

**Identifizierung mikrobieller Antagonisten
gegen den bodenbürtigen phytopathogenen
Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* und
Nachweis antagonistisch wirkender Metaboliten**

Karin Schreiner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

| | |
|--------------------------|--------------------------------|
| Vorsitzender: | Univ.-Prof. Dr. S. Scherer |
| Prüfer der Dissertation: | 1. Univ.-Prof. Dr. J. C. Munch |
| | 2. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald |

Die Dissertation wurde am 31.01.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.05.2008 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis | 7 |
| Abkürzungen | 9 |
| 1 Einleitung | 13 |
| 2 Stand der Forschung | 15 |
| 2.1 <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , der Erreger der Schwarzbeinigkeit . . . | 15 |
| 2.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Schwarzbeinigkeit | 15 |
| 2.1.2 Biologie und Befallsverlauf | 16 |
| 2.1.3 Klassifizierung von <i>G. graminis</i> und nahe verwandten Pilzen | 18 |
| 2.1.4 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von <i>G. graminis</i> | 19 |
| 2.2 Methoden zur Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit | 22 |
| 2.2.1 Bewirtschaftungsmaßnahmen | 22 |
| 2.2.2 Biologische Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit | 24 |
| 2.2.2.1 Antagonistische Biokontrolle: Take-all Decline | 25 |
| 2.2.2.2 Mögliche Antagonisten gegen <i>Ggt</i> und ihre Wirkungsweise | 26 |
| 2.3 Ziel der Arbeit und methodisches Vorgehen | 29 |
| 3 Material und Methoden | 33 |
| 3.1 Chemikalien | 33 |
| 3.2 Lösungen und Medien | 33 |
| 3.2.1 Puffer und Lösungen | 33 |
| 3.2.2 Nährmedien | 34 |
| 3.3 Biokontrollversuche | 36 |
| 3.3.1 Inokulation mit <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> | 37 |
| 3.3.1.1 Herstellung des <i>Ggt</i> -Inokulums | 37 |
| 3.3.1.2 Pathogenitätstest zur Auswahl eines <i>Ggt</i> -Stammes | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.2 | Feldversuch | 38 |
| 3.3.2.1 | Standort, Boden und Bewirtschaftung | 38 |
| 3.3.2.2 | Parzelleneinteilung und Aussaat | 39 |
| 3.3.2.3 | Probenahmen im Feldversuch | 39 |
| 3.3.2.4 | Befallsbonitur | 41 |
| 3.3.3 | Gewächshausversuch | 41 |
| 3.3.3.1 | Aufbau des Gewächshausversuchs | 41 |
| 3.3.3.2 | Probenahmen im Gewächshaus | 43 |
| 3.3.4 | Isolierung von Mikroorganismen aus der Rhizosphäre | 44 |
| 3.3.4.1 | Gewinnung von Bakterien-Isolaten | 44 |
| 3.3.4.2 | Gewinnung von Pilz-Isolaten | 44 |
| 3.3.5 | Konfrontationstests | 45 |
| 3.3.5.1 | Konfrontationstests der Bakterien-Isolate | 45 |
| 3.3.5.2 | Konfrontationstests der Pilz-Isolate | 46 |
| 3.4 | Metabolitanalyse bei bakteriellen Antagonisten | 48 |
| 3.4.1 | Gewinnung von Sekundärmetaboliten | 48 |
| 3.4.1.1 | Herstellung von Kulturfiltraten | 48 |
| 3.4.1.2 | Größenfraktionierung der Kulturfiltrate | 50 |
| 3.4.1.3 | Nachweis antagonistischer Aktivität in Kulturfiltraten | 50 |
| 3.4.2 | Analyse mit dem FTICR-Massenspektrometer | 51 |
| 3.4.2.1 | Festphasenextraktion | 51 |
| 3.4.2.2 | Alkaline Hydrolyse | 51 |
| 3.4.2.3 | FTICR-Massenspektrometrie | 51 |
| 3.5 | Molekularbiologische Methoden | 53 |
| 3.5.1 | Isolierung von Nukleinsäuren | 53 |
| 3.5.1.1 | Isolierung von pilzlicher DNA | 53 |
| 3.5.1.2 | Isolierung von bakterieller DNA | 53 |
| 3.5.1.3 | Isolierung von pflanzlicher DNA aus Gerstenwurzeln | 53 |
| 3.5.1.4 | Isolierung von Nukleinsäuren aus Bodenproben | 53 |
| 3.5.1.5 | Synthese von cDNA | 54 |
| 3.5.2 | Amplifizierung von DNA | 54 |
| 3.5.2.1 | Primer und Sonden | 54 |
| 3.5.2.2 | Amplifizierung bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen | 54 |
| 3.5.2.3 | Amplifizierung der ITS-Region von Pilz-DNA | 55 |
| 3.5.2.4 | Quantitative TaqMan PCR für <i>Gga</i> und <i>Ggt</i> | 55 |
| 3.5.3 | Sequenzierung von DNA | 59 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.5.3.1 | Sequenzierung bakterieller 16S rRNA-Gene | 59 |
| 3.5.3.2 | Sequenzierung der ITS-Region von Pilz-DNA | 60 |
| 3.5.4 | Populationsanalysen mittels tRFLP-Fingerprints | 60 |
| 3.5.4.1 | tRFLP-Analyse der bakteriellen 16S rRNA | 60 |
| 3.5.4.2 | Statistische Auswertung der tRFLP-Profile | 61 |
| 4 | Ergebnisse | 63 |
| 4.1 | Entwicklung der Schwarzbeinigkeit in den Biokontrollversuchen | 63 |
| 4.1.1 | Pathogenität des <i>Ggt</i> -Inokulums | 63 |
| 4.1.2 | Entwicklung des Schwarzbeinigkeitsbefalls im Feldversuch | 63 |
| 4.1.3 | Entwicklung eines suppressiven Stadiums im Gewächshausversuch | 66 |
| 4.1.3.1 | Pflanzenwachstum im Gewächshausversuch | 66 |
| 4.1.3.2 | Schwarzbeinigkeitsbefall im Gewächshausversuch | 67 |
| 4.2 | Entwicklung eines quantitativen PCR-Assays für <i>Gga</i> und <i>Ggt</i> | 71 |
| 4.2.1 | Absolute Quantifizierung: Standardkurven | 72 |
| 4.2.2 | Quantifizierung von <i>Gg</i> -Varietäten in Reinkultur | 74 |
| 4.2.3 | Quantifizierung von Genkopien im Boden und an Wurzeln | 75 |
| 4.3 | Isolierung und Charakterisierung von Antagonisten gegen <i>Gaeumannomyces</i> <i>graminis</i> var. <i>tritici</i> | 78 |
| 4.3.1 | Isolierung antagonistischer Pilze | 78 |
| 4.3.2 | Isolierung und Identifizierung bakterieller Antagonisten | 81 |
| 4.4 | Identifizierung antagonistisch wirkender, bakterieller Metaboliten | 82 |
| 4.4.1 | <i>Ggt</i> -inhibierende Wirkung der Kulturfiltrate | 82 |
| 4.4.2 | Ergebnisse der FTICR-MS Analyse | 84 |
| 4.4.2.1 | Gesamtextrakt | 84 |
| 4.4.2.2 | Fraktionierung nach Molekulargewicht | 85 |
| 4.4.3 | Identifizierung der inhibierenden Metaboliten als zyklische Lipopeptide | 85 |
| 4.4.4 | Bestätigung der zyklischen Lipopeptidstruktur | 90 |
| 4.5 | Bakterielle Diversität während der Entwicklung eines TAD-Stadiums | 91 |
| 4.5.1 | Auswahl eines Restriktionsenzym | 91 |
| 4.5.2 | Aufbereitung der Rhizosphärenproben für die tRFLP-Analyse | 92 |
| 4.5.3 | tRFLP-Profile | 93 |
| 4.5.4 | Statistische Auswertung der tRFLP-Profile | 95 |
| 5 | Diskussion | 101 |
| 5.1 | Ausbildung spezifischer Suppressivität gegen <i>Ggt</i> in Gersten-Monokultur | 102 |
| 5.2 | Bonitur und Prognose des <i>Gg</i> -Befalls mittels quantitativer PCR | 104 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.3 | Mikrobieller Antagonismus im Rhizosphärenboden | 107 |
| 5.4 | Zyklische Lipopeptide in der bakteriellen Biokontrolle | 109 |
| 5.4.1 | CLP-Produktion in <i>Bacillus</i> und in <i>Pseudomonas</i> | 109 |
| 5.4.2 | CLPs beeinflussen zahlreiche Prozesse in der Rhizosphäre | 110 |
| 5.4.3 | Steuerung der CLP-Produktion | 112 |
| 5.5 | Einfluss des Pathosystems Gerste – <i>Ggt</i> auf die bakterielle Diversität im Rhizosphärenboden | 114 |
| 5.5.1 | Etablierung eines geeigneten tRFLP-Systems | 114 |
| 5.5.2 | Nachweis der biokontrollaktiven Bakterien in der mikrobiellen Gemeinschaft | 116 |
| 5.5.3 | Welche Faktoren beeinflussen die bakterielle Diversität? | 117 |
| 5.6 | Schlussfolgerung | 118 |
| 6 | Zusammenfassung | 121 |
| | Literaturverzeichnis | 123 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Weltweite Verbreitung der Schwarzbeinigkeit | 16 |
| 2.2 | Von <i>Ggt</i> befallene Gerstenwurzeln | 17 |
| 2.3 | Struktureller Aufbau der Arbeit | 31 |
| 3.1 | Wachstum von <i>Ggt</i> auf R-PDA | 35 |
| 3.2 | Lage der Fläche A30 auf dem Versuchsgut Scheyern | 38 |
| 3.3 | Foto der Parzellen Nummer 5 bis 8 des Feldversuchs 2006 | 39 |
| 3.4 | Versuchsdesign Scheyern A30, Aufteilung der Parzellen | 40 |
| 3.5 | Schemazeichnung der im Gewächshausversuch verwendeten Versuchsröhren | 42 |
| 3.6 | Bakterienkolonien auf einer Konfrontationstest-Platte | 45 |
| 3.7 | Inhibitionsklassen im Konfrontationstest der Pilz-Isolate | 47 |
| 3.8 | Vorgehen bei der Metabolitanalyse | 48 |
| 3.9 | Konfrontationstest der für die Metabolitanalyse ausgewählten Bakterien- isolate | 49 |
| 4.1 | Befallserscheinungen von <i>Ggt13</i> an Gerste | 64 |
| 4.2 | Befallsparameter im Feldversuch in den Jahren 2005 bis 2007 | 65 |
| 4.3 | Ertrag im Feldversuch von 2005 bis 2007 | 66 |
| 4.4 | Fotos der Vegetationszyklen 1 bis 6 des Gewächshausversuchs | 68 |
| 4.4 | Fortsetzung | 69 |
| 4.5 | Wachstumsparameter im Gewächshausversuch | 70 |
| 4.6 | Schwarzbeinigkeitsbefall im Gewächshausversuch | 71 |
| 4.7 | TaqMan [®] -System für <i>Ggt</i> | 72 |
| 4.8 | Standardkurve des TaqMan [®] Assays für <i>Ggt</i> | 73 |
| 4.9 | Quantifizierung von DNA aus Reinkulturen mit TaqMan [®] PCR | 75 |
| 4.10 | Quantifizierung von <i>Ggt</i> im Boden und an Wurzeln | 77 |
| 4.11 | Verteilung der Inhibitionsklassen unter den Pilz-Isolaten | 79 |
| 4.12 | Phylogenetische Einordnung der antagonistischen Bakterien-Isolate | 81 |
| 4.13 | Konfrontationstest von Filtraten bakterieller Reinkulturen mit <i>Ggt13</i> | 83 |
| 4.14 | Gesamt-Massenspektrum des Kulturfiltrats von <i>Pseudomonas</i> P39 | 84 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.15 | Größenfraktionierung der Kulturfiltrate | 86 |
| 4.16 | Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Kulturfiltrats von <i>Pseudomonas</i> P39 | 88 |
| 4.17 | Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Kulturfiltrats von <i>Bacillus subtilis</i> B171 | 89 |
| 4.18 | Ausschnitt aus dem Massenspektrum des hydrolysierten Kulturextrakts von <i>Pseudomonas</i> P39 | 90 |
| 4.19 | Terminale Restriktionsfragmente (tRFs) für Reinkulturen einiger bakteri- eller Isolate | 92 |
| 4.20 | Reproduzierbarkeit der tRFLP-Profile nach Homogenisierung einer Rhizo- sphärenprobe | 94 |
| 4.21 | Charakteristisches tRFLP-Profil der Rhizosphärenproben aus dem Ge- wächshausversuch | 95 |
| 4.22 | Relative Anbundanz der tRFs von <i>Streptomyces</i> und <i>Pseudomonas</i> | 96 |
| 4.23 | Hauptkomponentenanalyse des tRFLP-Datensatzes für den <i>Ggt</i> -inokulier- ten bzw. den nicht inokulierten Boden | 97 |
| 4.24 | Hauptkomponentenanalyse des gesamten tRFLP-Datensatzes | 98 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 3.1 | Dauer der Vegetationsperiode und Beprobungstermine im Feldversuch . . . | 41 |
| 3.2 | Vegetationszyklen und Probenahmen im Gewächshausversuch | 43 |
| 3.3 | PCR- und Sequenzierungs-Primer | 55 |
| 3.4 | Auswahl der Stämme von <i>Gaeumannomyces graminis</i> für das Screening nach Varietäten | 57 |
| 4.1 | Kalibrierungsfunktionen und Korrelationskoeffizienten für die verwendeten TaqMan [®] Assays | 74 |
| 4.2 | Quantifizierung von <i>Gga</i> und <i>Ggt</i> in Boden- und Wurzelproben | 76 |
| 4.3 | Morphologische Gruppen der Pilz-Isolate | 80 |
| 4.4 | Phylogenetische Einordnung der antagonistischen Bakterien-Isolate | 82 |
| 4.5 | Eigenschaften der detektierten zyklischen Lipopeptide | 87 |
| 4.6 | Theoretische und beobachtete Fragmentlängen bei der tRFLP-Analyse bakterieller Reinkulturen | 93 |
| 4.7 | PerMANOVA für die tRFLP-Profile von <i>Ggt</i> -inokulierten und nicht inoku- lierten Proben | 99 |

Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| A30 | Ackerschlag 30 des Versuchsguts Scheyern |
| AHL | Ammoniumnitrat-Harnstoff-Lösung |
| AS | Aminosäure |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CFU | Colony Forming Unit |
| CLP | Zyklisches Lipopeptid |
| cnts | counts |
| cv. | Kultivar |
| CV | Coefficient of Variation |
| d | Tag |
| DAPG | 2,4-Diacetylphloroglucinol |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DCA | Detrended Correspondence Analysis |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphat |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| EC | Entwicklungsstadium nach Tottman und Broad (1987) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMBL | European Molecular Biology Laboratory |

| | |
|--------------------------------|---|
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| FTICR-MS | Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry |
| <i>Gga</i> | <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i> |
| <i>Ggg</i> | <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> |
| <i>Ggt</i> | <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> |
| h | Stunde |
| H ₂ O _{MQ} | MilliQ®-Wasser |
| ITS | Internal Transcribed Spacers |
| kb | Kilobasen |
| MeOH | Methanol |
| min | Minute |
| mM | millimolar |
| MW | Molekulargewicht |
| NRPS | Nonribosomale Peptidsynthetase |
| nt | Nukleotide |
| NTC | No Template Control |
| OD _x | Optische Dichte bei x nm |
| PCA | Principal Components Analysis |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PerMANOVA | Permutational Multivariate Analysis of Variance |
| PGPR | Plant Growth Promoting Rhizobacteria |
| PP | Polypropylen |
| qPCR | quantitative PCR |
| RAPD | Random Amplified Polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| R-PDA | Rifampicin–Potato Dextrose Agar |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| SEA | Soil Extract Agar (Bodenextraktmedium) |

| | |
|-------|---|
| sp. | species |
| SPE | Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion) |
| spp. | species (Mrz.) |
| TAD | Take-all Decline |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| tRF | Terminal Restriction Fragment |
| tRFLP | Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| ÜN | über Nacht |
| var. | Varietät |
| Vol. | Volumen |

Zusätzlich wurden die Einbuchstabencodes für Aminosäuren und Nukleotide verwendet sowie SI-Einheiten und die Symbole für die chemischen Elemente.

1 Einleitung

Pflanzen in agrarwirtschaftlichen Produktionssystemen sind dem Angriff zahlreicher bodenbürtiger Phytopathogene ausgesetzt, die zu hohen Ertragseinbußen wie auch Toxin-kontaminationen des Ernteguts führen können. Um eine langfristige Sicherung der Erträge ohne Pestizidfrachten zu gewährleisten, ist die Entwicklung neuartiger Bekämpfungsstrategien und Pflanzenschutzmittel wichtig. Einen hohen Stellenwert nehmen dabei biologische Bekämpfungsmaßnahmen ein, die dazu beitragen können, den Pestizideinsatz in der Landwirtschaft zu reduzieren und gestiegenen ökologischen Anforderungen Rechnung zu tragen.

Für die wirksame und nachhaltige Bekämpfung bodenbürtiger Krankheitserreger ist es von entscheidender Bedeutung, die Prozesse in der Rhizosphäre, die die Schnittstelle zwischen Pflanze und Pathogen darstellt, zu verstehen. Die Rhizosphäre bildet einen wichtigen Lebensraum für eine Vielzahl von Mikroorganismen, die sowohl untereinander als auch mit der Pflanze interagieren. Viele dieser Mikroorganismen können antagonistisch gegen Pathogene wirken, etwa durch die Produktion verschiedener Sekundärmetaboliten. Der biologische Pflanzenschutz strebt unter anderem die Anreicherung dieser Mikroben in der Rhizosphäre und die gezielte Stimulation ihrer antagonistischen Aktivität an.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Thematik anhand des Pathosystems Gerste (*Hordeum vulgare*) – *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) bearbeitet. Die von *Ggt* verursachte Schwarzbeinigkeit ist eine der weltweit bedeutendsten Getreidekrankheiten und kann zu beträchtlichen Ertragseinbußen führen. Es ist bekannt, dass die Krankheit in bestimmten, suppressiven Böden trotz Gegenwart des Pathogens nicht mehr zum Ausbruch kommt. Die Suppression des Erregers kann durch den langjährigen Anbau einer Wirtspflanze induziert werden und wird auf mikrobielle Antagonisten in der Rhizosphäre zurückgeführt. Diese Mikroorganismen stellen ein wichtiges Potenzial für die Entwicklung neuer, biologischer Bekämpfungsmethoden gegen *Ggt* dar. Allerdings sind die detaillierten Prozesse, die bei der molekularen Interaktion von Antagonist und Pathogen stattfinden, bislang kaum aufgeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Erkenntnisse über die beteiligten Antagonisten und Metaboliten zu gewinnen und daraus grundlegende Mechanismen abzuleiten, die zur Suppression bodenbürtiger Phytopathogene führen.

2 Stand der Forschung

2.1 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, der Erreger der Schwarzbeinigkeit

2.1.1 Verbreitung und Bedeutung der Schwarzbeinigkeit

Die durch den bodenbürtigen Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) hervorgerufene Schwarzbeinigkeit ist zweifellos eine der bestuntersuchten Getreidekrankheiten. Nichtsdestotrotz ist sie weiterhin die weltweit bedeutendste Wurzelkrankheit im Weizenanbau (Cook, 2003). Die Schwarzbeinigkeit wurde erstmals 1852 von australischen Weizenfarmern beschrieben, die ihr auch ihren englischen Namen „Take-all“ gaben (Garrett, 1981). Offenbar war der Befall so schwerwiegend, dass „buchstäblich kein Korn zur Ernte übrig blieb“. Obwohl seither viele Jahre intensiver Forschung zu einem beachtlichen Verständnis der Krankheit geführt haben, ist ihre nachhaltige und wirtschaftliche Bekämpfung immer noch schwierig (Freeman und Ward, 2004).

Auch an Gerste zählt die Schwarzbeinigkeit neben dem Mehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) zu den bedeutendsten Krankheiten. Da Gerste in der Fruchtfolge oft nach Winterweizen angebaut wird, ist sie dem Erreger der Schwarzbeinigkeit besonders ausgesetzt (Mielke, 1992).

Das Pathogen *Ggt* ist weltweit in nahezu allen gemäßigten Klimazonen verbreitet. Es kommt sowohl auf der Nord- als auch der Südhalbkugel vor, und zwar besonders in Getreideanbauregionen, in denen keine Fruchtwechselwirtschaft stattfindet (Abb. 2.1). Aktuelle Studien belegen, dass der Pilz in Deutschland in ackerbaulich genutzten Böden ebenfalls weit verbreitet ist (Heß und Habermayer, 1999; Heß, 2006). *Ggt* kommt vor allem auf lehmigem Sand, sandigem Lehm und anmoorigen Böden vor, kann aber auch auf Löß- und Lehmböden Schäden verursachen (Mielke, 1998). Mit der Zunahme des Anbaus von Weizen und Gerste in Deutschland hat die Krankheit in den letzten Jahren auch hier spürbar an Bedeutung gewonnen (Mielke, 1992, 1998).

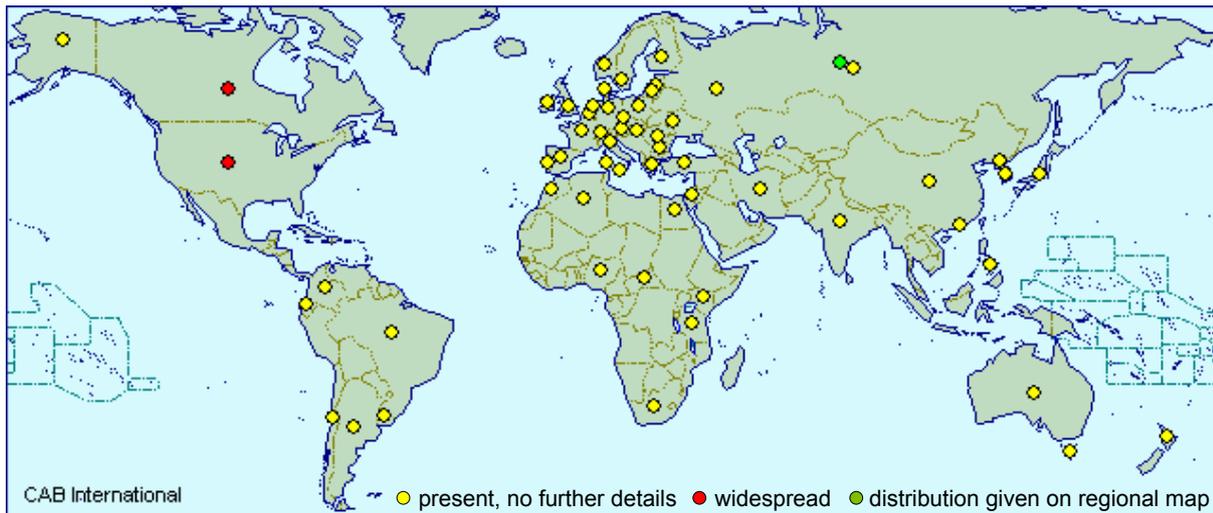


Abbildung 2.1 Weltweite Verbreitung der Schwarzbeinigkeit, reproduziert aus dem Crop Protection Compendium, Edition 2007, © CAB International, www.cabi.org/compendia/cpc/. Die Karte basiert auf den vom Commonwealth Mycological Institute (1984) veröffentlichten, weiterhin aktuellen Verbreitungsdaten.

2.1.2 Biologie und Befallsverlauf

Ggt infiziert seine Wirtspflanzen ausgehend von Stoppelresten der Getreidevorfrucht, an denen der Pilz saprophytisch überdauert, aber auch von Ausfallgetreide und Gräsern, die als Wirt dienen können. Er entwickelt sich am besten in mäßig feuchten, gut durchlüfteten Böden bei 10–20°C. Bei der Primärinfektion wächst das Pilzmycel zunächst mit charakteristischen dunkelbraunen Laufhyphen bis zu den Pflanzenwurzeln und besiedelt deren Oberfläche (Skou, 1981). Die Laufhyphen dienen der Verbreitung innerhalb des Wurzelsystems einer Pflanze, aber auch zwischen Pflanzen im Bestand (Sekundärinfektion; Bailey und Gilligan, 1999), wodurch oft ein nesterweises Auftreten der Schwarzbeinigkeit zu beobachten ist. Die Laufhyphen setzen sich aus mehreren fusionierten Hyphen zusammen, die anschwellen und Melanin einlagern (Abb. 2.2). Laut Henson et al. (1999) ist die Melanin-Biosynthese in *Ggt* erforderlich, um Schwarzbeinigkeit auszulösen. Von der mittels Laufhyphen kolonisierten Wurzeloberfläche dringen dann hyaline, farblose Infektionshyphen in die Wurzelrinde ein und durchwachsen das Gewebe bis zum Zentralzylinder. Die Penetration der Epidermis, welche eine Barriere innerhalb des Wurzelgewebes darstellt, ist ein wichtiges Kriterium hinsichtlich der Pathogenität des Pilzes (Speakman und Lewis, 1978). Ist der Pilz in den Zentralzylinder eingedrungen, kommt es zu einer Verstopfung und Zerstörung der Leitungsbahnen, wobei zunächst das Phloem und dann das Xylem angegriffen werden (Clarkson et al., 1975; Deacon, 1981). Die Pflanze reagiert auf den Befall mit verstärkter Lignineinlagerung in den Wurzelzellwänden, daher sind infizierte Wurzeln oft vermorscht und brüchig (Heß und Habermayer, 1999; Skou, 1981). Je nach

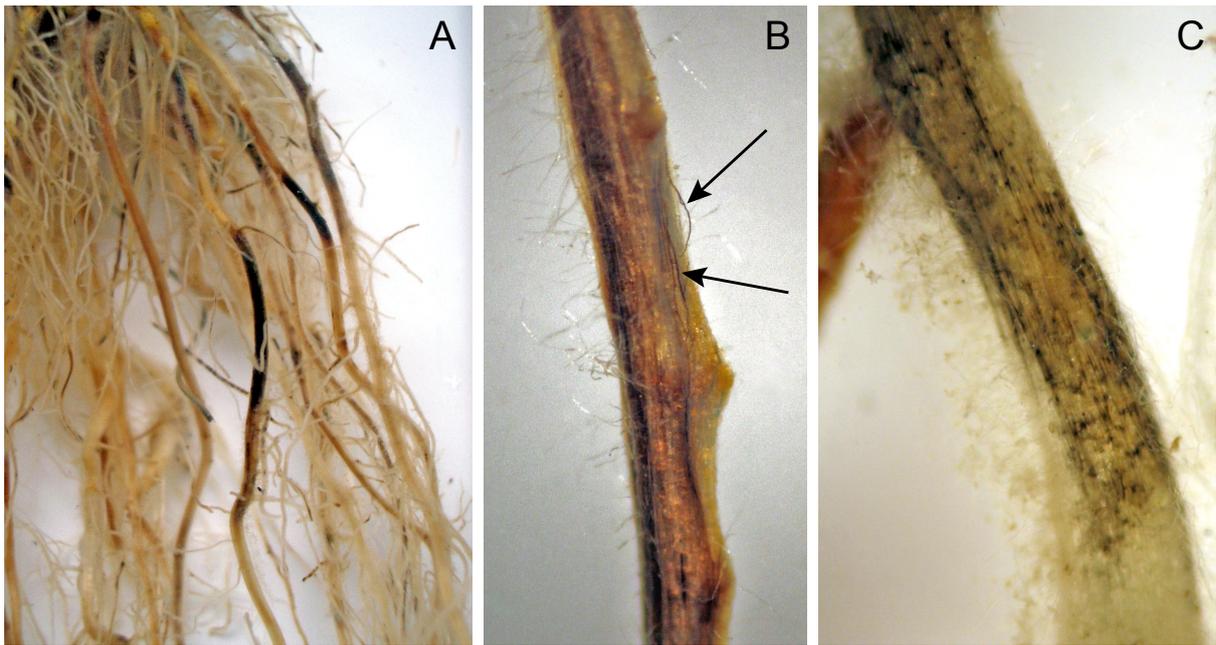


Abbildung 2.2 Von *Ggt* befallene Gerstenwurzeln.

A. Charakteristische Verschwärzungen der Wurzel durch Pilzmycel.

B. Dunkle Laufhyphen entlang der Wurzeloberfläche (Pfeile).

C. Läsionen des Wurzelgewebes. Infektionshyphen, die von den Laufhyphen ausgehen, dringen in das Gewebe ein und führen zu einer Verfärbung der Leitungsbahnen.

Stärke der Infektion werden das Wachstum und die Funktion der Wurzeln, insbesondere die Wasser- und Nährstoffaufnahme, erheblich gestört, was ein Vergilben der Blätter und Notreife mit schlechter Kornausbildung verursachen kann. Oft kommt es dabei ab der Milchreife zum Erbleichen der gesamten Ähre, der sogenannten Weißährigkeit, die als ein typisches Symptom der Schwarzbeinigkeit angesehen wird.

Bei starkem Befall wird auch die Halmbasis von dunklen Laufhyphen besiedelt, was der Krankheit ihren deutschen Namen gab. *Ggt* kann an der Sprossbasis dunkle, flaschenförmige Fruchtkörper (Perithezien) ausbilden, deren Öffnungskegel aus dem Pflanzengewebe herausragen (Skou, 1981). Die dort gebildeten Ascosporen werden mit dem Wind verfrachtet und können neue, weiter entfernte Flächen besiedeln. Für die Verbreitung im Bestand spielen die Ascosporen aber kaum eine Rolle, da sie über eine relativ geringe saprophytische Konkurrenzskraft im Boden verfügen (Wilmsmeier, 2002). Nach der Ernte verbleiben infizierte Pflanzenreste im Boden, die beim erneuten Anbau einer Wirtspflanze als natürliches Inokulum dienen.

Klimatische Faktoren haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Schwarzbeinigkeit. Das Wachstum von *Ggt* wird durch feuchte, milde Witterung gefördert, insbesondere durch hohe Niederschläge im Frühjahr und Sommer, während es bei Trockenheit stagniert (Clarkson und Polley, 1981; Hornby, 1998; Smiley et al., 1996).

Strenge Winter können verhindern, dass Stoppelreste und damit pilzliches Inokulum im Boden abgebaut werden, was das Befallsrisiko in der darauf folgenden Vegetationsperiode stark erhöht (Hornby, 1978).

2.1.3 Klassifizierung von *G. graminis* und nahe verwandten Pilzen

Der vollständige Name des Erregers der Schwarzbeinigkeit lautet *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx et Olivier var. *tritici* Walker. *G. graminis* trug ursprünglich den Namen *Ophiobolus graminis*, der ihm 1881 von dem Mykologen Saccardo gegeben wurde. Erst 1952 wurde er von Arx und Olivier in *G. graminis* umbenannt, die ihn auch erstmals den Ascomyceten zuordneten. Walker (1972) beschrieb schließlich var. *tritici*, die an Weizen pathogene Varietät von *G. graminis*.

Gaeumannomyces ist ein Ascomycet aus der Familie *Magnaporthaceae* und somit verwandt mit *Magnaporthe grisea*, dem Erreger des Reis-Mehltaus. Diese weltweit wohl bedeutendste Blattkrankheit von Reis nutzt Befallsmechanismen (z. B. melanisierte Appressorien), die denen wurzelinfizierender Pathogene sehr ähnlich sind (Dean et al., 2005; Sesma und Osbourn, 2004). Die Gattung *Gaeumannomyces* umfasst sieben Arten: *G. graminis* und *G. cylindrosporus* infizieren Getreidearten und Gräser (Hornby, 1998), während *G. caricis* Seggen befällt (Freeman und Ward, 2004). *G. incrustans* wurde von Rasengräsern isoliert (Landschoot und Jackson, 1989), *G. medullaris* von einer Binse (Kohlmeyer et al., 1995), *G. amomi* von wildem Ingwer (Bussaban et al., 2001) und *G. wongoonoo* von Büffelgras (Wong, 2002).

Die Nebenfruchtformen (Anamorphen) von *Gaeumannomyces* gehören der Gattung *Phialophora* an (Gams, 2000). Taxonomische Arbeiten fassen beide Gattungen daher oft als *Gaeumannomyces-Phialophora*-Komplex zusammen (Freeman und Ward, 2004; Hornby, 1998; Walker, 1981).

Für *G. graminis* wurden vier Varietäten identifiziert, die sich in Wirtsspektrum, Pathogenität, Größe der Ascosporen und Struktur der Hyphopodien unterscheiden (zusammengefasst in Freeman und Ward, 2004):

- *G. graminis* var. *tritici* (*Ggt*) ist die Varietät mit der größten Bedeutung für den Getreideanbau. Sie ruft Schwarzbeinigkeit an Weizen, Gerste, Triticale und Roggen hervor. Auch zahlreiche andere Gramineen können von *Ggt* befallen werden und die Krankheit auf das nächste Getreide in der Fruchtfolge übertragen (Hornby, 1998; Walker, 1981).
- *G. graminis* var. *avenae* (*Gga*) hat zwar ein ähnliches Wirtsspektrum wie *Ggt*, der Pathogenitäts-Schwerpunkt liegt aber im Bereich der Gras- und nicht der

Getreide-Arten (Walker, 1981). *Gga* kann im Gegensatz zu *Ggt* auch Hafer befallen, da es die von Hafer exsudierten, antifungalen Avenacine entgiften kann. Dies geschieht durch Produktion des Enzyms Avenacinase (Rachdawong, 1999). Hauptsächlich ist *Gga* jedoch als Pathogen des Straußgrases *Agrostis capillaris* bekannt, welches oft auf Golfplätzen angepflanzt wird (Cook, 2003).

- *G. graminis* var. *graminis* (*Ggg*) befällt das ebenfalls auf Golfplätzen verwendete Bermudagrass (Elliott, 1991), hat aber seine größte wirtschaftliche Bedeutung als Erreger der Schwarzbeinigkeit von Reis (Ou, 1972). *Ggg* ist an verschiedenen Gräsern weit verbreitet, ohne pathogen zu sein. Im Unterschied zu den anderen drei Varietäten hat *Ggg* gelappte Hyphopodien und lässt sich so morphologisch leicht abgrenzen (Walker, 1981).
- *G. graminis* var. *maydis* (*Ggm*) ist der Erreger der Schwarzbeinigkeit von Mais (Hornby, 1998; Yao et al., 1992).

2.1.4 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von *G. graminis*

Die Klassifizierung von *Gg*-Varietäten auf Basis von Krankheitssymptomen, Wirtsspektrum und morphologischen Merkmalen in Kultur ist schwierig, zeit- und arbeitsaufwändig. Viele der morphologischen Merkmale, etwa die Länge der Ascosporen, sind zudem nicht eindeutig zuzuordnen (Clarkson und Polley, 1981). Einige semiselektive Medien haben sich als nützlich zur Identifikation von *Ggt* erwiesen, sind aber nicht geeignet, wenn avirulente *Phialophora* spp. vorkommen, die *Ggt* in Kultur sehr ähnlich sind (Hornby, 1998; Juhnke et al., 1984). Die Quantifizierung von *Ggt* im Boden erfolgte ursprünglich mit Hilfe eines Boden-Bioassays, der den Prozentsatz infizierter Keimwurzeln von Weizen misst (Hornby, 1981). Diese Methode ist jedoch äußerst zeitaufwändig (4–6 Wochen), subjektiv und benötigt viel Platz unter kontrollierten Bedingungen.

Diese Schwierigkeiten können durch die Anwendung molekularer Nachweisverfahren ausgeräumt werden, weil diese eine kultivierungsunabhängige Detektion der Varietäten ermöglichen. In den letzten Jahren wurde daher eine Reihe molekularbiologischer Methoden entwickelt und eingesetzt, um *G. graminis* auf Spezies- und Varietäten-Ebene zu detektieren (Freeman und Ward, 2004). Die wichtigsten sind im Folgenden aufgeführt.

- **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysen**

Einige RFLP-Analysen zur Identifizierung von *G. graminis* basieren auf der Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden. Die erste dieser Sonden wurde von Henson

(1989) entwickelt. Es handelt sich um das Plasmid pMSU315, welches ein Fragment der mitochondrialen DNA (mtDNA) von *Ggt* enthält. Diese Sonde hybridisiert mit allen *Gg*-Varietäten und mit *Phialophora*-Arten und kann *Gg* von anderen Bodenzpilzen unterscheiden. Bei der RFLP-Analyse mit *Bam*HI erzeugt pMSU315 eine charakteristische Bande für *Ggt* und *Gga*, nicht aber für *Ggg* (Bateman et al., 1992; Henson, 1992). Die Sonde ist allerdings nicht sensitiv genug, um das Pathogen in natürlich infizierten Pflanzen oder im Boden nachzuweisen (Henson et al., 1993).

Eine von Tan et al. (1994) publizierte Sonde gegen nukleäre 26S rRNA-Sequenzen unterscheidet bei der RFLP-Analyse ebenfalls *Ggt* und *Gga* von *Ggg*, identifiziert aber zusätzlich Untergruppen von *Ggt*. O'Dell et al. (1992) verwendeten zur RFLP-Hybridisierung markierte Gesamt-DNA von *Ggt* und erhielten dadurch jeweils ähnliche Muster für *Gg*-Isolate, die vom gleichen Wirt isoliert worden waren. Auch die RFLP-Analysen von Bryan et al. (1999) gruppierten die untersuchten Isolate in Übereinstimmung mit ihrer Wirtspräferenz.

Ward und Akrofi (1994) erstellten RFLP-Muster von PCR-Amplifikaten der ribosomalen ITS-Region, die zur Identifizierung von Isolaten bis auf Varietäten-Ebene geeignet waren. Sie berichten jedoch von intermediären Mustern bei einigen Isolaten, deren Zuordnung damit fraglich war.

In Summe sind die beschriebenen RFLP-basierten Methoden zum Nachweis von *G. graminis* relativ zeitaufwändig, können nicht zweifelsfrei zwischen *Ggt* und *Gga* differenzieren und eignen sich nicht zum direkten Nachweis in Umweltproben.

- **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysen**

Mehreren Autoren gelang es, mittels RAPD-Analysen pilzliche Isolate verschiedenen Spezies und Varietäten von *Gaeumannomyces* zuzuordnen, allerdings waren dafür mehrere RAPD-Primer nötig und die Ergebnisse waren z. T. inkonsistent (Augustin et al., 1999; Bryan et al., 1999; Fouly et al., 1996). RAPD-Analysen bedürfen daher einer zusätzlichen Absicherung und sind im Allgemeinen weniger gut zur spezifischen Identifizierung geeignet als die anderen hier vorgestellten Methoden.

- **Spezifische PCR-Assays**

Es wurden mehrere PCR-Primerpaare für den spezifischen Nachweis bestimmter *Gaeumannomyces*-Spezies und Varietäten von *G. graminis* entwickelt. Die meisten basieren auf den rRNA-Gensequenzen. Bryan et al. (1995) verwendeten die PCR-Primerpaare pGt1/pGt2 und pGa1/pGa2 für die spezifische Detektion von *Ggt* bzw. *Gga*, aber pGt1/pGt2 amplifizieren wahrscheinlich auch mindestens ein *Ggg*-Isolat

(Freeman und Ward, 2004; Lebuhn et al., 2000). Fouly und Wilkinson (2000b) setzen die reversen Primer GGT-RP und GGA-RP zusammen mit dem forward-Primer NS5 (White et al., 1990) ein, die DNA von *Ggt*- und *Gga*-Isolaten amplifizieren, aber keine der getesteten Isolate von *Ggg* oder anderer *Gaeumannomyces*-Arten. Die Amplifizierung mit NS5/GGT-RP ergibt verschieden große PCR-Produkte für *Ggt* und *Gga* und ermöglicht so eine Unterscheidung dieser Varietäten.

Eine mehrstufige PCR zur spezifischen Detektion von *Gaeumannomyces*-, *Phialophora*- und *Magnaporthe*-Arten amplifiziert mitochondriale DNA (Henson, 1992; Schesser et al., 1991). Die dazu verwendeten Primer basieren auf der von Henson (1989) entwickelten Sonde pMSU315 (s. o.) und erlauben den Nachweis von *G. graminis* auch an natürlich infizierten Wurzeln. Ophel-Keller et al. (1995) gelang mit den gleichen Primern der erste PCR-Nachweis von *Ggt* in natürlich infiziertem Boden. Die mehrstufige PCR wurde von Ward (1995) zu einer single-step PCR mit dem Primerpaar KS1F/KS2R vereinfacht. Dieses konnte *Ggt* und *Gga* aufgrund der Amplifikatgröße trennen, alle anderen PCR-Produkte (Isolate von *Ggm*; die *Ggm*-Anamorphen *P. radicicola* und *P. zeicola*; *Cephalosporium maydis*) hatten jedoch eine ähnliche Amplifikatlänge wie *Ggg* (Ward und Bateman, 1999).

Ein weiterer spezifischer PCR-Assay für *Ggt*, *Gga* und *Ggg* beruht auf Unterschieden der Avenacinase-Gensequenzen in den drei Varietäten (Rachdawong et al., 2002). In *Gga* kodieren diese Gene für das Enzym Avenacinase, welches die antifungalen Avenacine von Hafer entgiften kann. *Ggt* und *Ggg* dagegen produzieren Avenacinase-ähnliche Proteine, die keine Aktivität gegen Avenacin haben. Der Assay verwendet varietätsspezifische forward-Primer zusammen mit einem allgemeinen reverse-Primer, um Amplifikate unterschiedlicher Größe zu erhalten. Die PCR-Produkte einiger *Ggt*-Isolate zeigten jedoch die für *Ggg* erwartete Größe, daher schlugen die Autoren weitere Tests zur Bestätigung der Varietätsspezifität vor. Genowati (2001) wandte das System für den direkten Nachweis an infizierten Wurzeln und im Boden an, berichtet allerdings von inkonsistenten Ergebnissen und schlägt eine Optimierung des Assays vor. Die Avenacinase-Primer wurden von Thomas (2004) zur Anwendung als *Gga*-spezifische quantitative TaqMan[®] PCR weiterentwickelt, allerdings kann auch dieser Test nicht zwischen *Ggt* und *Ggg* unterscheiden.

Der große Vorteil spezifischer PCR-Assays ist ihr geringer Zeitaufwand, durch den sie gut für Routinetests geeignet sind. Zudem besteht die Möglichkeit, quantitative Assays zu etablieren und in Umweltproben einzusetzen.

Trotz des breiten Spektrums molekularbiologischer Methoden wurden die meisten Verfahren bisher nur zur Klassifizierung pilzlicher Isolate eingesetzt. Nur wenige Studien befassen sich mit dem direkten, qualitativen Nachweis von *G. graminis* in Bodenproben oder an infizierten Wurzeln. Zur molekularbiologischen Quantifizierung des Pathogens im Boden gibt es bislang nur einen von Herdina und Roget (2000) entwickelten Hybridisierungsassay, der in Australien kommerziell zur Vorhersage des Krankheitsbefalls eingesetzt wird. Da *G. graminis* Monitoring-Ergebnissen zufolge auch in Deutschland weit verbreitet ist (Heß, 2006), wäre auch hier eine Quantifizierung im Boden nützlich. Außerdem könnte man mit einem geeigneten Assay absichern, ob Befallssymptome an der Pflanze tatsächlich auf *Ggt* zurückzuführen sind bzw. zu welchem Anteil sie von *Ggt* ausgehen. Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte quantitative TaqMan[®] PCR-Assay zur Detektion von *Ggt* und *Gga*, der z. T. auf Modifikationen der oben erwähnten Primer von Bryan et al. (1995) und Fouly und Wilkinson (2000b) basiert, wurde daher zur Anwendung sowohl im Boden als auch an der Wurzel etabliert (Kap. 4.2).

2.2 Methoden zur Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit

Als bodenbürtiges Pathogen war der Pilz *Ggt*, der sowohl parasitisch als auch saprophytisch an Pflanzenresten im Boden zu überdauern vermag, seit jeher schwer zu bekämpfen. Bisher gibt es keine resistenten Wirtspflanzen, und die Entwicklung wirksamer Fungizide steckt auch heute noch im Anfangsstadium. Seit fast einem Jahrhundert liegt der Fokus der Schwarzbeinigkeitsbekämpfung daher auf Bewirtschaftungsmaßnahmen und Mechanismen der antagonistischen Biokontrolle. Die intensive Forschung auf diesen Gebieten erbrachte jedoch meist nur einen orts- oder bodenspezifischen Erfolg (Cook, 2003).

2.2.1 Bewirtschaftungsmaßnahmen

Fruchtwechsel

Die wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit ist der Fruchtwechsel (Yarham, 1981). Die Wahl einer gesunden Fruchtfolge aus Getreide, Blatt- (z. B. Raps, Sonnenblumen, Mais) und Hackfrüchten (z. B. Kartoffeln, Zuckerrüben) bietet den wirkungsvollsten Schutz gegenüber Ertragsverlusten. Um den Befall mit *Ggt* zu verhindern, sollte der Anteil von Weizen, Gerste und Roggen an der Fruchtfolge 60 % nicht überschreiten (Mielke, 1998). Bereits eine ein- bis zweijährige Anbaupause anfälliger Getreidearten senkt das Befallsrisiko deutlich (Cook, 2003).

Auch eine Gründüngung mit Klee-Gras-Mischungen oder Reinsaaten verschiedener Gräser können sich günstig auswirken, da sie oft zum verstärkten Auftreten nicht pathogener *Phialophora*-Spezies führen (Mielke, 1998). Durch „Cross-Protection“ können diese die Ausbreitung von *Ggt* verhindern (Kap. 2.2.2.2; Wong, 1981).

Die Vorfrucht kann sich entscheidend auf den Schwarzbeinigkeitsbefall auswirken. Roggen etwa wird von *Ggt* befallen und vermehrt den Pilz sehr stark, obwohl er selbst nur selten einen Ertragsrückgang zeigt (Scott, 1981). Er erhöht damit aber das Risiko für nachfolgende Getreidearten erheblich. Auch nach Winterraps, der selbst keine Wirtspflanze ist, tritt bei Weizen oft ein stärkerer Befall auf, vermutlich weil *Ggt* unter Raps aufgrund der langen Bodenbedeckung mit hoher Bodenfeuchte gut überdauern kann (Hornby, 1998). Erstaunlicherweise kann der Schwarzbeinigkeitsbefall auch durch den Anbau von Weizen oder Gerste in Monokultur reduziert werden – ein als „Take-all Decline“ bezeichnetes Phänomen, das in Kap. 2.2.2.1 erläutert wird.

Ackerbauliche Maßnahmen

Viele ackerbauliche Maßnahmen können das Auftreten der Schwarzbeinigkeit beeinflussen, etwa der Aussaattermin, die Wahl der Bodenbearbeitung, verschiedene Düngemaßnahmen und die Bekämpfung von Unkräutern.

Eine frühe Aussaat von Wintergetreide führt oft zu erhöhtem Befall, da sich *Ggt* bei höheren Bodentemperaturen im Herbst gut entwickeln kann (Hornby, 1998; Mielke, 1998). Ist der Boden bei der Aussaat sehr locker, kann das die Krankheit noch verschlimmern (Garrett, 1981). Auf „schweren“ Böden dagegen können Bodenverdichtung und schlechte Drainage ebenfalls zu erhöhtem Befall führen, da die Wurzelentwicklung beeinträchtigt und die Regenerationskraft der Pflanzen geschwächt ist (Yarham, 1981).

Bestimmte Bodenbearbeitungsmaßnahmen können das Befallsrisiko verringern: Durch Unterpflügen der Stoppeln im Herbst werden pathogenbesiedelte Pflanzenreste in den Boden eingebracht, wo sie leichter verrotten. Dadurch kann die saprophytische Überdauerung von *Ggt* verhindert werden (Cook, 2003; Hornby, 1998).

Der Schwarzbeinigkeitsverlauf hängt auch vom Ernährungszustand der Pflanze ab, der ihre Widerstandskraft gegen *Ggt* beeinflusst (Huber, 1981). Sowohl Stickstoff- als auch Phosphat- und Mangan-Mangel können das Infektionsrisiko erhöhen, aber die Bedeutung dieser Nährstoffe variiert je nach geographischer Lage. So haben Stickstoff und Phosphat in Großbritannien einen höheren Stellenwert, während in den USA und in Australien Mangan die wichtigere Rolle spielt (Hornby, 1998).

