

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum – DLR-Rheinpfalz

Kompetenzzentrum Weinforschung

Breitenweg 71, 67435 Neustadt an der Weinstraße

Dr. Andreas Kortekamp und Dr. Ruth Walter

Abschlussbericht

zum Forschungsvorhaben 2810HS016

(15.9.2010 – 31.11.2013)

**Sensorisch und gesundheitlich relevante Sekundärmetabolite von
Penicillium sp. an Weintrauben – Profilerfassung, biologische Funktion und
Entwicklung eines analytischen Markers**

Berichtszeitraum 15.9.2010 - 31.11.2013

1 Ziele und Aufgabenstellung

- 1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens
 - 1.1.1 Sammlung von *Penicillium*-Isolaten
 - 1.1.2 Bestimmung der *Penicillium*-Arten
 - 1.1.3 Bildung von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A durch *Penicillium* sp.
 - 1.1.3.1 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener *B. cinerea*-Stämme auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft
 - 1.1.3.2 Untersuchung wichtiger Stoffwechselprodukte von *Penicillium*-Isolaten an Einzelbeeren
 - 1.1.4 Untersuchungen zur biologischen Funktion verschiedener Sekundärmetabolite
 - 1.1.5 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most
 - 1.1.6 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

2 Material und Methoden

- 2.1 Sammlung von *Penicillium*-Isolaten
- 2.2 Bestimmung der *Penicillium*-Arten
 - 2.2.1 Isolierung von DNA für molekularbiologische Untersuchungen
 - 2.2.2 Spezifischer Nachweis von *P. expansum*
 - 2.2.3 Identifizierung weiterer *Penicillium*-Arten
 - 2.2.3.1 PCR des Cytochromoxidase-Gens (cox1) mit anschließender Restriktion
- 2.3 Untersuchung wichtiger Stoffwechselprodukte *in vitro*
 - 2.3.1 Aufbereitung der Proben und analytischer Nachweis von Geosmin und den Toxinen Patulin, Citrinin sowie Ochratoxin A
 - 2.3.1.1 Festphasenextraktion und Elution
 - 2.3.1.2 Analytischer Nachweis von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A
 - 2.3.2 Herstellung von Konidiensuspensionen für Versuchsansätze

- 2.3.3 Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum*
 - 2.3.3.1 *In vitro*-Versuche mit künstlichen Nährlösungen
 - 2.3.3.2 *In vitro*-Versuche mit Traubensaft
 - 2.3.3.3 Bildung von Geosmin, Citrinin und Patulin an Einzelbeeren
- 2.3.4 Bildung von Ochratoxin A durch *P. crustosum* und *P. purpurogenum* in Traubensaft
- 2.4 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Stoffwechselprodukte
- 2.5 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most
- 2.6 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

- 3.1 Ergebnisse der Artenbestimmung
 - 3.1.1 Spezifischer Nachweis von *P. expansum*
 - 3.1.2 Nachweis anderer *Penicillium*-Arten
 - 3.1.2.1 PCR des Cytochrom-Oxidase-Gens (*cox1*) mit anschließender Restriktion
- 3.2 Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum*
 - 3.2.1 *In vitro*-Versuche mit künstlichen Nährlösungen
 - 3.2.2 *In vitro*-Versuche mit Traubensaft
 - 3.2.3 Bildung von Geosmin, Citrinin und Patulin an Einzelbeeren
- 3.3.1 Bildung von Ochratoxin A durch *P. crustosum* und *P. purpurogenum*
- 3.4 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Stoffwechselprodukte
- 3.5 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most
- 3.6 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

4 Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse, weiterer Forschungsbedarf

5 Zusammenfassung

6 Soll-Ist-Vergleich des Vorhabens

7 Literatur

8 Anhänge

1 Ziele und Aufgabenstellung

Seit Ende der 1990er Jahre werden in deutschen Weinanbaugebieten zunehmende Probleme mit Sekundärfäuleerregern beobachtet. Insbesondere der Befall durch Grünfäule, verursacht durch Pilze der Gattung *Penicillium*, hat in einigen Jahren zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten bei den Winzern geführt. Die Pilze bilden sensorisch und gesundheitlich relevante Sekundärmetabolite, die einen bedeutenden negativen Einfluss auf die Most- und Weinqualität haben. Die Bildung dieser Sekundärmetabolite durch die Pilze wird offensichtlich von abiotischen und biotischen Wachstumsfaktoren beeinflusst. Eine zuverlässige Abschätzung der Qualitätsminderung anhand des visuell vorhandenen *Penicillium*-Befalls an den Trauben ist kaum möglich und eine Schadensschwelle für den Befall konnte bisher nicht klar definiert werden. Vor diesem Hintergrund sollte in dem vorgestellten Projekt insbesondere die Bildung wichtiger Stoffwechselprodukte durch *Penicillium*-Isolate von Trauben analysiert werden. Auch der Einfluss wesentlicher biotischer und abiotischer Wachstumsfaktoren auf die Bildung der Substanzen sollte überprüft werden. Physiologische und epidemiologische Untersuchungen sollten zudem grundlegende Hinweise liefern, welche biologische Funktion diese Sekundärmetabolite für die Pilze erfüllen. Ein zentrales Ziel des Projektes bestand in der Entwicklung eines geeigneten analytischen Markers, der aussagekräftig für den *Penicillium*-Befall an den Trauben ist. Dieser Marker soll die Grundlage für eine zuverlässige Beurteilung des *Penicillium*-Befalls an den Trauben liefern und somit als eine essentielle Entscheidungshilfe für eventuell notwendige weitere Behandlungsschritte an Trauben, Mosten oder Weinen dienen.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

1.1.1 Sammlung von *Penicillium*-Isolaten

Während den Vegetationsperioden 2010 bis 2013 wurden *Penicillium*-Isolate aus Rebflächen gewonnen. Insbesondere Isolate von Trauben mit typischen Krankheitssymptomen, aber auch von Blütenresten und anderen Rebsorten sollten für die Bestimmung der Arten und die Untersuchungen zur Bildung verschiedener Stoffwechselprodukte gesammelt und kultiviert werden.

1.1.2 Bestimmung der *Penicillium*-Arten

Verschiedene *Penicillium*-Arten bilden unterschiedliche sensorisch und gesundheitlich relevante Sekundärmetabolite. Die Arten-Bestimmung der Isolate stellt daher eine wesentliche Grundlage zur Einschätzung verschiedener Risikofaktoren für die Mostqualität dar.

1.1.3 Bildung von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A durch *Penicillium* sp.

In den Untersuchungen sollten ausgewählte *Penicillium*-Isolate auf ihr Potential zur Bildung von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A geprüft werden. Ziel der Untersuchungen ist die Erfassung von Stoffwechselprodukten als potenzielle Verunreinigungen von Mosten. Zudem sollen grundlegende Kenntnisse zu den Unterschieden zwischen Isolaten gewonnen werden. Die Daten liefern wichtige Grundlagen zur Untersuchung verschiedener Bildungsbedingungen und Entwicklung eines analytischen Markers.

1.1.3.1 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener *B. cinerea*-Stämme auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft

Untersuchungen von La Guerche (2007) belegen eine wichtige Rolle verschiedener *B. cinerea*-Stämme für die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft. Um den Einfluss verschiedener Stämme auch für deutsche Weinanbaugebiete zu untersuchen, wurden *B. cinerea*-Isolate verschiedener Herkunft und von verschiedenen Rebteilen (z.B. Stielgerüst, Blütenreste, befallene Beeren) gewonnen und nach den Kriterien von La Guerche (2007) als Bot (+) oder Bot (-)-Stämme charakterisiert. Bot (+)-Stämme sollen die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft stimulieren, während Bot (-)-Stämme die Bildung von Geosmin behindern bzw. nicht anregen sollen.

1.1.3.2 Untersuchung wichtiger Stoffwechselprodukte von *Penicillium*-Isolaten an Einzelbeeren

Durch Versuche an Einzelbeeren werden die Bildungsbedingungen am eigentlichen Zielorgan näher erfasst, und wichtige Infektionsprozesse können berücksichtigt

werden. Verschiedene Inkubationszeiten können zudem die Bildung der Metabolite während unterschiedlichen Wachstumsphasen der Pilze widerspiegeln. Der Einfluss der verschiedenen Wachstumsparameter auf die Bildung der Sekundärmetabolite sollen wichtige und grundlegende Einblicke in den Metabolismus der Pilze liefern. Die Daten können konkrete Hinweise auf die Stoffwechselaktivität der Pilze im Freiland liefern und als Grundlage geeigneter Freilandversuche dienen.

1.2 Untersuchungen zur biologischen Funktion verschiedener Sekundärmetabolite

Grundlegende Erkenntnisse zur Biologie und Epidemiologie von *Penicillium*-Arten sollen gewonnen werden. Ziel ist die Aufklärung der Frage, ob es sich bei den Substanzen um reine „Abfallprodukte“ des pilzlichen Stoffwechsels handelt oder diese Substanzen dem Pilz einen Selektionsvorteil verschaffen.

1.3 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most

Ein wichtiges Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung eines geeigneten analytischen Markers in Traubenproben und in Mosten mittels der modernen Analytik (HPLC, GC-MS, LC-MS/MS). *Penicillium*-Arten produzieren eine Reihe sekundärer Stoffwechselprodukte, die in das Nährmedium abgegeben werden. In einer umfangreichen Literaturstudie von Frisvad et al. (2004) werden zahlreiche Metabolite unter anderem aus den Stoffgruppen der Terpene, Alkene, Ketone, Alkohole und Ester genannt, die von verschiedenen *Penicillium*-Arten gebildet werden. Anhand dieser Vorkenntnisse sollten mittels GC-MS/MS, HPLC bzw. LC/MS „Leitsubstanzen“ gesucht werden, die entweder spezifisch auf das Vorkommen von *Penicillium*-Arten allgemein hinweisen oder die Stoffwechselaktivität der für den Weinbau besonders wichtigen Arten anzeigen.

1.4 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

Ein weiteres Ziel des Projektes bestand in der Einschätzung einer Schadensschwelle für einen *Penicillium*-Befall an den Trauben im Freiland. Für die Untersuchungen wird in unterschiedlich behandelten Versuchspartzen im Freiland der Fäulnis-Befall visuell erfasst. In den Versuchsvarianten wurden insbesondere kulturtechnische

Maßnahmen geprüft, die die Wachstumsbedingungen für die Pathogene an den Trauben stark beeinflussen können (z. B. horizontales Traubenteilen, Entblätterung, Regalis[®], Gibb 3[®], Fungizide, Blattdünger). Traubenproben aus den Versuchspartzen wurden zu Mosten verarbeitet. Die Moste wurden chemisch analysiert und mykologisch auf pilzliche Pathogene untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Sammlung von *Penicillium*-Isolaten

In den Jahren 2010 bis 2012 wurden 125 *Penicillium*-Isolate von infizierten Trauben gesammelt. Um Mischungen aus verschiedenen Isolaten auszuschließen und homogenes Material für alle molekularbiologischen und analytischen Untersuchungen zu schaffen, wurden alle Isolate als Einzelsporlinien angezogen.

2.2 Bestimmung der *Penicillium*-Arten

Die Identifizierung verschiedener *Penicillium*-Arten anhand morphologischer Merkmale ist aufwendig und häufig aufgrund der großen Ähnlichkeiten nicht eindeutig. Identifizierungen anhand des Sekundärmetabolismus sind langwierig, teuer und nicht immer reproduzierbar, da sich der Metabolismus zwischen verschiedenen Isolaten innerhalb einer Art stark voneinander unterscheiden kann. Aus diesem Grund werden eindeutige und reproduzierbare molekularbiologische Verfahren zum Nachweis der Arten angestrebt. Für den spezifischen Nachweis von *P. expansum*, dem Hauptverursacher der Grünfäule an Trauben, kann bereits ein zuverlässiges PCR-Verfahren herangezogen werden (siehe Kapitel 2.2.2). Zur Bestimmung anderer *Penicillium*-Arten werden bisher Sequenzierungen der ITS-Region und ein Sequenzdatenabgleich in der Gendatenbank durchgeführt. Über dieses Verfahren kann jedoch häufig keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten *Penicillium*-Art erfolgen. Zur spezifischen Unterscheidung verschiedener *Penicillium*-Arten anhand von Fragmentmustern wurde ein Verfahren mit verschiedenen Restriktionsenzymen weiterentwickelt. Ziel war eine einfache, schnelle und zuverlässige Unterscheidung der wichtigsten im deutschen Weinbau nachgewiesenen fäulnisverursachenden *Penicillium*-Arten an Weintrauben. Auch für die spezifische Abgrenzung von *P. crustosum* und *P. commune* konnte ein

Nachweisverfahren mittels Restriktion einer Sequenz des Cytochrom-Oxidase-Gens erfolgreich entwickelt werden (siehe Kapitel 2.2.3.1).

2.2.1 Isolierung von DNA für molekularbiologische Untersuchungen

Für die Isolierung von DNA aus *Penicillium*-Myzel wurde folgendes Protokoll nach Kortekamp (mündliche Mitteilung) herangezogen:

- Die Myzelplatte wurde mit flüssigem Stickstoff geflutet, das Myzel abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorftube gegeben.
- Zerkleinerung des Myzels mit flüssigem Stickstoff und je drei Stahlkugeln (Durchmesser 3 mm) in einer Retsch® Schwingmühle MM 400 (45 sec., 18 Hz).
- Zugabe von 500 µl Extraktionspuffer (200mM Tris HCL pH 8,5; 25mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1ml/100ml Mercaptoethanol).
- Inkubation für 30-60 min. bei 65°C
- Abkühlung auf Raumtemperatur
- Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
- Zentrifugation 10 min (13000rpm) in einer Tischzentrifuge
- Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
- Zentrifugation 10 min (13000rpm) in einer Tischzentrifuge
- Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorftube
- Zugabe von 10 µl RNase (10 mg/ml), Inkubation für 60 min. bei 37°C
- Zugabe des 0,5 fachen Volumens von 7,5 M Ammoniumacetat (pH 6,0), geschwenkt
- Zentrifugation 10 min (13000rpm) in einer Tischzentrifuge
- Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorftube
- Zugabe von 1/9 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5-6) und 0,5fachen Volumen Isopropanol
- Inkubation erfolgte auf Eis/-20°C für 10 min.
- Zentrifugation 20 min. (13000rpm)
- Abgießen des Überstandes, eine anschließende Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur und Lösen des Pelletts in 50 µl TE-Puffer, Lagerung bei 4°C.

2.2.2 Spezifischer Nachweis von *P. expansum*

Der spezifische Nachweis der Art *P. expansum* erfolgte mittels PCR mit den Primern PEF (5´ATC GGC TGC GGA TTG AAA G 3´) und PER (5´AGT CAC GGG TTT GGA GGG A 3´) nach Marek et al. (2003). Die Eignung des Protokolls zum spezifischen Nachweis von *P. expansum* wurde bereits intensiv geprüft (Walter 2008). Da *P. expansum* der Hauptverursacher der Grünfäule an Trauben ist, wurden alle Isolate zunächst mit Hilfe der artspezifischen Primern untersucht.

