ist (Sun et al., 2006). Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass an der Expression von MDR-Transportern oft Transkriptionsfaktoren, z.B. Yap1, der die oxidative Stressantwort reguliert, beteiligt sind (Nguyên et al., 2001). Es gibt also Schnittstellen zwischen der MDR und der oxidativen Stressantwort. Diese erhöhte Stresstoleranz wirkt sich verstärkt bei der Keimung und kaum beim Myzelwachstum aus. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der größeren Anpassungsfähigkeit des *B. cinerea*-Myzels im Vergleich mit dem Ruhezustand der Spore zusammen. Die MDR-Stämme besitzen keine verringerte Keimungsrate und keimen in der Gegenwart von Radikalbildnern sogar besser als sensitive Stämme.

Auf Gerberapetalen, unverwundeten Bohnenblättern, verwundeten Weinbeeren oder verwundeten Äpfeln wiesen die unterschiedlichen MDR-Phänotypen im Vergleich zu sensitiven Stämmen keine Reduktion der Virulenz auf (Tab. 10). Auf verwundeten Weinblättern sind MDR1- und MDR3-Stämme leicht (wenn auch nicht signifikant) virulenter im Vergleich zu sensitiven oder MDR2-Stämmen (Tab. 10). Bei MDR1 bcatrB Deletionsmutanten zeigte sich eine signifikante um den Faktor zwei verringerte Virulenz im Vergleich mit den MDR1-Elternstämmen (Tab. 10). Es ist bereits bekannt, das Resveratrol, ein bei Pathogenbefall von der Weinrebe gebildetes Phytoalexin, sowohl ein Induktor als auch ein Substrat für BcatrB darstellt (Schoonbeek et al., 2001). BcatrB verzögert durch den Export des Resveratrols das Erreichen einer cytosolisch toxischen Konzentration und ermöglicht so B. cinerea weitere Entgiftungsmechanismen, z.B. Laccasen, zu induzieren. Sensitive und MDR1-Stämme haben durch die induzierte bzw. konstitutive Expression von bcatrB genügend Zeit eine Entgiftung von Resveratrol zu erzielen (Adrian et al., 1998; Schoonbeek et al., 2001). Die Deletion von *bcatrB* führt zum Verlust eines Teils der Abwehrmechanismen, wodurch die Resveratrolkonzentration im Cytoplasma durch den fehlenden Export ansteigt. Dies führt durch geringere Detoxifizierung von Resveratrol zur einer höheren Toxizität und einer geringeren Virulenz der MDR1 bcatrB Deletionsmutanten. BcatrB stellt für Botrytis auf Weinblättern einen Virulenzfaktor dar.

Auf Tomatenblättern waren MDR1-Stämme weniger virulent wie sensitive Stämme (Abb. 26A). MDR1 *bcatrB* Deletionsmutanten, die keine Expression von *bcatrB* mehr zeigen, wiesen eine dreifach so schnelle Läsionsausbreitung wie die MDR1-Elternstämme auf (Abb. 26C). Es könnte sein, dass Inhaltsstoffe in Tomatenblättern, möglicherweise die Phytoalexine Lubimin oder Rhishitin (Akram et al., 2008) oder das Saponin Tomatin (Verhoeff und Liem,

90

1975) mit BcatrB interagieren und dessen Funktion stören. Möglicherweise exportiert BcatrB aber auch Substanzen, die zu einer verstärkten Abwehr des Tomatenblatts führen. Diese verringerte Virulenz auf Tomatenpflanzen könnte im Laufe der Zeit zu einer Spezialisierung und Entstehung einer Unterart führen. Für eine erfolgreiche Pathogenese von *B. cinerea* ist demnach je nach Wirtsgewebe eine abgestimmte Expression/Synthese von *bcatrB* notwendig. Abgesehen von der Wirtspflanzen-abhängigen Virulenz zeigen alle drei MDR-Phänotypen *in vitro* im Vergleich zu sensitiven Stämmen keine generellen Fitnessnachteile, sondern besitzen neben den erhöhten Fungizidresistenzwerten sogar noch andere Vorteile. Daraus resultiert, dass MDR-Stämme ohne Fungizidselektion sehr konkurrenzfähig sein müssten.

#### 4.6. Konkurrenzfähigkeit von MDR-Stämmen im Freiland

Eine Fungizidresistenz stellt für die Effizienz der wenigen für die Bekämpfung von *B. cinerea* im Weinbau zugelassenen Wirkstoffe eine große Gefahr dar. Die Einzelresistenzen können durch den Wechsel verschiedener Fungizide mit unterschiedlichen Wirkmechanismen gut kontrolliert werden (Staub, 1991). Der ständige Wechsel der Wirkstoffe und die Unfähigkeit, eine Einzelresistenz gegen Fludioxonil zu selektieren, scheint die MDR zu bevorzugen. Unter Laborbedingungen zeigten die MDR-Stämme keine Fitnessnachteile. Deshalb sollte in einem Freilandversuch in Weinbergen untersucht werden, ob sich MDR-Stämme ohne und mit Fungizidbehandlung gegenüber sensitiven Stämmen behaupten können.

In den Jahren 2007 und 2008 wurden jeweils in einem mit der Sorte Riesling bepflanzten Weinberg ein sensitiver und ein MDR3-Stamm im Verhältnis 1:1 ausgebracht. Ohne Fungizidbehandlung zeigte der ausgebrachte MDR3-Stamm gegenüber dem sensitiven Kontrollstamm keinen Konkurrenznachteil (Abb. 27A). Dies bedeutet, dass MDR-Phänotypen auch im Freiland ohne Selektion durch Fungizide keinen Konkurrenznachteil besitzen.

Dagegen führte eine Fungizidbehandlung zu einer klaren Selektion des MDR3-Stamms. Dies zeigt erstens, dass MDR-Stämme eine Fungizidbehandlung im Freiland überleben können, obwohl *in vitro* keine sehr hohen Fungizidkonzentrationen toleriert werden und zweitens, dass diese Stämme durch den MDR-Mechanismus einen Selektionsvorteil gegenüber sensitiven Stämmen erworben haben. Da die MDR-Stämme die eingesetzte Fungizidkonzentration *in vitro*, wie bereits erwähnt, nicht überleben würden, stellt sich nun die Frage, wo und wie diese Stämme trotzdem im Freiland überleben können. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Wirkungsweise der Fungizide zurückzuführen. Die meisten eingesetzten Fungizide haben nur eine geringe systemische Wirkung. Bei einer unvollständigen Bedeckung entstehen Nischen, z.B. im Inneren von Weintrauben, mit einer geringen Fungizidbedeckung und -konzentration,

in denen sich die MDR-Stämme im Vergleich zu den sensitiven Stämmen besser behaupten können. Zusätzlich zu diesen räumlichen Nischen könnte es jedoch auch sein, da die meisten Fungizide eher fungistatisch als fungizid wirken, dass bei abnehmender Fungizidkonzentration durch Umwelteinflüsse wie UV-Licht, Regen oder Abbau der Fungizide durch Mikroorganismen, die MDR-Phänotypen früher weiter wachsen können als sensitive Stämme. Dadurch könnten die MDR-Stämme einen zeitlichen Vorsprung erhalten, wodurch sie in die Lage versetzt würden, ihren Lebenszyklus im Vergleich zu sensitiven Stämmen früher abzuschließen. Der ausgebrachte MDR3-Stamm konnte sich bei einer Fungizidbehandlung jedoch nicht nur gegen den sensitiven Stamm behaupten, sondern setzte sich ebenfalls gegenüber der bereits im Weinberg vorherrschenden endogenen B. cinerea-Population durch. Dagegen veränderte sich der Anteil des ausgebrachten sensitiven Stamms im Vergleich zur endogenen Population durch die Fungizidbehandlung nicht. Die Fungizidbehandlung vernichtete also sowohl die endogene Population als auch den sensitiven Stamm (Abb. 27C).

Neben der Annahme, dass resistente Stämme einen Fitnessnachteil haben könnten, wird oft auch spekuliert, dass diese eine Winterperiode ohne Selektionsdruck mit unwirtlichen Umweltbedingungen schlechter überleben würden als sensitive Stämme (Baroffio et al., 2003). Der MDR3-Stamm war nach einer Winterperiode im darauf folgenden Frühjahr sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Flächen des Weinbergs häufig zu finden. MDR-Stämme sind deshalb anscheinend auch während der Winterperiode sehr konkurrenzfähig. Im Gegensatz zu den unbehandelten Flächen, bei denen sich die Zusammensetzung der Population, bestehend aus ausgebrachtem sensitivem und MDR3-Stamm und der endogenen Population, im Vergleich zum vorigen Herbst nicht signifikant veränderte, nahm die Häufigkeit der beiden ausgebrachten Stämme in den behandelten Flächen im Vergleich zu der endogenen Population leicht ab. Dies kann nicht mit einer geringeren Fitness oder Konkurrenzfähigkeit der ausgebrachten Stämme erklärt werden, da sich die ausgebrachten Stämme in unbehandelten Flächen behaupten konnten. Vielmehr scheint es so zu sein, dass durch die Fungizidbehandlung freigewordene Nischen währen des Winters durch Sporeneinträge aus der umgebenden endogenen Population aufgefüllt wurden.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass MDR-Stämme für die Landwirtschaft eine große Gefahr darstellen, da sie keine Fitness- oder Konkurrenznachteile im Vergleich zu sensitiven Stämmen aufweisen. Sie sind in der Lage, in kommerziell genutzten und fungizidbehandelten Weinbergen zu überleben und werden durch die Fungizidbehandlung im Vergleich zu sensitiven Stämmen selektiert.

# 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren traten in Frankreich und Deutschland vermehrt *Botrytis cinerea*-Freilandstämme mit MDR-Phänotypen auf. Für Pflanzenpathogene war der MDR Resistenzmechanismus bisher unbekannt.

In der Champagne, in Freiburg i. Br. und in der Pfalz konnten drei MDR-Phänotypen anhand ihrer Fungizidresistenzspektren unterschieden werden. MDR1(AniR2)- und MDR2(AniR3)-Stämme zeigen eine Resistenz gegen wichtige Botrytizide, Antibiotika und pflanzliche Abwehrstoffe. MDR3-Stämme weisen die bekannten, vereinigten Resistenzspektren der MDR1- und MDR2-Stämme auf und sind aus deren Kreuzung entstanden. Durch die MDR werden nur geringe Resistenzlevel erreicht, allerdings wird die Wirksamkeit verschiedener Botrytizide signifikant verringert.

Durch diese Arbeit wurde erstmals die molekulare Grundlage der MDR bei einem für die Landwirtschaft wichtigen Pflanzenpathogen aufgeklärt. *B. cinerea* MDR1- und MDR3-Stämme zeigen eine konstitutive Überexpression des ABC-Transporters *bcatrB*. Dagegen weisen MDR2- und MDR3-Stämme eine konstitutive Überexpression des MFS-Transporters *bcmfsM2* auf. Die Deletion von *bcatrB* in MDR1-Stämmen stellte den Zusammenhang zwischen MDR-Phänotyp und *bcatrB* Überexpression her, da die Mutanten einen Verlust des MDR1-Phänotyps zeigten. Als Auslöser der *bcatrB* Überexpression können sowohl Genduplikation als auch Promotormutationen ausgeschlossen werden. Daher ist eine Mutation in einem Transkriptionsfaktor am wahrscheinlichsten. Kürzlich konnten durch unsere Arbeitsgruppe Mutationen im Transkriptionsfaktor Bcmrr1 als Auslöser der *bcatrB* Überexpression und des MDR1-Phänotyps identifiziert werden. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte *bcmfsM2* als Auslöser des MDR2-Phänotyps bestätigt werden. Die *bcmfsM2* Überexpression wird durch eine Insertion eines Transposons im Promotor des Transporters verursacht.

MDR-Stämme zeigen *in vitro* keine Fitnessnachteile und weisen im Freiland im Vergleich mit sensitiven Stämmen auch ohne Fungizidselektion eine hohe Konkurrenzfähigkeit auf. MDR-Stämme überleben im Freiland eine Fungizidbehandlung und werden durch diese selektiert. Für die zukünftige Landwirtschaft könnten diese MDR-Stämme eine große Bedrohung darstellen.

Durch ABC-Transporter-Inhibitoren können MDR1-Stämme für Botrytizide wieder resensibilisiert werden. Chlorpromazin ist in der Lage, die Effektivität der Fungizide bei MDR1-Stämmen sowohl *in vitro* als auch auf einer Wirtspflanze zu erhöhen. Dies zeigt das

93

Potential dieser Chemikalie zur Verbesserung der Bekämpfung von MDR-Stämmen in der Landwirtschaft.

Diese Arbeit bildet die Grundlage der Erforschung und des Verständnisses der molekularen Mechanismen der MDR bei *B. cinerea*.

# 6. Literaturverzeichnis

Adrian, M., Rajaei, H., Jeandet, P., Veneau, J. and Bessis, R. (1998) Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88: 472-476.

Agrios, G.N. (2005) Plant Pathology. 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier Adademic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.

Akram, A., Ongena, M., Duby, F., Dommes J. and Thonart, P. (2008) Systemic resistance and lipoxygenaserelated defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol.* 8: 113.

Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. and Leroux, P. (2002) Eburicol 14α-demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **106**: 1171-1178.

Albertsen, M., Bellahn, I., Krämer, R. and Waffenschmidt, S. (2003) Localization and function of the yeast multidrug transporter Tpo1p. *J. Biol. Chem.* 278: 12820–12825.

Alexander, B.D. and Perfect, J.R. (1997) Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. *Drugs* 54: 657-678.

Ambudkar, S.V., Lelong, H.I., Zhang, J., Cardarelli, C.O., Gottesmann, M.M. and Pastan, I. (1992) Partial purification and reconstitution of the human multidrug resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *PNAS* **89**: 8472-8476.

Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan I. and Gottesmann, M.M. (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 361-398.

Andre, B. (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 11: 1575-1611.

Avenot, H. F., Sellam, A., Karaoglanidis, G. and Michailides, T. J. (2008) Characterization of mutations in the Iron-Sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with Boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California Pistachio. *Phytopathology* **98**: 736-742.

Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., van Dyck, L. and Goffeau, A. (1994) Pdr5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator Pdr1. *J. Bacteriol.* 269: 2206-2214.

**Baroffio**, C.A., Siegfried, W. and Hilber, U.W. (2003) Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to Anilinopyrimidine, Phenylpyrrole, and Hydroxyanilide fungicides in Switzerland. *Plant Dis.* 87: 662-666.