Die Bekämpfung von Unkräutern ist insofern wichtig, als Grasarten wie z. B. die Quecke bedeutende Wirtspflanzen für *Ggt* sind (Gutteridge et al., 2005; Yarham, 1981). Auch

Ausfallgetreide in Raps und anderen Blatt- und Hackfrüchten stellt ein Problem dar und sollte durch Herbizide kontrolliert werden (Mielke, 1998).

Fungizide

Die Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit mit Fungiziden ist schwierig, da es sich um einen bodenbürtigen, wurzelinfizierenden Pilz handelt. Bis vor kurzem gab es keine kommerziell erhältlichen Fungizide gegen *Ggt* (Freeman et al., 2005). Mittlerweile wurden zwei Fungizide zur Saatgutbehandlung zugelassen, die aber relativ teuer in der Anwendung sind (Bateman et al., 2007): Das wirksamere von beiden, Silthiofam (Handelsname Latitude®; Beale et al., 1998; Schoeny und Lucas, 1999), ist spezifisch für *Ggt* und wirkt fungistatisch, wobei die genaue Wirkungsweise noch weitgehend unbekannt ist. Fluquinconazol (Handelsname Jockey®; Löchel et al., 1998) hat ein relativ breites Aktivitätsspektrum und wirkt sich durch Inhibition der Sterol-Biosynthese ebenfalls fungistatisch aus (Wilmsmeier, 2002). Beide können das Krankheitsbild der Schwarzbeinigkeit mildern, ihr Einsatz ist allerdings nur für bestimmte Feldfrüchte in bestimmten Fruchtfolgen sinnvoll. Um einen günstigen Zeitpunkt für die Fungizidgabe zu wählen, wäre es daher hilfreich, die Schwere des zu erwartenden Befalls genau vorhersagen zu können.

Der Einsatz dieser Fungizide birgt jedoch auch einige Nachteile. Bateman et al. (2007) berichten, dass die Fungizidbehandlung den Take-all Decline (TAD) verzögert und daher in Fruchtfolgen, die auf die Entwicklung eines TAD-Stadiums abzielen, unzuweckmäßig ist. Auch besteht das Risiko einer Resistenzentwicklung durch das Pathogen, weshalb z. B. für Silthiofam empfohlen wird, höchstens drei aufeinander folgende Getreidearten zu behandeln. Freeman et al. (2005) stellten außerdem fest, dass bis zu 30% der *Ggt*-Population in natürlichen Böden unempfindlich gegen Silthiofam sind. Cook (2007a) schließlich weist darauf hin, dass Silthiofam im pazifischen Nordwesten der USA keinen Effekt gezeigt hat, der nicht auch mit ackerbaulichen Maßnahmen erzielbar wäre.

2.2.2 Biologische Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit

Der Begriff „Biologische Schädlingsbekämpfung“ oder „Biokontrolle“ ist definiert als die Bekämpfung eines Krankheitserregers mit Hilfe lebender Organismen (Vincent et al., 2007). In natürlichen Ökosystemen spielen die zugrunde liegenden Prozesse eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Populationen.

Ein Mechanismus der Biokontrolle ist die sogenannte „Cross-Protection“, bei der die Pflanze durch den gleichzeitigen oder vorhergehenden Befall mit einem anderen apathogenen oder schwach pathogenen Mikroorganismus vor der Infektion durch den virulenten Erreger geschützt wird (Deacon, 1976; Wong, 1981).

Eine weitere Möglichkeit der biologischen Schädlingsbekämpfung ist die antagonistische Biokontrolle. Dieser grundlegende Mechanismus ist unter Mikroorganismen weit verbreitet, da er ihr Überleben im ständigen Konkurrenzkampf um natürliche Ressourcen sichert. Der Boden stellt ein dicht besiedeltes, jedoch nährstofflimitiertes Habitat dar, in dem die Besetzung geeigneter ökologischer Nischen und die effiziente Verwertung von Nährstoffen entscheidend sind. Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, die ihnen hierbei erhebliche Selektionsvorteile gegenüber ihren Konkurrenten verschaffen, etwa die Produktion von Antibiotika oder Siderophoren. Antagonistische Biokontrolle beruht auf diesen mikrobiellen Interaktionen und findet zunächst einmal unabhängig von der Pflanze statt. In der Agrarwirtschaft findet die antagonistische Biokontrolle Anwendung, indem lebende Mikroorganismen in das System eingebracht werden, die das Pathogen bekämpfen oder seine Etablierung verhindern (Dowling und O’Gara, 1994; Weller, 1988). Dabei kann die gezielte Isolation und Wiederausbringung individueller Stämme auf einer ortsspezifischen Basis helfen, die Zerstörung mikrobieller Gemeinschaftsstrukturen zu minimieren, die oft eine Folge der Einführung nicht nativer Stämme ist (McSpadden Gardener et al., 2006a,b). Noch vielversprechender ist allerdings der Ansatz, das bereits natürlich vorhandene Potenzial zu nutzen, indem Populationen antagonistischer Organismen im Boden gefördert werden (Cook, 2007a; McSpadden Gardener, 2007). Dies kann z. B. durch geeignete Bewirtschaftungsmaßnahmen und Düngemittelgaben geschehen.

2.2.2.1 Antagonistische Biokontrolle: Take-all Decline

Beim Anbau von Weizen und Gerste in Monokultur auf *Ggt*-belasteten Böden kommt es zunächst zu einem starken Ausbruch der Schwarzbeinigkeit, gefolgt von einem plötzlichen Rückgang des Befalls und einer Erholung der Erträge. Dieses Phänomen wird als „Take-all Decline“ (TAD) bezeichnet (Cook, 2003). Üblicherweise tritt der TAD nach vier bis sechs Monokulturjahren ein, es wurden allerdings auch schon wesentlich längere Zeiträume beobachtet (Hornby, 1998; Weller et al., 2002).

Der TAD-Effekt wurde von Gerlagh (1968) in den Niederlanden zum ersten Mal experimentell nachgewiesen. Er postulierte, dass der TAD auf einer spezifischen Suppression des Pathogens beruht, während eine generelle Suppression für alle antagonistischen Effekte verantwortlich ist, die vor dem Einsetzen des TAD-Stadiums stattfinden.

Weller et al. (2002) definieren die Begriffe „generelle“ und „spezifische“ Suppression folgendermaßen: Die generelle Suppression ist auf die gesamte mikrobielle Biomasse eines Bodens zurückzuführen und umfasst ein Kontinuum antagonistischer Effekte, das vom Konkurrenzkampf um Ressourcen über direkten Antagonismus bis hin zur Stimulierung pflanzlicher Abwehrmechanismen reicht. Sie unterdrückt allgemein das Wachstum bo-

denbürtiger Pathogene, ist in ihrer Wirkung aber relativ schwach. Dagegen basiert die spezifische Suppression auf der Aktivität einzelner Gruppen von Mikroorganismen und ist gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet.

Die Forschungsarbeiten von Shipton et al. (1973) mit Boden von Monokultur-Weizenfeldern im US-Bundesstaat Washington bestätigten die Ergebnisse von Gerlagh (1968) und zeigten zudem die Übertragbarkeit der spezifischen Suppressivität auf andere Böden durch Beimischung kleiner Mengen TAD-Bodens. Cook und Rovira (1976) stellten fest, dass die Kolonisierung von Pflanzenwurzeln durch *Ggt* in TAD-Böden inhibiert wird und postulierten, dass die spezifische Suppression eher in der Rhizosphäre stattfindet als im umgebenden Boden (Bulk Soil).

Die Entwicklung eines TAD setzt drei Komponenten voraus: Den Anbau einer Wirtspflanze in Monokultur, die Anwesenheit von *Ggt* und einen oder mehrere starke Ausbrüche der Schwarzbeinigkeit (Hornby, 1998; Weller et al., 2002). Auch Fruchtfolgen, in denen abwechselnd Weizen und Gerste angebaut werden, induzieren einen TAD (Cook, 2007b).

Die Unterbrechung langjähriger Monokultur kann die Suppressivität gegen *Ggt* aufheben. So berichtet Cook (1981) aus Langzeit-Versuchen mit Weizen-Monokultur, dass der dreijährige Anbau von Luzerne, Sojabohnen oder Hafer einen vollständigen Verlust der Suppressivität zur Folge hat (ebenso wie die Fumigation des Bodens mit Methylbromid). TAD ist ein weltweit vorkommendes Phänomen (Gerlagh, 1968; Hornby, 1998; Simon und Sivasithamparam, 1989; Weller et al., 2002), dessen Entwicklung überall dem gleichen Muster folgt. Umweltfaktoren und zuvor angebaute Feldfrüchte modulieren lediglich die Geschwindigkeit, mit der er sich entwickelt. Mehr als 30 Jahre intensiver Forschung haben den TAD-Effekt zu einem allgemeinen Modellsystem für die antagonistische Biokontrolle bodenbürtiger Phytopathogene gemacht (Cook, 2007c).

2.2.2.2 Mögliche Antagonisten gegen *Ggt* und ihre Wirkungsweise

Mikroorganismen, die die Schwarzbeinigkeit unterdrücken, stammen aus vielen verschiedenen taxonomischen Gruppen, und das Pathogen ist sensitiv für verschiedene Arten des Antagonismus, sowohl als Bestandteil des TAD-Effekts als auch im Rahmen genereller Suppression. Eine Auswahl wichtiger Antagonisten ist im Folgenden aufgeführt.

Antagonistische Bakterien

Obwohl verschiedene bakterielle Gattungen und Arten mit der Suppression von *Ggt* in Verbindung gebracht werden, befasst sich die überwältigende Mehrheit der wissenschaftlichen Untersuchungen mit *Pseudomonas*-Spezies. Einer der Gründe hierfür ist sicher, dass diese im Labor sehr leicht zu kultivieren sind. Pseudomonaden sind hervorragend

an das Leben in der Rhizosphäre angepasst, können viele verschiedene organische Substrate verwerten und synthetisieren zahlreiche Metaboliten, die in unterschiedlicher Weise gegen *Ggt* wirken (Weller, 2007). Es wurde beobachtet, dass *Pseudomonas*-Populationen an Wurzeln mit *Ggt*-Läsionen deutlich zunehmen (Weller et al., 2002). Besondere Aufmerksamkeit wurde den fluoreszierenden Pseudomonaden zuteil, deren Wirkung gegen *Ggt* sowohl in Gewächshaus- als auch Freilandexperimenten nachgewiesen werden konnte (u. a. Chapon et al., 2002; De Souza et al., 2003b; Duffy und Weller, 1995; Pierson und Weller, 1994; Raaijmakers und Weller, 1998). Diese Pseudomonaden produzieren das fluoreszierende Pigment Pyoverdin und umfassen mehrere Spezies, darunter *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. syringae* (Haas und Défago, 2005). Ihre Wirkung gegen *Ggt* beruht auf der Produktion verschiedener Antibiotika. Den ersten Beleg für diesen Mechanismus lieferten Thomashow und Weller (1988), die das Antibiotikum Phenazin-1-Carboxylsäure in einem Stamm von *Pseudomonas fluorescens* identifizierten. Ihre Studie war zugleich der erste eindeutige Beweis dafür, dass Antibiotika in Böden produziert werden und eine wichtige Rolle in der Ökologie bodenbewohnender Mikroorganismen spielen. Weitere Studien bestätigten die Wirkung von Phenazinen gegen *Ggt* (Bull et al., 1991; Hamdan et al., 1991; Pierson und Pierson, 1996).

Im Zusammenhang mit dem TAD scheint jedoch ein anderes Antibiotikum, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG), eine weit wichtigere Rolle zu spielen (Bonsall et al., 1997; De Souza et al., 2003b; Keel et al., 1992; Landa et al., 2006; Raaijmakers und Weller, 1998). Raaijmakers et al. (1997) etwa wiesen DAPG-produzierende *Pseudomonas*-Stämme in TAD-Böden nach, konnten aber keine Phenazin-produzierenden Stämme detektieren. Die Fähigkeit, DAPG zu synthetisieren, ist eine hochkonservierte Eigenschaft weltweit vorkommender Populationen von *P. fluorescens* (Keel et al., 1996); offenbar selektieren unterschiedliche Anbaumethoden und Böden jedoch verschiedene Genotypen. Bisher wurden 22 Genotypen DAPG-produzierender Pseudomonaden identifiziert (Landa et al., 2006). In TAD-Böden in den USA dominiert der Genotyp D (Weller et al., 2002, 2007), in TAD-Böden in den Niederlanden dagegen die Genotypen F und M (De Souza et al., 2003b). Mazzola et al. (1995) konnten jedoch zeigen, dass in der *Ggt*-Population auch Stämme vorkommen, die resistent gegen Phenazin und DAPG sind. Mögliche Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Schwarzbeinigkeit sollten daher nicht allein auf diesen Substanzen basieren.

Ein weiterer Mechanismus, der Pseudomonaden Wirkung gegen *Ggt* verleiht ist die Produktion von Siderophoren, niedermolekularen, hochaffinen Fe^{3+} -Chelatoren wie z. B. Pyochelin, Pyoverdin und Pseudobactin. Sie werden aus der Zelle exportiert und komplexieren Eisen im extrazellulären Milieu; der Eisen-Siderophor-Komplex wird dann über spezifi-

sche Rezeptor-Proteine auf der äußeren Zellmembran in die Zelle transportiert (Kloepper et al., 1980; Loper und Buyer, 1991). Das verschafft Pseudomonaden unter Eisenmangelbedingungen einen entscheidenden Selektionsvorteil gegenüber Organismen mit weniger effektiven Eisenaufnahmesystemen, zu denen auch Pathogene wie *Ggt* gehören. Indem sie dem Boden Eisen entziehen, vermögen Pseudomonaden das Wachstum dieser Pathogene zu inhibieren (Haas und Défago, 2005).

Die Etablierung von Populationen antagonistischer Pseudomonaden in Gegenwart von *Ggt* ist ein dynamischer Prozess, der bereits früh an den Keimwurzeln beginnt. Die Bildung von Läsionen an den Keimwurzeln spielt dabei eine zentrale Rolle, da sie die Anreicherung fluoreszierender Pseudomonaden stimulieren (Rovira und Wildermuth, 1981; Weller, 1988). Diese Populationen können die Adventivwurzeln, die sich später entwickeln, vor dem Befall mit Schwarzbeinigkeit schützen (Sarniguet et al., 1992). Die Besiedlung der Rhizosphäre mit fluoreszierenden Pseudomonaden kann durch die Art der Stickstoffdüngung beeinflusst werden. So wurde in der Rhizosphäre Ammonium-gedüngter Weizenpflanzen eine größere Anzahl fluoreszierender Pseudomonaden festgestellt als nach Nitrat-Düngung (Smiley, 1978a,b).

Neben *Pseudomonas* wird auch von anderen bakteriellen Antagonisten gegen *Ggt* berichtet: Isolate von *Bacillus* spp. (Kim et al., 1997a,b), *B. cereus* und *B. subtilis* (Ryder et al., 1999) können die Schwarzbeinigkeit an Weizen reduzieren, der Wirkungsmechanismus ist hier jedoch nicht bekannt. Verschiedene Actinomyceten, z. B. *Streptomyces*, inhibieren *Ggt* durch die Produktion von Antibiotika (Andrade et al., 1994; El-Tarabily und Sivathamparam, 2006). Coombs et al. (2004) beschreiben zudem endophytische Vertreter der Actinomyceten, die das Wurzelgewebe vor der Besiedlung durch *Ggt* schützen können.

Antagonistische Pilze

Hypovirulente *Ggt*-Stämme können wie die virulenten Stämme die Oberfläche und äußere Gewebeschichten der Wurzeln von Wirtspflanzen kolonisieren, aber nicht in den Zentralzylinder eindringen. Sie fungieren damit als Konkurrenten bei der Wurzelbesiedlung (Deacon, 1981; Wong, 1981). Es wird vermutet, dass Veränderungen in der Pathogenität der Populationen von *Ggt* zum TAD-Effekt beitragen, da nach lang andauernder Monokultur von Weizen ein erhöhter Anteil an hypovirulenten Stämmen beobachtet wird (Hornby, 1998).

Stämme von *Ggg* und nahe verwandte, apathogene *Phialophora* spp. verfügen ebenfalls über die Fähigkeit, einem *Ggt*-Befall entgegenzuwirken (Gutteridge et al., 2007; Mathre et al., 1998; Wong, 1975; Wong et al., 1996). Auch sie führen durch Besiedlung der Pflanzenwurzeln zu einer „Cross-Protection“ (Deacon, 1976; Wong, 1981). *Phialophora*

radicicola bewirkt eine verstärkte Lignifizierung und Suberinisierung der Endodermis, die die Widerstandsfähigkeit der Wurzel gegenüber einem Eindringen des Pathogens in den Zentralzylinder erhöht (Speakman und Lewis, 1978).

Zwei andere Pilze, die für die biologische Bekämpfung von *Ggt* interessant erscheinen, sind *Trichoderma harzianum* und *T. koningii*, die das Pathogen mittels verschiedener Antibiotika und Chitinasen inhibieren (Duffy et al., 1996; Ghisalberti et al., 1990; Simon und Sivasithamparam, 1989; Simon, 1989).

Daneben sind einige weitere Pilze bekannt, die antagonistisch gegen *Ggt* wirken, z. B. *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten (Dewan und Sivasithamparam, 1988). Khaosaad et al. (2007) berichten, dass arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze der Gattung *Glomus* die Infektion der Wurzel durch *Ggt* verhindern können, indem sie die systemische Resistenz der Pflanze induzieren. Auch ein steriler roter Pilz vermag *Ggt* auf diesem Weg zu hemmen (Aberra et al., 1998).

Biokontrolle durch andere Bodenorganismen

Auch andere Organismen wurden mit einer Verminderung des Schwarzbeinigkeitsbefalls in Verbindung gebracht. Dazu gehören mykophage Amöben, die in TAD-Böden in höherer Anzahl vorkommen als in nicht suppressiven Böden (Chakraborty und Warcup, 1983, 1984; Homma et al., 1979). Sie können u. a. dazu beitragen, *Ggt* während dessen saprophytischer Phase abzubauen. Auch Regenwürmer können involviert sein, da sie einerseits Pilzhypphen verdauen und andererseits die Menge pflanzenverfügbarer Nährstoffe erhöhen (Clapperton et al., 2001; Stephens und Davoren, 1996).

2.3 Ziel der Arbeit und methodisches Vorgehen

Die vorliegende Doktorarbeit ist in das Projekt „Molekulare Interaktionen in der Rhizosphäre“ des Helmholtz Zentrums München eingegliedert (<http://rhizosphere.helmholtz-muenchen.de>), an dem die Institute für Bodenökologie, Biochemische Phytopathologie, Ökologische Chemie, Bioinformatik, Biomathematik und Biometrie sowie die Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen beteiligt sind.

Im Rahmen dieses Projektes sollen Prozesse identifiziert und charakterisiert werden, die beim Angriff bodenbürtiger Phytopathogene in der Rhizosphäre ablaufen, und die Bedeutung dieser Prozesse für eine nachhaltige Produktion gesunder und hochwertiger Pflanzen aufgezeigt werden. Das Projekt soll außerdem helfen, allgemeine Prinzipien der Kommunikation zwischen Organismen zu verstehen und so neue Erkenntnisse über die Funktionsweise komplexer biologischer Systeme liefern.

Im Kooperationsprojekt werden diese Prozesse anhand des Pathosystems Gerste (*Hordeum vulgare*) – *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) untersucht. Die von *Ggt* verursachte Schwarzbeinigkeit gehört zu einer der weltweit am besten untersuchten Pflanzenkrankheiten, dennoch ist ihre Bekämpfung immer noch schwierig. Es ist bekannt, dass die Krankheit in bestimmten, suppressiven Böden trotz Gegenwart des Pathogens nicht mehr zum Ausbruch kommt. Die Suppression des Erregers kann durch den langjährigen Anbau einer Wirtspflanze induziert werden und wird auf mikrobielle Antagonisten in der Rhizosphäre zurückgeführt. Diese stellen ein wichtiges Potenzial für die Entwicklung neuer, biologischer Bekämpfungsmethoden gegen *Ggt* dar.

Zahlreiche Studien führten zur Identifizierung von Organismen, die antagonistisch gegen *Ggt* wirken. Sie gehören vielen verschiedenen bakteriellen und pilzlichen Arten und Gattungen an. Ein Großteil dieser Untersuchungen basiert auf mikrobiellen Isolaten, die aus der Rhizosphäre infizierter Pflanzen gewonnen wurden. So lag der Schwerpunkt der bisherigen Forschung auf den fluoreszierenden Pseudomonaden, weil diese leicht zu kultivieren und daher gut zugänglich sind. Für sie wurden auch einzelne Metaboliten identifiziert, die an der Inhibierung von *Ggt* beteiligt sind, z. B. Phenazin und insbesondere 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG).

Es wird jedoch angenommen, dass nur ein geringer Teil der Bodenmikroorganismen kultivierbar ist. Daher sind im natürlichen System vermutlich weitaus mehr Organismen an Biokontrollprozessen beteiligt, als bis jetzt beschrieben wurden. Einerseits dürften weitere phylogenetische Gruppen involviert sein und damit eine Vielzahl weiterer Metaboliten. Andererseits produzieren wahrscheinlich auch die bisher bekannten Mikroorganismen noch andere Substanzen, die die antagonistischen Interaktionen beeinflussen können. Bisher war die Identifizierung und Charakterisierung neuer antagonistischer Metaboliten schwierig, weil die dafür erforderliche „Non-Target“-Analytik noch nicht weit genug entwickelt war. Mittlerweile sind jedoch neue Methoden verfügbar, deren Anwendung entscheidend dazu beitragen sollte, neue Erkenntnisse über die Prozesse der antagonistischen Biokontrolle zu gewinnen.

Für die vorliegende Arbeit wurden daher folgende **Hypothesen** formuliert:

1. Neben den bisher beschriebenen Antagonisten spielen viele weitere Mikroorganismen eine Rolle bei der Suppression von *Ggt*.
2. Die entsprechenden Gruppen werden während der Entwicklung eines Take-all Declines induziert und in ihrer Abundanz erhöht.
3. An der antagonistischen Biokontrolle von *Ggt* sind neben DAPG weitere mikrobielle Metaboliten beteiligt.

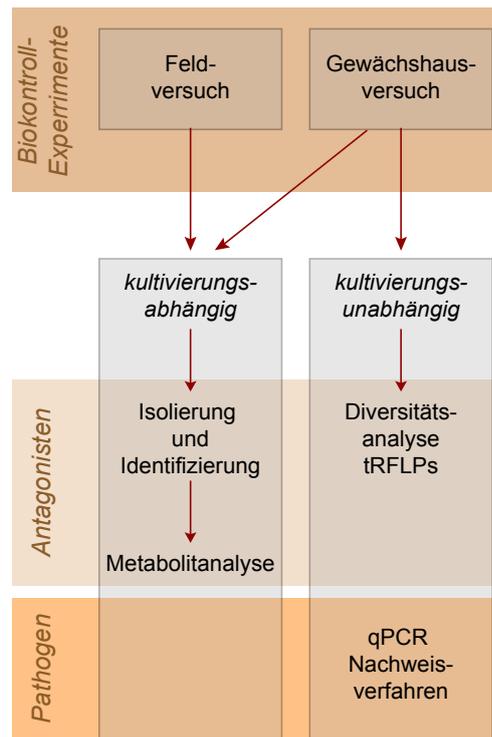


Abbildung 2.3 Struktureller Aufbau der Arbeit, experimentelle Versuchsansätze und methodisches Vorgehen. tRFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, qPCR: quantitative realtime PCR.

Als Basis der Studie dienten zwei Biokontrollexperimente, von denen eines im Freiland und das andere unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus stattfand (Abb. 2.3). Durch den Anbau von Gerstenmonokultur unter hohem Pathogendruck sollte in einem landwirtschaftlich genutzten Boden die Entwicklung eines *Ggt*-suppressiven Stadiums induziert werden. Im Gewächshausversuch wurde diese Entwicklung beschleunigt, indem sechs Vegetationszyklen von Gerste in unmittelbarer Abfolge angebaut wurden.

In einem kultivierungsabhängigen Ansatz wurden Pilze und Bakterien aus der Rhizosphäre isoliert, *in vitro* auf Antagonismus gegen *Ggt* getestet und gegebenenfalls identifiziert. Ausgewählte bakterielle Isolate wurden einer Metabolitanalyse unterzogen, um die biokontrollaktiven Substanzen zu identifizieren. Dabei kam modernste massenspektrometrische Analytik (FTICR-MS) zum Einsatz.

Mittels kultivierungsunabhängiger Methoden wurde daraufhin untersucht, welche Bedeutung die identifizierten Antagonisten in der gesamten mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft haben. Die Diversität dieser Gemeinschaft wurde mittels molekularbiologischer tRFLP-Fingerprints analysiert, die vor allem Veränderungen der bakteriellen Populationen während der Entwicklung eines *Ggt*-suppressiven Stadiums aufzeigen sollten.

Des Weiteren wurde ein quantitativer realtime PCR-Assay zur Detektion des Pathogens im Boden und an infizierten Pflanzenwurzeln etabliert.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien, Medienbestandteile und Antibiotika von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme, 2 mM dNTP Mix und GeneRuler™ 1 kb bzw. 100 bp DNA Ladder stammten von Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot, Deutschland), RNaseOUT™ und *Taq* DNA Polymerase von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Agar Agar, Typ RG für Festmedien wurde von Bernd Euler Biotechnologie (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Agarose für die Gelelektrophorese stammte von Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland).

3.2 Lösungen und Medien

3.2.1 Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O H₂O_{MQ} mit 0,1 % DEPC versetzen,
gut schütteln, ÜN bei RT inkubieren,
unter Dampfdruck sterilisieren (121°C, 20 min)

10× TAE- 0,4 M Tris
Puffer 0,05 M Natriumacetat
 0,01 M EDTA
 pH 7,8 mit 100 % Essigsäure einstellen

TE 1 mM EDTA, pH 8,0 (aus 0,5 M Stammlösung)
 10 mM Tris, pH 8,0 (aus 1 M Stammlösung)

3.2.2 Nährmedien

Sämtliche Medien wurden unter Dampfdruck sterilisiert (121°C, 20 min). Die Zugabe von sterilfiltrierten Antibiotika bzw. Vitaminen erfolgte bei Festmedien nach Abkühlung auf 60°C und bei Flüssigmedien nach vollständiger Abkühlung.

Bodenextraktmedium SEA

Zur Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen aus der Rhizosphäre wurde ein speziell an den Standort angepasstes Bodenextraktmedium (modifiziert nach Hagn, 2004) sowohl als Fest- als auch als Flüssigmedium verwendet.

| | | | |
|------------|---------|--|------------|
| SEA | 4,66 g | Zitronensäure | |
| | 9,17 g | Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) | |
| | 1 g | MgSO ₄ anhydrisch | |
| | 0,75 g | Hefeextrakt | |
| | 0,75 g | Bacto TM -Pepton (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) | |
| | 200 ml | Bodenextrakt | |
| | 11,25 g | Agar-Agar (für Festmedium) | auf 750 ml |
| | pH 6,2 | einstellen mit 3 N NaOH | |

Zur Herstellung des Bodenextrakts wurden jeweils 400 g frischer Boden des Probenahme-standorts A30 mit 500 ml Leitungswasser versetzt und zweimal bei 121°C für 20 min unter Dampfdruck sterilisiert (dazwischen ÜN Inkubation bei RT). Nach 10 min Zentrifugation bei 4000 × g wurde der Überstand durch Cellulose-Faltenfilter (Typ 595½, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert, erneut unter Dampfdruck sterilisiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zur Selektion von Pilzen wurden pro Liter Medium 300 mg Chloramphenicol (50 mg/ml Stammlösung in EtOH) und 300 mg Streptomycin (50 mg/ml Stammlösung in H₂O) zugegeben (Sambrook und Russel, 2001), zur Selektion von Bakterien 50 mg Cycloheximid (10 mg/ml Stammlösung in H₂O; Salkin und Hurd, 1972).

R-PDA, R-PDB

Zur Kultivierung von *Gaeumannomyces*-Stämmen auf Agarplatten wurde R-PDA, d. h. Rifampicin-haltiger Potato Dextrose Agar, als semiselektives Medium verwendet. Das Wachstum von *Ggt* führt zu einer Farbänderung des Rifampicins im Medium von orange nach lila, welche als Ring um die Pilzkolonie sichtbar wird und so die Identifizierung von *Ggt* erleichtert (Duffy und Weller, 1994, Abb. 3.1).

Für Flüssigkulturen von *Gaeumannomyces*-Stämmen wurde R-PDB, d. h. Rifampicin-haltige Potato Dextrose Broth verwendet.

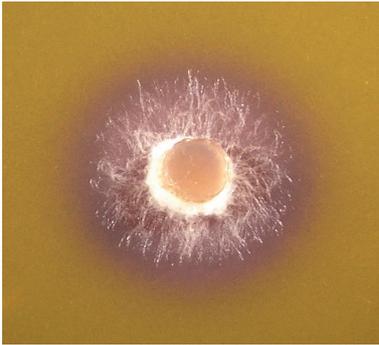


Abbildung 3.1 Farbänderung von R-PDA um eine *Ggt*-Kolonie nach 2 d Wachstum bei RT.

| | | | |
|--------------|--------|-------------------------|---------|
| R-PDA | 39 g | Potato Dextrose Agar | |
| | 3 g | Agar-Agar | |
| | 100 mg | Rifampicin* | auf 1 l |
| | pH 6,2 | einstellen mit 1 N NaOH | |

| | | | |
|--------------|--------|-------------------------|---------|
| R-PDB | 24 g | Potato Dextrose Broth | |
| | 100 mg | Rifampicin* | auf 1 l |
| | pH 6,2 | einstellen mit 1 N NaOH | |

*25 mg/ml Rifampicin-Stammlösung in DMSO, sterilfiltriert

LB-Medium

Für ÜN-Kultur von transformierten Zellen für Glycerol-Stock und Plasmid-Präparation wurde LB-Medium (Lennox, 1955) unter Zugabe von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (5 mg/ml Stammlösung in H_2O) verwendet.

| | | | |
|---------------|--------|----------------------------|---------|
| LB- | 10 g | Trypton | |
| Medium | 5 g | Hefeextrakt | |
| | 5 g | NaCl | |
| | 15 g | Agar-Agar (für Festmedium) | auf 1 l |
| | pH 7,0 | einstellen mit 1 N NaOH | |

Minimalmedium nach Guilleroux

Für die Metabolitanalyse wurde MM_G , ein Minimalmedium nach Guilleroux und Osbourn (2004) verwendet. Die enthaltenen Spurenelementlösungen wurden modifiziert nach Pfennig und Lippert (1966) und DSMZ Medium 14 (SL-4) und Medium 27 (SL-6) (<http://www.dsmz.de/microorganisms/medialist.php>).

| | | | |
|-----------------------|--------|---|---------|
| MM_G | 10 g | D-Glukose | |
| | 6 g | NaNO ₃ | |
| | 0,5 g | KCl | |
| | 0,5 g | MgSO ₄ | |
| | 1,5 g | KH ₂ PO ₄ | |
| | 0,01 g | Thiamin | |
| | 0,01 g | Biotin | |
| | 1 ml | Spurenelementlösung SL-4 | auf 1 l |
| SL-4 | 0,05 g | Na ₂ EDTA×2H ₂ O | |
| | 0,02 g | FeSO ₄ ×7H ₂ O | |
| | 10 ml | Spurenelementlösung SL-6 | |
| | 90 ml | H ₂ O | |
| SL-6 | 0,03 g | MnCl ₂ ×4H ₂ O | |
| | 0,3 g | H ₃ BO ₃ | |
| | 0,2 g | CoCl ₂ ×6H ₂ O | |
| | 0,2 g | CuCl ₂ ×2H ₂ O | |
| | 0,02 g | NiSO ₄ ×6H ₂ O | |
| | 0,03 g | Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O | auf 1 l |

Zur Herstellung von 750 ml MM_G, pH 6,8 wurden 1,125 g KH₂PO₄ in 400 ml H₂O gelöst und pH 7,0 mit 3 M NaOH eingestellt. 4,5 g NaNO₃, 0,375 g KCl und 0,375 g MgSO₄ wurden in 300 ml H₂O gelöst und pH 7,0 mit 0,1 M NaOH eingestellt. Beide Lösungen wurden getrennt unter Dampfdruck sterilisiert (121°C, 20 min) und nach Abkühlung gemischt. Anschließend wurden 50 ml unter Dampfdruck sterilisierte 15 % D-Glukose-Lösung, je 0,75 ml sterilfiltriertes Thiamin (10 mg/ml Stammlösung in H₂O) und Biotin (10 mg/ml Stammlösung in 0,1 N NaOH) und 0,75 ml SL-4 zugegeben.

3.3 Biokontrollversuche

Die Basis für die vorliegende Arbeit bildeten ein Gewächshausversuch und ein Parzellenversuch auf dem Versuchsgut Scheyern des Helmholtz Zentrums München. In beiden Experimenten wurde Sommergerste, *Hordeum vulgare* cv. Barke (Saatzucht Josef Breun GdbR, Herzogenaurach), unter Pathogendruck in Monokultur angebaut, um einen TAD zu induzieren und ein suppressives Stadium im Boden zu etablieren.

3.3.1 Inokulation mit *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

3.3.1.1 Herstellung des *Ggt*-Inokulums

Als Inokulum sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland wurden *Ggt*-kolonisierte Haferkörner verwendet. Je 400 g Haferkörner und 400 ml destilliertes Wasser wurden in 2 l Erlenmeyerkolben bei 121°C für 20 min unter Dampfdruck sterilisiert, ÜN bei RT inkubiert und ein zweites Mal unter Dampfdruck sterilisiert. Nach Abkühlung wurden pro Kolben 20 Agar-Plugs vom Rand einer frischen *Ggt*-Reinkultur zugegeben. Die Kolben wurden bis zur vollständigen Kolonisierung für 4–6 Wochen bei 20°C im Dunkeln inkubiert und währenddessen einmal wöchentlich geschüttelt, um ein gleichmäßiges Durchwachsen zu garantieren (Kabbage und Bockus, 2002). Anschließend wurden die Körner für 24 h unter der Sterilbank luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlraum gelagert. Bei einem Verhältnis von Inokulum : Gerste = 2 : 1 wurden für den Freilandversuch jährlich 8,64 kg Inokulum benötigt.

3.3.1.2 Pathogenitätstest zur Auswahl eines *Ggt*-Stammes

In einem Gefäßversuch wurden zwei Isolate (*Ggt10*, *Ggt13*), die in einem vorangegangenen Feldversuch erfolgreich als Inokulum verwendet wurden (Lebuhn et al., 2000), auf ihre Pathogenität gegenüber dem Kultivar Barke getestet. Beide Isolate stammten ursprünglich aus einer Studie zum Befall von Weizen am Julius Kühn-Institut Braunschweig (vormals BBA; Mielke, 1998, Tab. 3.4, S. 57).

Die zwei *Ggt*-Isolate wurden auf sterilisierten Haferkörnern angezogen wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Gerstenkörner (Kultivar Barke) wurden mit 1.2 % NaOCl oberflächensterilisiert und in Plastiktöpfen (12 cm hoch, Ø 12 cm) ausgesät, die mit zweifach unter Dampfdruck (121°C, 20 min) sterilisiertem Boden (Scheyern, A30, Kap. 3.3.2.1) gefüllt waren. Pro Topf wurden 7 Körner jeweils zusammen mit einem *Ggt10*- oder *Ggt13*-verpilzten Haferkorn ausgelegt und mit 0,5 cm gesiebttem Boden bedeckt. In den Kontrolltöpfen wurden statt des pilzlichen Inokulums unter Dampfdruck (121°C, 20 min) sterilisierte Haferkörner zugegeben. Nach 32 d bei Tages-/Nacht-Temperaturen von 20/15°C und 14 h Belichtungszeit wurden die Pflanzen aus den Töpfen entnommen und sorgfältig getrennt. Die Wurzeln wurden gewaschen und vor einem weißen Hintergrund auf Krankheitssymptome untersucht (Hornby, 1998), bevor sie für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

3.3.2 Feldversuch

3.3.2.1 Standort, Boden und Bewirtschaftung

Standort des Feldversuchs ist das Versuchsgut Kloster Scheyern, Landkreis Pfaffenhofen/Ilm im bayrischen Tertiärhügelland. Die durchschnittliche Jahrestemperatur liegt bei 7,4°C, die Niederschlagsmenge bei 803 mm/Jahr (Schröder et al., 2002). Das Gut wurde zwischen 1990 und 2005 vom Forschungsverbund Agrarökosysteme München bewirtschaftet und am 1. Oktober 2005 vom Helmholtz Zentrum München als neuem Pächter übernommen.

Aufgrund seiner räumlichen Homogenität wurde der Schlag A30 (48°29'51" N, 11°26'39" O, Höhe 455 m NN) für die Versuche ausgewählt, der sich unmittelbar südlich an den Gebäudekomplex des Prielhofes anschließt (Abb. 3.2). Vor Beginn des Parzellenversuchs wurde A30 mit der Fruchtfolge Kartoffeln (2002), Winterweizen (2003) und Klee-Gras (2004) bewirtschaftet.

Die vorherrschende Bodenart ist sandiger Lehm (Braunerde, Cambisol) mit einem pH-Wert (CaCl₂) von 6,2. Der Boden hat folgende chemischen Eigenschaften: 15,6 g/kg Gesamt-C_{org}, 1,9 g/kg Gesamt-N, 1,6 mg/kg NH₄-N, 10,1 mg/kg NO₃-N. Bodenparameter und Nährstoffgehalt wurden jährlich vor der Aussaat mittels Bodenanalyse kontrolliert (Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Bioanalytik, TU München, Weihenstephan). Vor jeder Aussaat wurde mit AHL gedüngt (Ammoniumnitrat-Harnstoff-Lösung, 50 kg N/ha); die weitere Bewirtschaftung erfolgte gemäß den Richtlinien für integrierten Landbau. Die Ernte wurde mit einem Parzellenmähdrescher durchgeführt, so dass der Ertrag pro Streifen bestimmt werden konnte. Das Erntegut wurde ca. 7 d bei 60°C getrocknet, der Wassergehalt bestimmt und der Ertrag ausgewogen.

Im vorliegenden Versuch sollte möglichst schnell ein hoher Schwarzbeinigkeitsbefall induziert werden. Daher wurden Bewirtschaftungsmaßnahmen eingesetzt, die den Befall bekanntermaßen fördern. So wurde das Stroh nach der Ernte auf den Parzellen belassen und die Stoppen blieben bis unmittelbar vor der Aussaat im folgenden Jahr stehen.



Abbildung 3.2 Lage der Fläche A30 auf dem Versuchsgut Scheyern.



Abbildung 3.3 Parzellen Nummer 5–8 des Feldversuchs 2006, 44 d nach Aussaat, durchgehende Bewirtschaftungsstreifen für jeweils zwei Parzellen.

Der Parzellenversuch in Scheyern wurde im Frühjahr 2005 gestartet und ist als Langzeit-Versuch geplant, der in den kommenden Jahren weiter mit Sommergersten-Monokultur bewirtschaftet werden soll.

3.3.2.2 Parzelleneinteilung und Aussaat

Auf der Versuchsfläche A30 wurden 16 Parzellen von 6×6 m Größe angelegt, jeweils unterteilt in vier Bewirtschaftungsstreifen à 1,5 m Breite (Abb. 3.3, Abb. 3.4). Die Parzellen wurden durch einen 3 m breiten Grünstreifen (Klee) voneinander getrennt. Auf den Parzellen 1–8 wurde seit 2005 Sommergerste (Kultivar Barke) in Monokultur angebaut; Parzellen 9–16 wurden ab dem Jahr 2006 entsprechend bewirtschaftet. Die Aussaatmenge betrug jeweils 150–160 kg/ha, entsprechend 300–320 Körner/m². Parzellen 5–8 und 13–16 wurden jährlich zur Aussaat mit *Ggt13* inokuliert (*Ggt13*: Gerste = 2:1). Dazu wurden verpilzte Haferkörner (Kap. 3.3.1.1) per Hand gleichmäßig auf den Parzellen ausgestreut. Unmittelbar anschließend wurde die Gerste angesät, so dass das Inokulum durch die Sähmaschine mit in den Boden eingearbeitet wurde.

3.3.2.3 Probenahmen im Feldversuch

Alle Daten zum Vegetationszeitraum und den Beprobungen von 2005 bis 2007 sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Beprobte wurden jeweils Parzellen 1–8 zu EC25 und EC60 (Entwicklungsstadien des Getreides siehe Tottman und Broad, 1987; Zadoks et al., 1974), 2006 mit einer zusätzlichen Probenahme zu EC80. Dazu wurden aus der Mitte jedes Bewirtschaftungsstreifens drei Pflanzen vollständig entnommen, insgesamt also 12 Pflanzen/Parzelle \times 8 Parzellen = 96 Pflanzen. Die oberirdischen Sprosse wurden entfernt

Tabelle 3.1 Dauer der Vegetationsperiode und Beprobungstermine im Feldversuch.

| Jahr | Vegetationsperiode | | | Probenahmen | | | |
|------|--------------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------------|---------------------|
| | Aussaat | Ernte | Dauer [d] | Kürzel | Datum | Tage nach Aussaat | Entwicklungsstadium |
| 2005 | 15.04.2005 | 19.08.2005 | 126 | F 1.1 | 31.05.2005 | 46 | EC 22-26 |
| | | | | F 1.2 | 27.06.2005 | 73 | EC 60-61 |
| 2006 | 25.04.2006 | 30.07.2006 | 96 | F 2.1 | 08.06.2006 | 44 | EC 23-27 |
| | | | | F 2.2 | 03.07.2006 | 69 | EC 59-60 |
| | | | | F 2.3 | 18.07.2006 | 84 | EC 77-83 |
| 2007 | 16.03.2007 | 18.07.2007 | 124 | F 3.1 | 03.05.2007 | 48 | EC 22-24 |
| | | | | F 3.2 | 12.06.2007 | 88 | EC 60-65 |

verwendet; dazu wurden sie bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert. Die restlichen R+R-Mischproben wurden auf Trockeneis eingefroren.

3.3.2.4 Befallsbonitur

Zur Abschätzung des Befalls mit Schwarzbeinigkeit wurden sowohl morphologische Veränderungen an der Wurzel als auch Wachstumsparameter (Anzahl und Länge von Bestockungstrieben, Spross- und Wurzel-Trockengewicht) untersucht. Im Feldversuch wurden zudem die Ernteerträge erfasst.

Um den Befall mit Schwarzbeinigkeit morphologisch feststellen zu können, wurden die Wurzeln gründlich mit Leitungswasser gewaschen und vor einem weißen Hintergrund optisch untersucht (Hornby, 1998). Der Anteil von geschwärzten Wurzeln am Gesamtwurzelwerk wurde in 10 %-Schritten abgeschätzt (Heß und Habermayer, 1999), zusätzlich wurde die Bewertung 5 % für sehr gering befallene Wurzeln vergeben. Im Freiland wurden acht Pflanzen pro Parzelle, im Gewächshaus zwei Pflanzen pro Röhre bonitiert.

3.3.3 Gewächshausversuch

3.3.3.1 Aufbau des Gewächshausversuchs

Der Gewächshausversuch wurde unter kontrollierten Bedingungen in einem eigenen, abgetrennten Raum durchgeführt. Die Belichtung erfolgte mit fünf über eine Zeitschaltuhr gesteuerten Halogen-Metall dampflampen (Osram PowerStar HQI-E 250W/D, tageslichtweiß), deren Lichtintensität PAR (Photosynthetic active radiation) auf Höhe der Pflanzen 500–600 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ betrug (gemessen mit LI-COR Quantum/Radiometer/Photometer, Model LI-250 Light Meter, Walz Mess- und Regeltechnik, Effeltrich, Deutschland). Die Bestrahlungsdauer durch die Pflanzlampen betrug 15 h/Tag.

Als Pflanzgefäße wurden 30 eigens angefertigte Röhren (Helmholtz Zentrum München, Abteilung Experimentelle Umweltsimulation) verwendet, bestehend aus Polypropylen-Abflussrohren (70 cm hoch, Ø 15 cm) mit abtrennbarem Boden, so dass der Inhalt bei der Probenahme als intakter Zylinder vollständig entnommen werden konnte. Sie wurden mit ca. 6 cm Blähton als Drainageschicht befüllt, gefolgt von wasserdurchlässiger Lochfolie (zum Schutz vor Durchwurzelung) und Bodenmaterial (Abb. 3.5). Die erste Füllung erfolgte im Dezember 2004 mit unbehandeltem Boden des Ah-Horizonts der Versuchsfläche A30 aus Scheyern.

Wie im Freiland wurde Sommergerste (Kultivar Barke) in Monokultur angepflanzt, allerdings wurden hier sechs Vegetationszyklen in unmittelbarer Abfolge durchlaufen, um die Entwicklung eines suppressiven Stadiums zu beschleunigen.

Vor jeder Aussaat wurde eine Stickstoffdüngung mit AHL durchgeführt (Ammoniumnitrat-Harnstoff-Lösung, analog der im Freiland verwendeten

Menge von 50 kg N/ha). Jeweils vor dem ersten und vierten Vegetationszyklus wurden Bodenparameter und Nährstoffgehalt mittels Bodenanalyse kontrolliert (Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Bioanalytik, TU München, Weihenstephan). Zu Beginn jedes Vegetationszyklus wurden Röhren Nr. 1–15 mit *Ggt13* inokuliert. Pro Röhre wurden dazu sechs Gerstenkörner in gleichmäßigem Abstand ausgelegt – jeweils zusammen mit drei bis vier von *Ggt13* kolonisierten Haferkörnern – und mit 0,5 cm gesiebtem Boden bedeckt. In den nicht inokulierten Röhren Nr. 16–30 wurden statt des Pilz-Inokulums unter Dampfdruck (121°C, 20 min) sterilisierte Haferkörner zugegeben. Nach dem Auflaufen wurde die Anzahl der Keimlinge auf drei reduziert. Die Pflanzen wurden bei Temperaturen zwischen 15°C (nachts) und 23°C (tagsüber) bei einer Luftfeuchte von 50 % angezogen. Sie wurden dreimal wöchentlich mit Leitungswasser gegossen, um den Wassergehalt auf etwa 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität einzustellen.

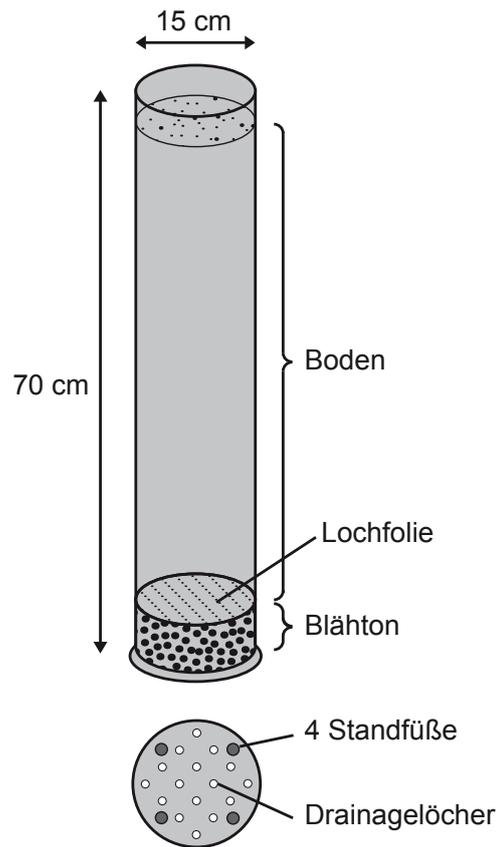


Abbildung 3.5 Längsschnitt durch eine Versuchsröhre und Röhrenboden mit Standfüßen und Drainagelöchern.