Die Ansätze wurden mit den puReTaq™Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für 25 µl-Ansätze wurden je 25 pmol Primer und 5 µl DNA eingesetzt. Das PCR Protokoll erfolgte modifiziert nach Marek et al. (2003) in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler® gradient):

5 Minuten 92°C

1 Minute 92°C, 45 Sekunden 56°C, 45 Sekunden 72°C (30 Zyklen)

7 Minuten 72°C

Der Nachweis des 404 bp großen PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.3 Identifizierung weiterer *Penicillium*-Arten

Bisher wurden *Penicillium*-Arten anhand ihrer ITS-Sequenz identifiziert. Diese Vorgehensweise lässt in manchen Fällen jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten *Penicillium*-Art zu. Beispielsweise können *P. crustosum* und *P. commune* anhand der untersuchten Sequenz nicht unterschieden werden. Auch die Unterscheidung von *P. minioluteum* und *P. purpurogenum* kann anhand der ITS-Region nicht immer zuverlässig erfolgen. Daher wurde an der Entwicklung eines spezifischen molekularbiologischen Nachweises für die wichtigsten *Penicillium*-Arten an Weintrauben gearbeitet. Basenunterschiede im Cytochrom-Oxidase-Gen sollten bei verschiedenen *Penicillium*-Arten mittels spezifischer Restriktion zu spezifischen Fragmentmustern führen.

2.2.3.1 PCR des Cytochromoxidase-Gens (cox1) mit anschließender Restriktion

Zunächst wurde die *cox1*-Sequenz mit den Primern PenF1 (5´GAC AAG AAA GGT GAT TTT TAT CTT C 3´) und AspR1 (5´GGT AAT GAT AAT AAT AAT ACA GCT G 3´) nach Seifert et al. (2007) amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden mit den puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für 25 µl-Ansätze wurden je 25 pmol Primer und 5 µl DNA eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden nach einem Protokoll von Chen et al. (2009) mit dem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler® gradient) wie folgt ausgeführt:

3 Minuten 95°C

1 Minute 95°C, 45 Sekunden 56°C, 90 Sekunden 72°C (40 Zyklen)

10 Minuten 72°C

Restriktion der *cox1*-Sequenz mit *HpyF3I* zur Unterscheidung von *P. crustosum* und *P. commune*:

Für die anschließende Restriktion der *cox1* Sequenz wurden 10 µl PCR-Produkt, 2 µl 10x Puffer Tango (Fermentas), 1 µl *HpyF3I*, und 7 µl H₂O (Reinstwasser) gemischt, kurz zentrifugiert und für 4-5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das PCR-Produkt und die Restriktionsfragmente wurden mit einer Gelelektrophorese (1,8 % Agarose) überprüft.

Restriktion der *cox1*-Sequenz mit *HpyF3I*, *BspT1* und *BsmI* zur Unterscheidung verschiedener *Penicillium*-Arten:

Für eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung der *Penicillium*-Arten, die seit 2003 an Trauben aus deutschen Weinanbaugebieten nachgewiesen werden konnten (*P. crustosum*, *P. commune*, *P. solitum*, *P. spinulosum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. purpurogenum* und *P. minioluteum*), wurde das Restriktionsverfahren der *cox1*-Gensequenz weiterentwickelt.

Die mittels PCR amplifizierte *cox1*-Sequenz (Primer PenF1 und AspR1) der verschiedenen *Penicillium*-Arten wurde mit den Enzymen *HpyF3I*, *BspT1* und *BsmI* versetzt. Für eine Dreifach-Restriktion wurden je 10 µl PCR-Produkt mit je 1 µl Enzym, 4 µl 10x Tango Puffer und 10 µl dest. Wasser für 8-10 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3 Untersuchung wichtiger Stoffwechselprodukte *in vitro*

Die Bildung von Geosmin und den Mycotoxinen Citrinin, Patulin und Ochratoxin A durch verschiedene *Penicillium*-Isolate wurde *in vitro* geprüft. Hierzu wurde in mehreren Versuchsansätzen der Einfluss zahlreicher Parameter auf den Metabolismus verschiedener *Penicillium*-Arten und -Isolate in künstlichen Nährmedien und in Traubensaft untersucht. Da *P. expansum* der Hauptverursacher der Grünfäule in deutschen Weinanbaugebieten ist, konzentrierte sich ein Großteil der Untersuchungen bisher auf den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bildung relevanter Stoffwechselprodukte bei verschiedenen *P. expansum*-Isolaten. Die Parameter umfassten:

- Bildungspotenzial der Metabolite durch verschiedene Isolate
- Einfluss der Kohlenstoffquelle
- Einfluss verschiedener Aminosäuren und Stickstoffquellen
- Einfluss verschiedener *B. cinerea*-Stämme im Traubensaft

2.3.1 Aufbereitung der Proben und analytischer Nachweis von Geosmin und den Toxinen Patulin, Citrinin sowie Ochratoxin A

Die Analyse auf Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A bei den verschiedenen Versuchsansätzen wurden wie folgt vorbereitet:

Flüssige Nährmedien: Das Pilzmyzel wurde von der Nährlösung (2% Biomalz-Extrakt) getrennt, gesondert zermörsert und zusammen mit der Nährlösung durch ein Filterpapier gegeben. Es folgte eine Festphasenextraktion (Abschnitt 2.3.1.1).

Beerenproben: Die Einzelbeeren innerhalb einer Versuchsvariante wurden durch Glaswolle gepresst. Der Saft wurde mittels Festphasenextraktion (Abschnitt 2.3.1.1) für die Analytik aufbereitet.

Trauben- und Mostproben: Trauben innerhalb einer Versuchsvariante wurden durch ein Sieb gepresst. Der Saft (Most) wurde anschließend für 10 Minuten bei 4600 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Saft wurde mittels Festphasenextraktion (Abschnitt 2.3.1.1) für die Analytik aufbereitet.

2.3.1.1 Festphasenextraktion und Elution

Für die Festphasenextraktion und Elution von Geosmin, Citrinin, Patulin und Ochratoxin A aus den Proben wurde die Methode von Twertek (1995) verwendet:

- Versetzen von 100 ml Probe mit 100 ml destilliertem Wasser und 2 ml Methanol
- Konditionierung der C18 -Säulen: Spülen mit zwei Bettvolumen Hexan, zwei Bettvolumen Methanol und zwei Bettvolumen Wasser mit 1 % Methanol
- Extraktion der Probe über eine 1000 mg C18-Säule der Firma Macherey-Nagel

(vorgeschaltete, mit Glaswolle gefüllte Kartusche verhindert die Verstopfung der Fritte über die C18 –Säule)

- Nachspülung der Probe mit destilliertem Wasser, Trocknung der Säule im Stickstoffstrom
- Elution der adsorbierten Substanzen mit 2,5 ml Aceton und 2,5 ml Essigsäureethylester aus den C18-Säulen, Ausblasen im Stickstoffstrom
- chromatographische Reinigung über 500 mg Silicagel (Körnungsgröße 40 µm) in einer 6 ml Kartusche
- Ausschwemmung des Silicagels mit einem Bettvolumen Säuleneluent (Hexan:Aceton, 1:1)
- Lösen der getrockneten Proben in 250 µl Aceton, Zugabe von 250 µl Hexan, Überführung auf Silicagel
- Erste eluierte Fraktion wurde verworfen, 500 µl Eluent auf die Säulen gegeben, diese zweite Fraktion wurde ebenfalls verworfen.

Für die Elution von Geosmin und Patulin wurde das Eluat ab 1 ml bis 3,5 ml an Hexan:Aceton 1:1 aufgefangen. Die durchschnittliche Menge 2,5 ml des Eluates wurde im Stickstoffstrom eingengt und der Rückstand für die Analyse mittels GC/MS in 400 µl Aceton gelöst. Für den Nachweis von Patulin wurde nach der Messung von Geosmin in der GC/MS das Aceton ausgedampft und der verbleibende Rückstand in 400 µl Acetonitril:Wasser 1:1 gelöst. Vor dem Verschließen des Probenvials wurde der gewonnene Probenextrakt mikromembranfiltriert und mittels HPLC/DAD vermessen.

Die Elution von Ochratoxin A und Citrinin erfolgte ab 3,5 ml, wobei auf Aceton als Laufmittel umgestellt wurde. Diese Erhöhung der Polarität war erforderlich, um Citrinin zu eluieren. Zur vollständigen Elution wurden 4,5 ml auf das Silicagel pipettiert. Die Einengung erfolgte im Stickstoffstrom und der Rückstand wurde zur Analyse mittels HPLC/FLD in 400 µl Acetonitril:Wasser 1:1 gelöst und membranfiltriert.

2.3.1.2 Analytischer Nachweis von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A

Nachweis von Geosmin:

Die Analyse und Quantifizierung von Geosmin wurde mittels Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Die Analyse wurde an einem Gaschromatografen (FinniganTMMAT) gekoppelt mit einem Iontrap GCQ Massenspektrometer durchgeführt. Die GC/MS-Analyse wurde zum einen im Full-scan-Modus vorgenommen, in dem alle vorhandenen Substanzen erfasst wurden. Mit Hilfe von Standards wurde für Geosmin eine Retentionszeit von 8,18 min ermittelt. Die Quantifizierung von Geosmin erfolgte anhand der Peakflächen. Hierzu wurden in einem Messzyklus Standards an Geosmin (Fluka, Taufkirchen) in den Konzentrationen 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 und 10,0 µg/ml gemessen. Durch lineare Regression wurde anschließend der sogenannte Response Faktor für Geosmin errechnet. Danach konnten die resultierenden Peakflächen der Proben in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet werden. Um Fehler bei der Quantifizierung durch Hintergrundrauschen bei 8,18 min auszuschließen, erfolgte die Peakintegration über die SIM-Massen (Selected Ion Monitoring Mode) 97, 112 und 126. Durch Isolation der Masse 112 aus der Molekülmasse 182 und Bestrahlung bei 0,6 V entstand zum anderen ein für Geosmin charakteristisches Tochterionen-spektrum. Diese MS/MS-Isolation ermöglichte die Ausblendung störender Matrixeffekte und sicherte als Gegenvergleich die Quantifizierung ab.

Gaschromatograph: Finnigan GC

Säule: Kapillarsäule ZB-1 der Firma Phenomenex

(30 m x 0.25 mm i.D.; Filmdicke: 0.50 µm)

Trärgas: Helium; Injektortemperatur: 250°C

Injektionsvolumen: 3 µl, Splitlos-Injektion; Fließgeschwindigkeit: 40.00 cm/ sec

Ofenprogramm:

Ofentemperatur 1: 60 °C Isozeit 1: 2.0 min Heizrate 1: 20°C/ min

Ofentemperatur 2: 250 °C Isozeit 2: 10.0 min Heizrate 2: 25°C/ min

Ofentemperatur 3: 300°C Isozeit 3: 26.5 min

Massenspektrometer: Iontrap GCQ der Firma Axel Semrau

Modus: Full-Scan 50 – 650 (0.27 Sekunden pro Scan)

Ionvolumen: 180°C; Transfer Line: 250°C

Filament: Start nach 6.0 min; Modus: MS/MS

Ionvolume: 180°C; Transfer Line: 250°C
Filament: Start nach 6.0 min
Precursor Ion: 112 Width: 1.0 Time 12 ms
Excitation Volts: 0.60 V q: 0.45 Time 30 ms
Product Ions: 50 - 112

Nachweis von Citrinin und Ochratoxin A:

Die Messung des Gehaltes an Citrinin und Ochratoxin A erfolgte mittels HPLC. Hierzu wurden eine Kinetex 2.6 µ PFP 100 Å Säule und folgende Eluenten benutzt.

Gradiententabelle:

Laufmittel A: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 50:50

Laufmittel B: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 5:95

Zur Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor mit folgenden Wellenlängen verwendet:

Citrinin: Extinktion: 319 nm – Emission: 360nm

Ochratoxin A: Extinktion: 330 nm – Emission: 460 nm

Die Absicherung positiver Befunde an Citrinin und Ochratoxin A erfolgte durch das Signal des Dioden-Array-Detektors, der ebenfalls in der HPLC integriert war.

Bei den entsprechenden Retentionszeiten Citrinin 10,85 min und Ochratoxin A 13,60 min konnten dann die Absorptionsmaxima bei 319 nm (Citrinin) sowie bei 248 und 333 nm (Ochratoxin A) überprüft werden.

Nachweis von Patulin:

Die Messung des Gehaltes an Patulin konnte mit der ersten Cleanfraktion nach Ausdampfen des Lösungsmittels für die GC/MS Messung und Neuaufnahme in Acetonitril:Wasser mittels HPLC durchgeführt werden. Hierzu wurden eine Kinetex 2.6 µ PFP 100 Å Säule und folgende Eluenten verwendet:

Laufmittel C: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 75:25

Laufmittel D: 4 mM Natriumacetat-Puffer/Methanol 5:95

Die Retentionszeit beträgt 5,10 Minuten, wobei der Nachweis mit Hilfe des Diode-Array-Detektors bei einer Wellenlänge von 276 nm erfolgte.

2.3.2 Herstellung von Konidiensuspensionen für Versuchsansätze

Eine reproduzierbare und stets konstante Herstellung aller verwendeten Konidiensuspensionen stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Vergleichbarkeit aller Versuchsansätze dar. Alle verwendeten Konidiensuspensionen stammen von einer auf (2%) Biomalz-Agar angezogenen Kultur. Die Kulturen wurden in Abhängigkeit der Art fünf bis sieben Tage vor dem Versuchsansatz ausplattiert und bei 21°C inkubiert.

Am Tag des Versuchsansatzes wurden die Konidien von den Biomalz-Agarplatten mit einem Drigalski-Spatel und sterilem, destilliertem Wasser ab gespült. Es folgte zweimaliges Waschen der Konidien mit destilliertem Wasser (Abzentrifugieren für 10 min bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge, Abziehen des Überstandes, Resuspendieren in 10 ml destilliertem Wasser, mischen). So konnte gewährleistet werden, dass keine Zuckerreste von den Biomalz-Nährplatten in die Nährlösung der einzelnen Versuchsansätze gelangten und die verwendeten Konidien stets einen vergleichbaren Entwicklungsstand hatten.

