

Masterarbeit

DER EINSATZ VON INTACT CELL MASS SPECTROMETRY UND IMAGING MASSENSPEKTROMETRIE ZUR CHARAKTERISIERUNG VON PILZINTERAKTIONEN

Ausgeführt am Institut für
Chemische Technologien und Analytik
der Technische Universität Wien

unter der Anleitung von
Associate Prof.Mag.Dr. Martina Marchetti-Deschmann
und
Privatdoz.Mag.Dr.rer.nat Susanne Zeilinger-Migsich

durch
Sonja Reitschmidt
Taubergasse 52/14, 1170 Wien

Ort, Datum

Sonja Reitschmidt

Kurzfassung

Rhizoctonia solani (Pilz der Ordnung *Cantharellales*) hat eine weltweite Verbreitung und ist verantwortlich für eine Vielzahl an Krankheiten von Erntepflanzen. Er verursacht einen Befall der auskeimenden Triebe unter der Erde früh in der Saison und somit eine recht spät bemerkbare Schädigung.

Trichoderma atroviride (Pilz der Ordnung *Hypocreale*) ist bekannt als opportunistischer und avirulenter Pflanzensymbiont, der in der Lage ist, *Rhizoctonia* zu erkennen und anzugreifen und kann somit als natürliches Fungizid eingesetzt werden.

Um die Wechselwirkungen und die Kommunikation zwischen diesen beiden Pilzen besser zu verstehen, ist es nötig eine direkte Konfrontation zu untersuchen.

In dieser Arbeit geht es darum ein Probe-Matrix-System zu finden und zu optimieren, um *Trichoderma* (sowohl Sporen als auch Mycel) und *Rhizoctonia* mittels MALDI-TOF-MS unter denselben Bedingungen analysieren und eventuell unterscheiden zu können.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltet die Vorversuche, um ein Konfrontations-Assay direkt auf einem Target durchzuführen und anschließend mittels MALDI-MSI zu untersuchen.

Zur Optimierung wurden folgende drei Matrices in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet:

- α -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure (α -Cyano-4-hydroxy cinamic acid, CHCA)
- Sinapinsäure (sinapic acid, SA)
- 2,5-Dihydroxybezoensäure (2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB)

Mit 80 mg/mL DHB, gelöst in ACN und Wasser (mit 0,1% TFA) im Verhältnis 1:1, wurden die optimalsten Ergebnisse erzielt. Mit diesem Matrix-System war es auch möglich, eindeutige Unterschiede in den Spektren von *Trichoderma* Sporen, *Trichoderma* Mycel und *Rhizoctonia* zu erkennen.

Bei den Konfrontations-Assays ist es gelungen eine Methode zu entwickeln die ein Wachstum von beiden Pilzen auf einem ITO-Target ermöglicht, so dass es nach der Trocknung direkt mittels MALDI-MSI untersucht werden kann. Durch diese Technik konnten bereits sekundäre Metabolite, welche während der Interaktion von *Trichoderma* und *Rhizoctonia* entstanden sind, direkt visualisiert werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen danken ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Meiner Betreuerin Associate Prof. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. **Martina Marchetti-Deschmann**. Für die Möglichkeit im Rahmen meiner Masterarbeit am Institut für Chemische Technologien und Analytik (CTA) in ihrer Arbeitsgruppe (Omics Technologies) an diesem interessanten Thema mitarbeiten zu dürfen. Sowie für die Zeit, die sie trotz vollem Terminkalender immer gefunden hat um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, wenn ich einmal nicht mehr weiter wusste.

Privatdoz. Mag. Dr.rer.nat. **Susanne Zeilinger-Migsich** und Projektass. Mag. Dr. **Sabine Gruber**, für die tatkräftige Unterstützung bei der Gewinnung meiner biologischen Proben.

Der **gesamten Arbeitsgruppe**, für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit. Ich habe mich in dieser Gruppe sehr wohl gefühlt und werde mich noch lange an diese Zeit erinnern.

Univ.-Prof.Mag.Dr. **Christian Huck** (Institut für Analytische Chemie und Radiochemie, Universität Innsbruck), der sich dankenswerter Weise bereit erklärt hat meine Diplomarbeit zu korrigieren und zu benoten.

Meiner **Familie**, besonders meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich gemeinsam mit meiner Schwester immer unterstützt und an meinen Erfolg geglaubt haben.

All meinen **Freunden** für die Unterstützung, Geduld und das Verständnis, wenn das Studium zwischendurch die höchste Priorität und ich somit keine Zeit für sie hatte. Hier möchte ich mich ganz besonders bei **Sabrina Pober** bedanken die im Laufe unseres gemeinsamen Studiums eine sehr gute Freundin geworden ist, und mir vor allem in den schweren Phasen des Studiums immer zur Seite stand.

Meinem Freund **Manuel Mayer**, der mir in den letzten Monaten meines Studiums zu jedem Zeitpunkt die nötige Kraft und Motivation gegeben hat, um nicht so kurz vor dem Ziel aufzugeben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit	1
1.2	Biologischer Hintergrund.....	1
1.2.1	Rhizoctonia solani	1
1.2.2	Trichoderma	3
1.3	MALDI-TOF / RTOF- MS	5
1.3.1	MALDI Probenpräparation	6
1.3.2	Ionisation und Desorption mittels Laser.....	8
1.3.3	Flugzeit Massenanalysator (TOF, Time-of-flight mass analyzer)	9
1.3.4	MALDI-TOF Intact Cell Mass Spectrometry (MALDI-TOF-ICMS)	11
1.4	Statistik	12
1.4.1	Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis).....	12
1.4.2	Hierarchische Cluster Analyse (HCA).....	13
1.4.3	Receiver Operating Characteristics Curve (ROC-Kurve).....	14
2	Durchführung.....	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Chemikalien.....	16
2.1.2	Material und Instrumente	17
2.2	Biologische Proben.....	17
2.2.1	Kultivierung.....	17
2.2.2	Probenvorbereitung	20
2.3	Matrixsystem und Probenaufbringung	21
3	Ergebnisse und Diskussion	23
3.1	Optimierung des Probe-Matrix-Systems	23
3.1.1	Vergleich von 3 verschiedenen CHCA- und einer SA- Konzentration	24
3.1.2	Vergleich verschiedener DHB - Konzentrationen.....	26
3.1.3	Vergleich der optimalen CHCA- und DHB – Konzentration	31
3.2	Reproduzierbarkeit der Messungen	32
3.2.1	Vergleich der biologischen Ansätze	32
3.2.2	Vergleich verschiedener Aliquote	35
3.3	Probenunterscheidung	38
3.4	Miniaturisierter Konfrontations-Assay	43
3.5	Imaging	45

4	Conclusio.....	46
5	Ausblick	49
5.1	MALDI - MSI.....	49
6	Anhang	A
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	A
6.2	Tabellenverzeichnis	C
6.3	Literaturverzeichnis.....	D
6.4	Vollständige Peaklisten zu Kapitel 3.2 Reproduzierbarkeit der Messungen.....	I
6.4.1	Vergleich der biologischen Ansätze	I
6.4.2	Vergleich verschiedener Aliquote	K
6.5	Vollständige Abbildungen und Peaklisten zu Kapitel 3.3 Probenunterscheidung M	

I Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit sollten Vorarbeiten für spätere MS-Imaging Versuche geleistet werden.

Dazu wurden zwei Pilze (*Trichoderma atroviride* und *Rhizoctonia solani*) mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert und anschließend ein miniaturisierter Konfrontations-Assay etabliert.

1.2 Biologischer Hintergrund

1.2.1 *Rhizoctonia solani*

Bei *Rhizoctonia solani* handelt es sich um einen Pilz der Ordnung *Cantharellales* (genaue Taxonomie siehe Tabelle 1) und wächst als Hyphe (fadenförmige Struktur) auf Pflanzen [1]. Eine große Ansammlung von Hyphen wird Myzel genannt und hat im Fall von *Rhizoctonia* Farben von weiß bis grau und braun, abhängig von den Isolaten [2] (Abbildung 1). Charakteristisch für diesen Pilz ist, dass keine asexuellen Sporen produziert werden [1].

Tabelle 1: Taxonomie von *Rhizoctonia solani* [3]

Art	<i>Rhizoctonia solani</i>
Gattung	<i>Rhizoctonia</i>
Familie	<i>Ceratobasidiaceae</i>
Ordnung	<i>Cantharellales</i>
Klasse	<i>Agaricomycetes</i>
Subdivision	–
Abteilung	<i>Basidiomycota</i>
Unterreich	<i>Dikarya</i>
Reich	<i>Fungi</i>
Domäne	<i>Eukaryota</i>

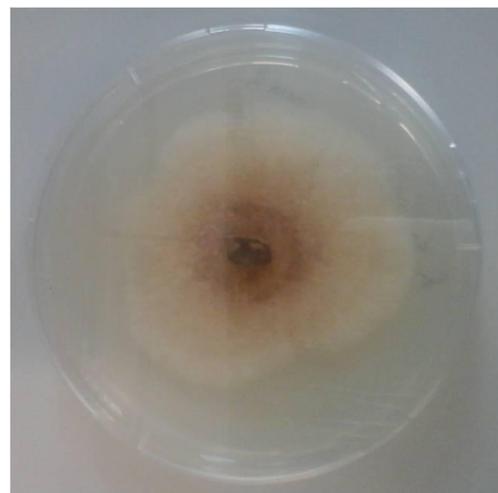


Abbildung 1: *R.solani* 4 Tage gewachsen auf PDA

R.solani hat eine weltweite Verbreitung und ist unter anderem verantwortlich für die Pockenkrankheit von Kartoffeln [4, 5], die Wurzelfäule von Getreide und Zuckerrüben [6, 7], die Blattscheidedürre von Reis [8] sowie für das Abfaulen von Gurken [2, 9] (Abbildung 2). Die bekanntesten Symptome sind eine Störung der Keimung sowie das Abfaulen der Keimlinge.

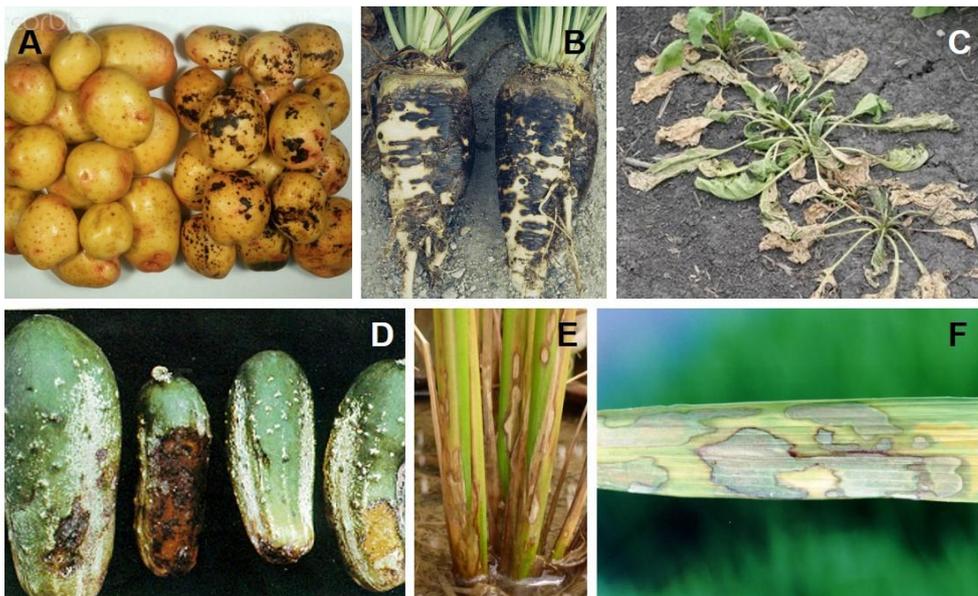


Abbildung 2: Durch *R.solani* verursachte Pflanzenkrankheiten; A: Pockenkrankheit von Erdäpfeln, B/C: Wurzelfäule von Zuckerrüben, D: Abfaulen von Gurken, E/F: Blattscheidendürre von Reis¹

R.solani infiziert Knollen, Stängel und Triebe [5] sowie Wurzeln und deren Ausläufer [10], wobei hauptsächlich die sich aus der Saatknolle entwickelnden Sprossen und Wurzel ausläufer befallen und beschädigt werden [4]. Die Krankheiten äußern sich in verspätetem Wachstum [5] und führen zu einem schlechten Bestand, unterentwickelten Pflanzen, Ernteverlusten, weniger und kleineren sowie missgebildeten Knollen [2, 5, 7, 10].

Das größte Problem an diesem pathogenen Pilz ist, dass er bereits früh in der Saison die auskeimenden Triebe vor dem Erreichen der Oberfläche unter der Erde attackiert. Dadurch wird der Befall erst spät in der Saison bemerkt [5, 10]. Ein weiteres Problem ergibt sich daraus, dass für diesen Pilz bisher kein effizientes Fungizid erhältlich ist [10].

1

A: <http://www.corbisimages.com/images/Corbis-42-27851494.jpg?size=67&uid=19272312-2e67-4375-baed-4e12ab0cade4> (2015-04-30; 14:64)

B: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2006/beets/image/rot18.jpg> (2015-04-30; 11:35)

C: http://www.ag.ndsu.edu/cpr/images/05-23-13/foiar-symp-rhizoc-sugarbeet.mohamed/image_preview (2015-04-30; 11:43)

D: <http://ipm.ncsu.edu/vegetables/Pamphlets/cucumber/fig3-9.gif> (2015-04-30; 14:54)

E: http://www.rkmp.co.in/sites/default/files/eis_states/P%2038.JPG (2015-04-30; 15:02)

F: <http://www.lsuagcenter.com/NR/rdonlyres/C93A494B-8105-4804-9DFA-81190EC3F68B/58166/pub3123>

ShealthBlightofRiceHIGHRES.pdf. (2015-04-28; 15:40)

R.solani bevorzugt warmes Wetter mit feuchten Böden (2,8,10) und wächst sehr schnell [1, 2]. Die Erkrankung beginnt mit dem Eintrag des Pilzes entweder durch die Erde oder infizierte Saatknoten [4, 10]. Im Fall der Infizierung durch die Saatknoten wächst *R.solani* von der Oberfläche der Knolle zum neu entstehenden Trieb, während die Verwendung von kontaminierter Erde nur zu einem Befall der Pflanzen führt, welche in der Nähe des Inokulums wachsen [10]. Der Pilz überlebt den Winter als Sklerotium (welches spät in der Saison gebildet wird) und als Myzel sowohl in den Pflanzen als auch auf infizierten Knollen und in der Erde [10]. Auf Grund der Vielfalt der in Betracht kommenden Wirtspflanzen kann der Pathogen in der Erde über Jahre hinweg überdauern [1].

1.2.2 *Trichoderma*

Trichoderma spp. sind frei lebende Pilze der Ordnung *Hypocreales* (genaue Taxonomie siehe Tabelle 2), welche sowohl als opportunistische als auch avirulente Pflanzensymbionten [11] bekannt sind. Sie sind in der Lage andere Pilze anzugreifen [11, 12] und produzieren grüne Sporen (Abbildung 3) sowie ein weißes Myzel und werden üblicherweise in der Erde [13] und in Wurzel-Ökosystemen gefunden [11].

Tabelle 2: Taxonomie von *Trichoderma atroviride* [14]

Art	<i>Trichoderma atroviride</i>
Gattung	<i>Trichoderma</i>
Familie	<i>Hypocreaceae</i>
Ordnung	<i>Hypocreales</i>
Klasse	<i>Sordariomycetes</i>
Subdivision	<i>Pezizomycotina</i>
Abteilung	<i>Ascomycota</i>
Unterreich	<i>Dikarya</i>
Reich	<i>Fungi</i>
Domäne	<i>Eukaryota</i>

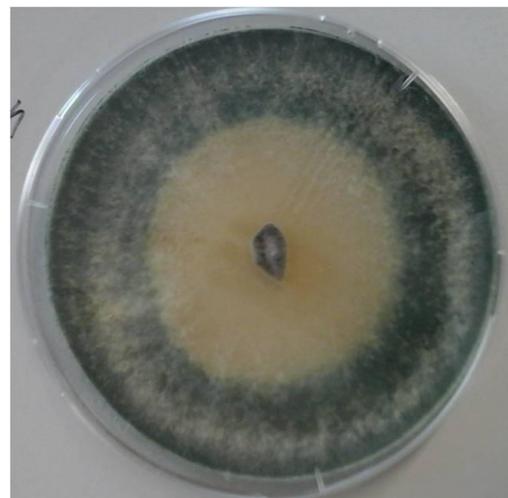


Abbildung 3: *T.atroviride* 5 Tage gewachsen auf PDA

Die effizientesten Stämme von *Trichoderma spp.* besiedeln Wurzeln und verbessern sowohl das Pflanzenwachstum als auch die Resistenz gegenüber Krankheiten [11, 12] und sind somit in der Lage, eine Unterdrückung von Krankheiten in der Erde zu bewirken [12].

Trichoderma spp. erkennt andere Pilze auf Grund sequenzieller Expression von Zellwand abbauenden Enzymen [11] und wächst auf diesen andern Pilz zu [11, 12].

Trichoderma atroviride ist ein filamentöser [13, 15] Stamm von *Trichoderma*, welcher als „Biological control agent“ gegen eine Reihe von pathogenen Pilzen, wie zum Beispiel *Rhizoctonia solani*, wirkt [11, 13, 15, 16]

Wegen seiner mycoparasitären Eigenschaften hat *T.atroviride* die Fähigkeit, Erntepflanzen durch die Freisetzung von zellwandabbauenden Enzymen zu schützen, wenn diese mit einem pathogenen Pilz konfrontiert werden [15]. Diese Zellwand abbauenden Enzyme inhibieren die Keimung der Sporen im pathogenen Pilz und können daher der Erde und Erntepflanzen während der Aussat beigegeben werden [15].

Trichoderma produziert immer ein geringes Level an extrazellulärer Exochitinase, welche diffundiert und die Exposition von Zellwandfragmenten des pathogenen Pilzes katalysiert [11, 12]. Dies führt zur Expression pilztoxischer Wand-Endochitinase, welche ebenfalls diffundiert [11, 12]. Daher beginnt die Attacke des Zielpilzes noch bevor es zum Kontakt zwischen den Antagonisten kommt [12].

Es ist auch möglich, die Pflanzen mit einer integrierten genetischen Resistenz gegen einen pathogenen Pilz zu versorgen [15]. Dazu werden bestimmte Gene in die Pflanze geklont [15]. Diese Gene tragen den Code, der für die Proteine der biologischen Kontrolle verantwortlich ist [15].

Mit diesen beiden möglichen Verwendungen von *T.atroviride* als „biocontrol agent“, gemeinsam mit den anderen Vorteilen, ist dieser Pilz eine umweltfreundliche und billige Alternative zu chemischen Fungiziden im Umgang mit durch *Rhizoctonia solani* hervorgerufenen Krankheiten [11, 15].

1.3 MALDI-TOF / RTOF- MS

Die Massenspektrometrie ist eine physikalische Methode, bei der die Ionen auf Grund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) getrennt werden [17]. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, um aus den Molekülen der Probe Ionen zu generieren, einem Massenanalysator zur Separation dieser Ionen anhand ihrer m/z -Werte und einem Detektor mit Datenausgabe, um die generierten m/z -Werte aufzuzeichnen [17, 18]. Im Gegensatz zur Ionenquelle müssen sich sowohl Massenanalysator als auch Detektor im Vakuum befinden, um Stöße zwischen den generierten Ionen selbst sowie mit andern Gasmolekülen so weit wie möglich zu reduzieren [17, 19].

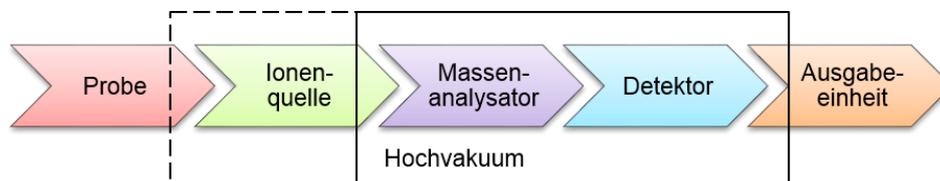


Abbildung 4: Schema eines Massenspektrometers

Abhängig davon, wie viel Energie zur Erzeugung der Ionen verwendet wird, wird die Ionisierung als hart oder weich bezeichnet [18]. Matrixunterstützte Laserdesorption/ionisation (MALDI, genauer beschrieben in Kapitel 1.3.2) und Elektrosprayionisation (ESI) gelten als weiche Ionisationstechniken und sind somit gut geeignet für schwerflüchtige, große und instabile Moleküle, so wie zum Beispiel Biomoleküle [18, 20].

Unter den vielen verschiedenen Massenanalysatoren zur Trennung von MALDI-Ionen ist der Flugzeitmassenanalysator (Time of Flight, TOF (siehe Kapitel 1.3.3) [20].

Der letzte Abschnitt des Massenspektrometers ist der Detektor. In Kombination mit MALDI werden meist Sekundärelektronenvervielfacher oder Mikrokanalplatten (MSP) verwendet, welche die ankommenden Ionen in Elektronen konvertieren und so den dadurch produzierten Strom aufzeichnen [18, 21].

MALDI ist, wie schon erwähnt, eine weiche Desorption/Ionisationstechnik, die gerne für biologische Proben verwendet wird, da bei dieser Methode Ionen von intakten Molekülen ohne Fragmentierung erzeugt werden [18]. Um die weiche Ionisierung zu gewährleisten, wird die Probe gemeinsam mit einer Matrix (welche als Energiemediator dient) auf ein Target aufgebracht, und anschließend dem Vakuum und dem Laserstrahl ausgesetzt [18, 20, 22].

1.3.1 MALDI Probenpräparation

Da kein Probenvorbereitungsprotokoll existiert welches für jedes beliebige analytische Problem verwendet werden kann, gibt es eine Vielzahl an MALDI-Matrices und Probenpräparationstechniken, die angepasst und optimiert werden müssen [20].

Die Matrixsysteme bestehen aus kleinen organischen Molekülen mit der Fähigkeit die Laserenergie zu absorbieren [20]. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die meist verwendeten Matrices [20].

Matrix	Structure	Wavelength	Major applications
6-Aza-2-thiothymine (ATT)		UV 337 nm, 355 nm	Proteins, peptides, noncovalent complexes; near-neutral pH
4-Chloro- α -cyanocinnamic acid (ClCCA)		UV 337 nm, (355 nm)	(Glyco/Phospho) Peptides, (halogenated) lipids, fragmentation
α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA)		UV 337 nm, 355 nm	Peptides, fragmentation
2,5-Dihydroxybenzoic acid (plus 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) (2,5-DHB(s))		UV 337 nm, 355 nm	Proteins, peptides, carbohydrates, synthetic polymers
k,m,n-Di/Trihydroxy-acetophenone (D/THAP)		UV 337 nm, 355 nm	Proteins, peptides, noncovalent complexes; near-neutral pH
Glycerol		IR 2.94 μ m, 2.79 μ m	Proteins, peptides; liquid matrix
3-Hydroxypicolinic acid (3-HPA)		UV 337 nm, 355 nm	Nucleic acids
Nicotinic acid (NA)		UV 266 nm	Proteins, peptides, adduct formation
Sinapic acid (SA)		UV 337 nm, 355 nm	Proteins, peptides
Succinic acid		IR 2.94 μ m, 2.79 μ m	Proteins, peptides

Abbildung 5: Auswahl an häufig verwendeten MALDI Matrices (IR, Infrarot; UV, Ultraviolett)²

² Hillenkamp, F., T.W. Jaskolla, and M. Karas, *The MALDI Process and Method, in MALDI MS*, F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, Editors. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 25

Die hochkonzentrierte Matrixlösung (ca. 0,01 – 0,1 M) wird mit einer geringen Menge der Analytlösung (ca. 10^{-6} – 10^{-9} M) vermischt, wobei das typische Analyt-zu-Matrix-Verhältnis zwischen 10^{-2} und 10^{-7} M liegt [20]. Bei der Verdampfung des Lösungsmittels rekrystallisiert die Matrix und schließt dabei die Analytmoleküle komplett ein, wodurch eine Wechselwirkung zwischen den Analytmolekülen auf ein Minimum reduziert werden kann.

Für die Analyse von Peptiden und kleinen Proteinen unter einem Molekulargewicht von 20 000 Da wird oft CHCA (α -Cyano-4-Hydroxy-cinnamic acid) als Matrix in Kombination mit einem RTOF-MS (Kapitel 1.3.3) als Analysator verwendet [23, 24].

Für große Proteine kommen eher SA oder DHB als Matrix und TOF-MS im linearen Modus (Kapitel 1.3.3) als Analysator zum Einsatz [23].

2,5-DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) bzw. DHBs (2,5-DHB + 10% 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid) sind gut geeignet für die Proteinanalyse, da die großen Kristalle (~ 100 μ m) das Protein einschließen, wobei gleichzeitig ein Ausschluss der meisten Verunreinigungen erfolgt [20].

Die Art der Proben- und Matrixaufbringung auf das Target ist ebenfalls abhängig vom jeweiligen analytischen Problem.