Tabelle 3.2 Vegetationszyklen und Probenahmen im Gewächshausversuch.

| Vegetations- zyklus | Vegetationsperiode | | | Probenahmen | | | | | |
|------------------------|--------------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | Beginn | Ende | Dauer [d] | Kürzel | Datum | Tage nach Aussaat | Ent- wicklungs- stadium | Anzahl beprobter Röhren | |
| | | | | | | | | Ggt- inokuliert | nicht inokuliert |
| 1 | 04.03.2005 | 11.07.2005 | 129 | GH 1.1 | 12.04.2005 | 39 | EC 31-32 | 4 | 4 |
| | | | | GH 1.2 | 10.05.2005 | 67 | EC 60-61 | 4 | 4 |
| | | | | GH 1.3 | 14.06.2005 | 102 | EC 85-92 | 4 | 4 |
| 2 | 27.09.2005 | 09.01.2006 | 104 | GH 2.1 | 30.11.2005 | 66 | EC 55-61 | 5 | 5 |
| 3 | 16.01.2006 | 26.04.2006 | 100 | GH 3.1 | 16.03.2006 | 59 | EC 54-61 | 5 | 5 |
| 4 | 12.05.2006 | 07.08.2006 | 87 | GH 4.1 | 28.06.2006 | 47 | EC 61-65 | 5 | 5 |
| 5 | 29.08.2006 | 18.12.2006 | 111 | GH 5.1 | 02.11.2006 | 65 | EC 55-61 | 5 | 5 |
| 6 | 05.01.2007 | 18.04.2007 | 103 | GH 6.1 | 06.03.2007 | 60 | EC 60-61 | 5 | 5 |

3.3.3.2 Probenahmen im Gewächshaus

Während des ersten Vegetationszyklus wurde zu drei Entwicklungsstadien beprobt (EC30, EC60, EC90; entsprechend dem Beginn des Schossens, dem Beginn der Blüte und der Vollreife), in den weiteren Zyklen nur zu EC60 (Tab. 3.2). Pro Zeitpunkt und Behandlung (inokuliert/nicht inokuliert) wurden jeweils fünf Röhren (vier im ersten Zyklus) zufällig ausgewählt und vollständig geerntet. Nach Auszählung der Bestockungstriebe pro Pflanze und Vermessung ihrer Länge wurden die Sprosse zur Bestimmung des Trockengewichts entfernt.

Die drei Wurzelwerke pro Bodenzylinder wurden vorsichtig getrennt; der lose anhaftende Boden wurde abgeschüttelt und zur Bestimmung des Wassergehalts verwendet. Wurzeln 1 und 2 wurden unter Leitungswasser sorgfältig von sämtlichen Bodenresten befreit, einer Befallsbonitur (Kap. 3.3.2.4) unterzogen und für weitere Analysen in flüssigem Stickstoff eingefroren (Wurzel 1) bzw. zur Bestimmung des Trockengewichts verwendet (Wurzel 2). Für eine Mischprobe aus Rhizosphäre und Rhizoplane (R+R) wurde der an Wurzel 3 anhaftende Rhizosphärenboden per Hand abgebröselst, auf 2 mm gesiebt und die Wurzel selbst in ca. 5 mm große Stücke geschnitten. Beide Fraktionen wurden wieder vereinigt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Zudem wurden während des ersten Vegetationszyklus Pilze und Bakterien aus der R+R-Probe isoliert, wofür 5 g bzw. 1 g der Probe vor dem Einfrieren abgewogen und bis zur Verarbeitung am Folgetag (Kap. 3.3.4) bei 4°C gelagert wurden. Der Boden aus den abgeernteten Röhren wurde bis zur nächsten Aussaat bei 4°C im Kühlraum gelagert.

In den verbliebenen Röhren wurde nach dem Abreifen die Anzahl der Bestockungstriebe ausgezählt, ihre Länge vermessen und der Spross zur Bestimmung des Trockengewichts entfernt. Stoppeln und Wurzeln dagegen wurden im Boden belassen, um die Akkumulation pilzlichen Inokulums zu verstärken. Alle Röhren wurden vollständig entleert; inokulierter

bzw. nicht inokulierter Boden wurden getrennt gesammelt, jeweils gründlich durchmischt und zurück in die Röhren 1–15 bzw. 16–30 gefüllt.

3.3.4 Isolierung von Mikroorganismen aus der Rhizosphäre

Ein Teil der Wurzeln (Rhizoplane + Rhizosphäre) aus den Probenahmen im ersten Vegetationszyklus sowohl des Feld- als auch des Gewächshausversuchs wurde frisch zur Isolierung von Bakterien und Pilzen verwendet. Im Feldversuch wurden dazu die vier Proben einer Parzelle zu einer Mischprobe vereinigt. Für die Isolierungen wurde das Bodenextraktmedium SEA (Kap. 3.2.2) verwendet.

3.3.4.1 Gewinnung von Bakterien-Isolaten

Je 1 g R+R-Probe wurde für 30 min mit 9 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung geschüttelt und anschließend in 1:10 Schritten mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-6} wurden je 100 μl auf dem Nährmedium ausplattiert und ÜN bei 28°C inkubiert. Nach Auszählung der Kolonien (CFUs) wurden pro Probe 20 Kolonien zufällig gepickt und auf frischen SEA-Platten ausgestrichen. Gegebenenfalls wurde erneut überimpft, um Reinkulturen zu erhalten.

Zur Stammhaltung wurden die Isolate ÜN (langsam wachsende Isolate auch länger) bei 30°C und 170 rpm in 6 ml flüssigem SEA-Medium angezogen. Je 200 μl Flüssigkultur wurden in zwei Cryobank-Röhrchen (MAST Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) pro Isolat überführt, nach Angaben des Herstellers weiter verarbeitet und bei -80°C gelagert.

3.3.4.2 Gewinnung von Pilz-Isolaten

Aktive Hyphen wurden mittels eines Bodenwaschverfahrens (Frankland et al., 1990) aus den R+R-Proben isoliert, um pilzliche Reinkulturen zu gewinnen. Je 5 g Probe wurden auf einem sterilen Edelstahlsieb (Maschenweite 200 μm) mit je 1 l sterilem $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ gewaschen. Die auf dem Sieb verbliebenen organischen und anorganischen Partikel wurden vereinzelt und steril auf Nährmedium ausgesetzt. Pro Platte wurden vier Partikel in größtmöglichem Abstand zueinander und zum Rand der Platte ausgebracht. Pro Probe wurden jeweils fünf Platten inokuliert, mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Bei täglichen Kontrollen wurden auswachsende Kolonien auf frische SEA-Platten überimpft, bis Reinkulturen vorlagen. Die Stammhaltung der Pilz-Isolate erfolgte bei 4°C in SEA-Schrägagarröhrchen (SCHOTT, Mainz, Deutschland).

3.3.5 Konfrontationstests

Alle bakteriellen und pilzlichen Isolate aus den Biokontrollversuchen wurden auf Antagonismus gegen *Ggt* getestet, indem sie zusammen mit *Ggt13* auf eine SEA-Platte gesetzt und inkubiert wurden.

3.3.5.1 Konfrontationstests der Bakterien-Isolate

SEA-Platten wurden mittig mit einem Agar-Plug vom Rand einer frischen *Ggt13*-Kolonie beimpft und für 3 d im Dunkeln bei RT vorkultiviert. Anschließend wurden pro Platte vier verschiedene bakterielle Reinisolate ca. 1,5 cm vom Plattenrand entfernt mit einem sterilen Zahnstocher punktförmig aufgebracht. Pro Isolat wurden drei Test-Wiederholungen angesetzt. Gleichzeitig wurde das Reinisolat zur Kontrolle auf eine frische SEA-Platte überimpft. Die beimpften Test-Platten wurden für ca. 5 d bei RT im Dunkeln inkubiert, bis die *Ggt*-Kolonie den Plattenrand erreichte. Je nach Größe der umgebenden Zone, in der *Ggt* nicht mehr wuchs, wurden die Isolate in drei Inhibitionsklassen eingeteilt (Pierson und Weller, 1994, Abb. 3.6):

- Keine Inhibition, d. h. der Pilz überwuchs die Bakterienkolonie.
- + Schwache Inhibition, d. h. klare Inhibitionszone ohne Pilzwachstum mit weniger als 6 mm Radius um den Auftragspunkt der Bakterienkolonie.
- ++ Starke Inhibition, d. h. klare Inhibitionszone mit mehr als 6 mm Radius um den Auftragspunkt der Bakterienkolonie.

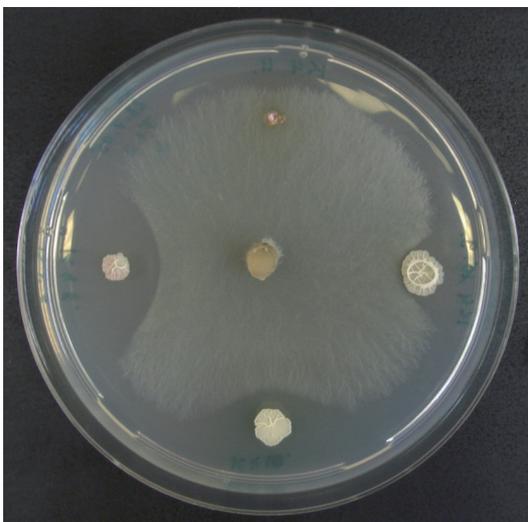


Abbildung 3.6 Bakterienkolonien auf einer Konfrontationstest-Platte ohne Inhibition (oben), mit schwacher Inhibition (rechts) und mit starker Inhibition (unten, links) des *Ggt*-Wachstums.

3.3.5.2 Konfrontationstests der Pilz-Isolate

Auf SEA-Platten wurde in ca. 2 cm Entfernung vom Plattenrand ein Agar-Plug vom Rand einer frischen *Ggt13*-Kolonie aufgebracht und für 3 d im Dunkeln bei RT vorkultiviert. Die andere Hälfte der Platte wurde anschließend mit einem Agar-Plug eines pilzlichen Reinisolates beimpft. Pro Isolat wurden zwei Test-Wiederholungen plus eine Vergleichsplatte mit Reinkultur angesetzt und weiter bei RT im Dunkeln inkubiert. Während einer Inkubationszeit von bis zu vier Wochen (RT, dunkel) wurden die Platten zunächst 2–3 mal pro Woche, später wöchentlich, kontrolliert und die Interaktion der Pilze dokumentiert. So konnte sichergestellt werden, dass eine eventuell in einer frühen Testphase auftretende Wachstumshemmung durch Diffusion inhibierender Metaboliten ebenso erfasst wurde wie spätere Interaktionen bei Kontakt der Pilzhyphen. Je nach Interaktionsverhalten wurden die Pilz-Isolate in folgende Inhibitionsklassen eingeteilt (Abb. 3.7):

- Keine Inhibition, d. h. die Konfrontation führte zu keiner Wachstumshemmung des Pathogens.
- Deadlock-Systeme, d. h. keiner der beiden Pilze war in der Lage, den anderen zu überwachsen.
- Inhibition des *Ggt*-Wachstums ohne Hyphenkontakt.
 - Klasse 1** Schwache Inhibition, d. h. die klare Inhibitionszone zwischen den Rändern der beiden Pilzkolonien war kleiner als 5 mm.
 - Klasse 2** Starke Inhibition, d. h. die klare Inhibitionszone zwischen den Rändern der beiden Pilzkolonien war größer als 5 mm.
- Inhibitionsklassen von Pilzen, die *Ggt* überwachsen.
 - Klasse 3** *Ggt* stellte das Wachstum ein und wurde vom konkurrierenden Pilz überwachsen.
 - Klasse 4** Die Morphologie der *Ggt*-Hyphen wurde durch Kontakt mit dem konkurrierenden Pilz verändert.

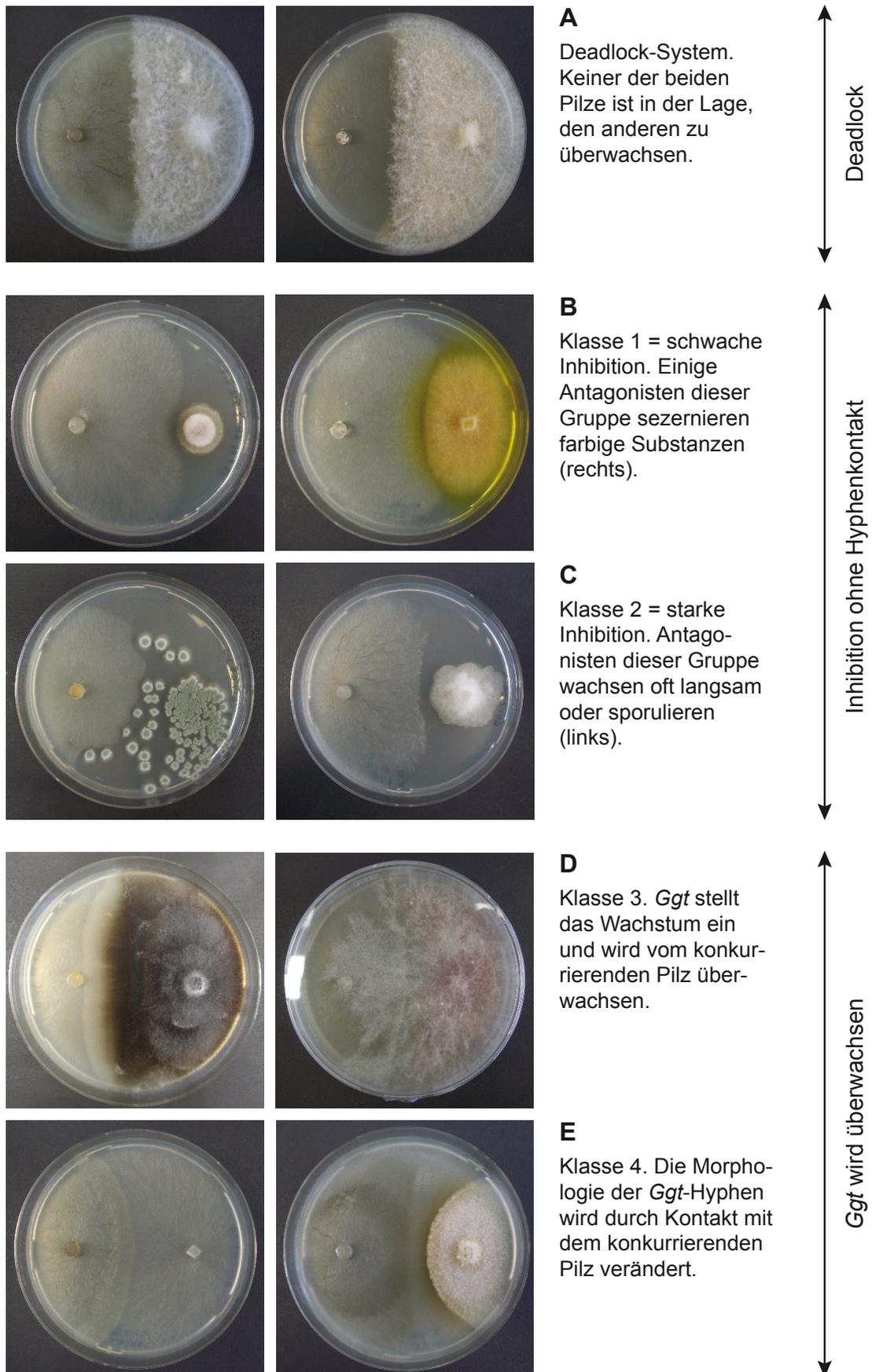


Abbildung 3.7 Inhibitionsklassen im Konfrontationstest der Pilz-Isolate. *Ggt* befindet sich auf allen Platten links, der Antagonist rechts.

3.4 Metabolitanalyse bei bakteriellen Antagonisten

Zur Identifizierung der inhibierenden Substanzen wurden Kulturfiltrate bakterieller Antagonisten mit einem 12-Tesla FTICR-Massenspektrometer (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) analysiert, welches sich durch extrem hohes Massenaufklärungsvermögen, hervorragende Massengenauigkeit sowie außerordentliche Empfindlichkeit auszeichnet. Es ermöglicht die Bestimmung der Summenformeln tausender Komponenten in einer komplexen Umweltprobe (Marshall, 2000). Das Vorgehen bei der Metabolitanalyse ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

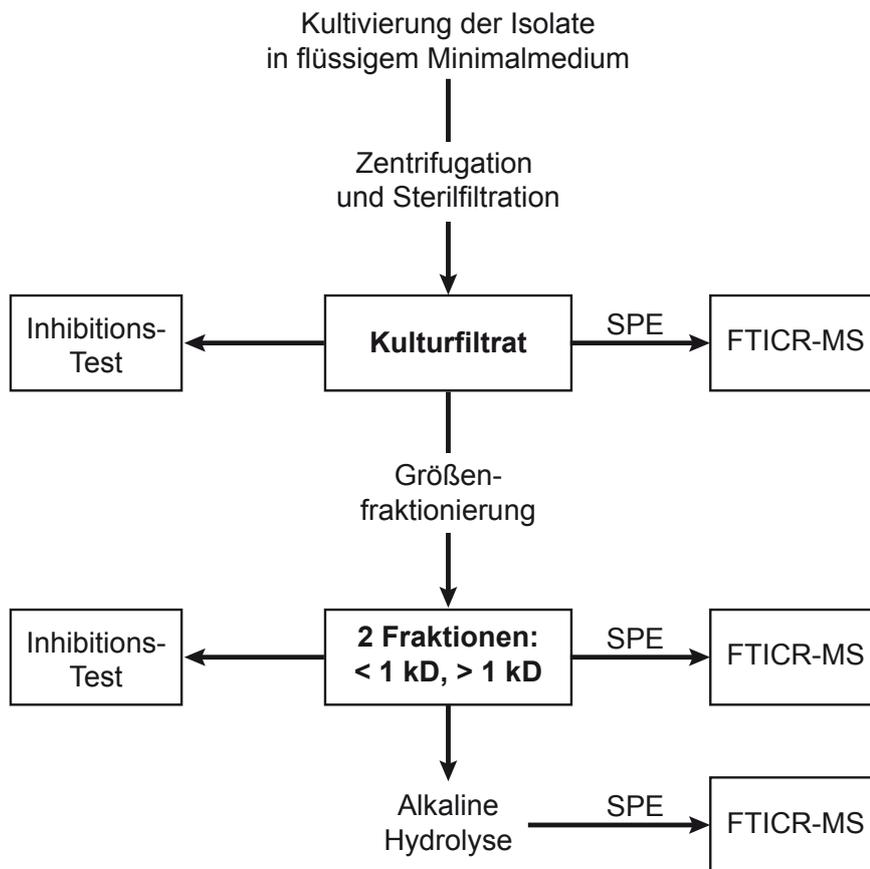


Abbildung 3.8 Vorgehen bei der Metabolitanalyse. SPE: Festphasenextraktion.

3.4.1 Gewinnung von Sekundärmetaboliten

3.4.1.1 Herstellung von Kulturfiltraten

Aus den zwei dominanten Gattungen der isolierten Bakterien wurde je ein Stamm ausgewählt, der im Konfrontationstest gegen *Ggt13* (Kap. 3.3.5.1) besonders starke Inhibition gezeigt hatte (Abb. 3.9):

1. *Pseudomonas* sp. Isolat P39 aus F 1.2, Parzelle G 5
2. *Bacillus subtilis* Isolat B171 aus GH 1.3, Röhre K 25

Medium

Komplexe Medien führen aufgrund der hohen Empfindlichkeit des FTICR-MS zu einer unüberschaubaren Menge von Hintergrund-Signalen, die die Eingrenzung auf die gesuchten Peaks im Spektrum sehr schwierig macht. Mineralmedien definierter Zusammensetzung erleichtern die MS-Analyse deutlich, allerdings wachsen die Mikroorganismen darin oft schlechter oder gar nicht. Auch Geliermittel, z. B. Agar, stören bei der Analyse. Daher wurde das Wachstum der ausgewählten Bakterienstämme bzw. von *Ggt13* in vier verschiedenen flüssigen Minimalmedien getestet. Alle vier Medien wurden auch im FTICR-MS analysiert. Diese Voruntersuchungen führten zur Auswahl des Minimalmediums MM_G (angepasst nach Guilleroux und Osbourn, 2004, Kap. 3.2.2). Es enthält die Vitamine Biotin und Thiamin, die für das Wachstum von *Ggt* erforderlich sind (Sivasithamparam und Parker, 1981).

Bakterielle Reinkulturen

Für die Bakterien wurden zunächst Starterkulturen angeimpft, indem je ein Kügelchen aus einem Cryobank-Röhrchen (Kap. 3.3.4.1) in 5 ml MM_G überführt und bei 28°C (Schüttler, 170 rpm) für 24 h (P39) bzw. 7 d (B171) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2–0,5 inkubiert wurde. Je 3 ml Bakteriensuspension aus der Vorkultur wurden zu 30 ml MM_G zugegeben und bei 25°C (Schüttler, 160 rpm) für 3 d (P39) bzw. 4 d (B171) weiter inkubiert. Das Wachstum hatte nach dieser Zeit die stationäre Phase erreicht, während der Antibiotika und Sekundärmetaboliten vermehrt produziert werden (Laville et al., 1992). Für jeden Bakterienstamm wurden drei Wiederholungen angesetzt. Zum späteren Abgleich gegen reines Medium wurden 3 × 30 ml MM_G für den gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen mit inkubiert.

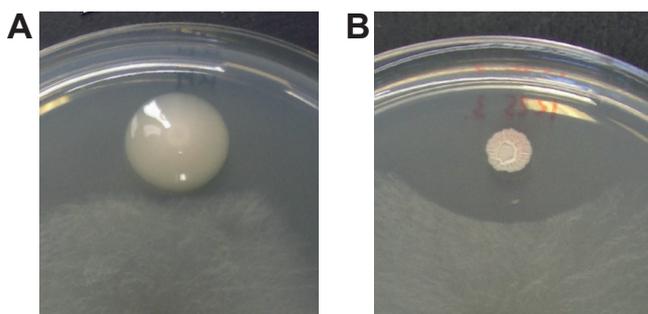


Abbildung 3.9 Die für die Metabolitanalyse ausgewählten Bakterienstämme im Konfrontationstest mit *Ggt13*.

A. *Pseudomonas* sp. P39.

B. *Bacillus subtilis* B171.

Dualkultur mit *Ggt13*

Mit Hilfe von Dualkulturen sollte untersucht werden, inwieweit die Produktion von Inhibitoren durch das Pathogen induziert wird. *Ggt13* wurde zunächst in 30 ml MM_G bei 25°C (Schüttler, 160 rpm) vorkultiviert. Nach 7 d wurden je 5 ml Bakteriensuspension aus der stationären Phase zugegeben und für 2 d weiter inkubiert. Für jeden Bakterienstamm wurden drei Dualkulturen angesetzt, außerdem wurden drei Reinkulturen von *Ggt13* für insgesamt 9 d inkubiert.

Kulturfiltrate

Alle Kulturen wurden für 15 min bei 4°C und 6000 × g abzentrifugiert und der Überstand mit 0,22 µm Millex[®] GP Filter Units (Millipore Express[®] PES Membrane; Millipore, Bedford, USA) sterilfiltriert. Bis zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Filtrate bei -20°C aufbewahrt.

3.4.1.2 Größenfraktionierung der Kulturfiltrate

Je 3 ml Kulturfiltrat wurden in einem Microsep[™] Zentrifugeneinsatz, Trenngrenze 1 kD (PALL Life Sciences, Dreieich, Deutschland) in einer Sorvall Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor SA-512 (23°) für 6 h bei 4°C und 6000 × g fraktioniert. Das im Überstand verbliebene Konzentrat (Fraktion > 1 kD) wurde mit H₂O_{MQ} auf die Ausgangsmenge verdünnt, so dass die Konzentration beider Fraktionen der Konzentration der Kulturfiltrate entsprach.

3.4.1.3 Nachweis antagonistischer Aktivität in Kulturfiltraten

Um zu überprüfen, ob die Kulturfiltrate bzw. die Fraktionen inhibierende Substanzen enthielten, wurden Aliquots im Konfrontationstest auf Festmedium gegen *Ggt13* eingesetzt. Dazu wurden SEA-Platten mittig mit einem Agar-Plug vom Rand einer frischen *Ggt13*-Kolonie beimpft und für 3 d bei RT im Dunkeln vorkultiviert. Ca. 1,5 cm vom Plattenrand entfernt wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette drei Löcher ausgestochen, in die je 2 × 100 µl Filtrat pipettiert wurden. Nach weiteren 4–6 d Inkubation bei RT wurden die Platten durch Vermessung der Inhibitionszonen um die Löcher ausgewertet (Abstand zwischen dem Rand des Lochs und dem Rand der *Ggt*-Kultur).

3.4.2 Analyse mit dem FTICR-Massenspektrometer

3.4.2.1 Festphasenextraktion

Die Kulturfiltrate wurden mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) über Supelco Discovery[®] DSC-18 Säulen (1 ml, 100 mg; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) entsalzt. Zur Vorbereitung wurden die SPE-Säulen mit 1 ml 100 % MeOH konditioniert und mit 1 ml H₂O_{MQ} gespült. 1,5 ml Probe, angesäuert mit 15 µl Ameisensäure, wurden auf die SPE-Säule gegeben, mit 1 ml 0,1 % Ameisensäure gewaschen und mit 1 ml 100 % MeOH eluiert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

3.4.2.2 Alkaline Hydrolyse

100 µl Probenextrakt (in MeOH) wurden mit 100 µl 1 N NaOH versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Der Vergleichsansatz ohne Hydrolyse erhielt 100 µl H₂O_{MQ} statt NaOH. Nach Zugabe von 700 µl H₂O_{MQ} und 100 µl konzentrierter H₃PO₄ erfolgte eine erneute Festphasenextraktion über C18-Säulen wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben.

3.4.2.3 FTICR-Massenspektrometrie

Die FTICR-Massenspektren wurden mit einem Bruker Daltonik (Bremen, Germany) Apex Qe 12 T System aufgenommen. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) erfolgte entweder mit einer Advion (Ithaca, NY, USA) TriVersa Nanomate Nanoelektrospray Ionenquelle bei 0,3 psi und ± 1500 V unter Verwendung des Standard-Chips oder mit der konventionellen Mikroelektrospray Ionenquelle bei ± 3000 V auf dem Spray Shield und ± 3500 V auf der Kapillare mit einem Proben-Durchsatz von 250 µl/h, einer Flussrate des Trocknungsgases von 4 l/s, einem Vernebelungs-Gasdruck von 1 bar und einer Temperatur der Ionenquelle von 200°C. Im Mikrospray-Modus wurde eine signifikant höhere Reproduzierbarkeit erzielt.

Die Ionenerzeugung mittels ESI ist sehr schonend für das Analytmolekül und führt kaum zu Fragmentationen. Das Verfahren eignet sich daher besonders für die Ionisation von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen (Fenn et al., 1989). Typischerweise erzeugt ESI quasimolekulare Ionen, bei positiver Spannung durch die Addition eines Protons ([M+H]⁺) oder eines anderen Kations, etwa eines Natriumions ([M+Na]⁺), bei negativer Spannung durch die Entfernung eines Protons ([M-H]⁻). Besonders bei größeren Molekülmassen treten oft auch mehrfach geladene Ionen auf. Je nach Polarität der angelegten Spannung werden bestimmte Moleküle bevorzugt detektiert. So lassen sich mit positiver ESI vor allem stickstoffhaltige Moleküle wie z. B. Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und Aminozucker, aber auch Methoxy-Gruppen nachweisen, während negative ESI u. a. zur Detektion

von Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen – und damit von Zuckern und Phenolen – führt. Im Allgemeinen erzielt der Negativ-Modus höhere Intensitäten und es lassen sich mehr Signale detektieren. Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine nicht gerichtete Analyse handelte, wurden jeweils beide Modi angewandt, um alle Stoffgruppen zu erfassen.

Für negative ESI wurden die Proben 1:10 mit 100 % MeOH verdünnt, für positive ESI mit 50 % MeOH / 0,1 % Ameisensäure. Die Ionen wurden für 0,5 s im Hexapole der Ionenquelle gehalten. Für ein Spektrum wurden normalerweise 256 Scans akkumuliert. Die FTMS-Parameter wurden so gewählt, dass in einem Massenbereich von ca. 200–400 Da mit 50 µg/ml Arginin in MeOH als Testlösung optimale Sensitivität und Auflösung erreicht wurden.

Die Spektren wurden im Breitband-Modus mit einer Zeitauflösung von 1 MWord und einem Massenbereich von ca. 150–2000 m/z erfasst. Nach Ausführung einer einfachen Sinus-Apodisation erfolgte die Fourier-Transformation des Zeit-Domäne Signals mit einer Prozessierungsgröße von 2 MWord. Die Spektren wurden extern mit Arginin-Clustern kalibriert, wozu die oben erwähnte Testlösung innerhalb des erforderlichen Massenbereiches (m/z 175,11895, m/z 349,23062, m/z 523,34230 und m/z 697,453979) verwendet wurde. Um die Massengenauigkeit zu erhöhen, wurden die Spektren intern mit Signalen ubiquitärer Verunreinigungen im Lösungsmittel rekaliert (protonierte und Na-kationisierte Phthalat-Diester, m/z 207,15908, m/z 229,14103, m/z 251,12778, m/z 273,10973, m/z 279,15908, m/z 301,14103, m/z 315,25298, m/z 337,23493, m/z 391,28428, m/z 413,26623, m/z 447,34688 und m/z 469,32883). Die maximal erlaubte Abweichung von diesen Referenzmassen betrug 0,1 ppm.

Die Identifizierung einzelner Komponenten im Massenspektrum basiert darauf, dass die Atome der verschiedenen chemischen Elemente einen unterschiedlichen Massendefekt haben. Daher kann zu einer sehr exakt bestimmten Masse eine Liste möglicher Summenformeln errechnet werden, welche wiederum auf ihre Plausibilität hin überprüft werden können. Die Berechnung der Summenformeln erfolgte mit dem Bruker DataAnalysis Tool mit einer maximalen Abweichung von 0,5 ppm.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.5.1.1 Isolierung von pilzlicher DNA

Zur Isolierung von DNA wurden Pilze für 10–12 d (RT, 150 rpm) in 20 ml R-PDB (Kap. 3.2.2) angezogen und durch Cellulose-Faltenfilter (Typ 595 $\frac{1}{2}$, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) abfiltriert. Je 50–100 mg Mycel wurden in 1,5 ml-Tubes überführt und unter flüssigem Stickstoff mit einem Mikropistill homogenisiert. Die anschließende DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers.

3.5.1.2 Isolierung von bakterieller DNA

Aus den Biokontrollversuchen isolierte Bakterien wurden ÜN (langsam wachsende Isolate auch länger) bei 30°C und 170 rpm in 6 ml Bodenextraktmedium (Kap. 3.2.2) angezogen. Zur Gewinnung genomischer DNA wurden je 2 ml Flüssigkultur pelletiert und mit dem DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien extrahiert. Alternativ wurde der Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) verwendet. Die extrahierte DNA wurde mit einem NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer (Wilmington, USA) quantifiziert.

3.5.1.3 Isolierung von pflanzlicher DNA aus Gerstenwurzeln

Ganze Wurzeln wurden unter flüssigem Stickstoff homogenisiert, je 100 mg in 1,5 ml-Tubes überführt und mit dem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

3.5.1.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Bodenproben

Zur Gewinnung von Gesamt-DNA aus Boden wurde der FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (QBiogene, Carlsbad, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Koextraktion von DNA und RNA aus R+R-Proben (Rhizosphäre + Rhizoplane) wurden diese zunächst unter flüssigem Stickstoff homogenisiert, je 3 × 0,5 g Probe abgewogen und nach einem modifizierten Protokoll von Griffiths et al. (2000) extrahiert. Anders als dort erfolgte die Lyse der Proben in Matrix-Röhrchen aus dem Precellys Keramik Kit, 1.4 mm (Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) in Kombination mit einem Precellys 24 Homogenisator (Bertin Technologies, Frankreich). Der Gesamtextrakt wurde in

30 μl DEPC- H_2O resuspendiert. Zur Gewinnung von reiner RNA wurde die DNA entfernt, indem je 1 μg Gesamtextrakt mit 1 U RQ1 RNase-freier DNase (Promega, Madison, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verdaut wurden. Gesamtextrakt bzw. RNA wurden jeweils mit einem NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer (Wilmington, USA) quantifiziert.

3.5.1.5 Synthese von cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte mit 0,5–0,8 μg RNA-Template in einem Reaktionsvolumen von 20 μl unter Verwendung des Omniscript[™] RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit einem Random Hexamer Primer. Die vom Hersteller empfohlene Inkubationszeit wurde auf 90 min bei 37°C verlängert; außerdem wurde abschließend 5 min bei 93°C inkubiert, um das Enzym zu inaktivieren. Als RNase-Inhibitor wurden 10 U RNaseOUT[™] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Aliquots der reversen Transkriptionsreaktion wurden direkt als PCR-Templates verwendet. Die reine RNA diente als Negativkontrolle in der PCR.

3.5.2 Amplifizierung von DNA

3.5.2.1 Primer und Sonden

In Tabelle 3.3 sind alle zur PCR, qPCR, cDNA-Synthese und Sequenzierung verwendeten Primer aufgeführt. Sie wurden von Thermo Electron (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

3.5.2.2 Amplifizierung bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen

Bakterielle 16S rRNA-Gensequenzen wurden mit den universellen Primern B27f und 1401r amplifiziert. Für die tRFLP-Analyse war der Forward Primer B27f mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 5'-markiert.

Der 50 μl Reaktionsansatz enthielt 20–100 ng DNA- oder cDNA-Template, 0,5 M Betaine, 5 Vol.% DMSO, 200 μM dNTPs, 2,5 mM MgCl_2 , 2,5 U Taq DNA Polymerase, 1 \times Taq Puffer und jeweils 0,2 μM Primer. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit folgendem Programm durchgeführt: 3 min Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 57°C und 1,5 min bei 72°C und 10 min finale Extension bei 72°C.

Zur Verifizierung wurden die Amplifikate auf einem 1,5 % Agarose-Gel (1,5 g Agarose in 100 ml 1 \times TAE-Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Als Längenstandard wurde der GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen.

Tabelle 3.3 PCR- und Sequenzierungs-Primer.

| Oligo-Name | Sequenz (5'→3') | T _M [°C] | Ref. |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| ITS1 | TCC GTA GGT GAA CCT GCG G | 65,0 | [1] |
| ITS4 | TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC | 58,0 | [1] |
| B27f ¹ | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | 48,3 | [2] [3] [4] |
| 1401r | CGG TGT GTA CAA GAC CCã | 42,6 | [5] |
| 968f | AAC GCG AAG AAC CTT AC | 82,0 | [6] [7] |
| Ggt-18S-3010-f | TCG AGG CGT TGG GAG TCT AT | 53,7 | [8] |
| Ggt-18S-3234-S4 ² | CAC GCA ACA TTG GCT TCA CGA AGC C | 67,0 | [8] [9] |
| Ggt-18S-3260-r | GCA CTC GGT CAC ACT TTG CAA | 56,0 | [8] |
| Gga*(y)-ITS-52f | GCT TCG GCG GAC GAT GGT | 58,1 | [8] [10] |
| Gga*(g)-ITS-470S1 ² | CTA GCG AGA CCG CCG ATG TTC TTG G | 65,5 | [8] |
| Gga*y-ITS-518r | AGC CCG CCG GGA AGC CA | 63,2 | [8] |
| T7 Promoter Primer | CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG | 40,7 | |
| Hexamer | NNN NNN | | |

¹Für tRFLPs 5' Cy5-gelabelt, ²Sonden gelabelt: 5' FAM, 3' TAMRA. [1] White et al. (1990); [2] Orphan et al. (2001); [3] Heuer et al. (1997); [4] Weisburg et al. (1991); [5] Wawrik et al. (2005); [6] Nübel et al. (1996); [7] Nakatsu et al. (2000); [8] Lebuhn, persönliche Mitteilung; [9] modifiziert nach Fouly und Wilkinson (2000b); [10] modifiziert nach Bryan et al. (1995).

3.5.2.3 Amplifizierung der ITS-Region von Pilz-DNA

Die Amplifizierung der ITS-Region erfolgte mit den Primern ITS1 und ITS4, die die Regionen ITS1 und ITS2 inklusive der 5,8S-Region abdecken. Der 50 µl Reaktionsansatz enthielt ca. 100 ng DNA-Template, 200 µM dNTPs, 5 mM MgCl₂, 2,5 U Taq DNA Polymerase, 1× Taq Puffer und jeweils 0,2 µM Primer. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit folgendem Programm durchgeführt: 5 min Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 2 min bei 72°C sowie 5 min Extension bei 72°C. Die Verifizierung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 3.5.2.2 beschrieben.

3.5.2.4 Quantitative TaqMan PCR für *Gga* und *Ggt*

Zur Quantifizierung von *Gga* und *Ggt* im Boden und an Wurzeln wurde ein TaqMan[®]-System etabliert. Von Lebuhn et al. (2000) wurden mehrere Primersysteme entwickelt, aus denen nach Tests an Reinkulturen zwei varietätspezifische TaqMan[®]-Systeme hervorgingen (Lebuhn, persönliche Mitteilung; Tab. 3.3): Ein Primersystem ist spezifisch für *Ggt* (es bindet an ein *Ggt*-spezifisches 23 bp-Insert im 18S-Intron der rRNA-Gensequenz), das andere spezifisch für *Gga* (ITS-Region der rRNA-Gensequenz).

1. ***Ggt* 18S-Intron** Primer Ggt-18S-3010-f / Ggt-18S-3260-r 285 bp
Sonde Ggt-18S-3234-S4
2. ***Gga* ITS** Primer Gga*(y)-ITS-52f / Gga*y-ITS-518r 397 bp
Sonde Gga*(g)-ITS-470S1

Die Primer und Sonden wurden aus Alignments abgeleitet, die Sequenzen der verschiedenen *Gg*-Varietäten und nahe verwandter Spezies wie *Magnaporthe grisea* enthielten (Lebuhn, persönliche Mitteilung). Bei zweien der so abgeleiteten Oligonukleotide handelt es sich um Modifikationen bereits publizierter Primer: So entspricht Gga*(y)-ITS-52f einem verkürzten Primer pGa1 aus Bryan et al. (1995) und die Nukleotide 14–25 der Sonde Ggt-18S-3234-S4 sind komplementär zu den Nukleotiden 7–17 des Primers GGT-RP aus Fouly und Wilkinson (2000b).

Beide Systeme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Anwendung in Umweltproben (Boden, Wurzel) etabliert.

Auswahl von *Gaeumannomyces*-Isolaten

Zur Etablierung des qPCR-Assays wurde auf Reinkulturen zurückgegriffen, die in einer Stammsammlung am Institut vorhanden sind. Alle *Gaeumannomyces*-Isolate wurden auf semiselektivem R-PDA-Medium kultiviert (Duffy und Weller, 1994). Für das Screening nach Varietäten von *Gaeumannomyces graminis* wurden 22 Isolate ausgewählt. Um ihre Identität zu verifizieren, wurde die DNA der Isolate extrahiert (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland), mit den Primern ITS1/ITS4 (White et al., 1990) amplifiziert und mit ITS1 sequenziert (Kap. 3.5.3.2). Per Datenbankrecherche (NCBI-BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) konnten 16 Isolate als *Ggt*, vier Isolate als *Gga* und zwei Isolate als *Ggg* bestätigt werden (Tab. 3.4).

Standardkurven

Als Standard für die TaqMan[®] PCR wurde jeweils ein Plasmid verwendet, welches das gewünschte PCR-Produkt als Insert trägt. Zur Herstellung der Standards wurde zunächst mit genomischer DNA der Isolate *Ggt13* bzw. *Gga187.65* (Tab. 3.4) eine konventionelle PCR (Biometra T3 Thermocycler) mit dem jeweils spezifischen Primerpaar durchgeführt. Der Reaktionsansatz für beide Stämme enthielt jeweils 30 ng Template DNA, 200 μ M dNTPs, 1 \times PCR Puffer, 4,5 mM MgCl₂, je 0,5 μ M Primer f/r und 1 U Taq DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Es wurde ein Hotstart-Programm verwendet mit 95°C für 10 min, 94°C für 3 min, 30 Zyklen bei 94°C für 30 s, 66°C für 30 s und 72°C für 1 min, gefolgt von 10 min Extension bei 72°C.

Tabelle 3.4 Auswahl der Stämme von *Gaeumannomyces graminis* für das Screening nach Varietäten. CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures.

| Ergebnis der Sequenzierung | Isolat | erhalten von | Herkunft des Isolats | | | Referenz |
|---|--------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|--------------|----------|
| | | | Wirtspflanze | Land | | |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i> | <i>Gga</i> 187.65 | CBS, Niederlande | <i>Avena sativa</i> | Niederlande, Oostelijk Flevoland | | |
| | <i>Gga</i> BAS II | Dr. J.B. Speakman, BASF, Deutschland | nicht bekannt | nicht bekannt | | |
| | <i>Gga</i> 5914 | Dr. J.B. Speakman, BASF, Deutschland | Rasenpflanze (<i>Poaceae</i>) | nicht bekannt | | |
| | <i>Gga</i> AT3 | Dr. A.E. Osbourn, Sainsbury Laboratory, Norwich, England | <i>Agrostis</i> sp. | Australien, New South Wales | Bryan, 1995 | |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> | <i>Ggg</i> 387.81 | CBS, Niederlande | <i>Deschampsia caespitosa</i> | England, Suffolk | | |
| | <i>Ggg</i> 904.73 | CBS, Niederlande | <i>Pennisetum clandestinum</i> | Australien, New South Wales | | |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> | <i>Ggt</i> 7 | Dr. H. Mielke, BBA Braunschweig, Deutschland | <i>Triticum aestivum</i> | Deutschland | Mielke, 1998 | |
| | <i>Ggt</i> 10 | Dr. H. Mielke, BBA Braunschweig, Deutschland | <i>Triticum aestivum</i> | Deutschland | Mielke, 1998 | |
| | <i>Ggt</i> 11 | Dr. H. Mielke, BBA Braunschweig, Deutschland | <i>Triticum aestivum</i> | Deutschland | Mielke, 1998 | |
| | <i>Ggt</i> 13 | Dr. H. Mielke, BBA Braunschweig, Deutschland | <i>Triticum aestivum</i> | Deutschland | Mielke, 1998 | |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> | <i>Ggt</i> 188.65 | CBS, Niederlande | <i>Triticum aestivum</i> | Niederlande, Oostelijk Flevoland | | |
| | <i>Ggt</i> 247.29 | CBS, Niederlande | nicht bekannt | Niederlande | | |
| | <i>Ggt</i> 905.73 | CBS, Niederlande | <i>Triticum aestivum</i> | Australien, Western Australia | | |
| | <i>Ggt</i> (T1) C2 | Dr. A.E. Osbourn, Sainsbury Laboratory, Norwich, England | <i>Triticum aestivum</i> | USA, Washington State | Tan, 1997 | |
| <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> | <i>Ggt</i> 13.14.2 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | England, Rothamsted | | |
| | <i>Ggt</i> 47.37.2 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | England, Rothamsted | | |
| | <i>Ggt</i> 4.6a | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | Frankreich | | |
| | <i>Ggt</i> AT3 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | Australien | | |
| | <i>Ggt</i> G21 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | Deutschland | | |
| | <i>Ggt</i> R14 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | England, Rothamsted | | |
| | <i>Ggt</i> R15 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | England, Rothamsted | | |
| | <i>Ggt</i> R21 | F. Amberni, Aventis CropScience, Frankreich | nicht bekannt | England, Rothamsted | | |

Das Amplifikat wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und mit einem NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer (Wilmington, USA) quantifiziert. Unter Verwendung des AccepTor™ Vector Kit (Novagen, Madison, USA) wurden je 30 ng gereinigtes PCR-Produkt in den pSTBlue-1 Vektor ligiert und in NovaBlue Singles™ Competent Cells transformiert. Aus jeweils 10 Klonen wurde Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert und durch analytischen Verdau (*EcoRI*) und Sequenzierung mit dem T7 Promoter-Primer überprüft. Jeweils zwei Klone wurden daraufhin zur Gewinnung der Standard-Plasmid-DNA in größerem Maßstab mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) ausgewählt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels NanoDrop® bestimmt und die Kopienzahl berechnet (Fontaine und Guillot, 2002). Für die Standardkurve wurde die Plasmid-DNA in 1:10-Schritten verdünnt. Jeweils sechs Verdünnungsstufen (10^{-4} bis 10^{-9} , das entspricht bei *Ggt13* $2,21 \cdot 10^7$ bis $2,21 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l bzw. bei *Gga187.65* $2,33 \cdot 10^7$ bis $2,33 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l) wurden als externe Standards in der TaqMan® PCR eingesetzt.

Zur Erstellung der Standardkurve wurde der Cycle-Wert C_t verwendet, an dem die Fluoreszenzintensität ΔR_n eine bestimmte Schwelle (Threshold, definiert als zehnfache Standardabweichung des Basissignals) überschreitet. Wird dieser C_t -Wert (berechnet durch die ABI PRISM® Sequence Detector Software) gegen den \log_{10} der Kopienzahl aufgetragen (Henry et al., 2006), lassen sich aus der Kurve die Kopienzahlen der zu analysierenden Proben ablesen. Die Effizienz E der Reaktion wurde mittels der Steigung der Standardkurve nach der Formel $E = (10^{-1/\text{Steigung}}) - 1$ berechnet. Der lineare Korrelationskoeffizient der Standardkurve r^2 betrug in allen qPCR-Läufen 0,97–0,99.

Reaktionsansätze

Der 50 μ l Reaktionsansatz für DNA aus Reinkulturen oder Umweltproben enthielt 5 μ l Template, $1 \times$ TaqMan® Buffer A, 6 mM MgCl_2 , je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP, 400 μ M dUTP, je 300 nM Primer, 150 nM Sonde und 1,5 U AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (TaqMan® PCR Core Reagents Kit; Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Deutschland). Die Amplifikation erfolgte mit einem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit 95°C für 10 min, gefolgt von 45 Zyklen mit 95°C für 15 s und 64°C für 1 min. Alle Reaktionen wurden in dreifacher Wiederholung angesetzt, und jeder Lauf enthielt eine Negativ-Kontrolle (No Template Control, NTC). Der Threshold-Cycle C_t wurde für jede PCR automatisch von der ABI PRISM® Sequence Detector Software (Version 1.7) berechnet, mit der auch die Datenanalyse durchgeführt wurde.

Probenaufbereitung

DNA von Isolaten der Varietäten *Gga*, *Ggt* und *Ggg* wurde aus Flüssigkultur extrahiert (Kap. 3.5.1.1) und in verschiedenen Verdünnungen in der qPCR eingesetzt (1:10, 1:100, 1:1000), wobei die Verdünnung 1:100 (ca. 2 ng DNA) die besten Ergebnisse lieferte.

Des Weiteren konnte mit beiden Systemen die jeweilige *Gaeumannomyces*-Varietät im Boden nachgewiesen und quantifiziert werden. Hierfür wurden in einem Aufstockungsversuch je 0,5 g nicht sterilisierter Boden (Scheuern A30, Kap. 3.3.2.1; luftgetrocknet, gesiebt) mit 1 mg, 5 mg und 25 mg frischem Mycel (je drei Wiederholungen) aus Flüssigkultur von *Ggt13* bzw. *Gga187.65* versetzt und mit dem FastDNA® SPIN Kit for Soil (QBiogene, Carlsbad, USA) extrahiert.

Mit dem *Ggt*-System wurde zudem ein Nachweis des Pathogens an den infizierten Wurzeln (DNA-Extraktion siehe Kap. 3.5.1.3) und in Bodenproben aus dem Pathogenitätstest (Kap. 3.3.1.2) erbracht. Die optimale Verdünnung für DNA aus Boden und Wurzel lag bei 1:1000.

3.5.3 Sequenzierung von DNA

3.5.3.1 Sequenzierung bakterieller 16S rRNA-Gene

Alle Bakterien-Isolate aus den Biokontrollversuchen, die in der Lage waren, das Pilzwachstum zu hemmen, wurden durch partielle Sequenzierung der 16S rRNA-Gene identifiziert. Dazu wurde DNA isoliert (Kap. 3.5.1.2) und mit den Primern B27f/1401r amplifiziert (Kap. 3.5.2.2); die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und mittels NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer (Wilmington, USA) quantifiziert. 20–30 ng des Amplifikats wurden als Template in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt, die mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Als Sequenzierungsprimer wurden sowohl die flankierenden Primer B27f und 1401r verwendet, als auch der interne Primer 968f, welcher insbesondere die variablen Regionen V6, V7 und V8 abdeckt (Baker et al., 2003).