2.3.3 Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum*

2.3.3.1 *In vitro*-Versuche mit künstlichen Nährlösungen

In den Versuchsjahren 2011 und 2012 wurde geprüft, in wieweit verschiedene *P. expansum*-Isolate in der Lage waren, in unterschiedlich zusammengesetzten Nährlösungen Geosmin, Citrinin und Patulin zu bilden. 50 ml der autoklavierten Nährlösungen wurden mit je 1 ml Konidiensuspension (200.000 Konidien/ml) inokuliert und für 14 Tage bei 21°C inkubiert. Folgende Zusammensetzungen der Nährmedien wurden in zweifacher Wiederholung geprüft:

dest. Wasser

2 % Biomalz

1 % Biomalz

2 % Glucose, 2 % Hefeextrakt

1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat

2 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat

1 % Biomalz, 1 % Saccharose

In weiteren Versuchsansätzen wurde geprüft, wie sich verschiedene Kohlenstoffquellen auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* ausgewirkt haben. Die

Untersuchungen wurden mit dem *P. expansum*- Stamm (DSM 62841) durchgeführt. Die Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Saccharose, Galactose, Mannit(ol), Glycerin und Cellobiose wurden jeweils 2% ig mit 1% Hefeextrakt versetzt.

2.3.3.2 In vitro-Versuche mit Traubensaft

Geosmin

Studien von La Guerche et al. (2007) zeigten, dass *P. expansum* in Traubensäften kein Geosmin bilden kann. Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass bestimmte *Botrytis*-Stämme einen Einfluss auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* haben. Dabei stimulieren sogenannte Bot (+)-Stämme die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft. Solche Interaktionen von *P. expansum* mit *B. cinerea* in Traubensaft wurde 2011 und 2012 auch für die in deutschen Weinanbaugebieten vorkommenden *B. cinerea*-Isolate untersucht. In den Vegetationsperioden 2009 bis 2011 wurden insgesamt 316 *Botrytis*-Isolate aus Rebflächen gewonnen, die für die Untersuchungen zur Verfügung stehen. 150 Isolate stammten von befallenen Trauben, 161 von Blütenresten und 5 aus Mostproben.

Für die Versuche wurden je 50 ml Traubensaft (Riesling) mit verschiedenen Stämmen (n= 63) von *B. cinerea* beimpft (1 ml, 200.000 Konidien/ml). Nach 14 Tagen Inkubation bei 21°C wurde das Myzel mittels eines Siebes aus der Lösung entfernt. Es folgte eine Inokulation der Ansätze mit 1 ml Konidien suspension (200.000 Konidien/ml) von *P. expansum*, DSM 62841. Nach weiteren 14 Tagen Inkubation bei 21°C wurde das Myzel durch ein Filterpapier aus der Lösung entfernt und für den Nachweis von Geosmin mittels GC-MS/MS vorbereitet.

2.3.3.3 Bildung von Geosmin, Citrinin und Patulin an Einzelbeeren

Mit Versuchen an den Einzelbeeren sollte die Bildung wichtiger Stoffwechselprodukte von *P. expansum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen im Labor *in vivo* geprüft werden. Im Jahr 2011 wurden bereits Versuchsansätze mit Beeren der Sorte Riesling, Müller-Thurgau, Weißburgunder und Portugieser angesetzt (Abb. 1). Die detaillierte Versuchsdurchführung wurde im Zwischenbericht 2011 (Kapitel 2.5) dargestellt. Alle Versuchsvarianten und Messergebnisse wurden dort im Anhang 2 aufgeführt und befinden sich in diesem Bericht im Anhang II. In den

Versuchsvarianten wurden damit wichtige Wachstumsparameter geprüft, die im Weinberg auf die Pilze einwirken können. Insbesondere auch die Konkurrenz mit Bot(+) -oder Bot(-) -Stämmen wurde in den Versuchsvarianten geprüft.



Abbildung 1: *P. expansum* (DSM 62841) an Rieslingbeeren. Inkubation bei 21°C für 7 Tage in Dunkelheit (links). *P. expansum* (DSM 62841) und *B. cinerea* (Bot (+) 9206) an Riesling-Beeren. Inkubation bei 21°C für 7 Tage in Dunkelheit (rechts).

2.3.4 Bildung von Ochratoxin A durch *P. crustosum* und *P. purpurogenum* in Traubensaft

Für die Untersuchungen wurden je 50 ml Traubensaft (Riesling) mit 1 ml (200.000 Konidien/ml) in 2 Wiederholungen beimpft. Die Proben wurden bei 21°C für 14 Tage inkubiert. Die Untersuchungen wurden mit den Eigenisolaten *P. crustosum* (876) und *P. purpurogenum* (9262, 9503), und der Referenz *P. crustosum* CBS 327.48 durchgeführt. In der negativen Kontrolle wurde der Traubensaft mit destilliertem Wasser beimpft.

2.4 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Stoffwechselprodukte

Untersuchungen an Einzelbeeren:

In Untersuchungen zur biologischen Funktion von Ochratoxin A wurden Einzelbeeren verschiedener Rebsorten im Labor mit Ochratoxin A bildenden *P. crustosum*-Isolaten infiziert.

In vitro Tests in Mikrotiterplatten:

In weiteren Versuchsserien wurde die Wirkung der Toxine Patulin, Citrinin und Ochratoxin A als Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf unterschiedliche Mikroorganismen, die von reifen Beeren isoliert wurden, getestet.

Der Saft von Rieslingbeeren wurde auf Biomalzagar ausplattiert und bei 21°C bzw. 25°C inkubiert. Kolonien verschiedener Mikroorganismen wurden isoliert und für die Tests als Reinkulturen angezogen (zwei Bakterien-Stämme, zwei *Cladosporium* sp., zwei Stämme wilder Hefen, drei Stämme filamentöser Pilze). Zusätzlich wurden zwei *B. cinerea*-Stämme, zwei *P. expansum*- und zwei *P. purpurogenum*-Stämme in die Versuche einbezogen. Die Reinsubstanzen der Metabolite lagen in Methanol gelöst vor. Um die Wirkung von Methanol auszuschließen, wurde auch eine Methanol-Kontrolle in die Versuche einbezogen. Ein Beispiel für einen Versuchsaufbau mit einem *Penicillium*-Isolat ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Metabolite wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in die Taschen der Mikrotiterplatten vorgelegt und das Methanol wurde durch Verdampfen für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur weitestgehend entfernt. Anschließend wurden jeweils 1000 µl Konidien suspension, angesetzt in Riesling-Traubensaft (200.000 Sporen/ml), zugegeben. Die Platten wurden bei 21°C inkubiert, bis in der Wasserkontrolle ein deutliches Wachstum oder eine Vermehrung der Mikroorganismen zu erkennen war. Die Keimrate der Wasserkontrolle und der höchsten eingesetzten Konzentration wurde in einer 1:10 Verdünnung mittels Zählkammer ausgezählt.

Tabelle 1: Beispiel für einen Versuchsaufbau in einer Mikrotiterplatte mit einem der insgesamt neun Mikroorganismen. Die Buchstaben A-L bezeichnen die Reihen in den Mikrotiterplatten.

Platte 1/ Mikroorganismus 1						
	µl gelöster Metabolit					
Metabolit	A+B	C+D	E+F	G+H	I+J	K+L
Ochratoxin A	0	1	2	3	4	5
Methanol (100%)	0	1	2	3	4	5
Citrinin	0	5	10	15	20	25
Patulin	0	5	10	15	20	25
Methanol (100%)	0	5	10	15	20	25

Konzentrationen der Stammlösungen: 100 ng/µl

2.5 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most

Für die Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most wurden verschiedene Versuchsansätze verfolgt (siehe Zwischenbericht 2011, Anhang III). Im letzten Versuchsjahr wurden die Möglichkeiten zur Identifizierung eines Markers mittels LC-MS/MS geprüft. LC-MS/MS-Analysen sollen ein breiteres Spektrum an Substanzen erkennen und über eine geeignete Software einen automatisierten und effizienten Abgleich der Inhaltsstoffe ermöglichen. Zu Beginn wurde der Saft einzelner gesunder und mit *P. expansum* infizierter Beeren untersucht. In weiteren Versuchsserien wurden auch homogenisierte Mostproben, Wein, und ein weites Spektrum verschiedener, an Weinbeeren auftretender Pathogene untersucht.

Probenaufbereitung:

Alle Proben wurden durch Verreiben oder Zerdrücken in Plastiktüten homogenisiert (Abb. 2). Der gewonnene Probensaft wurde 1:1 mit 100 % Methanol versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand 1:10 mit Wasser versetzt. 10 µl der Probe wurden direkt in die LC/MS/MS injiziert.



Abbildung 2: Aufbereitung einzelner Beeren für die Analyse mittels LC-MS/MS.

LC-MS/MS: Geräteaufbau und Konditionen

HPLC Agilent 1260, bestehend aus binärer Pumpe, Säulenofen, High Performance Autosampler, Q-TOF mit AJS-ESI-Ionenquelle

HPLC: Konditionen

Säule: Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1mm x 100 mm x 1.8 µm)

Injektionsvolumen: 10 µL; Fluss: 0.3 mL/min

Mobile Phase: A: Wasser, Methanol, Ameisensäure (94.8/5/0.2), B: Methanol, Wasser, Ameisensäure (94.8/5/0.2)

Gradient: 0% B bei 0 min, 100% B bei 10-12 min, 0% B bei 13 min; Stopp nach 20 min.

Q-TOF mit AJS-ESI: Konditionen; Modus: ESI positiv

MS Modus: 4 spectra/sec, m/z 100-1600; MS/MS Modus: 5 spectra/sec, m/z 50-500

Drying gas: 8 L/min, 320°C, Sheath gas: 11 L/min, 3 80°C; Kollisionsenergie: 20 V

2.6 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

In den Vegetationsperioden 2010 und 2011 wurden verschiedene Parzellen in Riesling-Anlagen beprobt. Die Versuchsvarianten in der Riesling-Anlage umfassten Behandlungen, die einen direkten Einfluss auf die Wachstumsbedingungen der Pilze haben können (im Anhang I Tabellen 10 und 11). Nach einer Versuchslese wurden repräsentative Mostproben für analytische Messungen und mikrobiologische Aufarbeitungen eingefroren. Der Befall durch *Botrytis*, *Penicillium* und Essigfäule in den beprobten Versuchspartzen wurde ein Tag vor der Lese bonitiert (im Anhang I Tabelle 12). Im Jahr 2012 wurden zudem 18 Traubenproben von verschiedenen Standorten in der Pfalz gesammelt und für die Analysen der Stoffwechselprodukte aufbereitet. Die untersuchten Trauben waren von *P. expansum* und verschiedenen anderen Fäulniserregern (z. B. *Botrytis*, Essigfäule) besiedelt.

3 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Artenbestimmung

In den Jahren 2010 bis 2012 wurden 125 *Penicillium*-Isolate von Trauben mit typischen Krankheitssymptomen gewonnen. 120 der gesammelten Isolate wurden als *P. expansum* identifiziert (Tabelle 2). Mit diesen Ergebnissen konnte erneut bestätigt werden, dass *P. expansum* der Hauptverursacher der Grünfäule an Trauben in deutschen Weinanbaugebieten ist. Die Bestimmung der anderen *Penicillium*-Arten konnte mittels der erarbeiteten Restriktions-Analyse mit *HpyF3I*, *BspT1* und *Bsml* (Kapitel 2.2.3) durchgeführt werden. Zur Bestimmung der *Penicillium*-Arten wurden molekularbiologische Verfahren teilweise neu entwickelt.

Tabelle 2: Artenspektrum an Trauben mit typischen Krankheits-Symptomen (2010 bis 2012).

Jahr	2010	2011	2012	gesamt
Isolate gesamt	48	15	62	125
<i>P. expansum</i>	43	15	57	120
<i>P. purpurogenum</i>	4			4
<i>P. spinulosum</i>	1			1

3.1.1 Spezifischer Nachweis von *P. expansum*

Der spezifische Nachweis der Art *P. expansum* erfolgte mittels PCR mit den Primern PEF (5´ATC GGC TGC GGA TTG AAA G 3´) und PER (5´AGT CAC GGG TTT GGA GGG A 3´) nach Marek et al. (2003).

Der Nachweis des 404 bp großen PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Ein Beispiel aus dem Screening der Isolate von 2010 ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3: Ausschnitt aus dem PCR-Screening aller Isolate mit den Primern PEF und PER. 1: 100 bp Leiter, 2-6, 8-11, 13-20 positives Produkt (*P. expansum*), 7 und 12 kein PCR-Produkt (andere *Penicillium*-Arten).

3.1.2 Nachweis anderer *Penicillium*-Arten

3.1.2.1 PCR des Cytochromoxidase-Gens (*cox1*) mit anschließender Restriktion

Zunächst wurde die *cox1*-Sequenz mit den Primern PenF1 (5´GAC AAG AAA GGT GAT TTT TAT CTT C 3´) und AspR1 (5´GGT AAT GAT AAT AAT AAT ACA GCT G 3´) nach Seifert et al. (2007) amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden mit den puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für 25 µl-Ansätze wurden je 25 pmol Primer und 5 µl DNA eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden nach einem Protokoll von Chen et al. (2009) mit dem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler® gradient) wie folgt ausgeführt:

3 Minuten 95°C

1 Minute 95°C, 45 Sekunden 56°C, 90 Sekunden 72°C (40 Zyklen)

10 Minuten 72°C

Restriktion der *cox1*-Sequenz mit *HpyF3I* zur Unterscheidung von *P. crustosum* und *P. commune*:

Durch die Restriktion der *cox1* Sequenz mit dem Enzym *HpyF3I* wurde die Sequenz von *P. crustosum* an zwei Stellen geschnitten und die Sequenz von *P. commune* nur einfach geschnitten (Abbildung 4).

Intensive Prüfungen der Methode im Jahr 2012 zeigten, dass das Verfahren zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Referenzstämme konnten erfolgreich den Arten zugeordnet werden. Diese neu entwickelte Methode konnte bereits veröffentlicht werden [(Walter et al. 2012 (5, 6)].

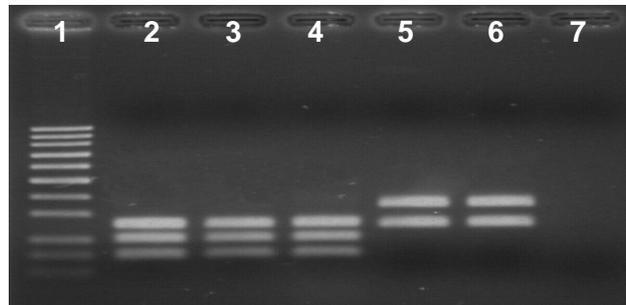


Abbildung 4: Restriktion der *cox1*-Sequenz mit dem Enzym *HpyF3I*. 1: 100 bp DNA Marker (Roth); 2: *P. crustosum*, CBS 548.77; 3: *P. crustosum*, CBS 747.74; 4: *P. crustosum*, Isolat 9864/2; 5: *P. commune*, CBS 184.89; 6: *P. commune*, CBS 216.30; 7: Kontrolle.