Baudoin, A.B.A.M. (1994) Iprodione-resistant Botrytis cinerea in Virginia vineyards. Plant Dis. 78: 102.

Bauer, E.B., Wolfger, H. and Kuchler, K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 217-236.

**Beever, R.E. and Weeds, P.L. (2004)** Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.) *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 29-52.

Blakeman, J.P. (1975) Germination of *Botrytis cinerea in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65: 239-247.

Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E. (1995) Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267: 371-374.

Brito, N., Espino, J.J. and Gonzalez, C. (2006) The endo-beta-1,4-xylanase *xln11A* is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 25-32.

Brown, J.K.M. and Hovmøller, M.S. (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 297: 537-541.

Busch, W. and Saier JR., M.H. (2002) The transporter classification (TC) system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 287-337.

Callahan, T.M., Rose, M.S., Meade, M.J., Ehrenshaft, M. and Upchurch, R.G. (1999) CFP, the putative Cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type Cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 901-910.

Carrideo, G., Lanzotti, V., Barile, E. and Del Sorbo, G. (2004) Synergism of ABC transporter modulators and agricultural fungicides in control of *Botrytis cinerea*. J. Plant Pathol. 86: 301.

**Chapeland-Leclerc, F. (2000)** Etude de la resistance aux Anilinopyrimidines et a d'autres fongicides chez le champignon phytopathogene *Botrytis cinerea*. (Dissertation Universität Paris)

Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 232-260.

Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. and Deeley, R.G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654.

Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarwis, W.R. (1980) The biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK.

Comménil, P., Belingheri, L., Bauw, G. and Dehorter, B. (1999) Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 37-43.

Coste, A., Karababa, M., Ischer, F., Bille J. and Sanglard, D. (2004) Tac1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcriptions factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *cdr1* and *cdr2*. *Eukaryot*. *Cell* **2**: 1639-1652.

Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhäuser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille J. and Sanglard, D. (2006) A mutation in Tac1, a transcription factor regulating *cdr1* and *cdr2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172: 2139-2156.

Croop, J.M. (1993) P-glykoprotein structure and evolutionary homologies. Cytotechnology 12: 1-12.

Cui, W., Beever, R.E., Parkes, S.L. and Templeton, M.D. (2004) Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)* in response to Dicarboximide fungicide. *Phytopathology* **94**: 1129-1135.

**Davidse, L.C.** (1986) Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 43-65.

**Davidse, L.C. and Ishii, T. (1995)** Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr, H. (Eds): Modern Selective Fungicides. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany. 305-322.

**Delahodde, A., Delaveau, T. and Jacq, C. (1995)** Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4043-4051.

**Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik J. and Jacq, C. (1994)** *Pdr3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *pdr1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 501-511.

**de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. and Sanglard, D. (2002)** A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *cdr1* and *cdr2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* **43**: 1197-1214.

DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C. and Goffeau, A. (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* **470**: 156-160.

Del Sorbo, G., Andrade, A.C., Van Nistelrooy, J.G.M., van Kan, J.A., Balzi, E. and de Waard, M.A. (1997) Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol. Gen. Genet.* 254: 417-426.

Del Sorbo, G., Schoonbeek, H.j. and de Waard, M.A. (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural and toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 30: 1-15.

**Doehlemann, G., Berndt, P. and Hahn, M. (2006)** Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol. Microbiol.* **59**: 821-835.

**De Waard, M.A. (1997)** Significance of ABC-Transporters in Fungicide Sensitivity and Resistance. *Pestic. Sci.* **51**: 271-275.

Doss, R.P., Potter, S.W., Chastagner, G.A. and Christian, J.K. (1993) Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 1786-1791.

Doss, R.P., Potter, S.W., Soeldner, A.H., Christian, J.K. and Fukunaga, L.E. (1995) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 260-265.

**Droby, S. and Lichter, A. (2004)** Post-Harvest *Botrytis* Infection: Etiology, Development and Management. In: *Botrytis*: Biology, Biology, Pathology and Control (Eds: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 349-368.

Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E. and Pommer, E.H. (1989) New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Neth. J. Plant Pathol.* **95**: 53-62.

Elad, Y. and Shtienberg, D. (1995) *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integ. Pest Manag. Rev.* 1: 15-29.

English, J.T., Thomas, C.S., Marois, J.J. and Gubler, W.D. (1989) Microclimates of grapevine canopies associated with leaf removal and control of *Botrytis* bunch rot. *Phytopathology* **79**: 395-401.

Fermaud, M. and Le Menn, R. (1989) Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology* 79: 651-656.

Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C. and Debieu, D. (2008) Genetic analysis of Fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. **52**: 3933-3940.

Finkers, R., Bai, Y., van den Berg, P., van Berloo, R., Meijer-Dekens, F., ten Have, A., van Kan, J., Lindhout, P. and van Heusden, A.W. (2008) Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii. Euphytica* 159: 83–92.

Fitt, B.D.L., Creighton, N.F. and Bainbridge, A. (1985) Role of wind and rain dispersal of *Botrytis fabae* conidia. *Brit. Mycol. Soc.* 85: 307-312.

Fleißner, A., Sopalla, C. and Weltring, K.M. (2002) An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 102-108.

Fling, M.E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J.A., Smith, H.A. and Koltin, Y. (1991) Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol. Gen. Genet.* 227: 318–329.

Fritz, R., Lanen, C., Colas, V. and Leroux, P. (1997) Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pestic. Sci.* **49**: 40-46.

Fukumori, Y., Nakajima, M. and Akutsu, K. (2004) Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Plant Pathol. 70: 256-260.

Ghannoumi, M.A. and Rice, L.B. (1999) Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 501-517.

Gibbons, S. (2005) Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem. Rev.* 4: 63-78.

Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. and Brygoo, Y. (1997) RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)* and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* 14, 1177-1185.

Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet R. and Pont V. (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**: 759-767.

Gottesman, M.M., Fojo, T. and Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2: 48-58.

Gray, K.M. (1997) Intercellular communication and group behavior in bacteria. *Trends Microbiol.* 5:184-188.

Grindle, M. (1979) Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. 111: 109-120.

Gupta, A. and Chattoo, B.B. (2008) Functional analysis of a novel ABC transporter ABC4 from *Magnaporthe* grisea. FEMS Microbiol. Lett. 278: 22-28.

Gupta, V., Kohli, A., Krishnamurthy, S., Puri, N., Aalamgeer, S.A., Panwar, S. and Prasad, R. (1998) Identification of polymorphic mutant alleles of CaMDR1, a major facilitator of *Candida albicans* which confers multidrug resistance, and its in vitro transcriptional activation. *Curr. Genet.* **34**:192-199.

Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K. and Hibi, T. (2000) Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14α-Demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum. Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3421–3426.

Hayashi, K., Schoonbeek, H.j., Sugiura, H. and de Waard, M.A. (2001) Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* with decreased accumulation of the azole fungicide oxoconazole and increased transcrition of the ABC transporter gene *bcatrD*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **70**: 168-179.

Hayashi, K., Schoonbeek, H.j., Sugiura, H. and de Waard, M.A. (2002a) Expression of the ABC transporter *bcatrD* from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol.* 73: 110-121.

Hayashi, K., Schoonbeek, H.j., Sugiura, H. and de Waard, M.A. (2002b) Bcmfs1 a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea* provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4996-5004.

Hayashi, K., Schoonbeek, H.j. and de Waard, M.A. (2003) Modulators of membrane drug transporters potentiate the activity of the DMI fungicide oxpoconazole against *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 59:294–302.

Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: From microorganisms to man. Annuv. Rev. Cell Biol. 8: 67-113.

Higgins, C.F. (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446: 749–757.

Hilber, U.W. and Hiber-Bodmer, M. (1998) Genetic basis and monitoring of resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines. *Plant Dis.* 82: 496-500.

Hiller, D., Sanglard, D. and Morshhäuser, J. (2006a) Overexpression of the *mdr1* gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**: 1365-1371.

Hiller, D., Stahl, S. and Morshhäuser, J. (2006b) Multiple cis-Acting sequences mediate upregulation of the *mdr1* efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2300-2308.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. (2004) The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen, N., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 9-27.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. and Nickerson, K.W. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by Farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2982-2992.

Horsefield, R., Yankovskaya, V., Sexton, G., Whittingham, W., Shiomi, K., Omura, S., Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S. (2006) Structural and computational analysis of the Quinone-binding Site of complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* 281: 7309-7316.

Hovmøller, M.S., Justesen, A.F. and Brown, J.K.M. (2002) Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis f.sp. tritici* in north-west Europe. *Plant Pathol.* **51**: 24-32.

Hyde, S.C., Emslex, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Giledai U., Pearce S.R., Gallagher M.P. and Gill, D.R. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365.

Jarvis, W.R. (1962) Splash dispersal of spores of Botrytis cinerea Pers. Nature 193: 599.

**Jarvis, W.R. (1977)** *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. A guide to the literature. Monograph no. 15. Canada Department of Agriculture, Ottawa.

Jarvis, W.R. (1980) Taxonomy. In: The Biology of *Botrytis*. (Eds. Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., Jarvis, W.R.). Academic Press inc., London. 1-18.

**Jungwirth, H., Wendler, F., Platzer, B., Bergler, H. and Högenauer, G. (2000)** Diazaborine resistance in yeast involves the efflux pumps Ycf1p and Flr1p and is enhanced by a gain-of-function allele of gene *yap1. Eur. J. Biochem.* **267**: 4809-4816.

Kanazawa, S., Driscoll, M. and Struhl, K. (1988) *Atr1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* 8: 664–673.

Kanetis, L., Förster, H., Jones, C.A., Borkovich, K.A. and Adaskaveg, J.E. (2008) Characterization of genetic and biochemical mechanisms of Fludioxonil and Pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* **98**: 205-214.

Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A. and Fournier, E. (2008) Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* **98**: 1271-1279.

Kars, I. and van Kan, J.A.L. (2004) Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: *Botrytis*: Biology, Biology, Pathology and Control (Eds: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 99-118.

Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Mahe, Y. and Moye-Rowley, W.S. (1996). Multiple Pdr1/Pdr3 binding sites are essential for normal expression of the ATP-binding cassette transporter protein encoding gene *pdr5. J. Biol. Chem.* 271: 23049-23054.

Keller, M., Viret, O., and Cole, F. M. (2003) *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **93**:316-322.

Kerssies, A., (1990) A selective medium for *Botrytis cinerea* to be used in a spore-trap. *Neth. J. Plant Pathol.* 96: 247-250.

Kim, B.S., Park, E.W. and Cho, K.Y. (2001) Population dynamics and fitness comparison of sensitive and resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* to Benzimidazole, Dicarboximide, and N-phenylcarbamate fungicides. *Plant Pathol. J.* 117: 149-153.

Kim, Y.S., Dixon, P., Vincelli, P. and Farman, M.L. (2003) Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* **93**: 891-900.

Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers O.P. and de Vos, W.M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895-904.

Koenraadt, H. and Jones, A.L. (1993) Resistance to benomyl conferred by mutations in codon 198 or 200 of the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by codon 198. *Phytopathology* 83: 850-858.

Kohl, J., Molhoek, W.M.L., van der Plas, C.H. and Fokkema, N.J. (1995) Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology* **85**: 393-401.

Kohli, A., Gupta, V., Krishnamurthy, S., Hasnain S.E. and Prasad, R. (2001) Specificity of drug transport mediated by CaMDR1: a major facilitator of *Candida albicans. J. Biosci.* 26: 333-339.

Kojima, K., Bahn, Y.S. and Heitman, J. (2006) Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Micorbiology* **152**: 591-604.

Kolaczkowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczkowska, A., Soumillon, J.P., Konings, W.M. and Goffeau, A. (1996) Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.* 271: 31543-31548.

Kolaczkowski, M., Kolaczkowska, A., Luczynski, J., Witek, S. and Goffeau, A. (1998) In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* 4: 143-158.

Kontoyiannis, D.P. and Lewis, R.E. (2002) Antifungal drug resistance to pathogenic fungi. *Lancet* 359: 1135-1144.

Krewulak, K.D. and Vogel, H.J. (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1781-1804.

Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A. and Boccara, M. (2006) Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytol.* **170**: 537-50.

Kuo, MT. (2007) Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 608: 23-30.

Kwok, I.M.Y. and Loeffler, R.T. (1993) The biochemical mode of action of some newer azole fungicides. *Pestic. Sci.* 39: 1-11.

Lage, H. (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22: 188-199.

Latorre, B.A., Spadaro, I. and Rioja, M.E. (2002) Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop. Protect.* 21: 957-961.

Law, C.J., Maloney, P.C. and Wang, D.N. (2008) Ins and outs of Major Facilitator Superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 289–305.

Lehnert, M. (1994) Multidrug resistance in human cancer. J. Neurooncol. 22: 239-43.

Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendgen, K. (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.

Leroux, P. and Clerjeau, M. (1985) Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* Berl. and De Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Prot.* 4: 137-160.

Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. and Gredt, M. (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)* isolates from French vineyards. *Crop Prot.* **18**: 687-697.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gerdt, M. and Chapland, F. (2002a) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.* **58**: 876-888.

Leroux, P., Debieu, D., Albertini, C., Arnold, A., Bach, J., Chapeland, F., Fournier, E., Fritz, R., Gredt, M., Hugon, M., Lanen, C., Malosse, C. and Thebaud, G. (2002b) The hydroxyanilide botryticide fenhexamid: mode of action and mechanisms of resistance. In: Dehne, H.W., Gisi, U., Juck, K.H., Russel, P.E. and Lyr, H. (Eds): Modern Fungicides and Antifungal Compounds III. Agro Concept GmbH, Bonn. 29-40.

Leroux, P. (2002c) Classification des fongicides agricoles et résistance. Phytoma 554: 43-51.

Leroux, P. (2004) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (Eds.): *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 195-222.

Lewis, K. (1994) Multidrug resistance pumps in bacteria: Variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19: 119-123.

Liu, W., Leroux, P. and Fillinger, S. (2008) The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1062-1074.

Lorbeer, J.W. (1980) Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. & Jarvis, W.R. (eds.). The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK. 19-40.

Lorenz, D.H. and Eichorn, K.W. (1983) Investigation on *Botryotinia fuckeliana* Whetz., the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. Z. *Pflanzenkrank*. *Pflanzen* 9: 1-11.

Louis, C., Girard, M., Kuhl, G. and Lopez-Ferber, M. (1996) Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* 86: 934-939.

Luo, C.X., Cox, K.D., Amiri, A. and Schnabel, G. (2008) Occurrence and detection of the DMI resistanceassociated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Dis*. **92**: 1099-1103.