Anschließend wurde der 5 µl Reaktionsansatz mit LiChroSolv-H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 20 µl aufgefüllt und mit dem DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Das Eluat (ca. 18 µl) wurde mit 20 µl LiChroSolv-H₂O aufgefüllt und in die Wells einer 96er Sequenzierungsplatte überführt. Bei einem hohen Probenumsatz wurde die Reaktion in jeweils 10 µl Volumen direkt in einer 96-Well Probenplatte angesetzt und mit Ethanol-fällung (nach dem Protokoll des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) gereinigt.

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Kapillar-Sequencer (3730 DNA Analyzer; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) im Genomanalysezentrum (GAC, Institut für Experimentelle Genetik) des Helmholtz Zentrums München. Zur Identifizierung wurden die Sequenzen mittels BLASTN-Suche mit den Einträgen der NCBI Datenbank verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.5.3.2 Sequenzierung der ITS-Region von Pilz-DNA

Pilz-Stämme wurden durch Sequenzierung der ITS-Region identifiziert. Dazu wurde DNA aus Reinkulturen extrahiert (Kap. 3.5.1.1), mit den Primern ITS1/ITS4 amplifiziert (Kap. 3.5.2.3) und mit ITS1 sequenziert wie in Kapitel 3.5.3.1 beschrieben.

3.5.4 Populationsanalysen mittels tRFLP-Fingerprints

Mittels tRFLP-Analyse (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) wurden Fingerprints für die bakterielle Gemeinschaft des Rhizosphärenbodens erstellt. tRFLPs sind sehr gut reproduzierbar, sensitiv, schnell durchzuführen und daher gut für einen hohen Probendurchsatz geeignet (Liu et al., 1997; Marsh, 1999). Die Analysen erfolgten auf Transkript-Ebene, da vor allem die aktiven Bakterien erfasst werden sollten.

3.5.4.1 tRFLP-Analyse der bakteriellen 16S rRNA

tRFLP-Profile wurden für 40 R+R-Proben des Gewächshausversuchs erstellt, die zu EC60 in den Vegetationszyklen 1–5 entnommen wurden (Kap. 3.3.3.2). Die RNA-Extraktion aus je drei Wiederholungen pro R+R-Probe erfolgte wie in Kapitel 3.5.1.4 beschrieben nach dem Protokoll von Griffiths et al. (2000); die cDNA-Synthese wurde wie in Kapitel 3.5.1.5 durchgeführt.

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte mit den 16S rRNA Primern B27f (5' Cy5-markiert) und 1401r wie in Kapitel 3.5.2.2 beschrieben; das PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und Elution mit 30 μ l EB-Puffer wurden die Amplifikate mit einem NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer (Wilmington, USA) quantifiziert.

Für den Restriktionsverdau wurden 200 ng der markierten cDNA mit 5 U *Msp*I und 1 \times Reaktionspuffer Tango™ (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland) in einem Endvolumen von 25 μ l angesetzt; die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37°C mit abschließender Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C. In einem Vorversuch mit PCR-Produkten bakterieller Reinkulturen wurde gezeigt, dass die Amplifikate unter diesen

Bedingungen vollständig verdaut wurden und keine unspezifische Aktivität des Enzyms auftrat. Die Reaktion wurde mit dem MinElute[®] Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und mit 10 μl sterilem H_2O_{MQ} eluiert.

Zur Analyse wurden 2 μl (ca. 30 ng) der markierten Fragmente mit 0,25 μl Genome Lab[™] DNA Size Standard-600 und 27,75 μl Genome Lab[™] Sample Loading Solution (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) gemischt, in eine 96-Well Probenplatte überführt und mit Mineralöl überschichtet. Pro Restriktionsverdau wurden drei Replikate analysiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillar-Elektrophorese auf einem CEQ[™] 2000 Genetic Analyzer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit Standardbedingungen für die Fragmentanalyse.

3.5.4.2 Statistische Auswertung der tRFLP-Profile

Die Chromatogramme wurden mit der Genetic Analysis System Software (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) ausgewertet. Zur Identifizierung der Peaks wurden folgende Parameter gesetzt: Binning Range = 1 bp und Relative Peak Height Threshold = 0,25 % (relativ zum zweit höchsten Peak). Nur die Fragmentlängen zwischen 60 und 600 bp wurden bei der statistischen Auswertung berücksichtigt.

Der Datensatz wurde folgendermaßen aufbereitet: Da die meisten Peaks in allen Profilen vorhanden waren, wurde mit Abundanzen gearbeitet. Die Verwendung der Peak Areas war aufgrund von Inkonsistenzen bei der Peak-Erkennung durch die CEQ[™] Software nicht möglich, daher wurden die Peakhöhen ausgewertet. Zunächst wurden die Peakhöhen aus den Profilen der drei Extraktions-Replikate gemittelt. Dann wurden diese absoluten Peakhöhen umgerechnet in relative Peakhöhen, bezogen auf die Gesamt-Peakhöhe im jeweiligen Profil (McCune et al., 2002). Peaks, die unterhalb eines Schwellenwerts von 0,25 % relativer Peakhöhe lagen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Um den Einfluß von wenigen sehr hohen Peaks gegenüber vielen kleineren Peaks zu relativieren, wurde der Datensatz wurzeltransformiert. Dieses Vorgehen entspricht der sogenannten Hellinger-Transformation, die z. B. von Blackwood et al. (2003), Legendre und Gallagher (2001) und Ramette (2007) für die Aufbereitung von Daten für die Hauptkomponentenanalyse (Principal Components Analysis, PCA) empfohlen wird.

Der Vergleich der tRFLP-Profile erfolgte durch PCA der Kovarianz innerhalb des Datensatzes unter Verwendung des Canoco 4.5 Software-Pakets (Microcomputer Power, Ithaca, USA; Ter Braak und Šmilauer, 2002). Vor jeder PCA wurde eine DCA (Detrended Correspondence Analysis) durchgeführt, um die lineare Verteilung der Daten zu bestätigen (Gradientenlänge der DCA < 3; Leyer und Wesche, 2007).

Das Ergebnis wurde graphisch als Ordinationsdiagramm dargestellt (Skalierung mit Fokus auf die Korrelation der Fragmentlängen, keine nachträgliche Transformation der Abundanzen, Zentrierung auf Fragmentlängen). Zusätzlich wurden der tRFLP-Datensatz mit den Parametern Befallsstärke, Spross-Trockengewicht und Sprosslänge korreliert, die im Gewächshausversuch gemessen wurden. Sie wurden als Vektoren im Ordinationsdiagramm dargestellt.

Die multivariate, permutationsbasierte Varianzanalyse erfolgte mit der PerMANOVA-Software (frei erhältlich unter www.stat.auckland.ac.nz/~mja/; Anderson, 2001; McArdle und Anderson, 2001). Das hierfür verwendete Versuchsdesign bestand aus den zwei Faktoren Vegetationszyklus (5 Stufen) und Inokulierung (2 Stufen). Beide Faktoren wurden als orthogonal und fixiert definiert. Pro Vegetationszyklus und Behandlung wurden je 4 Replikate analysiert. Für jeden Analyseterm wurden 4999 zufällige Permutationen der Rohdaten durchgeführt, um p-Werte zu erhalten (Manly, 1997). Als Distanzmaß wurde die euklidische Distanz verwendet, auf der auch die PCA basiert (Anderson, 2005; Ter Braak und Šmilauer, 2002).

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Schwarzbeinigkeit in den Biokontrollversuchen

Bei den Biokontrollversuchen im Freiland und im Gewächshaus wurde Sommergerste in Monokultur unter Pathogendruck angebaut, um die Entwicklung eines *Ggt*-suppressiven Bodens zu induzieren. Während dieses Ziel im Gewächshaus im Laufe von sechs unmittelbar aufeinander folgenden Vegetationszyklen erreicht wurde, befand sich der Feldversuch nach drei Vegetationsperioden noch in einem früheren Stadium dieser Entwicklung.

4.1.1 Pathogenität des *Ggt*-Inokulums

Vor dem Einsatz im Feld- und Gewächshausexperiment wurde die Pathogenität verschiedener *Ggt*-Inokula in sterilem Boden geprüft (Kap. 3.3.1.2). Die Auswertung dieses Pathogenitätstests nach 32 Tagen ergab durchschnittlich 10 % Wurzelschwärzung für die mit *Ggt10* inokulierten Pflanzen bzw. 20 % für *Ggt13*. Während in den *Ggt10*-Töpfen die charakteristischen Laufhyphen nur entlang der Wurzeln auftraten, war mit *Ggt13* auch ein deutlicher Befall der Halmbasis zu sehen (Abb. 4.1). In den Kontrolltöpfen war kein Schwarzbeinigkeitsbefall feststellbar. *Ggt13* wurde daraufhin als Standard-Inokulum für die Biokontrollversuche ausgewählt.

4.1.2 Entwicklung des Schwarzbeinigkeitsbefalls im Feldversuch

Die Freiland-Parzellen 1–8 wurden von 2005 bis 2007 drei Jahre lang mit Sommergerste in Monokultur bewirtschaftet und während dieser Zeit regelmäßig beprobt. Ab 2006 wurden auch die Parzellen 9–16 bewirtschaftet, allerdings fand auf ihnen keine Befallsbonitur statt.

Die Bonitur wurde jeweils während der Bestockung (EC25) und zu Beginn der Blüte (EC60) durchgeführt. Im Laufe der Vegetationsperiode nahm der Befall deutlich zu (Abb. 4.2 A). Bei zusätzlicher Bonitur zu EC80 in 2006 (nicht dargestellt) wurde eine



Abbildung 4.1 Befallserscheinungen von *Ggt13* an Gerste. Alter der Pflanzen 32 d.
A. Von *Ggt13* infizierte, geschwärzte Wurzeln.
B. Von Pilzmycel bewachsene Halmbasis.

weitere Zunahme der Wurzelschwärzung auf 31,3 % (nicht inok.) und 33,1 % (inok.) verzeichnet, allerdings kamen hier seneszenzbedingte Verschwärzungen und Vermorschungen hinzu, die eine Abschätzung des Befalls erschwerten. Bei der EC25-Bonitur war ein Befallsanstieg von Jahr zu Jahr zu verzeichnen, der in den inokulierten Parzellen um den Faktor 3,2 höher war als in den nicht inokulierten. Allerdings war der EC25-Befall (mit maximal 12,2 % bei F3.1) insgesamt sehr gering. Zu EC60 wurde immer ein höherer Befall festgestellt, der 2006 am stärksten war. Der geringere EC60-Befall 2007 dürfte auf die niederschlagsarme Witterung in diesem Jahr zurückzuführen sein, da *Ggt* auf sehr trockenem Boden nicht mehr wächst (Cook, 2003). Auch der EC60-Befall war in den inokulierten Parzellen stärker, die Unterschiede zwischen den inokulierten und nicht inokulierten Parzellen aber waren geringer als zu EC25. Mit maximal 24,1 % (F2.2) lag der EC60-Befall ebenfalls deutlich unter den im Gewächshaus erreichten Werten.

Die Spross-Trockengewichte (Abb. 4.2 B) sollten den Befall widerspiegeln, da sich die Störung der pflanzlichen Leitbahnen durch den Pilz auf das Wachstum auswirkt (Asher, 1972). Der Befall war aber vermutlich insgesamt zu gering, um hier einen Effekt auszulösen. Das sehr niedrige Trockengewicht in F3.1 und F3.2 dürfte auf den niederschlagsarmen Frühsommer 2007 zurückzuführen sein.

Der Ertrag im Parzellenversuch war in allen drei Jahren relativ gering (Abb. 4.3). Er lag deutlich unter den 50 dt/ha, die mit Barke durchschnittlich erzielt werden (Angaben der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, www.lfl.bayern.de). Mögliche Gründe

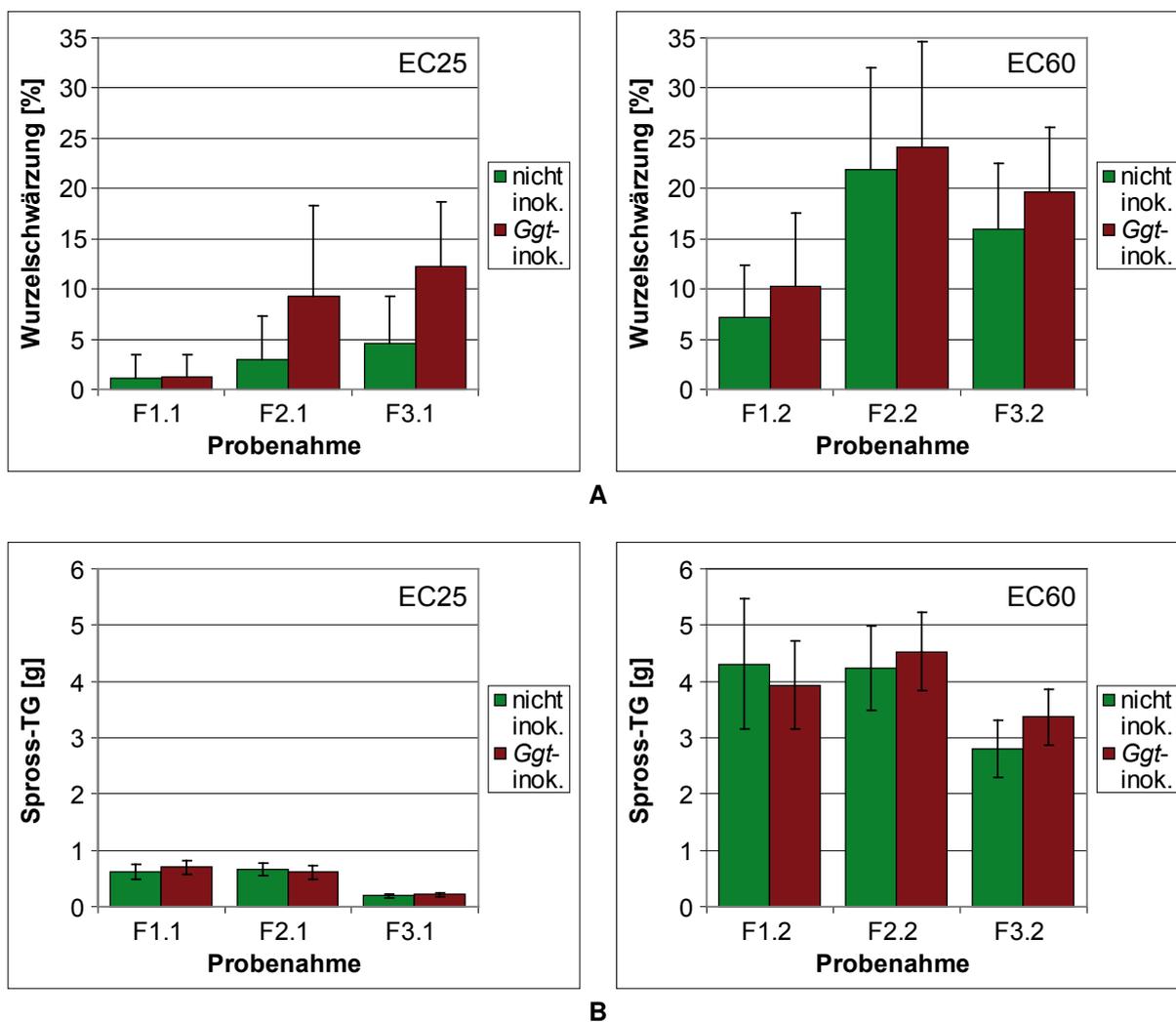


Abbildung 4.2 Befallsparameter im Feldversuch in den Jahren 2005 bis 2007. Probenahme und Bonitur erfolgten jeweils während der Bestockung (EC25) und zu Beginn der Blüte (EC60).

A. Schwarzbeinigkeitsbefall auf den nicht inokulierten Parzellen 1–4 und den *Ggt*-inokulierten Parzellen 5–8.

B. Spross-Trockengewicht der von den Parzellen 1–4 (nicht inokuliert) und 5–8 (*Ggt*-inokuliert) entnommenen Pflanzen.

für den geringen Ertrag 2005 waren die späte Aussaat und ein relativ feuchter Sommer mit z. T. heftigen Niederschlägen. Im Jahr 2006 erfolgte die Aussaat witterungsbedingt noch später. Dagegen folgte 2007 auf eine frühe Aussaat eine wochenlange Trockenperiode mit sommerlichen Temperaturen im April, die zu schwacher Bestockung und geringer Bestandesdichte führten. Eine optimale Ertragsentwicklung war dadurch bereits nicht mehr möglich. Auf den zusätzlich angelegten Parzellen 9–16 wurden 2006 und 2007 durchschnittlich höhere Erträge erzielt als auf den Parzellen 1–8, die sich bereits im zweiten bzw. dritten Monokulturjahr befanden.

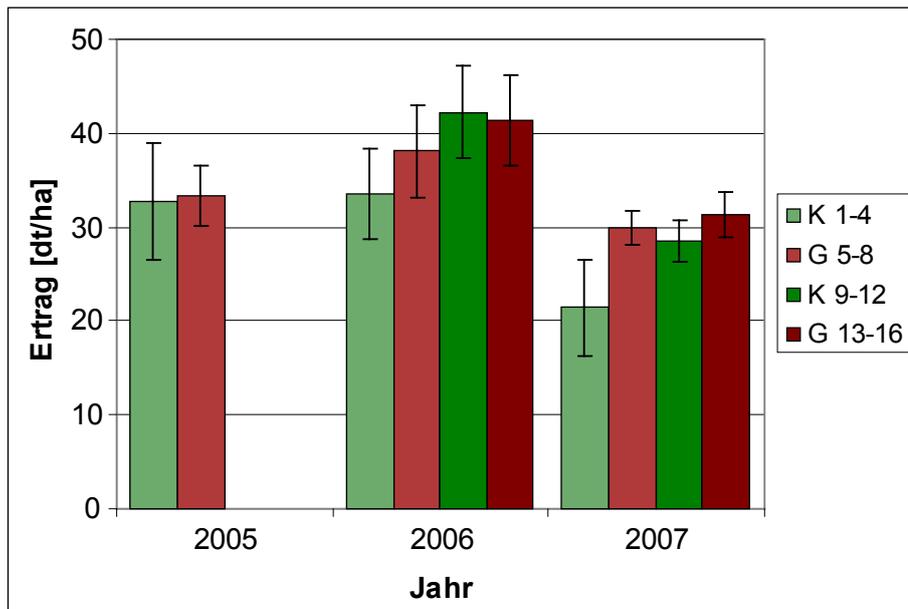


Abbildung 4.3 Ertrag im Feldversuch von 2005 bis 2007. G: *Ggt*-inokulierte Parzellen. K: nicht inokulierte Parzellen. Die Parzellen 9–16 wurden erst ab 2006 bewirtschaftet. Ertragszahlen bezogen auf 14 % Wassergehalt.

4.1.3 Entwicklung eines suppressiven Stadiums im Gewächshausversuch

Im Gewächshausversuch wurden sechs Vegetationszyklen (abgekürzt als GH1–6) von Sommergerste in Monokultur in direkter Folge angebaut. Um die Entwicklung eines Decline-Stadiums zu beschleunigen, wurde der Pathogendruck in der Hälfte des verwendeten Bodens durch Inokulation mit *Ggt13* künstlich erhöht.

4.1.3.1 Pflanzenwachstum im Gewächshausversuch

Der Verlauf des Gewächshausversuchs ist in Abbildung 4.4 dokumentiert. Auf den Fotos sind ab GH2 Unterschiede zwischen den *Ggt*-inokulierten und den nicht inokulierten Pflanzen zu erkennen. Besonders ausgeprägt war der Unterschied in GH3, wie das dazugehörige Foto belegt: Die inokulierten Pflanzen waren hier deutlich kleiner und bildeten weniger Bestockungstriebe. In GH4 blieben alle Pflanzen relativ klein; in GH5 und GH6 dagegen hatte sich das Wachstum fast vollständig erholt und wieder nahezu das Niveau von GH1 erreicht.

In den jeweils zu EC60 und EC90 gemessenen Wachstumsparametern fanden sich deutliche Belege für die Entwicklung eines suppressiven Bodens in den inokulierten Röhren. So nahm das Spross-Trockengewicht aller Pflanzen im Laufe der ersten Vegetationszyklen kontinuierlich ab (Abb. 4.5 A). Bei den zu EC60 entnommenen Pflanzen erreichte es in

GH4 ein Minimum, während das Minimum zu EC90 für die inokulierten Pflanzen in GH3 und für die nicht inokulierten in GH4 lag – zeitlich übereinstimmend mit dem Befallsmaximum der jeweiligen Behandlung (Kap. 4.1.3.2). In GH5 erholte sich das Trockengewicht deutlich, war aber in GH6 wieder etwas geringer.

Zu EC90 war das Spross-Trockengewicht im Schnitt 1,8 mal so hoch wie zu EC60, mit einer Ausnahme in GH3. Dort waren die Wurzeln der inokulierten Pflanzen so stark geschädigt, dass bis zur Vollreife nur das 1,4-fache Trockengewicht erreicht wurde. Bei diesen Pflanzen war vor allem die Kornfüllung deutlich reduziert. Außerdem war der Unterschied zwischen den zwei Behandlungen zu EC90 immer ausgeprägter als zu EC60, da Effekte über die Wachstumsperiode akkumulierten. Während in GH1–3 das Trockengewicht der nicht inokulierten Pflanzen größer war, waren in GH4–6 die inokulierten Pflanzen schwerer. Dies war vermutlich ein Effekt des einsetzenden TAD.

Die Beobachtungen für die Sprosslänge waren ähnlich (Abb. 4.5 B). Auch hier zeigten sich die größten Unterschiede in GH3, wo die inokulierten Pflanzen zu beiden Zeitpunkten im Schnitt ganze 19 cm kleiner waren als die nicht inokulierten Pflanzen.

Ab GH2 wurde die Anzahl der Bestockungstriebe pro Pflanze ausgezählt, da laut Cook (2003) bereits frühe Infektionen der Keimwurzeln die Bildung von Bestockungstrieben stören können. Von allen gemessenen Wachstumsparametern zeigte dieser Wert die größten Schwankungen zwischen den einzelnen Vegetationszyklen (Abb. 4.5 C). So wurden von den nicht inokulierten Pflanzen in GH2 die meisten (6,0 zu EC90) und in GH6 die wenigsten (3,5 zu EC90) Bestockungstriebe gebildet. Die Werte für die inokulierten Pflanzen waren in GH3 mit nur 2,8 Bestockungstrieben (EC90) minimal, erreichten aber unmittelbar anschließend in GH4 mit 6,2 Bestockungstrieben (EC90) ihr Maximum. Das spricht eindeutig für das Einsetzen des Decline-Stadiums.

4.1.3.2 Schwarzbeinigkeitsbefall im Gewächshausversuch

Gegenüber den Beprobungen im Freiland hatten die im Gewächshaus verwendeten Röhren den Vorteil, dass der Boden vollständig aus dem Zylinder entnommen werden konnte. Dadurch konnten wesentlich längere Wurzeln geerntet und zur Befallsbonitur herangezogen werden. Diese fand jeweils zu Beginn der Blüte (EC60) statt. Der *Ggt*-Befall war bereits in GH1 an den inokulierten Wurzeln (17,5 %) mehr als dreimal so hoch wie an den nicht inokulierten Wurzeln (5,0 %, Abb. 4.6). In den inokulierten Röhren stieg der Befall während der zwei folgenden Zyklen weiter stark an und erreichte in GH3 mit durchschnittlich 49 % ein deutliches Maximum. Einzelne Wurzeln waren hier bis zu 80 % verschwärzt und z. T. so stark vermorscht, dass sie bei der Probenahme abbrachen. In GH4 trat in den inokulierten Röhren ein plötzlicher Befallsrückgang auf nur mehr 21 % auf – das entspricht

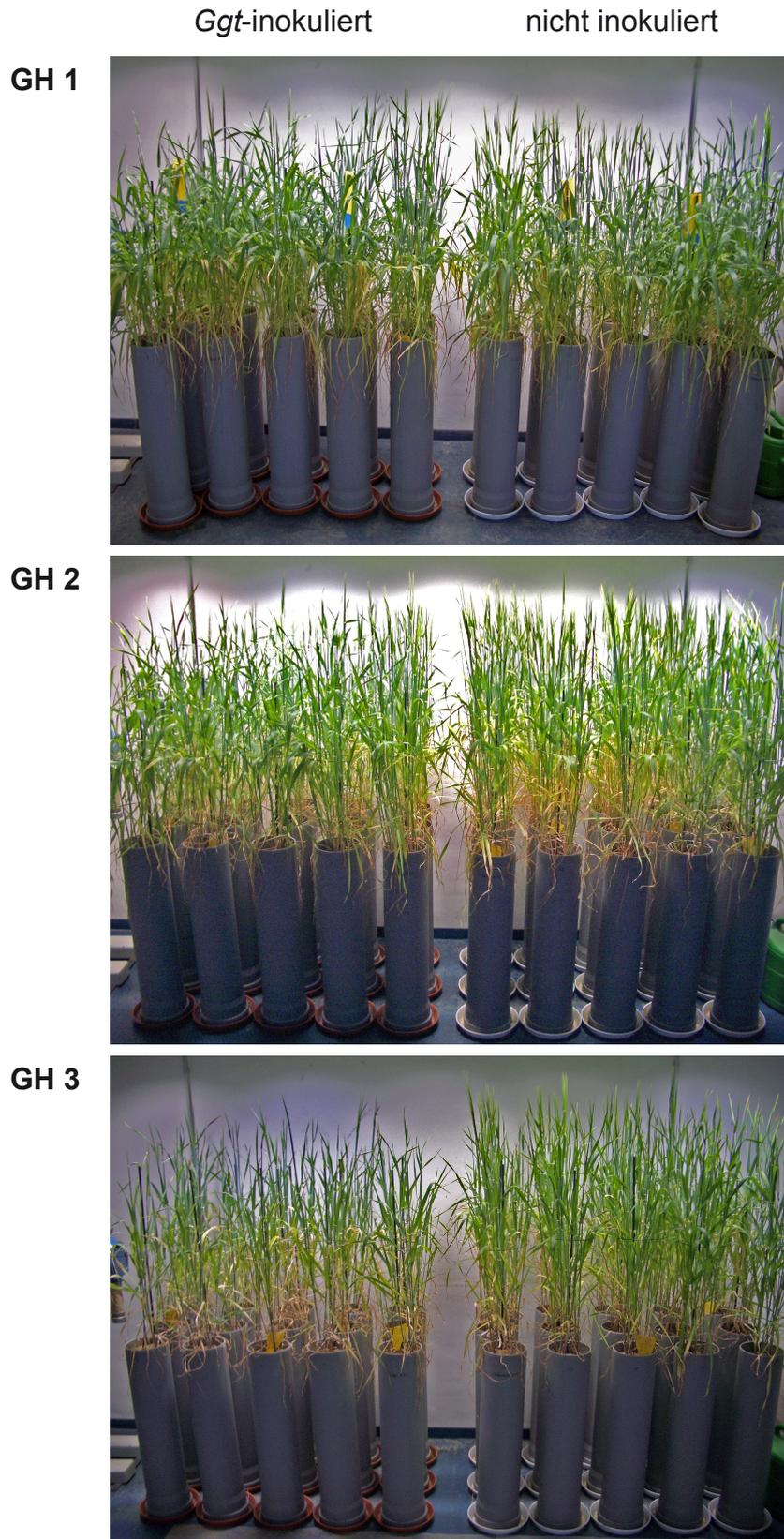
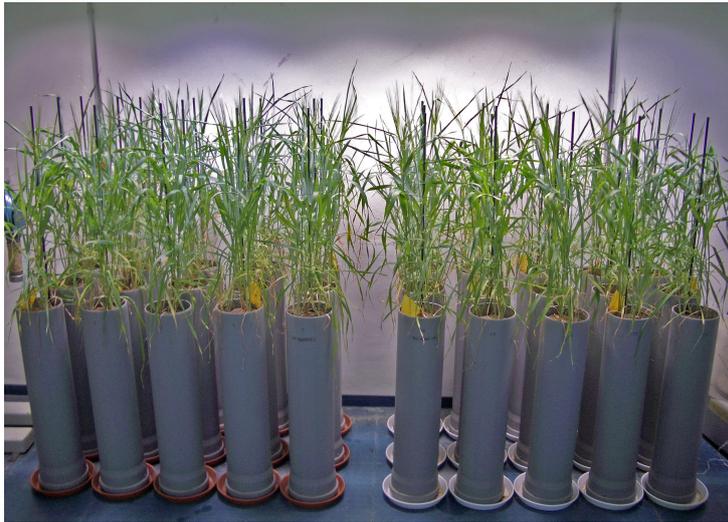


Abbildung 4.4 Vegetationszyklen 1 bis 6 des Gewächshausversuchs, jeweils zu Beginn der Blüte (EC60). In GH1 wurden vier Röhren pro Behandlung bereits zu EC30 entnommen.

Ggt-inokuliert

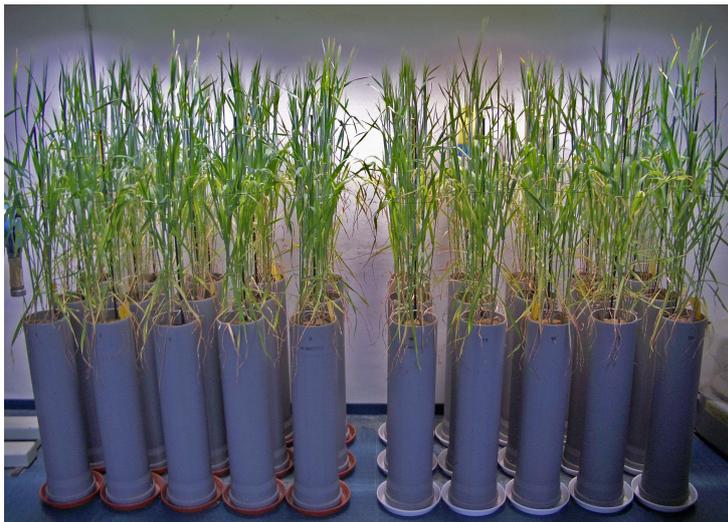
nicht inokuliert



GH 4

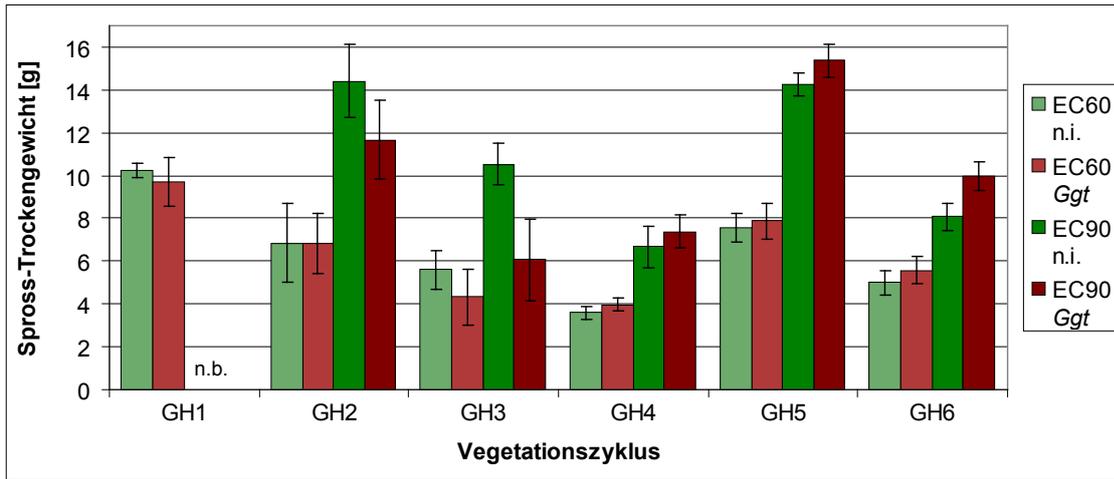


GH 5

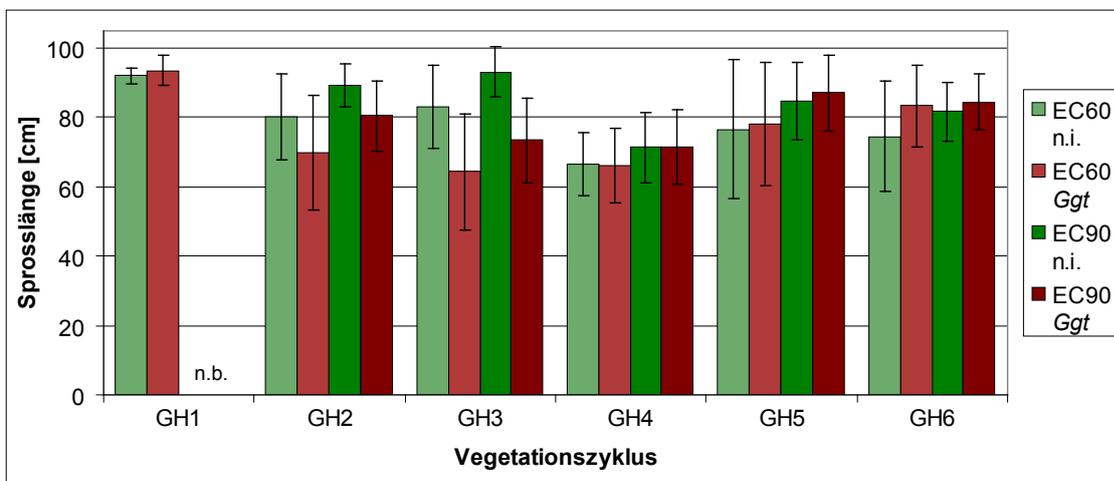


GH 6

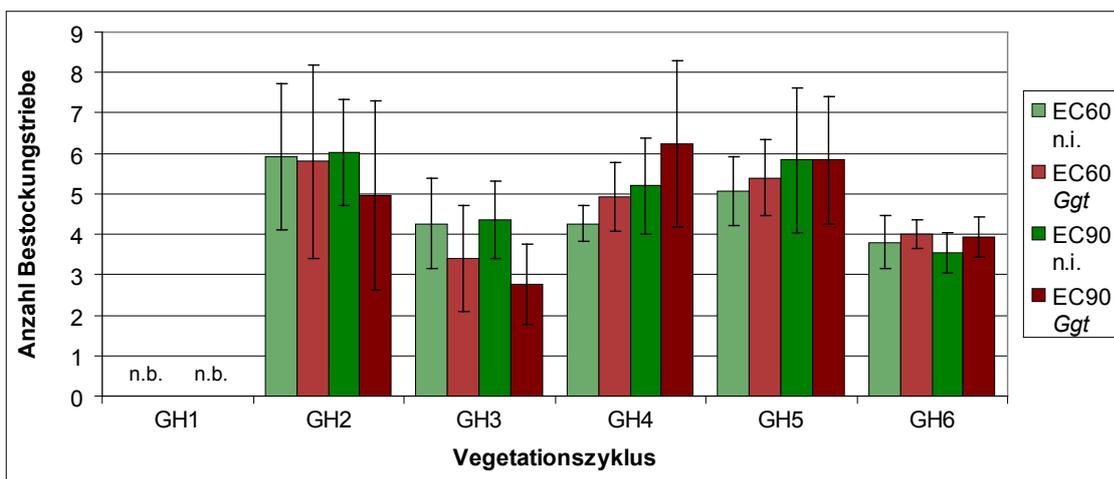
Abbildung 4.4 (Fortsetzung)



A



B



C

Abbildung 4.5 Wachstumsparameter für den Gewächshausversuch zu den Entwicklungsstadien EC60 (pro Behandlung fünf Röhren, d. h. 15 Pflanzen; in GH1 nur 4 Röhren, d. h. 12 Pflanzen) und EC90 (pro Behandlung 10 Röhren, d. h. 30 Pflanzen). n.b.: nicht bestimmt, n.i.: nicht inokuliert, Ggt: Ggt-inokuliert.

A. Spross-Trockengewicht.

B. Sprosslänge.

C. Anzahl von Bestockungstrieben pro Pflanze.

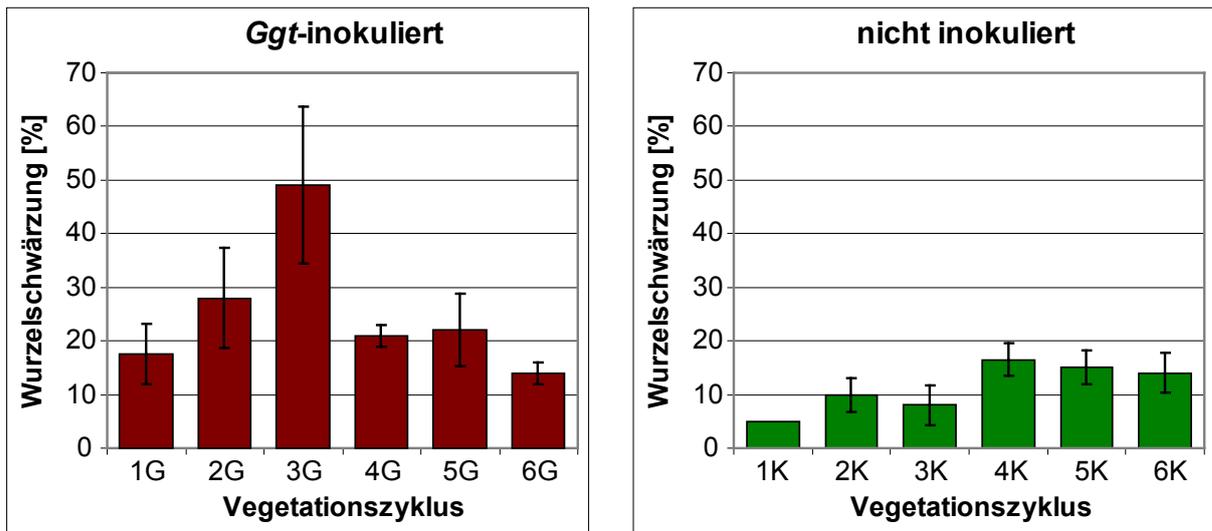


Abbildung 4.6 Schwarzbeinigkeitsbefall im Gewächshausversuch während sechs aufeinander folgender Vegetationszyklen. Probenahme jeweils zu Beginn der Blüte (EC60). G: *Ggt*-inokulierte Röhren, K: nicht inokulierte Röhren.

fast dem Ausgangsniveau in GH1. Bis zu GH6 blieb der Befall auf diesem Niveau relativ stabil. Dieser Verlauf entspricht der typischen Entwicklung eines Decline-Stadiums, bei der auf zunächst sehr starken Befall ein spontaner Rückgang folgt, nach dem die Krankheit trotz weiterer Anwesenheit des Pathogens nicht mehr oder nur noch eingeschränkt auftritt (Cook, 2003). Deshalb kann man davon ausgehen, dass in den *Ggt*-inokulierten Röhren ein solches TAD-Stadium erreicht wurde.

In den nicht inokulierten Röhren lag der Befall zunächst auf sehr niedrigem Niveau. Er erreichte in GH4 ein leichtes Maximum (16,5 %) und sank dann wieder auf 15 % in GH5 und 14 % in GH6. Hier konnte keine TAD-Entwicklung festgestellt werden.

4.2 Entwicklung eines quantitativen PCR-Assays für *Gga* und *Ggt*

In den Biokontrollversuchen wurde der Schwarzbeinigkeitsbefall der Wurzel visuell bonitiert. Diese Methode ist relativ fehleranfällig, etwa weil zu späten Entwicklungsstadien auch seneszenzbedingte Verschwärzungen auftreten, oder aber, weil andere Pathogene – wie etwa *Pythium* – ähnliche Verfärbungen der Wurzel hervorrufen können wie *Ggt* (Waller, 1979). Der im Folgenden beschriebene realtime PCR-Assay ermöglicht es, die Konzentration der Varietäten *Ggt* und *Gga* genau zu quantifizieren. Damit kann sowohl die Menge des im Boden vorhandenen Inokulums als auch der Befall der Wurzel exakt und objektiv bestimmt werden.

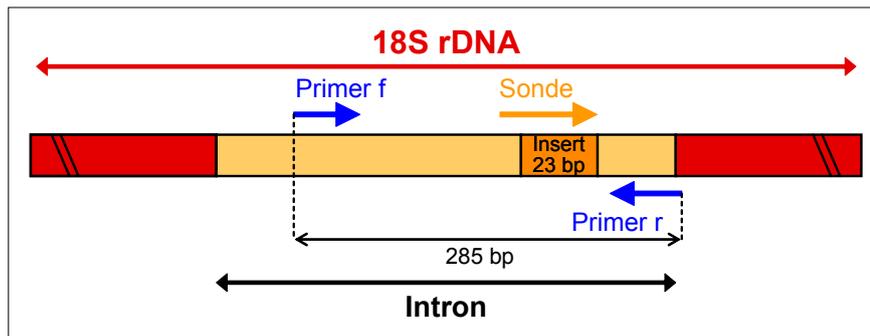


Abbildung 4.7 TaqMan[®]-System für *Ggt*. Die Sonde bindet an ein 23 bp Insert im Intron der 18S rRNA-Gensequenz, das spezifisch für *Ggt* ist.

Bei einer TaqMan[®] PCR wird zusätzlich zu den Primern eine fluoreszenzmarkierte Sonde eingesetzt, die die Spezifität der realtime PCR gegenüber SYBR Green basierten Systemen erhöht. Sie ermöglicht die Differenzierung von *Gaeumannomyces graminis* bis auf Varietäten-Ebene.

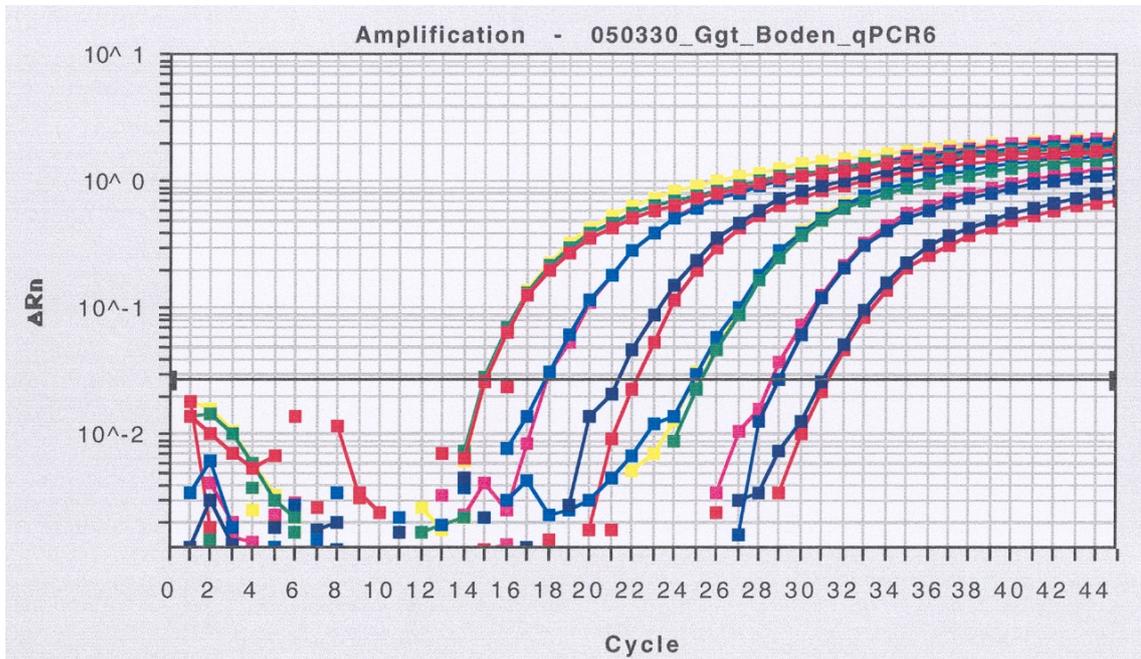
Das für *Gga* spezifische Primersystem amplifiziert ein 397 bp Fragment der ITS-Region der rRNA-Gensequenz. Die Nukleotidsequenzen der ITS1- und ITS2-Region variieren stärker als die der 18S- oder 5,8S-Untereinheit und sind daher gut zur spezifischen Amplifikation einer Varietät geeignet (Bryan et al., 1995).

Für *Ggt* wurde ein Primersystem verwendet, welches ein 285 bp Fragment der 18S rRNA-Gensequenz amplifiziert. Phylogenetische Sequenzanalysen der *Gg*-Varietäten und nahe verwandter Spezies hatten ergeben, dass *Gga* und *Ggt* allein durch Analyse der 18S rRNA Exon-Sequenzen nicht unterscheidbar sind (Lebuhn, persönliche Mitteilung). Das 18S rRNA Intron von *Ggt* enthält jedoch ein spezifisches 23 bp Insert (Fouly und Wilkinson, 2000a), welches eine eindeutige Unterscheidung von den anderen Varietäten ermöglicht. Daher wurde für *Ggt* ein TaqMan[®] System entwickelt, dessen Sonde spezifisch für das genannte 23 bp Insert ist und so die alleinige Detektion dieser Varietät ermöglicht (Abb. 4.7).

Der PCR-Assay wurde zunächst an Reinkulturen etabliert und schließlich für DNA aus Umweltproben (Boden, Wurzel) optimiert.

4.2.1 Absolute Quantifizierung: Standardkurven

Für die absolute Quantifizierung wurde eine externe Standardkurve aus einer 1:10 Verdünnungsreihe des jeweiligen Plasmid-Standards erzeugt. Die Amplifikation der Standardverdünnungen und die daraus abgeleitete Standardkurve sind in Abbildung 4.8 am Beispiel des *Ggt* 18S TaqMan[®]-Systems dargestellt. In Tabelle 4.1 sind die Kalibrierungsfunktionen für beide Assays aufgeführt.



A



B

Abbildung 4.8 Quantitative TaqMan[®] PCR mit den *Ggt* 18S-Oligonukleotiden.

A. Amplifikation der sechs Standardverdünnungen ($2,2 \cdot 10^7$ bis $2,2 \cdot 10^2$ Kopien/ μ l), jeweils drei Wiederholungen.

B. Standardkurve. Die schwarzen Symbole repräsentieren die Triplikate der Standard-DNA, die roten Symbole die PCR-Amplifikate der Proben unbekannter Konzentration.

Tabelle 4.1 Kalibrierungsfunktionen und Korrelationskoeffizienten für die verwendeten TaqMan[®] Assays. C_t = Threshold Cycle, x = Kopienzahl.

| TaqMan [®] Assay | Kalibrierungsfunktion | Korrelations- koeffizient | Effizienz |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------|
| Ggt 18S | $C_t = -3,26 \cdot \log x + 38,87$ | 0,987 | 102,6 % |
| Gga ITS | $C_t = -3,17 \cdot \log x + 44,04$ | 0,998 | 106,8 % |

Der lineare Korrelationskoeffizient der Standardkurve r^2 betrug in allen Läufen zwischen 0,97 und 0,99. Die Effizienz der Reaktion lag etwas über 100 % (Steigung -3,17 bis -3,26).

4.2.2 Quantifizierung von Gg-Varietäten in Reinkultur

Die Spezifität beider PCR-Assays wurde mit DNA aus Reinkulturen der verschiedenen Gg-Varietäten überprüft (Beschreibung der verwendeten Isolate siehe Tab. 3.4, S. 57). Die TaqMan[®]-PCR reagiert hochsensitiv auf inhibierende Substanzen, die bei der DNA-Isolierung aus Reinkulturen koextrahiert werden (Bach et al., 2002). Daher wurden die DNA-Extrakte 1:100 verdünnt, so dass jeweils ca. 2 ng DNA in der qPCR eingesetzt wurden.