Restriktion der *cox1*-Sequenz mit *HpyF3I*, *BspT1* und *BsmI* zur Unterscheidung verschiedener *Penicillium*-Arten:

Für eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung der *Penicillium*-Arten, die seit 2003 an Trauben aus deutschen Weinanbaugebieten nachgewiesen werden konnten (*P. crustosum*, *P. commune*, *P. minioluteum*, *P. purpurogenum*, *P. spinulosum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. solitum*), wurde das Restriktionsverfahren der *cox1*-Gensequenz weiterentwickelt. Die mittels PCR amplifizierte *cox1*-Sequenz (Primer PenF1 und AspR1) der verschiedenen *Penicillium*-Arten wurde mit den Enzymen *HpyF3I*, *BspT1* und *BsmI* die *cox1* Sequenz spezifisch geschnitten (Abbildung 5). Lediglich *P. minioluteum* konnte nicht von *P. commune* unterschieden werden.

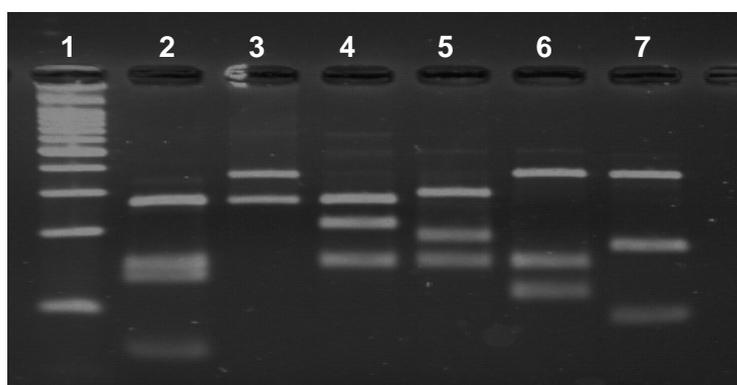


Abbildung 5: Restriktion der *cox1*-Sequenz verschiedener *Penicillium*-Arten mit *HpyF3I*, *BspT1* und *BsmI*. 1: DNA Leiter, 2: *P. crustosum* DSM 313.48, 3: *P. commune* DSM 216.30, 4: *P. solitum* CBS 147.84, 5: *P. spinulosum* DSM 62870, *P. brevicompactum* Isol. 9561, 7: *P. chrysogenum* Isol. 294. Agarose-Gelelektrophorese mit der hochauflösenden Agarose 1000 (2,5%).

3.2 Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum*

3.2.1 *In vitro*-Versuche mit künstlichen Nährlösungen

Bereits im Versuchsjahr 2011 wurde geprüft, in wieweit verschiedene *P. expansum*-Isolate in der Lage waren, in unterschiedlich zusammengesetzten Nährlösungen Geosmin, Patulin und Citrinin zu bilden. Die Versuche wurden im Versuchsjahr 2012 fortgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse aus mehreren Versuchsansätzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die *in vitro*-Untersuchungen der vergangenen zwei Jahre zeigten, dass innerhalb identisch durchgeführter Versuchsansätze starke Schwankungen in der Bildung der geprüften Metabolite auftreten konnten. In einem Versuchsansatz, in dem *P. expansum* DSM 62841 in 10-facher Wiederholung in 1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat angezogen wurde, wurden Geosmin-Werte zwischen 0 und 0,5 µg/l gemessen. Zwischen zwei Wiederholungen in 2% Saccharose mit 1 % Hefeextrakt reichten die Abweichungen sogar von 0 bis 5,59 µg/l. Auch unter standardisierten Bedingungen traten Schwankungen bei der Metabolitenbildung auf, sodass die erzielten Ergebnisse nur zum Teil reproduziert werden konnten und sich der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Bildung der Metabolite nicht zuverlässig bestimmen lässt. Auch Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten konnten aufgrund der großen Schwankungen bei der Metaboliten-Bildung statistisch nicht belegt werden.

Wiederholungsversuche zur Bestätigung von Versuchsergebnissen hatten häufig abweichende Ergebnisse zur Folge. Von dieser Problematik wird auch aus anderen Arbeitsgruppen berichtet, die sich mit dem Metabolismus der Pilze beschäftigen (mündlicher Austausch mit IFV Frankreich, Lippmann Institut Luxemburg und Max Rubner-Institut, MRI Karlsruhe).

Tendenzen bezüglich der Geosmin-Produktion konnten dennoch aus den Versuchsergebnissen abgelesen werden. In vollwertigen und komplex zusammengesetzten Nährlösungen war nach Inokulation mit dem *P. expansum*-Stamm DSM 62841 in den meisten Versuchsansätzen Geosmin nachzuweisen. Dazu gehörten Biomalz und Nährlösungen, denen Hefeextrakt zugesetzt wurde. Je nährstoffärmer die Zusammensetzung der angebotenen Nährlösung war, desto seltener konnte Geosmin nachgewiesen werden. Die zwei *P. expansum*-Stämme (DSM 1282 und DSM 1994) waren zwar in der Lage Geosmin zu bilden, dies konnte jedoch in nur wenigen Versuchsansätzen nachgewiesen werden. Die Bildung von Geosmin in den Nährlösungen hing vom Myzelwachstum und der Sporulation der Pilze ab. Ohne gute Wachstumsbedingungen, die zu starkem Myzelwachstum und Sporulation führten, konnte *in vitro* kein Geosmin nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchsansätzen wurde geprüft, wie sich verschiedene Kohlenstoffquellen auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* auswirken. Die Untersuchungen wurden mit dem *P. expansum*-Stamm (DSM 62841) durchgeführt.

Die Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Saccharose, Galactose, Mannit(ol), Glycerin und Cellobiose wurden jeweils mit Hefeextrakt versetzt. Die Ergebnisse der analytischen Messungen zeigten, dass Saccharose und Glucose als C-Quellen die höchsten Geosmin-Bildungsraten zur Folge hatten. Glycerin und Cellobiose als Kohlenstoffquelle führten nicht zur Bildung von Geosmin durch *P. expansum* (DSM 62841). Galactose und Mannitol ergaben keine einheitlichen Ergebnisse innerhalb der zwei angesetzten Wiederholungen.

Tabelle 3: Nachweis von Geosmin [$\mu\text{g/l}$] in verschiedenen Nährlösungen (Inkubation bei 21°C für 14 Tage).

Zusammensetzung Nährmedium	WDH	<i>P. expansum</i> -Stamm		
		DSM	DSM	DSM
dest. Wasser	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
2 % Biomalz	a	n.n.	n.n.	1,80
	b	n.n.	n.n.	2,80
1 % Biomalz	a	n.n.	n.n.	0,04
	b	n.n.	n.n.	0,02
2 % Glucose, 2 % Hefeextrakt	a	n.n.	n.n.	0,70
	b	n.n.	n.n.	0,93
1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	c	n.n.	n.n.	0,52
	d	n.n.	0,93	n.n.
1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	e	n.n.	n.n.	n.n.
	f	n.n.	n.n.	n.n.
1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	g	0,03	n.n.	0,02
	h	0,01	n.n.	0,03
1 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	i	n.n.	3,03	n.n.
	j	n.n.	5,10	n.n.
2 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat, 2 % Hefeextrakt	a	n.n.	n.n.	2,41
	b	n.n.	n.n.	1,09
2 % Glucose, 0,1 % L-Leucin, 0,1 % Na-Pyruvat	a	n.n.	-	n.n.
	b	n.n.	-	n.n.
1 % Biomalz, 1 % Fructose	a	n.n.	-	n.n.
	b	n.n.	-	n.n.
1 % Biomalz, 1 % Saccharose	a	n.n.	-	0,02
	b	n.n.	-	0,07
2 % Biomalz	a	n.n.	n.n.	0,27
	b	n.n.	n.n.	0,18
2 % Biomalz	a	0,52	n.n.	0,87
	b	0,52	n.n.	3,13
2 % Saccharose, 1 % Hefeextrakt	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	0,40	n.n.	5,59
2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt	a	-	-	4,14
	b	-	-	6,17
2 % Fructose, 1 % Hefeextrakt	a	-	-	0,41
	b	-	-	0,96
2 % Galactose, 1 % Hefeextrakt	a	-	-	3,25
	b	-	-	n.n.
2 % Mannit(ol), 1 % Hefeextrakt	a	-	-	n.n.
	b	-	-	0,43
2 % Glycerin, 1 % Hefeextrakt	a	-	-	n.n.
	b	-	-	n.n.
2 % Cellobiose, 1 % Hefeextrakt	a	-	-	n.n.
	b	-	-	n.n.

„n.n.“ nicht nachweisbar; „-“ nicht durchgeführt

3.2.2 *In vitro*-Versuche mit Traubensaft

Geosmin

Studien von La Guerche et al. (2007) zeigten, dass *P. expansum* in Traubensaft kein Geosmin bilden kann. Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass die Anwesenheit bestimmter *Botrytis*-Stämme einen Einfluss auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* hat. Dabei stimulieren sogenannte Bot (+)-Stämme die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft. auch für die in deutschen Weinanbaugebieten vorkommenden *B. cinerea*-Stämme wurden solche Interaktionen mit *P. expansum* mit *B. cinerea* in Traubensaft 2011 und 2012 geprüft.

Die Herstellung von Traubensaft für die *in vitro*-Versuche wurde, wie im Zwischenbericht 2011 (Kapitel 2.4.1) beschrieben, durchgeführt. Im Versuchsjahr 2012 wurde neben Riesling-Saft auch Saft von Trauben der Sorte Müller-Thurgau, Weißburgunder, Portugieser und Spätburgunder hergestellt und für Laborversuche mittels Pasteurisieren konserviert.

In den Vegetationsperioden 2009 bis 2011 wurden insgesamt 316 *Botrytis*-Isolate aus Rebflächen gewonnen, die für die Untersuchungen zur Verfügung standen. 150 Isolate stammten von befallenen Trauben, 161 von Blütenresten und 5 aus Mostproben. Von 316 Isolaten wurden 63 Isolate auf ihre Wirkung auf *P. expansum* getestet.

Die Untersuchungen aus dem Jahr 2011 bestätigten, dass alle getesteten *P. expansum*-Stämme in Riesling-Traubensaft kein Geosmin bilden konnten (Zwischenbericht 2011, Anhang IV). Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Inokulation des Traubensaftes mit bestimmten *B. cinerea*-Stämmen und eine anschließende Inokulation mit *P. expansum* eine Geosmin-Bildung durch *P. expansum* zur Folge hatte. Neun von insgesamt 63 geprüften *B. cinerea*-Stämme wurden als Bot(+)-Stämme identifiziert.

In aktuellen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Phytopathologie der Universität Kaiserslautern konnte neben der Art *B. cinerea* auch die Art *B. pseudocinerea* von Trauben isoliert werden (M. Hahn, pers. Mitteilung, 58. Deutsche Pflanzenschutztagung, Braunschweig, Julius-Kühn-Archiv 438, S. 265). Daher sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob es sich bei den untersuchten *Botrytis*-Isolaten tatsächlich um *B. cinerea* oder möglicherweise um *B. pseudocinerea* handelt.

Citrinin und Patulin

In künstlichen Nährlösungen und in Traubensaft konnte keine Bildung von Citrinin durch verschiedene Stämme von *P. expansum* nachgewiesen werden. Untersuchungen von Schneider et al. (2007) belegen, dass Citrinin in wässriger Lösung nicht stabil ist. Anhand der Untersuchungen konnte somit nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob *P. expansum* dieses Toxin nicht bildet, oder ob das Toxin in den Nährlösungen lediglich nicht nachgewiesen werden konnte. Das grundsätzliche Potential zur Bildung des Toxins durch *P. expansum* konnte an Versuchen mit Einzelbeeren belegt werden (Kapitel 2.3.1.3).

Eine Produktion von Patulin durch *P. expansum* DSM 62841 in Nährlösungen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde das Toxin in reinem Traubensaft und in Traubensaft mit unterschiedlichen Zusätzen in hohen Konzentrationen nachgewiesen (Tabellen 4, 5 und 6). Dabei war zu beobachten, dass der Metabolit innerhalb mehrerer Wiederholungen in unterschiedlichen Mengen produziert wurde. In zwei Versuchsserien (Tabellen 4 und 5) wurde die Bildung von Patulin und Citrinin durch *P. expansum* DSM 62841 in Traubensaft geprüft. Hierzu wurde der Traubensaft in einigen Varianten mit verschiedenen *B. cinerea*-Stämmen vorkultiviert (siehe Versuch zur Geosminbildung von *P. expansum* in Traubensaft in diesem Kapitel). Für die Versuchsserien wurde Traubensaft derselben Charge verwendet. Die Pilze wurden unter gleichen Bedingungen angezogen und für die Versuche vorbereitet (Kapitel 2.3.1). Während in der ersten Versuchsserie keine der Probe Patulin aufwies (Tabelle 4), wurden in der zweiten Versuchsserie häufig sehr hohe Patulinwerte festgestellt (Tabelle 5). Der Unterschied zwischen den Versuchsserien kann nicht auf die unterschiedlichen *Botrytis*-Stämme zurückgeführt werden, da in beiden Versuchsserien die *Botrytis*-Stämme 9206 und 9207 geprüft wurden und auch *P. expansum* in beiden Versuchsserien in purem Traubensaft angesetzt wurde. In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob eine mikrobiologische Aufbereitung der Versuchsansätze Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse liefert. In der zweiten Versuchsserie wurde erneut deutlich, wie stark sich die nachgewiesenen Patulin-Mengen innerhalb der Wiederholungen voneinander unterscheiden können. Beispielsweise wurden in den zwei Versuchsansätzen, in denen der *Botrytis*-Stamm 8855 in dem Traubensaft vorkultiviert wurde, Patulin-Mengen zwischen 2 und 514 µg/l gemessen.

Wurden dem Riesling-Traubensaft unterschiedliche Nährstoffe, wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker und Salze zugesetzt, konnten ebenfalls hohe Patulinwerte gemessen werden (Tabelle 6). Geosmin und Citrinin waren nicht nachweisbar. In der ersten Versuchsserie (Tabelle 4) konnten die zwei *Botrytis*-Stämme 9206 und 9207 als Bot (+)-identifiziert werden. Diese Ergebnisse konnten in der zweiten Versuchsserie zumindest in einer Wiederholung bestätigt werden.

Tabelle 4: Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum* DSM 62841 in Traubensaft nach Vorkultivierung mit verschiedenen *B. cinerea*-Isolaten; 1. Versuchsserie.

<i>B. cinerea</i> -Isolat	Wiederholung	Geosmin [$\mu\text{g} / \text{l}$]	Patulin [$\mu\text{g} / \text{l}$]	Citrinin [$\mu\text{g} / \text{l}$]
Traubensaft ohne Inokulationen	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
Dest. Wasser	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9452	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9458/8/1	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9492	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9523	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9537	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9206	a	0,69	n.n.	n.n.
	b	0,83	n.n.	n.n.
9207	a	0,06	n.n.	n.n.
	b	0,57	n.n.	n.n.
9209	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9211	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
9213	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.

n.n nicht nachweisbar

Tabelle 5: Bildung von Geosmin, Patulin und Citrinin durch *P. expansum* DSM 62841 in Traubensaft (Vorkultivierung mit verschiedenen *B. cinerea*-Isolaten); 2. Versuchsserie.