Mago, N. and Khuller, G.K. (1989) Influence of lipid composition on the sensitivity of *Candida albicans* to antifungal agents. *Indian J. Biochem. Biophys.* 26: 30–33.

Markoglou, A.N., Malandrakis, A.A., Vitoratos, A.G. and Ziogas, B.N. (2006) Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 149-162.

Matsson, M. and Hederstedt, L. (2001) The Carboxin-binding site on *Paracoccus denitrificans* succinate:quinone reductase identified by mutations. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 99-105.

Mishra, N.N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D.K. and Singh, R. (2007) Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 54: 201-35.

Morschhäuser, J., Barker K.S., Liu, T.T., Blaß-Warmuth, J., Homayouni, R. and Rogers, P.D. (2007) The transcription factor Mrr1p controls expression of the *mdr1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans. PLoS Pathog.* **3**:1603-1616.

Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I. and Kudo, T. (2005) An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr. Genet.* **47**: 298-306.

Moyano, C. and Melgarejo, P. (2002) Survival of *Botrytis cinerea* in Soil in South-Eastern Spain. J. *Phytopathol.* 150: 536-540.

Moyano, C., Alfonso, C., Gallego, J., Raposo, R. and Melgarejo, P. (2003) Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 515-522.

Moye-Rowley, W.S. (2003) Transcriptional control of multidrug resistance in the yeast *Saccharomyces*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **73**: 251-79.

Mukhopadhyay, K., Kohli, A. and Prasad, R. (2002) Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3695-3705.

Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S. and Tzavella, K. (2007) Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* **91**: 407-413.

Myresiotis, C.K., Bardas, G.A. and Karaoglanidis, G.S. (2008) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to Pyraclostrobin and Boscalid and control of Anilinopyrimidine- and Benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Dis.* **92**: 1427-1431.

Nair, N.G. and Nadtotchei, A. (1987) Sclerotia of *Botrytis* as a source of primary inoculum for bunch rot of grapes in New South Wales, Australia. *J. Phytopathol.* 119: 42-51.

Nakaijma, M., Suzuki, J., Hosaka, T., Hibi, T. and Akutsu, K. (2001) Functional analysis of an ATP-binding cassette transporter gene in *Botrytis cinerea* by gene disruption. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 212-214.

Nakaune, R., Adachi, K., Nawara, O., Tomiyama, M., Akutsu, K. and Hibi, T. (1998) A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum. Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3983-3988.

Nguyên, D.T., Alarco, A.M. and Raymond, M. (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *flr1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 276: 1138-1145.

Nijland, J.G., Kovalchuk, A., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A.L. and Driessen, A.J.M. (2008) Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1415-1421.

Nobili, S., Landini, I., Giglioni, B. and Mini, E. (2006) Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr. Drug Targets* 7: 861-879.

Noda, J., Brito, N., Espino, J.J. and Gonzales, C. (2007) Methodological improvements in the expression of foreign genes and in gene replacement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 8: 811-916.

Okada, A., Banno, S., Ichiishi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I. and Fujimura, M. (2005) Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa. J. Pestic. Sci.* **30**: 378–383.

Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A. and Yamaguchi, I. (2002) A point mutation in the two-component histidine kinase *bcOS-1* gene confers Dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **92**: 75-80.

Panayotakou, M. and Malathrakis, N.E. (1983) Resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides in protected crops. *Ann. Appl. Biol.* 102: 293-299.

Pappas, A.C. (1997) Evolution of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in protected crops in Greece. *Crop Protect.* 16: 257-263.

**Park, S.Y., Jung, O.J., Chung, Y.R. and Lee, C.W. (1997)** Isolation and characterization of a benomylresistant form of beta-tubulin-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana*. *Mol. Cells* **7**: 104-109.

Paulsen, I.T. (2003) Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 446-451.

**Pfaffl, M.W. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 45-50.

**Pezet, R., Viret, O., Perret, C. and Tabacchi, R. (2003)** Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *J. Phytopathol.* **151**: 208-214.

**Petzet, R., Viret, O. and Gindro, K. (2004)** Plant-Microbe Interaction: The *Botrytis* grey mould of grapes – biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: Hemantaranjan, A. (Eds): Advances in Plant Physiology. Scientific Publishers **7**, Jodhpur, India.71-116.

Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muehlbauer, M., Coote, P. and Kuchler, K. (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* 17: 4257-4265.

**Ponte-Sucre**, A. (2007) Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:279-86.

**Prasad, R., de Wergifosse, P., Goffeau, A. and Balzi, E. (1995)** Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans, cdr1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**: 320-329.

Prasad, R., Gaur, N.A., Gaur, M. and Komath, S.S. (2006) Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect. Disord. Drug Targets* 6: 69-83.

Prins, T.W., Tudzynski, P., von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M.E., Tenberge, K. and van Kan, J.A.L. (2000) Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In: *Fungal Pathology* (Kronstaad, J. W., ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 33-64.

Raposo, R., Gomez, V., Urrutia, T. and Melgarejo, P. (2000) Fitness of *Botrytis cinerea* associated with Dicarboximide resistance. *Phytopathology* **90**: 1246-1249.

**Reimann, S. and Deising, H.B. (2005)** Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-Hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3269-3275.

Reis, H., Pfiffi, S. and Hahn, M. (2005) Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 6: 257-267.

Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczkowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. and Goffeau, A. (2001) The Pleitropic Drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 207-214.

**Rogon, B., Kozovsk, Z., Coste, A.T., Pardini, G. and Sanglard, D.** (2006) Identification of promotor elements responsible for the regulation of *mdr1* from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* 152: 3701-3722.

**Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B. and Tudzynski, P. (2004)** Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BcSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BcGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* **5**: 17-27.

**Roohparvar, R., Huser, A., Zwiers, L.H. and de Waard, M.A.** (2007a) Control of *Mycosphaerella* graminicola on wheat seedlings by medical drugs known to modulate the activity of ATP-binding cassette transporters. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5011-5019.

**Roohparvar, R., de Waard, M.A., Kema, G.H. and Zwiers L.H.** (2007b) MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 44: 378-388.

Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D. (2000) *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* 19: 557-561.
Sá-Correia, I., dos Santos, S.C., Teixeira, M.C., Cabrito, T.R. and Mira, N.P. (2009) Drug:H+ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol.* 17: 22-31.

Saier Jr., M.H., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jähn, P.S., Lew, k., Liu, J., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Tseng, T.T. and Virk, P.S. (1999) The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 257–79.

Saier JR., M.H. (2000) A functional-phylogenetic classification systeme for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.

Salinas, J. and Verhoeff, K. (1995) Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 377-386.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F. Pagani, J.L., Monod, M. and Bille, J. (1995) Mechanisms of resistance to azol antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2378-2386.

Sanglard, D., Ischer F., Mondo M. and Bille, J. (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *cdr2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143: 405-416.

Sanglard, D. and Odds, F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2: 73-85.

Sauter, H., Steglich, W. and Anke, T. (1999) Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 1328-1349.

Schoonbeek, H.j., Del Sorbo, G. and de Waard, M.A. (2001) The ABC-Transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpicionil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 562-571.

Schoonbeek, H.j., Raajmakers, J.M. and de Waard, M.A. (2002) Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1165-1172.

Schoonbeek, H.j., van Nistelrooy, J.G.M. and de Waard, M.A. (2003) Functional analysis of ABC transporter genes from *Botrytis cinerea* identifies BcatrB as a transporter of eugenol. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 1003-1011.

Schoonbeek, H.j., Jacquat-Bovet, A.C., Mascher, F. and Métraux, J.P. (2007) Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 20: 1535-1544.

Sharom, F.J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9: 105-27.

Shirane, N., Masuko, M. and Hayashi, Y. (1988) Nuclear behavior and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **78**: 1627-1630.

Shtienberg, D. and Elad, Y. (1997) Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **87**: 332-340.

Shukla, S., Wu, C.P. and Ambudkar, S.V. (2008) Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 4: 205-223.

Sierotzki, H., Frey, R., Wullschleger, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J. and Gisi, U. (2007) Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Manage. Sci.* **63**: 225-233.

Sievers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Schulze Gronover, C., Pradier, J.M., Tudzynski, B. and Tudzynski, P. (2005) Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 602-612.

Skatrud, P.L. (2002) The impact of multiple drug resistance (mdr) proteins on chemotherapy and drug discovery. *Prog. Drug Res.* 58: 99-131.

Slocombe, B. and Sutherland, R. (1969) Beta-lactamase activity and resistance to ampicillin, carbenicillin, and cephaloridine of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Citrobacter*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*. 9: 78-85.

Smith, D.J., Burnham, M.K., Edwards, J., Earl, A.J. and Turner, G. (1990a) Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillum chrysogenum*. *Biotechnology* **8**: 39–41.

Smith, D.J., Earl, A.J. and Turner, G. (1990b) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *EMBO J.* **9**: 2743-2750.

Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J.A.L. (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333-346.

Stammler, G. and Speakman, J. (2006) Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *J. Phytopathol.* **154**: 508-510.

Staub, T. (1991) Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annu. R. Phytopathol.* 29: 421-442.

Stehmann, C. and de Waard, M.A. (1996) Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 171-180.

Stergiopoulos, I., Suviers, L.H. and de Waard M.A. (2002) Secretion of natural and synthetic toxic compoundes from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator family. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 719-734.

Sun, C.B., Suresh, A., Deng, Y.Z. and Naqvi, N.I. (2006) A multidrug resistance transporter in *Magnaporthe* is required for host penetration and for survival during oxidative stress. *Plant Cell* 18: 3686-3705.

Taglicht, D. and Michaelis, S. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol.* 292: 130-162.

Teixeira, M.C., Dias, P.J., Simões, T. and Sá-Correia, I. (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of *flr1* under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 249–255.

Ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. and van Kan, J.A.L. (1998) The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1009-1016.

**Tenreiro, S., Nunes, P.A., Viegas, C.A., Neves, M.S., Teixeira, M.C., Cabral M.G. and Sá-Correia, I.** (2002) *Aqr1* gene (ORF YNL065w) encodes a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 741–748.

Thakur, J.K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S.J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D.P., Gulshan, K., Li, D.K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W.S., Cormack, B.P., Wagner, G. and Näär, A.M. (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **452**: 604-609.

Theodoulou, F.L. (2000) Plant ABC transporters. Biochem. Biophys. Acta. Biomembr. 1465: 79-103.

Thomas, A.C., Kotze, J.M. and Matthee, F.N. (1983) Development of a technique for the recovery of soilborne sclerotia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **73**: 1374-1376.

**Ullan, R.V. Liu, G., Casqueiro, J., Gutierrez, S., Banuelos, O. and Martin, J.F.** (2002) The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol. Genet. Genomics* **267**: 673-683.

Urban, M., Bhargava, T. and Hamer, J.E. (1999) An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* 18:512-521.

Váczy, K.Z., Sándor, E., Karaffa, L., Fekete, E., Fekete, É., Árnyasi, M., Czeglédi, L., Kövics, G.J., Druzhinina, I.S. and Kubicek, C.P. (2008) Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* **98**: 1312-1319.

Vail, M.E. and Marois, J.J. (1991) Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81: 188-191.

van den Hazel, H.B., Pichler, H., do Valle Matta, M.A., Leitner, E., Goffeau, A. and Daum, G. (1998) PDR16 and PDR17, two homologous genes of Saccharomyces cerevisiae, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.* 274: 1934-1941.

van Kan, J.A.L. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.

Verhoeff, K. and Liem, J.I. (1975) Toxicity of tomatine to *Botrytis cinerea*, in relation to latency. J. *Phytopathol.* 82: 333-338.

Verhoeff, K. (1980) The infection process and host-pathogen interactions. In: The Biology of *Botrytis*. (Eds. Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K. and Jarvis, W.R.). Academic Press inc., London.153-180.

Vermeulen, T., Schoonbeek, H.j. and de Waard, M.A. (2001) The ABC Transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrol fungicide fludioxonil. *Pest. Manag. Sci.* 57: 393-402.

Vivier, M. A. and Pretorius, I.S. (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotechnol.* 20: 472-478.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta- subunits of ATP-Synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.

Wang, Z.N. and Coley-Smith, J.R. (1986) Studies on some characteristics of dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from protected lettuce. *Plant Pathol.* 35: 544-550.

White, T.C., Marr, K.A. and Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 382-402.

Willetts, H.J. (1971) The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biol. Rev.* 46: 387-407.

Willetts, H.J. (1997) Morphology, development and evolution of stromata/sclerotia and macroconidia of the *Sclerotiniaceae*. *Mycol. Res.* 101: 939-952.

Wirsching, S., Michel, S. and Morschhäuser, J. (2000) Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *mdr1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol. Microbiol.* 36: 856-65.

**Wiwiorra, M. (2007)** MDR (multiple drug resistance) im Grauschimmelerreger *Botrytis cinerea*. (Diplomarbeit TU Kaiserslautern)

**Yarden, O. and Katan, T. (1993)** Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **83**: 1478-1483.

Yoder, O.C. and Turgeon, G.B. (2001) Fungal genomics and pathogenicity. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 315-321.

Zhang, C.Q., Yuan, S.K., Sun, H.Y., Qi, Z.Q., Zhou, M.G. and Zhu, G.N. (2007) Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to Boscalid. *Plant Pathol.* 56: 646-653.

Zhang, D. and Fan, D. (2007) Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7: 1369-78.

Ziegler, H., Benet-Buchholz, J., Etzel, W., Etzel, W. and Goyer, H. (2003) Trifloxystrobin - a new strobilurin fungicide with an outstanding biological activity. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **56**: 213-230.

Ziogas, B.N., Markoglou, A.N. and Malandrakis, A.A. (2003) Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**: 311-317.

Ziogas, B.N., Markoglou, A.N. and Spyropoulou, V. (2005) Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *Eur. J. Plant Pathol.* **113**: 83-100.

Zwiers, L.H. and de Waard, M.A. (2000) Characterization of the ABC transporter genes *mgAtr1* and *mgatr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal. Genet. Biol.* **30**: 115-125.

Zwiers, L.H., Stergiopoulos, I., van Nistelrooy, J.G.M., Goodall and de Waard, M.A. (2002) ABC transporters and Azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 3900-3906.

Zwiers, L.H., Stergiopoulos, I., Gielkens, M.M., Goodall, S.D. and de Waard, M.A. (2003) ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Mol. Genet. Genomics.* 269: 499-507.

#### 6.1. Eigene Veröffentlichungen

Stefanato, F., Abou-Mansour, E., Kretschmer, M., Hahn, M., Bochet, C., Métraux, J-P. and Schoonbeek, H-j. (2008) The ABC-transporter BcatrB protects *Botrytis cinerea* against camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. in press.