Oberflächenpräparation oder eine voraufgebrachte Matrixkristallschicht wird oft als Dünnschicht-Präparation bezeichnet [20]. Bei ersterem wird die Matrix auf eine bereits getrocknete Schicht der Probe aufgebracht, während bei zweitem erst die Matrix getrocknet wird, um anschließend die Probe darüber aufzutragen [25-27].

Es gibt zwei Möglichkeiten, Probe und Matrix zu vermischen. Bei der Dried-Droplet-Methode werden diese direkt am Target gemischt [25-27], während bei der Volumen-Methode eine Matrix-Probe-Mischung, hergestellt in einem Eppendorfgefäß, aufgebracht wird [25, 26, 28].

Bei der Two-layer-Volumen-Technik (auch Reverses-Two-Layer genannt) bzw. bei der Sandwich-Methode wird über den mittels Volumen- bzw. Dried-Droplet-Auftragung generierten Probe-Matrix-Spot eine zusätzliche Matrixschicht aufgebracht [25, 27, 28]). Das führt zu einem Lösungs- und Rekrystallisierungsschritt, welcher einen besseren Einbau der Probe in die Matrixkristalle bewirkt, wodurch die Bildung von kleineren und dichteren Kristallen gefördert wird [25].

1.3.2 Ionisation und Desorption mittels Laser

Desorptions- und Ionisationsprozess sind noch nicht genau geklärt [20, 29], aber es wird angenommen, dass die Laserenergie von der Matrix absorbiert und in Gitterenergie umgewandelt wird [18, 20, 29]. Durch die dabei entstehende hohe Energiedichte werden Teile des Probe-Matrix-Kristalls explosionsartig desorbiert, was wiederum sowohl zu einem Phasenübergang [18, 20] als auch zur Ionisation der Matrix durch Addition eines Protons führt. In der Gasphase wird diese Ladung von der Matrix auf die Analytmoleküle übertragen [18, 22, 29]. Dadurch werden hauptsächlich einfach protonierte Quasi-Molekülonen $[MH]^+$ generiert, die anschließend in den Massenanalysator beschleunigt werden [22] (Abbildung 6).

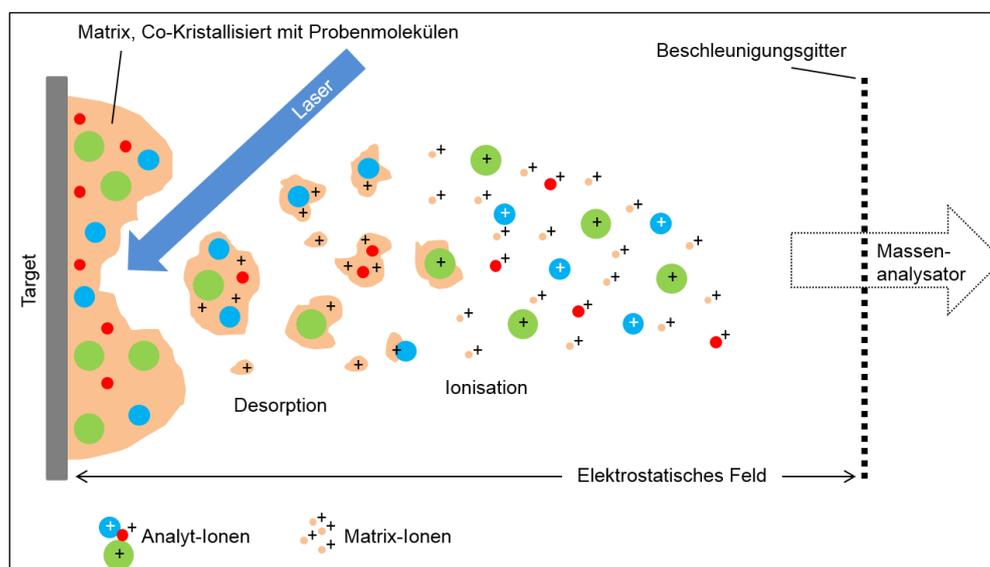


Abbildung 6: Schema des MALDI Prozesses

Für eine funktionierende MALDI muss der Desorptions- und Ionisierungsprozess der Probe kürzer sein als die thermische Diffusion, was nur durch gepulste Laser erreicht werden kann [20, 21]. Die kurzen Laserpulse werden ebenfalls vom TOF für eine gute Massenauflösung benötigt [21]. Im Allgemeinen wird der Laser über Emission (Wellenlänge, Pulsweite, Pulsenergie) und Strahl (Strahldurchmesser, Abweichung) charakterisiert [21].

Wird ein IR-Laser verwendet, so handelt es sich dabei meist um einen Er:YAG-Laser (Erbium-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat Kristall) mit einer Wellenlänge von $2,94 \mu\text{m}$ [21]. CO_2 -Laser mit einer Wellenlänge von $\sim 10 \mu\text{m}$ werden weit seltener verwendet [21]. In Kombination mit den meist genutzten MALDI-Matrices (siehe oben) werden UV-Laser, wie zum Beispiel Stickstofflaser (N_2 -Gaslaser) für Wellenlängen von 337 nm und Nd:YAG

(Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat) Festkörperlaser für Wellenlängen von 355 und 266 nm verwendet [18, 21].

N₂-Laser werden am häufigsten verwendet, da sie einfach, klein und relativ günstig sind [21]. Sie emittieren bei 337 nm und somit nahe dem Absorptionsmaximum von häufigen Matrices (2,5-DHB, CHCA) [21]. Die Hauptlimitierungen sind die limitierte Pulsfrequenz (typ. < 100 Hz) und die Anzahl an Emissionen, bevor der Laser getauscht werden muss (typ. ≤10⁸) [21]. Dadurch ist er, im Gegensatz zum Nd:YAG-Laser, weniger gut für die Hochdurchsatzanalyse geeignet [21].

1.3.3 Flugzeit Massenanalysator (TOF, Time-of-flight mass analyzer)

Da MALDI einen gepulsten Ionenstrom generiert, wird üblicherweise ein Flugzeit-Massenanalysator (TOF) verwendet [21]. Die Ionen werden in den Analysator hinein beschleunigt und anschließend auf Grund ihrer Flugzeit, die wiederum eine Funktion zwischen Molekulargewicht und Ladung ist, analysiert [22]. Es gibt TOF-Massenanalysatoren sowohl in linearer als auch in reflektor Bauweise. Beide können entweder positive oder negative Ionen detektieren [22].

Der Reflektor-Modus erzielt Auflösungen bis zu 5000 Da, wobei jene für kleine Moleküle höher ist [22]. Der lineare Modus hingegen deckt einen weiten Massenbereich von unter 100 Da bis über 1000 Da [22] ab.

Linear TOF

Die generierten Ionen werden in einem elektrostatischen Feld auf eine konstante kinetische Energie E_{kin} beschleunigt [18]. Die anschließende Trennung erfolgt im Hochvakuum in einem feldfreien Flugrohr. Die Separation an sich ist möglich, da Ionen mit derselben kinetischen Energie, aber unterschiedlichen m/z (Masse-zu-Ladung) Verhältnis unterschiedliche Geschwindigkeiten v haben (Gleichung 1) [18]. Die Geschwindigkeit ist jene Zeit, die zur Überwindung einer bestimmten Strecke benötigt wird (Gleichung 2) [18]. Bei bekannter Beschleunigungsspannung U und Länge des Flugrohres L muss lediglich die Flugzeit der Ionen bestimmt werden, um ihr m/z-Verhältnis zu ermitteln (Gleichung 3) [18], wobei der initiiierende Laserpuls als Start und die Ankunft der Ionen am Detektor als Ende der Messung definiert werden [22].

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U = \frac{mv^2}{2} \quad \text{Gleichung 1}$$

$$v = \frac{L}{t} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Gleichung 3

Unterschiede in der Kristallisation von Matrix und Analyten führen zu einer zeit- und ortsverschobenen Desorption und Ionisation, wodurch die Ionen mit demselben m/z -Verhältnis nicht mehr dieselbe kinetische Energie haben [18]. Dies hat eine geringfügige Verschiebung der Ankunftszeiten am Detektor und somit eine Verbreiterung des Signals zur Folge (Abbildung 7) [18].

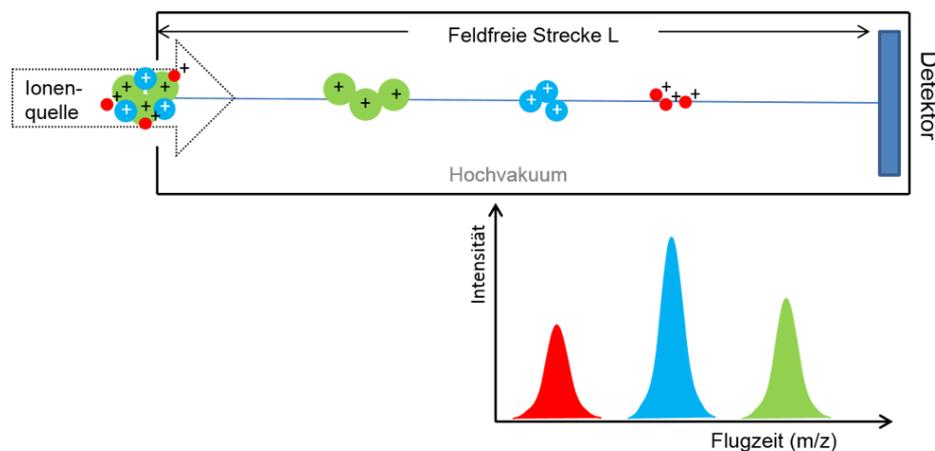


Abbildung 7: Schematische Trennung in einem linearen TOF Analysator inkl. daraus resultierender Peaks

Aus diesem Grund ist auch die Massenauflösung, neben der Massengenauigkeit, Sensitivität / Detektionslimit und Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR), eine der typischen Charakterisierungsgrößen von Massenspektren und Massenanalysatoren [21]. Sie ist definiert als die Massendifferenz Δm mit der zwei benachbarten Peaks (mit m als Masse der Peakspitze) noch klar getrennt werden können [18, 21].

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m}{m_2 - m_1}$$

Gleichung 4

Heutzutage wird als Δm die Halbwertsbreite (full width at half maximum, FWHM) des Peaks verwendet, um die Auflösung mit nur einem Peak zu definieren [18].

Reflektor TOF

Der Reflektor besteht aus mehreren Ringelektroden und befindet sich am Ende der Flugröhre. Mit Hilfe dieser Elektroden wird ein elektrisches Feld mit linearem Spannungsgradienten generiert, welches die ankommenden Ionen abbremst, ihre Flugrichtung umgekehrt und sie in leicht abgelenktem Winkel wieder in die Gegenrichtung beschleunigt.

Ionen mit demselben m/z -Verhältnis aber einer etwas höheren kinetischen Energie dringen tiefer in das elektrische Feld ein, wodurch sich eine längere Flugzeit, als jene von Ionen mit geringerer kinetischer Energie ergibt [18, 21]. Mit der richtigen Reflektorspannung kommen alle diese Ionen (mit höherer und geringerer Energie) gleichzeitig am Detektor an, wodurch schärfere Peaks erhalten werden (Abbildung 8) [21]. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die Reflektierung der Ionen ein längerer Flugweg entsteht, wodurch auch Ionen mit ähnlichen Geschwindigkeiten besser getrennt werden können [18].

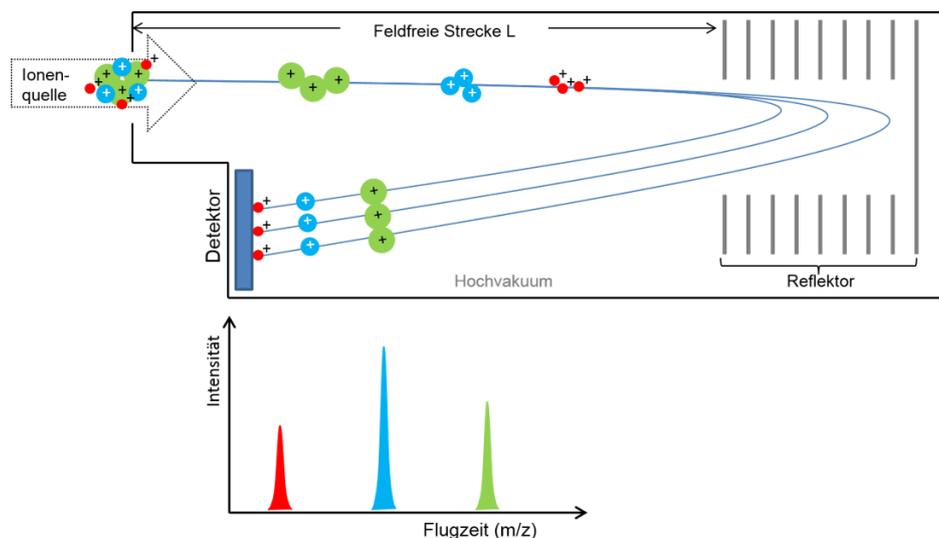


Abbildung 8: Schematische Trennung in einem RTOF Analysator inkl. daraus resultierender Peaks

1.3.4 MALDI-TOF Intact Cell Mass Spectrometry (MALDI-TOF-ICMS)

In diesem Fall bedeutet „Intact Cell“ nicht, dass die mikrobielle Zelle strukturell ganz oder intakt ist [30], sondern dass die Zellen in einer Lösung suspendiert und anschließend direkt auf ein Target aufgebracht werden [31].

Probenvorbereitung:

Um eine ICMS-Analyse (Intact Cell Mass Spectrometry-Analyse) erfolgreich durchführen zu können, ist es nötig die Probe durch Zentrifugation und mehrere Waschschriffe von den restlichen Wachstumsmedien und anderen Kontaminationen zu reinigen [30]. Die Zugabe von TFA (Trifluoressigsäure) zur Matrix bewirkt eine gute Kristallisation von Matrix und Analyt [23] sowie eine Zerstörung der Zellwände, was wiederum zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt [30].

MALDI-TOF ICMS ist eine schnelle und einfache Methode, um kleine Proben, welche einfach durch abschaben einer Kultur von einer Agarplatte gewonnen werden, zu analysieren [22].

ICMS hat viele Vorteile und ist eine beliebte Technik für schnelle Analysen von Mikroorganismen, da sie lediglich ein kleines Probenvolumen und minimale Probenvorbereitung benötigt [30]. Mit dieser Methode ist es möglich, schnell spezifische Protein- oder Peptidprofile verschiedener Spezies zu generieren, da jeder Stamm bzw. jede Spezies von Mikroorganismen einen oder mehrere spezifische Peaks hat, welche zur Identifizierung verwendet werden können.

1.4 Statistik

1.4.1 *Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis)*

PCA ist eine Methode um die Anzahl von Variablen zu reduzieren und mehrdimensionale Daten zu visualisieren [32]. Dazu werden neue Achsen (Hauptkomponenten, PC) so in die Originaldaten gelegt, dass die 1. Hauptkomponente die größtmögliche Varianz hat [32, 33]. Jede folgende Hauptkomponente hat die größte Varianz der verbleibenden Daten und steht im rechten Winkel zu allen vorangehenden Komponenten [32, 33] (Abbildung 9 und Abbildung 10). Dabei ist jede Komponente eine Linearkombination aller originalen Variablen [32].

Normalerweise werden spätere Hauptkomponenten ohne nennenswerten Verlust an Information (auf Grund ihres geringeren Anteils an der Gesamtvarianz) ausgenommen (3). Deshalb ist es möglich die 1. und 2. (ev. 3.) Hauptkomponente gegeneinander aufzutragen um ein 2- (ev. 3-) dimensionales Bild der Daten zu erhalten [32].

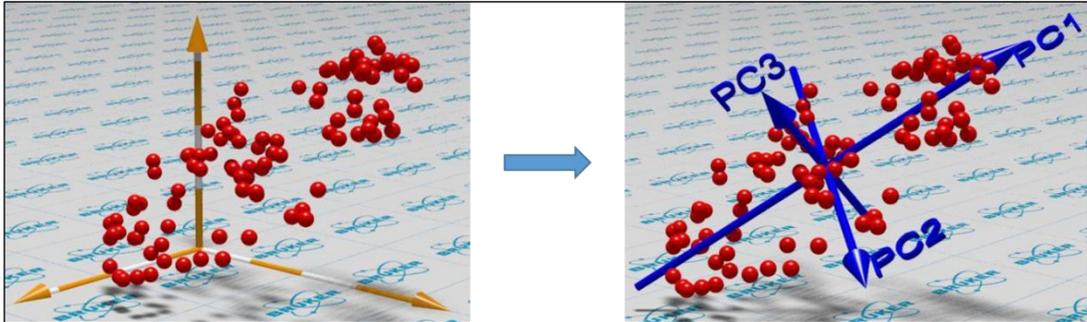


Abbildung 9: Schematische Abbildung der Generierung der ersten 3 Hauptkomponenten ³

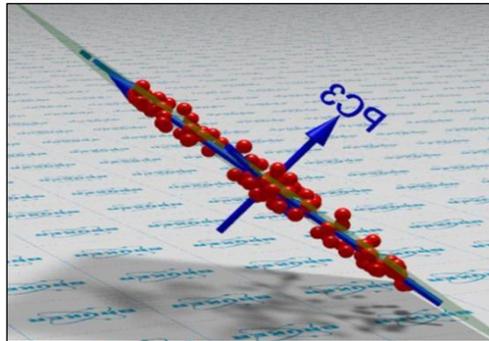


Abbildung 10: Seitlicher Blick auf die Ebenen, welche durch die ersten beiden Hauptkomponenten aufgespannt wird ⁴

1.4.2 Hierarchische Cluster Analyse (HCA)

HCA ist eine Methode der Clusteranalyse mit einer Hierarchie von Clustern als Ergebnis [34].

Es gibt 2 Strategien um einen Cluster zu generieren

- Agglomerativer Algorithmus („bottom-up“-Verfahren):
Jedes Objekt ist der Beginn von einem Cluster. Schritt für Schritt werden diese Cluster zu Größeren zusammengefasst bis nur noch 1 Cluster übrig ist [34, 35].
- Divisiver Algorithmus („top-down“-Verfahren):
Funktioniert umgekehrt. Anfangs bilden alle Objekte einen Cluster und werden aufgespalten bis jeder Cluster nur noch 1 Objekt beinhaltet [34, 35].

Um eine strikte Clusterhierarchie zu bekommen, wird die Struktur verfeinert (divisiv) oder vergrößert (agglomerativ). Sobald der Cluster einmal gebildet wurde, kann er nicht mehr verändert werden [35]. Ausgehend von der fertigen Hierarchie, kann nicht auf den verwendeten Algorithmus geschlossen werden [35].

³ Bruker, *ClinProTools Help-file: Principal Component Analysis (PCA) Basics*

⁴ Bruker, *ClinProTools Help-file: Principal Component Analysis (PCA) Basics*

Eine Messung von Ungleichheiten (meist Distanzen) zwischen den Objekten wird benötigt, um zu entscheiden welche Cluster geteilt/verzweigt werden sollen [34].

Der übliche Weg, um die Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse zu visualisieren ist ein Dendrogramm [34, 35]. Auf der Abszisse wird der Abstand (bzw. anderer gemessener Unterschied) aufgetragen, während die Objekte auf der Ordinate aufgelistet werden [35]. Die Verbindungslinie wird auf der Höhe der Distanz gezeichnet, welche die zwei verbundenen Cluster zueinander haben [35] (Abbildung 11).

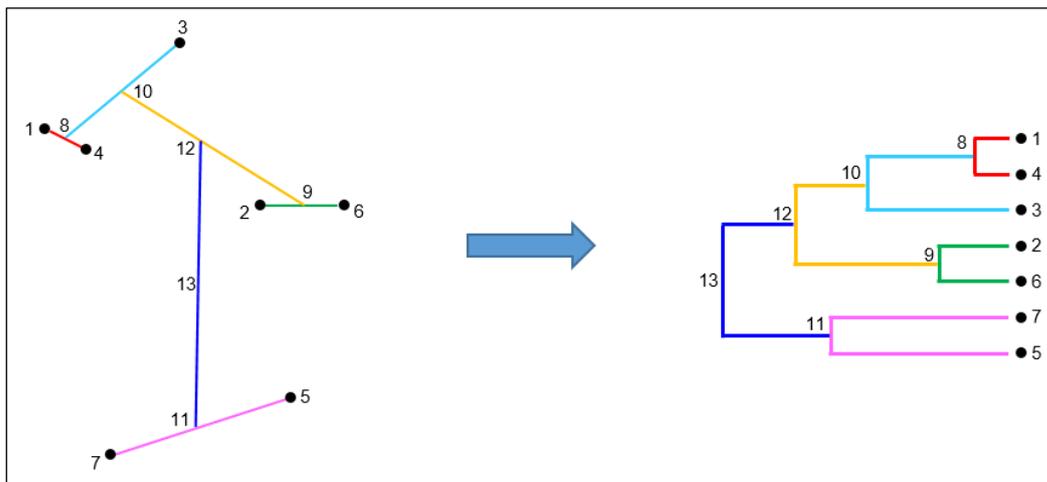


Abbildung 11: Schematische Darstellung wie aus einem Datensatz (rechts) ein Dendrogramm (links) gebildet wird

1.4.3 Receiver Operating Characteristics Curve (ROC-Kurve)

Wenn statistische Modelle zur Kategorisierung von Objekten in 2 Klassen verwendet werden, ist die ROC-Kurve ein hilfreiches Mittel um die Genauigkeit des Modells zu beurteilen [36]. Die ROC-Kurve ist eine Aufzeichnung von Sensitivität (true positiv rate, TPR) auf der y-Achse gegen die „1 – Spezifität“ (fals positive rate FPR) auf der x-Achse [36, 37]. Die Fläche unter der Kurve (AUC, Area under the curve) ist eine Gesamtsumme der Genauigkeit [36] und kann verwendet werden, um die Gesamtleistung verschiedener Tests zu beurteilen [37].

Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung verschiedener ROC-Kurven. Jene Kurven, welche mit einem Zufall korrelieren (45° Linie) haben ein AUC von 0,5 während perfekt passende Tests ein AUC von 1,0 haben [36, 37]. Üblicherweise liegen ROC-Kurven zwischen diesen beiden Extrema und haben daher ein AUC zwischen 0,5 und 1,0 wobei höhere Werte eine bessere Genauigkeit des Test bedeuten [36, 37]. ROC-Kurven mit gleichen AUC-Werten müssen nicht ident sein [37].

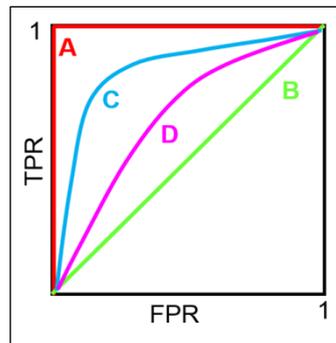


Abbildung 12: Schematische Darstellung der ROC-Kurve;
 A (perfekter Test / $AUC = 1,0$), B (Zufällig / $AUC = 0,5$),
 C,D (übliche ROC-Kurven / $AUC_c > AUC_b$)

Die Sensitivität gibt das Verhältnis von korrekt positiv identifizierten Werten (TP) zu allen positiven Werten (TP+FN) an [38].

$$\text{Sensitivität} = \frac{TP}{TP + FN}$$

TP ... true positive
 FN ... false negative

GL 5

Die Spezifität gibt das Verhältnis von korrekt negativ identifizierten Werten (TN) zu allen negativen Werten (FP+TN) an [38].

$$\text{Spezifität} = \frac{FP}{FP + TN}$$

TN ... true negative
 FP ... false positive

GL 6

2 Durchführung

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Name	Reinheit	Molekulargewicht [g/mol]	Produkt- bzw. [CAS]-nummer	Firma
α -Cyano-4-hydroxycinamic acid (CHCA)	$\geq 98\%$ (TLC)	189,17	C2020-16G [28166-41-8]	Sigma-Aldrich San Louis / USA
Sinapic acid (SA)	$\geq 99,0\%$ (T)	224,21	85429-5G [530-59-6]	Fluka Buchs / Schweiz
2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)	98%	154,12	[490-79-9]	Sigma-Aldrich San Louis / USA
Trifluoroacetic Acid (TFA)	-	114,02	[76-05-1]	Pierce
Acetonitrile for Analysis (ACN)	ACS, Reag.phEur $\geq 99,5\%$	41,05	-	EMSURE
Wasser (UHQ)	18,2 M Ω cm (25°C)	-	-	-
Potato Dextrose Ager (PDA)	-	-	213400 Lot# 4099154	Becton, Dickinson and Company Sparks / USA
Potato Dextrose Broth (PDB)	-	-	254920 Lot# 0280721	Becton, Dickinson and Company Sparks / USA
Pepton aus Casein	Trypt. verdaut, für die Mikrobiologie	-	8986.2 [91079-40-2]	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe / Deutschland
Miracloth von Colibiochem (Fließ)	-	-	475855	EMD Chemicals Inc. San Diego / USA

2.1.2 Material und Instrumente

- * Eppendorfgefäße in unterschiedlichen Größen
- * Eppendorfpipetten mit Spitzen in unterschiedlichen Größen
- * Div. Glasgeräte (Erlenmayerkolben, Becherglas,...)
- * Target: MTP384 polished steel, S/N22748 von Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
- * UltrafleXtreme™ von Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
- * ITO-glass-slides von Bruker Daltonics, Bremen Deutschland
- * Mikroskop, Nikon SMZ800
- * Autoklav
- * Kryovials
- * Petrischalen
- * Diverse Waagen
- * Inkubator
- * Laborzentrifuge

2.2 Biologische Proben

In dieser Arbeit wurden die Pilze *Trichoderma atroviride* (Stamm P1) und *Rhizoctonia solani* als biologische Proben verwendet.