Mit den Oligonukleotiden für *Gga* wurden in den vier getesteten *Gga*-Isolaten $1,02 \cdot 10^7$ bis $5,06 \cdot 10^7$ Kopien/ μ l DNA-Extrakt nachgewiesen (Abb. 4.9 A). Für die jeweils zwei *Ggg*- bzw. *Ggt*-Isolate wurden zwar falsch positive Amplifikate detektiert; deren Kopienzahlen lagen allerdings um etliche Größenordnungen unter denen für *Gga*. So wurden für *Ggg* $2,04 \cdot 10^3$ und $1,02 \cdot 10^4$ Kopien/ μ l DNA-Extrakt gemessen, also um den Faktor 5.000 weniger als für *Gga*. Für *Ggt* waren die Werte mit 1,2 und 192 Kopien/ μ l DNA-Extrakt sogar um den Faktor 300.000 niedriger. Sie lagen damit bereits im Bereich der NTC (Kontrollprobe ohne DNA), die ein Maßstab für unspezifische Amplifizierung ist. Bei der mit 45 sehr hohen Anzahl der PCR-Zyklen ist mit solchen unspezifischen Amplifikaten durchaus zu rechnen; im Mittel traten sie ab einem C_t von 43 auf. Die starke Differenzierung zwischen den Varietäten bestätigte die Eignung des gezeigten TaqMan[®]-Systems für die spezifische Quantifizierung von *Gga*.

Mit dem TaqMan[®]-System für *Ggt* lagen die Werte für die *Ggt*-Isolate bei $7,66 \cdot 10^7$ und $1,03 \cdot 10^8$ Kopien/ μ l DNA-Extrakt (Abb. 4.9 B). Auch mit diesem System wurden Amplifikate für die anderen beiden Varietäten detektiert; mit $6,17 \cdot 10^3$ Kopien/ μ l DNA-Extrakt (*Gga*) und $8,16 \cdot 10^3$ Kopien/ μ l DNA-Extrakt (*Ggg*) lagen die Werte aber um den Faktor 15.000 unter den *Ggt*-Werten. Damit war auch für das *Ggt*-System eine ausreichende Spezifität gewährleistet.

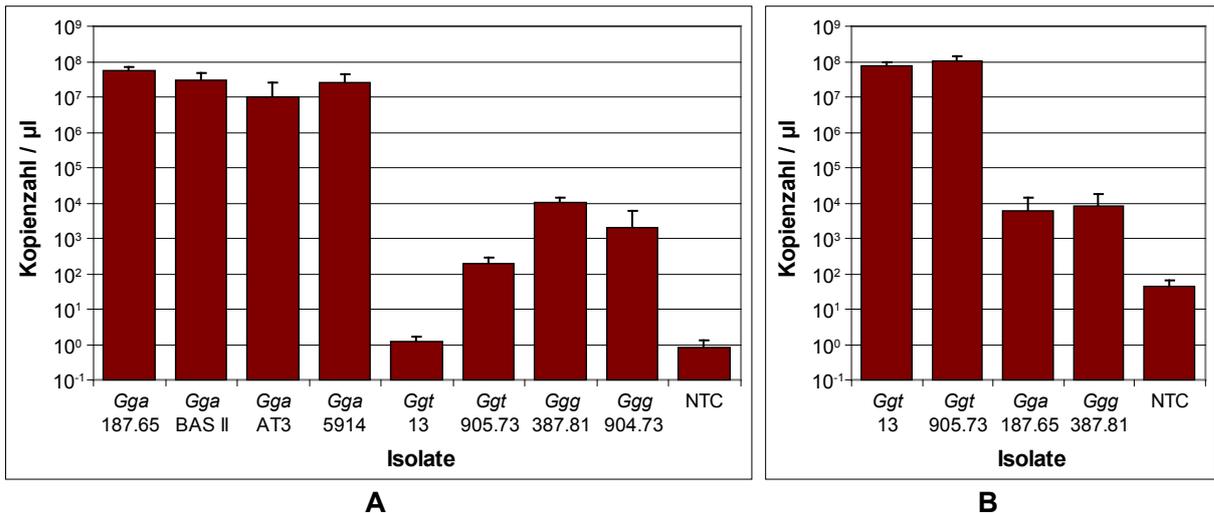


Abbildung 4.9 Quantifizierung von DNA aus Reinkulturen mit TaqMan® PCR. Die als Template verwendeten, 1:100 verdünnten Extrakte enthielten ca. 0,4 ng DNA/µl. NTC: No Template Control.

A. *Gga* ITS-Assay.

B. *Ggt* 18S-Assay.

4.2.3 Quantifizierung von Genkopien im Boden und an Wurzeln

Der hier entwickelte Assay soll generell in Umweltproben Anwendung finden, um die Menge an *Ggt* und *Gga* in landwirtschaftlich genutzten Böden zu detektieren. Daher wurde seine Eignung an Boden- und Wurzelproben überprüft und für diese optimiert.

Dafür wurden zunächst Bodenproben mit frischem Pilz-Mycel der Varietäten *Ggt* bzw. *Gga* versetzt und die daraus extrahierte DNA als Template im jeweiligen TaqMan® Assay eingesetzt. Hier wurde mit einer 1:1000-Verdünnung der Eluate gearbeitet, da bei höheren Konzentrationen (Verdünnung 1:100) eine Inhibierung der PCR-Reaktion auftrat. Diese war vermutlich auf koextrahierte Huminstoffe aus dem Boden zurückzuführen, die als Inhibitoren in der PCR wirken (Wilson, 1997).

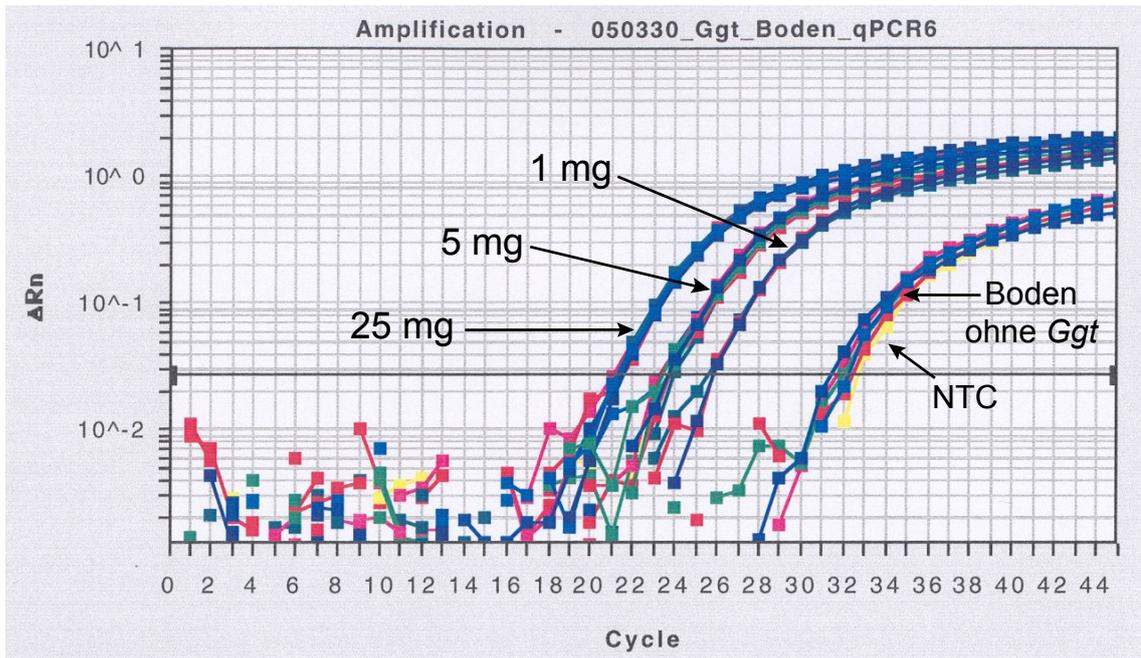
Es wurde eine deutliche Korrelation von zugegebener Menge an Pathogen und detektierter Anzahl an Kopien errechnet. Mit dem *Ggt*-spezifischen Assay wurden bei Zugabe von 1 mg Mycel (*Ggt13*) im Mittel $1,17 \cdot 10^9$ Kopien/g Boden (Frischgewicht), für 5 mg Mycel $5,10 \cdot 10^9$ Kopien/g Boden und für 25 mg Mycel $2,57 \cdot 10^{10}$ Kopien/g Boden detektiert (Tab. 4.2). Das entspricht ziemlich genau einer Verfünffachung der Kopienzahl analog zur eingesetzten Mycelmenge (Faktor 4,3 zwischen 1 mg und 5 mg bzw. Faktor 5,0 zwischen 5 mg und 25 mg; Abb. 4.10 A). Die Werte für den gleichen, nicht sterilen Boden ohne Zugabe von Pilz lagen mit $1,19 \cdot 10^7$ Kopien/g zwar nur unwesentlich über der „No Template Control“ (NTC); sie zeigten aber, dass *Ggt* in geringen Mengen auch im unbeimpften Feldboden vorhanden war. Der C_t -Wert der NTC entspräche $6,97 \cdot 10^6$ Kopien/g Boden; diese Kopienzahl kann daher als Detektionslimit der Reaktion angesehen werden.

Tabelle 4.2 Quantifizierung von *Gga* und *Ggt* in Boden- und Wurzelproben, Mittelwerte für je drei Replikate. Für die No Template Control (NTC) wurden die C_t -Werte in Kopienzahlen pro g Boden umgerechnet; sie entsprechen dem Detektionslimit der Reaktion.

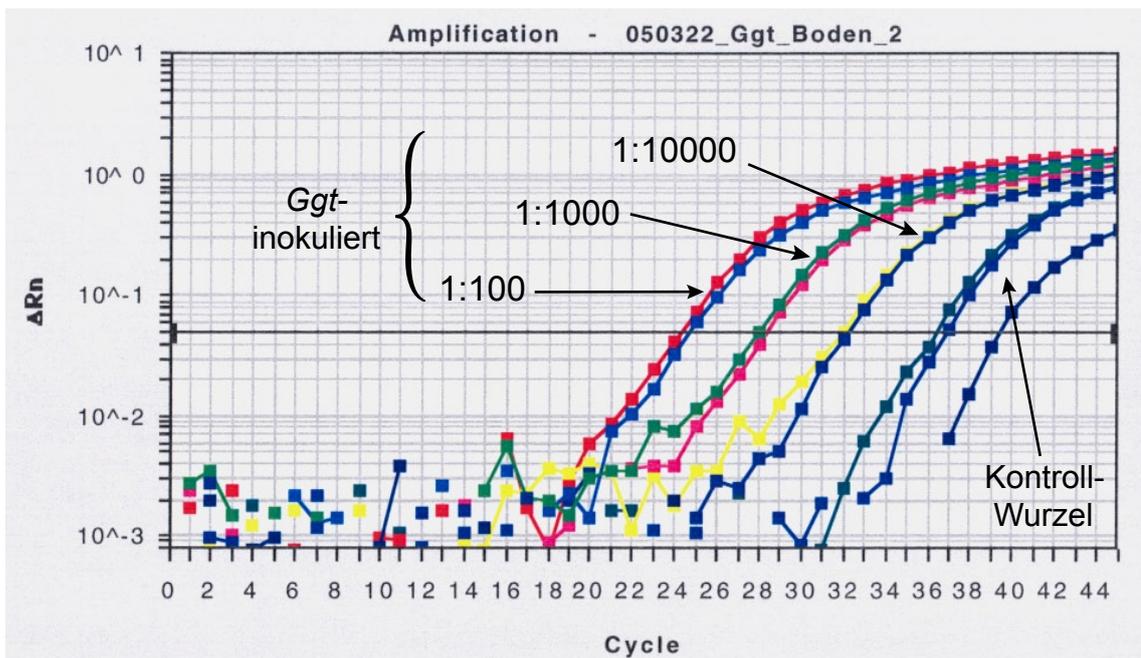
| TaqMan [®] Assay | Testmaterial | Inokulum | Kopienzahl pro g Boden bzw. pro g Wurzel |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|
| <i>Gga</i> ITS | Boden, mit <i>Gga187.65</i> versetzt | 0 mg | $1,32 \cdot 10^7$ |
| | | 1 mg | $1,86 \cdot 10^9$ |
| | | 5 mg | $6,44 \cdot 10^9$ |
| | | 25 mg | $3,01 \cdot 10^{10}$ |
| | | No Template Control | $1,88 \cdot 10^7$ |
| <i>Ggt</i> 18S | Boden, mit <i>Ggt13</i> versetzt | 0 mg | $1,19 \cdot 10^7$ |
| | | 1 mg | $1,17 \cdot 10^9$ |
| | | 5 mg | $5,10 \cdot 10^9$ |
| | | 25 mg | $2,57 \cdot 10^{10}$ |
| | Boden (Pathogenitätstest) | nicht inokuliert | $5,24 \cdot 10^6$ |
| | | <i>Ggt10</i> | $7,47 \cdot 10^6$ |
| | | <i>Ggt13</i> | $2,07 \cdot 10^6$ |
| | Wurzeln (Pathogenitätstest) | nicht inokuliert | $1,90 \cdot 10^7$ |
| | | <i>Ggt10</i> | $8,91 \cdot 10^9$ |
| | | <i>Ggt13</i> | $7,06 \cdot 10^9$ |
| | No Template Control | $6,97 \cdot 10^6$ | |

Auch mit dem *Gga*-spezifischen Assay wurde eine deutliche Korrelation von zugegebener Pathogenmenge und Kopienzahl errechnet. Die nachgewiesenen Kopienzahlen bei Zugabe verschiedener Mycelmengen (*Gga187.65*) entsprachen in etwa denen des *Ggt*-Assays, allerdings war das Detektionslimit mit $1,88 \cdot 10^7$ Kopien/g Boden etwas höher (Tab. 4.2).

Die Berechnung der Kopienzahlen pro mg eingesetztes Mycel im Boden ergab sowohl mit dem *Ggt*- als auch mit dem *Gga*-Assay ca. $7 \cdot 10^8$ Kopien/mg, was nahezu mit den Zahlen für die Reinkulturen übereinstimmte (ca. $1 \cdot 10^8$ Kopien/mg Mycel). Dies kann als Beleg dafür angesehen werden, dass die für die Bodenproben gewählte DNA-Extraktionsmethode sehr effizient war. Der verwendete FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (QBiogene, Carlsbad, USA) erzielte eine relativ hohe Ausbeute von 10–20 μg DNA pro g Boden (Trockengewicht). Die Eignung dieser Methode wird durch eine Studie von Mummy und Findlay (2004) bekräftigt, laut der der FastDNA[®] Kit im Vergleich von drei Bodenextraktionskits die höchste DNA-Extraktionseffizienz erreichte.



A



B

Abbildung 4.10 Quantifizierung von *Ggt* im Boden und an Wurzeln mit dem *Ggt* 18S TaqMan® Assay.

A. Nachweis unterschiedlicher Mengen *Ggt13* (1 mg, 5 mg, 25 mg) in jeweils 0,5 g Boden (Scheyern A30), Verdünnung des DNA-Extrakts 1:1000. NTC: No Template Control.

B. Quantifizierung von *Ggt13* an infizierten Gerstenwurzeln, verglichen mit einer nicht infizierten Kontrollwurzel, je drei verschiedene Verdünnungen des DNA-Extrakts.

Mit dem *Ggt*-Assay wurden auch Bodenproben (Bulk Soil) und Wurzeln aus dem Pathogenitätstest analysiert, die 32 d nach der Aussaat entnommen wurden (Kap. 3.3.1.2). Die Werte für den nicht inokulierten Boden lagen unterhalb des Detektionslimits, ebenso wie für den *Ggt13*-inokulierten Boden – obwohl die Pflanzen hier sichtlich mit *Ggt* infiziert waren. Für den *Ggt10*-inokulierten Boden wurden mit $7,47 \cdot 10^6$ Kopien/g Boden etwas höhere Zahlen nachgewiesen, die allerdings auch nur leicht über dem Detektionslimit lagen (Tab. 4.2).

Die analysierten Wurzeln zeigten keine Symptome (Kontrolle) bzw. 10 % (*Ggt10*) und 20 % (*Ggt13*) Wurzelverschwärzung. Die Kopienzahlen für die infizierten Wurzeln waren für beide Stämme ähnlich, wobei für *Ggt10* mit $8,91 \cdot 10^9$ Kopien/g Wurzelmaterial ein etwas höherer Wert detektiert wurde als für *Ggt13* mit $7,06 \cdot 10^9$ Kopien/g Wurzelmaterial (Tab. 4.2) – obwohl die visuelle Bonitur die *Ggt13*-Wurzeln als doppelt so stark befallen einstufte wie die *Ggt10*-Wurzeln. Die Kopienzahlen für die nicht inokulierten Kontrollwurzeln lagen um den Faktor 500 unter denen der infizierten Wurzeln. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem verwendeten TaqMan[®]-System schon bei geringen Befallszahlen ein deutlicher Nachweis des Pathogens an der Wurzel möglich ist (Abb. 4.10 B).

4.3 Isolierung und Charakterisierung von Antagonisten gegen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Aus dem ersten Vegetationszyklus des Feld- und des Gewächshausexperiments wurden sowohl Pilze als auch Bakterien isoliert, in Konfrontations-Versuchen auf Antagonismus gegen *Ggt* getestet und gegebenenfalls identifiziert. Zwei ausgewählte Bakterien-Isolate wurden zudem einer Metabolitanalyse unterzogen.

4.3.1 Isolierung antagonistischer Pilze

Aus den Biokontrollversuchen wurden insgesamt 699 Pilz-Isolate gewonnen, von denen knapp die Hälfte das Wachstum von *Ggt* zu hemmen vermochte. Die Zuordnung zu den in Kapitel 3.3.5.2 (S. 46) definierten Inhibitionsklassen ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Die insgesamt 111 Isolate der Klassen 1 und 2 inhibierten das *Ggt*-Wachstum ohne Hyphenkontakt. Das bedeutet, dass sie diffusionsfähige Metaboliten ins Medium abgaben. Bei den 96 Isolaten der Klassen 3 und 4 trat die Inhibition erst nach Kontakt der Hyphen auf. Hier könnte u. a. Mycoparasitismus eine Rolle spielen.

Innerhalb der Inhibitionsklassen konnten die Pilz-Isolate weiter in morphologische Gruppen unterteilt werden. Dazu wurden Wuchsform der Kolonie, Wachstumsgeschwindigkeit,

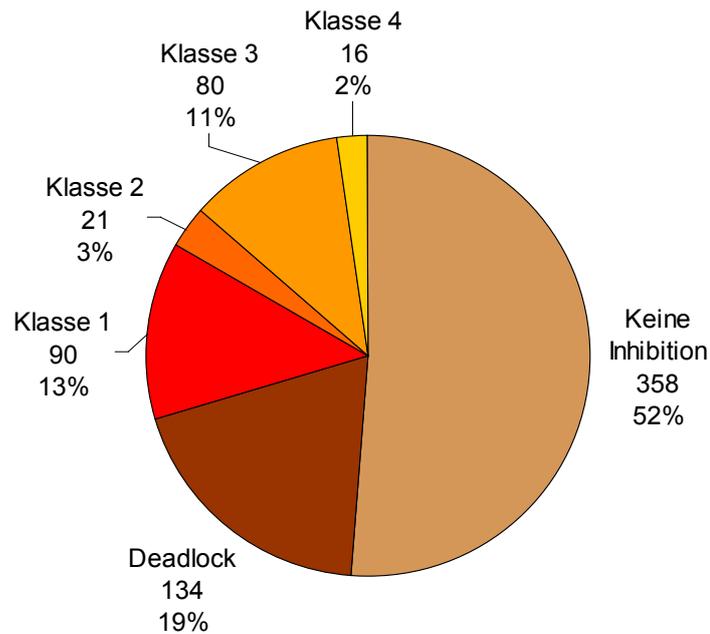


Abbildung 4.11 Verteilung der Inhibitionsklassen unter allen 699 Pilz-Isolaten. Klasse 1: Schwache Inhibition. Klasse 2: Starke Inhibition. Klasse 3: *Ggt* wird überwacht. Klasse 4: Kontaktinhibition, Veränderung der *Ggt*-Morphologie. Details zu den Inhibitionsklassen s. Abb. 3.7, S. 47.

eventuelle Sporenbildung, Farbe des Mycel und der Sporen und eine eventuelle Färbung des Mediums durch Pigmentabgabe notiert. Insgesamt wurden 46 morphologische Gruppen identifiziert (Tab. 4.3).

Die Gruppe 0.4 war morphologisch identisch mit *Ggt*. Für sie war kennzeichnend, dass alle Isolate aus *Ggt*-inokuliertem Boden des Gewächshausversuchs stammten. Daher handelte es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um den inokulierten Stamm *Ggt13* selbst.

Bei den antagonistischen Isolaten war auffällig, dass die meisten sporulierenden Pilze bereits ohne Hyphenkontakt inhibierten. Sie waren besonders zahlreich in Klasse 2 vertreten (Gruppen 2.1 bis 2.6), einzelne Isolate aber auch in Klasse 1 (Gruppen 1.8 bis 1.13). Es könnte sich hier um *Aspergillus*- oder *Penicillium*-Spezies handeln (Dewan und Sivasithamparam, 1988). Einige Isolate der Klassen 1 und 2 waren zudem intensiv gefärbt (v. a. Gruppen 1.3, 1.4, 2.7), gaben Pigmente in das Medium ab (Gruppen 1.3, 2.4) oder führten zu einer Trübung des Mediums (Gruppen 1.10, 2.3). Bei den Gruppen 4.2 und 4.3 handelte es sich aufgrund der Morphologie und des mycoparasitären Verhaltens wahrscheinlich um *Trichoderma*-Isolate (Domsch et al., 1993; Duffy et al., 1996; Harman et al., 2004).

Tabelle 4.3 Morphologische Gruppen der Pilz-Isolate. Die Hauptgruppe entspricht der Inhibitionsklasse (Kap. 3.3.5.2).

| Morphologische Gruppe | Haupt- gruppe | Unter- gruppe | Anzahl von Isolaten | | | | | | | | | | Beschreibung | | | | |
|-----------------------|------------------|------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|--|---|---|----------------|------------------|--------|----------------------|
| | | | gesamt | F | | GH | | GH | | nicht Inok. | Ggt- Inok. | v | Kolonie- morphologie | Luft- mycel | Farbe des Mycels | Sporen | Färbung im Medium |
| | | | | 1.1 | 1.2 | 1.1 | 1.2 | 1.3 | GH | | | | | | | | |
| 0 | 1 | 179 | 20 | 43 | 50 | 40 | 26 | 82 | 97 | ± | flächig-schuppig | - | hyalin | - | - | | |
| 0 | 2 | 97 | 14 | 10 | 32 | 18 | 23 | 57 | 40 | ++ | lockeres Mycel | + | hyalin | - | - | | |
| 0 | 3 | 11 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 10 | 1 | -- | kompakt | - | weiß, hellgrau | - | - | | |
| 0 | 4 | 10 | 0 | 0 | 2 | 2 | 6 | 6 | 10 | ± | flächig | - | hyalin bzw. schwarz | - | - | | |
| 0 | 5 | 61 | 29 | 22 | 1 | 6 | 3 | 25 | 36 | | Zusammenfassung der restlichen Isolate der Hauptgruppe 0 | - | | - | - | | |
| D | 1 | 78 | 8 | 9 | 10 | 24 | 27 | 50 | 28 | + | dicht-flaumig | + | weiß, rosa, gelb, orange | - | - | | |
| D | 2 | 12 | 5 | 3 | 3 | 1 | 0 | 6 | 6 | -- | kompakt | ± | weiß, lachtsrosa, gelb, hellorange, grau | - | - | | |
| D | 3 | 8 | 3 | 2 | 3 | 0 | 0 | 5 | 3 | - | ring-, strahlenförmig | ± | gelblich | - | - | | |
| D | 4 | 8 | 2 | 0 | 2 | 4 | 0 | 5 | 3 | - | ring-, strahlenförmig | + | grau bis schwarzbraun | - | - | | |
| D | 5 | 6 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 5 | 1 | - | kompakt | + | dunkelgrün bis schwarz | - | - | | |
| D | 6 | 6 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 2 | 4 | + | dicht-flaumig | + | rosa, LM weiß | - | - | | |
| D | 7 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 1 | 4 | + | flaumig, Sekkoren | + | hellbraun bis braungrau | - | - | | |
| D | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | ± | locker flaumig | + | schwarzbraun, LM hell | - | - | | |
| D | 9 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | + | dicht-flaumig | + | weiß | - | - | | |
| D | 10 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | ++ | flächig | ± | hyalin | - | - | | |
| D | 11 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | + | dichte-wollig | ± | weiß, bräunlich | - | - | | |
| D | 12 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | - | flockig | + | hellrosa | - | - | | |
| 1 | 1 | 38 | 10 | 12 | 6 | 3 | 7 | 18 | 20 | + | friedig-geklappt | + | weiß | - | - | | |
| 1 | 2 | 22 | 3 | 5 | 4 | 4 | 6 | 8 | 14 | ± | flüzig-wollig | + | braun marmoriert | - | - | | |
| 1 | 3 | 14 | 4 | 6 | 3 | 1 | 0 | 8 | 6 | + | wollig | + | intensiv gelborange, LM weiß-gelb-orange-rosa | - | gelborange | | |
| 1 | 4 | 6 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 4 | 2 | + | stark geklappt | + | rot-orange, LM weiß-rosa | - | - | | |
| 1 | 5 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | ± | leicht pelzig | + | hellbraun | - | - | | |
| 1 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | ± | gymnariartig | ± | dunkelbraun | - | - | | |
| 1 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | -- | kompakt | ± | hellgelb | - | - | | |
| 1 | 8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | ± | wollig | + | gelblich-beige | - | - | | |
| 1 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | - | kompakt | + | dunkelgrün bis braun | - | - | | |
| 1 | 10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | + | kompakt | + | weiß | - | - | | |
| 1 | 11 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | ± | ring-, strahlenförmig | - | grünbraun | - | grünbraun | | |
| 1 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | + | kompakt | + | orange | - | hellgrau | | |
| 1 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | -- | kompakt | ± | weiß | - | weiß | | |
| 2 | 1 | 9 | 0 | 0 | 1 | 6 | 2 | 6 | 3 | -- | kompakt | ± | gelborange | - | weiß, hellgrau | | |
| 2 | 2 | 5 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 | 3 | + | kompakt | + | weiß | - | grün, grau | | |
| 2 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | - | kompakt | ± | gelb | - | hellgrau | | |
| 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | -- | flaumig | + | weiß-rosa | - | weiß | | |
| 2 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | - | pelzig, ringförmig | + | weiß-rosa | - | weiß | | |
| 2 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | - | pelzig, ringförmig | + | weiß-rosa | - | weiß | | |
| 2 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | - | kompakt | + | grau | - | schwarz | | |
| 2 | 8 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | - | pelzig | + | dunkelrot, LM grauweiß | - | - | | |
| 3 | 1 | 59 | 10 | 17 | 0 | 5 | 27 | 28 | 31 | ± | dicht-flaumig | + | weiß-beige gefleckt | - | - | | |
| 3 | 2 | 14 | 0 | 2 | 1 | 9 | 2 | 8 | 6 | ++ | flächig | ± | rosa, später dunkelbraun (z.T. gespunktet) | - | - | | |
| 3 | 3 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 | + | locker flaumig | + | weiß-rosa, orange | - | - | | |
| 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | + | dicht-flaumig | + | weiß-rosa | - | - | | |
| 3 | 5 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | + | dicht-wollig | + | weiß-gelb | - | - | | |
| 4 | 1 | 14 | 8 | 1 | 3 | 1 | 1 | 6 | 8 | + | flaumig | + | weiß | - | - | | |
| 4 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | - | sternartiges Luftmycel | ± | gelblich | - | - | | |
| 4 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | + | flächig | + | weiß | - | gelblich | | |
| Σ | 46 | 699 | 134 | 144 | 136 | 141 | 144 | 356 | 343 | + | leicht wollig | + | weiß | - | grün | | |

v: Wachstums geschwindigkeit, ++ sehr schnell, + schnell, ± mittel (wie Ggt), - langsam, --- sehr langsam. LM: Luftmycel, + vorhanden, ± schwach ausgeprägt, - nicht vorhanden. Für Hauptgruppe 0 sind nur die Untergruppen mit ≥ 10 Vertretern aufgeführt, die restlichen Isolate sind zu Untergruppe 5 zusammengefasst.

4.3.2 Isolierung und Identifizierung bakterieller Antagonisten

Aus den Biokontrollversuchen wurden insgesamt 711 bakterielle Isolate gewonnen. Im Konfrontationstest inhibierten 181 Isolate das Wachstum von *Ggt*, wobei 113 Isolate schwachen (+) und 68 Isolate starken (++) Antagonismus zeigten (Inhibitionsklassen siehe Kap. 3.3.5.1, S. 45). Durch partielle Sequenzierung der 16S rRNA-Gene und anschließenden Datenbankvergleich konnten die Isolate neun verschiedenen Gattungen zugeordnet werden. Die am häufigsten vorkommende Gattung *Bacillus* wurde bis auf Artebene identifiziert (Tab. 4.4, Abb. 4.12).

Bacillus-Spezies, v. a. Vertreter der *B. cereus*-Gruppe, machten mit 61 % den Hauptteil der schwach inhibierenden Bakterien aus. Bei den stark inhibierenden Antagonisten stellten sie sogar 65 % der Isolate, wobei hier *Bacillus subtilis* am stärksten vertreten war. Die zweite große Gruppe von Antagonisten gehörte der Gattung *Pseudomonas* an; ihr wurden 31 % der schwach und 28 % der stark inhibierenden Isolate zugeordnet. In weitaus geringerer Zahl waren zudem die Gattungen *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Variovorax*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* und *Aminobacter* vertreten.

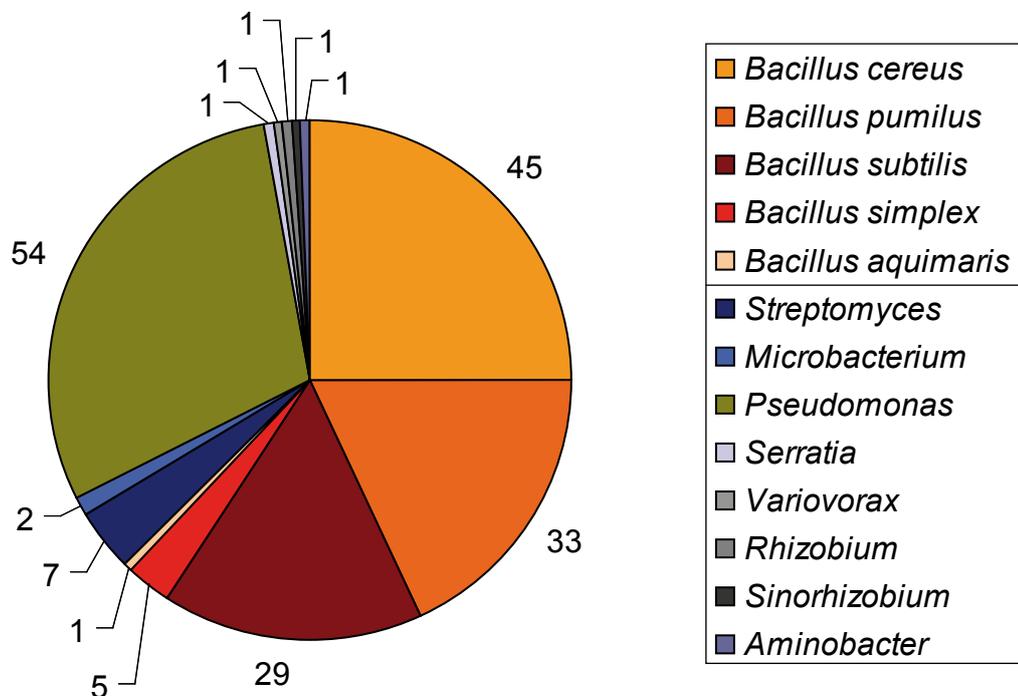


Abbildung 4.12 Phylogenetische Einordnung der 181 antagonistischen (+/++) Bakterien-Isolate. Angegeben ist die Anzahl von Antagonisten, die der jeweiligen Gruppe angehörten.

Tabelle 4.4 Phylogenetische Einordnung der 181 antagonistischen Bakterien-Isolate aufgrund des 16S rRNA-Sequenzvergleichs mittels BLASTN. Klassifikation nach Garrity et al. (2004). Identität: Prozent Übereinstimmung im Alignment mit den NCBI-Datenbanksequenzen.

| Phylogenetische Einordnung | Gram | Klasse | Identität [%] | [%] | Anzahl von Isolaten | | |
|---------------------------------|------|--------------------------|---------------|------|---------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | | | gesamt | schwache Inhibition (+) | starke Inhibition (++) |
| <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe* | pos. | Bacilli | 96 - 99 | 24,9 | 45 | 39 | 6 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | pos. | Bacilli | 97 - 99 | 18,2 | 33 | 16 | 17 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | pos. | Bacilli | 90 - 99 | 16,0 | 29 | 8 | 21 |
| <i>Bacillus simplex</i> | pos. | Bacilli | 98 - 99 | 2,8 | 5 | 5 | 0 |
| <i>Bacillus aquimaris</i> | pos. | Bacilli | 99 | 0,6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> | pos. | Actinobacteria | 92 - 100 | 3,9 | 7 | 5 | 2 |
| <i>Microbacterium</i> | pos. | Actinobacteria | 100 | 1,1 | 2 | 0 | 2 |
| <i>Pseudomonas</i> | neg. | γ -Proteobacteria | 97 - 100 | 29,8 | 54 | 35 | 19 |
| <i>Serratia</i> | neg. | γ -Proteobacteria | 98 | 0,6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Variovorax</i> | neg. | β -Proteobacteria | 99 | 0,6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Rhizobium</i> | neg. | α -Proteobacteria | 91 | 0,6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Sinorhizobium</i> | neg. | α -Proteobacteria | 99 | 0,6 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Aminobacter</i> | neg. | α -Proteobacteria | 99 | 0,6 | 1 | 1 | 0 |
| Σ | | | | | 181 | 113 | 68 |

**Bacillus cereus*-Gruppe: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*

4.4 Identifizierung antagonistisch wirkender, bakterieller Metaboliten

In den Konfrontationstests von Bakterien-Isolaten mit *Ggt* konnten auf Festmedium klare Inhibitionszonen unterschiedlicher Größe beobachtet werden, in denen kein Pilzwachstum mehr auftrat. Dies deutet auf antagonistisch wirkende Metaboliten hin, die von den Bakterien abgegeben werden und durch das Medium diffundieren. Um diese inhibierenden Substanzen zu identifizieren, wurde eine Metabolitanalyse mit einem hochauflösenden FTICR-Massenspektrometer (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) durchgeführt.

4.4.1 *Ggt*-inhibierende Wirkung der Kulturfiltrate

Die antagonistische Aktivität der ausgewählten Isolate war zuvor nur im Konfrontationstest auf Festmedium nachgewiesen worden. Daher musste bestätigt werden, dass der inhibierende Metabolit auch in Flüssigkultur gebildet und ans Medium abgegeben wird. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die Produktion von Sekundärmetaboliten bevorzugt während der stationären Phase des Bakterienwachstums stattfindet (Haas und Keel, 2003; Laville et al., 1992). Außerdem war zu klären, ob die Inhibitoren in Reinkulturen exprimiert werden oder ob eine Induktion durch das Pathogen nötig ist. Daher wurden

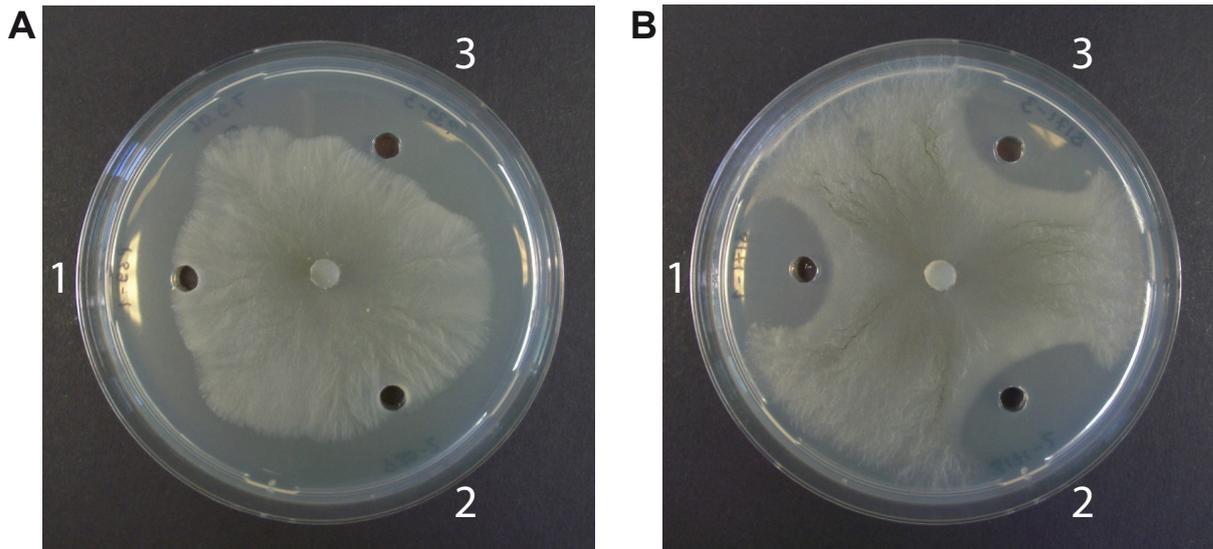


Abbildung 4.13 Konfrontationstest von Filtraten bakterieller Reinkulturen mit *Ggt13*, jeweils drei Replikate (1, 2, 3), 6 d nach Auftragen der Filtrate.

A. *Pseudomonas* sp. P39. Replikate 1 und 2 wuchsen in Flüssigkultur schneller als Replikat 3 und produzierten einen gelben Farbstoff, während Kultur 3 weiß erschien.

B. *Bacillus subtilis* B171.

Aliquots der Kulturfiltrate sowohl von Rein- als auch Dualkulturen (Bakterium/*Ggt*) in Konfrontationstests gegen *Ggt* eingesetzt.

Die Filtrate von reinem Flüssigmedium bzw. von *Ggt13*-Reinkultur zeigten keinerlei Inhibition von *Ggt*. Alle antagonistisch wirkenden Substanzen mussten also von den Bakterien produziert werden. Mit den Filtraten der bakteriellen Reinkulturen wurden deutliche Inhibitionszonen festgestellt, deren Durchmesser nach 4 d Konfrontation durchschnittlich 2 mm (P39) bzw. 5 mm (B171) betrug. Nach 6 d war *Ggt* auf den P39-Platten zwar bei zwei von drei Replikaten bis an die Löcher herangewachsen, insgesamt aber war das Pilzwachstum auf der Testplatte gegenüber dem auf *Ggt*-Vergleichsplatten deutlich verlangsamt (Abb. 4.13 A). Auf den B171-Platten waren die Inhibitionszonen nach 6 d noch durchschnittlich 2 mm groß, zusätzlich bildete *Ggt* ca. 1–2 cm um die Löcher herum keine schwarz pigmentierten Laufhyphen mehr (Abb. 4.13 B).

Entgegen den Erwartungen zeigten die Filtrate der Dualkultur im Falle von P39 eine schwächere Wirkung als das Filtrat der Reinkultur; bei B171 in Dualkultur fehlte eine Wachstumshemmung sogar ganz. Vermutlich hatten die Bakterien, v. a. der langsam wachsende Stamm B171, nach 2 d Inkubation zusammen mit *Ggt13* noch nicht die stationäre Wachstumsphase erreicht. Daher wurden noch keine Sekundärmetaboliten (B171) bzw. weniger als in den Reinkulturen (P39) produziert. Für die vorliegende Metabolitanalyse wurde im Weiteren auf Dualkulturen verzichtet, da die inhibierende Substanz bereits in Reinkultur in großer Menge produziert wurde.

4.4.2 Ergebnisse der FTICR-MS Analyse

4.4.2.1 Gesamtextrakt

Die FTICR-Massenspektren der Gesamtextrakte zeigten mehr als 8500 Peaks (Abb. 4.14). Es war zunächst zu klären, welcher oder welche dieser Peaks inhibierenden Substanzen zugeordnet werden konnten. Für *Pseudomonas* P39 wurden in erster Linie die Moleküle 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG, MW = 210) und Phenazin (MW = 220) erwartet. Zahlreiche Studien führen das TAD-Phänomen auf Pseudomonaden zurück, die diese Substanzen produzieren (z. B. De Souza et al., 2003b; Landa et al., 2006; Thomashow und Weller, 1988; Weller et al., 2007). Eine erste qualitative Auswertung der P39-Spektren ergab jedoch, dass diese Moleküle im analysierten Extrakt nicht vorhanden waren.

Auffällig waren indessen Peaks sehr hoher Intensität bei m/z 1407,8 (P39) und m/z 1034,7 (B171) bei negativer Ionisierung. Nach Berechnung der Summenformeln konnten diese Peaks für beide Isolate Molekülen aus der Stoffgruppe der zyklischen Lipopeptide (CLP) zugeordnet werden, nämlich Tensin und Surfactin, deren Produktion in biokontrollaktiven Organismen in der Literatur beschrieben ist (z. B. Nielsen et al., 2002; Bonmatin et al., 2003). Beide Substanzen waren somit geeignete Kandidaten für die gesuchten Metaboliten im jeweiligen Stamm. Im folgenden Schritt wurden daher alle Moleküle > 1 kD per Größenfraktionierung aus dem Gesamtextrakt abgetrennt und auf ihre antagonistische Aktivität überprüft.

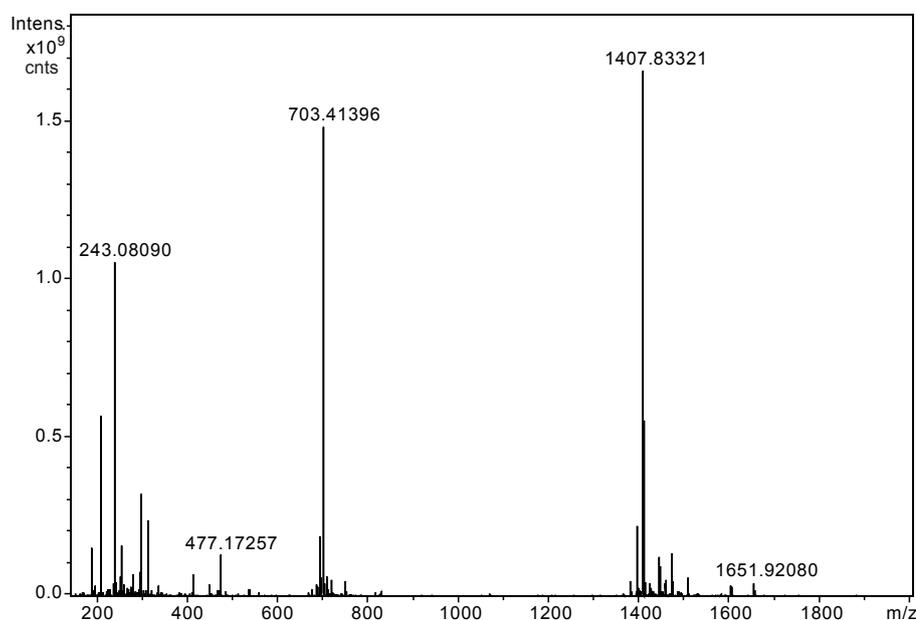


Abbildung 4.14 Gesamt-Massenspektrum (negative ESI) des Kulturfiltrats von *Pseudomonas* P39 mit mehr als 8500 Peaks. Der auffällige Peak bei m/z 1407,83321 konnte dem zyklischen Lipopeptid Tensin zugeordnet werden; bei dem Peak bei m/z 703,41396 handelt sich um das gleiche, allerdings doppelt geladene Molekül.

4.4.2 Fraktionierung nach Molekulargewicht

Die Auftrennung des Kulturfiltrats in zwei Fraktionen (< 1 kD und > 1 kD) und der Test dieser Fraktionen auf antagonistische Aktivität bestärkte die Zuordnung der gesuchten Substanzen zu den zyklischen Lipopeptiden. Weder bei P39 noch bei B171 vermochte die Fraktion < 1 kD das Pilzwachstum zu hemmen, während die Fraktion > 1 kD im Konfrontationstest die gleiche Wirkung zeigte wie der Gesamtextrakt (Abb. 4.15). Der inhibierende Metabolit musste also ein größeres MW als 1 kD haben, und kleinere Moleküle wie DAPG und Phenazin konnten als Inhibitoren definitiv ausgeschlossen werden. Die FTICR-Massenspektren der Fraktionen (Abb. 4.15) bestätigten, dass die Abtrennung von Massen > 1 kD nahezu vollständig verlaufen war. Oberhalb m/z 1000 wurden in der Fraktion < 1 kD, wenn überhaupt, nur noch Signale äußerst geringer Intensität detektiert. Alle Moleküle mit einem MW > 1 kD waren tatsächlich nur noch in der Fraktion > 1 kD vorhanden, darunter die putativen CLP-Peaks. Für den Peak m/z 1407,83321 bei P39 wurde die größte Intensität in Replikat 3 gemessen, welches auf Platte am stärksten inhibierte. Moleküle < 1 kD waren in beiden Fraktionen enthalten (nicht dargestellt), allerdings zeigte der Konfrontationstest zweifelsfrei, dass diese nicht für die Inhibition verantwortlich sein konnten.

4.4.3 Identifizierung der inhibierenden Metaboliten als zyklische Lipopeptide

Bei P39 lagen die Peaks im relevanten Massenbereich der inhibierenden Fraktion bei negativer ESI bei m/z 1407,83321 bzw. m/z 1393,81704 (Abb. 4.16). Die errechneten Summenformeln dieser Peaks waren $C_{67}H_{116}N_{12}O_{20}$ bzw. $C_{66}H_{114}N_{12}O_{20}$, das entspricht den CLPs Tensin und Amphisin, die beide von *Pseudomonas* produziert werden (Raaijmakers et al., 2006). Beide bestehen aus einem 3-Hydroxydecanoyl-Fettsäurerest und einem Undecapeptidylrest, der zwischen den Aminosäuren 3 und 11 zu einem Lactonring geschlossen ist. Sie unterscheiden sich allein in AS 11, die bei Tensin Glutaminsäure ist und bei Amphisin Asparaginsäure (Tab. 4.5). Glu hat eine Methylengruppe (CH_2 , MW = 14) mehr als Asp, was sich im Abstand der beiden Peaks widerspiegelt (Abb. 4.16).