<i>B. cinerea</i> -Isolat	Wiederholung	Geosmin [$\mu\text{g / l}$]	Patulin [$\mu\text{g / l}$]	Citrinin [$\mu\text{g / l}$]
Traubensaft ohne Inokulationen	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
Dest. Wasser	a	n.n.	28,81	n.n.
	b	n.n.	19,57	n.n.
9206	a	n.n.	67,87	n.n.
	b	0,52	55,37	n.n.
9207	a	n.n.	172,96	n.n.
	b	0,96	46,43	n.n.
9204	a	n.n.	96,60	n.n.
	b	n.n.	0,18	n.n.
9216	a	n.n.	77,31	n.n.
	b	8,493	64,03	n.n.
9219	a	5,225	412,62	n.n.
	b	1,126	10,23	n.n.
9221	a	n.n.	311,19	n.n.
	b	n.n.	5,05	n.n.
8847	a	n.n.	50,08	n.n.
	b	0,662	457,46	n.n.
8849	a	1,252	457,46	n.n.
	b	n.n.	43,61	n.n.
8851	a	n.n.	564,51	n.n.
	b	n.n.	315,42	n.n.
8853	a	n.n.	11,90	n.n.
	b	0,598	82,00	n.n.
8855	a	n.n.	514,25	n.n.
	b	1,26	2,30	n.n.

n.n nicht nachweisbar

Tabelle 6: Metabolitenbildung durch *P. expansum* DSM 62841 in Traubensaft mit unterschiedlichen Zusätzen.

Zusammensetzung Nährlösung	WDH	Geosmin [$\mu\text{g/l}$]	Patulin [$\mu\text{g/l}$]	Cirtinin [$\mu\text{g/l}$]
Traubensaft	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
Traubensaft mit 2 % Saccharose, 1 % Hefeextrakt	a	n.n.	3,12	n.n.
	b	n.n.	0,53	n.n.
Traubensaft mit Zuckern und Salzen ² , Phosphatpuffer ³	a	n.n.	n.n.	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
Traubensaft mit Aminosäuren ¹ , Zuckern und Salzen ²	a	n.n.	4,43	n.n.
	b	n.n.	n.n.	n.n.
Traubensaft mit Zuckern und Salzen ² , Phosphatpuffer ³	b	n.n.	14,50	n.n.
	b	n.n.	9,37	n.n.
Traubensaft mit Aminosäuren ¹	a	n.n.	389,68	n.n.
	b	n.n.	52,42	n.n.

n.n nicht nachweisbar; WDH Wiederholung

¹ Aminosäuren: Thiamin-Hydrochlorid, 0,01%, L-Asparaginsäure 0,1%, Serin 0,1%, L-Glutaminsäure 0,3%, Glycin 0,1%, Alanin 0,1%, Valin 0,1%, Isoleucin 0,1%, L-Leucin 0,1%, Lysin 0,1%, Guanin 0,013 %, Adenin 0,01%

² Zucker und Salze: Saccharose 2%, Natriumpyruvat 0,1%, Ammoniumsulfat 0,1%, Kaliumchlorid 0,01%, Kalziumkarbonat 0,1%, Magnesiumsulfat 0,1 %

³ Puffer: Kaliumhydrogenphosphat 0,15 %, Dikaliumhydrogenphosphat 0,05 %,

⁴ Spurenelemente: Eisensulfat 0,001 %, Kupfersulfat 0,001%, Zinksulfat 0,001%

3.2.3 Bildung von Geosmin, Citrinin und Patulin an Einzelbeeren

Mit Versuchen an den Einzelbeeren sollte die Bildung wichtiger Stoffwechselprodukte von *P. expansum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen im Labor *in vivo* geprüft werden. Im Jahr 2011 wurden bereits Versuchsansätze mit Beeren der Sorte Riesling, Müller-Thurgau, Weißburgunder und Portugieser angesetzt. Die detaillierte Versuchsdurchführung wurde im Zwischenbericht 2011, Kapitel 2.5, dargestellt und sind zusätzlich in Anhang II aufgeführt. In den Versuchsvarianten wurden damit wichtige Wachstumsparameter geprüft, die im Weinberg auf die Pilze einwirken können. Insbesondere auch die Konkurrenz mit Bot(+) -oder Bot(-) -Stämmen wurde in den Versuchsvarianten geprüft.

Trotz des starken Befalls an den Beeren konnte in keinem der Versuchsansätze Geosmin nachgewiesen werden. Demnach führte weder die Anwesenheit verschiedener *Botrytis*-Stämme, noch Stress durch Pflanzenschutzmittel oder einer der geprüften Wachstumsfaktoren zu einer Bildung des Metabolits an den Beeren im Labor.

Mit *P. expansum* infizierte Beeren zeigten im Jahr 2011 trotz eines starken Befalls kaum Kontaminationen mit Citrinin. Lediglich in Beeren der Sorte Müller-Thurgau konnte Citrinin analysiert werden. Daher wurde im Jahr 2012 in Wiederholungsversuchen getestet, ob eine Sortenabhängigkeit hinsichtlich der Bildung des Metaboliten Citrinin besteht. Im Jahr 2012 konnte Citrinin in keinen Proben nachgewiesen werden, somit bestehen offensichtlich keine Sortenunterschiede.

Eine Produktion von Patulin konnte in fast allen Versuchsansätzen an den Beeren beobachtet werden. Die nachgewiesenen Patulin-Werte lagen zwischen 0,7 und 8000 µg/l. Die Bildung des Toxins konnte bei Temperaturen zwischen 10°C und 25°C nachgewiesen werden. Patulin wurde von dem Pilz sowohl bei einer Inkubation bei Dunkelheit, als auch bei Dauerlicht gebildet. Die Bildung war zudem unabhängig von der Rebsorte. An Beeren, die mit *P. expansum* und verschiedenen *Botrytis*-Stämmen besiedelt waren, konnten ebenfalls teilweise hohe Patulin-Werte nachgewiesen werden. In Wiederholungsversuchen in 2012 wurde das hohe Bildungspotential von Patulin an den Einzelbeeren bestätigt.

3.3.1 Bildung von Ochratoxin A durch *P. crustosum* und *P. purpurogenum*

Sowohl Eigenisolate von *P. crustosum* und *P. purpurogenum*, als auch Referenzstämme dieser beiden Arten bildeten in Traubensaft der Sorte Riesling vergleichsweise große Mengen Ochratoxin A. In Traubensaft, der mit *P. purpurogenum* (Isolat 9503) beimpft wurde, konnte bereits eine Woche nach der Inokulation bis zu 24,4 µg/l des Toxins nachgewiesen werden. Wie bereits bei der Bildung von Geosmin, Citrinin und Patulin beobachtet wurde, waren auch in den Untersuchungen zur Bildung von Ochratoxin A Konzentrationsunterschiede innerhalb der Wiederholungen aufgetreten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Bildung von Ochratoxin A durch *P. crustosum* und *P. purpurogenum* in Traubensaft (Riesling).

Isolat	Wiederholung	Ochratoxin A [µg/l]
dest. Wasser	a	n.n.
	b	n.n.
	c	n.n.
	d	n.n.
<i>P. crustosum</i> , CBS 327.48	a	n.n.
	b	n.n.
	c	0,20
	d	0,37
<i>P. crustosum</i> , Isolat 876	a	9,51
	b	13,29
	c	22,64
	d	13,48
<i>P. purpurogenum</i> , Isolat 9262	a	14,39
	b	13,87
	c	15,90
	d	18,12
<i>P. purpurogenum</i> , Isolat 9503	a	11,04
	b	24,40
	c	16,47
	d	24,04

An Einzelbeeren der Sorten Riesling, Portugieser und Weißburgunder, die mit *P. crustosum* oder *P. purpurogenum* infiziert waren, konnte in einigen Fällen Ochratoxin A nachgewiesen werden (Anhang 3 im Zwischenbericht vom 18.12.2012 bzw. Anhang II dieses Berichtes). *P. purpurogenum* bildete dabei häufiger und in größeren Mengen das Toxin. Generell waren die Beeren wesentlich schwächer durch *P. purpurogenum* und *P. crustosum* befallen, als die durch *P. expansum*. Wie bei den

anderen Metaboliten konnte die Bildung von Ochratoxin A keinem bestimmten Wachstumsfaktor zugeordnet werden.

3.4 Untersuchungen zur biologischen Funktion der Stoffwechselprodukte

Untersuchungen an Einzelbeeren

In Untersuchungen zur biologischen Funktion von Ochratoxin A wurden Einzelbeeren verschiedener Rebsorten im Labor mit Ochratoxin A-bildenden *P. crustosum*-Isolaten infiziert. Aus den Versuchen waren keine Rückschlüsse auf die biologische Funktion, wie beispielsweise eine gesteigerte Pathogenität durch die Bildung großer Metabolitmengen möglich.

In vitro Tests in Mikrotiterplatten

In weiteren Versuchsserien wurde die Wirkung der Toxine Patulin, Citrinin und Ochratoxin A als Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf unterschiedliche Mikroorganismen, die von reifen Beeren isoliert wurden, getestet.

Der Saft von Rieslingbeeren wurde auf Biomalzagar ausplattiert und bei 21°C bzw. 25°C inkubiert. Kolonien verschiedener Mikroorganismen wurden isoliert. Zusätzlich wurden zwei *B. cinerea*-Stämme, zwei *P. expansum*- und zwei *P. purpurogenum*-Stämme in die Versuche einbezogen.

Die getesteten Mikroorganismen zeigten bis zur maximal getesteten Konzentration keinen Einfluss auf die Entwicklung oder Vermehrungsrate der Organismen (Anhang 4 im Zwischenbericht vom 18.12.2012, Anhang V dieses Berichtes). Die Schwankungen der Messwerte innerhalb der Wiederholungen waren sehr groß. Zwar zeigte in einem Versuchsansatz eine der wilden Hefen (MO5) unter dem Einfluss von Ochratoxin A (maximale Konzentration von 500 ng/µl) eine reduzierte Wachstumsrate im Vergleich zur Methanol- und Wasserkontrolle, jedoch konnten diese Ergebnisse in einem Folgeversuch nicht bestätigt werden.

3.5 Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most

In den Untersuchungen konnte ein Molekül mit der Masse 288.168 bei den mit *P. expansum* infizierten Beeren identifiziert werden, die bei gesunden Beeren nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildungen 6 und 7). Bei weiterer Ionisierung mit

Stickstoff kommt es zu einer Fragmentierung des Moleküls. Es entsteht ein Tochterfragment mit der Masse 148.074 (Abbildung 8).

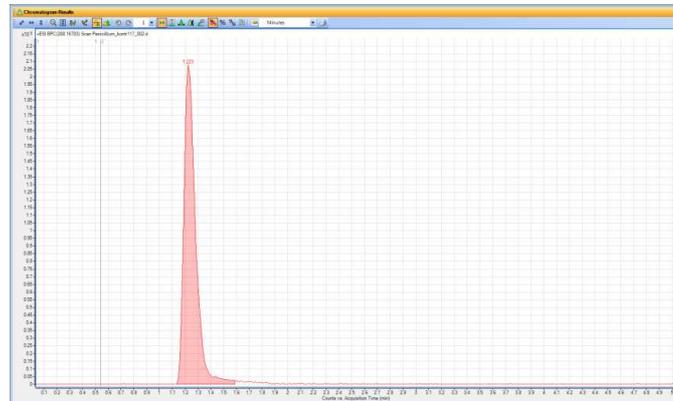


Abbildung 6: Chromatogramm: Proben von *P. expansum* infizierten Beeren zeigen ein Signal mit der Retentionszeit 1,22 min.

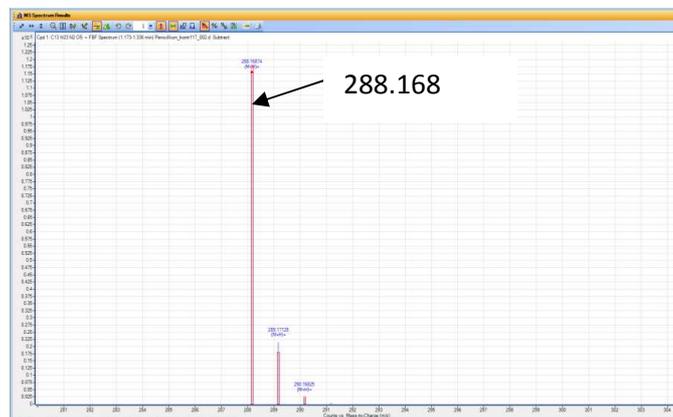


Abbildung 7: Massenspektrum. Das Ion mit der Masse 288.168 wurde bei *P. expansum*-infizierten Beeren identifiziert.

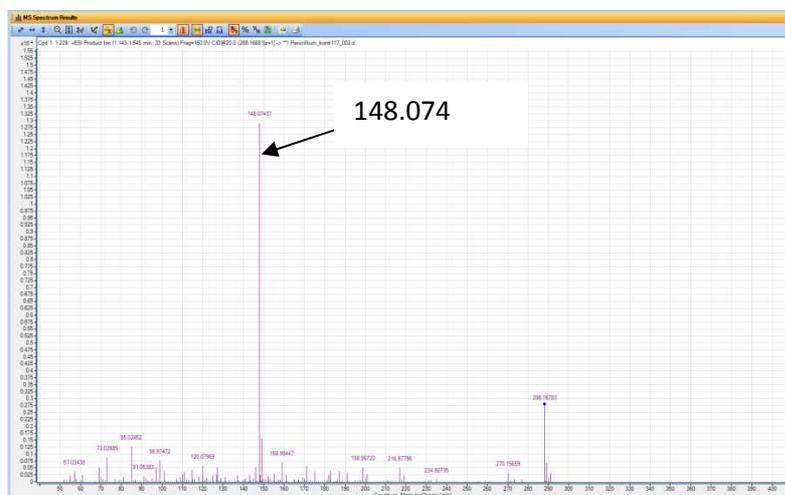


Abbildung 8: Fragmentspektrum: Das Fragmention mit der Masse 148.074 resultiert aus dem Hauption (288.168 m/z) nach Ionisierung mit Stickstoff.

Die bisher nachgewiesenen Bildungseigenschaften des Metaboliten werden im Folgenden beschrieben (siehe auch Tabelle 8).