2.2.1 Kultivierung

Für die Gewinnung von *T.atroviride* Sporen und *R.solani* wurden die Pilze jeweils separat in Petrischalen mit PDA (potato dextrose agar) als Nährmedium kultiviert. Als Inokulum diente dabei je ein kleines Stück einer, bei 4°C gelagerten, Vorkultur. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit bei 28°C (im Inkubator) dauerte es zwischen 4 und 7 Tagen bis die komplette Platte bewachsen war und die Pilze geerntet werden konnten (Abbildung 13, Abbildung 14).

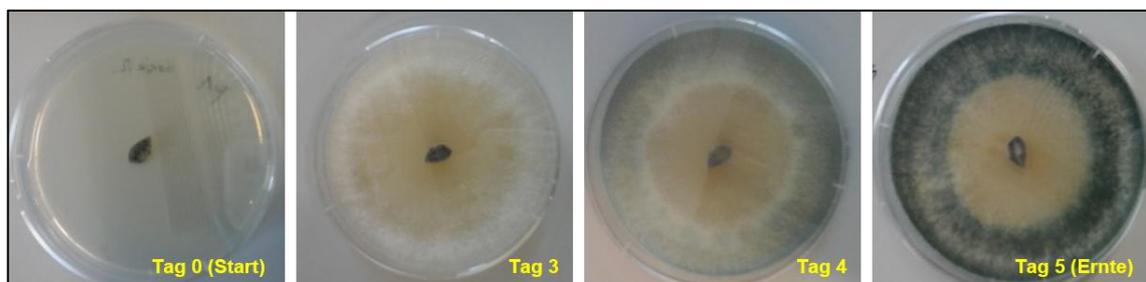


Abbildung 13: *Trichoderma atroviride* Sporen, Fotoserie der Kultivierung

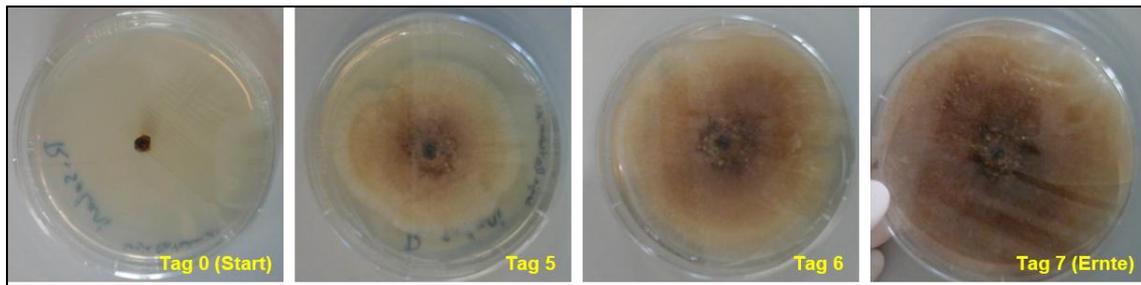


Abbildung 14: *Rhizoctonia solani*, Fotoserie der Kultivierung

Auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften erfolgte die Ernte der beiden Pilze auf zwei verschiedene Weisen. Die Sporen von *Trichoderma* wurden mit ~10 mL sterilem Wasser, unter vorsichtigem Schaben mittels Spatel, von der Platte gewaschen. Die Suspension wurde zur Entfernung von Wachstumsmedium durch Glaswolle in ein Falcon filtriert. Im Gegensatz dazu wurde *Rhizoctonia* durch einfaches Abkratzen vom PDA erhalten.

Die Gewinnung von *Trichoderma* Mycel erfolgte im Schüttelkolben mit PDB (potato dextrose broth) + 5% Pepton als Nährmedium. Die autoklavierte Lösung wurde mit den zuvor geernteten Sporen inokuliert und bei 28°C mit 200 rpm für 2 Tage kultiviert. Die Suspension wurde durch ein Fleece abfiltriert und die Biomasse anschließend vorsichtig vom Stoff abgekratzt.

Alle biologischen Proben (*Trichoderma* Sporen und Mycel sowie *Rhizoctonia*) wurden in Cryovials aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Wachstumsexperiment

Bei diesem Experiment handelte es sich um einen miniaturisierten Konfrontation-Assay mit dem Ziel die mycoparasitäre Interaktion zwischen *Trichoderma* und *Rhizoctonia* zu analysieren. Um diese Interaktion untersuchen zu können, war es nötig die beiden Pilze direkt auf einem Target miteinander zu konfrontieren.

Im ersten Schritt musste eine dünne Schicht des Wachstumsmedium (hier 39g/L PDA), auf das ITO-Target (Indium-Zinn-Oxid beschichtete Glas-Platte) aufgebracht werden. Dazu wurde das Target leicht schräg gehalten und das noch heiße, autoklavierte PDA vorsichtig darüber gegossen oder auf das waagrecht gehaltene Target pipettiert.

Im zweiten Schritt wurde je ein kleines Stück der zuvor separat kultivierten Pilze (siehe oben) in einem Abstand von ca. 1-2 cm voneinander auf dem Target platziert (Abbildung 15).

Um ein Austrocknen des PDA und der Pilze während des Wachstums zu verhindern, wurde in einer Petrischale ein Filterpapier mit etwas Wasser befeuchtet, das präparierte Target mit zwei Abstandhaltern (Zahnstocher oder Deckel eines kleinen Eppendorfgefäßes) darauf platziert (Abbildung 15) und bei 28°C in den Inkubator gestellt.



Abbildung 15: Aufbringung von *Trichoderma* (rechts) und *Rhizoctonia* (links) in unterschiedlichen Abständen auf ITO-Targets inkl. Platzierung dieser in Petrischalen

Von Interesse von zwei unterschiedlichen Zeitpunkte der Interaktion zwischen *T.atroviride* und *R.solani*:

- a) Nahe zusammengewachsen ohne direkten Kontakt (Abbildung 16)
- b) Deutlich übereinander gewachsen (Abbildung 17)

Sobald der gewünschte Wachstumsfortschritt erreicht war, wurde das Target sofort auf -70°C abgekühlt (und auch bei dieser Temperatur gelagert), um den Metabolismus so schnell wie möglich zu stoppen.

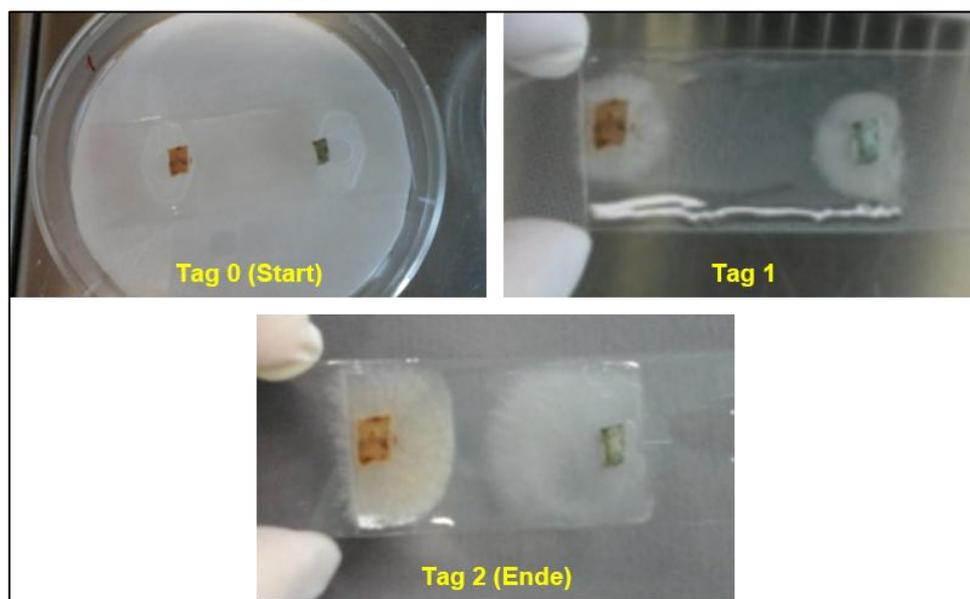


Abbildung 16: Fotoserie der Konfrontation von *R.solani* (rechts) mit *T.atroviride* (links); Abbruch bevor sich die Hyphen berühren

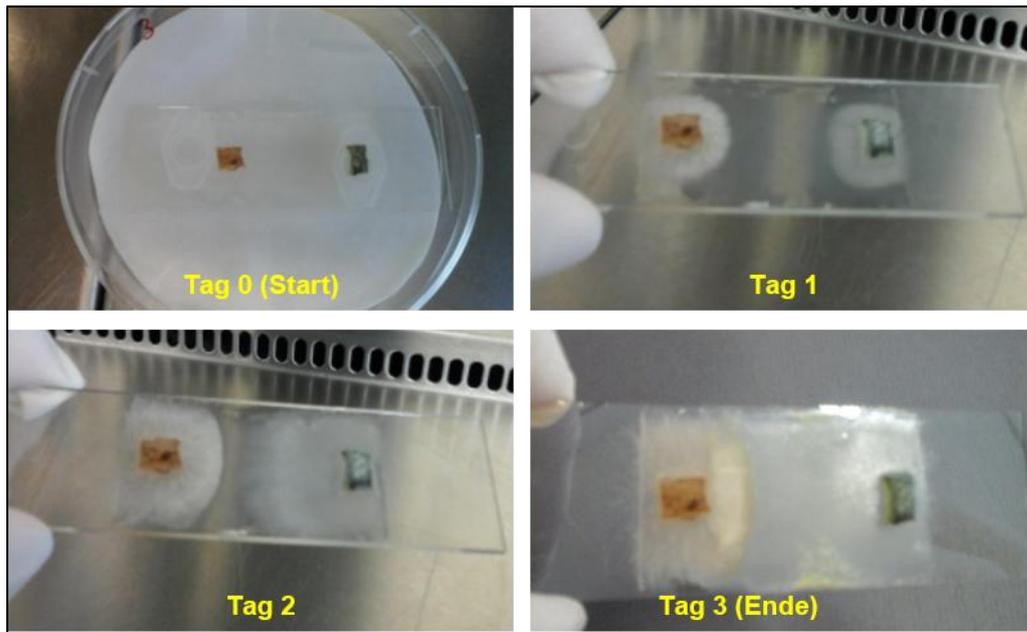


Abbildung 17: Fotoserie der Konfrontation von *R.solani* (rechts) mit *T.atroviride* (links); Abbruch nachdem sich Hyphen überlagern

2.2.2 Probenvorbereitung

Die biologischen Proben mussten vor der Verwendung gewaschen werden um das restliche Wachstumsmedium sowie Verunreinigungen zu entfernen. Dazu wurde im ersten Schritt das jeweilige Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut.

50 μL der *Trichoderma*-Sporensuspension wurde mit 100 μL Wasser (UHQ) versetzt, bei 10 000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und das Pellet zum Schluss in 100 μL Wasser resuspendiert.

Die Aufbereitung des *Trichoderma* Mycels war ähnlich. 20-30 mg Biomasse wurden eingewogen, dreimal mit 1 mL Wasser bei 13 000 rpm für 4 min zentrifugiert und das Pellet in 1 mL Wasser resuspendiert.

Rhizoctonia bildete bei der Ernte spanartige Splitter, so dass es nicht möglich war das Mycel zu suspendieren. Daher wurden die Splitter mit Hilfe von zwei Pinzetten zerteilt und in einem Eppendorfgefäß mit 1 mL Wasser vermischt.

Wachstumsexperiment

Die Vorbereitung für das Wachstumsexperiment bestand darin, das ITO-Target in einem Exsiccator für 2 Stunden aufzutauen und zu trocknen.

2.3 Matrixsystem und Probenaufbringung

Auf der Suche nach dem passenden Matrixsystem wurden Vorversuche mit folgenden 3 Matrices durchgeführt:

- α -Cyano-4-hydroxy Zimtsäure (α -Cyano-4-hydroxy cinamic acid, CHCA)
- Sinapinsäure (sinapic acid, SA)
- 2,5-Dihydroxybezoensäure (2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB)

Alle Matrices wurden in einem Gemisch aus Acetonitril (ACN) und Wasser mit TFA in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst (siehe Tabelle 4).

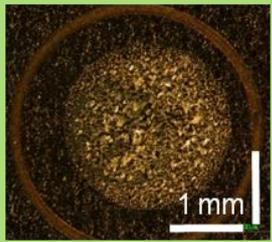
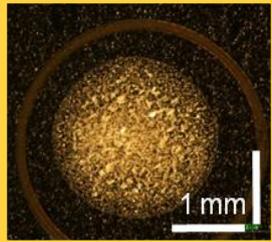
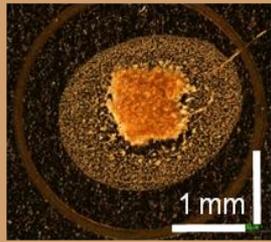
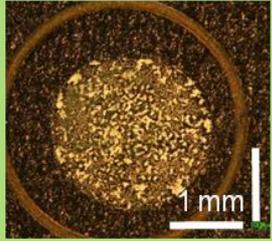
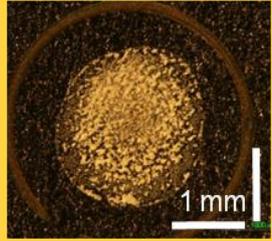
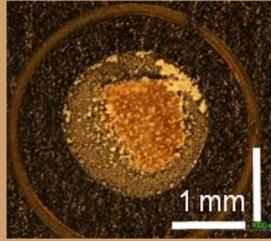
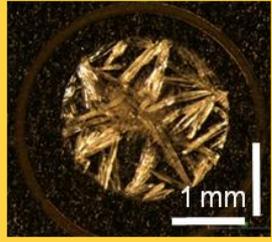
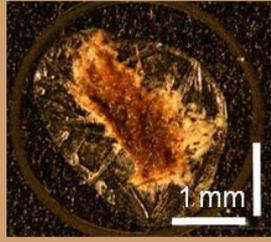
Tabelle 4: Unterschiedliche Zusammensetzungen der Matrix

Matrix	Konzentration [mg/mL]	ACN / Wasser mit TFA; %TFA in Wasser
CHCA	30	1/1; 0,1%
	3	
	3	1/1; 0,5%
SA	10	1/1; 0,1%
DHB	20	1/1; 0,1% bzw. 2/1; 0,1%
	30	
	40	
	50	
	60	
	70	
	80	
	90	
	100	
	400	

Laut Aufgabenstellung sollte im Rahmen dieser Arbeit ein System entwickelt werden, um auf einem Target gewachsene Pilze direkt analysieren zu können. Aus diesem Grund kamen nur noch jene Matrixauftragungstechniken in Frage, bei welchen die Probe vor der Matrix aufgebracht wird, wobei in dieser Arbeit die Dünnschicht-Technik (siehe 1.3.1) verwendet wurde. Im Fall von *Trichoderma* wurde je 1 μ L der Sporen- bzw. Mycel-Suspension auf das Target pipettiert, getrocknet und mit 1 μ L Matrix überschichtet. Da die Stücke von *Rhizoctonia* (siehe 2.2.2) nicht pipettiert werden konnten, wurden kleine, flache Stücke des Pilzes mit Hilfe einer Pipettenspitze vorsichtig auf das Target aufgebacht und nach dem Trocknen ebenfalls mit 1 μ L Matrix überschichtet.

Tabelle 5 zeigt eine exemplarische Übersicht des unterschiedlichen Aussehens und Kristallisationsverhaltens der mit Matrix überschichteten Pilzen. Der deutlichste Unterschied der Matrices liegt in der Ausbildung von großen, nadelförmigen Kristallen von DHB, welche ausgehend vom Rand des Tropfens in die Mitte hinein wachsen. Dagegen bilden CHCA und SA nur kleine Kristalle aus, wodurch eine gleichmäßigere Verteilung über die gesamte Probe erreicht wird.

Tabelle 5: Mikroskopische Betrachtung der mit unterschiedlichen Matrix überschichteten Pilze

	<i>Trichoderma</i> Sporen	<i>Trichoderma</i> Mycel	<i>Rhizoctonia</i>
10 mg/mL SA (1/1; 0,1)			
30 mg/mL CHCA (1/1; 0,1%)			
80 mg/mL DHB (1/1; 0,1%)			

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Optimierung des Probe-Matrix-Systems

Der erste Schritt der Arbeit bestand darin, eine geeignete Matrix zu finden und damit das Probe-Matrix-System so zu optimieren, sodass alle biologischen Proben (*Trichoderma* sowohl Sporen und Mycel und *Rhizoctonia*) unter denselben Bedingungen gemessen werden können. Dies ist erforderlich um im späteren Verlauf des Projektes die Konfrontations-Versuche analysieren zu können.

In dieser Arbeit wurden 3 Matrices (CHCA, SA, DHB) mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen ausprobiert. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die im Folgenden angeführten Vergleiche der Ergebnisse, wobei die rot markierten Bedingungen jeweils das optimalste Matrixsystem eines jedes Vergleiches darstellt.

Tabelle 6: Überblick der folgenden Vergleiche unterschiedlicher Matrices und Matrixkonzentrationen (rot: optimalste Matrix des jeweiligen Vergleiches)

Matrix	Konzentration (µg/mL)	TFA in Wasser [%]	Abbildung							
			18	19	20	21	22	23	26	
CHCA	30	0,1	x	X						x
	3		x	x						
	3	5,0	x	x						
SA	10	0,1	x	x						
DHB	20	0,1			x					
	30				x					
	40					x				
	50					X			x	
	60					x				
	70					x				
	80							X	X	X
	90							x		
	100							x		
	400							X	x	
Verwendeter Modus vom TOF			Reflektor	Linear						
Ionenmodus			Positiv	Positiv						

3.1.1 Vergleich von 3 verschiedenen CHCA- und einer SA-Konzentration

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Messungen, welche mit CHCA bzw. SA als Matrix im positiven Reflektor-Modus im Massenbereich von 500 bis 3500 Da durchgeführt wurden. Es ist zu erkennen, dass die meisten Peaks von *Trichoderma* (sowohl Sporen als auch Mycel) in der Region der Matrix-Peaks auftreten. *Rhizoctonia* hingegen zeigt Signale außerhalb des Matrix-Peak-Bereichs, allerdings mit einer 10-fach geringeren Intensität im Vergleich zu jenen von *Trichoderma*.

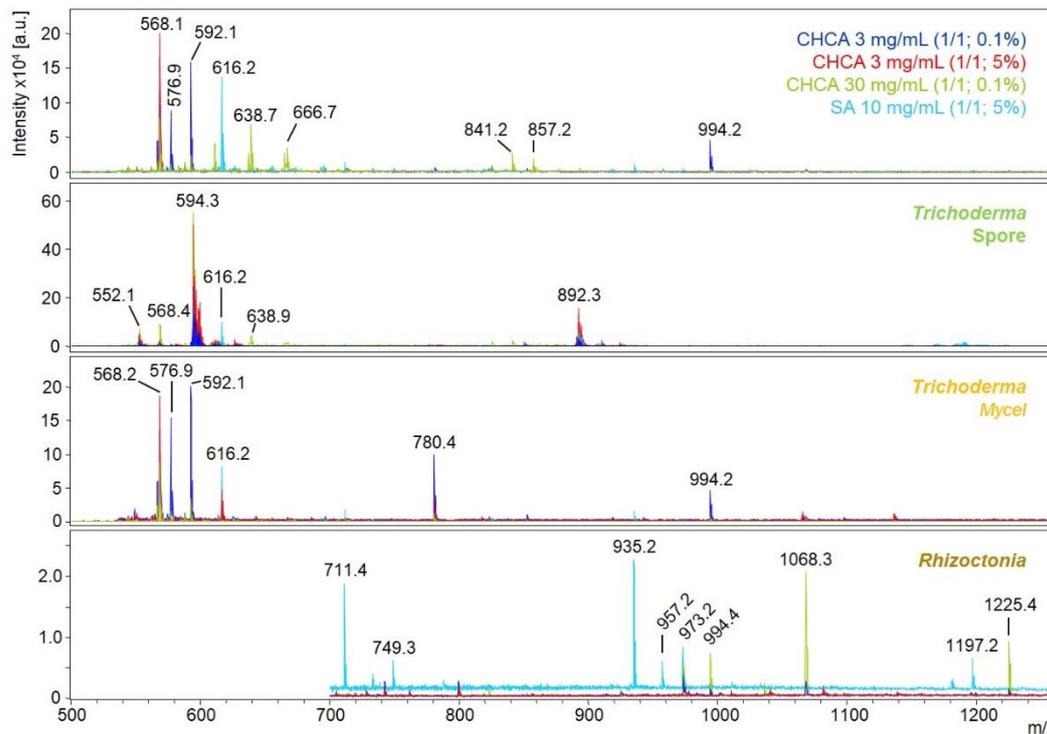


Abbildung 18: Vergleich der Ergebnisse von CHCA 3 bzw. 30 mg/mL (1/1; 0,1%), CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) und SA 10 mg/mL (1/1; 5%); (Modus: reflectron positiv; Massenbereich: 500 – 3500 Da)

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich ist, generiert im Massenbereich zwischen 2 und 20 kDa weder CHCA noch SA Peaks, womit alle auftretenden Signale ausschließlich von den Proben stammen müssen. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Messungen in diesem Massenbereich durchgeführt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von *Trichoderma* (sowohl Sporen als auch Mycel) ist zu erkennen, dass die Verwendung von SA zu einer geringeren Signalintensität führt. Der Vergleich der *Sporen*-Ergebnisse zeigt, dass die Verwendung von CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) und CHCA 3 mg/mL (1/1; 0,1%) in ähnlichen m/z-Werten und Intensitäten resultiert. Mit CHCA 30 mg/mL (1/1; 0,1%) als Matrix werden für diese Proben

bei m/z 857,5; 7523,1 und 17159,2 die höchsten Intensitäten erzielt. Im Vergleich der Ergebnisse des **Mycels** ist zu erkennen, dass CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) in weniger Peaks mit geringerer Intensität resultiert als mit den beiden andern CHCA-Konzentrationen. Wird hingegen CHCA 3 mg/mL (1/1; 0,1%) bzw. CHCA 30 mg/mL (1/1; 0,1%) als Matrix verwendet, führt dies zu einem ähnlichen Pattern mit dem einzigen Unterschied, dass m/z 8325,2 nur mit letzterer existiert.

Die Betrachtung der **Rhizoctonia**-Ergebnisse zeigt, dass sowohl Anzahl als auch Intensität der Peaks mit folgender Reihenfolge der Matrices steigt: CHCA 3 mg/mL (1/1; 0,1%), SA 10 mg/mL (1/1; 5%), CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%), CHCA 30 mg/mL (1/1; 0,1%).

Als Ergebnis aus diesem Vergleich geht CHCA 30 mg/mL (1/1; 0,1%) als Optimum hervor, unter der Beachtung, dass Messungen von *Trichoderma* Sporen unter diesen Bedingungen zu einer 10-fach höheren Intensität führt als jene von *Rhizoctonia*.

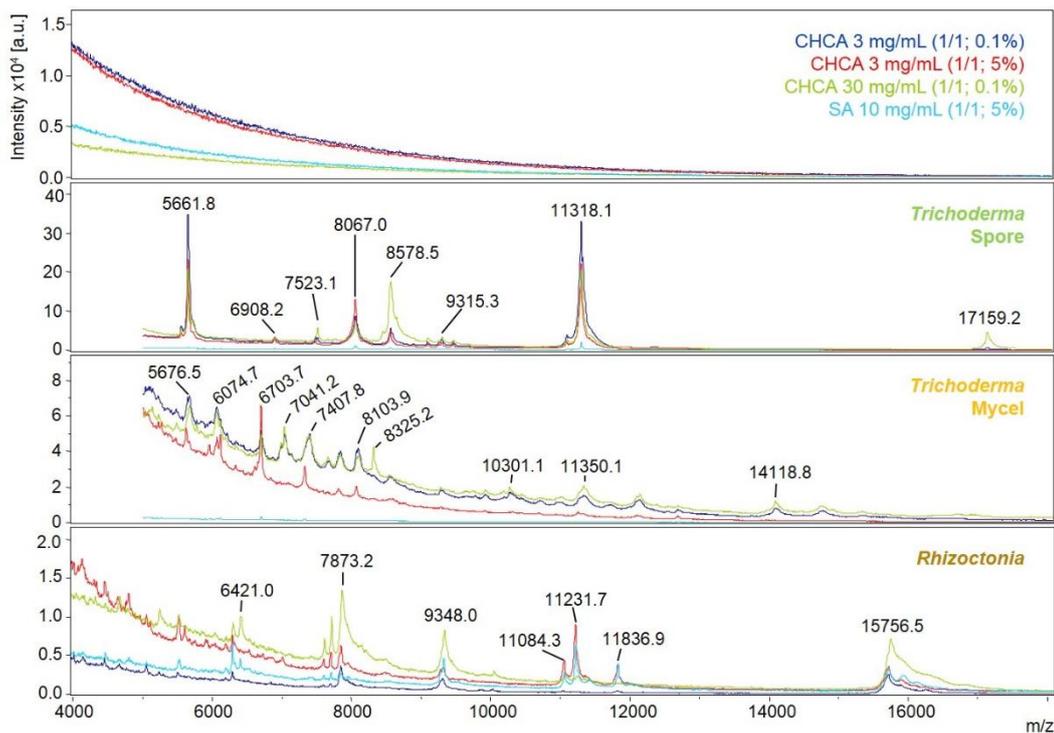


Abbildung 19: Vergleich der Ergebnisse von CHCA 3 bzw. 30 mg/mL (1/1; 0,1%), CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) und SA 10 mg/mL (1/1; 5%); (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

3.1.2 Vergleich verschiedener DHB - Konzentrationen

Für große Proteine werden laut Theorie [23] eher SA oder DHB als Matrix verwendet. Aufgrund der geringen Intensitäten mit SA (Abbildung 19) wurden in weiterer Folge Messungen mit unterschiedlichen DHB-Konzentrationen im Massenbereich von 2-20 kDa durchgeführt. DHB generiert, wie in Abbildung 20 bis Abbildung 22 zu sehen ist, in diesem Bereich keinen Matrix-Peaks.