Der höchste Peak im Massenspektrum von B171 (m/z 1034,67626) hatte die Summenformel $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$, die mit der Summenformel des CLPs Surfactin übereinstimmt (Abb. 4.17). Surfactin besteht aus einem Heptapeptid und einer β -Hydroxy-Fettsäure mit einer variablen Kettenlänge von 13–15 Kohlenstoffatomen (Tab. 4.5). Es ist bekannt, dass Surfactine als Gemisch von Komponenten produziert werden, die sich jeweils in der Länge der Fettsäurekette oder der Peptidstruktur unterscheiden (Baumgart et al., 1991; Oka

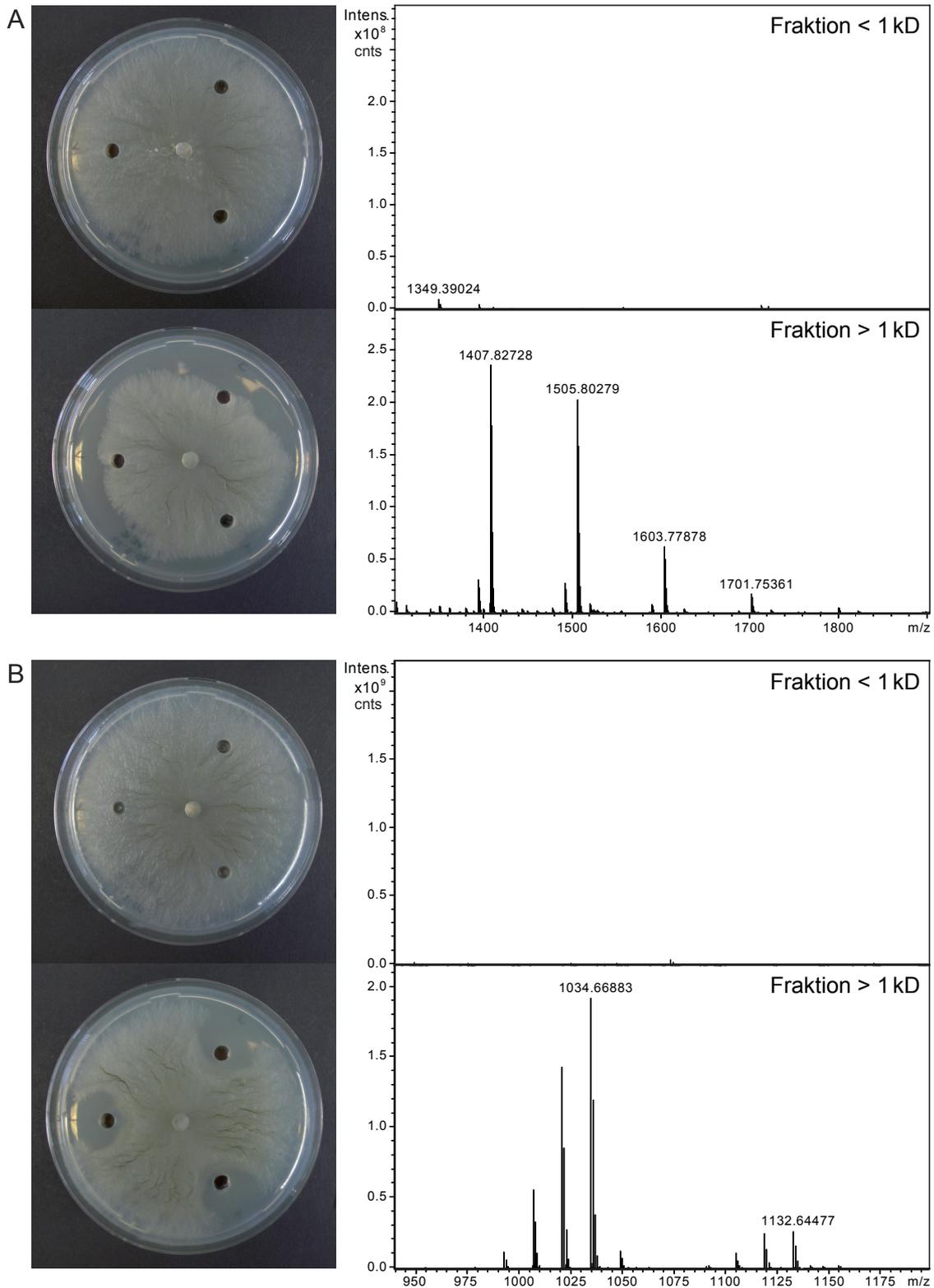


Abbildung 4.15 Größenfraktionierung der Kulturfiltrate. Links Konfrontationstest-Platten 6 d nach Auftragen der Fraktionen, je drei Replikate. Rechts Ausschnitt aus dem Massenspektrum der jeweiligen Fraktion im relevanten CLP-Massenbereich, negative ESI. Bei den bezeichneten Peaks der Fraktion > 1 kD handelt es sich jeweils um das gleiche CLP-Molekül, der Abstand von 98 Da entsteht durch Phosphorsäure-Addukte (Chowdhury et al., 1990).

A. *Pseudomonas* sp. P39.

B. *Bacillus subtilis* B171.

Tabelle 4.5 Eigenschaften der detektierten zyklischen Lipopeptide. *a*Thr: *allo*-Threonin. FS: Fettsäure.

| Isolat | CLP | Summenformel | MW | Peptidrest | FS-Rest | Ref. |
|-------------|-----------|--|---------|---|--------------------|---------|
| P39 | Tensin | C ₆₇ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₂₀ | 1408,84 | D-Leu-D-Asp-D- <i>a</i> Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Glu | C ₁₀ OH | [1] [2] |
| | Amphisin | C ₆₆ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₂₀ | 1394,82 | D-Leu-D-Asp-D- <i>a</i> Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp | C ₁₀ OH | [3] [4] |
| B171 | Surfactin | C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃ | 1035,68 | L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu | C ₁₅ OH | [5] [6] |

[1] Henriksen et al. (2000); [2] Nielsen et al. (2000); [3] Sørensen et al. (2001); [4] Raaijmakers et al. (2006); [5] Bonmatin et al. (1994); [6] Bonmatin et al. (2003).

et al., 1993). So etwa kann Aminosäure 7 bei Surfactin statt Leucin auch Valin (eine CH₂-Gruppe weniger) oder Isoleucin sein (Peypoux et al., 1994; Vater et al., 2002). Aus diesem Grund finden sich im Massenspektrum benachbarte Peaks, die sich jeweils um m/z 14, der Masse einer Methylengruppe, vom Hauptpeak unterscheiden (Abb. 4.17).

CLPs sind durch den hydrophoben Fettsäurerest und den polaren Peptidrest amphiphil, also sowohl hydrophil als auch hydrophob. Das macht sie zu Biosurfactants, oberflächenaktiven Stoffen oder Tensiden, die die Lipidmembran der Zielzelle zerstören und so antagonistisch wirken können (Bonmatin et al., 2003).

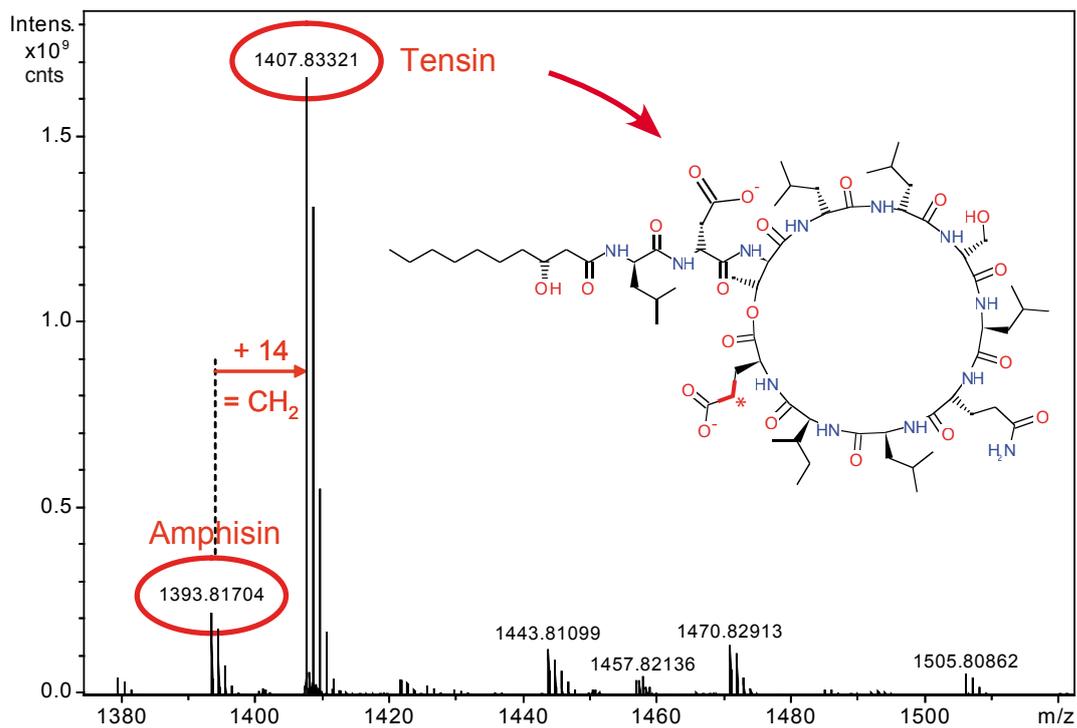


Abbildung 4.16 Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Kulturfiltrats von *Pseudomonas* P39, negative ESI. Der auffällige Peak bei m/z 1407,83321 konnte dem CLP Tensin zugeordnet werden, bei dem Peak bei m/z 1393,81704 handelt es sich um Amphisin. Strukturformel von Tensin nach Sørensen (2002). Amphisin hat Asp statt Glu als elfte Aminosäure (Stern) und besitzt damit eine CH₂-Gruppe weniger.

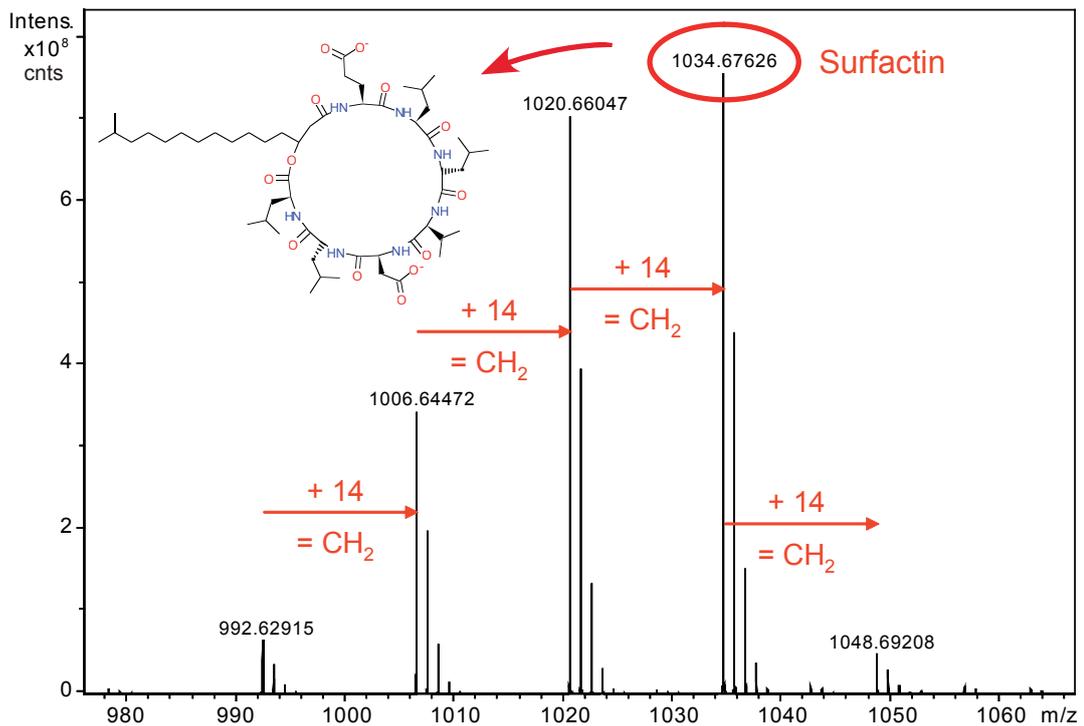


Abbildung 4.17 Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Kulturfiltrats von *Bacillus subtilis* B171, negative ESI. Der Peak bei m/z 1034,67626 entspricht dem CLP Surfactin (abgebildete Strukturformel). Weitere Peaks im Abstand von m/z 14 treten auf, weil Surfactin als Gemisch von Komponenten produziert wird, die sich in der Länge der Fettsäurekette oder der Peptidstruktur um jeweils eine Methylengruppe unterscheiden.

4.4.4 Bestätigung der zyklischen Lipopeptidstruktur

Die CLP-Struktur der inhibierenden Metaboliten konnte durch eine alkalische Behandlung des Kulturextrakts bestätigt werden, die zur Hydrolyse der Lactonbindung führt (Williams et al., 2002). Durch die Inkubation mit NaOH kommt es zu einer Ringöffnung des Lactonrests und Addition eines H₂O-Moleküls (MW = 18), die im Massenspektrum als Verschiebung des Peaks gegenüber dem Peak der nicht hydrolysierten Probe zu sehen ist (Abb. 4.18).

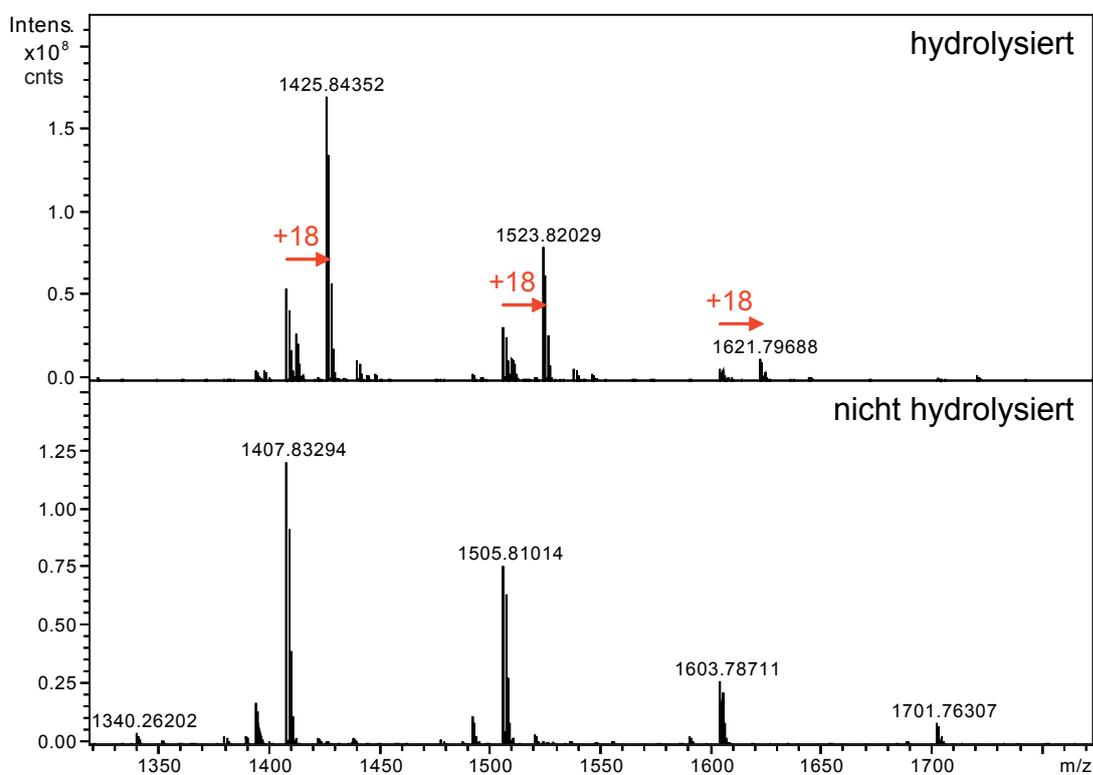


Abbildung 4.18 Ausschnitt aus dem Massenspektrum des hydrolysierten (oben) bzw. nicht hydrolysierten (unten) Kulturextrakts von *Pseudomonas* P39, negative ESI. Die hydrolysierten Peaks sind um jeweils +18 Da verschoben, was der Masse eines H₂O-Moleküls entspricht.

4.5 Bakterielle Diversität während der Entwicklung eines TAD-Stadiums

Wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt, konnten im Gewächshausversuch verschiedene Entwicklungsphasen eines suppressiven Stadiums im Boden bis hin zum stabilen TAD beobachtet werden. Mittels molekularbiologischer tRFLP-Fingerprints sollte nun untersucht werden, wie sich die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft während dieser Phasen verändert und von welchen Faktoren diese Veränderungen beeinflusst werden. So könnte zum einen der erhöhte Pathogendruck, der durch künstliche Inokulation in einem Teil der Proben erzeugt wurde, eine unterschiedliche Entwicklung der Populationen bewirken. Zusätzlich war innerhalb der Behandlungen eine zeitliche Dynamik durch die strikte Monokultur zu erwarten. Zur Erfassung der aktiven Bodenbakterien wurde die Analyse auf Transkript-Ebene mit Primern für die 16S rRNA Gensequenzen durchgeführt.

4.5.1 Auswahl eines Restriktionsenzym

Geeignete Restriktionsenzyme wurden mit Hilfe von *in silico* tRFLPs mit dem Programm „TAP T-RFLP“ des Ribosomal Database Project II ausgewählt (Marsh et al., 2000, <http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html>). Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass sich für die aus den Biokontrollversuchen isolierten Bakteriengattungen bzw. -arten (Kap. 4.3.2) eine ausreichende Auftrennung ergab und die terminalen Restriktionsfragmente (tRFs) im Bereich des verwendeten Größenstandards lagen. Gute Werte wurden etwa mit einem Einzelverdau mit *MspI* erzielt.

Um die *in silico* Vorhersagen zu überprüfen, wurden tRFLP-Profile für DNA aus bakteriellen Reinkulturen erstellt. Mit *MspI* ergab sich eine sehr gute Auftrennung und Verteilung der Peaks über den gesamten durch den Standard abgedeckten Bereich (Abb. 4.19). Die tRFs für *B. cereus* und *B. subtilis* unterschieden sich zwar nur um 3 nt, allerdings war das für die meisten der *in silico* getesteten Restriktionsenzyme der Fall. Da das Auflösungsvermögen von tRFLP-Fingerprints unter 1 nt liegt (Marsh, 2005), war die Differenz aber durchaus akzeptabel.

In Tabelle 4.6 sind neben den detektierten tRFs auch die *in silico* vorhergesagten Fragmentgrößen aufgeführt. Für die meisten der getesteten Spezies kamen laut RDP-II mehrere verschieden große Fragmente in Frage. Erst durch die *in vitro* Analyse konnte die für das jeweilige Isolat zutreffende Größe ermittelt werden.

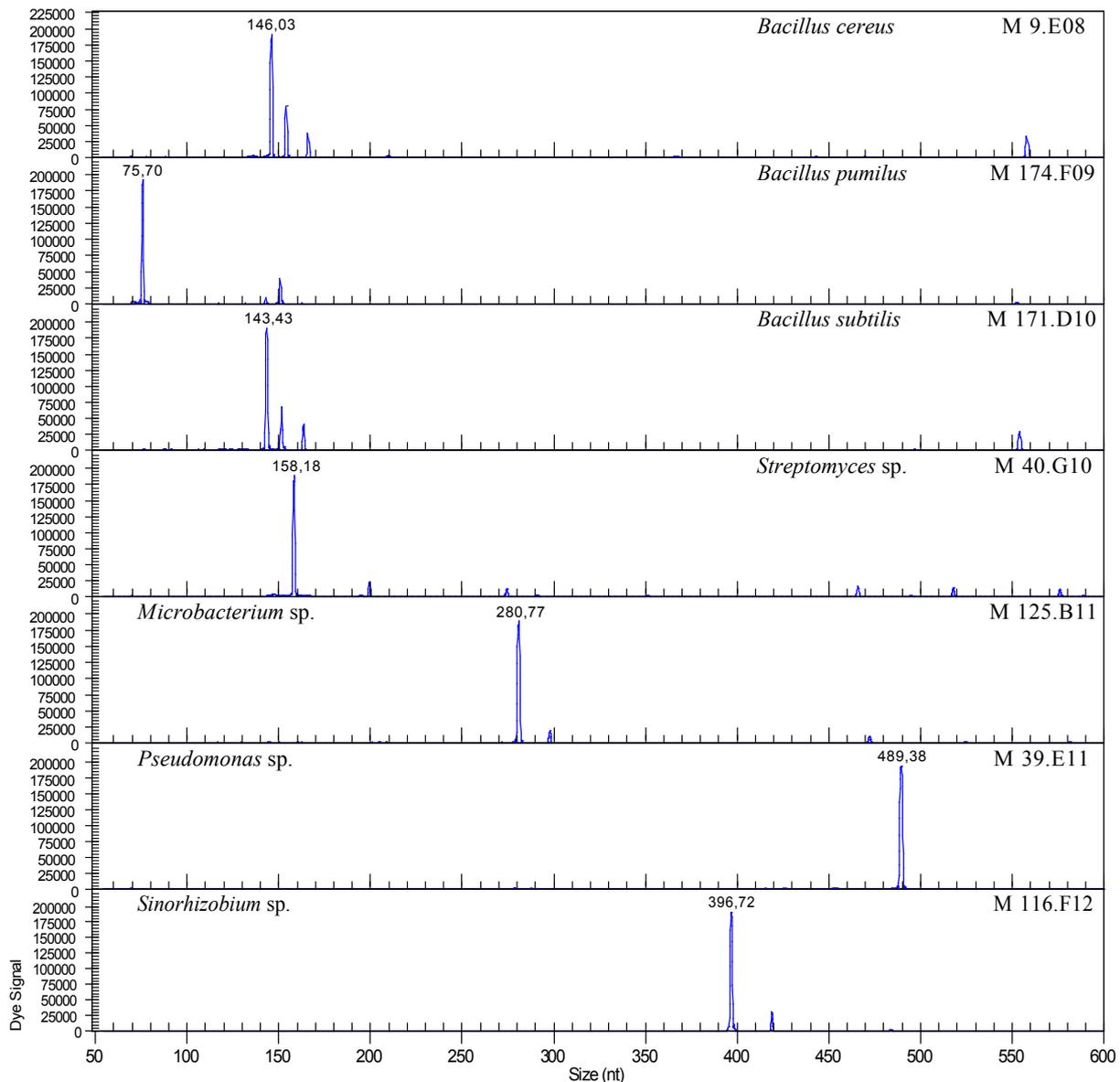


Abbildung 4.19 Terminale Restriktionsfragmente (tRFs) für Reinkulturen einiger bakterieller Isolate aus den Biokontrollversuchen. Restriktionsverdau mit *MspI*.

4.5.2 Aufbereitung der Rhizosphärenproben für die tRFLP-Analyse

Die aus dem Gewächshausversuch stammenden R+R-Proben (Rhizosphäre+Rhizoplane) bestanden aus einem Gemisch aus gesiebttem Rhizosphärenboden und der gesamten, in kleine Stücke geschnittenen Wurzel. In einem Vorversuch wurden tRFLP-Profile von unbehandelten R+R-Proben erstellt und mit Profilen der gleichen, aber unter flüssigem Stickstoff gemörserten Proben verglichen. Die tRFLP-Profile für die Replikate der unbehandelten Proben waren relativ heterogen, während sich für die homogenisierten Proben eine sehr gute Reproduzierbarkeit ergab (Abb. 4.20). Für alle weiteren Analysen wurden die R+R-Proben daher vor der Extraktion gemörsert.

Tabelle 4.6 Theoretische und beobachtete Fragmentlängen bei der tRFLP-Analyse bakterieller Reinkulturen mit *MspI*. Analysiert wurden Vertreter der häufigsten Isolate aus den Biokontrollversuchen. Zudem ist die relative Abundanz der Fragmente in den tRFLP-Profilen der R+R-Proben angegeben.

| Phylogenetische Einordnung | Klasse | Anteil an Isolaten [%] | Name der getesteten Isolate | Fragmentgröße nach Verdau mit <i>MspI</i> [bp] | | mittlere rel. Peakhöhe* des Fragments [%] |
|----------------------------|------------|------------------------|-----------------------------|--|------------|---|
| | | | | theoretisch (RDP-II) | detektiert | |
| <i>Bacillus cereus</i> | Bacilli | 24,9 | 9, 87 | 147 | 146 | 0,709 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Bacilli | 18,2 | 3, 174 | 81 | 76 | 0,406 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Bacilli | 16,0 | 159, 171 | 143-5 | 143 | 0,136 |
| <i>Streptomyces sp.</i> | Actinob. | 3,9 | 40 | 67, 158/9, 161 | 158 | 7,788 |
| <i>Microbacterium sp.</i> | Actinob. | 1,1 | 125 | 145, 161/3/6/9, 172, 279, 280/1, 478 | 281 | 0,084 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | γ-Proteob. | 29,8 | 39, 54, 117 | 489-93 | 489 | 1,751 |
| <i>Sinorhizobium sp.</i> | α-Proteob. | 0,6 | 116 | 400/1 | 397 | 0,073 |

* Mittelwerte der relativen Peakhöhen in den tRFLP-Profilen der Rhizosphärenproben (GH1-5) für die in den Isolaten detektierten tRFs.

4.5.3 tRFLP-Profile

Es wurden tRFLP-Fingerprints für die ersten fünf Vegetationszyklen des Gewächshausversuchs (im Folgenden abgekürzt als GH1–5) erstellt. Pro Zyklus wurden vier *Ggt*-inokulierte und vier nicht inokulierte R+R-Proben (je drei Replikate) analysiert. Im Gesamt-Datensatz der tRFLP-Profile konnten insgesamt 184 individuelle tRFs identifiziert werden, von denen 102 in allen 40 Proben detektiert wurden. 50 tRFs waren in mindestens 30 Proben vorhanden. Die 32 tRFs, die in weniger als 30 Proben nachgewiesen wurden, lagen bis auf eine Ausnahme unter dem Schwellenwert von 0,25 % relativer Peakhöhe. Daher war die Erstellung einer 0/1-Matrix nicht sinnvoll, zur Auswertung wurden stattdessen die Peakhöhen herangezogen. Die aufsummierte Signalintensität pro Probe lag zwischen 145.934 und 2.572.746, mit einem Variationskoeffizienten von 34 % (CV = Standardabweichung ÷ Mittelwert; McCune et al., 2002). Um eine bessere Vergleichbarkeit der Peakhöhen zwischen den Profilen zu erreichen, wurden die Werte daher in relative Peakhöhen umgerechnet. Abbildung 4.21 zeigt ein tRFLP-Chromatogramm mit der für alle Proben charakteristischen Verteilung der Fragmentlängen. Jedes Fragment repräsentiert eine Gruppe von Spezies mit ähnlichen 16S rRNA-Sequenzen; die Peakhöhe zeigt die relative Abundanz der Gruppe unter den verwendeten PCR-Bedingungen an.

Wie oben (Kap. 4.5.1) erläutert, ist es schwierig, einzelnen tRFs über Datenbanken bestimmte Spezies zuzuordnen. Durch die tRFLP-Analyse von Reinkulturen waren aber die Fragmentgrößen von einigen bakteriellen Isolaten aus den am häufigsten isolierten Gattungen bekannt. Die meisten dieser tRFs, etwa die der *Bacillus*-Arten (die immerhin zwei Drittel der Isolate stellten), kamen in den Profilen der Rhizosphärenproben nur mit

4 Ergebnisse

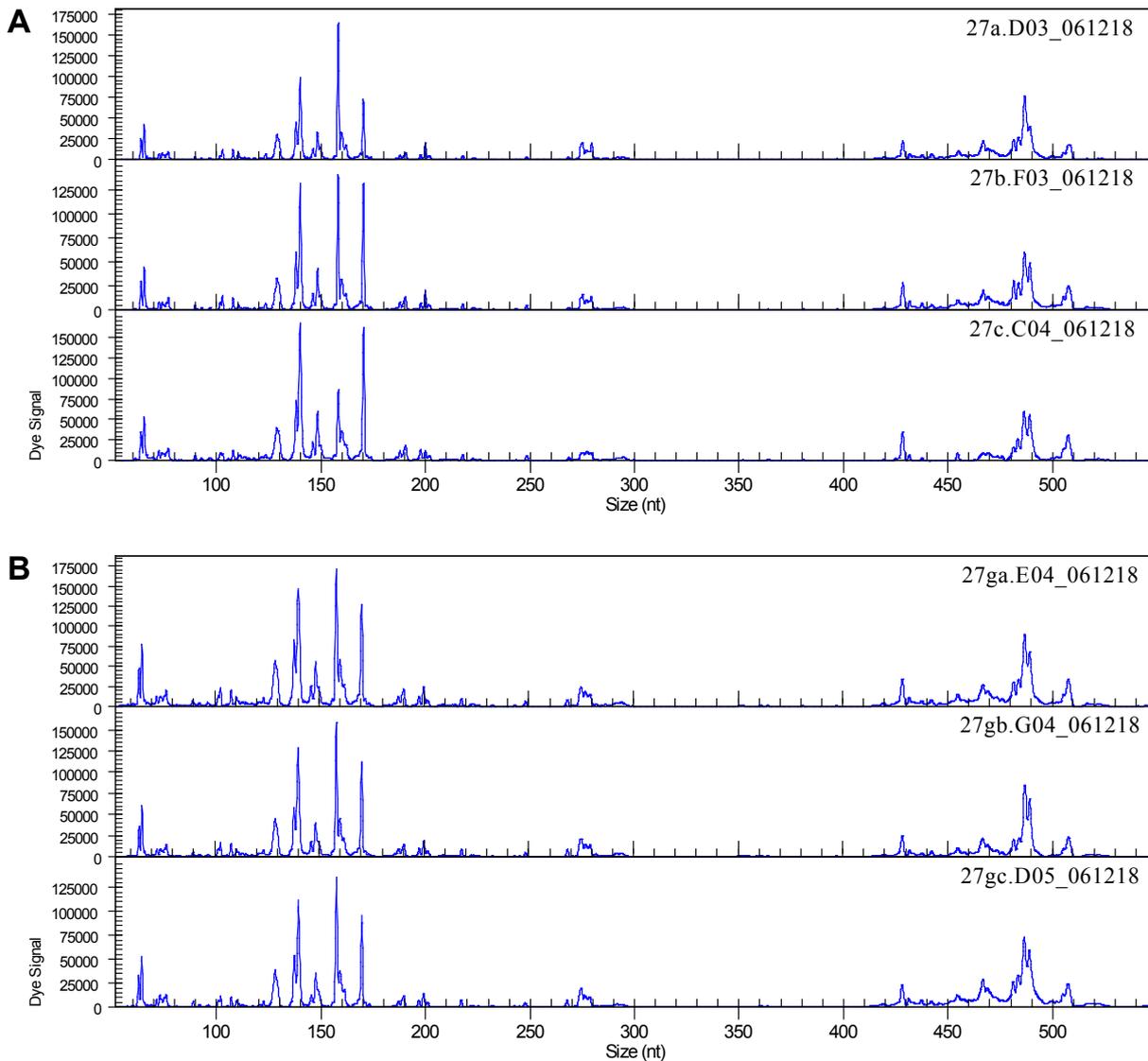


Abbildung 4.20 Reproduzierbarkeit der tRFLP-Profile nach unterschiedlicher Aufarbeitung einer Rhizosphärenprobe aus dem Gewächshausversuch (GH1.3, Röhre K27).

A. tRFLP-Profile für drei Replikate, die vor dem Homogenisieren der R+R-Probe entnommen wurden. Die Abundanzen der detektierten tRFs unterschieden sich v. a. im Bereich zwischen 100 und 200 nt deutlich.

B. tRFLP-Profile für drei Replikate der homogenisierten R+R-Probe. Sie zeigten im gesamten Bereich eine sehr gute Übereinstimmung.

geringer Abundanz vor (Tab. 4.6). Das dem *Pseudomonas*-tRF entsprechende Fragment (489 bp) dagegen hatte mit durchschnittlich 1,75 % die insgesamt zwölft höchste relative Peakhöhe, und das *Streptomyces*-tRF (158 bp) mit 7,79 % sogar die dritthöchste relative Peakhöhe. Jedes individuelle tRF einer komplexen Rhizosphärenprobe kann mehrere Spezies beinhalten; welcher Anteil der tRFs 158 und 489 tatsächlich auf *Streptomyces* bzw. *Pseudomonas* zurückging, war also unbestimmt. Nichtsdestotrotz erschien es interessant, die Abundanz dieser beiden Fragmente in den einzelnen Vegetationszyklen zu betrachten (Abb. 4.22). Erstaunlicherweise waren die Peakhöhen beider Fragmente in GH3, dem

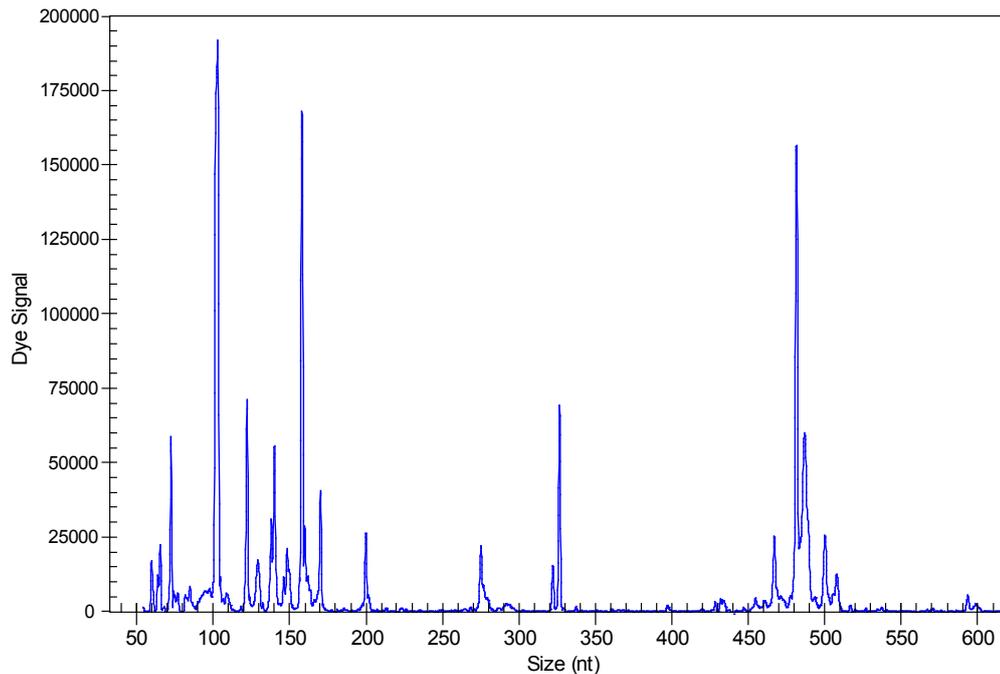


Abbildung 4.21 Charakteristisches tRFLP-Profil der Rhizosphärenproben aus dem Gewächshausversuch (hier: Probe aus GH5, Röhre G8). Die individuellen tRFs traten in drei Gruppen in den Bereichen 50–200 nt, 270–330 nt und 430–520 nt auf. Die höchsten Intensitäten einzelner Fragmente wurden zumeist in der ersten Gruppe gemessen.

Zyklus mit den höchsten Befallszahlen, deutlich reduziert. Besonders im *Ggt*-inokulierten System stieg die Abundanz des *Streptomyces*-Fragmentes im darauf folgenden Zyklus 4 wieder signifikant an, was mit dem Einsetzen des Take-all Decline zusammentraf. Die Abundanz des *Pseudomonas*-Fragments nahm in GH4 ebenfalls zu, erreichte aber nicht mehr das Ausgangsniveau von GH1.

4.5.4 Statistische Auswertung der tRFLP-Profile

Der multivariate tRFLP-Datensatz wurde mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) ausgewertet, um das Ausmaß der Unterschiede zwischen den Proben und eventuell vorhandene Gruppierungen zu veranschaulichen. Diese Methode der indirekten Gradientenanalyse positioniert die Proben nach der Kovarianz der Variablen, wobei die größte Varianz von den ersten paar Achsen, den „Hauptkomponenten“, erklärt wird (McCune et al., 2002). Die PCA setzt eine lineare Verteilung der Daten voraus; von einer solchen ist dann auszugehen, wenn eine DCA (Detrended Correspondence Analysis) des Datensatzes eine Gradientenlänge < 3 errechnet (Lepš und Šmilauer, 2003). Die DCA für den Gesamtdatensatz ergab eine Gradientenlänge von 1,528 und bestätigte die lineare Verteilung der Variablen. Zunächst wurden getrennte PCA-Analysen für das *Ggt*-inokulierte und das nicht inokulierte System durchgeführt. Das Ordinationsdiagramm zeigte eine signifikante Gruppierung

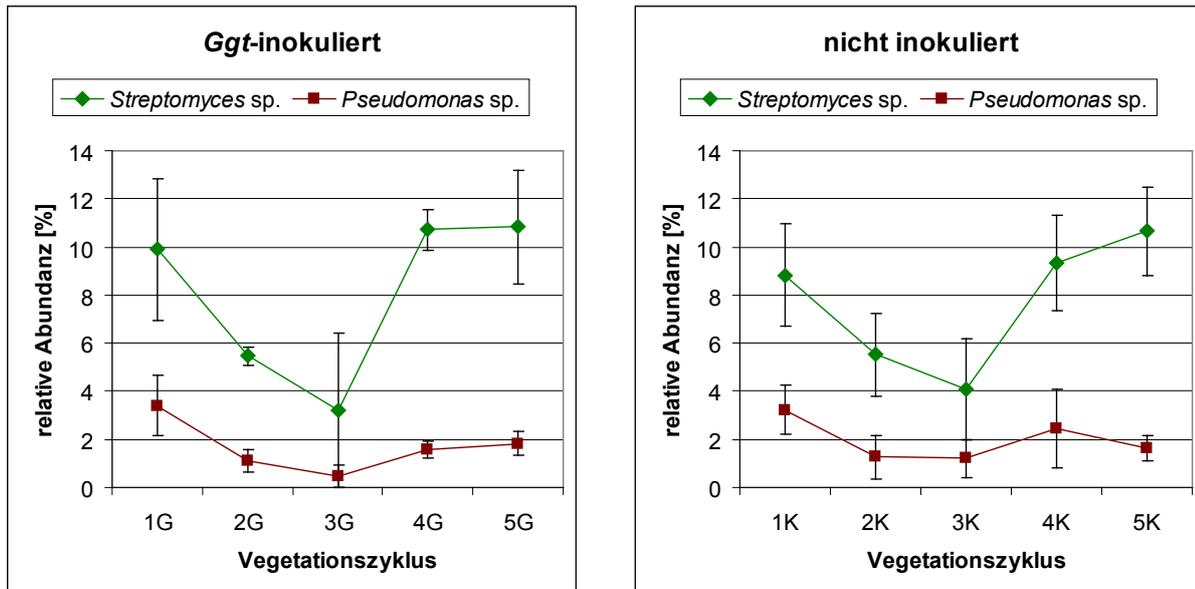


Abbildung 4.22 Relative Abundanz der Fragmentgrößen 158 bp und 489 bp, die den tRFs von *Streptomyces* (Isolat 40) und *Pseudomonas* (Isolate 39, 54, 117) entsprechen, in den tRFLP-Profilen der Rhizosphärenproben (Vegetationszyklen 1–5 des Gewächshausversuchs). Mittelwerte für je vier Wiederholungen.

der *Ggt*-inokulierten Proben nach Vegetationszyklen (Abb. 4.23 A).

Außerdem gab es einen deutlichen Populationsshift von GH1, dessen Vertreter sich am äußersten Rand des Ordinationsplots gruppierten, über GH2 nach GH3 am gegenüber liegenden Rand. Der Shift setzte sich fort über GH4 nach GH5 am unteren Rand des Diagramms, so dass die Gruppen GH1, GH3 und GH5 ein nahezu gleichseitiges Dreieck bildeten. Der insgesamt größte Populationsshift war von GH1 nach GH2 zu beobachten. Allein die erste Hauptkomponente erklärte 69,6 % der Varianz im *Ggt*-inokulierten System, weitere 15,8 % wurden von der zweiten Achse erklärt. Der Wurzelbefall, der in GH3 maximal war (Abb. 4.6, S. 71), folgte stark der ersten Achse. Das weist darauf hin, dass er deutlichen Einfluss auf die Verteilung hatte. Die Parameter Spross-Trockengewicht und Sprosslänge (Abb. 4.5, S. 70) folgten ebenfalls der ersten Achse. Allerdings zeigten sie in die entgegengesetzte Richtung, da sie umgekehrt proportional zu den Befallszahlen waren. Im Ordinationsplot für den nicht inokulierten Boden (Abb. 4.23 B) war eine Gruppierung nach Vegetationszyklus nur noch für GH1 und GH5 zu erkennen. Die Proben aus GH4 bildeten eine Gruppe mit jeweils zwei Proben aus GH2 und GH3, während die restlichen GH2- und GH3-Proben eine eigene Gruppe bildeten. Die Befallswerte folgten hier eher der zweiten Achse, die jedoch mit 17,3 % nur einen geringen Teil der Varianz erklärte (gegenüber den 65,8 % der ersten Achse). In diesem System hatte der Befall demnach wenig Einfluss, was aufgrund der niedrigen und relativ konstanten Befallswerte (Abb. 4.6) auch schlüssig erschien. Es impliziert allerdings, dass eben nicht die Infektionsstärke der

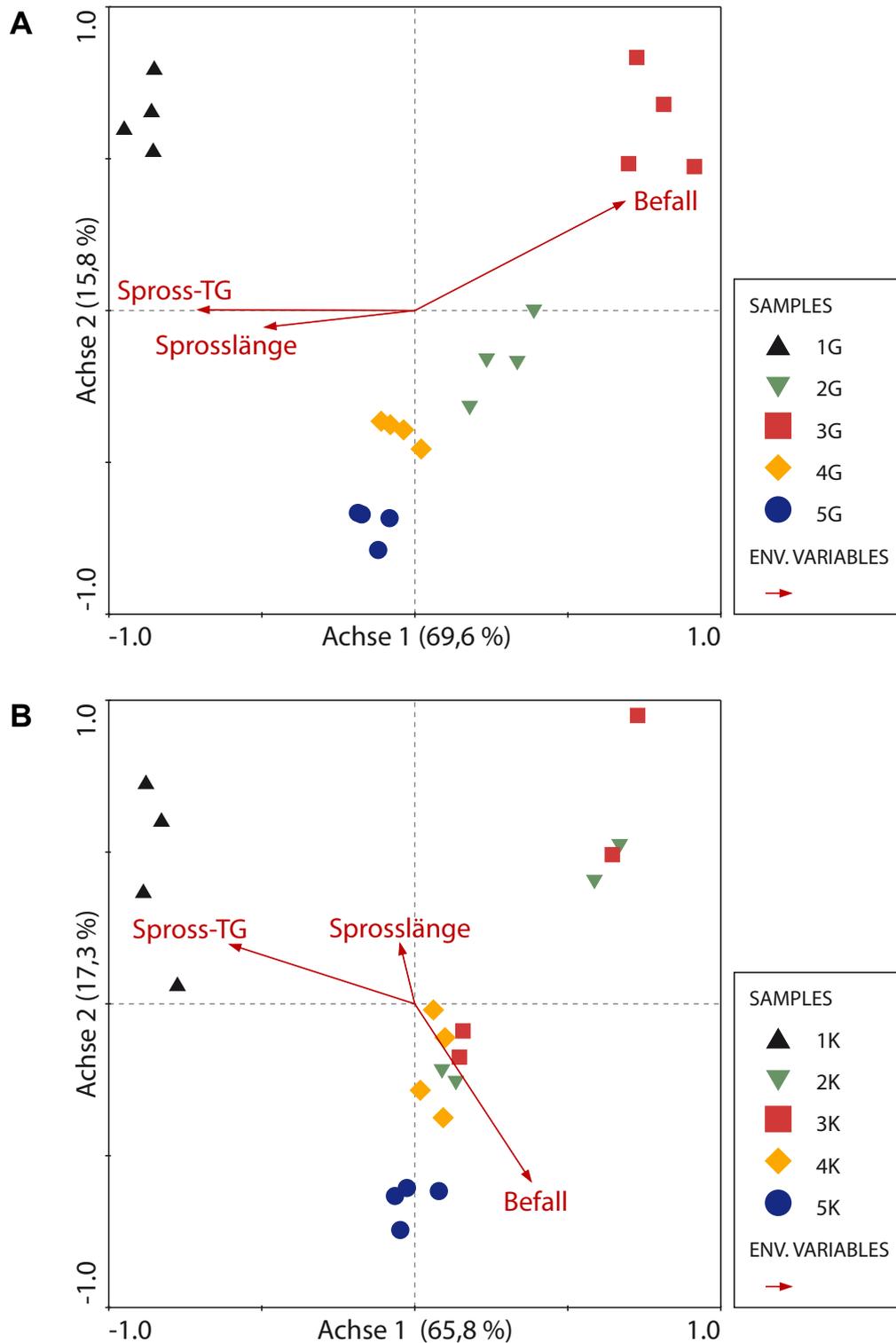


Abbildung 4.23 Hauptkomponentenanalyse des tRFLP-Datensatzes. Mittelwerte für drei Replikate pro Probe. In Klammern ist der Anteil der Varianz angegeben, der durch die jeweilige Ordinationsachse erklärt wird. Die Symbole entsprechen den Vegetationszyklen 1–5 des Gewächshausversuchs. Die Umweltparameter Befall, Spross-Trockengewicht und Sprosslänge sind als Vektoren dargestellt, die die Richtung der maximalen Änderung des Parameters angeben. Die Vektorlänge zeigt die Stärke der Korrelation mit den Achsen an.

A. Ggt-inokulierter Boden.

B. Nicht inokulierter Boden.

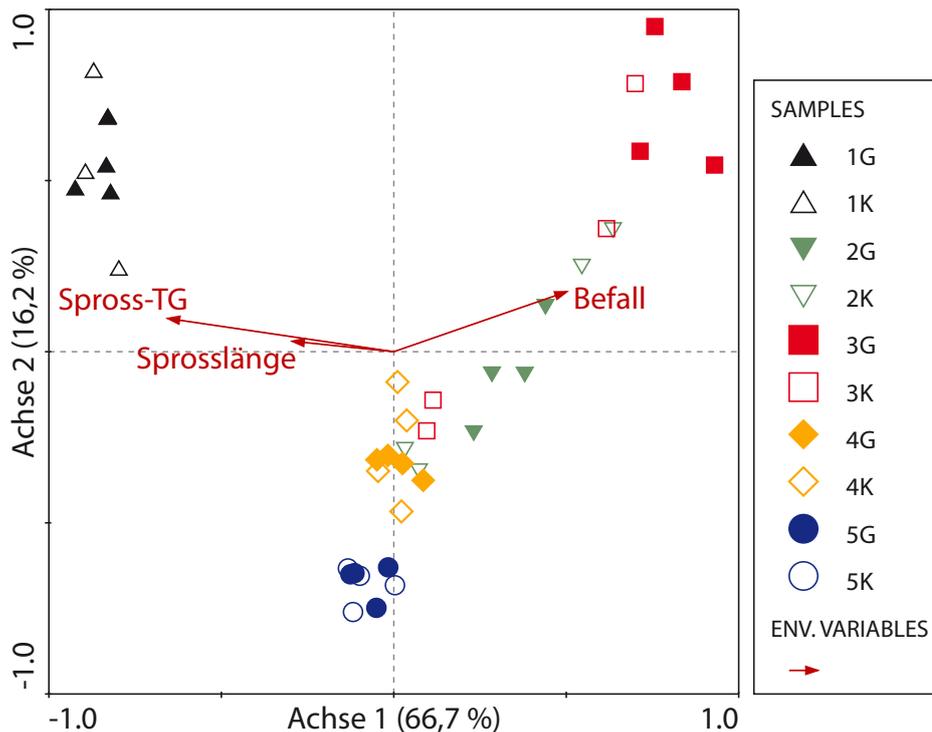


Abbildung 4.24 Hauptkomponentenanalyse des gesamten tRFLP-Datensatzes für die Vegetationszyklen 1–5 des Gewächshausversuchs. Gefüllte Symbole: *Ggt*-inokulierte Proben (G); Offene Symbole: nicht inokulierte Proben (K).

Hauptgrund für den Populationsshift sein konnte, sondern dass in erster Linie ein anderer Faktor für die Gruppierung der Proben verantwortlich sein musste.

Die PCA des Gesamtdatensatzes verdeutlichte dies (Abb. 4.24). Sie bestätigte, dass es für alle Proben eine ähnliche Tendenz gab, nämlich eine Veränderung der Populationszusammensetzung im Laufe der aufeinander folgenden Vegetationszyklen. Es erfolgte jedoch keine Aufspaltung nach inokulierten und nicht inokulierten Proben. Die Befallszahlen folgten wieder der ersten Achse (die 66,7 % der Varianz erklärte), die Korrelation (veranschaulicht durch die Länge des Vektors) war aber schwächer als in Abbildung 4.23 A.