Prüfung auf Spezifität für *P. expansum*

Der Metabolit war bei den geprüften Organismen spezifisch für *P. expansum*. Bei *P. digitatum*, *P. purpurogenum*, *P. crustosum*, *P. minioluteum*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum* und *P. solitum* konnte die Substanz nicht nachgewiesen werden. Auch Beeren, die mit den Erregern *Botrytis cinerea*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichothecium roseum*, *Eryphise necator* oder verschiedenen *Aspergillus*-Arten infiziert waren, wiesen diese Substanz nicht auf. Die geprüften Organismen stellen die wichtigsten im Weinbau vorkommenden Pilze an den Beeren dar. Alle Proben ohne sichtbaren *P. expansum*-Befall wiesen den Metaboliten nicht auf. Untersuchungen zur Bestimmung der Molekülstruktur sind zwingend erforderlich, um Recherchen durchführen zu können, ob ähnliche Verbindungen existieren und ob Berichte über deren Bedeutung vorliegen.

Prüfung auf Bildung durch *P. expansum* unter verschiedenen Bedingungen

Die Substanz konnte in allen Proben nachgewiesen werden, die einen sichtbaren Befall mit *P. expansum* aufwiesen. Alle bisher geprüften *P. expansum*-Isolate bildeten diesen Metaboliten zuverlässig.

Prüfung äußerer Einflussfaktoren auf die Bildung der Markersubstanz

In bisherigen Versuchen war die Bildung des Metaboliten unabhängig von äußeren Einflussfaktoren wie Rebsorte, Standort, Klima, Bewirtschaftungsweise oder Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln, wie beispielsweise Botrytiziden. Auch die Art der Wirtspflanze hatte keinen Einfluss auf die Bildung des Metaboliten. Auch in *P. expansum*-infizierten Birnen, Tomaten und Äpfeln wurde der Metabolit eindeutig nachgewiesen.

Prüfung auf Korrelation zwischen sichtbarem Befall und Markersubstanz

Offensichtlich besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem sichtbaren Befall an der Traube und der Menge an nachgewiesener Substanz. Unter den verwendeten Analysebedingungen der LC-MS/MS wird die Nachweisgrenze für *P. expansum* bei rund 1 % Befallsstärke bei Trauben vermutet. Für genauere

Ergebnisse muss die Reinsubstanz vorliegen, welche erst nach Aufklärung der Molekülstruktur und daran angepasster Reinigungsschritte verfügbar sein wird.

Prüfung auf Stabilität des Metaboliten

Von der Lese am Rebstock bis zur Qualitätsbeurteilung des Mostes wirken offensichtlich keine Faktoren negativ auf die Substanz ein. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Substanz von der Lese bis zur Pressung und auch während der Fermentation stabil geblieben ist. Der Metabolit konnte sowohl in Mosten aus mit *P. expansum* infizierten Trauben, als auch in den resultierenden Jungweinen nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Nachweis des Ions mit der Masse 288.16 m/z und dessen Fragmentions mit der Masse 148.07 m/z mittels LC-MS/MS.

sample	number of samples	number of isolates	grape varieties/ specification	precursor ion 288.16 m/z	fragment ion 148.07 m/z
<i>P. expansum</i> infected samples (positive controls)					
inoculated grape berries	98	12	five grape varieties	+	+
inoculated grape juice	23	1	Riesling	+	+
most and resulting young wine from infected grapes	9	1	Riesling	+	+
whole grape bunches from the field with <i>Botrytis cinerea</i> coinfections	29	29	Riesling	+	+
grape bunches with disease severity less 1 %	2	2	Riesling	+	-
grape berries from the field	3	3	three grape varieties	+	+
apple from the field, partly coinfections with <i>Botrytis cinerea</i>	1	1	wild apple	+	+
inoculated tomatoe	4	1	tomatoe	+	+
inoculated apple	2	1	apple	+	+
inoculated pear	2	1	pear	+	+
conidia and mycelium, culture grown on malt agar (2%)	2	1	artificial medium	+	+
	176				
healthy plant material (negative controls)					
grape berries, grape bunches, grape juice, most, wine, grape leaf, mandarin, pear, apple, tomatoe	170		13 grape varieties	-	-
different pathogens on plant material (negative controls)					
<i>Botrytis cinerea</i> , inoculated grape berries	11	11	Müller-Thurgau/ Pinot noir	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> , whole grape bunches from the field	12	12	Riesling	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> , grape berries (field)	34	34	13 grape varieties	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> , most of infected grapes and resulting young wine	2	1	Riesling	-	-
<i>Erythrina necator</i> , inoculated grape berries	48	48	four grape varieties	-	-
<i>Cladosporium</i> sp., inoculated grape berries	1	1	unknown variety, red	-	-
sour rot, berries from the field	2	2	Muskat/ Gr. Portugieser	-	-
<i>P. nihoiense</i> , inoculated grape berries	9	2	Riesling/ Regent	-	-
<i>P. solitum</i> , inoculated grape berries	6	1	Riesling/ Regent	-	-
<i>P. crustosum</i> , inoculated grape berries	13	3	Riesling/ Regent	-	-
<i>P. griseovulum</i> , inoculated grape berries	6	1	Riesling	-	-
<i>P. purpurogenum</i> , inoculated grape berries	3	2	Riesling / Regent	-	-
<i>P. spinulosum</i> , inoculated grape berries	3	1	Riesling	-	-
<i>P. chrysogenum</i> , inoculated grape berries	4	2	Regent	-	-
<i>Cladosporium</i> sp., inoculated grape berries	12	2	Riesling / Regent	-	-
<i>Rhizopus</i> sp., inoculated grape berries	6	1	Riesling / Regent	-	-
<i>Trichothecium roseum</i> , inoculated grape berries	6	1	Riesling / Regent	-	-
<i>Alternaria</i> sp., inoculated grape berries	6	1	Riesling / Regent	-	-
<i>Aspergillus tubingensis</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. japonicus</i> , inoculated single berries	30	1	Riesling / Regent	-	-
<i>Plasmopara viticola</i> on grape leaf	2	1	Müller-Thurgau	-	-
<i>P. digitatum</i> , natural infected mandarin	4	1	mandarin	-	-
	220				

3.6 Freilanduntersuchungen und Analyse von Mosten und Weinen

In den Jahren 2010 bis 2011 wurden verschiedene Parzellen in einer Riesling-Anlage beprobt. Die Versuchsvarianten umfassten Behandlungen, die einen direkten Einfluss auf die Wachstumsbedingungen der Pilze haben können (Anhang I, Tabellen 10 und 11).

Zusätzlich wurden im Jahr 2012 insgesamt 18 Traubenproben aus der gesamten Region mit verschiedenen Fäulniserregern gesammelt, die auf Kontaminationen mit den Metaboliten geprüft wurden. Die Befallsstärke an den Trauben lag zwischen 1% und 5 %. Alle Proben zeigten Kontaminationen mit Patulin (Tabelle 9). Die gemessenen Konzentrationen hingen dabei nicht von der Befallsstärke ab. Die übrigen Metabolite wurden nicht nachgewiesen.

In den Traubenproben aus den Jahren 2010 und 2011 wurden nur Spuren verschiedener Metabolite bzw. Mycotoxine in sehr wenigen Trauben gefunden (im Zwischenbericht 2012 dargestellt, Anhang VI dieses Berichtes). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem visuellen Fäulnisbefall und der Menge an Metaboliten festgestellt werden. Spuren von Ochratoxin A konnten sowohl in offensichtlich gesundem Traubenmaterial als auch in Trauben mit sichtbarem *Penicillium*-Befall festgestellt werden. Keine der Proben, die *Penicillium*-Befall aufwies, zeigte Kontaminationen mit Geosmin. Patulin und Citrinin konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der untersuchten Metabolite und einer bestimmten Behandlung der Trauben im Freiland wurde bisher nicht festgestellt.

Tabelle 9: Analyse von Geosmin, Patulin, Citrinin und Ochratoxin A [$\mu\text{g/l}$] an mit *P. expansum* befallenen Trauben.

Probe	Geosmin	Patulin	Citrinin	Ochratoxin A
1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	n.n.	200,356	n.n.	n.n.
4	n.n.	6,365	n.n.	n.n.
5	n.n.	15,254	n.n.	n.n.
6	n.n.	15,292	n.n.	n.n.
7	n.n.	122,933	n.n.	n.n.
8	n.n.	632,160	n.n.	n.n.
9	n.n.	100,551	n.n.	n.n.
10	n.n.	11,669	n.n.	n.n.
11	n.n.	5,673	n.n.	n.n.
12	n.n.	22,348	n.n.	n.n.
13	n.n.	5,159	n.n.	n.n.
14	n.n.	3,340	n.n.	n.n.
15	n.n.	11,480	n.n.	n.n.
16	n.n.	8,382	n.n.	n.n.
17	n.n.	7,451	n.n.	n.n.
18	n.n.	6,992	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

4 Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse, weiterer Forschungsbedarf

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde ein Monitoring zu den in Deutschen Weinbaugebieten vorhandenen *Penicillium*-Arten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jährlich zum Ende der Vegetationsperiode im Freiland von infizierten Trauben Einzelsporlinien angezogen. Anschließend erfolgte eine Artenbestimmung. *P. expansum* stellte in allen Jahren die häufigste *Penicillium*-Art dar, jedoch konnten weitere bisher für Deutsche Anbaugebiete nicht beschriebene Arten identifiziert werden. Die genaue Analyse des Artenspektrums und Häufigkeit verschiedener Arten erscheint vor dem Hintergrund der sich verändernden klimatischen Bedingungen von großer Bedeutung und sollte weiter durchgeführt werden. Zum einen ist zu erwarten, dass sich die Artenzusammensetzung bei sich verändernden Umweltbedingungen ebenfalls verändert, wobei einzelne Arten offensichtlich bestimmt ökologische Nischen besonders gut besiedeln können (z. B. *P. commune* und *P. crustosum* an Blütenresten), zum anderen konnte der Nachweis geführt werden, dass beispielsweise einzelne Isolate von *P. purpurogenum* zur Bildung von Ochratoxin A befähigt sind. Obwohl *P. expansum* die zurzeit häufigste Art darstellt, ist von einer sich verändernden Häufigkeitsverteilung und einem sich möglicherweise daraus ergebenden veränderten Gefährdungspotential für die Qualität der Trauben auszugehen.

Bisher ist kein Marker für *P. expansum*-Befall an Trauben und Most vorhanden. Ein Ziel des Projektes war daher die Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall an Trauben. Erst gegen Ende der Projektlaufzeit konnte ein Molekül identifiziert werden, welches sehr vielversprechend die Etablierung eines Markers in der Praxis in Aussicht stellt. Erste Recherchen deuten zudem darauf hin, dass die Substanz für *P. expansum* und andere *Penicillium*-Arten bisher noch nicht beschrieben wurde. Weiterführende Arbeiten sind für die genauere Aufklärung der Molekülstruktur und die zielorientierte Umsetzung der Forschungsergebnisse in die Praxis unbedingt notwendig. Da die Reinsubstanz noch nicht zur Verfügung steht, konnten bisher keine genauen quantitativen Analysen durchgeführt werden. Erst nach der Aufklärung der Molekülstruktur kann eine Kalibrierung der Analysegeräte durchgeführt werden.

In Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Substanz in oder an Konidien gebildet wird. Reines Myzel von *P. expansum* enthält die Markersubstanz nicht. Bisher ist ungeklärt, ob die Substanz an den Konidien fest haftet, oder ob das Molekül von den Konidien ins Medium abgegeben wird.

Bisher konnten noch keine Messungen durchgeführt werden, die Einblicke in die Bildungskinetik des Moleküls liefern. Sobald der Metabolit quantitativ erfasst werden kann, sollte untersucht werden, ob die Bildung des Metaboliten direkt mit der Sporulation oder erst zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt. Durch diese Untersuchungen sollte ebenfalls geklärt werden, ob die Bildung des Metaboliten linear oder exponentiell mit dem Befall ansteigt. Solche Erkenntnisse sind insbesondere im Hinblick auf den Zeitpunkt einer eventuell notwendigen Befallsreduktion im Feld von Bedeutung.

Erste Untersuchungen zeigten, dass der Metabolit bis über die Fermentation hinaus stabil blieb. Er konnte sowohl in Mosten aus *P. expansum* infizierten Trauben, als auch in den resultierenden Jungweinen nachgewiesen werden.

Bisher ist nicht bekannt, wie sich die Substanz in verschiedenen Pflanzengeweben verhält. Die Verteilung des Moleküls in verschiedenen Gewebeteilen von Wirtspflanzen wird in weiteren Versuchen geprüft. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der Ertragregulierung und Befallsreduktion im Feld von Bedeutung. Es sollte geprüft werden, ob die Markersubstanz nur an den befallenen Bereichen der Traube, oder auch in den benachbarten, gesunden Geweben nachzuweisen ist.

Insbesondere der Zusammenhang zwischen der *Penicillium*-Befallsstärke im Feld und nachweisbarer Substanz sollte weiter untersucht werden. Um eindeutige Zusammenhänge zwischen dem Befall im Feld und dem resultierenden Analyseergebnis nachzuweisen, sollten Trauben-, Most- und Weinproben aus verschiedenen Regionen analysiert werden. Um auch weiterhin ein sicheres Produkt für den Verbraucher gewährleisten zu können, sollten zudem oenologische Methoden geprüft werden, ob und wie der analytische Marker aus Mosten oder Weinen entfernt werden kann (z.B. Bentonit, Gelatine).

Inwieweit die Markersubstanz mittels FT-IR-Analytik (Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer) identifiziert werden kann, lässt sich bisher nicht abschließend beantworten. Erst nach Vorliegen der Molekülstruktur und der Reinsubstanz können

die erforderlichen quantitativen und qualitativen Analysen durchgeführt werden. Ein möglicher Nachweis hängt insbesondere von der Chemie des Moleküls und davon ab, in welchen Mengen *P. expansum* den Metaboliten an Trauben bildet. Nach der Etablierung des Markers in einem Messsystem muss definiert werden, welche *Penicillium*-Befallsstärke an Trauben toleriert werden kann (Schadensschwelle).

Bisherige Strategien zur Etablierung des Markers beruhen darauf, dass *P. expansum* der Hauptverursacher der Grünfäule an Trauben ist. Bisher wurden nur wenige andere Arten an Trauben identifiziert und *P. expansum* war stets zumindest Mitverursacher der Krankheit an einer Traube. Die krankheitsverursachenden *Penicillium*-Arten müssen daher in Stichproben weiter bestimmt und auf ihre Fähigkeit, die Markersubstanz zu bilden, überprüft werden. Die Möglichkeit der Toxinbildung an Trauben durch andere *Penicillium*-Arten sollte weiterhin, insbesondere vor einer vorhergesagten Klimaveränderung und einer damit verbundenen Veränderung der Artzusammensetzung beobachtet werden.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der zu etablierenden analytischen Markersubstanz wären zudem bei Lebensmitteln denkbar, die ebenfalls bevorzugt von *P. expansum* befallen werden, wie beispielweise Apfel, Birne, Tomate, Nüsse oder Quitte.