Die Verwendung von **DHB 20** mg/mL (1/1; 0,1%) bzw. **DHB 30** mg/mL (1/1; 0,1%) führt zwar für *Trichoderma* zu Signalen, wohingegen *Rhizoctonia* mit diesen Konzentrationen keine bzw. kaum Peaks mit geringer Intensität zeigt (Abbildung 20).

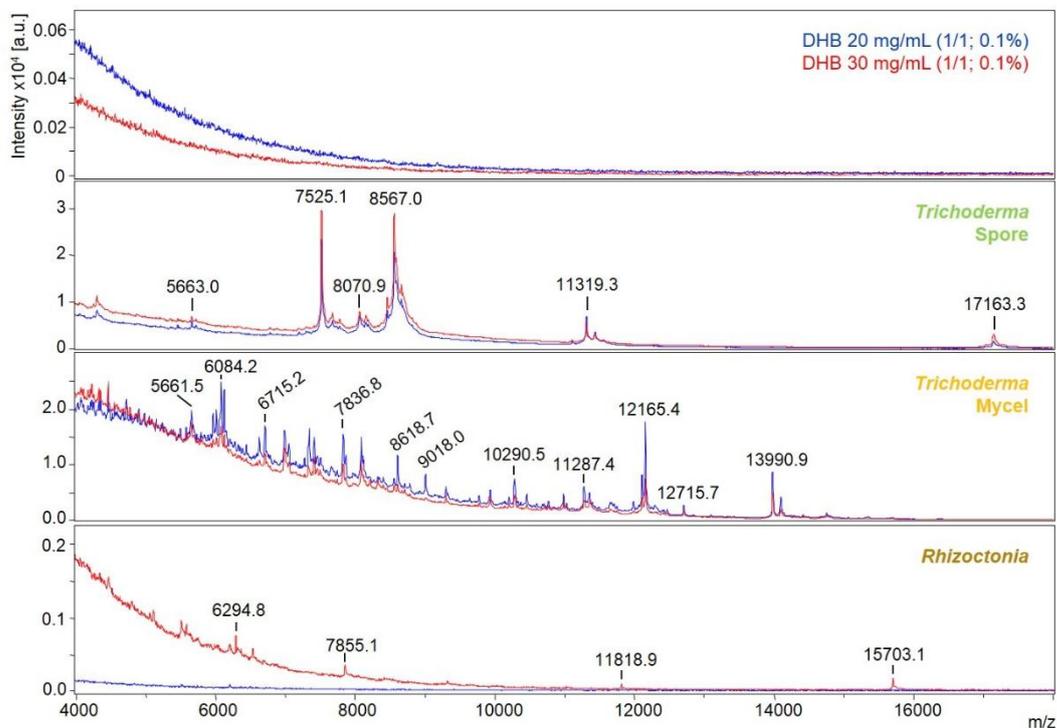


Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse von DHB 20 mg/mL (1/1; 0,1%) und DHB 30 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist führt die Verwendung von **DHB 40, 50, 60 und 70** mg/mL (1/1; 0,1%) für jeden Pilz an sich (*Trichoderma* Sporen und Mycel, *Rhizoctonia*) zu ähnlichen m/z-Werten.

Werden die Spektren von ***Trichoderma Spore*** verglichen, so ist zu erkennen, dass alle Konzentrationen zu ähnlichen Intensitäten führen, wobei m/z 17145,0 nur mit DHB 40 bzw. 50 mg/mL (1/1; 0,1%) erhalten wird.

Die Verwendung der Matrix mit einer DHB-Konzentration von 50 mg/mL führt für **Trichoderma Mycel** zur höchsten Intensität, während mit 40 mg/mL die geringste Intensität erzielt wird.

Werden Ergebnisse von **Rhizoctonia** betrachtet so ist zu erkennen, dass es einige Unterschiede in der Peak-Erscheinung gibt. Für m/z 11041,2 wurde die höchste Intensität unter Verwendung von DHB 40 mg/mL (1/1; 0,1%) erreicht, während für m/z 15703,1 DHB 70 mg/mL (1/1; 0,1%) als Matrix nötig ist. Mit DHB 50 mg/mL (1/1; 0,1%) wurden alle Peaks detektiert, allerdings mit geringeren Intensitäten.

Dieser Vergleich würde DHB 50 mg/mL (1/1; 0,1%) als optimalste Matrix identifizieren.

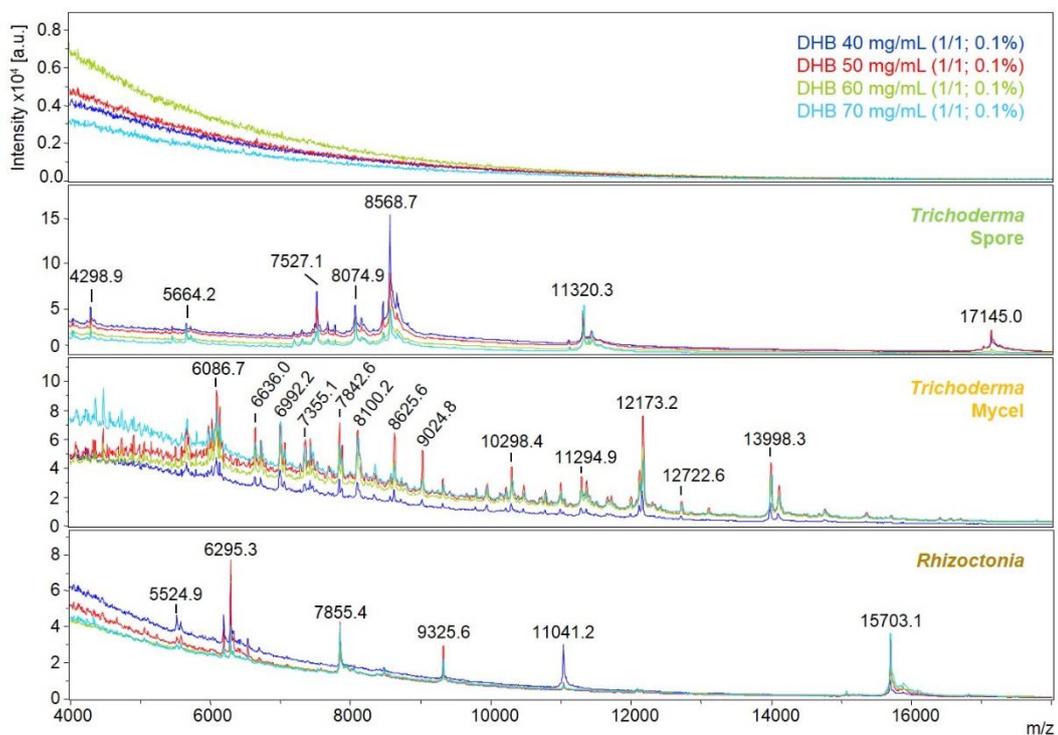


Abbildung 21: Vergleich der Ergebnisse von DHB 40, 50, 60 bzw 70 mg/mL (1/1; 0,1%)
(Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Experimente bei welchen **DHB 80, 90, 100 und 400** mg/mL (1/1; 0,1%) als Matrix-System verwendet wurde.

Im Vergleich der **Trichoderma Spore**-Spektren ist zu erkennen, dass die Verwendung der höchsten DHB-Konzentration zu einer geringeren Intensität der Peaks (außer m/z 17166,3) und einem Verlust des Signals bei m/z 8079,5 führt. Die anderen drei, in diesem Vergleich angeführten, DHB-Konzentrationen führen zu nahezu identen Spektren.

Für ***Trichoderma Mycel*** liegt der einzige Unterschied zwischen der Verwendung von DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) und DHB 50 mg/mL (1/1; 0,1%) in der deutlich höheren Intensität von m/z 8353,5 mit zweitgenannter Matrix-Konzentration.

Wie aus der Abbildung für ***Rhizoctonia*** ersichtlich ist, werden mit DHB 100 mg/mL (1/1; 0,1%) die höchsten Intensitäten erzielt, während DHB 400 mg/mL (1/1; 0,1%) zu einer größeren Anzahl an Peaks führt.

Nach diesem Vergleich wären sowohl DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) als auch DHB 400 mg/mL (1/1; 0,1%) als optimale Matrix möglich.

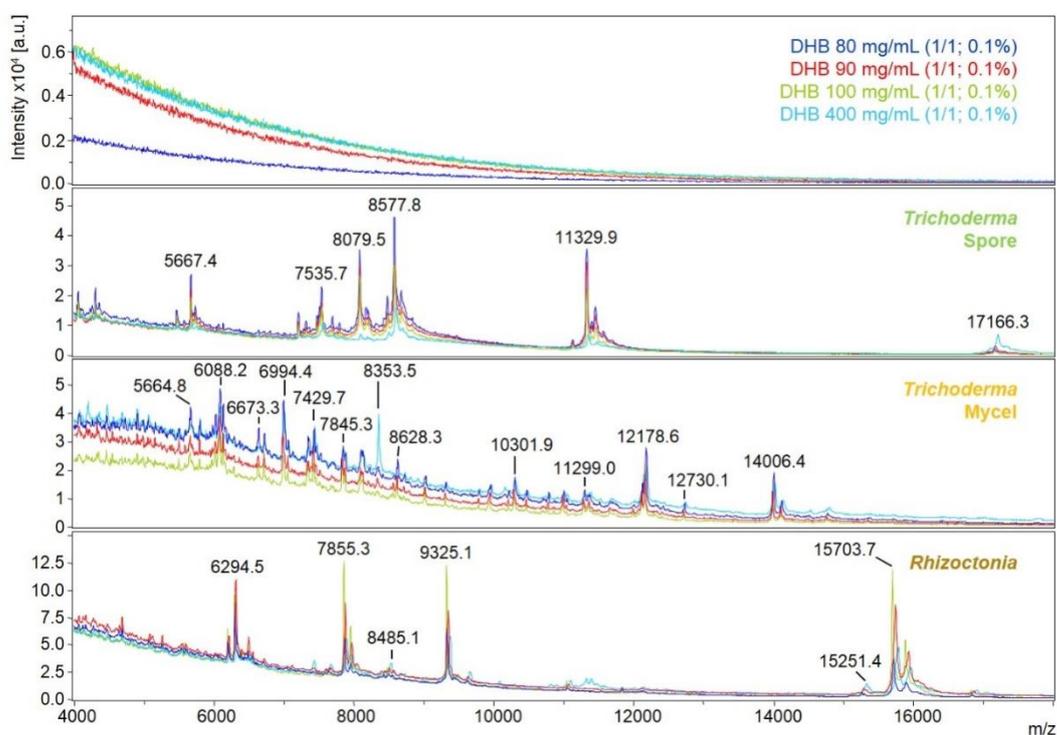


Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80, 90, 100 bzw 400 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

Bisher wurden drei DHB-Konzentrationen (50, 80 und 400 mg/mL) als mögliches Optimum ermittelt und werden nun im Anschluss verglichen (Abbildung 23).

Das Matrix-System mit einer **DHB-Konzentration von 400 mg/mL** wäre für *Rhizoctonia* optimal, da nur mit diesem die Peaks mit m/z 7435,0 und 11328,2 auftreten. Allerdings ist mit dieser Matrixzusammensetzung ein Intensitätsverlust der Peaks für *Trichoderma*, sowohl Sporen als auch Mycel, sowie der Verlust des *Trichoderma* Sporen-Peaks bei m/z 8075,9 erkennbar.

Der Vergleich zeigt deutlich, dass die Verwendung von **DHB 50 mg/mL** (1/1; 0,1%) bei *Trichoderma* zu den höchsten Intensitäten führt, und m/z 17146,6 deutlich erkennbar ist. Allerdings kommt es mit diesem System bei *Rhizoctonia* zu einem Signalverlust.

Die Verwendung von **DHB 80 mg/mL** (1/1; 0,1%) führt für *Rhizoctonia* zu ähnlichen Resultaten wie die Verwendung von DHB 400 mg/mL (1/1; 0,1%) aber zu geringen Intensitäten im Vergleich zu *Trichoderma* Spore und Mycel als die Verwendung als mit einer DHB-Konzentration von 50 mg/mL.

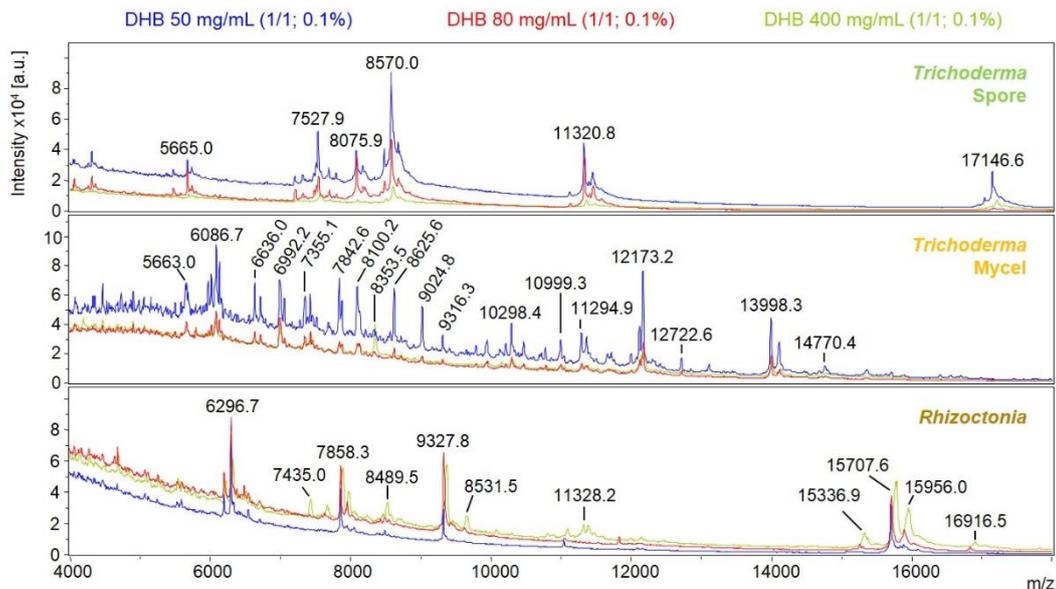


Abbildung 23: Vergleich der Ergebnisse von DHB 50, 80 bzw 400 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

Auf Basis dieses Vergleiches ist es schwer zu entscheiden ob nun DHB 50 mg/mL (1/1; 0,1%) oder DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) die optimale Matrix ist.

Daher wurden diese beiden Systeme zusätzlich mittels PCA (Kapitel 1.4.1) und HCA (Kapitel 1.4) verglichen (siehe Abbildung 24).

Der Vergleich zwischen den ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) der PCA zeigt, dass der Abstand zwischen den Spots bei DHB 50 mg/mL, vor allem für *Trichoderma* Mycel, größer ist als bei der Verwendung von 80 mg/mL DHB.

Die Klassifizierung (mittels HCA) in drei Gruppen (*Trichoderma* Sporen bzw. Mycel und *Rhizoctonia*) erfolgt mit beiden Matrices korrekt, wobei mit DHB 80 mg/mL die Distanzen innerhalb der Klassen kürzer und zwischen den Klassen länger sind.

Aus diesem Vergleich (und allen vorhergehenden) geht DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) als geeignete Matrix aller probierten DHB-Konzentrationen hervor.

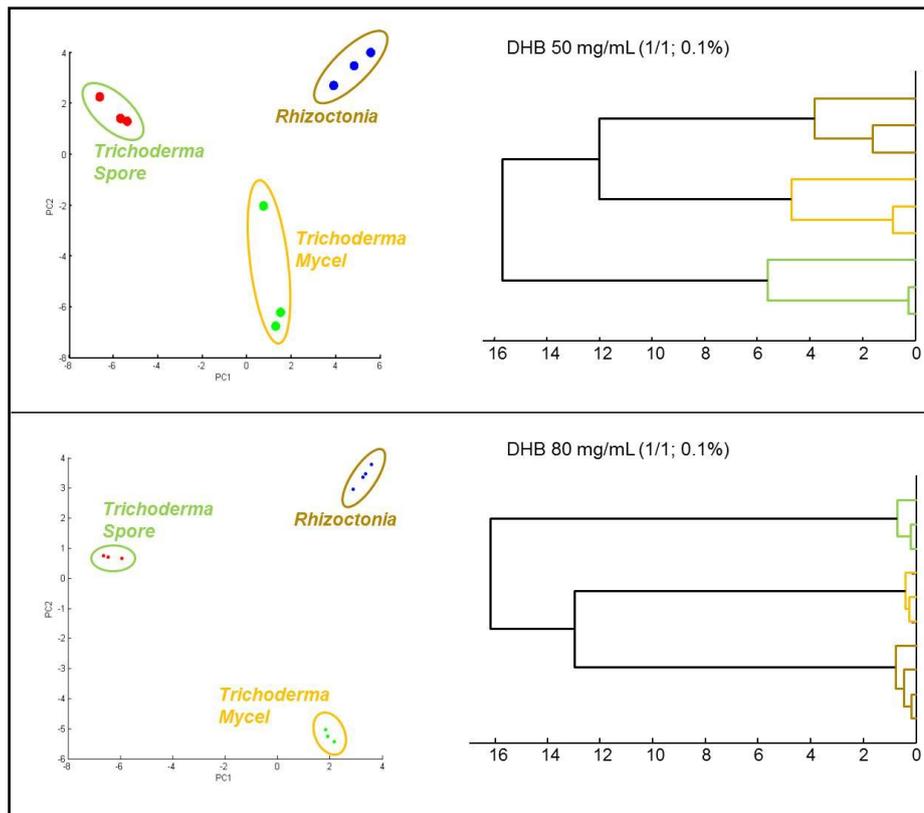


Abbildung 24: Vergleich der Messergebnisse von DHB 50 bzw. 80 mg/mL (1/1; 0,1%) mittels PCA (rechts) und HCA (links)

Für alle DHB-Konzentrationen wurden Messungen sowohl mit 1/1 als auch 2/1 als Verhältnis von ACN zu Wasser mit TFA durchgeführt, wobei kein Unterschied in den Massenspektren erkannt werden konnte. Dies ist für DHB 80 mg/mL exemplarisch in (Abbildung 25) dargestellt.

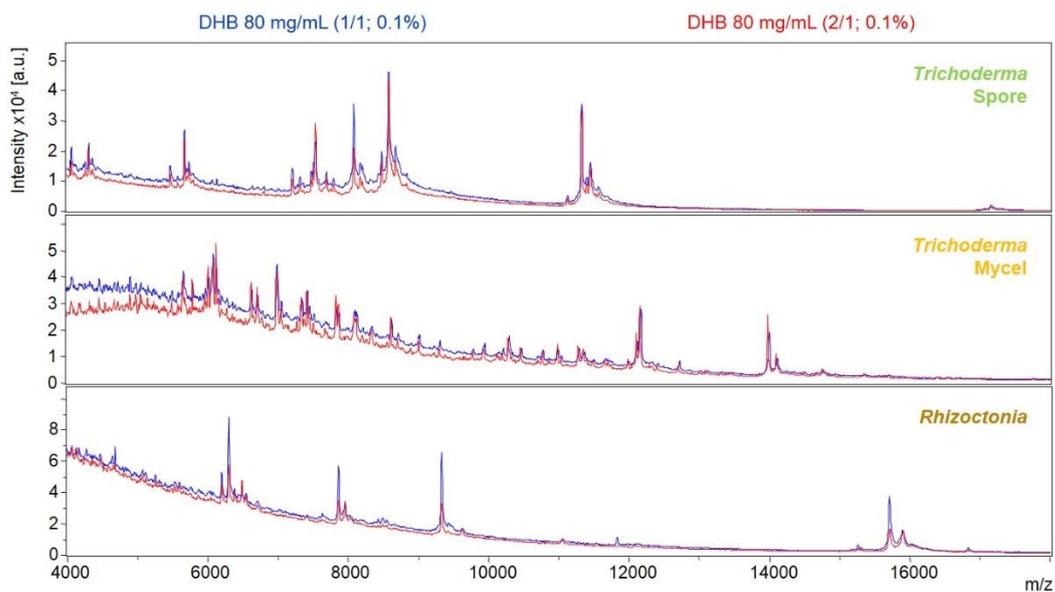


Abbildung 25: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) und DHB 80 mg/mL (2/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

3.1.3 Vergleich der optimalen CHCA- und DHB – Konzentration

Wie schon erwähnt, führt die Verwendung von **CHCA 30mg/mL** (1/1; 0,1%) zu einer zehnfach (*Trichodermaspore*) bzw. dreifach (*Trichodermamycel*) erhöhten Intensität im Vergleich zu *Rhizoctonia*.

Im Gegensatz dazu werden mit **DHB 80 mg/mL** (1/1; 0,1%) als Matrix Ergebnisse in einem vergleichbaren Intensitätsbereich (0 bis $8 \cdot 10^4$) erhalten. Der Vergleich dieser beiden Matrices (Abbildung 26) zeigt auch, dass mit DHB 80 mehr *Trichoderma Mycel*- und *Rhizoctonia* – Signale erzeugt werden.

Aus diesem Grund ergibt sich DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) als optimale Matrix um sowohl *Trichoderma* (Sporen und Mycel) als auch *Rhizoctonia* unter denselben Bedingungen analysieren zu können.

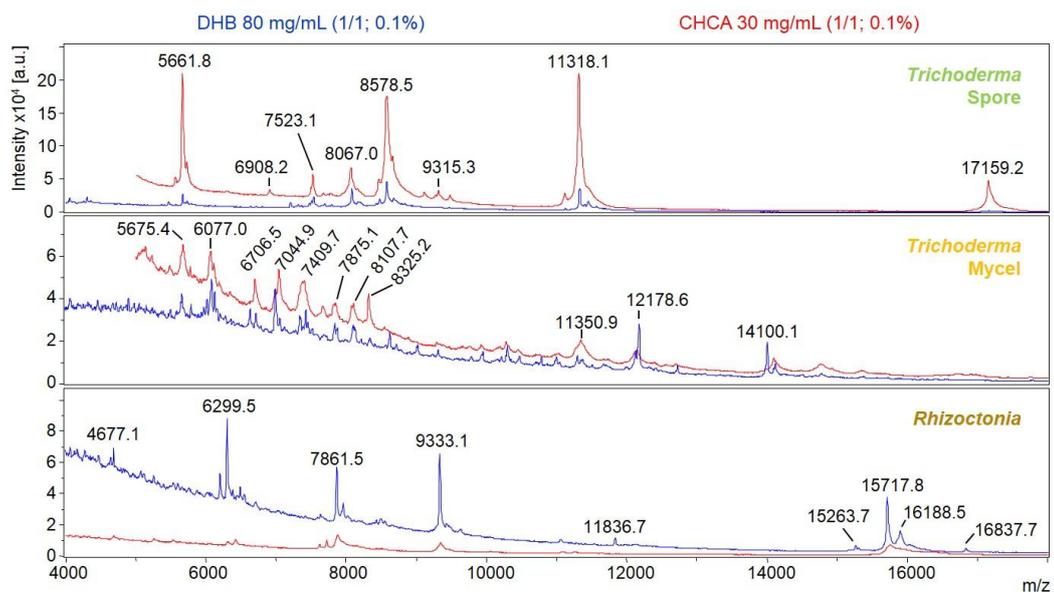


Abbildung 26: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) und CHCA 30 mg/mL (2/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)

3.2 Reproduzierbarkeit der Messungen

3.2.1 Vergleich der biologischen Ansätze

Als erstes wurde die Reproduzierbarkeit des biologischen Wachstums der Pilze überprüft. Dazu wurden *Trichoderma* Spore und Mycel jeweils zweimal und *Rhizoctonia* dreimal angesetzt und anschließend die daraus resultierenden Spektren verglichen. Diese Überprüfung wurde durchgeführt, noch bevor die optimale Matrix gefunden wurde. Daher wurden alle Messungen mit CHCA 30 mg/mL (1/1; 0,1%) als Matrix im linear positiven Modus im Massenbereich von 2-20 kDa durchgeführt. Die Anzahl der jeweiligen Messungen pro biologischen Ansatz kann aus Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Datenmengen zum Vergleich der biologischen Ansätze

	Ansatz Nr.	Datum der Ernte	Anzahl der Messungen
<i>Trichoderma</i> Spore	1	03.12.2014	3
	2	15.06.2015	4
<i>Trichoderma</i> Mycel	1	05.12.2014	3
	2	17.06.2015	4
<i>Rhizoctonia</i>	1	30.03.2015	7
	2	08.08.2015	4
	3	10.09.2015	3

Die Abbildungen 27, 28 und 29 zeigen jeweils die Spektren als Mittelwert aller zugehörigen Messungen. In allen ist ersichtlich, dass sich die Massenspektren der unterschiedlichen Ansätze kaum unterscheiden. Die Tabellen 8, 9 und 10 sind nur Ausschnitte der jeweiligen Peaktabellen (komplette Listen im Anhang). Aus jeder dieser Tabellen ist ersichtlich, dass für die verglichenen Ansätze immer die gleichen m/z-Werte gefunden wurden, wobei die Intensität und somit die Peakflächen geringfügig variieren. Damit sind sowohl die biologischen Ansätze von *Trichoderma* Spore und Mycel als auch jene von *Rhizoctonia* reproduzierbar.