Kretschmer, M. and Hahn, M. (2008) Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. J. Plant Dis. Protect. 115: 214–219.

Kretschmer, M., Kassemeyer, H.-H. and Hahn, M. (2007) Age-dependent grey mold susceptibility and tissuespecific defense gene activation of grapevine berry skins after infection by *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. 155: 258-263.

Boyce, K.J., Kretschmer, M. and Kronstad, J.W. (2006) The *vtc4* gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis. Eukaryot. Cell* **5**: 1399–1409.

#### 6.3. Internetquellen

#### Abbildungen

Abb. 1B: http://www.php.wur.nl/NR/rdonlyres/14B0FAAB-22E3-4F59-B32E-94A96DA 830F5/60109/BotrytisBotryotiniaapotheciaMarch200855x5550x50.jpg

Abb. 3A-E: www.sigmaaldrich.com

#### Internetseiten

www.broad.mit.edu www.tcdb.org www.ncbi.nlm.nih.gov www.urgi.versailles.inra.fr www.frac.info

# 7. Anhang

## 7.1. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
d	Tag
hpi	hours post inoculation (Stunden nach Inokulation)
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration50 (Wachstumsreduktion auf 50%)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hyg	Hygromycin
konz.	konzentriert
MDR	Multidrug resistance
min	Minute
OD	optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
U	Unit (µmol Substrat pro Minute)
UV	Ultraviolett(-licht)
Wt	Wildtyp

# 7.2. In dieser Arbeit verwendete Plasmide, Bakterien-, Pilzstämme und Oligonukleotide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pLOB1	<i>oliC</i> -Promotor ( <i>A. nidulans</i> ), Hygromycin- Phosphotransferase-Gen ( <i>E. coli</i> ), <i>tubB</i> - Terminator ( <i>B. cinerea</i> ); Vektor pBS(+)	AG van Kan (Universität Wageningen, Niederlande)
pBS.HYG-5	Kompletationsvektor zu Stamm B05.HYG-3	AG Gonzales (Universität La Laguna, Spanien)
pBS(+)	E. coli-Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA

Tab.	<b>S1:</b>	In	der	vorliegende	n Arbeit	verwendete	Vektoren.
------	------------	----	-----	-------------	----------	------------	-----------

Tab. S2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterien- und Pilzstämme.	In	dicker
Schrift angeführte Stämme sind Referenzstämme dieser Arbeit.		

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> XL1 Blue	recA1 endA gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacl <sup>q</sup> Z∆M15 Tn10(tet')] <sup>c</sup>	Stratagene, La Jolla, USA
B. cinerea B05.10	Benomylbehandelter <i>B. cinerea</i> SAS56	AG Tudzynski (Universität Münster, Deutschland)
B05.HYG-3	B05.10 mit verkürzter Hyg- Resistenzkassette	AG Gonzales (Universität La Laguna, Spanien)
B.c.02-1073	AniR2 (MDR1 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-650	AniR2 (MDR1 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-655	AniR2 (MDR1 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-644	AniR2 (MDR1 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-590	AniR2 (MDR1 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-649	AniR2-AniR3 (MDR3 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 02-392A	AniR2-AniR3 (MDR3 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-B-109	AniR2-AniR3 (MDR3 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-632	AniR2-AniR3 (MDR3 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 02-888	AniR3 (MDR2 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-652	AniR3 (MDR2 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
B.c.02-283	AniR3 (MDR2 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 04-562	AniR3 (MDR2 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-653	Sensitiver Stamm aus Frankreich	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-641	Sensitiver Stamm aus Frankreich	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c.</i> 05-A-654	Sensitiver Stamm aus Frankreich	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
<i>B.c</i> .05-A-628	AniR3 (MDR2 Stamm aus Frankreich)	Walker (INRA Versailles, Frankreich)
MK375	MDR1-Stamm	Kretschmer (2004, Freiburg i. Br.)
$\Delta B catrB4$	Deletionsmutante des ABC- Transporters B in B05.10	AG de Waard (Universität Wageningen, Niederlande)

# Tab. S3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Primername	Genbezeichnung	Sequenz	Kommentar
BcatrA_f	BC1G_03332.1	CCATCCTTCACCGTAATCTC	Primer für Macroarray-
BcatrA_r	bcatrA	CCCTTGAAGGGACTCTTAAC	PCR-Fragment
BcatrA rt f		TGGTATTATCGCTGCTACCC	Realtime PCR-Primer zur
BcatrA_rt_r		GCAATTTGTCGTCGCATCTG	Genexpressionsanalyse; Primereffizienz 92%
BcatrB1	AJ006217 bcatrB	TTTGCGCTGTCCTCTATTTCGT CT	Primer für Macroarray- PCR-Fragment
BcatrB2		CGCTGCTCCCATGCCCTGTA	· • · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
BcatrB_f		GCCATCATGGCAGCCATTG	Amplifikation des ∆BcatrB-
BcatrB_r		GGTTGAAGATGGCGAACTC	Konstrukts aus ∆BcatrB4
BcatrB_f_nes		CATCATCATCCGCCTTCTC	Amplifikation des ∆BcatrB-
BcatrB_r_nes		CAGATTCGCGACAGTTGAC	Konstrukts aus ∆BcatrB4
BcatrB_southern_f		CCTCCGTACTCCTTTGATAG	Southern-Sonde
BcatrB_southern_r		GCGAGATACCCATACTCTTG	
Hyg_spez		TATCCACGCCCTCCTACATC	Überprüfen der
Bc <i>atrB</i> _spez		GAGAAAGTTGGCGGATGTTG	Deletionsmutanten
BcatrB_prom_1_f		GAGTACGAGCAAGGATTCAC	Promtorsequenzierung
BcatrB_prom_1_r		GCTCTTGTGAGTGCATTTCC	Teil 1
BcatrB_prom_2_f		GTCTAAGCTGGCTCTGAC	Promtorsequenzierung
BcatrB_prom_2_r		TAGAAAGCCCGCGATCTC	Teil 2
BcatrB_1_BamHI	-	GT <u>GGATCC</u> ATCATGGCAGCCAT TGAGCCTG	Northern Sonde
BcatrB_HaeIII_r	-	GAAAATCCAGCGCCGACAGC	
BcatrB_rt_t	-		Realtime-PCR-Primer zur
BcatrB_rt_r		IGCATCCCTCCATCCATAGC	Genexpressionsanalyse; Primereffizienz 92%
BcatrC_f	BC1G_04465.1	TTACTTCGCACGCCATGGAG	Primer für Macroarray-
BcatrC_r		AAGCCCGGTAACAAAGGGAG	PCR-Fragment
BcatrD_f	BC1G_05954.1	TCTACCGCAATGCCGAGATG	Primer für Macroarray-
BcatrD_r	bcatrD	GCACCCTGACCAACCAATAC	PCR-Fragment
BcatrD_rt_f		CGCCGGAAACATAGCCAATC	Realtime-PCR-Primer zur
BcatrD_rt_r		TGTGTTAGCGAGACCCGTAG	Genexpressionsanalyse; Primereffizienz 98%
BcatrF_f	BC1G_01454.1	CCTGTCAATGCACGTAAAGG	Primer für Macroarray-
BcatrF_r	bcatrF	GAATCTTCTCGTCCGTTTCC	PCR-Fragment
BcatrF_rt_f		AGTGACAGGGCGTATACATC	Realtime-PCR-Primer zur
BcatrF_rt_r		GAATCTTCTCGTCCGTTTCC	Genexpressionsanalyse, Primereffizienz 97%
BcatrG_f	BC1G_07376.1	GATAGTGTCAGCCGAAGTCC	Primer für Macroarray-
BcatrG_r		GTCCAAGCCTTCACGGTATC	PCR-Fragment
Bcatrl_f	BC1G_10363.1	CGCTGGTGAGACACAAGAGG	Primer für Macroarray-
Bcatrl_r		CGACGGCGAAGAGACTTTCC	PCR-Fragment
BcatrK1	AF238227		Primer für Macroarray-
BcatrK2	bcatrK (bmr1)	CAGGCACTTGTCGCATTGTTGA	PCR-Fragment
BoatrK rt f	-	AATGGTAGCAGCTCTCACTCC	Bealtime-PCB-Primer zur
BoatrK_rt_r	-	CACCGATGAGACGAGTAAAGG	Genexpressionsanalyse
			Primereffizienz 95%
BcatrO_f	BC1G_05881.1	IGATTGTGGCGGGAATGGAC	Primer für Macroarray-
BcatrO_r		ICTTCGGCATGCGGACTAAC	PCR-Fragment
BMR3_f	BC1G_02799.1	AGTTCGCTATGCCGTTCACC	Primer für Macroarray-
BMR3_r	bmr3	AGITTCAGCATCCGGGAGAG	PCR-Fragment
BMR3_rt_f		GGATGCTGAAACTGCTGGTAAC	Realtime-PCR-Primer zur
BMR3_rt_r		AGATTACTTGACGACCGGAGAG	Genexpressionsanalyse; Primereffizienz 95%
BcatrKI1_f	BC1G_10130.1	ATAGTTGGAGCGTCCGGTTC	Primer für Macroarray-
BcatrKI1_r		ATCGGTGTGCGACCGTAATC	PCR-Fragment
BcatrKI2_f	BC1G_03509.1	CAGTCTGGCACCAGATATTG	Primer für Macroarray-

BcatrKl2 r		AACCATCGGGTAATCCGTTG	PCR-Fragment
BcatrKI3 f	BC1G 00181.1	ACACCGATATCTCCGAACTC	Primer für Macroarray-
BcatrKl3 r	1 –	GATCTCCCACTTCCAATACC	PCR-Fragment
BcatrKl4 f	BC1G 05589.1	GGTACGGCGGTAACCTATTG	Primer für Macroarray-
BcatrKl4 r	1	CTGCGATGGTATTCGGTGTC	PCR-Fragment
BcatrKI5 f	BC1G 10929.1	ATCGAGAAACAGCCCATCAG	Primer für Macroarray-
BcatrKl5_r		GTAATGCACGAGCAATGGAG	PCR-Fragment
BcatrKl6 f	BC1G 09597.	TCTACTCTCCGCCGTGAATC	Primer für Macroarray-
BcatrKl6_r		CCCACAGTTCCTTGAATAGC	PCB-Fragment
BcatrKI7 f	BC1G 01948 1	CATCTTCTCGTCGTTGTCTC	Primer für Macroarray-
BoatrKI7_r		CTTCCCACTCGGCTATTATC	PCB-Fragment
BoatrKI8 f	BC1G 02001 1	TCTCCCTTGCACTCCCTTTC	Primer für Macroarray-
Boatrk 18 r	0010_02001.1		PCB-Fragment
Boatrk 10 f	BC1C 1/026 1	TGACACTCCTCCGACTTCTG	Primor für Macroarray
Boatrk/IQ_r	0010_14920.1		PCR-Fragmont
Boatrk/10 f	BC1C 00204 1		Primor für Maaroarray
BoatrK110_1	BCTG_09204.1	TTGTACGTGGCCCAGGCATC	PCP Ergement
DCallKITU_I			
DCallKIII_I			Primer für Macroarray-
BcalrKIII_r			
			POR Fragment
BCatrKI12_r	D040,05000,4	GAGOCGCCTCCAATTCCATC	PCR-Fragment
BcatrKI13_f	BC1G_05922.1		Primer fur Macroarray-
BcatrKI13_r			PCR-Fragment
BcatrKI14_t	BC1G_14380.1	TCAGCGCCTATAGCACTGTC	Primer fur Macroarray-
BcatrKI14_r			PCR-Fragment
BcatrKI15_f	BC1G_15198.1	GACGITCATTICCGCTACCC	Primer fur Macroarray-
BcatrKI15_r			PCR-Fragment
BcatrKI16_t	BC1G_14379.1	ACGICIIGICGIGGAGAAAC	Primer für Macroarray-
BcatrKI16_r		CICGAITAIGAGGGCIIGIG	PCR-Fragment
BcatrKI17_f	BC1G_02708.1	GCGATGAGTCAGTGCTTTAC	Primer für Macroarray-
BcatrKI17_r		GCCAATCTATGAGCGACAAC	PCR-Fragment
BcatrKI18_f	BC1G_10568.1		Primer für Macroarray-
BcatrKI18_r			PCR-Fragment
BcatrKI19_t	BC1G_12625.1	ACTCCTCGATCCCACTCAAG	Primer für Macroarray-
BcatrKI19_r			PCR-Fragment
Bcmfs1-1	AF238225		Primer fur Macroarray-
Bcmfs1-2		ATGACCGCAGCCACCAAGAA	PCR-Fragment
Bcmfs5 f	BC1G 10320.1	TCTTTGTTTCGTCGCCTACC	Primer für Macroarray-
Bcmfs5 r	1	ACTCTTCGCTCTGATCTTGG	PCR-Fragment
Bcmfs6_f	BC1G 09943.1	ATCAAGCTCGATGCCAAGAC	Primer für Macroarray-
Bcmfs6 r		AGGAAGGTATTCGCACTGAC	PCR-Fragment
Bcmfs7 f	BC1G 12761.1	CTCGGCCTTGATTATTCACG	Primer für Macroarray-
Bcmfs7 r	1	GGCAATTGATCCGCATCAAC	PCR-Fragment
Bcmfs8 f	BC1G 12802.1	AGGTGTACTTGCGGCAAATG	Primer für Macroarrav-
Bcmfs8 r	1	AGCGCAGGTAACCGATATTC	PCR-Fragment
Bcmfs9 f	BC1G 14852.1	CTCGAAGCGGATGAAATGAC	Primer für Macroarray-
Bcmfs9 r	1	GTTTCCTGCGAATGCTGATG	PCR-Fragment
Bcmfs10 f	BC1G 08981.1	GGCCCTCATCTACGGCATTC	Primer für Macroarray-
Bcmfs10 r	1	CTCACTCTCGCTCCGTACAG	PCR-Fragment
Bcmfs11 f	BC1G 12442 1	GATGCTCTTCGCGCTCTATC	Primer für Macroarray-
Bcmfs11 r		CACCATCACCGCACTTATCC	PCR-Fragment
Bcmfs12 f	BC1G 05871 1	GTCACAACTCGGCACCTCTC	Primer für Macroarrav-
Bcmfs12 r	1	CCGGCATACCAGACTGTACG	PCR-Fragment
Bcmfs13 f	BC1G 02805 1	CGGTTGTGGTATCGTCATTG	Primer für Macroarrav-
Bcmfs13 r		TCGACTGGCTGATTCTTAGG	PCR-Fragment
Bcmfs14 f	BC1G 10270 1	CGCCGAGCAAACAAGATGTC	Primer für Macroarrav-
Bcmfs14 r		ACGGAAGCGGCGTAAAGAAC	PCR-Fragment
Bcmfs15 f	BC1G 09265.1	TCATATCCGCATACGATGCC	Primer für Macroarrav-