Bei Lebensmittelkontrollen können nur ausgewählte Stoffwechselprodukte erfasst werden, wie beispielsweise bereits bekannte und beschriebene Mykotoxine, deren Nachweis methodisch nach GLP-Richtlinien erfolgen kann. Diese Analysen sind jedoch zeitaufwändig und erfordern eine moderne Analytik. Außerdem können nicht alle toxikologisch relevanten Metabolite des Pilzes erfasst werden, nach wie vor eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten von *P. expansum* nicht beschrieben sind und somit Kenntnisse über eine möglicherweise vorhandene Toxizität fehlt. Ein analytisch nachweisbares Molekül, welches repräsentativ den Befall durch *P. expansum* widerspiegelt, könnte Lebensmittelkontrollen entscheidend verbessern.

5 Zusammenfassung

P. expansum konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen als Haupterreger der Grünfäule an Trauben in deutschen Weinanbaugebieten erneut bestätigt werden. Im Jahr 2011 wurde erstmals die Art *P. purpurogenum* an Trauben

nachgewiesen. Einige der *P. purpurogenum*-Isolate bildeten *in vitro* und an Einzelbeeren *in vivo* Ochratoxin A.

Geosmin konnte in verschiedenen *in vitro*-Versuchsansätzen und in Freilandproben nachgewiesen werden. An Einzelbeeren, die mit *P. expansum* infiziert waren, konnte dieser Metabolit nicht gefunden werden. Die Toxine Citrinin, Patulin, und Ochratoxin A wurden in flüssigen Nährlösungen, an Einzelbeeren und in Freilandproben nachgewiesen. Wachstumsfaktoren, die die Bildung der Metabolite Geosmin, Citrinin, Patulin und Ochratoxin A durch verschiedene *Penicillium*-Arten beeinflussen, konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Der Metabolitennachweis war unter identischen Versuchsbedingungen nicht in allen Versuchsansätzen reproduzierbar. Die auftretenden Schwankungen der Messwerte innerhalb der Wiederholungen und verschiedenen Versuchsansätzen erlauben daher noch keine Aussagen über die Wachstums-faktoren, die die Bildung der Metabolite beeinflussen.

Die Untersuchungen bestätigten, dass bestimmte *B. cinerea*-Stämme einen Einfluss auf die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft haben. Einige Stämme von *B. cinerea* stimulierten die Bildung von Geosmin durch *P. expansum* in Traubensaft. Das Gefährdungspotenzial hinsichtlich einer negativen Aroma-beeinflussung, welches durch die stimulierenden Bot (+)-Stämme ausgehen kann, sollte weiterhin beobachtet werden.

Gesundheitlich relevante Metabolite in Freilandproben konnten bisher nur sehr selten und in geringen Mengen nachgewiesen werden. Wie in den vergangenen Jahren konnte auch in neuen Befunden kein Zusammenhang zwischen dem visuell sichtbaren *Penicillium*-Befall und dem Auftreten von Geosmin und Ochratoxin A an den Trauben belegt werden. Citrinin konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Trauben mit sichtbarem *Penicillium*-Befall wiesen nicht immer Geosmin oder Ochratoxin A auf. Ebenso häufig konnten an gesundem Traubenmaterial Spuren von Geosmin oder Ochratoxin A nachgewiesen werden. Patulin konnte am häufigsten und in teilweise hohen Konzentrationen an den Trauben nachgewiesen werden. Alle Trauben, an denen Patulin nachgewiesen werden konnte, waren mit *P. expansum* besiedelt. Die Befallsstärke korrelierte nicht mit den Patulin-Werten. Da der Metabolit während der Fermentation weitestgehend abgebaut wird, stellt die Kontamination von Trauben mit Patulin bei der Weinherstellung offensichtlich kein Problem dar. Bei der Herstellung von Traubensäften und anderen Traubenprodukten müssen hohe

Patulin-Werte jedoch als problematisch angesehen werden, da anders als bei der Weinbereitung kein Abbau aufgrund einer fehlenden Fermentation stattfinden kann.

Die Untersuchungen der vergangenen drei Jahre zeigten, dass die Bildung der Metabolite Geosmin, Patulin, Citrinin oder Ochratoxin A durch *Penicillium* sp. von bisher unbekanntem Faktoren abhängt. Im Gegensatz dazu wird der neu entdeckte Metabolit zuverlässig gebildet. Im Hinblick auf die Qualitätssicherung von Mosten stellt die Nutzung eines analytischen Markers für *Penicillium* einen großen Vorteil bei der Qualitätsbeurteilung dar. Die vielversprechenden Ergebnisse aus der LC/MS-MS-Analyse könnten daher die Lösung für dieses zentrale Projektziel sein.

6 Soll-Ist-Vergleich des Vorhabens

Die im Antrag formulierten Projektziele konnten weitestgehend erfolgreich bearbeitet werden.

Die Bestimmung der an Trauben pathogenen *Penicillium*-Arten konnte erfolgreich durchgeführt werden. Außerdem wurden neue molekularbiologische Möglichkeiten zur Bestimmung der vorkommenden Arten erarbeitet.

Die Rolle bestimmter anwesender *Botrytis*-Stämme für die Geosmin-Produktion durch *P. expansum* in Traubensaft konnte auch für die in Deutschen Weinanbaugebieten vorkommenden Pilz-Isolate bestätigt werden. Die Versuche zeigten, dass die Bildungsbedingungen der relevanten Toxine durch die Pilze äußerst komplex sind und weitere Untersuchungen erforderlich sind.

Hinweise zur biologischen Funktion der Metabolite konnten bisher nicht gewonnen werden.

Kontaminationen von Freilandproben mit den untersuchten Metaboliten konnten erfolgreich nachgewiesen werden.

Die Suche nach einem analytischen Marker für *Penicillium*-Befall in Most führte zu vielversprechenden Ergebnissen. In weiteren Arbeiten muss geprüft werden, wie diese Ergebnisse für eine Anwendung in der Praxis genutzt werden können.

7 Literatur

Chen, W., K.A. Seifert, C.A. Levesque (2009): A high density COX1 barcode oligonucleotide array for identification and detection of species of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 114-129.

Frisvad, C., J. Smedsgaard J., T.O. Larsen, R.A. Samson (2004): Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49, 201-241.

Hahn, M. (pers. Mitteilung), Universität Kaiserslautern, Fachbereich Phytopathologie.

La Guerche, S., L. De Senneville, D. Blancard, P. Darriet (2007): Impact of the *Botrytis cinerea* strain and Metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92, 3, 331-341.

Marek, P., T. Annamalai, K. Venkitanarayanan (2003): Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 139-144.

Schneider, C. (2007): Vorkommen und Nachweis von Citrinin in Nahrungsmitteln pflanzlicher herkunft. Dissertation, LMU München.

Twertek, M: (1995): Eintrag und Verhalten von Pflanzenschutzmitteln in Oberflächengewässer nach der Applikation an Weinreben. Dissertation, Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie.

Walter, R. (2008): Untersuchungen zur Grünfäule (*Penicillium spec.*) an Weintrauben. Dissertation, Universität Hohenheim.

Walter, R., B. Altmayer, A. Kortekamp (2011): Die Bildung von Geosmin durch *Penicillium expansum*, dem Erreger der Grünfäule an Trauben. *Deutsches Weinbaujahrbuch* 63, 74-78.

Walter, R., A. Kortekamp (2012): Fäulniserreger an Trauben – Problematik und Bekämpfungsstrategien. Tagungsband zur Tagung „Stage de Formation et de perfectionnement en Oenologie“ am 08.02.2012 in Ostheim (Elsass), S. 15-18.

Walter, R. S. Jausel, J. Köckerling, B. Altmayer, M. Twertek, B. Engel, A. Kortekamp (2012): *Penicillium* an Trauben – Neue Ergebnisse. *Das Deutsche Weinmagazin* 13/2012, S. 9-11.

Walter, R., S. Jausel, J. Köckerling, B. Altmayer, M. Twertek, B. Engel, A. Kortekamp (2012): Fäulniserreger an Trauben verursachen muffigen Wein. *Landwirtschaftliches Wochenblatt* 31/2012, S. 37-39.

Walter, R., B. Altmayer, A. Kortekamp (2012): Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf den Sekundärmetabolismus von *Penicillium*-Arten. *Julius-Kühn-Archiv* 438, 305-306.

Walter, R. B. Altmayer, A. Kortekamp (2012): Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweises zur Identifizierung von *Penicillium*-Arten an der Weinrebe. *Julius-Kühn-Archiv* 438, 369-370.

Walter, R. (2012): Fäulnispilze an Weintrauben – Erregerkomplex, Mykotoxine und Bekämpfungsstrategien. *Journal für Kulturpflanzen* 64, 378-383.

Walter, R.; A. Kortekamp (2012): Further steps towards molecular identification of *Penicillium* species on grapes. Proceedings of the Second International Conference Patholux on the Impact of Plant Pathogens on the Quality of Crops and Wine, 22.-23.10.2012, Mondorf-les-Bains/Luxembourg, S. 83 (Abstract).

Walter, R., B. Altmayer, A. Kortekamp (2013): *Penicillium* on grapes – Metabolism and new molecular methods for species identification. Proceedings of the MycoRed International Conference on Global Mycotoxin Reduction Strategies, p. 214; 27.-31. Mai, Martina Franca (Italien).

Walter, R., A. Kortekamp 2012: Further steps towards molecular identification of *Penicillium* species on grapes. Journal of Plant Pathology (1, Supplement), S1.83.

Walter, R., A. Kortekamp (2013): *Penicillium* on grapes – molecular identification and secondary metabolism. Proceedings of the IOBC-WPRS European meeting of the working group „Integrated protection and production in viticulture“, p. 103; 13.-17. Oktober, Ascona (Schweiz).

8 Anhang I

Tabelle 10: Versuchsvarianten Schlossberg, Riesling 2010.

Variante	Basisaufwand	Durchführung
Kontrolle		
Traubenteilen		77
Entblätterung einseitig		75
Vollständige Entfernung von		69-71
Switch	0,24	77, 81
Teldor	0,4	77, 81
Regalis	1,8	61-65
Versuchspräparat	12	71, 77, 85
Versuchspräparat	12	77, 85
AminoCalP	6	71, 77, 85
AminoBot	5	71, 77, 85
Harnstoff	1	77,81,85
Cuprozin flüssig	0,4	77,81
Antagonistisches Versuchspräparat		77,85
Antagonistisches Versuchspräparat		68,77,85

Tabelle 11: Versuchsvarianten Schlossberg, Riesling 2011.

Variante	Basisaufwand	Durchführung
Kontrolle		
Traubenteilen		77
Entblätterung einseitig		71
Vollständige Entfernung von Blütenresten		71
Teilentblätterung und Ausblasen der		71
Teldor (69)	0,4	69
Teldor (77)	0,4	77
Teldor (81)	0,4	81
Teldor (69) + Switch (77)	0,4; 0,24	69, 77
Switch (77) + Teldor (81)	0,24; 0,4	77
Regalis	1,8	65
Versuchspräparat	12	69,77,81,87-89
Antagonistisches Versuchspräparat	0,8	69
Antagonistisches Versuchspräparat	0,8	69,77,85
Vitisan	2	69,77,85
Harnstoff	1	77,81
Cuprozin flüssig	0,4	77,81
Entblätterung, Blütenreste ausblasen ,	0,24, 0,4	71,77,81

Tabelle 12: Wirkung verschiedener Bekämpfungsstrategien auf die Befallsstärke von Botrytis und Essigfäule an Riesling kurz vor der Lese (Versuchsjahre 2010 und 2011).

Variante	aktive Inhaltsstoffe	Befallsstärke	Befallsstärke
Schloßberg, Riesling, 28.9.2010			
Kontrolle		16,9 ± 6,2	-
Traubenteilen		3,2 ± 0,8	-
Regalis	Prohexadione-Ca	8,4 ± 0,9	-
Teilentblätterung		8,5 ± 5,9	-
Vollständiges Entfernen von		7,1 ± 3,8	-
Switch (77, 81)	Cyprodinil	8,9 ± 3,2	-
Teldor (77, 81)	Fludioxonil	4,4 ± 1,3	-
Versuchspräparat		12,7 ± 1,2	-
Versuchspräparat		11,9 ± 7,1	-
Antagonistisches	Aureobasidium pullulans	17,4 ± 10,7	-
Antagonistisches	Aureobasidium pullulans	8,3 ± 3,9	-
Schloßberg, Riesling, 8.9.2011			
Kontrolle		21,8 ± 8,4	2,6 ± 1,2
Traubenteilen		14,2 ± 5,4	1,5 ± 0,6
Regalis		14,2 ± 3,8	1,1 ± 0,6
Teilentblätterung		17,6 ± 6,8	2,2 ± 0,3
Vollständiges Entfernen von		16,4 ± 8,3	1,4 ± 0,9
Teilentblätterung, Ausblasen der		16,5 ± 3,8	1,7 ± 0,6
Teldor (69)	Fludioxonil	20,6 ± 4,1	2,7 ± 0,8
Teldor (77)	Fludioxonil	17,2 ± 2,3	3,4 ± 1,9
Teldor (81)	Fludioxonil	15,5 ± 2,1	2,7 ± 1,5
Teldor (69) + Switch (77)	Fludioxonil, Cyprodinil	17,9 ± 5,6	2,3 ± 1,5
Switch (77) + Teldor (81)	Cyprodinil, Fludioxonil	14,7 ± 5,9	1,5 ± 0,8
Versuchspräparat		14,9 ± 4,2	2,5 ± 1,6
Antagonistisches	Aureobasidium pullans	23,8 ± 4,5	2,3 ± 1,1
Antagonistisches	Aureobasidium pullans	22,1 ± 2,9	2,9 ± 2,3
Vitisan	Kaliumhydrogencarbonat	22,3 ± 4,4	1,9 ± 1,2
Cupropzin flüssig	Kupfer	21,8 ± 3,5	1,8 ± 0,6
Harnstoff	Stickstoff	18,2 ± 2,9	1,8 ± 0,6
Teilentblätterung, Ausblasen der		5,6 ± 2,2	0,5 ± 0,4

(x): Entwicklungsstadium der Reben zum Zeitpunkt der Behandlung.