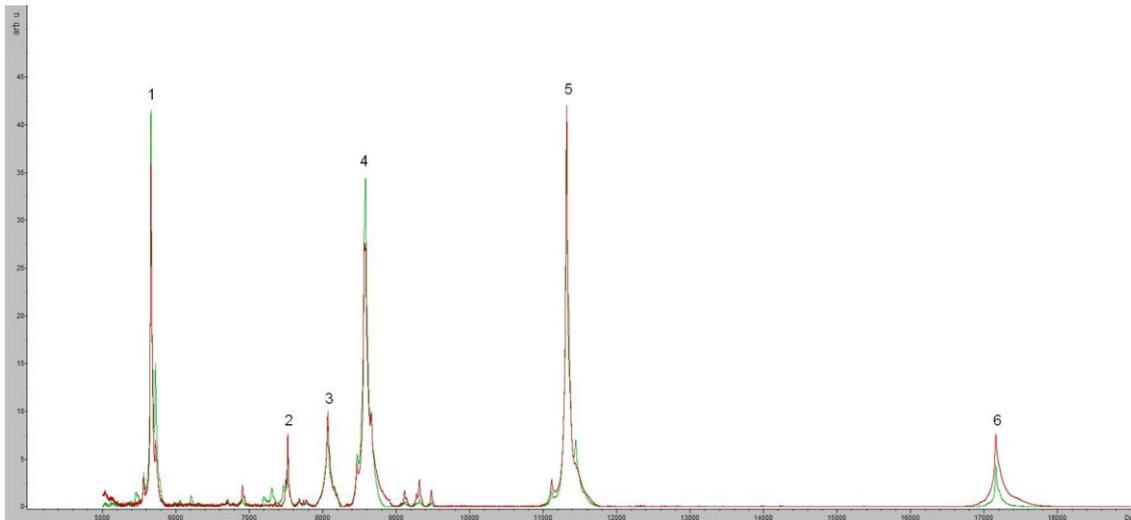
Abbildung 27: Vergleich der biologischen Ansätze von *Trichoderma* Spore (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz)

Tabelle 8: Ergebnistabelle zu Abbildung 27

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche		Differenz der Peakflächen	Standardabweichung	
		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)
1	5661	36,35	41,78	5,43	12,58	8,32
2	7524	7,76	5,25	2,5	1,13	4,09
3	8068	10,25	8,57	1,68	4,31	1,25
4	8578	28,89	35,35	6,46	5,16	9,79
5	11319	42,09	38,48	3,61	13,85	10,18
6	17160	7,73	4,52	3,21	6,27	1,41

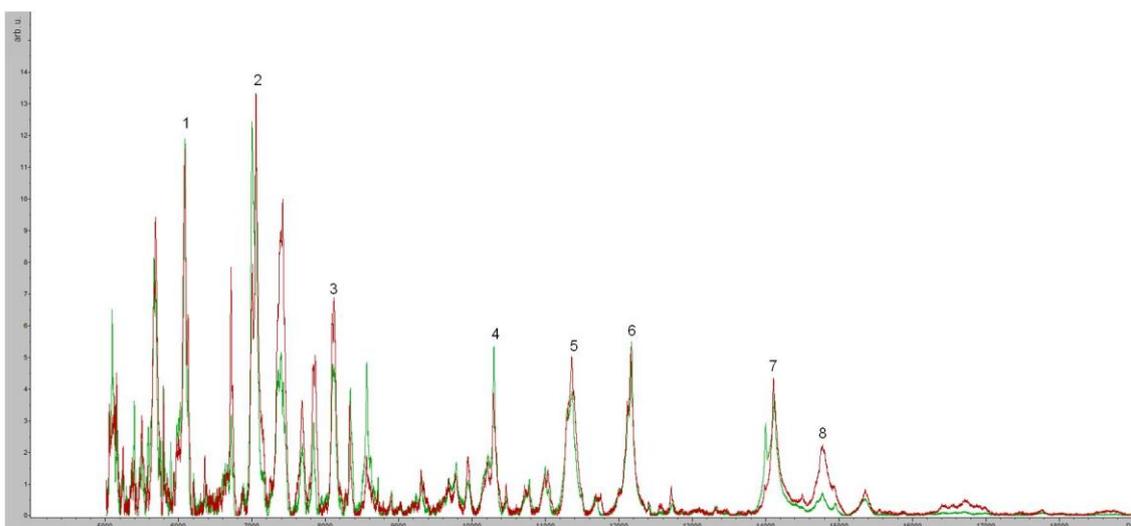
Abbildung 28: Vergleich der biologischen Ansätze von *Trichoderma* Mycel (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz)

Tabelle 9: Ergebnistabelle zu Abbildung 28

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche		Differenz der Peakflächen	Standardabweichung	
		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)
1	6078	11,75	12,62	1,45	3,84	0,86
2	7048	13,49	13,2	1,02	2,52	0,29
3	8110	7,12	5,4	1,62	2,86	1,72
4	10288	4,11	5,76	1,49	3,3	1,65
5	11294	3,66	3,67	0,45	2,2	0,01
6	12160	5,49	5,89	1,22	3,41	0,4
7	14106	4,49	4,2	0,25	2,85	0,29
8	14766	2,33	0,82	0,81	0,41	1,52

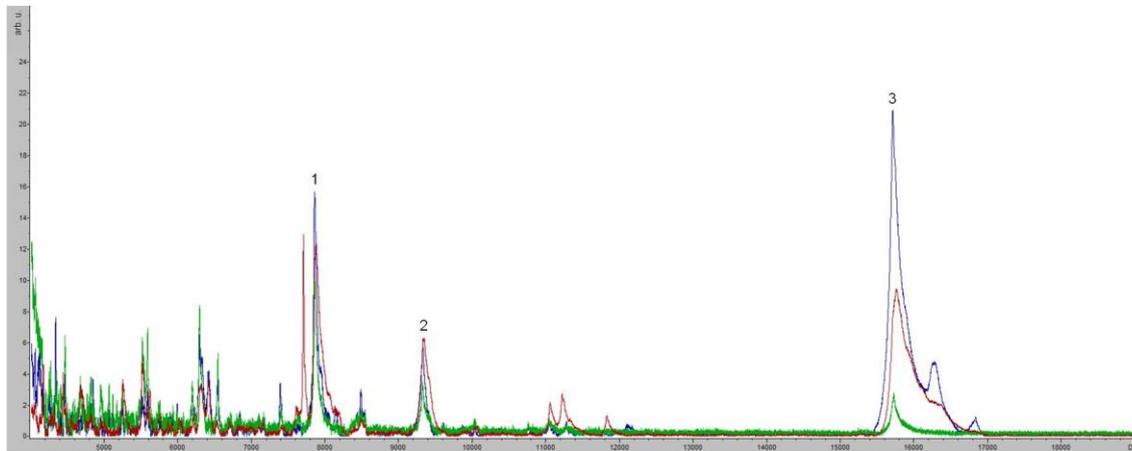
Abbildung 29: Vergleich der biologischen Ansätze von *Rhizoctonia* (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz, blau: 3. Ansatz)

Tabelle 10: Ergebnistabelle zu Abbildung 29

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche			Differenz	Standardabweichung		
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
1	7857	16,12	11,33	15,93	4,79	3,86	10,8	1,35
2	9325	7,45	4,14	6,2	3,31	3,31	2,71	3,24
3	15714	11,76	3,39	21,41	18,02	4,7	2,93	0,72

3.2.2 Vergleich verschiedener Aliquote

Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen von verschiedenen Aliquoten desselben biologischen Ansatzes wurde mit der optimierten Matrix, DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%), im linear positiven Modus im Massenbereich von 2-20 kDa durchgeführt. Die Anzahl der Messungen pro Aliquot kann Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Datenmengen zum Vergleich verschiedener Aliquote

	Ansatz (Erntedatum)	Aliquot Nummer	Anzahl Messungen
<i>Trichoderma Spore</i>	2 (15.6.2015)	1	3
		2	3
<i>Trichoderma Mycel</i>	2 (17.6.2015)	1	3
		2	3
<i>Rhizoctonia</i>	3 (10.9.2015)	1	4
		2	4

Die Abbildungen 30, 31 und 32 zeigen jeweils die Spektren als Mittelwert aller zugehörigen Messungen. Auch hier ist bereits optisch zu erkennen, dass sich die jeweiligen Massenspektren kaum unterscheiden. Die Tabellen 12, 13 und 14 geben wiederum nur einen Ausschnitt (komplette Peaktabellen im Anhang) und zeigen dass auch bei diesen Vergleichen die jeweils selben Massen detektiert wurden (mit geringen Intensitäts-/ Peakflächenunterschieden).

Somit kann gefolgert werden, dass weder das Aliquot noch der biologische Ansatz einen Einfluss auf die m/z -Werte des jeweiligen Massenspektrums für *Trichoderma* Spore, *Trichoderma* Mycel und *Rhizoctonia* hat.

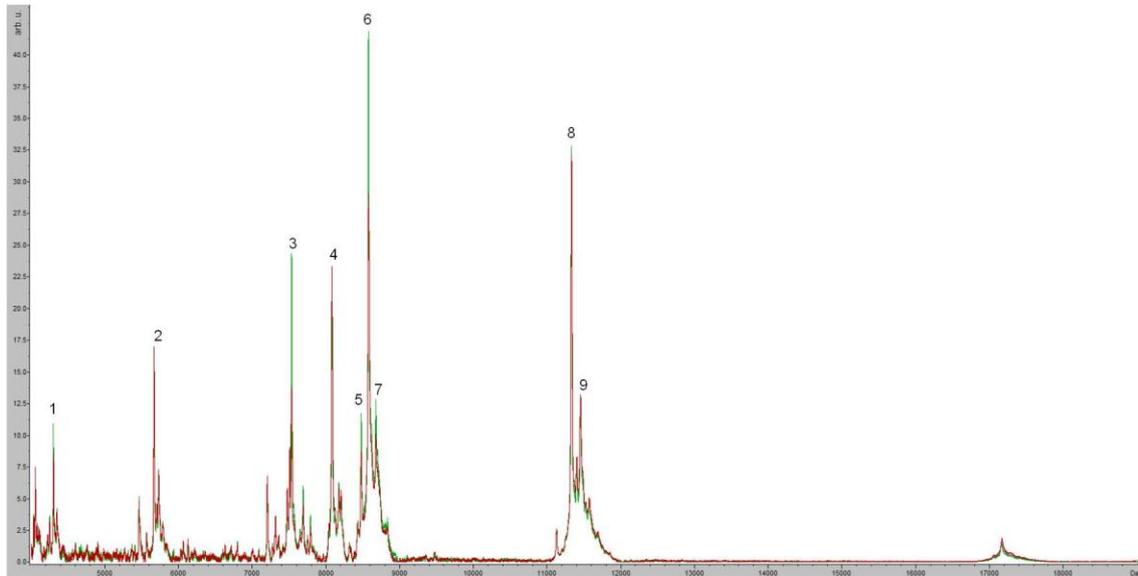
Abbildung 30: *Trichoderma* Spore: Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments

Tabelle 12: Ergebnistabelle zu Abbildung 30

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche		Differenz	Standardabweichung	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
1	4303	9,04	11,79	2,75	0,72	1,35
2	5668	17,57	17,32	0,25	0,84	1,49
3	7535	14,01	25,23	11,22	1,98	3,52
4	8082	24	19,67	4,33	1,98	2,96
5	8478	9,21	12,42	3,21	1,35	1,95
6	8578	30	43,15	13,15	5,39	7,54
7	8678	10,55	13,41	2,86	1,42	2,2
8	11331	32,43	33,45	1,02	3,49	6,03
9	11453	13,39	13,39	0,00	0,65	2,34

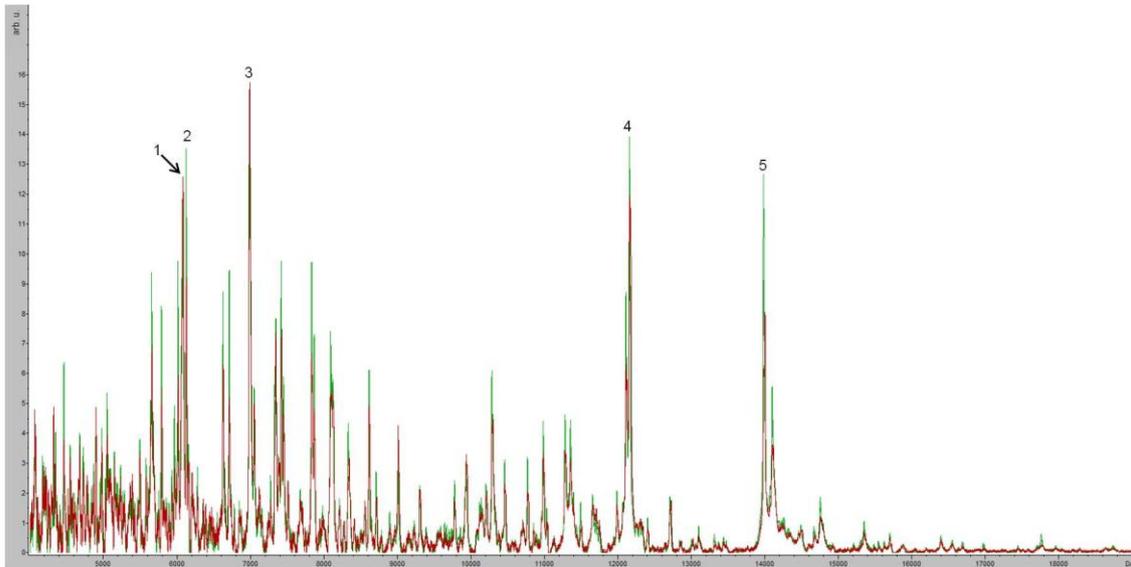
Abbildung 31: *Trichoderma* Mycel: Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments

Tabelle 13: Ergebnistabelle zu Abbildung 31

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche		Differenz	Standardabweichung	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
1	6081	14,38	12,68	1,71	0,29	1,54
2	6128	10,1	14,96	4,86	2,61	3,82
3	6991	15,94	14,75	1,18	1,77	0,43
4	12164	15,47	15,79	0,32	0,72	2,22
5	13991	9,83	15,1	5,27	2,55	1,15

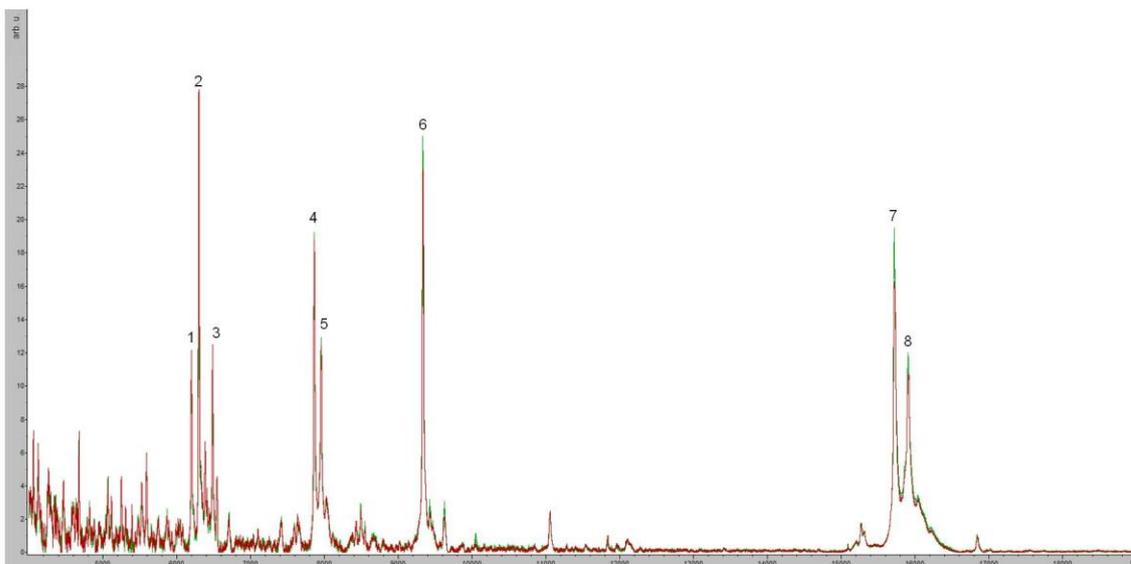
Abbildung 32: *Rhizoctonia*: Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments

Tabelle 14: Ergebnistabelle zu Abbildung 32

Markierung	m/z [Da]	Peakfläche		Differenz	Standardabweichung	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
1	6200	14,07	13,19	0,88	2,26	2,55
2	6300	32,42	28,48	3,94	6,36	6,48
3	6485	14,31	12,32	1,98	7,45	6,09
4	7862	23,51	22,31	1,2	4,69	6,33
5	7956	14,47	14,3	0,16	4,41	3,47
6	9333	29,21	28,52	0,69	6,12	11,92
7	15717	22,9	23,25	0,36	7,28	11,31
8	15904	13,4	13,87	0,47	2,81	1,95

3.3 Probenunterscheidung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nicht nur das Probe-Matrix-System optimiert werden, sondern auch eine mögliche Unterscheidung der drei Proben (*Trichoderma* Spore, *Trichoderma* Mycel und *Rhizoctonia*) gefunden werden. Dazu wurden alle Messungen, welche mit dem optimierten Matrix-System gemessen wurden miteinander verglichen.

Im ersten Schritt wurden jeweils zwei Klassen mit Hilfe der ROC-Kurven (Kapitel 1.4.3) bzw. der zugehörigen AUC-Werte verglichen. Dadurch ergeben sich folgende drei Vergleichspaarungen:

Trichoderma Spore – *Trichoderma* Mycel

Trichoderma Spore – *Rhizoctonia*

Trichoderma Mycel - *Rhizoctonia*

Die Abbildungen 33, 34 und 35 zeigen nur einen Ausschnitt der jeweils verglichenen Mittelwertspektren sowie den dazugehörigen Ausschnitt aus der Peaktabelle (komplette Tabellen siehe Anhang). In jedem dieser Vergleiche konnten die meisten der gefunden Peaks jeweils eindeutig (AUC = 1) einer der Klassen zugeordnet werden.

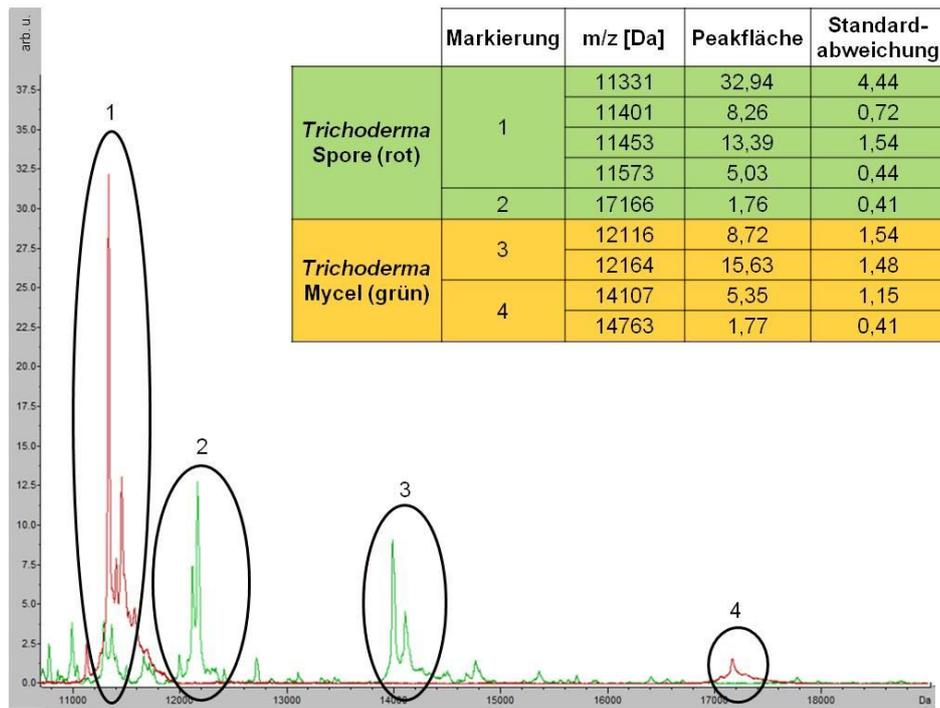


Abbildung 33: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma* Spore und Mycel; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen

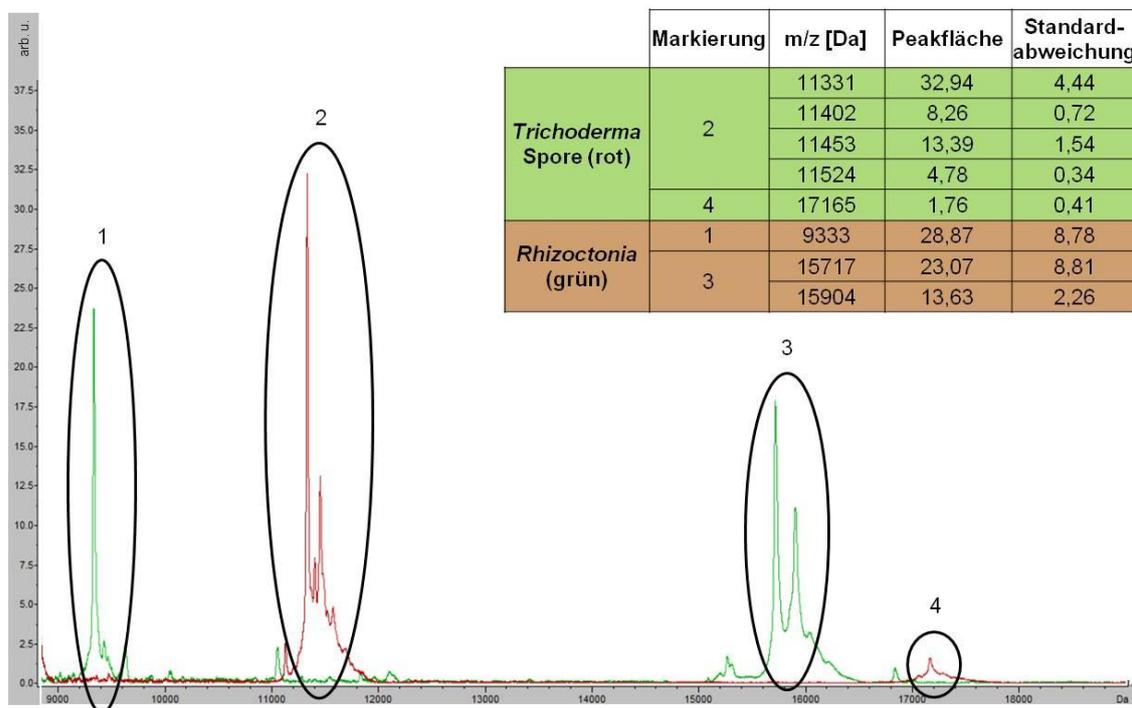


Abbildung 34: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma* Spore und *Rhizoctonia*; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen

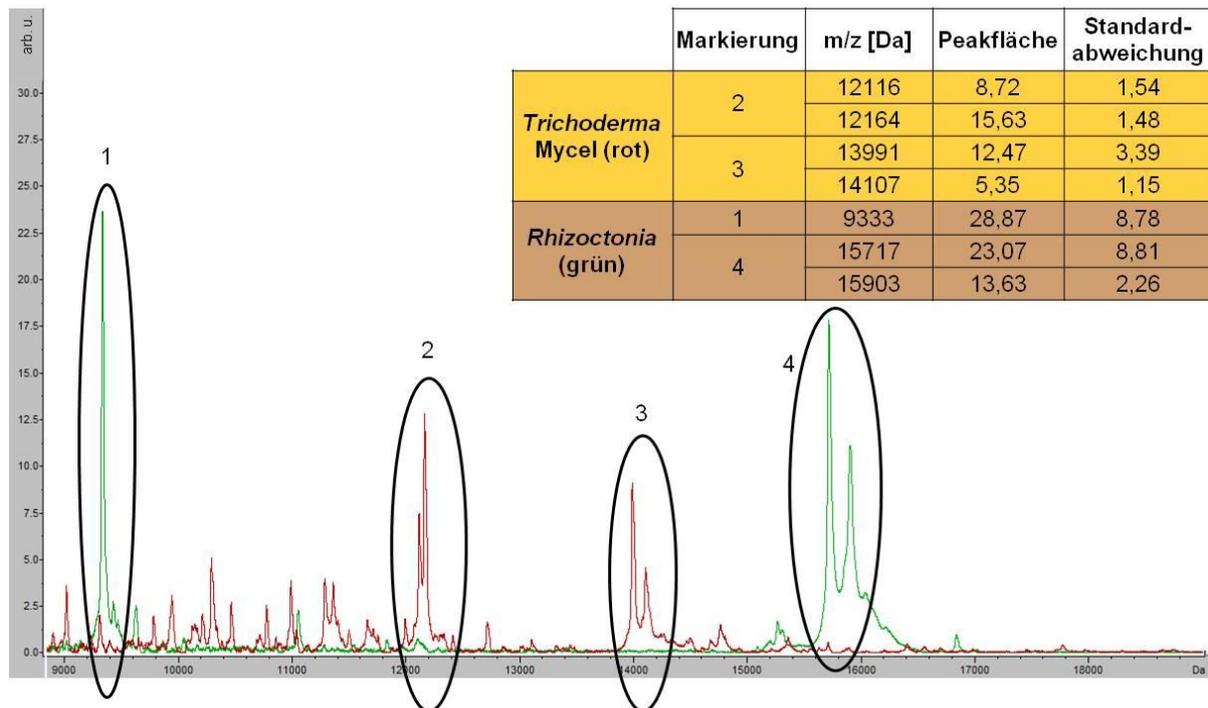


Abbildung 35: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia*; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen

Für alle drei Vergleiche wurden auch jeweils eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) und eine hierarchische Clusteranalyse (HCA) durchgeführt (Abbildungen 36, 37 und 38). Auch aus diesen geht eine eindeutige Unterscheidung der jeweils verglichenen Klassen hervor.