Bcmfs15 r		GATGCTGCGTATTGCTTTCC	PCR-Fragment
Bcmfs16 f	BC1G 12498.1	TGTCTGGGCTTATGTTCCTC	Primer für Macroarrav-
Bcmfs16 r		ACACTCCCTTCCCTAATACG	PCR-Fragment
Bcmfs17_f	BC1G 021091	CTGGTTTCAAGCGGTTCAAG	Primer für Macroarray-
Bcmfs17_r		AGATATTGTGGCGGTACGAG	PCB-Fragment
Bcmfs18 f	BC1G 11386 1	GGAGGTTATGCGTTGCAGAC	Primer für Macroarray-
Bomfe18 r	10010_11000.1	CTGGTGCTGGCATCATATCG	PCB-Fragment
Bomfe10 f	BC1G 13501 1	TTACTCCGCAGGCACCACAG	Primor für Macroarray
Bomfc10 r	bcmfe19		PCR-Fragmont
Bomfc10 Sol1 f	Donnard	GCTGTCGACTCACAGACTGGGT	Aplifikation von bomfc10 mit
Duniis 19_0an_i		GATTC	Solt Sobpittetollop für
Bcmfs19_Sal1_r		GCT <u>GTCGAC</u> ATCCGACAGGAC AACGAAAC	Deletionskonstrukt
Bcmfs19_inv_r_		G <u>CTCGAG</u> AGCCCAATCTGACAA	Amplifikation des Invers-
Xho1		ACAAC	PCR-Produkts
Bcmfs19 inv f		G <u>CTCGAG</u> AGGCAGAGGAGTTA	
Xho1		TGTTAG	
Hyg spec		TATCCACGCCCTCCTACATC	Überprüfen der
Bcmfs19 spec		CCCACATTTCGGTATCAC	Deletionsmutanten
Bcmfs19 southern		AGTACGCCTTAGGCTTAG	Southern-Sonde
f			
Bcmfs19_southern	-	CCCACATTTCGGTATCAC	
Bcmfs19_BamHI_f		GA <u>GGATCC</u> CACGATGGCAGAC	Northern-Sonde
Bcmfs19 BamHL r		CGGGATCCGCCTAAGGCGTAC	
		TAACATAACTC	
	-		
Bcmts19_Sac1		AGTAGTG	Amplifikation von <i>bcmts19</i>
_atg	-		vom atg bis zum tga mit
Bcmfs19_EcoR1			Sacl- bzw. EcoRI-
			Schnittstellen
	0040 04050		
Tub_S.sf	SS1G_04652	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG	Amplifikation des
Tub_S.sf BamH1	SS1G_04652	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i>
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev	SS1G_04652	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI-
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1	SS1G_04652	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev _Sac1 Hyg1_Xho1	SS1G_04652 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1	SS1G_04652 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1	SS1G_04652 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTCG</u> GATCGATTGTGATG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20 f	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I Primer für Macroarray-
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1	CGGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I Primer für Macroarray- PCR-Fragment
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I Primer für Macroarray- PCR-Fragment Primer für Macroarray-
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I Primer für Macroarray- PCR-Fragment Primer für Macroarray- PCR-Fragment
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTCG</u> GATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC	Amplifikation des Tubulinpromotors aus <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> mit <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Sac</i> I-Schnittstellen Amplifikation der Hygromycinresistenzkasset te mit <i>Xho</i> I-Schnittstellen Amplifikation des <i>olic</i> Promotors mit Schnittstellen für <i>Bam</i> HI bzw. <i>Sac</i> I Primer für Macroarray- PCR-Fragment Primer für Macroarray- PCR-Fragment <i>Vitis</i> Stilbensynthase für
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit XhoI-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTCC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit XhoI-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für Macroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. SacI-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit XhoI-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für Macroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGAGCTGTGGAGC CGCATTC GAGGATCCGAGCAGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. SacI-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit XhoI-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für Macroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_12086.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT AGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTCG</u> GATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. Hexokinase für
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_12086.1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAGC</u> ATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTC</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. Hexokinase fürMacroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2 18S1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_12086.1 BC1G_03713.1	C <u>GGATCC</u> AACAGTTTCACAGAA AGTAATG C <u>GAGCTC</u> TATTGAAAGTAGATT TAGGATT AGGATT A <u>CTCGAG</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC A <u>CTCGAG</u> CATGAATTGAAGCGG CACTGGC T <u>GGATCC</u> TGCAGCTGTGGAGC CGCATTC G <u>GAGCTCG</u> GGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. Hexokinase fürMacroarrayB.c. 18S ribosomale
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2 18S1 18S2	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_12086.1 BC1G_03713.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT AGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. 18S ribosomaleUntereinheit für Macroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2 18S1 18S2 Phos1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_12086.1 BC1G_03713.1 BC1G_12890.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT AGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit XhoI-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. 18S ribosomaleUntereinheit für MacroarrayB.c. Phosphoolvceratkinase
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2 18S1 18S2 Phos1 Phos2	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_03713.1 BC1G_03713.1 BC1G_12890.1	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCAATCCAAT	Amplifikation desTubulinpromotors aus S.sclerotiorum mit BamHI-bzw. Sacl-SchnittstellenAmplifikation derHygromycinresistenzkassette mit Xhol-SchnittstellenAmplifikation des olicPromotors mitSchnittstellen für BamHIbzw. SaclPrimer für Macroarray-PCR-FragmentPrimer für Macroarray-PCR-FragmentVitis Stilbensynthase fürMacroarrayB.c. Aktin für MacroarrayB.c. 18S ribosomaleUntereinheit für MacroarrayB.c. Phosphoglyceratkinasefür Macroarray
ga Tub_S.sf BamH1 Tub_S.srev Sac1 Hyg1_Xho1 Hyg2_Xho1 KO-Hyg1_BamH1 Olic_r_Sac1 Bcmfs20_f Bcmfs20_r Bcmfs21_f Bcmfs21_r STS1 STS2 ACT1 ACT2 Hxk-1 Hxk-2 18S1 18S2 Phos1 Phos2 PB1-1	SS1G_04652 pLOB1 pLOB1 BC1G_14639.1 BC1G_03313.1 S63227 BC1G_08198.1 BC1G_03713.1 BC1G_03713.1 BC1G_12890.1 NM_127025.2	CGATCCAACAGTTTCACAGAA AGTAATG CGAGCTCTATTGAAAGTAGATT TAGGATT ACTCGAGTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC ACTCGAGCATGAATTGAAGCGG CACTGGC TGGATCCTGCAGCTGTGGAGC CGCATTC GGAGCTCGGATCGATTGTGATG TGATGGAGT CGATGCTCGTAGCGAGATTC GAGGATACCGAGCAAGATGG ATTTCGTCGCGGTGAACGAG ACGGCGGGATTAACTTCAGG TGTCTCAATTGAACGACCACTC T AATAATACTCCCCAATCCAAT	Amplifikation des         Tubulinpromotors aus S.         sclerotiorum mit BamHI-         bzw. Sacl-Schnittstellen         Amplifikation der         Hygromycinresistenzkasset         te mit Xhol-Schnittstellen         Amplifikation des olic         Promotors mit         Schnittstellen für BamHI         bzw. Sacl         Primer für Macroarray-         PCR-Fragment         Primer für Macroarray-         PCR-Fragment         Vitis Stilbensynthase für         Macroarray         B.c. Aktin für Macroarray         B.c. 18S ribosomale         Untereinheit für Macroarray         B.c. Phosphoglyceratkinase         für Macroarray

PR1-2		CTTTATGTACGTGTGTATGCAT GATCAC	Macroarray
PR4-1	NM_111344.5	GAAGATCAGACTTAGCATAACC ATC	A. thaliana PR4 für
PR4-2		GAAACAAGCATGTTTCTGGAAT CAG	Macroarray
IGS2a		TGAACGCCTCTAAGTCAGAA	Zur Amplifikation der IGS
IGSnr1rev		GTGGATTAGTGGCCGATGG	von <i>B.c</i> .
IGSnr3for		TCCCGGTGAGCCTTTTA	Zur Amplifikation der IGS
IGS1b		GTGGATTAGTGGCCGATGG	von <i>B.c</i> .
bcEF_RTf	BC1G_09492.1	ATGCTATCGACCCTCCTTCC	Ef1a von B.c. für Realtime
bcEF RTr		GTTGAAACCGACGTTGTCAC	PCR;
			Primereffizienz 93%
BcAct_RTf	BC1G_08198.1	TCTGTCTTGGGTCTTGAGAG	Aktin von <i>B.c.</i> für Realtime
BcAct_RTr		GGTGCAAGAGCAGTGATTTC	PCR;
			Primereffizienz 101%
BcMat1	van Kan	GTGACCAGGAAACAGCTATGAC	Amplifikation des
		000407070770470070040	/ inplinitation des
	(Wageningen,	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG	Matingtyps MAT1-1 bei B.c.
BcMat2	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG	Amplifikation des Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i> Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA	Amplifikation des Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2	(Wageningen, Niederlande)	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCAAGATCAGACGGAGTGCAT TACCTC	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i> Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2 BcM2 mfs f	(Wageningen, Niederlande) BofuT4 P024110.1	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCAAGATCAGACGGAGTGCAT TACCTC TGGTGGTTGCTGCAATACTC	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i> Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei <i>B.c.</i>
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2 BcM2_mfs_f BcM2 mfs_r	(Wageningen, Niederlande) BofuT4_P024110.1 <i>bcmfsM2</i>	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCAAGATCAGACGGAGTGCAT TACCTC TGGTGGTTGCTGCAATACTC ACAATCGCCTGAATGACCTC	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i> Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei <i>B.c.</i> Northern Sonde
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2 BcM2_mfs_f BcM2_mfs_r BcM2 mfs rt f	(Wageningen, Niederlande) BofuT4_P024110.1 <i>bcmfsM2</i>	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCAAGATCAGACGGAGTGCAT TACCTC TGGTGGTTGCTGCAATACTC ACAATCGCCTGAATGACCTC ATTCGGCGTCGGTCTATTTG	Matingtyps MAT1-1 bei <i>B.c.</i> Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei <i>B.c.</i> Northern Sonde Realtime-PCR-Primer zur
BcMat2 BcHMG1 BcHMG2 BcH2_mfs_f BcM2_mfs_r BcM2_mfs_rt_f BcM2_mfs_rt_r	(Wageningen, Niederlande) BofuT4_P024110.1 <i>bcmfsM2</i>	CGGAGTGTGTTGATCGTGGAG CCGAG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCCACACATACATCATGACGG CTCCC GTGACCAGGAAACAGCTATGAC C GCTCCTTTCCATAAGTCGTAAG TCGTG GTGACTGTAAAACGACGGCCA GTCAAGATCAGACGGAGTGCAT TACCTC TGGTGGTTGCTGCAATACTC ACAATCGCCTGAATGACCTC ATTCGGCGTCGGTCTATTTG CCATTCAGGAAGACGGAATTGG	Matingtyps MAT1-1 bei B.c.         Amplifikation des Matingtyps MAT1-2 bei B.c.         Northern Sonde         Realtime-PCR-Primer zur Genexpressionsanalyse:

**Tab. S4: Fungizidresistenzspektren und genetische Charakteristika der entlang der Deutschen Weinstraße gesammelten** *B. cinerea***-Stämme aus den Jahren 2006 bis 2008.** Standort 1 wurde nur 2006 beprobt. Die sechs weiteren Standorte sind in Abb. 6 gezeigt. Kodierung: 06(Jahr).1(Standort)-2(Isolat). Alle Referenzstämme dieser Arbeit sind in dicker Schrift markiert. 0(1)= resistent gegen diese Konzentration aufgrund der MDR. Carb=Carbendazim; Flu= Fludioxonil; Fen= Fenhexamid; Cyp= Cyprodinil; Ip= Iprodion; Bos= Boscalid; Teb= Tebuconazol.

Isolat		Ei	inzelres	istenz [	μg ml⁻́	']		MDR- IGS Phänotyp F		IGS-PCR- RFLP		Mating Typ	
	Carb 5	Flu 3	Fen 5	Cyp 5	lp 5	Bos 5	Teb 7		<i>Bam</i> HI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG	
06.1-2	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
06.1-3	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0	
06.1-4	0	0	0	0	0	0	0		-				
06.1-6	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-7	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-8	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	
06.1-9	0	0	0	0	0	0	0		-				
06.1-10	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-11	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-12	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-13	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-14	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-15	0	0	0	1	0	1	0						
06.1-16	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-18	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-19	1	0	1	0	0	0	0						
06.1-20	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-21	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1	
06.1-22	0	0	0	0	0	0	0			_	_		
06.1-25	0	0	0	0	0	1	0						
06.1-26	0	0	0	0	0	0	0						
06.1-30	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	
06.1-31	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1	
06.2-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
06.2-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	
06.2-3	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	
06.2-4	0	0	0	0	0	0	0		0	12	0	1	
06.2-6	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	0	1	
06.2-7	0	0	0	0	0	0	0						
06.2-8	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	0	1	
06.2-11	0	0	0	0	0	0	0						
06.2-12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.2-13	0	0	0	0	0	0	0						
06.2-15	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
06.2-16	0	0	0	1	0	0	0		1	2	0	1	
06.2-17	0	0	0	0	0	0	0						
06.2-20	0	0	0	0	0	1	0		1	2	0	1	
06.2-21	0	0	0	0	0	0	0						
06.3-1	0	0	1	0	0	0	0						
06.3-2	1	0	0	1	0	0	0						
06.3-4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.3-6	1	0	0	0	0	0	0						
06.3-7	1	0	0	0	0	0	0						
06.3-9	0	0	1	0	0	0	0						
06.3-13	0	0	1	0	0	0	0						
06.3-16	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	