2010: kein Penicillium-Befall, kein Befall durch Erreger der Essigfäule

2011: kein Penicillium-Befall

Anhang II

Einfluss wichtiger Wachstumsfaktoren auf die Bildung verschiedener Metabolite an Einzelbeeren

An Einzelbeeren wurde in Laborversuchen die Bildung wichtiger Stoffwechselprodukte von *Penicillium* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen geprüft:

1. *Penicillium*-Arten (3):
 - a. *P. expansum* (DSM 62841)
 - b. *P. crustosum* (Isolat 876)
 - c. *P. purpurogenum* (Isolat 9262)
2. Rebsorten (4):
 - a. Müller-Thurgau
 - b. Portugieser
 - c. Riesling
 - d. Weißburgunder
3. Inkubationstemperaturen (4):
 - a. 10°C
 - b. 15°C
 - c. 21°C
 - d. 25°C
4. Licht (3):
 - a. hell-dunkel alternierend (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel)
 - b. 24 Stunden hell
 - c. 24 Stunden dunkel
5. Konkurrenzsituationen (6):
 - a. *P. expansum* + Bot (+)-Stamm, Isolat 9206 (Beeren sterilisiert)
 - b. *P. expansum* + Bot (+)-Stamm, Isolat 9206 (Beeren nicht sterilisiert)
 - c. *P. expansum* + Bot (-)-Stamm, Isolat 9569 (Beeren sterilisiert)
 - d. *P. expansum* + Bot (-)-Stamm, Isolat 9569 (Beeren nicht sterilisiert)
 - e. *P. expansum* (Beeren sterilisiert)
 - f. *P. expansum* (Beeren nicht sterilisiert)
6. Inkubationszeiten (4):
 - a. 7 Tage
 - b. 14 Tage
 - c. 21 Tage
 - d. 28 Tage
7. Behandlungen (5):
 - a. unbehandelt
 - b. Teldor (0,1 %)
 - c. Switch (0,06 %)

c. Cuprozin flüssig (0,1 %)

d. Harnstoff (0,5 %)

Die sieben Versuchsparemeter wurden unterschiedlich miteinander kombiniert, sodass insgesamt 169 Versuchsvarianten angesetzt wurden:

- 1.) 3 *Penicillium*-Arten, 4 Rebsorten, 4 Temperaturen, hell-dunkel-alternierend, Beeren oberflächensterilisiert, 14 Tage inkubiert
- 2.) 4 Inkubationszeiten, 3 *Penicillium* -Arten, 1 Sorte (Riesling), Beeren oberflächensterilisiert, 21°C, hell-dunkel-alternierend
- 3.) 3 Lichtverhältnisse, 3 *Penicillium* -Arten, 2 Sorten (Riesling und Portugieser), Beeren oberflächensterilisiert, 14 Tage inkubieren, 21°C
- 4.) 6 Konkurrenzsituationen, 2 Sorten (Riesling und Weißburgunder), 2 Inkubationszeiten (14 und 28 Tage), 21°C, hell-dunkel-alternierend

Die Beeren wurden modifiziert nach einer Methode von STEIN et al. (1983) mit Hilfe eines Dichtegradienten in Salzlösung (Dichte: 1,065 kg/m³ NaCl) nach ihrem Zuckergehalt bzw. Reifegrad sortiert. Abweichend zu den Angaben von STEIN et al. (1983) erfolgte die Trennung der Beeren ohne Zusatz von Tween, um die nachfolgenden Inokulationen mit den Konidien suspensionen nicht zu beeinflussen. Durch diese Methode konnte gewährleistet werden, dass die verwendeten Beeren von Trauben der Sorte Portugieser und Müller-Thurgau in dem Versuchsansatz (5.9.11) einen Reifegrad von mindestens 60°Oe, bei Riesling und Weißburgunder (12.9.11) von mindestens 70°Oe aufwiesen. Die Beeren wurden anschließend gewaschen, teilweise oberflächensterilisiert (30 sec. 70% Ethanol, 2 min. 0,35% Na-Hypochlorid, 30 sec. 70 % Ethanol), mit einer Impfnadel verwundet und mit den entsprechenden Konidien suspensionen inokuliert (siehe Abschnitt 2.3.2). Applikationen der Beeren mit Switch, Teldor, Cuprozin flüssig (Kupfer) und Harnstoff erfolgten nach der Verletzung mit einer Impfnadel durch eine Tauchbehandlung in der jeweiligen Anwendungskonzentration bezogen auf den betriebsüblichen Basisaufwand. Je 20 Beeren pro Versuchsvariante wurden in feuchten Kammern inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit wurden die Beeren fotografiert, anschließend durch Glaswolle gepresst und der so gewonnene Saft eingefroren.

An Einzelbeeren verschiedener Rebsorten, die mit *P. expansum* infiziert wurden, konnte bisher kein Geosmin nachgewiesen werden. Auch die Konkurrenz mit verschiedenen Bot (+)-Stämmen hatte keinen Einfluss auf die Bildung des Metabolits. Gleichzeitig konnte die Bildung von Citrinin durch *P. expansum* an Beeren erstmals bestätigt werden. Patulin wurde an Beeren im Labor sehr häufig und in großen Mengen nachgewiesen. Die Bildung des Metabolits konnte dabei keinem bestimmten Wachstumsfaktor zugeordnet werden. Ochratoxin A wurde an Einzelbeeren verschiedener Rebsorten von den Arten *P. crustosum* und *P. purpurogenum* gebildet, wobei *P. purpurogenum* das größere Potential zur Bildung des Toxins an den Beeren zeigte.

Anhang II, Tabelle 1: Bildung von Ochratoxin A (OTA) durch *P. crustosum* (Isolat 876) und *P. purpurogenum* (Isolat 9262) an oberflächensterilisierten Einzelbeeren.

Reb- sorte	Inkubations- temperatur	Licht	Konkurrenz	Inkubations- zeit	Behandlung	OTA µg/l	
						<i>P. crustosum</i> (Isolat 876)	<i>P. purpurogenum</i> (Isolat 9262)
MTH	10°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	1,16	n.n.
MTH	15°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
MTH	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
MTH	25°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	2,30
Portug.	10°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Portug.	15°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Portug.	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Portug.	25°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	10°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	15°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	25°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	10°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	15°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	25°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	0,64
Riesling	22°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	0,15	n.n.
Riesling	22°C	24 h hell	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.

Riesling	22°C	24 h dunkel	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	22°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	22°C	24 h hell	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Weißb.	22°C	24 h dunkel	-	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	-	n.n.	0,80
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	Teldor	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	Switch	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	Kupfer	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	-	14 Tage	Stickstoff	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot (+), 9206	14 Tage	-	n.n.	7,06
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot (+), 9206	14 Tage	Teldor	n.n.	6,414
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot (+), 9206	14 Tage	Switch	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot (+), 9206	14 Tage	Kupfer	n.n.	0,21
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot (+), 9206	14 Tage	Stickstoff	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot-,	14 Tage	-	n.n.	n.n.
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot-,	14 Tage	Teldor	n.n.	3,84
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot-,	14 Tage	Switch	n.n.	2,11
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot-,	14 Tage	Kupfer	0,69	1,18
Riesling	21°C	hell-dunkel altern.	Bot-,	14 Tage	Stickstoff	1,48	n.n.

Anhang III

Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most

Für die Entwicklung eines analytischen Markers für *Penicillium*-Befall in Most wurden verschiedene Versuchsansätze verfolgt:

- Chromatogramme der GC/MS-Analysen im Full-Scan-Modus

Die Auswertung der Chromatogramme der GC/MS-Analysen im Full-Scan-Modus läuft derzeit. Verglichen werden Einzel-Peaks von Traubensaft-Proben mit *Penicillium*-Befall mit denen unbefallener Traubensaftproben. Ein Vorteil der Auswertung liegt darin, dass die Daten durch die Geosmin-Messungen ohne zusätzliche Versuchsansätze ohnehin zur Verfügung stehen und die Datenbank bereits die Metabolitenprofile vieler verschiedener Versuchsansätze beinhaltet. Das Vorgehen ist allerdings zeitaufwendig und deckt lediglich Metabolite ab, die in der Clean-Fraktion von Geosmin enthalten sind.

- LC-MS/MS-Analysen

LC-MS/MS-Analysen sollen ein breiteres Spektrum an Substanzen erkennen und über eine geeignete Software einen automatisierten und effizienten Abgleich der Inhaltsstoffe ermöglichen. Da das LC-MS-Gerät am DLR Rheinpfalz noch nicht zur Verfügung steht, wurde für die Analysen eine Kooperation mit dem Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim begonnen. Erste Analysen der bereits Ende 2011 erzeugten Proben werden Anfang 2012 durchgeführt. Sie werden sich auf den Nachweis verschiedener Substanzen aus den Stoffgruppen der Terpene und Polyketide konzentrieren. Beide Stoffgruppen werden als typische Metabolite für verschiedene *Penicillium*-Arten genannt (FRISVAD et al. 2004).

Anhang IV

Untersuchung der Geosminbildung von *P. expansum* im Traubensaft

In ersten Versuchsansätzen wurde geprüft, ob verschiedene *P. expansum*-Stämme in Traubensaft Geosmin bilden können. Hierzu wurden je 50 ml Traubensaft mit 1 ml Konidien suspension (10^6 Konidien/ml) von sechs verschiedenen *P. expansum*-Isolaten angeimpft. Die Versuchsansätze wurden für 14 Tage bei 21°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte eine analytische Aufbereitung der Proben.

Verwendete *P. expansum*-Isolate:

- DSM 62841
- DSM 1994
- DSM 1282
- Isolat 54 (Eigenisolat von Trauben)
- Isolat 10 (Eigenisolat von Trauben)
- Isolat 342 (Eigenisolat von Trauben)

Die Untersuchungen bestätigten, dass keiner der bisher geprüften *P. expansum*-Stämme in Riesling-Traubensaft Geosmin bilden. Selbst der zuverlässige Geosmin-Bildner DSM 62841 bildete in dem Saft kein Geosmin.

Anhang V

Untersuchungen zur biologischen Funktion der Stoffwechselprodukte

Untersuchungen an Einzelbeeren

In ersten Untersuchungen zur biologischen Funktion von Ochratoxin A wurden Einzelbeeren verschiedener Rebsorten im Labor mit Ochratoxin A bildenden *P. crustosum*-Isolaten infiziert (Zwischenbericht 2011). Aus den Versuchen konnte keine Schlussfolgerungen auf die biologische Funktion, wie beispielsweise eine Steigerung der Pathogenität, durch die Bildung des Metabolits gezogen werden. Die analytischen Ergebnisse der Beerenversuche aus dem Jahr 2012 lieferten ebenfalls bisher keine Hinweise auf die biologische Funktion der Metabolite.

In vitro Tests in Mikrotiterplatten

In weiteren Versuchsserien wurde die Wirkung der Toxine Patulin, Citrinin und Ochratoxin A als Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf unterschiedliche Mikroorganismen, die von reifen Beeren isoliert wurden, getestet.

Der Saft von Rieslingbeeren wurde auf Biomalzagar ausplattiert und bei 21°C bzw. 25°C inkubiert. Kolonien verschiedener Mikroorganismen wurden isoliert und für die Tests als Reinkulturen angezogen (zwei Bakterien-Stämme, zwei *Cladosporium* sp., zwei Stämme wilder Hefen, drei Stämme filamentöser Pilze). Zusätzlich wurden zwei *Botrytis cinerea*-Stämme, zwei *P. expansum*- und zwei *P. purpurogenum*-Stämme in die Versuche einbezogen.

Die Reinsubstanzen der Metabolite lagen in Methanol gelöst vor. Um die Wirkung von Methanol auszuschließen, wurde auch eine Methanol-Kontrolle in die Versuche einbezogen. Ein Beispiel für einen Versuchsaufbau mit einem *Penicillium*-Isolat ist in Tabelle 7 dargestellt.

Die Metabolite wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in die Taschen der Mikrotiterplatten vorgelegt und das Methanol wurde durch Verdampfen für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur weitestgehend entfernt. Anschließend wurden jeweils 1000 µl Konidien suspension, angesetzt in Riesling-Traubensaft (200.000 Sporen/ml), zugegeben. Die Platten wurden bei 21°C inkubiert, bis in der Wasserkontrolle ein deutliches Wachstum oder eine Vermehrung der Mikroorganismen zu erkennen war. Die Keimrate der Wasserkontrolle und der höchsten eingesetzten Konzentration wurde in einer 1:10 Verdünnung mittels Zählkammer ausgezählt.

Die getesteten Mikroorganismen zeigten bis zur maximal getesteten Konzentration keinen Einfluss auf die Entwicklung oder Vermehrungsrate der Organismen (Anhang 4). Die Schwankungen der Messwerte innerhalb der Wiederholungen war sehr groß. Zwar zeigte in einem Versuchsansatz eine der wilden Hefen (MO5) unter dem Einfluss von Ochratoxin A (maximale Konzentration von 500 ng/µl) eine reduzierte Wachstumsrate im Vergleich zur Methanol- und Wasserkontrolle, jedoch konnten diese Ergebnisse in einem Folgeversuch nicht bestätigt werden.

Anhang V, Tabelle 1: Beispiel für einen Versuchsaufbau in einer Mikrotiterplatte mit einem der insgesamt 9 Mikroorganismen. Die Buchstaben A-L bezeichnen die Reihen in den Mikrotiterplatten.

Platte 1/ Mikroorganismus 1						
	µl gelöster Metabolit					
Metabolit	A+B	C+D	E+F	G+H	I+J	K+L
Ochratoxin A	0	1	2	3	4	5
Methanol (100%)	0	1	2	3	4	5
Citrinin	0	5	10	15	20	25
Patulin	0	5	10	15	20	25
Methanol (100%)	0	5	10	15	20	25

Anhang VI

Freilanduntersuchungen

Im Jahr 2011 wurden insgesamt 36 Proben aus unterschiedlich behandelten Parzellen in einer Riesling-Anlage gesammelt. Die Parzellen wurden mit verschiedenen Pflanzenschutzmitteln und Kulturmaßnahmen behandelt. Die Proben umfassten gesundes, *Botrytis*-faules und *Penicillium*-infiziertes Material aus jeder Parzelle. Drei Wiederholungen innerhalb der Versuchsanlage wurden beprobt. Insgesamt wurden nur sehr wenige Kontaminationen in Spuren an den Trauben gefunden. Gleichzeitig konnte kein Zusammenhang mit dem visuellen Fäulnisbefall und den gefundenen Metaboliten erkannt werden. Spuren von OTA konnten sowohl in offensichtlich gesundem Traubenmaterial als auch in Trauben mit sichtbarem *Penicillium*-Befall festgestellt werden. Keine der Proben, die *Penicillium*-Befall aufwies, zeigte Kontaminationen mit Geosmin. Patulin und Citrinin konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der untersuchten Metabolite und einer bestimmten Behandlung der Trauben im

Anhang VI, Tabelle 1: Analyseergebnisse der Beprobung Schloßberg, 2011:

Anzahl Proben	Trauben ohne sichtbaren Pilz-Befall	Faule Trauben* „ohne“ <i>Penicillium</i>	Faule Trauben* „mit“ <i>Penicillium</i>
gesamt	36	36	36
Patulin	0	0	0
Citrinin	0	0	0
Geosmin (< 0,6 µg/L)	0	4	0
Ochratoxin A (< 0,2 µg/L)	5	5	6

* Sichtbare Infektionen durch *Botrytis* und/oder Essigfäule vorhanden