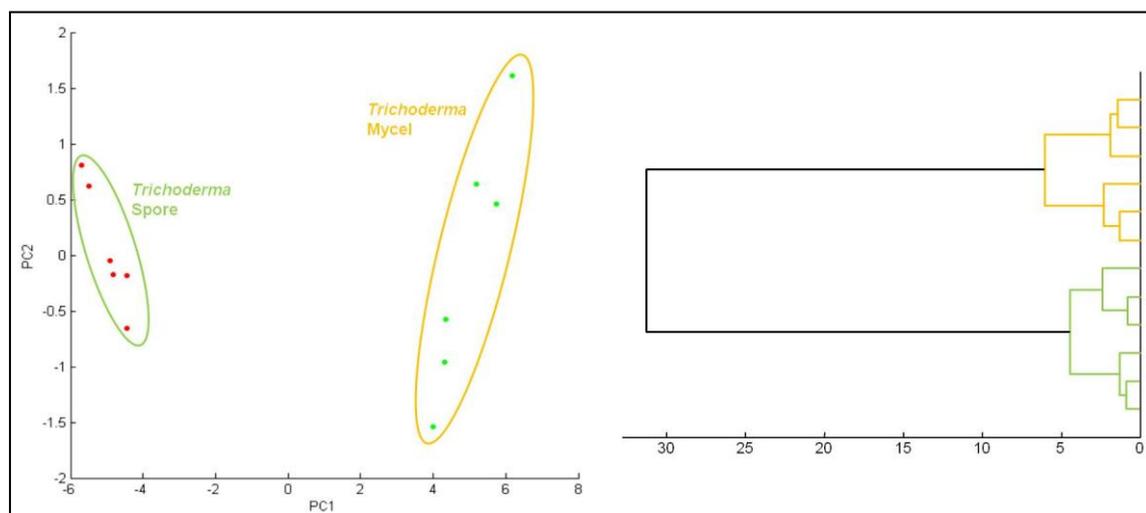


Abbildung 36: Darstellung der Unterscheidung von *Trichoderma Spore* und *Mycel* mittels PCA (rechts) und HCA (links)

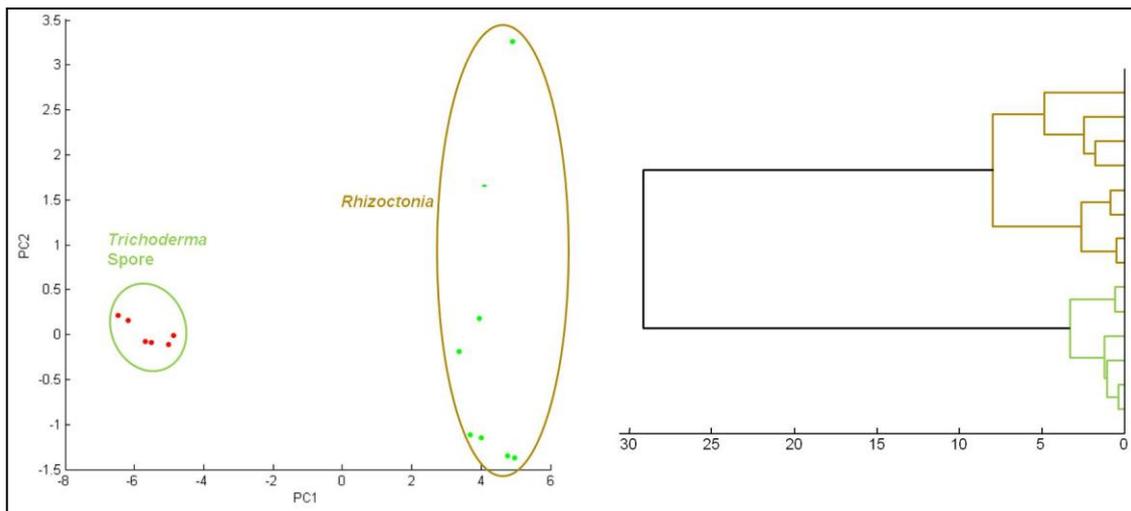


Abbildung 37: Darstellung der Unterscheidung von *Trichoderma Spore* und *Rhizoctonia* mittels PCA (rechts) und HCA (links)

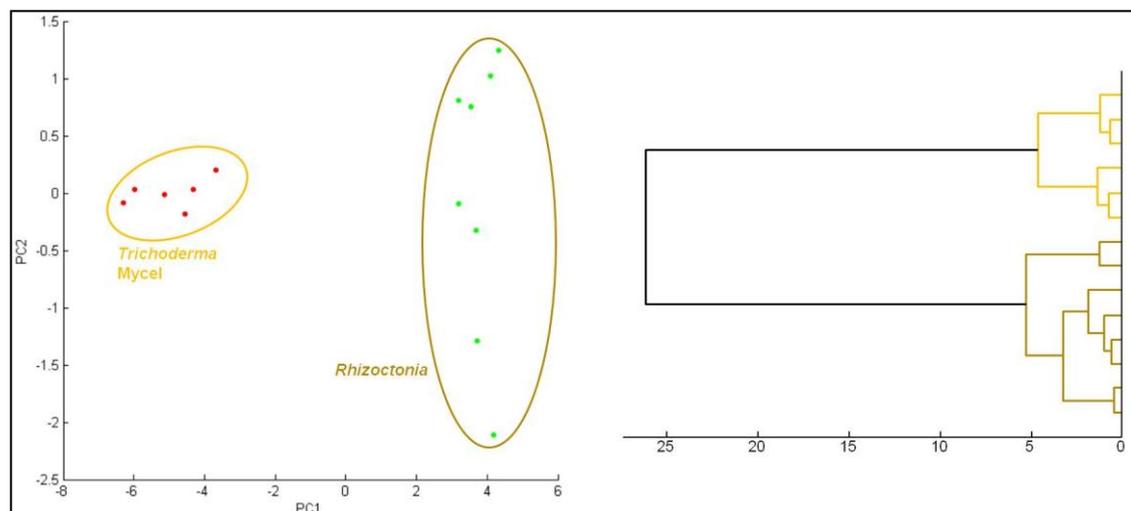


Abbildung 38: Darstellung der Unterscheidung von *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia* mittels PCA (rechts) und HCA (links)

Auch der Vergleich aller drei Klassen (Abbildung 39) zeigt, dass unterschieden werden kann ob der jeweilige Peak durch *Trichoderma Spore*, *Trichoderma Mycel* oder *Rhizoctonia* generiert wurde. Die Abbildung zeigt auch in diesem Fall wieder nur einen Ausschnitt aus dem kompletten Spektrum (siehe Anhang).

Abbildung 40 zeigt sowohl mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) als auch hierarchische Clusteranalyse (HCA), dass diese drei Klassen eindeutig unterschieden werden können.

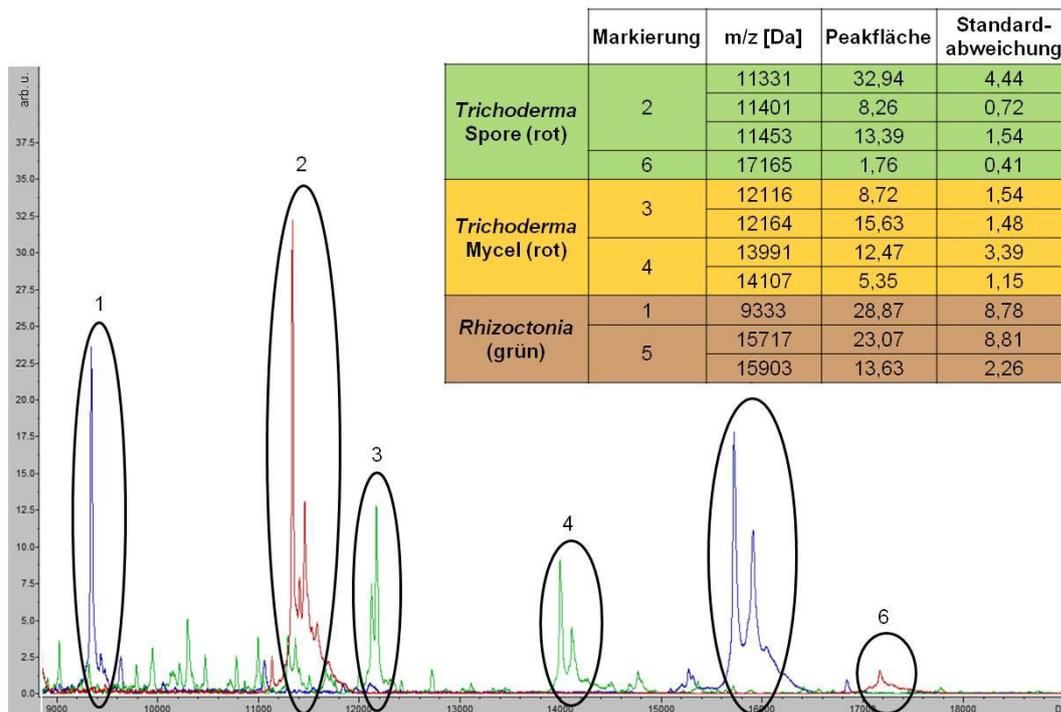


Abbildung 39: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma Spore*, *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia*; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen

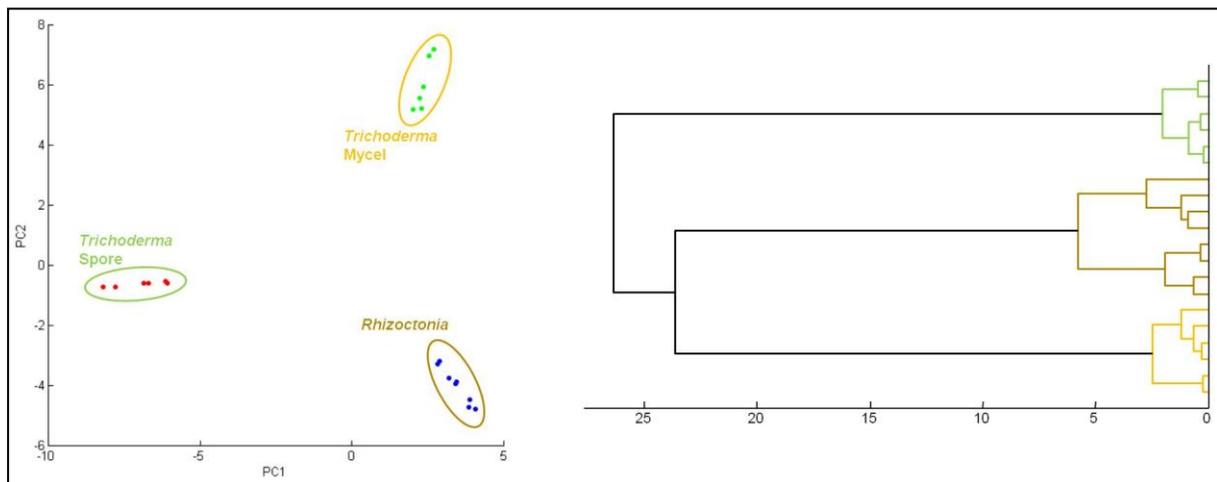


Abbildung 40: Darstellung der Unterscheidung von *Trichoderma Spore*, *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia* mittels PCA (rechts) und HCA (links)

3.4 Miniaturisierter Konfrontations-Assay

Für die **Aufbringung des PDA als Wachstumsmedium auf das ITO-Target** gab es, wie bereits in 2.2.1 erwähnt, zwei Möglichkeiten:

Variante 1: Übergießen des schräg gehaltenen Targets mit ca. 50°C warmen PDA

Variante 2: Pipettieren des heißen PDA auf ein waagrecht gehaltenes Target

Bei der Aufbringung ist darauf zu achten, dass die beschichtete Seite des Targets nach oben zeigt und die PDA-Schicht so dünn wie möglich ist, um die Leitfähigkeit des Targets nicht zu beeinträchtigen.

Zur einfacheren Handhabung wurde in beiden Fällen ein Teil der autoklavierten, heißen PDA-Lösung in ein 50 mL Plastikfalcon überführt und in einem Becherglas mit ca. 50°C warmen Wasser flüssig gehalten um es gut verarbeiten zu können. Bei zu langsamen Arbeiten wurde das PDA zähflüssig, wodurch es sich nicht mehr in einer gleichmäßig dicken Schicht auf dem Target verteilen ließ. Dieses Problem trat bei der Aufbringung mittels Pipette noch stärker in Erscheinung, da hier das PDA durch das geringe Volumen (1 mL Eppendorfpipette) teilweise bereits in der Pipettenspitze rasch abkühlte und somit zähflüssig bzw. fest wurde und dadurch nicht mehr aufgebracht werden konnte.

Bei Variante 1 wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn das PDA verarbeitet wurde, sobald das Falcon ohne Wärmeschutz gehalten werden konnte. Das Medium sollte möglichst rasch und kontinuierlich an der oberen Kante des schräg gehaltenen Targets aufgebracht werden damit sich beim Hinunterrinnen eine gleichmäßige und dünne PDA-Schicht ausbilden kann. Wichtig dabei ist, dass das Target nicht zu schräg gehalten und das Medium nicht zu flüssig ist, um zu verhindern, dass das Medium an der unteren Kante in einer dickeren Schicht aushärtet als an der oberen.

Bei Variante 2 wurde nur dann eine gleichmäßige Schichtdicke erreicht, wenn das PDA in noch sehr heißem Zustand aufgebracht wurde.

Bei beiden Varianten wurden vor Aufbringung der Pilze noch eventuelle PDA-Anhaftungen an der Unterseite des ITO-Targets mit Hilfe eines Tuches oder einer Spatel entfernt um ein Pilzwachstum auf der Oberseite zu garantieren.

Durch die sehr dünne PDA-Schicht war eine zusätzliche Feuchtigkeitsquelle nötig, um ein Austrocknen des Mediums und damit ein Stoppen des **Pilzwachstums** auf dem Target zu verhindern. Dies wurde durch ein Filterpapier am Boden der Petrischale erreicht,

welches je nach Bedarf zwischendurch erneut befeuchtet wurde. Dabei ist allerdings zu beachten, dass das Papier nicht zu nass ist, da sich sonst Tropfen am Deckel der Petrischale bilden.

Bei der Verwendung von Eppendorfgefäßdeckeln als Abstandhalter ist darauf zu achten, dass die Petrischale zu jedem Zeitpunkt waagrecht gehalten wird, da das Target sonst leicht hinunterkippt. Dies führt zu einem direkten Kontakt mit dem feuchten Papier, was wiederum ein Pilzwachstum darauf (statt auf dem Target) zur Folge hat.

Nach dem ersten Tag war meist noch keine Veränderung am Target erkennbar. Durch das anschließende, schnell einsetzende Pilzwachstum wurde allerdings eine zweimal tägliche Kontrolle nötig, um den Metabolismus zum gewünschten Zeitpunkt stoppen zu können.

Bei jedem Experiment war auffällig, dass *Rhizoctonia* solange in entgegengesetzte Richtung (von *Trichoderma* weg) wächst, bis auf dieser Seite des Inokulums kein Medium mehr zur Verfügung steht und erst danach in Richtung *Trichoderma*. Dies hat zur Folge, dass *Trichoderma* deutlich weiter auf *Rhizoctonia* zuwachsen kann und somit den größeren Teil des Target für sich beansprucht. Daraus kann eventuell auch schon ein optischer Hinweis abgeleitet werden, dass *Rhizoctonia* erkennt, wenn sein Antagonist in der Nähe ist und daher versucht in die entgegengesetzte Richtung zu wachsen.

Beim **Trocknen** löste sich das Wachstumsmedium teilweise wieder vom ITO-Target. Dies ist problematisch, da das Target senkrecht in das MALDI-TOF-MS eingebracht wird und somit zu starken Verunreinigungen der Ionenquelle führt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass dies nur bei jenen Versuchen der Fall war, bei welchen das PDA mittels Pipette aufgebracht wurde. Daher ist die Variante mit übergießen den Targets zu bevorzugen.

Da es bei Imaging-Experimenten wichtig ist, dass der betrachtete Bereich möglichst eben ist, stellten die Inokula ein Problem dar. In dieser Arbeit lag das Interesse allerdings auf dem Bereich des Zusammentreffens der Pilze in der Mitte des Target, wodurch die Inokula auch vor Aufbringung der Matrix entfernt werden konnten, bzw. der Massenbereich entsprechend ausgewählt wurde.

3.5 Imaging

Die Konfrontationsassays wurden von Matthias Holzlechner mittels MALDI-MSI (siehe Kapitel 5.1) untersucht. In diesem Fall wurde die Matrix (DHB gelöst in Aceton) mit Hilfe einer selbst gebauten Sublimationsapparatur auf die aufgetauten und getrockneten Wachstumsexperimente aufgebracht. Nach der Rekristallisation wurde das Target getrocknet und anschließend in einem Massenbereich von 100-2600 Da analysiert.

Mit dieser Technik ist es gelungen sekundäre Metabolite, welche während der Interaktion von *Trichoderma atroviride* und *Rhizoctonia solani* entstehen direkt auf PDA zu visualisieren und MALDI-MSI Daten zu generieren.

Dies ist kann in folgendem Paper genauer nachgelesen werden:

Holzlechner, M., et al., *Visualizing fungal metabolites during mycoparasitic interaction by MALDI mass spectrometry imaging*. Proteomics. **16**(11-12): p. 1742.

4 Conclusio

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen eine Methode zu entwickeln und zu optimieren um *Trichoderma atroviride* Sporen, *Trichoderma atroviride* Mycel und *Rhizoctonia solani* mittels MALDI-TOF-MS zu unterscheiden.

In den Tabellen 15, 16 und 17 werden die optimierten Parameter der entwickelten Methode noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 15: Zusammenfassung der optimierten Probengewinnung

		<i>Trichoderma</i> Sporen	<i>Trichoderma</i> Mycel	<i>Rhizoctonia</i>
Kultivierung	Art	Petrischale	Schüttelkolben	Petrischale
	Medium	PDA	PDB + 5% Pepton	PDA
	Bedingungen	28°C	28°C, 200 rpm	28°C
	Dauer	bis Platte voll bewachsen (ca. 5 Tage)	2 Tage	bis Platte voll bewachsen (ca. 6 Tage)
Ernte		Abschaben mit ~10 mL steriles Wasser + filtrieren	Biomasse durch Fleece abfiltrieren	Vorsichtiges abschaben mit Spatel
	Schockfrieren in N ₂ (l) + Lagerung bei -80°C			

Tabelle 16: Zusammenfassung der optimierten Probenvorbereitung und Auftragung

		<i>Trichoderma</i> Sporen	<i>Trichoderma</i> Mycel	<i>Rhizoctonia</i>
Waschen (3x)	Probemenge	50 µL	20 – 30 mg	Späne mit Pinzetten zerteilen
	dest. Wasser	100 µL	1000 µL	
	Zentrifugation	1 min, 10 000 rpm	4 min, 13 000 rpm	
Resuspendierung		100 µL	1000 µL	1000 µL
Auf Target		1 µL Probe	1 µL Probe	kleines, flaches Stück
	1 µL Matrix: 80 mg/mL DHB in in ACN / 0,1% TFA in water (1:1 v/v)			

Tabelle 17: Zusammenfassung der optimierten Einstellungen des MALDI-TOF-MS

Gerät	UltrafleXtreme™, Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Modus	linear, positiv
Massenbereich	2 - 20 kDa
Laserschüssen pro Stelle	1000
Stellen pro Auftragungsspot	8
Σ (Laserschüsse)	8000

Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die Unterscheidung der drei biologischen Proben mittels PCA (Abbildung 41) und HCA (Abbildung 42). Der verwendete Datensatz umfasst in diesem Fall alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit allen getesteten Matrix-Systemen.

Aus beiden Abbildungen geht eine klare Unterscheidung zwischen *Trichoderma* Spore, *Trichoderma* Mycel und *Rhizoctonia* hervor.

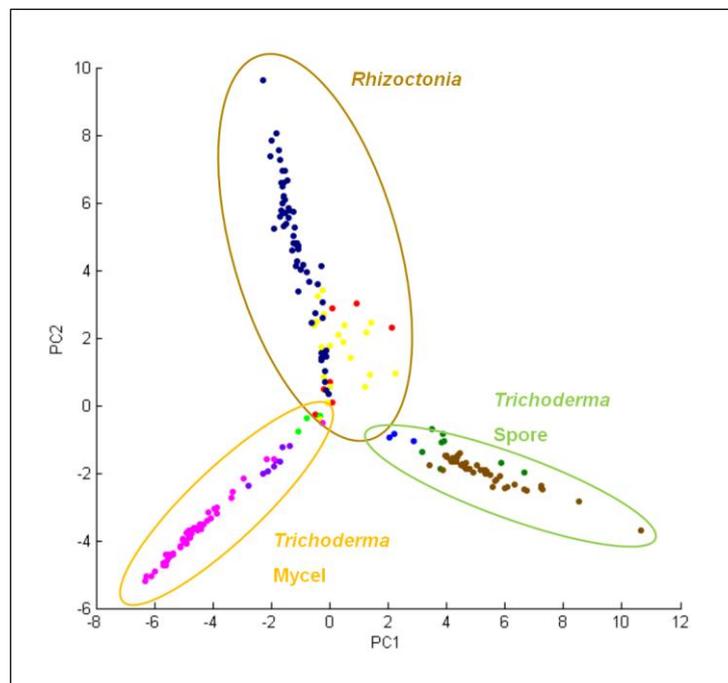


Abbildung 41: PCA generiert aus allen Messdaten dieser Arbeit

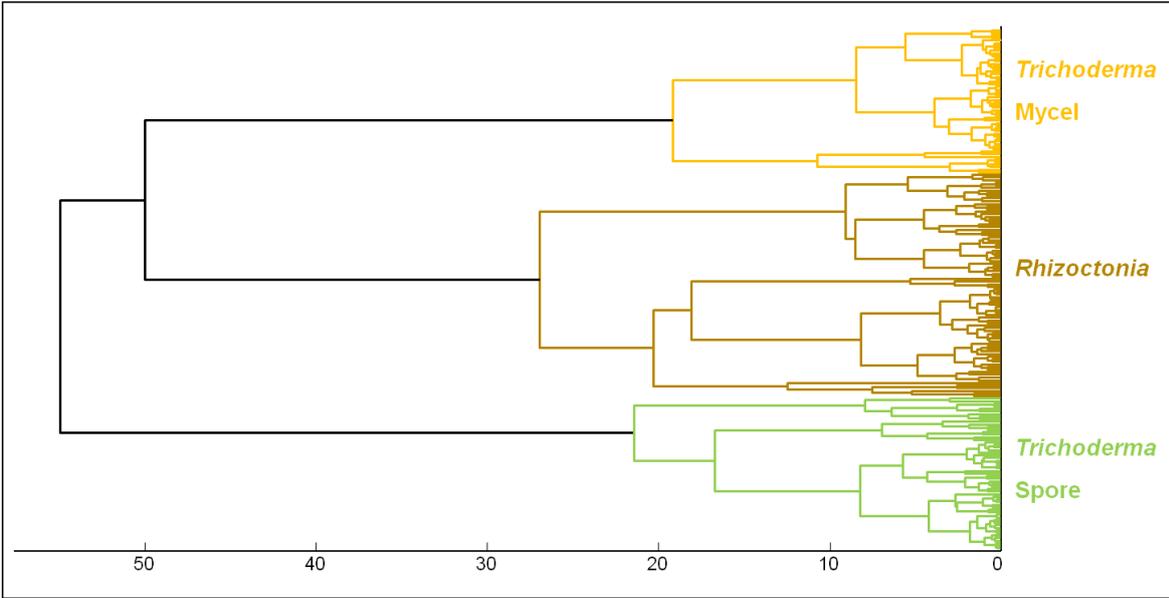


Abbildung 42: Hierarchische Cluster Analyse, generiert aus allen Messdaten dieser Arbeit

5 Ausblick

5.1 MALDI - MSI

MALDI-MS Imaging wird verwendet, um analytische Informationen der untersuchten biologischen Proben als zweidimensionales Konzentrationsprofil der Probenoberfläche zu visualisieren [39].