$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR-	IGS-P	CR-	Matin	д Тур
06.3.20         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.3.26         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         0         1         0         1         0         0         0         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         1         0         0		Carb	Flu	Fen	Сур	lp 5	Bos	Teb	г папотур	BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
06.328         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           08.327         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0	06.3-20	0	0	0	0	0	0	0					
06.3.27         0         0         0         0         0         1         0         0         1         0           06.3.31         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1         0           06.3.34         0         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         0           06.3.35         1         0         1         0	06.3-26	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
06328         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06331         0         0         1         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06334         0         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         0           06335         1         0	06.3-27	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
06.331         0         0         0         0         0         0         1         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0 <td>06.3-28</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>1</td>	06.3-28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
06.3.34         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.3.36         1         0	06.3-31	0	0	1	0	0	0	0	•	1	0	1	0
06.3.35         1         0 </td <td>06.3-34</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>1</td> <td>0</td>	06.3-34	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0
06.3.36         1         0         1         0 </td <td>06.3-35</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>•</td> <td>-</td> <td></td> <td>Ŭ</td>	06.3-35	1	0	0	0	0	0	0		•	-		Ŭ
0.2.3.0         1         0 </td <td>06.3-36</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.3-36	1	0	1	0	0	0	0					
000000000000000000000000000000000000	06.3-37	1	0	0	0	0	0	0					
0.64-4         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         0         0 <td>06.3-38</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.3-38	0	0	1	0	0	0	0					
00:4:6         0 <td>06 4-4</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06 4-4	0	0	0	0	0	0	0					
00-0-1         0         0         0         1         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         0         0 <td>06.4-6</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.4-6	0	0	0	0	0	0	0					
Obs.4-12         0         0         0         1         0         1         0         0         0         0<	06 4-11	0	0	0	0	1	0	0					
Obs. 12         O </td <td>06 4-12</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06 4-12	0	0	0	0	1	0	0					
06.4.14         0         0         0         0         0         0         1         0         0         1           06.4.15         0         0         0         0         0         0         0         1         0         0         1           06.4.15         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         0         1           06.4.12         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0 <td>06.4-13</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.4-13	0	0	0	0	0	0	0					
Obs. 11         O </td <td>06.4-14</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td>	06.4-14	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
06.4.17         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         0         1           06.4-19         0         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         <	06.4-15	0	0	0	0	0	0	0		-	0	0	1
Oct. 11         O </td <td>06.4-17</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td>	06.4-17	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
06.4.20         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         0         1         0 </td <td>06.4-19</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td>	06.4-19	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	0	1
06.4-20         0 </td <td>06.4-20</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td>	06.4-20	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0
06.4.32         0         1         1         1         1         0         0         0         1         0         0         1         0 </td <td>06.4-20</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>!</td> <td>0</td> <td></td> <td>0</td>	06.4-20	0	0	0	0	0	0	0		!	0		0
06.7-02         0 </td <td>06.4-21</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.4-21	0	0	0	0	0	0	0					
06.5-2         0 <td>06.4-32</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.4-32	0	0	1	0	0	0	0					
00.53         0 <td>06.5-2</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.5-2	0	0	0	0	0	0	0					
00:5-7         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         1         1         1         1         1         1         1         1         1         1 <td>06.5-3</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.5-3	0	0	0	0	0	0	0					
06.5-3         0         0         0         0         0         0         1         8         1         0           06.5-6         0         0         0         0         0         1         0         0         1         8         1         0           06.5-7         0         0         0         0         1         0         0         1         1         2         1         0           06.5-9         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.5-10         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-11         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-13         0         0         0         0         0         0         0         1         1         8         0         1           06.5-17         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1 </td <td>06.5-4</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06.5-4	0	0	0	0	0	0	0					
00.5-0         0         0         0         0         0         1         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         0         1         0         0         0         1         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         1         0         1         0         0         1         0         0         1         1         0         1         1         0         1         1         0         1         1         1         1         1         1         1         1         1         1         1         1 <td>06.5-5</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>Q</td> <td>1</td> <td>0</td>	06.5-5	0	0	0	0	0	0	0		1	Q	1	0
00.577         0         0         0         1         0         0         1         1         2         1         0           06.5-9         0         0         0         0         0         0         0         1         1         2         1         0           06.5-10         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.5-11         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-13         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-13         0         0         1         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.5-16         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         1         1         1         0           06.5-17         0         0	06.5-0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	5	1	0
00.3-5         0         0         0         1         0         0         1         1         2         0         1           06.5-10         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.5-11         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-12         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-13         0         0         1         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.5-15         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         1         1         0           06.5-16         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         1         1         1         0           06.5-17         0	06.5-7	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	1
00.5-10       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.5-11       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-12       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-13       0	06.5-3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0
00.011         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-12         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-13         0         0         1         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-14         0         0         1         0         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.5-15         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         1         1         0           06.5-17         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         1         1         0           06.5-10         0         0         0         0         0         0         0	06.5-10	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
00.012         0         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.5-13         0 <t< td=""><td>06.5-11</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td></td><td>1</td><td>2</td><td>0</td><td>1</td></t<>	06.5-11	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
00.0-13       0 </td <td>06.5-12</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>I</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>1</td>	06.5-12	0	0	0	0	0	0	0		I	2	0	1
00.514       0       0       1       0       1       1       1       8       0       1       1       0       0       0       1       10       1       11       1       0       0       0       1       10       0       0       1       11       1       0       0       0       0       1       11       1       0 <td< td=""><td>06.5-13</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></td<>	06.5-13	0	0	1	0	0	0	0					
00.513       0       0       0       0       0       0       1       1       8       0       1         06.5-16       0       0       0       0       0       0       0       1       1       8       0       1         06.5-17       0       0       0       0       0       0       0       1       11       1       0         06.5-19       0       1       1	06.5-14	0	0	0	1	0	0	0					
Objective         O	06.5-15	0	0	0	0	0	0	0	1	1	8	0	1
00.5-17       0       0       0       0       0       0       1       11       1       0         06.5-19       0       0       0       0       0       0       0       1       1       1       0         06.5-20       0       0       0       0       0       0       0       1       1       1       1       0         06.5-21       0       0       0       0       0       0       0       1	06.5-17	0	0	0	0	0	0	0	•	1	11	1	0
06.5 10         0 </td <td>06.5-10</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>I</td> <td>11</td> <td></td> <td>0</td>	06.5-10	0	0	0	0	0	0	0		I	11		0
06.5 20         0 </td <td>06 5-20</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>  </td>	06 5-20	0	0	0	0	0	0	0					
06.5-22         0 </td <td>06 5-21</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>  </td>	06 5-21	0	0	0	0	0	0	0					
06.5-24         1         0         1         1         0         0         1         0         0         0         0         0         0         1         0         1         1         0         1         1         0         1         0         1         0         1         0 </td <td>06 5-22</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td> </td> <td></td>	06 5-22	0	0	0	0	0	0	0					
06.5-25         1         0         1         1         2         1         0         1         0         1         1         0         1         1         0         1         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1         0         1 </td <td>06 5-24</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06 5-24	1	0	0	0	0	0	0					
06.5-26       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.5-26       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.5-27       1       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.5-28       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-29       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-30       0       0       0       0       0       0       0       1       0       1       0         06.5-31       0       0       0       0       0       0       1       1       0       1       0         06.6-1       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.6-2       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-3       0<	06 5-25	1	0	0	0	0	0	0					
06.5-25       0       0       0       0       0       0       0       1       1       1       1       0         06.5-27       1       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-28       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-29       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.5-30       0       0       0       0       0       0       0       1       0       1       0       1       0         06.5-31       0       0       0       0       0       0       1       1       0       1       0         06.6-1       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.6-2       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-3       0       0       0       0       0       0       0       1	06 5-26	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0
06.5-28         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-28         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-29         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-30         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         2         0         1           06.5-31         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         1         0           06.6-1         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.6-2         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-3         0         0         0         0         0         0         0<	06 5-27	1	0	0	0	0	0	0		I	۲		0
06.5-29         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-29         0         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.5-30         0         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         1         0           06.5-31         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         1         0           06.6-1         0         0         0         0         0         0         0         1         1         0         1         0           06.6-2         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-3         0         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-5         1         0         0         0         0 </td <td>06 5-28</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>1</td>	06 5-28	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
06.5-30         1         1         0         0         0 </td <td>06 5-20</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>٤</td> <td><u> </u></td> <td>1</td>	06 5-20	0	0	0	0	0	0	0		1	٤	<u> </u>	1
06.5-31       0       0       0       0       0       0       1       1       0       1       0         06.6-1       0       0       0       0       0       0       0       1       1       0       1       0         06.6-1       0       0       0       0       0       0       1       1       0       1       0         06.6-2       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.6-3       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-3       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-4       0       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.6-5       1       0 <td>06 5-30</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	06 5-30	0	0	0	1	0	0	0					
06.6-1         0         0         0         0         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0 <td>06.5-31</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td>	06.5-31	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
06.6-2       0       0       0       0       0       0       1       2       0       1         06.6-2       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-3       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-4       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-5       1       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-6       0       0       0       0       0       0       0       0       1       2       1       0         06.6-6       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0         0	06.5-51	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
06.6-3         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-3         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-4         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-5         1         0         0         0         0         0         0         0         1         2         1         0           06.6-6         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1	06.6-2	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0
06.6-4         0 <td>06.6-2</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>1</td> <td>0</td>	06.6-2	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0
06.6-5         1         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1           06.6-6         0         0         0         0         0         0         0         1         2         0         1	06.6-4	0	0	0	0	0	0	0		1	2		0
	06.6-5	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	0	1
	06.6-6	0	0	0	0	0	0	0	<b>_</b>	•	-		-

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR- IGS-PCR- Phänotyp RFLP		CR-	Mating Typ		
	Carb	Flu 3	Fen	Cyp	lp 5	Bos 5	Teb 7	г папотур	BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG	
06.6-7	0	0	0	0	0	0	0						
06.6-8	0	0	0	1	0	0	0						
06.6-9	0	0	0	0	0	0	0						
06 6-10	0	0	0	0	0	0	0		0	2	0	1	
06.6-11	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	
06.6-12	0	0	0	0	0	0	0						
06.6-13	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	0	1	
06.6-14	0	0	0	0	0	0	0	_			<u> </u>		
06.6-15	0	0	0	0	0	0	0		1	2	1	0	
06.6-16	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
06.6-17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	1	0	
06.6-18	1	0	0	0	0	0	0	-					
06.6-20	0	0	0	0	0	0	0						
06.6-21	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	1	0	
06.6-22	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.6-23	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	
06.6-24	0	0	0	0	0	0	0	-	1	2	0	1	
06.6-25	0	0	0	0	0	0	0				<u> </u>		
06.6-26	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
06.6-27	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.6-28	0	0	0	0	0	0	0		-		-		
06.6-29	0	0	0	0	0	0	0						
06.6-31	0	0	0	0	0	0	0						
06.6-32	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.6-34	0	0	0	1	0	0	0		-		-		
06.6-37	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
06.7-1	0	0	0	0	0	0	0	i		•			
06.7-2	0	0	0	0	1	0	0						
06.7-3	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-4	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-5	0	0	0	0	0	0	0		1	8	1	0	
06.7-6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
06.7-7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	
06.7-8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	
06.7-9	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-10	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-11	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-13	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-14	0	0	0	0	1	0	0						
06.7-15	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-17	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-18	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-19	0	0	1	0	0	0	0						
06.7-20	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	
06.7-21	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	1	0	
06.7-22	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-23	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-24	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-25	0	0	0	1	1	0	0						
06.7-26	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-27	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	1	0	
06.7-29	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-30	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-31	0	0	0	0	0	0	0						
06.7-33	0	0	0	0	0(1)	0	0	3	1	2	0	1	

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻́	']	MDR- Phänotyp	IGS-PCR- BELP		Mating Typ		
	Carb	Flu 3	Fen	Cyp	lp 5	Bos	Teb 7		BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
06 7-34	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
06 7-35	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
06.7-37	0	0	0	0	0	0	0	•			•	
06 7-38	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
06.7-39	Ő	Ő	Ő	Ő	0(1)	Ő	0	3	1	2	Ő	1
06.7-40	1	0	0	0	0	0	0	•	-		•	-
06 7-41	0	0	0	0	0(1)	0	0	3	1	2	1	0
06 7-42	0	0	0	0	0	0	0	ŭ		_		Ŭ
06 7-43	0	0	0	0	0	0	0					
06 7-44	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0
06 7-45	0	0	0	1	0	0	0			_		Ŭ
06 7-46	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
06.7-47	0	0	0	0	0	0	0					
06.7-53	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-1	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-7	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-9	1	0	0	1	0	0	0					
07.2-13	0	0	0	0	0	1	0					
07.2-14	0	0	0	0	0	1	0					
07.2-15	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0
07.2-16	0	0	0	0	0	1	0					
07.2-17	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
07.2-18	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.2-19	0	0	1	0	0	1	0		-		-	-
07.2-20	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-21	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-24	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-25	0	0	0	0	0	0	0		0	5	1	0
07.2-27	0	0	0	0	0	1	0					
07.2-28	0	0	0	0	0	0	0					
07.2-30	0	0	0	0	0	1	0					
07.3-1	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-2	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-3	0	0	0	0	0	0	0		0	5	0	1
07.3-5	0	0	0	1	0	0	0					
07.3-6	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
07.3-7	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0
07.3-8	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-9	1	0	0	0	1	0	0					
07.3-11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
07.3-12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
07.3-13	1	0	1	0	0	0	0					
07.3-15	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
07.3-16	1	0	0	0	0	0	0					
07.3-17	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.3-18	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.3-19	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0
07.3-20	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-21	0	0	0	0	0	1	0					
07.3-22	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-23	0	0	0	0	0	1	0					
07.3-24	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0
07.3-25	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-26	1	0	0	0	0	0	0					
07.3-27	0	0	0	0	0	0	0					