Die Varianzanalyse wurde mittels PerMANOVA für ein zweifaktorielles Versuchsdesign mit der Nullhypothese „kein Einfluss der Faktoren“ durchgeführt (Signifikanzniveau 0,05). Demnach gab es weder eine Interaktion von Vegetationszyklus und Inokulierung, noch hatte die Inokulierung einen signifikanten Einfluss auf die Verteilung (Tab. 4.7). Der Faktor Vegetationszyklus dagegen war mit einem p-Wert von 0,0002 hochsignifikant. In *a posteriori* Tests wurden die einzelnen Vegetationszyklen zusätzlich paarweise verglichen (Tab. 4.7). Sowohl im *Ggt*-inokulierten Boden als auch im Gesamtsystem unterschieden sich demnach alle Vegetationszyklen signifikant untereinander, wobei GH2 versus GH3 mit $p = 0,0482$ in letzterem nur knapp unter dem Signifikanzniveau lag. Im nicht inokulierten Boden dagegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen GH2, GH3 und

Tabelle 4.7 PerMANOVA für 40 tRFLP-Profile von *Ggt*-inokulierten und nicht inokulierten Proben aus GH1–5, basierend auf dem euklidischen Distanzmaß. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit 4999 Permutationen der gegebenen permutablen Einheiten pro Term oder mit 4999 Monte Carlo Samples aus der asymptotischen Permutationsverteilung (*kursiv* angegeben), falls es zu wenige mögliche Permutationen (hier: 35) gab.

| Faktor | <i>df</i> | SS | MS | <i>F</i> | <i>P</i> |
|----------------------------------|------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|
| Vegetationszyklus | 4 | 406,5042 | 101,6261 | 32,3614 | 0,0002 |
| Inokulierung | 1 | 7,6304 | 7,6304 | 2,4298 | 0,0840 |
| Veg.zyklus x Inokulierung | 4 | 20,7867 | 5,1967 | 1,6548 | 0,1204 |
| Residual | 30 | 94,2104 | 3,1403 | | |
| Total | 39 | 529,1318 | | | |

Paarweise *a posteriori* Tests der Vegetationszyklen

| Vergleich | <i>Ggt</i>-inok. + nicht inok. | | <i>Ggt</i>-inok. | | nicht inok. | |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | <i>t</i> | <i>P</i> | <i>t</i> | <i>P</i> | <i>t</i> | <i>P</i> |
| GH1 vs. GH2 | 7,9730 | 0,0004 | 7,4291 | <i>0,0002</i> | 4,5848 | <i>0,0006</i> |
| GH1 vs. GH3 | 7,0032 | 0,0002 | 7,0541 | <i>0,0002</i> | 4,1757 | <i>0,0004</i> |
| GH1 vs. GH4 | 8,1843 | 0,0002 | 6,8972 | <i>0,0002</i> | 5,0610 | <i>0,0006</i> |
| GH1 vs. GH5 | 8,1494 | 0,0002 | 6,2869 | <i>0,0002</i> | 5,0965 | <i>0,0002</i> |
| GH2 vs. GH3 | 1,8495 | 0,0482 | 2,8908 | <i>0,0048</i> | 0,5625 | <i>0,7126</i> |
| GH2 vs. GH4 | 3,1156 | 0,0004 | 3,4017 | <i>0,0018</i> | 1,8102 | <i>0,0712</i> |
| GH2 vs. GH5 | 4,1722 | 0,0002 | 3,8246 | <i>0,0012</i> | 2,5498 | <i>0,0208</i> |
| GH3 vs. GH4 | 3,8118 | 0,0002 | 4,6251 | <i>0,0004</i> | 1,8735 | <i>0,0594</i> |
| GH3 vs. GH5 | 4,5767 | 0,0006 | 5,0078 | <i>0,0008</i> | 2,5569 | <i>0,0142</i> |
| GH4 vs. GH5 | 3,5897 | 0,0002 | 2,9824 | <i>0,0044</i> | 2,6175 | <i>0,0060</i> |

df: Freiheitsgrade; SS: Sum of squares (Summe der quadratischen Abweichungen); MS: Mean of squares; *F*: *F*-Statistik; *P*: p-Wert; *t*: *t*-Statistik.

GH4, was auch aus Abbildung 4.23 B ersichtlich ist.

5 Diskussion

Der Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* wird wegen seiner pathogenen Wirkung auf Getreidearten und der Gefährdung des Pflanzenertrags seit mehr als einem Jahrhundert erforscht. Mittlerweile dient er als Modellorganismus für bodenbürtige Phytopathogene. Ein wichtiger Bestandteil dieser Forschungsarbeiten war meist auch die Entwicklung möglicher Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Schwarzbeinigkeit. Insbesondere die Mechanismen, die dazu führen, dass bestimmte Böden suppressiv gegen *Ggt* sind, wurden von zahlreichen Gruppen erforscht. Aufgrund der Komplexität des Systems aus Boden, Pflanze und Mikroorganismen, das mit dem Pathogen interagiert, konnten letztlich jedoch immer nur Teilaspekte herausgegriffen und analysiert werden. So wurden etliche Mechanismen beschrieben, die gegen *Ggt* wirken und die etwa bei der Ausbildung des Take-all Declines (TAD) eine Rolle spielen. Es ist allerdings immer noch nicht vollständig geklärt, wie ein TAD zustande kommt. Mit Sicherheit interagieren hier viele Faktoren, die nur durch Betrachtung von Teilaspekten womöglich gar nicht aufzuklären sind, weil sie im natürlichen System komplexe Netzwerke bilden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, im Boden eines herkömmlichen Agrarstandorts die Entwicklung eines TAD-Stadiums zu induzieren und ihren Verlauf auf Basis molekularbiologischer Fingerprints genau zu verfolgen. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Interaktionen in der Rhizosphäre während des Angriffs des Pathogens und seiner Abwehr gezogen werden.

Der kultivierungsabhängige Teil dieser Studie hatte die Vorgabe, Antagonisten gegen *Ggt* aus einem landwirtschaftlich genutzten Boden zu isolieren und zu analysieren, auf welche Art und Weise sie das Wachstum des Pathogens zu inhibieren vermögen. Es konnten zahlreiche antagonistisch wirkende Bakterien und Pilze charakterisiert und die Wirkungsweise zweier ausgewählter Bakterienstämme geklärt werden. Sie beruht auf der Produktion verschiedener zyklischer Lipopeptide, deren Potenzial weiter unten diskutiert wird.

Natürlich behandeln auch die hier vorgestellten Ergebnisse nur Teilaspekte des komplexen Zusammenwirkens in der Rhizosphäre. Sie stellen letztlich jedoch einen weiteren Puzzlestein dar, der helfen sollte, irgendwann ein Gesamtbild des TAD zusammensetzen.

5.1 Ausbildung spezifischer Suppressivität gegen *Ggt* in Gersten-Monokultur

Im Gewächshausversuch wurde durch den Anbau von Sommergersten-Monokultur über sechs Vegetationszyklen, in Kombination mit künstlich erhöhtem Pathogendruck, ein suppressives Stadium induziert. In einem parallel durchgeführten Feldversuch, der von 2005 bis 2007 drei Vegetationszyklen durchlief, konnte dagegen kein TAD festgestellt werden. Laut Weller et al. (2002) sind zur Entwicklung eines TAD-Stadiums drei Komponenten nötig: Monokultur eines *Ggt*-anfälligen Wirtes, die Anwesenheit von *Ggt* und mindestens ein starker Ausbruch der Krankheit.

Im Feldversuch waren die ersten beiden Voraussetzungen erfüllt. Wie die Quantifizierung mittels TaqMan[®] PCR ergeben hatte, war *Ggt* bereits im unbeimpften Feldboden in geringen Mengen vorhanden (Kap. 4.2.3). Zusätzlich wurde die Hälfte der Parzellen künstlich inokuliert. Dementsprechend war auch in allen Parzellen ein Befall mit Schwarzbeinigkeit feststellbar (Abb. 4.2, S. 65), allerdings blieb der zur Induktion des TAD nötige starke Krankheitsausbruch im Versuchszeitraum aus. Die bonitierte Wurzelverschwärzung zu EC60 betrug im Feld maximal 24 % und lag damit deutlich unter den Infektionsraten im Gewächshaus. Einer der Gründe hierfür dürfte sein, dass die Inokulation unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus gezielter und effektiver ist als im Freiland. Die als Inokulum dienenden Haferkörner wurden in den Versuchsröhren in direktem Kontakt zum Saatgut ausgelegt, und die Menge verwendeten Inokulums war etwa doppelt so hoch wie in den Parzellen. Ein weiterer Grund waren sicher die Witterungsbedingungen während der Vegetationsperioden in den drei Versuchsjahren, die der Etablierung von *Ggt* im Feldversuch entgegen wirkten. Beispielsweise war der Befall 2007 deshalb so gering (sogar wieder niedriger als 2006), weil die sechs Wochen nach der Aussaat sehr trocken waren. Laut Hornby (1998) stagniert das Pilzwachstum während der Frühjahrstrockenheit, so dass die Pflanzenwurzeln dem Befall davonwachsen können. Höhere Niederschläge und die resultierenden hohen Bodenfeuchten dagegen fördern den Befall (z. B. Clarkson und Polley, 1981; Hornby, 1978; Smiley et al., 1996). So wurden im niederschlagsreicheren Sommer 2006 die bisher höchsten Infektionsraten festgestellt.

Der Freiland-Befall war in den inokulierten Parzellen zu EC25 durchschnittlich 2,3 mal so hoch wie in den nicht inokulierten. Bis EC60 hatte der Befall zwar deutlich zugenommen, er war aber in den *Ggt*-Parzellen nur noch 1,3 mal so hoch wie in der Kontrolle. Dieser Angleich der Befallszahlen dürfte darauf beruhen, dass Gerstenpflanzen auf einen frühen *Ggt*-Befall mit der vermehrten Bildung von Adventivwurzeln reagieren, die die infizierten Wurzeln ersetzen (Asher, 1972; Gutteridge et al., 2003). Sekundärinfektionen der Adven-

tivwurzeln wirken sich deshalb in den inokulierten Pflanzen weniger stark aus. Das gilt aber nur, solange sich nicht zu viel pilzliches Inokulum aufgebaut hat. Wenn diese Grenze – wie im Gewächshausversuch – überschritten wird, kommt es zu einer Beschleunigung der Infektionsrate und starkem Ausbruch der Krankheit (Bailey und Gilligan, 1999).

Bislang also fehlen im Freiland die hohen Befallszahlen, die zur Ausbildung spezifischer Suppressivität erforderlich sind. Der Versuch soll daher über die nächsten Jahre fortgesetzt werden, bis ein stabiles Decline-Stadium erreicht ist. Bei künstlicher Inokulation mit *Ggt* ist ein TAD nach vier bis sechs Monokulturjahren zu erwarten (Weller et al., 2002). Allerdings kann dieser Zeitraum beträchtlich variieren, da sich im Freiland unzählige Klima- und Boden-Faktoren auf die Entwicklung auswirken. So berichtet Cook (2007a) von einem maximalen Ausbruch der Schwarzbeinigkeit im siebten Jahr und maximalem TAD im fünfzehnten Jahr nicht inokulierter Weizen-Monokultur auf Anbauflächen im US-Bundesstaat Washington.

In der vorliegenden Studie trafen alle drei von Weller et al. (2002) geforderten Komponenten allein in der *Ggt*-inokulierten Variante des Gewächshausversuchs zusammen. Hier kam es zu einem starken Ausbruch der Schwarzbeinigkeit im dritten Vegetationszyklus, gefolgt von einem plötzlichen Rückgang des Befalls im vierten Zyklus. Dies ist ein charakteristisches Indiz für das Eintreten ins Decline-Stadium (Cook, 2003).

In der nicht inokulierten Variante, in der kein TAD auftrat, kam *Ggt* zwar vor: Bei visueller Bonitur war ein leichter Wurzelbefall zu verzeichnen (Abb. 4.6, S. 71). Außerdem hatte die quantitative PCR die Anwesenheit von *Ggt* im verwendeten Boden bestätigt (Kap. 4.2.3). Dieses natürlich vorhandene *Ggt*-Inokulum reichte aber offenbar nicht aus, um einen starke Erkrankung auszulösen. Stattdessen schwankte der Befall hier auf sehr niedrigem Niveau, mit einem leichten Maximum im vierten Zyklus. Auch dieses Bild ist typisch für Versuche mit *Ggt*-Inokulation in Monokulturen, in denen allgemein beobachtet wird, dass das Befallsmaximum in nicht inokulierten Kontrollböden später eintritt als in inokulierten Böden und auch weniger ausgeprägt ist (Bateman und Hornby, 1999). Aus Monokulturen von Gerste wird berichtet, dass der natürliche Befall über neun Jahre kontinuierlich ansteigen kann, dabei aber insgesamt zu gering bleibt, um einen TAD auszulösen (Lockhart et al., 1975).

Im Gewächshaus konnten somit verschiedene Entwicklungsphasen eines suppressiven Stadiums bis hin zum stabilen Decline dokumentiert werden. Durch die Kombination von permanenter Monokultur und wiederholter Pathogenzugabe in einem Gefäßversuch wurde das Ziel erreicht, den zur TAD-Entwicklung benötigten Zeitraum beträchtlich zu verkürzen.

Da der Decline bekanntermaßen durch antagonistisch wirkende Mikroorganismen ausgelöst wird, war zu erwarten, dass auch im vorliegenden Versuch eine dahingehende Anpassung der Bodengemeinschaft stattgefunden hatte. Um dies auf molekularbiologischer Ebene zu überprüfen, wurden bakterielle Fingerprints mittels tRFLP-Analyse für Rhizosphärenproben aus GH1–5 erstellt, deren Ergebnis in Kapitel 5.5 diskutiert wird.

5.2 Bonitur und Prognose des *Gg*-Befalls mittels quantitativer PCR

Es wurden zwei Primer-Sonden-Systeme für den spezifischen Nachweis der Varietäten *Ggt* und *Gga* im Boden und an Wurzeln entwickelt, basierend auf den 18S- bzw. ITS-Gensequenzen der rRNA.

Bei der Quantifizierung der Kopienzahlen in Reinkulturen wurden mit beiden Assays auch Amplifikate der jeweils anderen Varietäten detektiert, allerdings in deutlich geringerer Zahl (Abb. 4.9, S. 75). Mit dem *Ggt*-Assay lagen die Werte für *Gga* und *Ggg* um den Faktor 15.000 unter denen für *Ggt*. Umgekehrt lagen die mit dem *Gga*-Assay gemessenen Kopienzahlen für *Ggg* und *Ggt* um den Faktor 5.000 bzw. 300.000 unter denen für *Gga*. Für die praktische Anwendung ist v. a. die Unterscheidung von *Gga* und *Ggt* von Bedeutung, da *Ggg* als Reis-Pathogen im europäischen Getreideanbau keine Rolle spielt (Ou, 1972). Die starke Differenzierung gerade zwischen diesen beiden Varietäten bestätigte die Eignung der gezeigten TaqMan[®]-Systeme für die spezifische Quantifizierung.

Zuvor waren zwar bereits mehrere PCR-Primer beschrieben worden, die für bestimmte *Gg*-Varietäten spezifisch sind. Die Primer für rRNA-Gensequenzen (Bryan et al., 1995; Fouly und Wilkinson, 2000b; Ward, 1995) wurden bisher allerdings nicht in quantitativen Assays eingesetzt. Die von Rachdawong et al. (2002) publizierten Primer für die Avenacinase-Gensequenz wurden von Thomas (2004) zusammen mit einer TaqMan[®]-Sonde für eine quantitative realtime PCR weiterentwickelt, die aber nur für *Gga* spezifisch war und nicht zwischen *Ggt* und *Ggg* unterscheiden konnte. Der hier vorgestellte TaqMan[®]-Assay ist somit der erste qPCR-basierte Test, der die spezifische Quantifizierung von *Ggt* und *Gga* in Umweltproben erlaubt. Durch Markierung der beiden Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen wäre sogar der gleichzeitige Nachweis beider Varietäten in einer Multiplex-PCR möglich, wie sie etwa von Schena et al. (2006) für vier verschiedene *Phytophthora*-Spezies angewandt wird.

Bei der Quantifizierung von *Ggt* im Boden des Pathogenitätstests lagen die Kopienzahlen im Bereich des Detektionslimits (Tab. 4.2, S. 76). Für diese trotz sichtbaren Befalls der Pflanzen sehr geringen Werte dürfte es zwei Ursachen geben. Zum einen wurde das als In-

okulum dienende verpilzte Haferkorn bei der Aussaat unmittelbar neben dem Gerstenkorn ausgelegt. Der Pilz musste also den Boden gar nicht erst durchwachsen, um zu seinem Wirt zu gelangen. Zum anderen wurde der im Pathogenitätstest verwendete Boden vor der Aussaat doppelt sterilisiert und das natürlich vorhandene Inokulum – das in nicht sterilem Boden in geringen Mengen nachweisbar ist – dadurch degradiert.

Der Nachweis von *Ggt* an infizierten Wurzeln zeigte zum einen, dass mit dem verwendeten TaqMan[®] Assay eine zuverlässige Quantifizierung des Pathogens schon bei relativ geringen Befallszahlen möglich ist. Zum anderen wurde die Notwendigkeit einer Absicherung der visuellen Bonitur deutlich. Die qPCR detektierte höhere Kopienzahlen für die *Ggt10*-infizierten Wurzeln, obwohl die visuelle Bonitur die *Ggt13*-Wurzeln als doppelt so stark befallen einstufte. Die Bonitur anhand des Anteils verschwärzter Wurzeln ist somit eher zur groben Abschätzung des Befalls geeignet, zumal sie trotz Verwendung von Bildtafeln und Bewertungsschlüsseln (etwa in Asher und Shipton, 1981; Hornby, 1998) subjektiv vom jeweiligen Betrachter geprägt ist. Mit zunehmendem Alter der Pflanze kommen außerdem seneszenzbedingte Verfärbungen hinzu, die nicht leicht von den Krankheitssymptomen zu unterscheiden sind. Zudem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auch andere Pathogene, z. B. *Pythium*, ähnliche Befallsbilder an der Wurzel hervorrufen (Waller, 1979). Der vorgestellte qPCR-Assay bietet die Möglichkeit, den tatsächlichen Befall mit *Ggt* oder *Gga* objektiv zu quantifizieren und kann so helfen, Fehleinschätzungen zu vermeiden.

Zudem eröffnet der Test die Möglichkeit, die Menge pilzlichen Inokulums im Ausgangsboden bereits vor der Aussaat zu bestimmen und damit das spätere Infektionsrisiko abzuschätzen. Der erste Schritt wäre hier, die vorliegenden Versuchsdaten in ein Modell zur Befallsvorhersage zu integrieren. Dazu müssten die Ausgangswerte für das im Boden vorhandene Inokulum mit den späteren Befallswerten an der Wurzel korreliert und auf Basis dieser Daten ein mathematisches Modell erstellt werden, das nur mit den Initialwerten den späteren Befall und Ertrag prognostizieren kann. Ferner müssten Witterungsdaten in das Modell mit einbezogen werden. Solche Modelle könnten in einem weiteren Schritt für diverse andere Wirtspflanzen und verschiedene Bodenarten erstellt werden. Sie würden in der Landwirtschaft weitreichende Möglichkeiten eröffnen, die Bewirtschaftung an die im Boden gemessene Pathogenmenge anzupassen. Dies wäre durchaus auch im heimischen Landbau von Bedeutung, da die Schwarzbeinigkeit in einem von Heß (2006) durchgeführten, deutschlandweiten Monitoring an Winterweizen in allen ackerbaulich genutzten Regionen nachgewiesen werden konnte.

So könnte man auf stark belastetem Boden Zwischenfrüchte wie z. B. Kartoffeln oder Leguminosen anbauen, die von *Ggt* nicht befallen werden und somit zur Reduktion des pilzlichen Inokulums beitragen (Hornby, 1998). Dies dürfte im europäischen Raum die

Methode der Wahl sein, da hier vorwiegend Wechselwirtschaft betrieben wird und monokulturbedingte *Ggt*-suppressive Böden daher Ausnahmefälle sind. Als Alternative auf *Ggt*-haltigen Böden kommen auch verschiedene Getreidearten in Frage. Hafer etwa ist nahezu immun gegen *Ggt*-Infektionen (Hornby, 1998), und Roggen ist deutlich weniger anfällig als Weizen oder Gerste (Scott, 1981). Interspezifische Hybride von Weizen und Roggen (Triticale) bilden Zwischenstufen in der Anfälligkeit (Hollins et al., 1986); so ist etwa hexaploider Triticale (4 Chromosomensätze von Weizen und 2 von Roggen) resistenter als oktaploider Triticale (6 Chromosomensätze von Weizen und 2 von Roggen). Daher stellt Triticale ebenfalls eine sinnvolle Alternative dar. Beim Anbau *Ggt*-anfälliger Getreidearten schließlich könnte man die Behandlung des Saatguts mit Silthiofam oder Fluquinconazol in Erwägung ziehen (Bateman et al., 2007), um Ertragseinbußen zumindest einzuschränken.

Es existieren bereits Modelle zur Vorhersage des Schwarzbeinigkeitsbefalls, die sich jedoch in Umfang und Zielsetzung stark unterscheiden. Das von Monsanto für Deutschland angebotene EDV-gestützte Prognosesystem FARMModel (frei erhältlich unter www.latITUDE.de/schwarzbeinigkeits/482.htm) etwa berechnet das Befallsrisiko und resultierende Ertragseinbußen für Weizen unter Berücksichtigung der Risikofaktoren Fruchtfolge, Bodentyp, Aussaattermin und der erwarteten Witterung für eine bestimmte Region. Die Berechnungen des FARMModels gründen laut Monsanto auf den Ergebnissen mehrerer sechsjähriger Feldversuchsserien sowie der regionalen Auswertung von Niederschlag und Temperatur in den Jahren 1978 bis 1999. Bisherige Befallszahlen oder gar die Menge an Inokulum im Boden finden hier allerdings keine Betrachtung.

Der in Australien angewandte PreDicta[®] B Test dagegen ist ein Risikomanagement-Tool für mehrere Phytopathogene einschließlich *Ggt*, dessen Prognosen tatsächlich auf dem molekularbiologischen Nachweis des Inokulums im Boden beruhen. Ausgehend von einer repräsentativen Bodenprobe detektiert und quantifiziert der Test bodenbürtige Pathogene auf DNA-Basis (Slot-Blot Hybridisierungsassay mit der Sonde pG158, Herdina et al., 1997). Er kann verwendet werden, um das Schwarzbeinigkeitsrisiko eines bestimmten Feldes vor der Aussaat abzuschätzen (Herdina und Roget, 2000; Herdina et al., 2004). Die Vorhersage des Befalls geschieht hier mittels eines Modells, das die Pathogenmenge im Boden mit Faktoren wie saisonalem Niederschlag und Ertragsverlust korreliert (Roget, 2001). Der vom Root Disease Testing Service (RDTS) des South Australian Research and Development Institute (SARDI) entwickelte PreDicta[®] B Assay ist kommerziell über C-Qentec Diagnostics (www.c-qentec.com) erhältlich. Er könnte als Vorbild für ein den klimatischen Bedingungen in Deutschland angepasstes Prognosesystem dienen.

Bei der Entnahme von Bodenproben, die zur Befallsprognose bestimmt sind, sollte jedoch unabhängig vom verwendeten Modell immer Folgendes beachtet werden: *Ggt* ist ein hochspezialisierter Wurzelparasit, der im Boden v. a. an organischem Material – wie etwa Stoppelresten – saprophytisch überdauert (Cunningham, 1981). Diese organischen Reste sollten daher auf jeden Fall mit beprobt werden.

5.3 Mikrobieller Antagonismus im Rhizosphärenboden

Aus einem landwirtschaftlich genutzten Boden wurden 181 bakterielle und 341 pilzliche Antagonisten isoliert, die *in vitro* das Wachstum von *Ggt* unterschiedlich stark zu hemmen vermochten. Die dazu verwendeten Proben bestanden aus Rhizosphärenboden einschließlich der zerkleinerten Wurzel, um auch die Rhizoplane zu erfassen, auf der mikrobielle Antagonisten vermutlich hauptsächlich angesiedelt sind (Smiley, 1978a). Die antagonistisch wirkenden Isolate stammten je etwa zur Hälfte aus nicht inokuliertem bzw. *Ggt*-inokuliertem Boden. Das zeigt, dass biokontrollaktive Mikroorganismen auch ohne künstlich erhöhten Pathogendruck bereits im Boden präsent sind. Sie stellen ein natürlich vorhandenes Potenzial dar, das bei Auftreten eines Pathogens induziert wird, woraufhin sich ihr Anteil an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft erhöht (Borneman und Becker, 2007). Die Isolierungen erfolgten zudem während der ersten Vegetationsperiode von Sommergerste auf dem Versuchsboden, also wahrscheinlich bevor sich stabile, an die Pflanze angepasste Populationen von Mikroorganismen etablieren konnten. Potenzielle Antagonisten sind also schon dann im Boden vorhanden, wenn dieser noch nicht durch den längeren Anbau einer bestimmten Feldfrucht geprägt ist (Mazzola et al., 2004).

Das Isolierungsmedium basierte auf einem Extrakt des Versuchsbodens und war in Nährstoffgehalt und pH-Wert an diesen angepasst, um eine möglichst hohe Anzahl nativer Mikroorganismen zu kultivieren (Hagn, 2004). So konnten 46 morphologische Pilzgruppen charakterisiert werden (Tab. 4.3, S. 80). Darunter befanden sich zahlreiche stark sporulierende, relativ langsam wachsende Pilze, die das *Ggt*-Wachstum bereits vor Kontakt der Hyphen inhibierten. Es könnte sich hier um *Aspergillus*- oder *Penicillium*-Spezies handeln, deren antagonistische Wirkung gegenüber *Ggt* von Dewan und Sivasithamparam (1988) beschrieben wurde. Bei zwei morphologischen Gruppen, die Mycoparasitismus gegen *Ggt* zeigten, dürfte es sich um *Trichoderma*-Spezies handeln (Domsch et al., 1993). Vertreter dieser Gattung sind seit langem als Biokontrollorganismen bekannt (einen Überblick geben Harman et al., 2004). Zahlreiche Studien berichten auch von der antagonistischen Wirkung verschiedener *Trichoderma*-Arten gegen *Ggt* (Duffy et al., 1996; Ghisalberti et al., 1990; Simon, 1989).

Die antagonistisch wirkenden Bakterien konnten neun verschiedenen Gattungen zugeordnet werden (Tab. 4.4, S. 82). *Bacillus*-Spezies machten mit mehr als 60 % den Hauptteil der inhibierenden Bakterien aus. Die zweite große Gruppe von Antagonisten gehörte der Gattung *Pseudomonas* an, die rund 30 % der inhibierenden Isolate stellte. Diese Verteilung entsprach nur teilweise den Erwartungen: In der Literatur werden v. a. fluoreszierende Pseudomonaden für das Auftreten des Decline-Phänomens verantwortlich gemacht (z. B. De Souza et al., 2003b; Haas und Défago, 2005; Landa et al., 2006; Mazzola, 2002; Raaijmakers und Weller, 1998; Weller et al., 2007), während *Bacillus* in diesem Zusammenhang eher selten genannt wird (Kim et al., 1997a; Ryder et al., 1999). Allerdings lag zum Zeitpunkt der Isolierung noch kein TAD vor, so dass mit Sicherheit eine andere Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft bestand als in einem suppressiven Boden, in dem der Anteil antagonistischer Pseudomonaden bekanntermaßen deutlich erhöht ist (Chapon et al., 2002; Landa et al., 2006; Mazzola, 2002; Raaijmakers et al., 1997; Sarniguet et al., 1992; Weller, 1988; Weller et al., 2007). Eine dritte Gruppe von Isolaten (5 %) konnte phylogenetisch den Actinomyceten zugeordnet werden, von denen ebenfalls berichtet wird, dass sie antagonistisch gegen *Ggt* wirken (Andrade et al., 1994; Coombs et al., 2004; El-Tarabily und Sivasithamparam, 2006).

Insgesamt decken die aus den Biokontrollversuchen isolierten Mikroorganismen zwar etliche bakterielle und pilzliche Gattungen ab. Gemessen an der geschätzten Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden (Wagner et al., 2007; Young und Crawford, 2004) dürfte dies jedoch lediglich einen winzigen Ausschnitt abbilden, zumal bisher nur ein geringer Teil der Boden-Mikroorganismen überhaupt als kultivierbar angesehen wird (Hugenholz et al., 1998; Torsvik et al., 1990; Ward et al., 1990). Des Weiteren ist zu beachten, dass bei *in vitro* Konfrontationstests ein artifizielles Zwei-Komponenten-System geschaffen wird, das die komplexen ökologischen Zusammenhänge in der Rhizosphäre völlig außer Acht lässt. Tatsächlich dürfte es sich dort um die Interaktionen von sehr vielen verschiedenen Organismen handeln, die in Summe eine bestimmte Funktion, z. B. Suppressivität, ergeben. Die vorliegende Analyse zielte jedoch in erster Linie darauf ab, Grundmechanismen der Biokontrolle – und damit zunächst einzelne Metaboliten – abzugrenzen, was die Reduktion auf ein möglichst einfaches *in vitro* System erforderte.

5.4 Zyklische Lipopeptide in der bakteriellen Biokontrolle

5.4.1 CLP-Produktion in *Bacillus* und in *Pseudomonas*

Die biokontrollaktiven Metaboliten zweier ausgewählter bakterieller Isolate (*Pseudomonas* sp. bzw. *Bacillus subtilis*) wurden als verschiedene zyklische Lipopeptide (CLPs) identifiziert. Diese Substanzen zeichnen sich durch ihre amphiphilen Eigenschaften aus; sie werden daher auch als Biotenside oder „Biosurfactants“ bezeichnet (Rosenberg, 2006). Das CLP Surfactin etwa kann die Oberflächenspannung von Wasser schon bei einer Konzentration von nur 20 μM von 72 mN/m auf 27 mN/m herabsetzen (Cooper et al., 1981; Peypoux et al., 1999) und ist damit das aktivste bis dato beschriebene bakterielle Biosurfactant (Bonmatin et al., 2003). Diese Wirkung beruht darauf, dass die CLPs den intermolekularen Raum zwischen den Wassermolekülen besetzen und dadurch die Anziehungskräfte zwischen benachbarten Wassermolekülen – hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen – herabsetzen. Dadurch entsteht eine flüssigere Lösung und die Benetzungsfähigkeit wird erhöht.

In den analysierten Stämmen fand die Produktion zyklischer Lipopeptide bereits in der bakteriellen Reinkultur und damit ohne Induktion durch das Pathogen statt (Abb. 4.13, S. 83). Das deutet darauf hin, dass die Substanzen grundlegendere Funktionen erfüllen und die Pathogenabwehr ein zusätzlicher Aspekt ist.

Die inhibierende Wirkung der aus Dualkultur mit *Ggt* gewonnenen Filtrate war sogar schwächer als die der Reinkulturen. Dies lag vermutlich daran, dass das Bakterienwachstum dort die stationäre Phase noch nicht erreicht hatte, in der Sekundärmetaboliten bevorzugt produziert werden (Haas und Keel, 2003; Laville et al., 1992). Zudem zeigt sich hier, dass eine Induktion durch das Pathogen, sollte sie denn stattfinden, ebenfalls erst während einer späteren bakteriellen Wachstumsphase zu erwarten ist. Versuche zu dieser Hypothese stehen allerdings noch aus.

Im Falle des analysierten *Bacillus*-Stammes wurde die Vermutung bestätigt, dass es sich bei der inhibierenden Substanz um das CLP Surfactin handelt. Dieses wird in der Literatur als Hauptagens der Biokontrollaktivität von *B. subtilis* beschrieben (z. B. Bonmatin et al., 1994, 2003; Stein, 2005), das meist in Kombination mit anderen CLPs wie z. B. Iturin, Bacillomycin und Fengycin produziert wird (Cazorla et al., 2007; Maget-Dana und Peypoux, 1994; Romero et al., 2007b; Vater et al., 2002). *Bacillus*-CLPs haben ein breites Wirkungsspektrum (Bonmatin et al., 2003), bisher wurde jedoch keine Studie publiziert, die gezielt die Wirkung von Surfactin gegen *Ggt* untersucht.

Für *Pseudomonas* wurden in erster Linie die Moleküle DAPG und Phenazin erwartet, da das TAD-Phänomen im Allgemeinen auf Pseudomonaden zurückgeführt wird, die diese Substanzen produzieren (z. B. De Souza et al., 2003b; Landa et al., 2006; Raaijmakers und Weller, 1998; Thomashow und Weller, 1988; Weller et al., 2007). Es war daher besonders interessant, dass gerade diese Stoffe hier als inhibierende Agenzien ausgeschlossen werden konnten und statt dessen die CLPs Tensin und Amphisin identifiziert wurden. Mehrere Arbeiten belegen, dass *Pseudomonas* diese beiden CLPs synthetisieren kann und dass sie antagonistisch gegen die Phytopathogene *Pythium ultimum* und *Rhizoctonia solani* wirken (Henriksen et al., 2000; Koch et al., 2002; Nielsen et al., 2000; Nielsen und Sørensen, 2003; Sørensen et al., 2001; Sørensen, 2002). Allerdings wurde in keiner dieser Studien ihre Wirkung gegen *Ggt* überprüft.

5.4.2 CLPs beeinflussen zahlreiche Prozesse in der Rhizosphäre

CLPs können aufgrund ihrer amphiphilen Struktur eine Vielzahl von Funktionen übernehmen, die bei den molekularen Interaktionen in der Rhizosphäre eine Rolle spielen. Im Folgenden sind mögliche Wirkungsweisen natürlicher Biosurfactants aufgeführt.

- Bioemulgatoren können gebundene hydrophobe Moleküle mobilisieren, ihre Löslichkeit erhöhen und sie für die Biodegradation verfügbar machen (Ron und Rosenberg, 2001; Rosenberg, 2006). Dadurch können CLP-Produzenten Nahrungsquellen nutzen, die anderen Organismen nicht zugänglich sind.
- Die effiziente Besiedlung der Rhizosphäre ist für antagonistische Bakterien von grundlegender Bedeutung (Lugtenberg et al., 2001; Whipps, 2001). Ihre Rhizosphärenkompetenz beruht zum einen auf ihrer Fähigkeit zur Anlagerung an geeignete Strukturen, zum anderen auf ihrem Bewegungsvermögen, um zu diesen Strukturen zu gelangen oder sich auf einer Oberfläche auszubreiten. Beide Prozesse können durch die Produktion von CLPs beeinflusst werden.

Für die Anlagerung der Mikroben an passende Oberflächen sind Strukturen der Zelloberfläche verantwortlich (Rosenberg, 2006). Neu (1996) beschreibt, wie Emulgatoren die Interaktion zwischen Bakterien und Oberflächen beeinflussen. Demnach können Biosurfactants einen Film auf einer Oberfläche bilden und so die Anlagerung bestimmter Mikroorganismen stimulieren, während andere inhibiert werden. Dieses Bild passt gut zum Ergebnis der Konfrontationstests auf festem Nährmedium, in denen *Ggt* den Bereich, in dem die CLPs ins Medium diffundiert waren, nicht mehr kolonisierte (Abb. 4.13, S. 83). Neu (1996) zufolge können Bakterien ihre Biosurfac-

tants aber auch nutzen, um die Eigenschaften ihrer eigenen Zelloberfläche zu regulieren und sich je nach Bedarf an Oberflächen anzulagern oder abzulösen. Bais et al. (2004) zeigten, dass Surfactin eine essentielle Rolle bei der Bildung ausgedehnter Biofilme von *B. subtilis* an *Arabidopsis*-Wurzeln spielt. Sie postulierten, dass diese Biofilme und die CLP-Produktion es den Bakterien ermöglichen, Pflanzenwurzeln effizient zu kolonisieren und ihren Wirt zu schützen, indem sie die Ansiedlung von Pathogenen verhindern.

Auch Bewegungsvorgänge erfordern die Präsenz bestimmter Biosurfactants. Die Produktion von Surfactin etwa ist essentiell für das Schwärmen von *Bacillus*-Spezies auf festen Oberflächen (Chen et al., 2007; Kearns et al., 2004). Bei der Kolonisierung von Pflanzenmaterial durch Pseudomonaden spielt Amphisin eine wichtige Rolle (Nielsen et al., 2005), da das CLP das selbständige Bewegungsvermögen der Bakterien und das Schwärmen auf festen Oberflächen fördert (Andersen et al., 2003; Nielsen et al., 2002). Tran et al. (2007) berichten von einem weiteren CLP, Masetolid A, das für die Wurzelbesiedlung durch *P. fluorescens* erforderlich ist.

- CLPs besitzen antimikrobielle und cytotoxische Aktivität gegen eine Vielzahl von Organismen, die auf ihrer Fähigkeit beruht, mit biologischen Membranen zu interagieren. Sie wirken antibakteriell, da sie in der Lage sind, die Zellmembran sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien zu zerstören, indem sie die Phospholipid-Doppelschicht permeabel machen (Raaijmakers et al., 2006). Vollenbroich et al. (1997b) beschreiben CLP-Aktivität gegen Mycoplasmen, parasitär lebende Bakterien, die zahlreiche Krankheiten im Menschen und in Tieren verursachen. Die Wirkung gegen Parasiten wie z. B. *Trypanosoma cruzi* (Raaijmakers et al., 2006) und gegen Zoosporen von Oomyceten wie z. B. *Pythium* spp. und *Phytophthora* spp. (De Souza et al., 2003a) scheint auf Immobilisierung und Zerstörung der Flagellen zu beruhen. CLPs wirken aber auch antiviral durch Zersetzung der viralen Lipidhülle und des Kapsids (Vollenbroich et al., 1997a). Raaijmakers et al. (2006) geben einen Überblick über die antifungale Aktivität gegen eine Vielzahl phyto- und humanpathogener Pilze und Hefen, darunter *Rhizoctonia solani*, *Phoma lingam*, *Alternaria brassicae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea*, *Ophiostoma ulmi*, *Aspergillus* und *Fusarium* spp., *Penicillium digitatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* und *C. glabrans*.

Diese universelle antimikrobielle Wirkung durch Zerstörung von Zellmembranen wird durch den amphiphilen Charakter der Biosurfactants ermöglicht. CLPs dringen durch hydrophobe Interaktion spontan in die Phospholipidmembran ein (Dufour

et al., 2005; Maget-Dana und Ptak, 1995). Bei mittlerer Konzentration bilden sie Poren, die als Kationenkanäle fungieren können, bei hohen Konzentrationen dagegen überwiegt der Detergens-Effekt und führt zur Permeabilität und letztendlich zur Zerstörung der Membran (Peypoux et al., 1999).

Während Tensin und Amphisin eine helikale Struktur besitzen, bei der das zyklische Peptid um ein Wassermolekül gewunden ist (Henriksen et al., 2000; Sørensen et al., 2001), weist die dreidimensionale Struktur von Surfactin eine Besonderheit auf: Es bildet in Lösung eine Sattelstruktur aus, welche weitere biologische Aktivitäten eröffnet, die über die amphiphile Wirkung hinausgehen (Peypoux et al., 1999). Diese Struktur kommt durch die zwei sauren Gruppen L-Glu¹ und L-Asp⁵ zustande, die eine Art „Klaue“ bilden (Bonmatin et al., 1994). Diese kann ein bivalentes Kation, bevorzugt Ca²⁺ und Mg²⁺ stabilisieren. Surfactin kann damit zweiwertige Kationen äußerst effizient transportieren und durch organische Grenzflächen schleusen (Heerklotz et al., 2004; Peypoux et al., 1999). In der Tat erleichtern komplexgebundene Kationen das Eindringen in die Lipidmembran sogar (Maget-Dana und Ptak, 1995).

Schon Rovira und Campbell (1975) stellten mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) fest, dass Bakterien *Ggt*-Hyphen kolonisieren, Eindellungen der Hyphen hervorrufen und sie schließlich lysieren. Diese Beobachtungen stimmen mit aktuellen Ergebnissen von Romero et al. (2007a) überein, die die Wirkung von Surfactin gegen fungale Phytopathogene ebenfalls mittels REM untersuchten. Sie berichten von morphologischen Schäden an Konidien von *Podosphaera fusca* in Gestalt von großen Einbuchtungen und Turgor-Abnahme. Ihre Analysen mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigten zudem schwerwiegende Veränderungen der Plasmamembran und die Auflösung des Cytoplasmas.

5.4.3 Steuerung der CLP-Produktion

Die Biosynthese des Peptidrests der CLPs erfolgt über nonribosomale multifunktionelle Peptidsynthetasen (NRPS), die modular aufgebaut sind. Jedes Modul ist verantwortlich für die schrittweise Inkorporation und Modifikation einer Aminosäure-Einheit (Challis und Naismith, 2004; Raaijmakers et al., 2006). NRPSs sind nicht nur an der CLP-Synthese beteiligt, sondern auch an der Produktion zahlreicher weiterer Peptide, darunter auch medizinisch relevante Substanzen wie Penicillin, Vancomycin und Cyclosporin. Die Ankopplung der Fettsäure an das Peptid geschieht durch eine Acetyltransferase (Rosenberg, 2006).

Zahlreiche NRPS-Gensequenzen, darunter auch die für Surfactin und Amphisin, wurden bereits publiziert. Surfactin wird vom *surfA* Operon kodiert, welches auch an der Sporulation und Entwicklung von Kompetenz beteiligt ist, einem physiologischen Zustand, der die Aufnahme von DNA ermöglicht (Koumoutsis et al., 2004; Nakano et al., 1991). Die Kodierung von Amphisin erfolgt über das *amsY* Operon (Koch et al., 2002). Die Kenntnis dieser Gensequenzen ermöglicht die Entwicklung eines molekularen Nachweisverfahrens, etwa eines quantitativen PCR-Assays, um diese Funktion auch im Boden zu detektieren. Damit könnte geklärt werden, welche Rolle die Biosurfactant-Produktion im komplexen ökologischen System tatsächlich spielt.

Die Regulation der CLP-Produktion erfolgt sowohl in *Bacillus* spp. als auch in *Pseudomonas* spp. über die Zelldichte, welche durch Quorum Sensing Kontrollelemente übermittelt wird (Raaijmakers et al., 2006; Ron und Rosenberg, 2001; Stein, 2005). So wird die Synthese von Surfactin bei hoher Zelldichte über das Signaltransduktionssystem ComA/ComP induziert (Peypoux et al., 1999; Rosenberg, 2006). ComP (für „Competence“) ist eine membrangebundene Histidinkinase, die für die Aktivierung des Transkriptionsregulators ComA nötig ist (Lazazzera et al., 1999).

Die *Pseudomonas*-CLPs Amphisin und Tensin werden ebenfalls über ein Zweikomponentensystem reguliert, bestehend aus der Sensor kinase GacS und dem Transkriptionsregulator GacA. Mutanten, in denen eines der beiden dafür kodierenden Gene ausgeschaltet wurde, sind CLP-defizient (Koch et al., 2002). GacA wurde erstmals für einen biokontrollaktiven *P. fluorescens*-Stamm als „Global antibiotic and cyanide control“ beschrieben (Laville et al., 1992). Obwohl das GacS/GacA-System Gegenstand zahlreicher Studien ist (Heeb und Haas, 2001), ist bisher wenig über die Signale bekannt, die als Auslöser dienen (Dubuis et al., 2007). Den Ergebnissen von Koch et al. (2002) zufolge handelt es sich bei den Signalmolekülen um kleine organische Moleküle, die hitzestabil und diffusionsfähig sind, deren Identität bisher jedoch nicht geklärt ist. Die Entschlüsselung dieser Signale könnte Möglichkeiten eröffnen, gezielt in die Biosurfactant-Produktion einzugreifen und so die Biokontrollaktivität zu steuern. Womöglich würde dies sogar erlauben, native bakterielle Populationen im Boden zu vermehrter Synthese antagonistisch wirksamer Sekundärmetaboliten anzuregen.

5.5 Einfluss des Pathosystems Gerste – *Ggt* auf die bakterielle Diversität im Rhizosphärenboden

Die Entwicklung des TAD-Stadiums im Verlauf des Gewächshausversuchs wurde auf Basis molekularbiologischer tRFLP-Fingerprints verfolgt, um Veränderungen der bakteriellen Diversität im Rhizosphärenboden zu dokumentieren. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Populationen aus allen fünf untersuchten Vegetationszyklen (GH1–5) des *Ggt*-inokulierten Systems (Abb. 4.23 A, S. 97). Im nicht inokulierten, natürlichen System dagegen waren die Unterschiede zwischen GH2, GH3 und GH4 nicht signifikant (Abb. 4.23 B).

5.5.1 Etablierung eines geeigneten tRFLP-Systems

Probenaufbereitung und Nukleinsäure-Extraktion

Die analysierten Proben bestanden aus einem Gemisch aus gesiebttem Rhizosphärenboden und der gesamten, in kleine Stücke geschnittenen Wurzel (Rhizosphäre+Rhizoplane, R+R). Der Pilzbefall tritt jedoch nicht gleichmässig über das gesamte Wurzelsystem auf (Gilligan et al., 1994). Es kommt vielmehr zu lokal begrenzten Infektionsherden mit Läsionen des Wurzelgewebes, an denen sich deutlich andere mikrobielle Gemeinschaften einstellen als an der intakten Rhizoplane (Cook und Rovira, 1976; Barnett et al., 1999). Zudem werden die entlang der Rhizoplane verlaufenden Pilzhyphen vermehrt von Bakterien besiedelt (Rovira und Campbell, 1975). Entnimmt man die Replikate für die Nukleinsäure-Extraktion nun aus der unbehandelten Mischprobe, so ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Verteilung infizierter Wurzelfragmente (und damit auch die Verteilung der bakteriellen Populationen) darin relativ heterogen ist. Das führt dazu, dass auch die resultierenden tRFLP-Profile heterogen und schlecht reproduzierbar sind. Dieses Problem konnte durch Homogenisieren der gesamten R+R-Probe vor der Extraktion gelöst werden (Abb. 4.20, S. 94).

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Griffiths et al. (2000), welches die gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA erlaubt. Wie auch Carrigg et al. (2007) zeigten, ist diese Extraktionsmethode aufgrund ihrer hohen Reproduzierbarkeit sehr gut für vergleichende Fingerprint-Analysen geeignet.

PCR-Amplifikation

Die terminalen Restriktionsfragmente (tRFs) wurden ausgehend vom 5'-Ende der 16S rRNA Gensequenz generiert (durch 5'-Fluoreszenzmarkierung des forward-Primers). Auf-

grund der Längenheterogenität der variablen Regionen V1, V2 und V3 am 5'-Ende des Gens erhält man so für gewöhnlich eine bessere Auftrennung der bakteriellen Gruppen als bei einer tRFLP-Analyse der 3'-Region (Osborn et al., 2000).

Bei der Interpretation von tRFLP-Profilen sollte beachtet werden, dass die PCR-Amplifikation womöglich ein verzerrtes Bild der mikrobiellen Gemeinschaft zur Folge hat. In einem Nukleinsäure-Extrakt aus einer komplexen Umweltprobe liegt ein Gemisch homologer rRNA Gensequenzen vor, deren Amplifikation unterschiedlich effizient sein kann. So werden etwa DNA-Templates mit niedrigem GC-Gehalt präferenziell amplifiziert, da diese früher in Einzelstränge dissoziieren und daher beim Annealing der Primer überrepräsentiert sind (Suzuki und Giovannoni, 1996). Weiteren Einfluss hat das Konzentrationsverhältnis der DNA-Templates im Gesamtextrakt, denn die Amplifikation von gering vertretenen Templates kann durch die Amplifikation der abundanteren Templates supprimiert werden (Becker et al., 2000). Unstimmigkeiten zwischen Template-Ratio und Produkt-Ratio können dadurch zustande kommen, dass differierende Sequenzen jeweils ihre eigene Reaktionskinetik haben und deshalb unterschiedlich schnell die Plateauphase der PCR erreichen (Suzuki und Giovannoni, 1996). Speziell für die 16S rRNA Gensequenzen gilt zudem, dass ihre Kopienzahl für verschiedene Bakterien stark variiert (von Wintzingerode et al., 1997). Das führt dazu, dass die Abundanz von Arten mit vielen Genkopien in tRFLP-Profilen überschätzt wird.

Der PCR-Fehler ist einer der Gründe, warum tRFLP-Profile nicht die absolute Quantität individueller Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft wiedergeben. Nichtsdestotrotz sind tRFLPs hervorragend geeignet, relative Veränderungen in der Struktur und in der Diversität einer Gemeinschaft aufzuzeigen (Hartmann und Widmer, 2008).