Die Probenvorbereitung ist dieselbe wie bei einer normalen MALDI-Analyse, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall die Zugabe der Matrix zu einer kleineren lateralen Migration des Analyten führen darf, als die gewünschte laterale Auflösung der Analyse [39]. Dies wird erreicht, indem die Matrix mit Methoden wie „chemischem Tintenstrahldrucken“, Versprühen mittels Airbrush oder Sublimation aufgebracht wird [39]. So wie auch bei der normalen MALDI wird die Probe einem gepulsten Laser ausgesetzt, welcher nun auf den Durchmesser der gewünschten lateralen Auflösung fokussiert wird [39].

Die Probe wird während der Messung schrittweise weiterbewegt, um von jedem Punkt ein Massenspektrum aufnehmen zu können, wobei die Schrittweite dabei dem Durchmesser des Lasers entspricht um eine Stelle nicht mehrfach bzw. überhaupt nicht zu erfassen [39].

Zum Auswerten der entstandenen Spektren wird ein Signal von Interesse ausgewählt und die relativen Intensitäten jedes Punktes gemäß ihrer Position auf der Probe in ein Graustufenbild umgewandelt [39]. Wird mehr als ein Signal desselben Scans ausgewertet, so können mehrere der so entstehenden Bilder in einem mehrfarbigen Bild kombiniert werden [39].

Wird vor der Überschichtung mit Matrix mittels Mikroskop ein Foto aufgenommen, so kann dieses im Anschluss mit dem MALDI-Bild in Korrelation gesetzt werden um physikalische Eigenschaften mit den ermittelten chemischen Informationen zu verknüpfen [39].

Die ersten erfolgreichen Versuche mit den in dieser Arbeit produzierten Konfrontationsassays wurden bereits durchgeführt (siehe dazu Kapitel 3.5 bzw. [40]).

In Zukunft soll der Fokus sowohl auf dem biologischen als auch dem technischen Aspekt liegen. Ersteres um den Mechanismus der Erkennung und Kommunikation der Pilze untereinander besser zu verstehen und zweiteres um die Qualität der Massenspektren weiter zu verbessern, in dem die Wachstumsunebenheiten vermindert werden unter der Bewahrung der Leitfähigkeit des mit PDA überzogenen Targets.

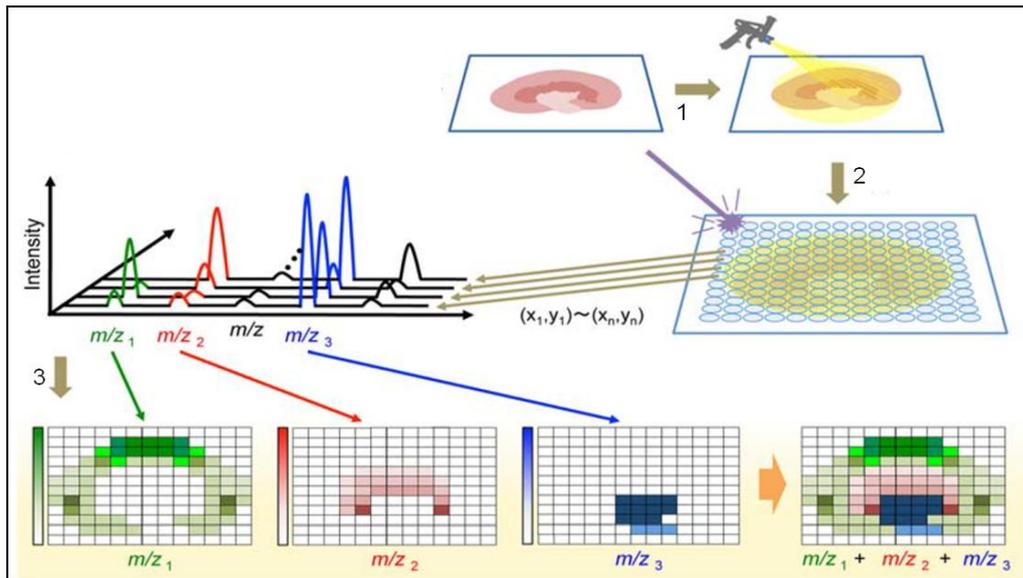


Abbildung 43: Prinzip eines MALDI-TOF-MS-Imaging Versuches (1: Matrix Aufbringung / 2: MALDI Laser 2D-Scannen / 3: Rekonstruktion der Intensitätsbilder) [41]

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>R.solani</i> 4 Tage gewachsen auf PDA	1
Abbildung 2: Durch <i>R.solani</i> verursachte Pflanzenkrankheiten; A: Pockenkrankheit von Erdäpfeln, B/C: Wurzelfäule von Zuckerrüben, D: Abfaulen von Gurken, E/F: Blattscheidendürre von Reis	2
Abbildung 3: <i>T.atroviride</i> 5 Tage gewachsen auf PDA	3
Abbildung 4: Schema eines Massenspektrometers.....	5
Abbildung 5: Auswahl an häufig verwendeten MALDI Matrices (IR, Infrarot; UV, Ultraviolett)	6
Abbildung 6: Schema des MALDI Prozesses	8
Abbildung 7: Schematische Trennung in einem linearen TOF Analysator inkl. daraus resultierender Peaks.....	10
Abbildung 8: Schematische Trennung in einem RTOF Analysator inkl. daraus resultierender Peaks.....	11
Abbildung 9: Schematische Abbildung der Generierung der ersten 3 Hauptkomponenten	13
Abbildung 10: Seitlicher Blick auf die Eben, welche durch die ersten beiden Hauptkomponenten aufgespannt wird	13
Abbildung 11: Schematische Darstellung wie aus einem Datensatz (rechts) ein Dendrogramm (links) gebildet wird.....	14
Abbildung 12: Schematische Darstellung der ROC-Kurve; A (perfekter Test / $AUC = 1,0$), B (Zufällig / $AUC = 0,5$), C,D (übliche ROC-Kurven / $AUC_C > AUC_D$)	15
Abbildung 13: <i>Trichoderma atroviride</i> Sporen, Fotoserie der Kultivierung	17
Abbildung 14: <i>Rhizoctonia solani</i> , Fotoserie der Kultivierung.....	18
Abbildung 15: Aufbringung von <i>Trichoderma</i> (rechts) und <i>Rhizoctonia</i> (links) in unterschiedlichen Abständen auf ITO-Targets inkl. Platzierung dieser in Petrischalen.....	19
Abbildung 16: Fotoserie der Konfrontation von <i>R.solani</i> (rechts) mit <i>T.atroviride</i> (links); Abbruch bevor sich die Hyphen berühren	19
Abbildung 17: Fotoserie der Konfrontation von <i>R.solani</i> (rechts) mit <i>T.atroviride</i> (links); Abbruch nachdem sich Hyphen überlagern	20
Abbildung 18: Vergleich der Ergebnisse von CHCA 3 bzw. 30 mg/mL (1/1; 0,1%), CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) und SA 10 mg/mL (1/1; 5%); (Modus: reflectron positiv; Massenbereich: 500 – 3500 Da)	24

Abbildung 19: Vergleich der Ergebnisse von CHCA 3 bzw. 30 mg/mL (1/1; 0,1%), CHCA 3 mg/mL (1/1; 5%) und SA 10 mg/mL (1/1; 5%); (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa).....	25
Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse von DHB 20 mg/mL (1/1; 0,1%) und DHB 30 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)	26
Abbildung 21: Vergleich der Ergebnisse von DHB 40, 50, 60 bzw 70 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)	27
Abbildung 22: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80, 90, 100 bzw 400 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)	28
Abbildung 23: Vergleich der Ergebnisse von DHB 50, 80 bzw 400 mg/mL (1/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)	29
Abbildung 24: Vergleich der Messergebnisse von DHB 50 bzw. 80 mg/mL (1/1; 0,1%) mittels PCA (rechts) und HCA (links).....	30
Abbildung 25: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) und DHB 80 mg/mL (2/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa)	30
Abbildung 26: Vergleich der Ergebnisse von DHB 80 mg/mL (1/1; 0,1%) und CHCA 30 mg/mL (2/1; 0,1%) (Modus: linear positiv; Massenbereich: 2 – 20 kDa).....	31
Abbildung 27: Vergleich der biologischen Ansätze von <i>Trichoderma</i> Spore (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz).....	33
Abbildung 28: Vergleich der biologischen Ansätze von <i>Trichoderma</i> Mycel (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz).....	33
Abbildung 29: Vergleich der biologischen Ansätze von <i>Rhizoctonia</i> (rot: 1. Ansatz, grün: 2. Ansatz, blau: 3. Ansatz).....	34
Abbildung 30: <i>Trichoderma</i> Spore: Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments	36
Abbildung 31: <i>Trichoderma</i> Mycel: Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments	37
Abbildung 32: <i>Rhizoctonia</i> : Vergleich von zwei verschiedenen Aliquoten des selben biologischen Experiments.....	37
Abbildung 33: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore und Mycel; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen.....	39
Abbildung 34: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore und <i>Rhizoctonia</i> ; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen.....	39

Abbildung 35: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i> ; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen	40
Abbildung 36: Darstellung der Unterscheidung von <i>Trichoderma</i> Spore und Mycel mittels PCA (rechts) und HCA (links)	40
Abbildung 37: Darstellung der Unterscheidung von <i>Trichoderma</i> Spore und <i>Rhizoctonia</i> mittels PCA (rechts) und HCA (links)	41
Abbildung 38: Darstellung der Unterscheidung von <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i> mittels PCA (rechts) und HCA (links)	41
Abbildung 39: Ausschnitt aus dem Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore, <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i> ; inkl. Auflistung der zugehörigen Massen, Peakflächen und Standardabweichungen	42
Abbildung 40: Darstellung der Unterscheidung von <i>Trichoderma</i> Spore, <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i> mittels PCA (rechts) und HCA (links).....	42
Abbildung 41: PCA generiert aus allen Messdaten dieser Arbeit	47
Abbildung 42: Hierarchische Cluster Analyse, generiert aus allen Messdaten dieser Arbeit	48
Abbildung 43: Prinzip eines MALDI-TOF-MS-Imaging Versuches (1: Matrix Aufbringung / 2: MALDI Laser 2D-Scannen / 3: Rekonstruktion der Intensitätsbilder) [41]	50
Abbildung 44: Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore und Mycel	M
Abbildung 45: Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore und <i>Rhizoctonia</i> N	
Abbildung 46: Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i> N	
Abbildung 47: Vergleich der Mittelwertspektren von <i>Trichoderma</i> Spore, <i>Trichoderma</i> Mycel und <i>Rhizoctonia</i>	N

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie von <i>Rhizoctonia solani</i> [3]	1
Tabelle 2: Taxonomie von <i>Trichoderma atroviride</i> [14].....	3
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	16
Tabelle 4: Unterschiedliche Zusammensetzungen der Matrix	21
Tabelle 5: Mikroskopische Betrachtung der mit unterschiedlichen Matrix überschichteten Pilze.....	22
Tabelle 6: Überblick der folgenden Vergleiche unterschiedlicher Matrices und Matrixkonzentrationen (rot: optimalste Matrix des jeweiligen Vergleiches)	23
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Datenmengen zum Vergleich der biologischen Ansätze.....	32
Tabelle 8: Ergebnistabelle zu Abbildung 27	33

Tabelle 9: Ergebnistabelle zu Abbildung 28.....	34
Tabelle 10: Ergebnistabelle zu Abbildung 29.....	34
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Datenmengen zum Vergleich verschiedener Aliquote	35
Tabelle 12: Ergebnistabelle zu Abbildung 30.....	36
Tabelle 13: Ergebnistabelle zu Abbildung 31.....	37
Tabelle 14: Ergebnistabelle zu Abbildung 32.....	38
Tabelle 15: Zusammenfassung der optimierten Probengewinnung	46
Tabelle 16: Zusammenfassung der optimierten Probenvorbereitung und Auftragung.....	46
Tabelle 17: Zusammenfassung der optimierten Einstellungen des MALDI-TOF-MS.....	47
Tabelle 18: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von <i>Trichoderma</i> Spore.....	I
Tabelle 19: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von <i>Trichoderma</i> Mycel.....	J
Tabelle 20: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von <i>Rhizoctonia</i>	J
Tabelle 21: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von <i>Trichoderma</i> Spore	K
Tabelle 22: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von <i>Trichoderma</i> Mycel.....	L
Tabelle 23: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von <i>Rhizoctonia</i>	M
Tabelle 24: Vollständige Peakliste zum Vergleich von <i>Trichoderma</i> Spore (TS) mit Mycel (TM)	O
Tabelle 25: Vollständige Peakliste zum Vergleich von <i>Trichoderma</i> Spore (TS) mit <i>Rhizoctonia</i> (R)	P
Tabelle 26: Vosllständige Peakliste zum Vergleich von <i>Trichoderma</i> Mycel (TM) mit <i>Rhizoctonia</i> (R)	Q
Tabelle 27: Vosllständige Peakliste zum Vergleich von <i>Trichoderma</i> Spore (TS), Mycel (TM) mit <i>Rhizoctonia</i> (R)	R

6.3 Literaturverzeichnis

1. Uchida, J.Y. *Rhizoctonia solani*. [cited 2015 June 19]; Available from: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/r_solani.htm.
2. Wehner, T.C. *NC State and USDA Cucumber Disease Handbook - Belly Rot (Rhizoctonia solani Kuhn)*. 2010 [cited 2015 April 28]; Available from: <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/cuke/dshndbk/br.html>.

3. UniProtCosortium. *Taxonomy - Rhizoctonia solani*. 2002-2016 [cited 2015 July 13]; Available from: <http://www.uniprot.org/taxonomy/456999>.
4. Wale, S. *Rhizoctonia Diagnostics and Epidemiology*. 2011 [cited 2015 April 28]; Available from: <http://www.potato.org.uk/publications/807232-rhizoctonia-diagnostics-and-epidemiology>.
5. Loria, R., R. Leiner, and D. Carting. *Vegetable Crops - Rhizoctonia Disease of Potato*. 1993 [cited 2015 April 28]; Available from: http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato_Rhizoctonia.htm.
6. Smiley, R.W. and W. Uddin, *Influence of soil temperature on Rhizoctonia root rot (R. solani AG-8 and R. oryzae) of winter wheat*. *Phytopathology*, 1993. **83**(7): p. 777-785.
7. Kiewnick, S., et al., *Integrated Control of Rhizoctonia Crown and Root Rot of Sugar Beet with Fungicides and Antagonistic Bacteria*. *Plant Disease*, 2001. **85**(7): p. 718-722.
8. Hollier, C.A., M.C. Rush, and D.E. Groth. *Sheath Blight of Rice*. 2009 [cited 2015 April 28]; Available from: <http://www.lsuagcenter.com/NR/rdonlyres/C93A494B-8105-4804-9DFA-81190EC3F68B/58166/pub3123SheathBlightofRiceHIGHRES.pdf>.
9. Uchneat, M.S. and T.C. Wehner, *Resistance to Belly Rot in Cucumber Identified through Field and Detached-fruit Evaluations*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1998. **123**(1): p. 78-84.
10. Wharton, P., et al., *Rhizoctonia stem cancer and black scurf of potato*. *Extension Bulletin E-2994*, 2007.
11. Harman, G.E., et al., *Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. **2**: p. 43-56.
12. Harman, G.E., *Overview of Mechanisms and Uses of Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 2006. **96**(2): p. 190-194.

13. *Trichoderma atroviride*. [cited 2015 January 16]; Available from: <http://genome.igip-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>.
14. UniProtCosortium. *Taxonomy - Hypocrea atroviridis (Trichoderma atroviride)*. 2002-2016 [cited 2015 July 13]; Available from: <http://www.uniprot.org/taxonomy/63577>.
15. Grinyer, J., et al., *Proteomic response of the biological control fungus Trichoderma atroviride to growth on the cell walls of Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 2005. **47**(6): p. 381-386.
16. deMelo, I.S. and J.L. Faull, *Parasitism of Rhizoctonia solani by strains of Trichoderma spp.*. *Scientia Agricola*, 2000. **57**(1).
17. Cammann, K., *Molekülmassenspektrometrie*, in *Instrumentelle Analytische Chemie*. 2001, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 539-574.
18. Lottspeich, F. and J.W. Engls, *Massenspektrometrie*, in *Bioanalytik*. 2012, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 367-424.
19. Gey, M.H., *Massenspektrometrie*, in *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 261-289.
20. Hillenkamp, F., T.W. Jaskolla, and M. Karas, *The MALDI Process and Method*, in *MALDI MS*, F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, Editors. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 1-40.
21. O'Connor, P.B., et al., *MALDI Mass Spectrometry Instrumentation*, in *MALDI MS*, F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, Editors. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 41-104.
22. C.Santos, et al., *Filamentous fungal characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Journal of Applied Microbiology*, 2010. **108**: p. 375-385.
23. Hjernø, K. and O.N. Jensen, *MALDI-MS in Protein Chemistry and Proteomics*, in *MALDI MS*, F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, Editors. 2014: Weinheim. p. 105-131.

24. Chalupová, J., et al., *MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews*. J. Mass. Spectrom., 2012. **47**(8): p. 978-968.
25. Dong, H., et al., *Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of Fusarium by MALDI linear TOF mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2009. **395**: p. 1373-1383.
26. Kemptner, J., et al., *Mixed volume sample preparation method for intact cell mass spectrometry of Fusarium spores*. J. Mass. Spectrom., 2009. **44**: p. 1622-1624.
27. Kemptner, J., et al., *Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact Fusarium spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2009. **23**(6): p. 877-884.
28. Marchetti-Deschmann, M., et al., *Using Spores for Fusarium spp. Classification by MALDI-Based Intact Cell/Spore Mass Spectrometry*. Food Technol. Biotechnol., 2012. **50**(3): p. 334-342.
29. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Massenspektrometrie*, in *Instrumentelle Analytik*. 2013, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 5-51 - 5-83.
30. Dong, H., *Intact cell mass spectrometry of mycotoxin-producing Fusarium fungi for differentiation and protein identification in Chemical Technologies and Analytics*. 2010, Technische Universität Wien: Vienna.
31. Fenselau, C. and P.A. Demirev, *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2001. **20**(4): p. 157-171.
32. Wikipedia. *PCA - Principal Component Analysis*. [cited 2015 August 03]; Available from: http://www.nl pca.org/pca_principal_component_analysis.html.
33. Wikipedia. *Hauptkomponentenanalyse*. [cited 2015 August 03]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Hauptkomponentenanalyse>.
34. Wikipedia. *Hierarchical clustering*. [cited 2015 August 04]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Hierarchical_clustering.

35. Wikipedia. *Hierarchische Clusteranalyse*. [cited 2015 August 03]; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/Hierarchische_Clusteranalyse.
36. Zou, K.H., A.J. O'Malley, and L. Mauri, *Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluating Diagnostic Tests and Predictive Models*. *Circulation*. **115**(5): p. 654-657.
37. Park, S.H., J.M. Goo, and C.-H. Jo, *Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists*. *Korean J Radiol*, 2004. **5**: p. 11-18.
38. Bruker, *ClinProTools Help-file: Receiver operating characteristic (ROC) Basics*.
39. Spengler, B., *MALDI-Mass Spectrometry Imaging*, in *MALDI MS*, F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinic, Editors. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 133-167.
40. Holzlechner, M., et al., *Visualizing fungal metabolites during mycoparasitic interaction by MALDI mass spectrometry imaging*. *Proteomics*. **16**(11-12): p. 1742.
41. Yoshinori, F. and M. Daisuke, *MALDI Mass Spectrometry Imaging for Visualizing In Situ Metabolism of Endogenous Metabolites and Dietary Phytochemicals*. *Metabolites*, 2014. **4**: p. 319-346.

6.4 Vollständige Peaklisten zu Kapitel 3.2

6.4.1 Vergleich der biologischen Ansätze

Tabelle 18: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von *Trichoderma* Spore

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen	
		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)	Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)
5561	0,67	3,1	3,76	0,37	0,34
5589	0,64	1,61	2,25	0,33	0,1
5661	5,43	36,35	41,78	12,58	8,32
5724	8,15	7,23	15,38	0,83	6,31
6907	1,34	2,38	1,04	1,43	0,67
7466	1,66	0,87	2,53	0,27	2,49
7498	0,69	3,13	2,43	1,07	1,64
7524	2,5	7,76	5,25	1,13	4,09
8068	1,68	10,25	8,57	4,31	1,25
8155	0,04	2,36	2,33	0,39	0,86
8467	1	4,64	5,64	1,9	1,43
8578	6,46	28,89	35,35	5,16	9,79
8659	0,14	10,03	9,89	3,47	2,18
9112	1,14	1,79	0,65	0,62	0,47
9275	0,9	1,42	0,52	0,63	0,37
9315	2,06	2,94	0,87	1,41	0,73
9478	1,24	1,78	0,54	0,79	0,37
11115	1,23	2,92	1,7	1,09	0,39
11319	3,61	42,09	38,48	13,85	10,18
11441	2,5	4,7	7,2	1,37	4,58
16965	0,92	1,39	0,47	1,33	0,32
17160	3,21	7,73	4,52	6,27	1,41

Tabelle 19: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von *Trichoderma Mycel*

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen	
		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)	Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)
5049	0,16	3,83	3,66	0,39	2,21
5088	3,16	3,49	6,65	0,33	8,77
5148	0,69	4,84	4,15	0,55	1,74
5657	1,12	7,78	8,9	1,14	5,24
5678	1,9	9,76	7,85	0,36	3,22
5787	0,54	4,24	4,78	0,49	2,44
6078	0,86	11,75	12,62	1,45	3,84
6123	0,66	6,49	5,82	0,3	5,29
6708	4,44	7,93	3,49	0,76	2,46
6996	5,19	8,07	13,26	1,61	5,15
7048	0,29	13,49	13,2	1,02	2,52
7349	1,72	7,05	5,34	0,89	2,54
7387	3,4	9,27	5,87	1,91	2,02
7413	5,83	10,29	4,46	1,42	1,65
7674	1,44	3,85	2,41	0,04	0,68
7830	1,81	4,97	3,17	0,46	2,11
7852	3,5	5,22	1,73	0,32	0,33
8089	1,33	6,52	5,18	1,32	3,52
8110	1,72	7,12	5,4	1,62	2,86
8329	0,53	3,8	4,33	4,7	2,58
8557	3,32	1,99	5,31	0,89	7,56
9774	0,31	1,51	1,82	0,24	0,97
9934	0,76	2,05	1,29	0,1	0,63
10203	0,23	1,92	2,15	0,36	1,13
10288	1,65	4,11	5,76	1,49	3,3
10985	0,29	1,38	1,67	0,21	0,62
11294	0,01	3,66	3,67	0,45	2,2
11352	1,08	5,2	4,13	0,35	2,69
12119	0,11	3,7	3,59	0,21	1,98
12160	0,4	5,49	5,89	1,22	3,41
13994	2,01	1,11	3,12	0,24	2,13
14106	0,29	4,49	4,2	0,25	2,85
14766	1,52	2,33	0,82	0,81	0,41

Tabelle 20: Peakliste vom Vergleich der biologische Ansätze von *Rhizoctonia*

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche			Standardabweichung der Peakflächen		
		Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)	Ansatz 3 (blau)	Ansatz 1 (rot)	Ansatz 2 (grün)	Ansatz 3 (blau)
4058	7,29	4,7	11,99	6,63	3,45	2,59	0,85
5514	4,53	6,49	7,4	2,87	6,42	4,44	0,32
6292	4,65	4,87	9,52	6,55	2,61	7,8	2,15
7704	13,97	14,94	1,47	0,97	24,93	0,32	0,18
7857	4,79	16,12	11,33	15,93	3,86	10,8	1,35
8484	1,54	1,63	2,36	3,16	0,74	1,2	0,88
9325	3,31	7,45	4,14	6,2	3,31	2,71	3,24
11050	1,66	2,72	1,74	1,05	1,34	0,4	0,3
11219	2,53	3,06	0,94	0,53	2,75	0,35	0,17
15714	18,02	11,76	3,39	21,41	4,7	2,93	0,72
16248	4,19	2,81	0,77	4,96	1,08	0,36	0,96

6.4.2 Vergleich verschiedener Aliquote

Tabelle 21: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von *Trichoderma* Spore