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]	MDR- Phänotyp	IGS-PCR- Matir		д Тур		
	Carb	Flu	Fen	Сур	lp 5	Bos	Teb	Thanotyp	BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
07.3-28	0	0	0	0	0	1	0					
07.3-29	0	0	0	0	0	0	0					
07.3-30	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	1
07.4-1	0	0	0	0	1	0	0				-	
07.4-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
07.4-3	0	0	0	0	0	0	0					
07.4-4	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
07.4-5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
07.4-8	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
07.4-9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
07.4-10	0	0	0	0	0	0	0					
07.4-11	0	0	0	0	0	0	0					
07.4-12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.4-13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
07.4-14	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.4-15	0	0	0	0	0	0	0					
07.4-17	0	0	0	1	0	0	0			0	0	
07.4-18	0	0	0	0	0	0	0	I	0	0	0	1
07.4-19	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
07.4-20	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	- 1
07.4-21	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
07.4-22	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
07.4-24	0	0	0	0	0	0	0					
07.4-26	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.4-28	1	0	0	0	0	0	0					
07.4-29	0	0	0	0	0	0	0	1				
07.4-30	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
07.5-2	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-3	0	0	0	1	0	0	0					
07.5-4	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
07.5-5	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
07.5-6	0	0	0	0	0	0	0	1				
07.5-7	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-8	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-9	0	0	0	0	0	0	0			•		
07.5-10	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0
07510	0	0		U 1	0	0	0	4	4	0	0	4
07.5-13	0	0	0		0	0	0	1		2	0	
07.5-14	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1
07.5-15	0	0	0	0	0	0	0		0	5	0	1
07.5-18	1	0	0	0	0(1)	0	0	2	1	2	0	1
07.5-19	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
07.5-20	0	0	0	0	0	0	0			•	•	•
07.5-21	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-22	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-23	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1
07.5-24	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0
07.5-25	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
07.5-26	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-27	0	0	0	0	0	0	0					
07.5-28	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
07.5-29	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR- Phänotyp	IGS-PCR- Ma		Matin	ating Typ	
	Carb	Flu 3	Fen	Cyp	lp 5	Bos	Teb 7	- Hanotyp	BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG	
07.5-30	0	0	0	0	0	0	0		0	2	0	1	
07.6-1	0	0	0	0	0	0	0						
07.6-2	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1	
07.6-3	0	0	0	0	0	0	0						
07.6-4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
07.6-6	0	0	0	0	0	0	0						
07.6-7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	
07.6-8	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
07.6-9	0	0	0	0	0	0	0						
07.6-10	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	
07.6-12	0	0	0	0	0	0	0						
07.6-18	0	0	1	0	0	1	0						
07.6-20	0	0	0	0	0	0	0		1	0	1	0	
07.6-22	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
07.6-23	1	0	0	0	0	0	0	-					
07.6-24	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
07.6-25	1	0	0	0	0	0	0						
07.6-28	0	0	1	0	0	0	0	1					
07.6-29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
07.6-30	0	0	0	0	0	1	0				0		
07.7-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
07.7-2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
07.7-4	0	0	0	0	0	0	0	- 1		0	0	4	
07.7-5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
07.7-6	0	0	0	0	0	1	0	I	0	5	I	0	
07.7-7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	F	4	0	
07.7-8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	5		0	
07.7-10	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0		
07.7-11	0	0	0	1	0	0	0	1	I	0	I	0	
07.7-14	0	0	0	0	0	0	0						
07.7-15	0	0	0	1	0	0	0						
07.7-17	0	0	0	0	0	0	0		1	12	1	0	
07.7-18	0	0	0	0	0	0	0			12	1	0	
07 7-19	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	0	1	
07 7-21	0	0	0	0	0	0	0	Ŭ		-	Ŭ		
07.7-22	0	0	0	0	0	0	0		1	0	0	1	
07.7-29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
07.7-30	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	
07.7-31	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	0	
07.7-32	0	0	0	1	0	0	0						
07.7-33	0	0	0	0	0	0	0	1	0	12	0	1	
07.7-34	1	0	0	1	0	0	0						
07.7-37	0	0	0	0	0	0	0						
07.7-38	0	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
07.7-39	1	0	0	0	0	0	0		1	2	0	1	
07.7-40	0	0	0	0	0	0	0		0	5	1	0	
08.2-1	1	0	0	0	0(1)	0	0	2					
08.2-2	0	0	0	1	0(1)	0	0	3					
08.2-3	1	0	0	0	0(1)	0	0	3					
08.2-4	1	0	0	0	0(1)	0	0	2					
08.2-5	0	0	0	0	0	0	0						
08.2-6	0	0	0	1	0(1)	0	0	2					
08.2-7	0	0	0	1	0	0	0	1					
08.2-8	0	0	0	0	0	0	0	1					

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR- Phänotyp	IGS-PCR-		Mating Typ	
	Carb	Flu 3	Fen 5	Cyp	lp 5	Bos 5	Teb 7	- Harlotyp	BamHI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
08.2-9	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-10	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.2-11	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-12	0	0	0	0	0(1)	0	0	2				
08.2-13	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-14	1	0	0	0	0(1)	0	0	3				
08 2-15	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-16	0	0	0	0	0	1	0					
08.2-17	1	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-18	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.2-19	0	0	1	0	0	0	0					
08.2-70	1	0	0	0	0	0	0					
08.2-20	0	0	1	1	0	0	0	1				
08.2-22	1	0	0	0	0(1)	0	0	2				
08.2-22	0	0	0	0		0	0	1				
08.2-23	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.2-24	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.2-25	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.2-20	0	0	0	1	0	0	0	1				-
08.2-27	1	0	0	1	0	0	0	1				-
08.2-20	1	0	0	0	0	0	0	1				-
08.2-29	0	0	0	0	0	0	0	1				-
08.2-30	0	0	1	0	0	1	0					-
08.3-1	0	0	0	1	0	0	0	1				-
00.3-2	0	0	1	0	0	1	0	1				-
00.3-3	0	0	0	0	0	1	0					-
08.3-4	0	0	1	0	0	1	0					
00.3-5	0	0	0	1	0	1	0					-
08.3-0	0	0	1	0	0	0	0					
00.3-7	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.3-0	0	0	0	1	0(1)	0	0	1				
08.3-3	0	0	1	0		0	0	2				
08.3-10	0	0	0	0	0	1	0					
08.3-11	0	0	0	0	0	0	0					
08.3-12	0	0	0	0	0	0	0					
08.3-13	0	0	0	0	0	0	0	4				
08.3-14	0	0	0	0	0	1	0	1				
08.3-15	1	0	0	0	0(1)	0	0	2				
08.3-10	0	0	0	0		0	0	<u> </u>				
08.3-18	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.3-10	0	0	0	0	0	1	0					
08.3-19	0	0	0	0	0	1	0					
08.3-20	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.3-21	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.3-22	0	0	0	1	0(1)	0	0	2				
08.3-23	1	0	0	0	0(1)	0	0	2				
08 3-25	0	0	0	0		0	0	<u> </u>				
08.3-26	0	0	0	0	0	0	0					
08 3-27	0	0	1	0	0	0	0					
08.3-22	0	0	0	0	0(1)	0	0	2				
00.0-20	0	0	0	0		0	0	<u> </u>				
00.0-29	0	0	0	0	0	0	0	I				
00.0-00	0	0	0	0	0	1	0					
08.4-1	1	0	0	0	0	1	0					
08 4-3	0	0	0	0	0	1	0					

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR- Phänotyp	IGS-PCR- M		Matin	Vating Typ	
	Carb 5	Flu 3	Fen 5	Cyp 5	lp 5	Bos 5	Teb 7		<i>Bam</i> HI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG	
08.4-4	0	0	1	0	0	0	0						
08.4-5	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-6	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-7	0	0	0	0	0	1	0						
08.4-9	1	0	0	1	0(1)	0	0	2					
08.4-10	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-11	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-12	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-13	0	0	0	1	0(1)	0	0	2					
08.4-14	0	0	0	0	0	1	0						
08.4-15	1	0	0	0	0	1	0						
08.4-16	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-17	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-18	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-19	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-20	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-21	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-22	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-23	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-24	0	0	0	0	0	0	0						
08.4-25	0	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-26	0	0	0	1	0	0	0	1					
08.4-27	1	0	0	0	0	0	0	1					
08.4-28	0	0	0	1	0	0	0	1					
08.4-29	0	0	0	0	0	0	0	-					
08 4-30	0	0	0	0	0	0	0	1					
08 5-1	0	0	0	1	0	0	0	1					
08 5-2	0	0	0	0	0	0	0	•					
08.5-3	0	0	0	1	0	1	0						
08 5-4	0	0	0	0	0(1)	0	0	2					
08.5-5	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-6	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-7	0	0	1	0	0	0	0						
08.5-8	0	0	0	1	0	0	0						
08.5-9	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-10	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-11	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-12	0	0	0	1	1	0	0	1					
08.5-13	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-14	0	0	1	0	0	0	0						
08.5-15	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-16	0	0	0	0	0	1	0						
08.5-17	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-18	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-19	0	0	0	0	0	1	0						
08.5-20	0	0	1	0	0	0	0						
08.5-21	0	0	1	0	0(1)	0	0	2					
08.5-22	0	0	0	0	0	0	0						
08.5-23	0	0	0	0	Õ	0 0	0						
08.5-24	0	0	0	0	1	0	0	1					
08 5-26	0	0	0	0	0	0	0	1					
08 5-27	0	0	0	0	0	0	0	1					
08 5-28	0	0	0	0	0	0	0						
08 5-29	0	0	0	1	0	0	0	1					
08.5-30	0	0	0	0	0	0	0						

$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml⁻¹	]		MDR- Phänotyp	IGS-PCR- RFLP		Mating Typ	
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		Carb 5	Flu 3	Fen 5	Cyp 5	lp 5	Bos 5	Teb 7		<i>Bam</i> HI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-1	0	0	1	0	0	1	0					
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-2	0	0	0	1	0	0	0					
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-3	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-4	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-5	0	0	0	1	0	0	0					
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	08.6-6	0	0	0	0	0	1	0					
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-7	0	0	0	1	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-8	0	0	0	1	0	0	0	1				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-9	0	0	0	0	0	0	1	-				
0.02, 0.1 $0$ <t< td=""><td>08 6-10</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>	08 6-10	0	0	0	1	0	0	0	1				
0.8.6-12 $0$ <th< td=""><td>08 6-11</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>•</td><td></td><td></td><td></td><td></td></th<>	08 6-11	0	0	0	0	0	0	0	•				
0.00000000000000000000000000000000000	08 6-12	0	0	1	0	0	0	0					
0.86.14 $0$	08 6-13	0	0	0	0	0	0	0					
0.00, 0.17 $0$ <	08.6-14	0	0	0	0	0	0	0					
30.8.616         0<	08.6-15	0	0	0	0	0	0	0	1				
0.6.17 $0$	08.6-16	0	0	0	0	0	0	0					
0.63.11 $0$	08.6-17	0	0	0	0	0	0	0					
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-18	0	0	1	0	0	0	0					
0.63.70 $0$	08.6-19	0	0	0	0	0	0	0					
0.6.2.10 $0$ <th< td=""><td>08.6-20</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></th<>	08.6-20	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-21	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-22	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-23	0	0	1	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-24	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-25	0	0	1	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6.26	0	0	0	0	0(1)	0	0	2				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-27	0	0	0	0	0(1)	0	0	3				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-28	0	0	0	1	0	0	0					
08.6-30         0         0         0         0         0         0         1         0         0         0         1         1         0         0         1         1         0         1         0         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         1         0         0         0         1         0         0         0         1         0         0         0         1         0         0         0         1         0         0         0         0         0         0         0         0         0         0 </td <td>08.6-20</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0(1)</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.6-20	0	0	1	0	0(1)	0	0	2				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.6-29	0	0	0	0	0(1)	0	0	2				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.7-1	0	0	0	0	0	0	0					
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.7-2	0	0	0	1	0	0	0	1				
00.75         0         0         0         1         0         0         1         0         1         0         1 <td>08.7-2</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-2	0	0	0	1	0	0	0	1				
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	08.7-3	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.7-5       0       0       1       0       0       1       0         08.7-6       0       0       1       0       0       0       1       0         08.7-7       0       0       0       1       0       0       0       1       0         08.7-8       1       0       0       0       0       0       0       1       0       0         08.7-9       0       0       0       0       1       0       0       1       0       0       0       1       0       0       0       1       0       0       1       1       0       0       0       1       0       0       1       1       0       0       1       1       1       0       0       1	08.7-5	0	0	0	0	0	1	0					
08.7-0       0       0       1       0       0       1       1       0       0       1       1       0       0       1       1       0       0       0       1       1       0       0       0       0       1 <td>08.7-6</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-6	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.77       0 <td>08.7-7</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-7	0	0	0	1	0	0	0					
08.7-6       1       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       0       1       0       0       0       1       0       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       0       1       0 <td>08.7-8</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-8	1	0	0	0	0	0	0					
08.7-10       0       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       1       0       0       0       1       0 </td <td>08.7-0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-0	0	0	0	0	0	1	0					
08.7-10       0 </td <td>08.7-3</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-3	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.7-11       0 </td <td>08.7-10</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-10	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.7-12       0 </td <td>08.7-12</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-12	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-13       0 </td <td>08.7-13</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-13	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-14       0       0       1       0 </td <td>08.7-13</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-13	0	0	1	0	0	0	0					
08.7-13       0 </td <td>08.7-14</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-14	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-10       0 </td <td>08.7-15</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-15	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-17       0       0       0       0       1       0 </td <td>08.7-17</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-17	0	0	0	0	0	1	0					
08.7-19         0         0         0         0         0         0         0         1         1           08.7-19         0         0         0         0         0         0         1         1         1           08.7-20         0         0         0         0         0         0         0         1         1           08.7-21         0 <td>08 7-18</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08 7-18	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-20         0 </td <td>08.7-19</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td>	08.7-19	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.7-21         0 </td <td>08.7-19</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>1</td> <td></td> <td><u> </u></td> <td></td> <td></td>	08.7-19	0	0	0	0	0	0	0	1		<u> </u>		
08.7-21         0         0         0         0         0         0         0           08.7-22         0         <	00.7-20	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-23 0 0 0 0 0 0 0 0	00.7-21	0	0	0	0	0	0	0	L				
	00.7-22	0	0	0	0	0	0	0					
	00.7-20	0	0	0	0	0	0	0					
	08.7-24	0	0	0	0	0	0	0					

Isolat		Ei	nzelres	istenz [	µg ml <sup>-</sup>	1]		MDR- Phänotyp	IGS-P RFL	CR- _P	Matin	д Тур
	Carb	Flu	Fen	Сур	lp	Bos	Teb		<i>Bam</i> HI	<i>Hin</i> fl	MAT	HMG
	5	3	5	5	5	5	7					
08.7-26	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-27	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-28	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-29	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-30	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-31	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-32	0	0	0	0	0	0	0	1				
08.7-33	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.7-34	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-35	0	0	0	1	0	0	0					
08.7-36	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.7-37	0	0	0	1	0	0	0	1				
08.7-38	0	0	0	0	0	0	0					
08.7-39	0	0	0	1	0	0	0	1				

### 7.3. Kombinierte Fungizidresistenzen entlang der Deutschen Weinstraße

**Tab. S5: Kombinierte Fungizidresistenzmechanismen bei** *B. cinerea.* t= Stämme mit mehreren Einzelresistenzen ohne MDR-Phänotyp. -= Kombination schließt sich aus. Abkürzungen siehe Tab. 6.

Resistenz		2006	6 (n=170)		2007 (n=144)				2007 (n=187)			
	+	MDR1	MDR2	MDR3	+	MDR1	MDR2	MDR3	+	MDR1	MDR2	MDR3
	ι.	n=28	n=4	n=3	ι.	n=42	n=1	n=1	ι.	n=52	n=15	n=4
Carb+ Fen	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Carb+ Cyp	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
Carb+ Bos	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Carb+ Ip	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Cyp+ Bos	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyp+ Ip	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bos+ Fen	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Fen+ lp	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Carb+ MDR	-	2	4	0	-	3	1	0	-	3	6	2
Bos+ MDR	-	2	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
Fen+ MDR	-	0	0	0	-	1	0	0	-	2	2	0
lp+ MDR	-	4	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0

### 7.4. Kladogramme der MFS-Transporter Bcmfs19, BcmfsM2



Abb. S1: Kladogramm des Bcmfs19 MFS-Transporters mit homologen Transportern aus anderen Ascomyceten. Das Kladogramm basiert auf einem Aminosäure-Alignment des Internetservices der Homepage www.ncbi.nlm.nih.gov.



Abb. S2: Kladogramm des BcmfsM2 MFS-Transporters mit homologen MFS-Transportern anderer Ascomyceten. Das Kladogramm basiert auf einem Aminosäure-Alignment des Internetservices der Homepage www.ncbi.nlm.nih.gov.



#### 7.5. Erzeugung der *bcmfs19* Mutanten

Abb. S3: Für die Transformation verwendete Plasmide mit dem Konstrukt zur Deletion bzw. Überexpression des Gens bcmfs19 im Laborstamm B05.10 bzw. B05.HYG-3 und die Verifizierung der Transformanten. (A) (I) Das Gen *bcmfs19* wurde mit den Primern P1: Bcmfs19\_Sal1\_for und P4: Bcmfs19\_Sal1\_rev amplifiziert. Das mit SalI verdaute Fragment wurde in den ebenfalls Sall verdauten Vektor pBS+ ligiert. (II) Nach Amplifikation mit den Primern P2: Bcmfs19\_inv\_r\_Xho1 und P3: Bcmfs19\_inv\_f\_Xho1 wurde das XhoI (X) verdaute Fragment der Hygromycin-resistenzkasette ligiert. Das für die Transformation verwendete Konstrukt wurde mit den Primern P1 und P4 amplifiziert. E= EcoRV (B) Southern-Blot-Analyse zum Verifizieren der Deletionsmutanten. Je 5µg gDNA wurden mit EcoRV (E) verdaut. Als Sonde diente das durch Primer P5: Bcmfs19\_southern\_f und P6: Bcmfs19 southern r amplifizierte 853bp Fragment. Für wt wurde ein Fragment der Größe 1880bp und für Deletionsmutanten von 4495bp erwartet. wt= B05.10; ko1 und ko2 sind je zwei Einzelsporisolate unabhängiger Deletionsmutanten. (C) Konstrukte zur Überexpression von bcmfs19 im Stamm B05.HYG-3. Die Konstrukte I und II unterschieden sich nur im verwendeten Promotor (I= oliC; II= B-Tubulin Promotor aus Sclerotinia sclerotiorum). Bcmfs19 wurde mit den Primern P3: Bcmfs19\_Sac1\_atg und P4: Bcmfs19\_EcoR1\_tga amplifiziert, und nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen SacI (S) und EcoRI (E) in pBS+ ligiert. Die Promotoren oliC, bzw. ß-Tubulin wurden mit den Primern P1: KO-Hyg1\_BamH1 bzw. Tub\_S.s.\_f\_BamH1 und P2: Olic\_r\_Sac1 bzw. Tub\_S.s.\_r\_Sac1

amplifiziert und nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Sac*I und *Xba*I vor das *bcmfs19*-Gen ligiert. Dieses Teilkonstrukt wurde dann mit *Xba*I und *Eco*RI in das Plasmid pBS.HYG-5 vor den NiaD Terminator kloniert. H= *Hind*III. hph trunc= 3' verkürzte Hygromycinphosphotransferase. (D) Northern-Blot-Analyse zur Kontrolle der *bcmfs19* Überexpression. Je Stamm wurden  $\$\mu$ g Total-RNA aufgetragen. wt= Elternstamm; *oliC*1-3 sind 3 unabhängige *bcmfs19* Überexprimierer mit *oliC* als Promotor und ß-Tub ist ein *bcmfs19* Überexprimierer mit dem ß-Tubulin Promotor aus *Sclerotinia. oliC*= Promotor; *hph*= Hygromycinphosphotransferase, *tubB*= Tubulin Terminator; *niaD*= Terminator; F1 und F2= flankierende Regionen des Gens *bcmfs19*.

Da die Überexpressionsmutante *oliC*3 und die ß-Tubulinpromotor-Überexpressionsmutanten nur eine leichte Überexpression des Transporters *bcmfs19* zeigten, wurden diese phänotypisch nicht weiter analysiert.

### 7.6. Überexprimierte Gene in MDR2-Stämmen

**Tab. S6: Konstitutiv in MDR2-Stämmen überexprimierte Gene.** Die Genexpression musste in beiden getesteten MDR2-Stämmen mindestens um den Faktor zwei im Vergleich mit der höchsten Expression in einem der sensitiven Stämme erhöht sein. Wiedergegeben sind nur die durchschnittlichen Überexpressionsraten der beiden MDR2-Stämme ab Faktor fünf. Auffällig ist die häufige Überexpression von an Stressantwort beteiligten Genen.

Genbezeichnung	Expression	Putative Funktion
BofuT4 P027100.1	5,0	Oxidoreduktase
BofuT4 P129480.1	5,0	Unbekannt
BofuT4 P120650.1	5,1	Unbekannt
BofuT4 uP071130.1	5,1	Unbekannt
BofuT4 P092570.1	5,1	Unbekannt
BofuT4_uP019900.1	5.1	Unbekannt
BofuT4 P071110.1	5,1	Nicht ribosomale Peptid-Synthase
BofuT4_P065730.1	5.2	Unbekannt
BofuT4 P085570.1	5,2	Ankyrin
BofuT4 P035350.1	5,2	Ankyrin
BofuT4_uP135170.1	5,3	Unbekannt
BofuT4 P047550.1	5,4	Kupfertransporter
BofuT4_uP157990.1	5,4	Unbekannt
BofuT4 P151250.1	5,4	Unbekannt
BofuT4_uP055850.1	5.5	Unbekannt
BofuT4 P103500.1	5.5	Proline-Dehydrogenase
BofuT4 P160070.1	5.6	Aminopeptidase
BofuT4_P071010.1	5.6	Cytochrom-P450-Monooxygenase
BofuT4 P137320.1	5.7	Choline-Dehvdrogenase
BC1G 11241.1	5.7	Unbekannt
BofuT4_P085460.1	5.7	Zn-abhängige Protease
BofuT4_P133550.1	5.8	Unbekannt
BofuT4_P122680_1	5.9	FAD-abhängige Oxidoreduktase
BofuT4_P091930_1	5.9	MES-Transporter <i>bcmfs19</i>
BofuT4_P150600.1	6,0	Unbekannt
BC1G 14678 1	6.0	Aminopeptidase
BofuT4_P059550.1	6,3	Unbekannt
BofuT4_P046390.1	6,3	Unbekannt
BofuT4_P094590.1	6.4	Acvl-Carrier-Protein
BofuT4 P107710.1	6,5	Flavoprotein K-Transport
BofuT4 P153400.1	6.6	Acvl-CoA-Synthetase
BofuT4 P133540.1	6.6	Beta-GRP
BC1G 13810.1	6.7	MFS Transporter
BC1G 09027.1	7.2	Aminosäurentransporter
BofuT4 P133520.1	7.3	Kupfer-Badikal-Oxidase
BofuT4 P044360.1	7.3	Cvtochrom-P450-Monooxvgenase
BofuT4 P162220.1	7.4	DNA-Reparatur
BofuT4 P160330.1	8.0	Unbekannt
BofuT4_P044380.1	8.2	Gluthation-S-Transferase
BofuT4_P160320.1	8,9	HMG
BC1G_00647_1	9.1	Unbekannt
BofuT4_P031010_1	92	Unbekannt
BofuT4_P133560_1	9.5	Unbekannt
BofuT4_P115390_1	10.0	Sterolmethyl-Transferase
BofuT4_P078420_1	10.8	Unbekannt
BC1G 16178 1	11.8	Unbekannt
BofuT4_P070990_1	12.5	Oxidoreduktase
BofuT4_P091680_1	12,5	WD40-Domäne
BofuT4 P108370 1	12.8	Unbekannt
	,0	Shookanik

BofuT4_P044370.1	12,9	Cytochrom-P450-Monooxygenase
BofuT4_P129470.1	15,1	Esterase
BofuT4_P129080.1	15,7	Unbekannt
BofuT4_P062310.1	58,5	Oxidoreduktase
BofuT4_P024110.1	70,5	MFS-Transporter bcmfsM2
BofuT4_P155250.1	72,0	Transkriptionsfaktor
BofuT4_P155260.1	117,0	Unbekannt

### 7.7. Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name:	Kretschmer
Vorname:	Matthias
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	21.09.1979
Geburtsort:	Landau in der Pfalz

# Werdegang

Schulausbildung und Zivildienst

1986-1990	Grundschule Nußdorf
1990-1999	Max-Slevogt-Gymnasium Landau i. d. Pfalz
1999-2000	Jugendzentrum Wörth

# Hochschulausbildung

2000-2005	<ul> <li>Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern Titel der Diplomarbeit:</li> <li>Das Pflanzenpathogen <i>Botrytis cinerea</i> im Weinbau</li> <li>1. Altersabhängige Suszeptibilität von Weinbeeren gegenüber <i>Botrytis cinerea</i></li> <li>2. Untersuchung der genetischen Diversität und Fungizidsensitivität einer Frühjahrs- und Herbstpopulation von <i>Botrytis cinerea</i></li> </ul>
2006-2009	Promotion an der TU Kaiserslautern, AG Phytopathologie als Stipendiat der Deutschen Bundesstiftung Umwelt Titel der Arbeit: Beteiligung von energieabhängigen Efflux-Transportern an der "Multiplen Fungizidresistenz" des Grauschimmelerregers <i>Botrytis cinerea</i> in französischen und deutschen Weinanbaugebieten

# Wissenschaftliche Tätigkeiten

Sep. 2005-Nov. 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern, Prof. Dr. M. Hahn
Dez. 2005-Mär. 2006	University of British Columbia, Kanada, Michael-Smith- Laboratories, Prof. Dr. J. Kronstad

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Möglichkeit dieses innovative und spannende Projekt in seinem Labor durchführen zu können. Weiterhin möchte ich mich für die sehr gute Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung bedanken.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die dieses Projekt nicht hätte durchgeführt werden können.

Bei Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck möchte ich mich vielmals für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern für ihre Hilfe bedanken. Bei der INRA in Versailles (Frankreich) möchte ich mich bei Anne-Sophie Walker, Pierre Leroux und Sabine Fillinger für die MDR-Vergleichsstämme, für Monitoringdaten, durchgeführte Kreuzungsexperimente und die ständige Bereitschaft zur Diskussion über MDR-Phänomene bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Henk-jan Schoonbeek (Universität Fribourg, Schweiz) für die Fungizidauffnahmeuntersuchungen und die Möglichkeit, für ihn, Macroarrayuntersuchungen für das Camalexinpaper durchführen zu können. Bei der DLR in Mußbach möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Versuchsflächen und die durchgeführte Fungizidbehandlung bedanken.

Nun möchte ich mich bei Dr. Andreas Böhm und Dr. Michaela Leroch für die Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und für das immer offene Ohr bedanken. Bei Michaela möchte ich mich zusätzlich für die helfende Hand, wenn etwas wieder einmal nicht so funktionierte wie gedacht, wenn hunderte von Isolate gesammelt oder dutzende von 96-Wellplatten für den Fungizidtest pipettiert werden mussten und die Besuche des "Fussiballs" bedanken.

Für die Hilfe bei Probenahmen, Fungizidtests und die Diskussionsbereitschaft über MDR möchte ich mich bei Andreas Mosbach, Dennis Mernke und Astrid Schamber recht herzlich bedanken. Weiterhin erwähnt werden müssen Christa, für ihre Hilfe bei bürokratischen Hürden, so wie Annette und Klaus für ihre Hilfe bei allen möglichen technischen Fragen. Ohne den Spaß mit euch im Labor zu arbeiten, hätte die Arbeit nur halb soviel Freude bereitet.

Des Weiteren möchte ich mich bei Maryam und Melanie für die Gespräche und die Hilfe beim Projekt bedanken.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei den AGs Ökologie, Pflanzenphysiologie, Proteomik und Zellbiologie für die Benutzung verschiedener technischer Geräte und Reagenzien. Den Mitarbeitern der AG Ökologie, Simone Marker und Martin Simon danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Als Letztes möchte ich mich bei allen Praktikanten, die dieses Projekt unterstützt haben und bei allen Ehemaligen der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit bedanken.

Abschließend noch einen ganz besonderen Dank an meine Familie für ihre Unterstützung sowohl während des Studiums als auch während der Promotion, ohne sie währe all dies nicht möglich gewesen.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation am Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern selbständig und ohne Zuhilfenahme unerlaubter Hilfsmittel verfasst habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind als solche kenntlich gemacht. Ergebnisse, die im Rahmen von Kooperationen erhalten wurden, sind in der Arbeit vermerkt.

1. Melanie Wiwiorra

Im Rahmen ihrer von mir betreuten Diplomarbeit wurden die Deletionsmutanten des ABC-Transporters *bcatrB* erzeugt.

2. In Kooperation mit Dr. Henk-jan Schoonbeek (Uni Fribourg, Schweiz) wurden die Fungizidakkumulationsstudien und die Camalexinsensitivitätstests durchgeführt.

3. In Kooperation mit der INRA Versailles (Frankreich) mit Anne-Sophie Walker, Dr. Pierre Leroux und Prof. Dr. Sabine Fillinger wurden MDR-Isolate ausgetauscht, Fungizidresistenzmonitoringdaten für das Weinanbaugebiet Champagne erhalten und Kreuzungen verschiedener MDR-Phänotypen durchgeführt.

Kaiserslautern, den 19.03.2009

Matthias Kretschmer