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)	Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
4035	0,15	4,32	4,16	0,08	0,5
4057	0,6	8,3	7,7	0,08	0,42
4253	0,65	3,71	4,36	0,35	0,09
4303	2,75	9,04	11,79	0,72	1,35
4352	0,33	4,68	4,35	0,26	0,35
5464	0,29	5,3	5,59	0,29	0,24
5668	0,25	17,57	17,32	0,84	1,49
5704	0,6	4,99	4,39	0,56	0,41
5730	0,27	7,72	7,46	0,79	0,68
5789	0,07	3,61	3,54	0,42	0,31
7205	0,75	7,05	6,31	0,57	0,12
7316	0,2	3,72	3,92	0,04	0,31
7474	0,11	5,98	5,87	0,91	0,31
7509	0,01	9,24	9,25	1,52	0,4
7535	11,22	14,01	25,23	1,98	3,52
7651	0,59	2,25	2,85	0,17	0,33
7691	1,81	4,67	6,47	0,7	1,12
7791	0,94	3,03	3,97	0,27	0,43
8041	0,78	3,35	2,57	0,05	0,46
8082	4,33	24	19,67	1,98	2,96
8174	0,7	6,14	6,84	0,75	0,65
8204	0,85	5,94	5,09	0,21	0,53
8429	0,37	3,6	3,22	0,41	0,77
8478	3,21	9,21	12,42	1,35	1,95
8517	0,77	3,95	4,72	0,46	0,08
8578	13,15	30	43,15	5,39	7,54
8678	2,86	10,55	13,41	1,42	2,2
8834	0,66	3,08	3,74	0,29	0,47
11128	0,12	2,71	2,83	0,1	0,48
11200	0,04	1,18	1,14	0,03	0,07
11331	1,02	32,43	33,45	3,49	6,03
11402	0,45	8,49	8,04	0,17	1,05
11453	NaN	13,39	13,39	0,65	2,34
11521	0,35	4,95	4,6	0,07	0,45
11573	0,51	5,29	4,78	0,16	0,52
11688	0,22	2,54	2,32	0,28	0,18
17058	0,17	0,66	0,49	0,17	0,04
17166	0,36	1,94	1,58	0,52	0,24

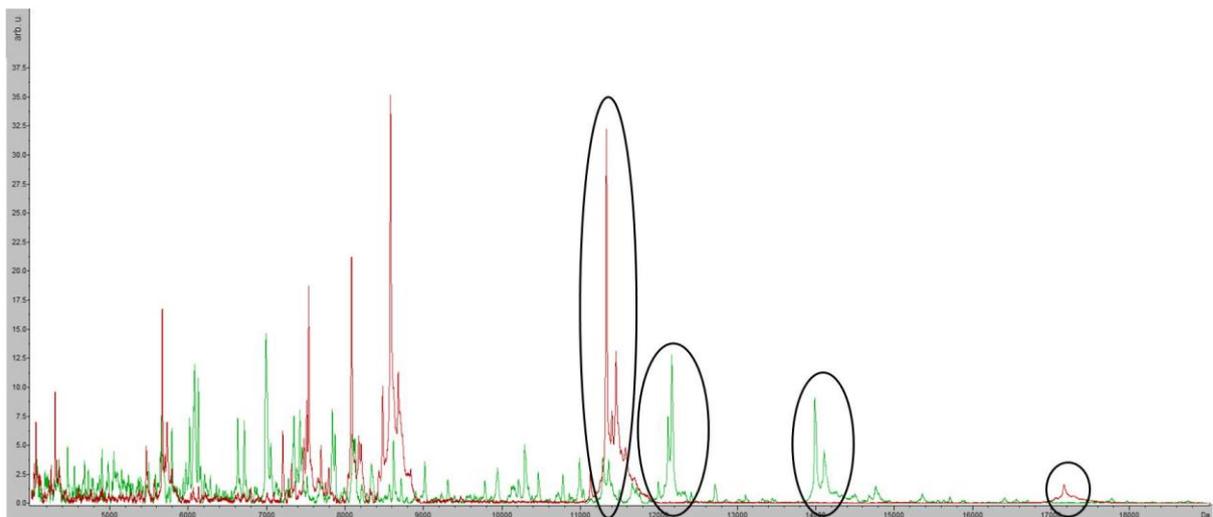
Tabelle 22: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von *Trichoderma Mycel*

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)	Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
5659	2,49	7,8	10,29	1,34	0,72
5791	3,14	6,36	9,5	1,76	0,19
6015	4,13	6,67	10,8	1,58	2,42
6081	1,71	14,38	12,68	0,29	1,54
6128	4,86	10,1	14,96	2,61	3,82
6631	2,32	7,02	9,34	1,02	2,16
6714	4,2	5,93	10,12	0,22	1,28
6991	1,18	15,94	14,75	1,77	0,43
7053	0,23	5,82	6,05	0,7	0,59
7347	0,7	7,72	8,41	2,1	1,64
7422	2,4	8,39	10,78	1,36	0,86
7453	1,75	4,85	6,6	0,14	0,46
7836	3,23	7,56	10,79	1,02	0,87
7871	2,86	5,25	8,11	0,81	1,2
8094	1,81	6,37	8,19	0,42	0,5
8126	0,31	5,92	6,23	0,14	0,52
8334	1,52	3,4	4,92	0,83	1,44
8618	0,95	5,91	6,86	1,63	1,21
9015	1,37	4,64	3,27	2,61	0,28
9309	0,17	2,71	2,54	0,47	0,32
9781	0,76	1,98	2,74	0,11	0,31
9941	0,44	3,74	3,3	0,49	0,47
10211	0,15	2,46	2,61	0,25	0,18
10291	1,08	5,7	6,78	0,67	0,85
10464	0,74	2,84	3,58	0,07	0,58
10774	0,84	2,77	3,61	0,38	0,48
10989	0,97	4,05	5,02	0,52	0,68
11287	1	4,22	5,23	0,79	0,44
11360	1,4	3,41	4,81	1	0,58
11660	0,29	1,88	2,17	0,16	0,32
11710	0,34	1,64	1,3	0,46	0,27
11993	0,56	1,77	2,33	0,66	0,31
12116	2,12	7,66	9,78	1,32	0,89
12164	0,32	15,47	15,79	0,72	2,22
12715	0,01	2,26	2,27	0,39	0,26
13991	5,27	9,83	15,1	2,55	1,15
14107	1,86	4,42	6,28	0,32	0,81
14498	0,08	1,01	1,09	0,13	0,08
14763	0,63	1,45	2,08	0,25	0,25
15357	0,4	0,78	1,18	0,31	0,11

Tabelle 23: Peakliste vom Vergleich unterschiedlicher Aliquote des selben biologischen Ansatzes von *Rhizoctonia*

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen	
		Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)	Aliquot 1 (rot)	Aliquot 2 (grün)
4060	1,1	8,52	7,42	1,92	3,36
4125	0,87	7,95	7,08	2,3	3,12
4678	0,02	8,1	8,08	2,34	1,7
5592	0,65	6,99	6,34	2,55	1,87
6200	0,88	14,07	13,19	2,26	2,55
6300	3,94	32,42	28,48	6,36	6,48
6384	0,77	7,61	6,84	2,67	2,58
6485	1,98	14,31	12,32	7,45	6,09
6546	0,09	5,37	5,28	1,5	1,48
7862	1,2	23,51	22,31	4,69	6,33
7956	0,16	14,47	14,3	4,41	3,47
8025	0,26	3,57	3,83	0,63	0,88
8492	0,18	3,27	3,44	0,33	1,56
9333	0,69	29,21	28,52	6,12	11,92
9427	0,82	2,77	3,59	0,87	1,72
9625	0,8	2,51	3,31	1,08	1
11053	0,48	3,39	2,91	1,14	1,16
15266	0,04	2,26	2,29	0,53	1
15717	0,36	22,9	23,25	7,28	11,31
15904	0,47	13,4	13,87	2,81	1,95
16035	0,3	3,49	3,79	0,19	0,07
16838	0,01	1,35	1,33	0,41	1,01

6.5 Vollständige Abbildungen und Peaklisten zu Kapitel 3.3

Abbildung 44: Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma* Spore und Mycel

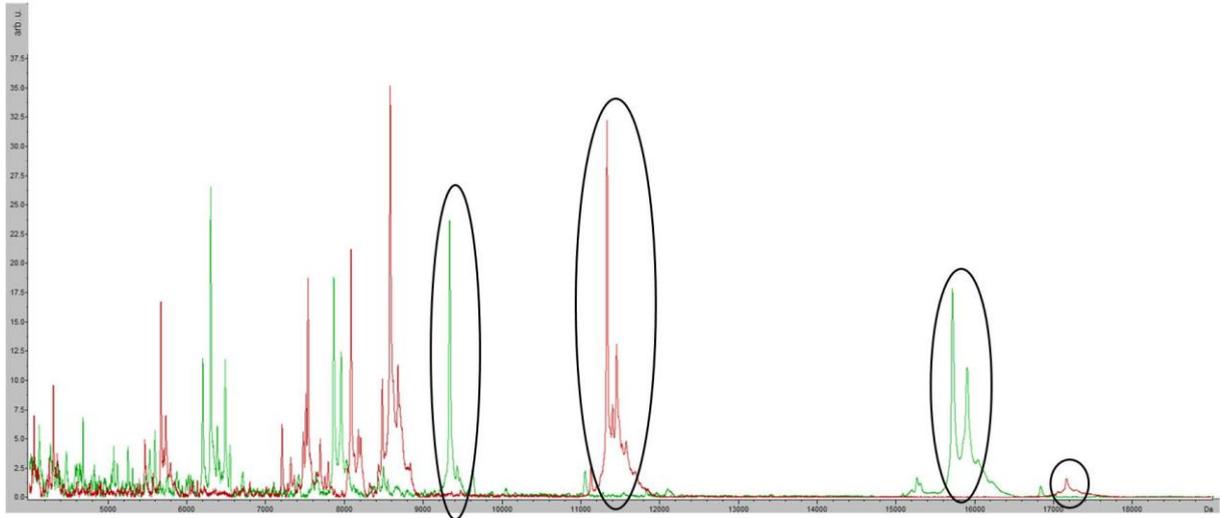


Abbildung 45: Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma Spore* und *Rhizoctonia*

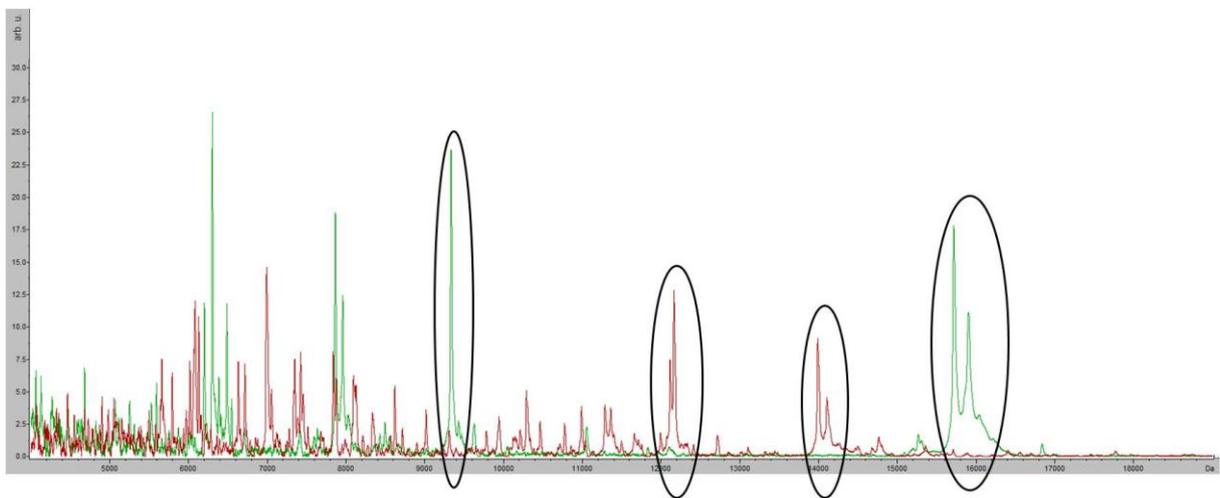


Abbildung 46: Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia*

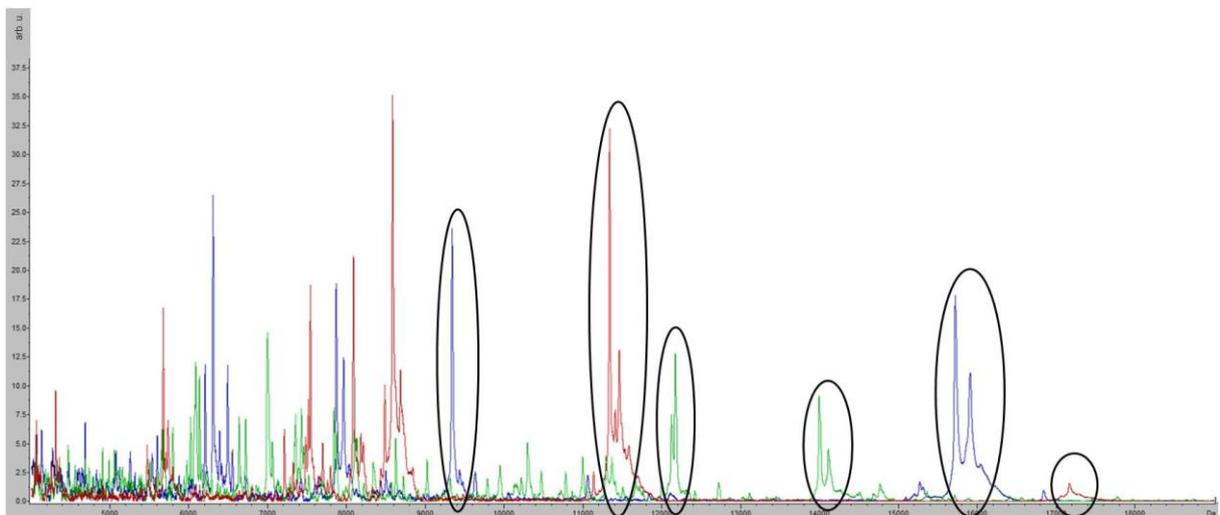


Abbildung 47: Vergleich der Mittelwertspektren von *Trichoderma Spore*, *Trichoderma Mycel* und *Rhizoctonia*

Tabelle 24: Vollständige Peakliste zum Vergleich von *Trichoderma Spore* (TS) mit Mycel (TM)

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen		AUC (ROC)
		TS	TM	TS	TM	
4058,64	3,29	8	4,71	0,42	1,09	1
4303,01	7,84	10,42	2,58	1,79	0,74	1
5667,27	8,4	17,44	9,05	1,09	1,67	1
5730,38	5,35	7,59	2,24	0,68	0,38	1
5790,82	4,35	3,57	7,93	0,34	2,05	1
6015,49	7,51	1,22	8,74	0,17	2,91	1
6068,51	7,56	1,65	9,21	0,23	0,68	1
6080,94	12,49	1,04	13,53	0,22	1,36	1
6128,39	10,93	1,61	12,53	0,49	3,96	1
6630,67	6,84	1,34	8,18	0,41	1,98	1
6714,03	6,71	1,31	8,02	0,31	2,44	1
6991,16	14,09	1,25	15,34	0,09	1,32	1
7205,06	5,96	6,68	0,72	0,55	0,19	1
7347,66	5,88	2,19	8,07	0,4	1,73	1
7421,96	8,05	1,54	9,59	0,2	1,66	1
7472,8	2,76	5,92	3,16	0,61	0,63	1
7509,85	6,57	9,24	2,68	0,99	0,44	1
7534,85	17,88	19,62	1,74	6,66	0,79	1
7690,78	3,36	5,57	2,21	1,3	0,29	1
7835,68	7,71	1,46	9,18	0,29	1,96	1
7871,02	5,6	1,08	6,68	0,13	1,82	1
8082,46	14,55	21,83	7,28	3,27	1,08	1
8124,61	1,84	4,23	6,07	0,49	0,38	1
8173,34	5,58	6,49	0,91	0,73	0,2	1
8205,59	3,67	5,51	1,84	0,59	0,18	1
8478,27	10,04	10,82	0,77	2,31	0,22	1
8577,83	34,62	36,57	1,95	9,28	0,45	1
8616,55	4,67	11,05	6,38	1,09	1,39	1
8677,52	11,15	11,98	0,82	2,28	0,19	1
8710,4	5,6	8,37	2,77	1,28	0,45	1
9940,96	3,11	0,41	3,52	0,1	0,49	1
10290,67	5,82	0,42	6,24	0,09	0,91	1
10463,43	2,81	0,4	3,21	0,1	0,55	1
10774,36	2,86	0,34	3,19	0,07	0,6	1
10989,25	4,16	0,38	4,54	0,08	0,76	1
11127,52	2,17	2,77	0,61	0,32	0,09	1
11290,45	0,91	3,82	4,73	0,48	0,79	0,83
11330,88	29,47	32,94	3,47	4,44	0,98	1
11401,29	6,32	8,26	1,94	0,72	0,33	1
11453,02	12,46	13,39	0,92	1,54	0,21	1
11573,05	4,47	5,03	0,56	0,44	0,06	1
11659,63	0,6	2,62	2,02	0,22	0,28	0,94
11751,54	0,37	1,42	1,05	0,1	0,21	0,97
12116,2	8,5	0,22	8,72	0,08	1,54	1
12164,06	15,37	0,26	15,63	0,06	1,48	1
12715,43	2,01	0,25	2,26	0,02	0,3	1
13990,97	12,25	0,22	12,47	0,05	3,39	1
14107,11	5,17	0,18	5,35	0,05	1,15	1
14763,02	1,61	0,15	1,77	0,03	0,41	1
17165,55	1,61	1,76	0,15	0,41	0,04	1

Tabelle 25: Vollständige Peakliste zum Vergleich von *Trichoderma Spore* (TS) mit *Rhizoctonia* (R)

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen		AUC (ROC)
		TS	R	TS	R	
4058,59	0,03	8	7,97	0,42	2,6	0,54
4302,97	6,32	10,42	4,1	1,79	0,55	1
5668,05	15,36	17,44	2,08	1,09	0,47	1
5730,1	4,85	7,59	2,74	0,68	0,44	1
6199,8	12,32	1,31	13,63	0,15	2,28	1
6300,32	29,61	0,84	30,45	0,16	6,3	1
6384,15	6,39	0,84	7,23	0,09	2,46	1
6485,31	12,47	0,85	13,32	0,11	6,39	1
7205,3	5,57	6,68	1,11	0,55	0,24	1
7474,39	5,02	5,92	0,9	0,61	0,24	1
7508,77	8,47	9,24	0,77	0,99	0,16	1
7535,04	18,47	19,62	1,15	6,66	0,48	1
7691,29	4,34	5,57	1,23	1,3	0,3	1
7862,28	21,61	1,3	22,91	0,19	5,2	1
7955,95	13,52	0,87	14,39	0,08	3,68	1
8038,94	0,74	2,96	3,7	0,52	0,72	0,77
8081,37	19,21	21,83	2,62	3,27	0,61	1
8173,73	5,27	6,49	1,22	0,73	0,31	1
8204,1	4,42	5,51	1,1	0,59	0,44	1
8428,63	1,26	3,41	2,15	0,59	0,62	0,94
8479,09	7,46	10,82	3,35	2,31	1,05	1
8578,01	34,61	36,57	1,96	9,28	0,78	1
8677,49	10,54	11,98	1,43	2,28	0,22	1
9333,23	28,21	0,66	28,87	0,1	8,78	1
9426,92	2,66	0,52	3,18	0,06	1,34	1
9625,37	2,43	0,48	2,91	0,09	1,05	1
11053,16	2,59	0,56	3,15	0,08	1,1	1
11127,75	2,22	2,77	0,55	0,32	0,14	1
11330,85	32,4	32,94	0,55	4,44	0,12	1
11401,72	7,72	8,26	0,54	0,72	0,08	1
11453,2	12,93	13,39	0,46	1,54	0,12	1
11523,95	4,08	4,78	0,7	0,34	0,05	1
11572,96	4,53	5,03	0,5	0,44	0,14	1
15266,03	2,13	0,15	2,27	0,04	0,74	1
15717,2	22,92	0,16	23,07	0,03	8,81	1
15903,77	13,48	0,15	13,63	0,05	2,26	1
16034,61	3,49	0,15	3,64	0,03	0,21	1
16838	1,18	0,17	1,34	0,05	0,71	1
17165,14	1,53	1,76	0,23	0,41	0,04	1

Tabelle 26: Vollständige Peakliste zum Vergleich von *Trichoderma Mycel* (TM) mit *Rhizoctonia* (R)

m/z [Da]	Differenz zwischen größter und kleinster Fläche	Mittelwert Peakfläche		Standardabweichung der Peakflächen		AUC (ROC)
		TM	R	TM	R	
6080,96	11,34	13,53	2,19	1,36	0,4	1
6128,19	11,52	12,53	1,01	3,96	0,17	1
6200,59	10,86	2,77	13,63	0,36	2,28	1
6300,29	27,76	2,69	30,45	0,33	6,3	1
6485,27	11,87	1,44	13,32	0,33	6,39	1
6713,2	5,38	8,02	2,65	2,44	0,44	1
6990,91	14,13	15,34	1,22	1,32	0,25	1
7347,44	7,18	8,07	0,89	1,73	0,29	1
7421,58	7,22	9,59	2,37	1,66	0,81	1
7836,87	6,04	9,17	3,13	1,97	1,23	1
7863,66	15,84	7,08	22,91	1,59	5,2	1
7955,46	12,86	1,53	14,39	0,18	3,68	1
8094,06	5,56	7,28	1,72	1,08	0,56	1
8124,9	4,71	6,07	1,37	0,38	0,44	1
8618	5,25	6,38	1,14	1,39	0,18	1
9333,1	26,24	2,63	28,87	0,37	8,78	1
10290,82	5,69	6,24	0,56	0,91	0,13	1
10774,23	2,62	3,19	0,57	0,6	0,15	1
10989,2	3,87	4,54	0,67	0,76	0,15	1
11048,62	1,55	1,6	3,15	0,39	1,1	0,88
11286,17	3,95	4,73	0,78	0,79	0,19	1
11359,26	3,58	4,11	0,53	1,06	0,14	1
12115,96	7,63	8,72	1,08	1,54	0,13	1
12163,96	14,94	15,63	0,69	1,48	0,15	1
13990,95	12,15	12,47	0,32	3,39	0,08	1
14107,18	5,02	5,35	0,33	1,15	0,07	1
14763,3	1,53	1,77	0,24	0,41	0,08	1
15266,11	2,02	0,25	2,27	0,05	0,74	1
15716,9	22,41	0,66	23,07	0,16	8,81	1
15903,43	13,3	0,33	13,63	0,06	2,26	1

Tabelle 27: Vosllständige Peakliste zum Vergleich von *Trichoderma Spore* (TS), *Mycel* (TM) mit *Rhizoctonia* (R)

m/z [Da]	Mittelwert Peakfläche			Standardabweichung der Peakflächen		
	TS	TM	R	TS	TM	R
4059,45	8	4,71	7,97	0,42	1,09	2,6
5667,09	17,44	9,05	2,12	1,09	1,67	0,39
6080,94	1,05	13,53	2,19	0,21	1,36	0,4
6200,62	1,3	2,77	13,63	0,16	0,36	2,28
6300,29	0,87	2,69	30,45	0,15	0,33	6,3
6485,22	0,85	1,44	13,32	0,11	0,33	6,39
6991,27	1,25	15,34	1,23	0,09	1,32	0,23
7421,53	1,54	9,59	2,39	0,2	1,66	0,79
7509,75	9,24	2,68	0,77	0,99	0,44	0,16
7534,94	19,62	1,74	1,15	6,66	0,79	0,48
7836,63	1,46	9,17	3,13	0,29	1,97	1,23
7863,77	1,15	7,08	22,91	0,06	1,59	5,2
7955,65	0,88	1,53	14,39	0,07	0,18	3,68
8082,29	21,83	7,28	2,66	3,27	1,08	0,65
8479,04	10,82	0,9	3,35	2,31	0,07	1,05
8577,84	36,57	1,95	1,96	9,28	0,45	0,78
8616,83	11,05	6,38	1,15	1,09	1,39	0,17
8677,32	11,98	0,82	1,43	2,28	0,19	0,23
8708,95	8,37	2,77	0,96	1,28	0,45	0,35
9333,08	0,66	2,63	28,87	0,1	0,37	8,78
10290,8	0,42	6,24	0,6	0,09	0,91	0,16
10989,24	0,37	4,54	0,67	0,09	0,76	0,15
11289,01	3,86	4,73	0,78	0,51	0,79	0,19
11330,89	32,94	3,55	0,52	4,44	0,98	0,11
11401,25	8,26	1,94	0,54	0,72	0,33	0,08
11452,93	13,39	0,92	0,44	1,54	0,21	0,11
11572,83	5,03	0,56	0,53	0,44	0,06	0,14
11659,02	2,62	2,02	0,48	0,22	0,28	0,09
12115,98	0,23	8,72	1,08	0,08	1,54	0,13
12163,95	0,26	15,63	0,69	0,06	1,48	0,15
13990,95	0,22	12,47	0,32	0,05	3,39	0,08
14107,17	0,19	5,35	0,33	0,05	1,15	0,07
15266,06	0,15	0,25	2,27	0,04	0,05	0,74
15716,91	0,16	0,66	23,07	0,03	0,16	8,81
15903,44	0,15	0,33	13,63	0,05	0,06	2,26
17165,07	1,76	0,14	0,23	0,41	0,03	0,04