Restriktion, Auftrennung der Fragmente, Datenbankrecherche

Bei der Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym für die tRFLP-Analyse wurde besonderer Wert auf eine gute Auftrennung jener Spezies gelegt, die bereits im kultivierungsabhängigen Ansatz aus den Biokontrollversuchen isoliert worden waren und antagonistische Aktivität gegen *Ggt* gezeigt hatten. Dazu wurden sowohl *in silico* Analysen durchgeführt als auch tRFs der bakteriellen Reinkulturen erstellt. Für die meisten der getesteten Spezies kamen laut RDP-II-Datenbank mehrere verschieden große Fragmente in Frage (Tab. 4.6, S. 93). Für einige der Test-Isolate, etwa *B. pumilus* und *Sinorhizobium*, stimmten zudem die vorhergesagten nicht mit den detektierten tRFs überein. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Migration von Fragmenten in einem Polyacrylamidgel zu einem gewissen Grad von der Zusammensetzung der Nukleotidsequenz beeinflusst wird (Dunbar et al., 2001; Kaplan und Kitts, 2003). Das würde auch erklären, warum der

Unterschied nicht bei allen Spezies gleich groß ist. Genau diese Tatsache macht es allerdings schwierig, die Zuordnung der tRFs gewissermaßen zu „kalibrieren“ (etwa indem man für die Datenbankrecherche einen definierten Betrag zur detektierten Größe addiert). Der Unterschied zwischen theoretischer und detektierter Fragmentgröße kann auch auf den Fluoreszenzfarbstoff zurückzuführen sein, der die elektrophoretische Mobilität ebenfalls beeinflusst (Marsh, 2005). Hinzu kommt, dass eine bestimmte Fragmentgröße in der RDP-II-Datenbank oft mehreren Spezies entspricht. In Summe verdeutlichen diese Tatsachen die Problematik bei der Zuordnung von tRFs zu phylogenetischen Gruppen über Datenbanken, die zudem auch nur den bisher bekannten Anteil der bakteriellen Gemeinschaft abbilden.

Die tRFLP-Analyse ist ein potentes Verfahren zum strukturellen Vergleich mikrobieller Gemeinschaften, sie vermag jedoch nicht, die Diversität detailliert aufzulösen (Bent et al., 2007; Clement et al., 1998; Kuske et al., 2002). Bei der Interpretation von tRFLP-Profilen ist vor allem zu beachten, dass tRFs der gleichen Größe durch multiple Taxa (Phylotypen) generiert werden können, die auch nicht nahe verwandt sein müssen (Blackwood und Buyer, 2007; Dunbar et al., 2001; Engebretson und Moyer, 2003; Pérez-Piqueres et al., 2006). Das führt dazu, dass die Anzahl von Peaks in einem tRFLP-Profil den Artenreichtum normalerweise unterschätzt. Außerdem werden seltene tRFs meist ausgeschlossen, entweder weil sie schon bei der Detektion unter einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert fallen oder dadurch, dass bei der Aufbereitung der Daten ein Schwellenwert für die relative Peakhöhe gesetzt wird. Dabei machen gerade diese seltenen Arten oft den Großteil der Diversität einer Gemeinschaft aus (Blackwood et al., 2007).

Generell sind tRFLPs eher zur Auflösung höherer taxonomischer Ebenen, weniger der Artebene geeignet (Fierer und Jackson, 2006), zumal sie insensitiv gegenüber Veränderungen auf der Ebene individueller Arten oder Genotypen sind, die aber sehr wohl für eine unterschiedliche physiologische Funktionalität der Gemeinschaft verantwortlich sein können (Buckley und Schmidt, 2001).

5.5.2 Nachweis der biokontrollaktiven Bakterien in der mikrobiellen Gemeinschaft

Es wurde überprüft, ob sich die tRFs der biokontrollaktiven Bakterienisolate in den tRFLP-Profilen der Rhizosphärenproben aus dem Gewächshausversuch wiederfinden ließen. Die drei *Bacillus*-Fragmente kamen in den Gesamtprofilen nur mit sehr geringer Abundanz vor, obwohl zwei Drittel der Isolate dieser Gattung angehörten. Das *Pseudomonas*-Fragment (ein Drittel der Isolate) hatte in den tRFLP-Profilen eine mittlere

Abundanz und das *Streptomyces*-Fragment (4 % der Isolate) eine relativ hohe Abundanz (Tab. 4.6, S. 93). Dies bestätigt die Vermutung, dass der Isolationsansatz aufgrund der unzureichenden Kultivierbarkeit vieler Bodenorganismen ein deutlich anderes Bild ergeben würde als der molekularbiologische Ansatz, der die gesamte mikrobielle Gemeinschaft erfasst und so völlig neue Einblicke erlaubt.

Bei Betrachtung der Abundanzen der *Streptomyces*- und *Pseudomonas*-Fragmente in den einzelnen Vegetationszyklen zeigte sich, dass beide Populationen einer zeitlichen Dynamik unterlagen. So konnte besonders im *Ggt*-inokulierten System ein Einbruch der Populationen in GH2 und GH3 (in denen der Befall besonders stark war) festgestellt werden (Abb. 4.22, S. 96). Anschließend erholten sich die Populationen; die *Streptomyces*-Abundanz stieg sogar über das Ausgangsniveau. Womöglich handelt es sich hier jedoch um andere Ökotypen als zu Beginn des Versuchs, die während des Aufbaus eines Take-all Declines induziert werden. Ökotypen sind physiologisch diverse Stämme, die sich in ihrer rRNA-Gensequenz jedoch nur unerheblich unterscheiden und damit das gleiche tRF haben (Becker et al., 2000). Eine solche Entwicklung ist für die DAPG-produzierenden Pseudomonaden gut dokumentiert, bei denen der TAD bestimmte Genotypen selektiert (De Souza et al., 2003b; Landa et al., 2006; Weller et al., 2002, 2007).

Im Laufe der fünf Vegetationszyklen veränderten sich jedoch nicht nur diese beiden Fragmente, sondern es gab in der gesamten Gemeinschaft massive strukturelle Shifts. Das zeigt deutlich, dass die Rhizosphärenpopulation starken Veränderungen unterliegt und neben *Streptomyces* und *Pseudomonas* noch viele andere, bisher nicht beschriebene Gruppen eine Rolle bei der Entwicklung von Suppressivität spielen. Dies müssen nicht unbedingt direkte Antagonisten gegen *Ggt* sein. Es kann sich zum Beispiel auch um Mikroben handeln, die eine günstige Wirkung auf die Antagonisten haben. McSpadden Gardener und Weller (2001) etwa stellten fest, dass sich in der Rhizosphäre *Ggt*-infizierter Weizenpflanzen *Chryseobacterium*-Spezies anreichern und postulierten, dass diese die *Ggt*-Suppression durch *Pseudomonas* fördern.

5.5.3 Welche Faktoren beeinflussen die bakterielle Diversität?

Der tRFLP-Datensatz wurde statistisch mittels Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Als multivariates Verfahren ist diese geeignet, um Muster in großen Datensätzen aufzudecken; sie erklärt jedoch nicht direkt, warum diese Muster existieren (Ramette, 2007). Die Korrelation mit Umweltvariablen liefert Hinweise auf die Ursachen der Verteilung. So konnte in der vorliegenden Analyse gezeigt werden, dass der Wurzelbefall durch *Ggt* ein wichtiger Einflussfaktor ist. Da im nicht inokulierten System eine ähnliche Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden konnte wie unter hohem Patho-

gendruck, scheint jedoch der Einfluss durch die Pflanze zu überwiegen. Garbeva et al. (2004) beschreiben, dass die Pflanze das Schlüsselement bei der Selektion bestimmter mikrobieller Populationen darstellt und dadurch starken Einfluss auf die Entstehung von Suppressivität hat.

Im untersuchten System, sowohl inokuliert als auch nicht inokuliert, fand denn auch der größte Populationsshift zwischen den ersten beiden Vegetationszyklen statt. Das lässt sich dadurch erklären, dass der Boden in GH1 zum ersten Mal überhaupt mit Sommergerste konfrontiert wurde. Die größte Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgte also an die Pflanze selbst, und zwar im Verlauf dieser ersten beiden Zyklen. Durch Fortsetzung der Monokultur wurde diese Anpassung dann verfeinert.

Hinter dem beobachteten Ordinationsmuster könnte somit folgender Mechanismus stehen: Im Laufe der Zeit, also über mehrere Vegetationszyklen hinweg, bildet sich nach und nach eine bakterielle Gemeinschaft heraus, die besonders an die Pflanze angepasst ist. Darunter sind auch potenzielle Antagonisten gegen *Ggt*. Die Entwicklung eines TAD-Stadiums beruht darauf, dass die Anwesenheit des Pathogens diese Antagonisten induziert und die entsprechenden Gene differenziell exprimiert werden.

5.6 Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, anhand des Pathosystems *Gaeumannomyces graminis* – Gerste grundlegende Mechanismen der antagonistischen Biokontrolle aufzuklären. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die molekularen Interaktionen zwischen pathogenem Pilz und mikrobiellen Antagonisten aus dem Versuchsboden gelegt. Es wurden jedoch auch die Veränderungen in der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre untersucht, die durch die Konfrontation der Gerste mit dem Pathogen ausgelöst werden. Eine der Arbeitshypothesen war, dass neben den bisher beschriebenen Antagonisten weitere Mikroorganismen eine Rolle bei der Suppression von *Ggt* spielen. Mit Hilfe molekularbiologischer Fingerprints konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass während der Entwicklung eines suppressiven TAD-Stadiums im Boden massive Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft stattfinden. Nur ein geringer Teil dieser Shifts konnte bekannten biokontrollaktiven Stämmen zugeordnet werden. Es sind also mit Sicherheit noch andere Gruppen beteiligt, die mit den bisherigen, meist kultivierungsabhängigen Methoden noch nicht erfasst wurden. Zudem konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die biokontrollaktiven Populationen während der TAD-Entwicklung induziert werden und ihre Abundanz deutlich zunimmt. Die Schlüsselrolle scheint dabei die Selektion einer spezifischen bakteriellen Gemeinschaft durch die Pflanze zu spielen.

Bei der Analyse pilzlicher Antagonisten in einem Isolationsansatz zeigte sich, dass nahezu die Hälfte der Isolate gegen *Ggt* aktiv war, dass diese Antagonisten vielen verschiedenen morphologischen Gruppen angehörten und dass diverse Formen des Antagonismus vorlagen. Bisher wurden Pilze im Zusammenhang mit dem TAD kaum erforscht, obwohl die vorliegenden Ergebnisse darauf hinweisen, dass gerade in dieser Gruppe zahlreiche und vielfältige Antagonisten gegen *Ggt* vorkommen.

Unter Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie gelang es, die Metaboliten zweier bakterieller Isolate (eines *Pseudomonas*- und eines *Bacillus*-Stammes), die besonders starken Antagonismus gezeigt hatten, als zyklische Lipopeptide zu identifizieren. Diese sind als oberflächenaktive Substanzen an vielen Prozessen beteiligt, welche in der Rhizosphäre ablaufen und die Interaktion zwischen Bakterien, pilzlichem Pathogen und Pflanze beeinflussen. Sie wurden jedoch zuvor nie als Inhibitoren von *Ggt* beschrieben. Somit bestätigte dieses Ergebnis die Vermutung, dass weitere mikrobielle Metaboliten an der Suppression von *Ggt* beteiligt sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass landwirtschaftlich genutzte Böden zahlreiche natürlich vorkommende Mikroorganismen beherbergen, die verschiedene antagonistische Wirkmechanismen gegen Phytopathogene besitzen und auf vielfältige Art und Weise interagieren können. Es darf jedoch spekuliert werden, dass die bisher bekannten Fakten über die Diversität mikrobieller Antagonisten nur die „Spitze des Eisbergs“ (Cook, 2007a) darstellen. Die tatsächliche Diversität der Gattungen, Spezies, Subspezies und Genotypen von Organismen, die als natürlich vorkommende Antagonisten von Pathogenen fungieren, liegt vermutlich noch viele Größenordnungen darüber. In ähnlich komplexer Weise, wie die verschiedenen Genotypen von DAPG-produzierenden *Pseudomonaden* an unterschiedliche Feldfrüchte, Böden und Klimate angepasst sind und spezifisch gegen bestimmte Phytopathogene wirken, tragen mit großer Wahrscheinlichkeit auch andere Spezies zur Suppression von Pflanzenkrankheiten in agrarischen und natürlichen Ökosystemen bei. Die Aufklärung dieser komplexen Interaktionen in der Rhizosphäre ist ein wichtiger Beitrag, um die Pathogen-Suppressivität von Böden zu verstehen und sie als Teil einer nachhaltigen Landwirtschaft, etwa durch gezielte Dünge- und Bewirtschaftungsmaßnahmen, auszuschöpfen.

6 Zusammenfassung

Die durch den bodenbürtigen phytopathogenen Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* hervorgerufene Schwarzbeinigkeit ist eine der weltweit bedeutendsten Wurzelkrankheiten von Weizen und Gerste. Sie kann erstaunlicherweise durch den Anbau der anfälligen Getreidearten in Monokultur eingedämmt werden. Dabei kommt es während der ersten Vegetationsperioden für gewöhnlich zu einem starken Krankheitsausbruch, dem jedoch nach wenigen Jahren ein plötzlicher Rückgang des Befalls folgt, der sogenannte „Take-all Decline“ (TAD). Es wird vermutet, dass dies eine natürliche Biokontrolle ist, beruhend auf der Entwicklung von Populationen antagonistischer Mikroorganismen, die in den suppressiven Böden hochwirksam gegen das Pathogen sind.

Zur Untersuchung der Mikroorganismen und Mechanismen, die zur Entstehung eines TADs beitragen, wurden zwei Biokontrollexperimente sowohl im Freiland als auch unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt. Bei beiden wurde Sommergerste (*Hordeum vulgare*) unter Pathogendruck in Monokultur angebaut, um die Entwicklung eines *Ggt*-suppressiven Stadiums im Boden zu stimulieren. Während sich der Feldversuch nach drei Jahren Monokultur noch in einer frühen Phase der TAD-Entwicklung befand, konnte im Gewächshausversuch im Rahmen von sechs unmittelbar aufeinander folgenden Vegetationsperioden ein stabiles TAD-Stadium etabliert werden.

Mittels molekularbiologischer Fingerprints wurde gezeigt, dass die Struktur der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft während der TAD-Entwicklung im Gewächshaus massiven Veränderungen unterlag, die mit der Herausbildung spezifischer antagonistischer Populationen einhergingen. Multivariate Analysen legten die Vermutung nahe, dass die Pflanze die Schlüsselrolle bei der Selektion dieser Gemeinschaft spielt, dass aber die Induktion der antagonistischen Gene durch den Pathogenangriff erfolgt.

Während der ersten Vegetationsperiode wurden aus Rhizosphärenproben beider Biokontrollexperimente 711 bakterielle und 699 pilzliche Isolate gewonnen und *in vitro* auf Antagonismus gegen *Ggt* getestet. 341 Pilz-Isolate, die eine große Anzahl unterschiedlicher morphologischer Gruppen darstellten, vermochten das Wachstum von *Ggt* in vielfältiger Art und Weise zu inhibieren. Bei den Bakterien wirkten 181 Isolate antagonistisch gegen *Ggt*. Fast zwei Drittel dieser Isolate zählten phylogenetisch zu verschiedenen Arten

der Gattung *Bacillus*, ein knappes Drittel gehörte der Gattung *Pseudomonas* an, und die restlichen Isolate zählten zu den Gattungen *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Variovorax*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* und *Aminobacter*.

Unter Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie wurden die *Ggt*-inhibierenden Metaboliten zweier bakterieller Isolate, die besonders starken Antagonismus zeigten (ein *Pseudomonas*- und ein *Bacillus*-Stamm), als zyklische Lipopeptide identifiziert. Das analysierte Isolat von *Bacillus subtilis* produzierte große Mengen des zyklischen Lipopeptids Surfactin, was den erwarteten Mechanismus bestätigte. Obwohl die antagonistische Wirkung von Pseudomonaden im Allgemeinen auf 2,4-Diacetylphloroglucinol zurückgeführt wird, wurden auch für das *Pseudomonas*-Isolat zyklische Lipopeptide (Tensin und Amphisin) als die aktiven Komponenten identifiziert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass landwirtschaftlich genutzte Böden zahlreiche natürlich vorkommende mikrobielle Antagonisten phytopathogener Pilze enthalten, die auf vielfältige Art und Weise interagieren können. Die Aufklärung dieser komplexen Interaktionen in der Rhizosphäre führt zu einem besseren Verständnis der Pathogen-Suppressivität bestimmter Böden und eröffnet neue Wege, sie als Teil einer nachhaltigen Landwirtschaft auszuschöpfen.

Literaturverzeichnis

- ABERRA, M. B., S. SEAH und K. SIVASITHAMPARAM. Suppression of the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) by a sterile red fungus through induced resistance in wheat (*Triticum aestivum*) seedling roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 30:1457–1461, 1998.
- ANDERSEN, J. B., B. KOCH, T. H. NIELSEN, D. SORENSEN, M. HANSEN, O. NYBROE, C. CHRISTOPHERSEN, J. SORENSEN, S. MOLIN und M. GIVSKOV. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology*, 149: 37–46, 2003.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26:32–46, 2001.
- ANDERSON, M. J. *PerMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance*. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand, 2005.
- ANDRADE, O. A., D. E. MATHRE und D. SANDS. Natural suppression of take-all disease of wheat in Montana soils. *Plant and Soil*, 164:9–18, 1994.
- ASHER, M. J. C. Effect of *Ophiobolus graminis* infection on the growth of wheat and barley. *Annals of Applied Biology*, 70:215–223, 1972.
- ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON. *Biology and Control of Take-all*. Academic Press Inc., London, 1981.
- AUGUSTIN, C., K. ULRICH, E. WARD und A. WERNER. RAPD-based inter- and intra-varietal classification of fungi of the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *Journal of Phytopathology*, 147:109–117, 1999.
- BACH, H. J., J. TOMANOVA, M. SCHLOTTER und J. C. MUNCH. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 49:235–245, 2002.
- BAILEY, D. J. und C. A. GILLIGAN. Dynamics of primary and secondary infection in take-all epidemics. *Phytopathology*, 89:84–91, 1999.
- BAIS, H. P., R. FALL und J. M. VIVANCO. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134:307–319, 2004.

- BAKER, G. C., J. J. SMITH und D. A. COWAN. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55:541–555, 2003.
- BARNETT, S. J., I. SINGLETON und M. RYDER. Spatial variation in populations of *Pseudomonas corrugata* 2140 and pseudomonads on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:633–636, 1999.
- BATEMAN, G. L. und D. HORNBY. Comparison of natural and artificial epidemics of take-all in sequences of winter wheat crops. *Annals of Applied Biology*, 135:555–571, 1999.
- BATEMAN, G. L., E. WARD und J. F. ANTONIW. Identification of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *avenae* using a DNA probe and non-molecular methods. *Mycological Research*, 96:737–742, 1992.
- BATEMAN, G. L., R. J. GUTTERIDGE, J. F. JENKYN und M. M. SELF. Effects of fluquinconazole and silthiofam, applied as seed treatments to single or consecutive crops of wheat, on take-all epidemic development and grain yields. *Annals of Applied Biology*, OnlineEarly Article, 2007.
- BAUMGART, F., B. KLUGE, C. ULLRICH, J. VATER und D. ZIESSOW. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177:998–1005, 1991.
- BEALE, R. E., D. P. PHILLION, J. M. HEADRICK, P. O'REILLY und J. COX. MON65500: a unique fungicide for the control of take-all in wheat. In *Proceedings of the British Crop Protection Conference - Pests and Diseases, 1998*, S. 343–350. British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1998.
- BECKER, S., P. BOGER, R. OEHLMANN und A. ERNST. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4945–53, 2000.
- BENT, S. J., J. D. PIERSON, L. J. FORNEY, R. DANOVARO, G. M. LUNA, A. DELL'ANNO und B. PIETRANGELI. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:2399–2401, 2007.
- BLACKWOOD, C. B. und J. S. BUYER. Evaluating the physical capture method of terminal restriction fragment length polymorphism for comparison of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:590–599, 2007.
- BLACKWOOD, C. B., T. MARSH, S.-H. KIM und E. A. PAUL. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:926–932, 2003.
- BLACKWOOD, C. B., D. HUDLESTON, D. R. ZAK und J. S. BUYER. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:5276–83, 2007.

- BONMATIN, J.-M., M. GENEST, H. LABBÉ und M. PTAK. Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by $^1\text{H-NMR}$, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers*, 34:975–986, 1994.
- BONMATIN, J. M., O. LAPREVOTE und F. PEYPOUX. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6:541–556, 2003.
- BONSALL, R., D. WELLER und L. THOMASHOW. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:951–955, 1997.
- BORNEMAN, J. und J. O. BECKER. Identifying microorganisms involved in specific pathogen suppression in soil. *Annual Review of Phytopathology*, 45:153–172, 2007.
- BRYAN, G. T., M. J. DANIELS und A. E. OSBOURN. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:681–9, 1995.
- BRYAN, G. T., E. LABOURDETTE, R. E. MELTON, P. NICHOLSON, M. J. DANIELS und A. E. OSBOURN. DNA polymorphism and host range in the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Mycological Research*, 103:319–327, 1999.
- BUCKLEY, D. H. und T. M. SCHMIDT. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*, 42:11–21, 2001.
- BULL, C. T., D. M. WELLER und L. S. THOMASHOW. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81:954–959, 1991.
- BUSSABAN, B., S. LUMYONG, P. LUMYONG, E. H. MCKENZIE und K. D. HYDE. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:943–948, 2001.
- CARRIGG, C., O. RICE, S. KAVANAGH, G. COLLINS und V. O’FLAHERTY. DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77:955–64, 2007.
- CAZORLA, F. M., D. ROMERO, A. PÉREZ-GARCÍA, B. J. J. LUGTENBERG, A. D. VICENTE und G. BLOEMBERG. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103:1950–1959, 2007.
- CHAKRABORTY, S. und J. H. WARCUP. Soil amoebae and saprophytic survival of *Gaeumannomyces graminis tritici* in a suppressive pasture soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 15:181–185, 1983.
- CHAKRABORTY, S. und J. H. WARCUP. Populations of mycophagous and other amoebae in take-all suppressive and non-suppressive soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 16:197–199, 1984.

- CHALLIS, G. L. und J. H. NAISMITH. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 14:748–756, 2004.
- CHAPON, A., A.-Y. GUILLERM, L. DELALANDE, L. LEBRETON und A. SARNIGUET. Dominant colonisation of wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 108:449–459, 2002.
- CHEN, X. H., A. KOUMOUTSI, R. SCHOLZ, A. EISENREICH, K. SCHNEIDER, I. HEINEMEYER, B. MORGENSTERN, B. VOSS, W. R. HESS, O. REVA, H. JUNGE, B. VOIGT, P. R. JUNGBLUT, J. VATER, R. SUSSMUTH, H. LIESEGANG, A. STRITTMATTER, G. GOTTSCHALK und R. BORRIS. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25:1007–1014, 2007.
- CHOWDHURY, S. K., V. KATTA, R. C. BEAVIS und B. T. CHAIT. Origin and removal of adducts (molecular mass = 98 u) attached to peptide and protein ions in electrospray ionization mass spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1: 382–388, 1990.
- CLAPPERTON, M. J., N. O. LEE, F. BINET und R. L. CONNER. Earthworms indirectly reduce the effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on soft white spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Fielder). *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1531–1538, 2001.
- CLARKSON, D. T., M. C. DREW, I. B. FERGUSON und J. SANDERSON. The effect of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, on the transport of ions by wheat plants. *Physiological Plant Pathology*, 6:75–84, 1975.
- CLARKSON, J. D. S. und R. W. POLLEY. Diagnosis, assessment, crop-loss appraisal and forecasting. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 251–269. Academic Press Inc., London, 1981.
- CLEMENT, B. G., L. E. KEHL, K. L. DEBORD und C. L. KITTS. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 31:135–142, 1998.
- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. *Distribution Maps of Plant Diseases*, Vol. 334. CAB International, Wallingford, UK, 4th edition, 1984.
- COOK, R. Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62:73–86, 2003.
- COOK, R. Management of resident plant growth-promoting rhizobacteria with the cropping system: a review of experience in the US Pacific Northwest. *European Journal of Plant Pathology*, 119:255–264, 2007a.
- COOK, R. J. Tell me again what it is that you do. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 1–23, 2007b.

- COOK, R. J. Take-all decline: model system in the science of biological control and clue to the success of intensive cropping. In VINCENT, C., M. S. GOETTEL und G. LAZAROVITS (Hrsg.), *Biological Control: A Global Perspective*, S. 399–414. CAB International, Wallingford, UK, 2007c.
- COOK, R. J. The influence of rotation crops on take-all decline phenomenon. *Phytopathology*, 71:189–192, 1981.
- COOK, R. J. und A. D. ROVIRA. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:269–273, 1976.
- COOMBS, J. T., P. P. MICHELSEN und C. M. M. FRANCO. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*, 29:359–366, 2004.
- COOPER, D. G., C. R. MACDONALD, S. J. DUFF und N. KOSARIC. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42:408–412, 1981.
- CUNNINGHAM, P. C. Isolation and culture. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 103–123. Academic Press Inc., London, 1981.
- DE SOUZA, J. T., M. DE BOER, P. DE WAARD, T. A. VAN BEEK und J. M. RAAIJMAKERS. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7161–7172, 2003a.
- DE SOUZA, J. T., D. M. WELLER und J. M. RAAIJMAKERS. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology*, 93:54–63, 2003b.
- DEACON, J. W. Biological control of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, by *Phialophora radiculicola* and similar fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 8:275–283, 1976.
- DEACON, J. W. Ecological relationships with other fungi: competitors and hyperparasites. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 75–101. Academic Press Inc., London, 1981.
- DEAN, R. A., N. J. TALBOT, D. J. EBBOLE, M. L. FARMAN, T. K. MITCHELL, M. J. ORBACH, M. THON, R. KULKARNI, J.-R. XU, H. PAN, N. D. READ, Y.-H. LEE, I. CARBONE, D. BROWN, Y. Y. OH, N. DONOFRIO, J. S. JEONG, D. M. SOANES, S. DJONOVIC, E. KOLOMIETS, C. REHMEYER, W. LI, M. HARDING, S. KIM, M.-H. LEBRUN, H. BOHNERT, S. COUGHLAN, J. BUTLER, S. CALVO, L.-J. MA, R. NICOL, S. PURCELL, C. NUSBAUM, J. E. GALAGAN und B. W. BIRREN. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434:980–986, 2005.

- DEWAN, M. und K. SIVASITHAMPARAM. Occurrence of species of *Aspergillus* and *Penicillium* in roots of wheat and ryegrass and their effect on root rot caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Australian Journal of Botany*, 36:701–710, 1988.
- DOMSCH, K. H., W. GAMS und T. H. ANDERSON. *Compendium of Soil Fungi*, Bd. 1. IHW-Verlag, Eching, 1993.
- DOWLING, D. N. und F. O'GARA. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12:133–141, 1994.
- DUBUIS, C., C. KEEL und D. HAAS. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology*, 119:311–328, 2007.
- DUFFY, B. und D. WELLER. A semiselective and diagnostic medium for *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Phytopathology*, 84:1407–1415, 1994.
- DUFFY, B. und D. M. WELLER. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. *Plant Disease*, 79:907–911, 1995.
- DUFFY, B., A. SIMON und D. WELLER. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86:188–194, 1996.
- DUFOUR, S., M. DELEU, K. NOTT, B. WATHELET, P. THONART und M. PAQUOT. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726:87–95, 2005.
- DUNBAR, J., L. O. TICKNOR und C. R. KUSKE. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:190–197, 2001.
- EL-TARABILY, K. A. und K. SIVASITHAMPARAM. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1505–1520, 2006.
- ELLIOTT, M. L. Determination of an etiological agent of bermudagrass decline. *Phytopathology*, 81:1380–1384, 1991.
- ENGBRETSON, J. J. und C. L. MOYER. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4823–9, 2003.
- FENN, J. B., M. MANN, C. K. MENG, S. F. WONG und C. M. WHITEHOUSE. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246:64–71, 1989.
- FIERER, N. und R. B. JACKSON. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:626–631, 2006.

- FONTAINE, M. und E. GUILLOT. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters*, 214:13–17, 2002.
- FOULY, H. M. und H. T. WILKINSON. A group I intron in the nuclear small subunit ribosomal DNA of *Gaeumannomyces graminis*. *Current Microbiology*, 40:291–296, 2000a.
- FOULY, H. M. und H. T. WILKINSON. Detection of *Gaeumannomyces graminis* varieties using polymerase chain reaction with variety-specific primers. *Plant Disease*, 84:947–951, 2000b.
- FOULY, H. M., H. T. WILKINSON und L. L. DOMIER. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. *Soil Biology and Biochemistry*, 28:703–710, 1996.
- FRANKLAND, J. C., J. DIGHTON und L. BODDY. Methods for studying fungi in soil and forest litter. In *Methods in Microbiology*, Bd. 22, S. 343–404. Academic Press, 1990.
- FREEMAN, J. und E. WARD. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology*, 5:235–252, 2004.
- FREEMAN, J., E. WARD, R. J. GUTTERIDGE und G. L. BATEMAN. Methods for studying population structure, including sensitivity to the fungicide silthiofam, of the cereal take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Pathology*, 54:686–698, 2005.
- GAMS, W. *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. *Studies in Mycology*, 45:187–199, 2000.
- GARBEVA, P., J. A. VAN VEEN und J. D. VAN ELSAS. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42:243–270, 2004.
- GARRETT, S. D. Introduction. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 1–11. Academic Press Inc., London, 1981.
- GARRITY, G. M., J. A. BELL und T. G. LILBURN. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York, Zweite Ausgabe, 2004.
- GENOWATI, I. *Take-all in wheat: PCR identification of the pathogen and the interactions amongst potential biological control agents*. Master of Science, Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001.
- GERLAGH, M. Introduction of *Ophiobolus graminis* into new polders and its decline. *European Journal of Plant Pathology*, 74 (Supplement 2):1–97, 1968.
- GHISALBERTI, E. L., M. J. NARBAY, M. M. DEWAN und K. SIVASITHAMPARAM. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil*, 121:287–291, 1990.

- GILLIGAN, C., P. BRASSETT und A. CAMPBELL. Modelling of early infection of cereal roots by the take-all fungus: a detailed mechanistic simulator. *New Phytologist*, 128: 515–537, 1994.
- GRIFFITHS, R. I., A. S. WHITELEY, A. G. O'DONNELL und M. J. BAILEY. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5488–5491, 2000.
- GULLEROUX, M. und A. OSBOURN. Gene expression during infection of wheat roots by the „take-all“ fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Molecular Plant Pathology*, 5: 203–216, 2004.
- GUTTERIDGE, R., J.-P. ZHANG, J. JENKYN und G. BATEMAN. Survival and multiplication of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (the wheat take-all fungus) and related fungi on different wild and cultivated grasses. *Applied Soil Ecology*, 29:143–154, 2005.
- GUTTERIDGE, R. J., G. L. BATEMAN und A. D. TODD. Variation in the effects of take-all disease on grain yield and quality of winter cereals in field experiments. *Pest Management Science*, 59:215–224, 2003.
- GUTTERIDGE, R. J., J. F. JENKYN und G. L. BATEMAN. The potential of non-pathogenic *Gaeumannomyces* spp., occurring naturally or introduced into wheat crops or preceding crops, for controlling take-all in wheat. *Annals of Applied Biology*, 150: 53–64, 2007.
- HAAS, D. und G. DÉFAGO. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3:307–319, 2005.
- HAAS, D. und C. KEEL. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41:117–153, 2003.
- HAGN, A. *Einfluss verschiedener Bewirtschaftungssysteme auf die Diversität von Bodenpilzen*, Bd. 63 der Reihe *FAM-Bericht*. Shaker Verlag, Aachen, 2004.
- HAMDAN, H., D. M. WELLER und L. S. THOMASHOW. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:3270–3277, 1991.
- HARMAN, G. E., C. R. HOWELL, A. VITERBO, I. CHET und M. LORITO. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43–56, 2004.
- HARTMANN, M. und F. WIDMER. Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. *FEMS Microbiology Ecology*, OnlineEarly:1–12, 2008.
- HEEB, S. und D. HAAS. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 14: 1351–1363, 2001.

- HEERKLOTZ, H., T. WIEPRECHT und J. SEELIG. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:4909–4915, 2004.
- HENRIKSEN, A., U. ANTHONI, T. H. NIELSEN, J. SØRENSEN, C. CHRISTOPHERSEN und M. GAJHEDE. Cyclic lipoundecapeptide tensin from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Acta Crystallographica Section C*, 56:113–115, 2000.
- HENRY, S., D. BRU, B. STRES, S. HALLET und L. PHILIPPOT. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:5181–5189, 2006.
- HENSON, J. M. DNA probe for identification of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:284–288, 1989.
- HENSON, J. M. DNA hybridization and polymerase chain reaction (PCR) tests for identification of *Gaeumannomyces*, *Phialophora* and *Magnaporthe* isolates. *Mycological Research*, 96:629–636, 1992.
- HENSON, J. M., T. GOINS, W. GREY, D. E. MATHRE und M. L. ELLIOTT. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology*, 83:283–287, 1993.
- HENSON, J. M., M. J. BUTLER und A. W. DAY. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 37:447–471, 1999.
- HERDINA und D. K. ROGET. Prediction of take-all disease risk in field soils using a rapid and quantitative DNA soil assay. *Plant and Soil*, 227:87–98, 2000.
- HERDINA, H. A. YANG und K. OPHEL-KELLER. Correlation of take-all disease severity and inoculum level of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* using a slot-blot hybridization assay. *Mycological Research*, 101:1311–1317, 1997.
- HERDINA, S. NEATE, S. JABAJI-HARE und K. OPHEL-KELLER. Persistence of DNA of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil as measured by a DNA-based assay. *FEMS Microbiology Ecology*, 47:143–152, 2004.
- HESS, M. *Vorkommen und Bedeutung der Schwarzbeinigkeit, verursacht durch den Pilz Gaeumannomyces graminis, an Winterweizen in Deutschland als Grundlage für die Anwendung neuer Beizmittel*. Dissertation, Technische Universität München, 2006.
- HESS, M. und J. HABERMAYER. Auftreten und Bedeutung der Schwarzbeinigkeit in Deutschland. *Getreide Magazin*, 5:2–5, 1999.
- HEUER, H., M. KRSEK, P. BAKER, K. SMALLA und E. M. WELLINGTON. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3233–3241, 1997.

- HOLLINS, T. W., P. R. SCOTT und R. S. GREGORY. The relative resistance of wheat, rye and triticale to take-all caused by *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 35: 93–100, 1986.
- HOMMA, Y., J. W. SITTON, R. J. COOK und K. M. OLD. Perforation and destruction of pigmented hyphae of *Gaeumannomyces graminis* by vampyrellid amoebae from Pacific Northwest wheat field soils. *Phytopathology*, 69:1118–1122, 1979.
- HORNBY, D. The problems of trying to forecast take-all. In SCOTT, P. R. und A. BAINBRIDGE (Hrsg.), *Plant Disease Epidemiology*, S. 151–158. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
- HORNBY, D. Inoculum. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 271–293. Academic Press Inc., London, 1981.
- HORNBY, D. *Take-all Disease of Cereals: A Regional Perspective*. CAB International, Wallingford, UK, 1998.
- HUBER, D. M. The role of nutrients and chemicals. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 417–431. Academic Press Inc., London, 1981.
- HUGENHOLTZ, P., B. M. GOEBEL und N. R. PACE. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180:4765–4774, 1998.
- JUHNKE, M. E., D. E. MATHRE und D. C. SANDS. A selective medium for *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Disease*, 68:233–236, 1984.
- KABBAGE, M. und W. W. BOCKUS. Effect of placement of inoculum of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on severity of take-all in winter wheat. *Plant Disease*, 86:298–303, 2002.
- KAPLAN, C. W. und C. L. KITTS. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *Journal of Microbiological Methods*, 54:121–125, 2003.
- KEARNS, D. B., F. CHU, R. RUDNER und R. LOSICK. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Molecular Microbiology*, 52:357–369, 2004.
- KEEL, C., U. SCHNIDER, M. MAURHOFER, C. VOISARD, J. LAVILLE, U. BURGER, P. WIRTHNER, D. HAAS und G. DÉFAGO. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5:4–13, 1992.
- KEEL, C., D. WELLER, A. NATSCH, G. DÉFAGO, R. COOK und L. THOMASHOW. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:552–563, 1996.

- KHAOSAAD, T., J. M. GARCIA-GARRIDO, S. STEINKELLNER und H. VIERHEILIG. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 39:727–734, 2007.
- KIM, D.-S., R. J. COOK und D. M. WELLER. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87:551–558, 1997a.
- KIM, D.-S., D. M. WELLER und R. J. COOK. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 87:559–564, 1997b.
- KLOPPER, J., J. LEONG, M. TEINTZE und M. SCHROTH. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4:317–320, 1980.
- KOCH, B., T. H. NIELSEN, D. SØRENSEN, J. B. ANDERSEN, C. CHRISTOPHERSEN, S. MOLIN, M. GIVSKOV, J. SØRENSEN und O. NYBROE. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4509–4516, 2002.
- KOHLMEYER, J., B. VOLKMANN-KOHLMEYER und O. E. ERIKSSON. Fungi on *Juncus roemerianus*. 4. New marine ascomycetes. *Mycologia*, 87:532–542, 1995.
- KOUMOUTSI, A., X. H. CHEN, A. HENNE, H. LIESEGANG, G. HITZEROTH, P. FRANKKE, J. VATER und R. BORRIS. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186:1084–1096, 2004.
- KUSKE, C. R., L. O. TICKNOR, M. E. MILLER, J. M. DUNBAR, J. A. DAVIS, S. M. BARNES und J. BELNAP. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1854–1863, 2002.
- LANDA, B. B., O. V. MAVRODI, K. L. SCHROEDER, R. ALLENDE-MOLAR und D. M. WELLER. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 55:351–368, 2006.
- LANDSCHOOT, P. J. und N. JACKSON. *Gaeumannomyces incrustans* sp. nov., a root-infecting hyphopodiate fungus from grass roots in the United States. *Mycological Research*, 93:55–58, 1989.
- LAVILLE, J., C. VOISARD, C. KEEL, M. MAURHOFER, G. DÉFAGO und D. HAAS. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:1562–1566, 1992.
- LAZAZZERA, B. A., I. G. KURTSE, R. S. MCQUADE und A. D. GROSSMAN. An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 181:5193–5200, 1999.

- LEBUHN, M., M. SCHLOTTER, A. HAGN, M. HESS, A. HARTMANN und J. C. MUNCH. Einfluß landwirtschaftlicher Nutzungssysteme auf die mikrobielle Diversität und den *Gaeumannomyces*-Befall. In *FAM-Bericht*, Bd. 48, S. 105–113. Shaker Verlag, Aachen, 2000.
- LEGENDRE, P. und E. D. GALLAGHER. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129:271–280, 2001.
- LENNOX, E. S. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1:190–206, 1955.
- LEPŠ, J. und P. ŠMILAUER. *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*. Cambridge University Press, 2003.
- LEYER, I. und K. WESCHE. *Multivariate Statistik in der Ökologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Erste Ausgabe, 2007.
- LIU, W., T. MARSH, H. CHENG und L. FORNEY. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4516–4522, 1997.
- LÖCHEL, A. M., M. WENZ, P. E. RUSSELL, H. BUSCHHAUS, P. H. EVANS, S. CROSS, T. PUHL und E. BARDSLEY. Root protection using fluquinconazole: a new approach to controlling cereal take-all. In *Proceedings of the British Crop Protection Conference - Pests and Diseases, 1998*, S. 89–96. British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1998.
- LOCKHART, D., V. HEPPEL und J. HOLMES. Take-all (*Gaeumannomyces graminis* (Sacc) Arx et Oliver): Incidence in continuous barley growing and effect of tillage method. *EPPO Bulletin*, 5:375–383, 1975.
- LOPER, J. E. und J. S. BUYER. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 4:5–13, 1991.
- LUGTENBERG, B. J., L. DEKKERS und G. V. BLOEMBERG. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 39: 461–490, 2001.
- MAGET-DANA, R. und F. PEYPOUX. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87:151–174, 1994.
- MAGET-DANA, R. und M. PTAK. Interactions of surfactin with membrane models. *Biophysical Journal*, 68:1937–1943, 1995.
- MANLY, B. F. J. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methodology in Biology*, Bd. 70 der Reihe *Texts in Statistical Science*. Chapman and Hall/CRC, London, 1997.
- MARSH, T. L. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism. *Methods in Enzymology*, 397:308–329, 2005.

- MARSH, T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2:323–327, 1999.
- MARSH, T. L., P. SAXMAN, J. COLE und J. TIEDJE. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3616–20, 2000.
- MARSHALL, A. G. Milestones in fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200: 331–356, 2000.
- MATHRE, D. E., R. H. JOHNSTON und W. E. GREY. Biological control of take-all disease of wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* under field conditions using a *Phialophora* sp. *Biocontrol Science and Technology*, 8:449–457, 1998.
- MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:557–564, 2002.
- MAZZOLA, M., D. K. FUJIMOTO, L. S. THOMASHOW und R. J. COOK. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2554–2559, 1995.
- MAZZOLA, M., D. L. FUNNELL und J. M. RAALJMAKERS. Wheat cultivar-specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microbial Ecology*, 48:338–348, 2004.
- MCARDLE, B. H. und M. J. ANDERSON. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, 82:290–297, 2001.
- MCCUNE, B., J. B. GRACE und D. L. URBAN. *Analysis of Ecological Communities*. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA, 2002.
- MCSPADDEN GARDENER, B. B. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 97:221–226, 2007.
- MCSPADDEN GARDENER, B. B. und D. M. WELLER. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4414–4425, 2001.
- MCSPADDEN GARDENER, B. B., M.-S. BENITEZ, A. CAMP und C. ZUMPETTA. Evaluation of a seed treatment containing a *phlD*+ strain of *Pseudomonas fluorescens* on organic soybeans, 2005. Report 21:FC046, American Phytopathological Society, 2006a.
- MCSPADDEN GARDENER, B. B., C. KROON VAN DIENST und J. BEUERLEIN. Evaluation of biological seed treatments containing *phlD*+ strains of *Pseudomonas fluorescens* on soybeans grown in Ohio, 2005. Report 21:FC045, American Phytopathological Society, 2006b.

- MIELKE, H. *Untersuchungen zum Befall der Gerste durch Gaeumannomyces graminis (Sacc.) von Arx et Olivier var. tritici Walker unter Berücksichtigung der Arten- und Sortenanfälligkeit*, Bd. 276 der Reihe *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1992.
- MIELKE, H. *Studien zum Befall des Weizens mit Gaeumannomyces graminis (Sacc.) von Arx et Olivier var. tritici Walker unter Berücksichtigung der Sorten- und Artenanfälligkeit sowie der Bekämpfung des Erregers*, Bd. 359 der Reihe *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1998.
- MUMY, K. L. und R. H. FINDLAY. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 57:259–268, 2004.
- NAKANO, M. M., R. MAGNUSON, A. MYERS, J. CURRY, A. D. GROSSMAN und P. ZUBER. *urfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173:1770–1778, 1991.
- NAKATSU, C. H., V. TORSVIK und L. OVREAS. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 64:1382–1388, 2000.
- NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, 60:151–166, 1996.
- NIELSEN, T. H. und J. SØRENSEN. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:861–868, 2003.
- NIELSEN, T. H., C. THRANE, C. CHRISTOPHERSEN, U. ANTHONI und J. SØRENSEN. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Journal of Applied Microbiology*, 89:992–1001, 2000.
- NIELSEN, T. H., D. SØRENSEN, C. TOBIASEN, J. B. ANDERSEN, C. CHRISTOPHERSEN, M. GIVSKOV und J. SØRENSEN. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3416–3423, 2002.
- NIELSEN, T. H., O. NYBROE, B. KOCH, M. HANSEN und J. SØRENSEN. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:4112–4116, 2005.
- NÜBEL, U., B. ENGELEN, A. FELSKE, J. SNAIDR, A. WIESHUBER, R. I. AMANN, W. LUDWIG und H. BACKHAUS. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178:5636–5643, 1996.

- O'DELL, M., R. B. FLAVELL und T. W. HOLLINS. The classification of isolates of *Gaeumannomyces graminis* from wheat, rye and oats using restriction fragment length polymorphisms in families of repeated DNA sequences. *Plant Pathology*, 41:554–562, 1992.
- OKA, K., T. HIRANO, M. HOMMA, H. ISHII, K. MURAKAMI, S. MOGAMI, A. MOTIZUKI, H. MORITA, K. TAKEYA und H. ITOKAWA. Satisfactory separation and MS-MS spectrometry of six surfactins isolated from *Bacillus subtilis natto*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 41:1000–1002, 1993.
- OPHEL-KELLER, K., B. ENGEL und K. HEINRICH. Specific detection of *Gaeumannomyces graminis* in soil using polymerase chain reaction. *Mycological Research*, 99: 1385–1390, 1995.
- ORPHAN, V. J., K. U. HINRICHS, R. USSLER, W., C. K. PAULL, L. T. TAYLOR, S. P. SYLVA, J. M. HAYES und E. F. DELONG. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:1922–1934, 2001.
- OSBORN, A. M., E. R. B. MOORE und K. N. TIMMIS. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2:39–50, 2000.
- OU, S. H. *Rice diseases*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, Erste Ausgabe, 1972.
- PÉREZ-PIQUERES, A., V. EDEL-HERMANN, C. ALABOUVETTE und C. STEINBERG. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:460–470, 2006.
- PEYPOUX, F., J. M. BONMATIN, H. LABBE, I. GRANGEMARD, B. C. DAS, M. PTAK, J. WALLACH und G. MICHEL. [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *European Journal of Biochemistry*, 224: 89–96, 1994.
- PEYPOUX, F., J. M. BONMATIN und J. WALLACH. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:553–563, 1999.
- PFENNIG, N. und K. D. LIPPERT. Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archives of Microbiology*, 55:245–256, 1966.
- PIERSON, E. A. und D. M. WELLER. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 84:940–947, 1994.
- PIERSON, III, L. S. und E. A. PIERSON. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiology Letters*, 136:101–108, 1996.
- RAAIJMAKERS, J., D. WELLER und L. THOMASHOW. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:881–887, 1997.

- RAAIJMAKERS, J. M. und D. M. WELLER. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 11:144–152, 1998.
- RAAIJMAKERS, J. M., I. DE BRUIJN und M. J. DE KOCK. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19:699–710, 2006.
- RACHDAWONG, S. *PCR-based test for differentiating varieties of Gaeumannomyces graminis, the take-all pathogens*. Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1999.
- RACHDAWONG, S., C. L. CRAMER, E. A. GRABAU, V. K. STROMBERG, G. H. LACY und E. L. STROMBERG. *Gaeumannomyces graminis* vars. *avenae*, *graminis*, and *tritici* identified using PCR amplification of avenacinase-like genes. *Plant Disease*, 86:652–660, 2002.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007.
- ROGET, D. K. Prediction modelling of soilborne plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 30:85–89, 2001.
- ROMERO, D., A. DE VICENTE, J. L. OLMOS, J. C. DAVILA und A. PÉREZ-GARCÍA. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, 103:969–976, 2007a.
- ROMERO, D., A. DE VICENTE, R. H. RAKOTOALY, S. E. DUFOUR, J.-W. VEENING, E. ARREBOLA, F. M. CAZORLA, O. P. KUIPERS, M. PAQUOT und A. PÉREZ-GARCÍA. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20:430–440, 2007b.
- RON, E. Z. und E. ROSENBERG. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3:229–236, 2001.
- ROSENBERG, E. Biosurfactants. In DWORKIN, M., S. FALKOW, E. ROSENBERG, K.-H. SCHLEIFER und E. STACKEBRANDT (Hrsg.), *The Prokaryotes*, Bd. 1, S. 834–849. Springer, New York, Dritte Ausgabe, 2006.
- ROVIRA, A. D. und R. CAMPBELL. A scanning electron microscope study of interactions between micro-organisms and *Gaeumannomyces graminis* (Syn. *Ophiobolus graminis*) on wheat roots. *Microbial Ecology*, 2:177–185, 1975.
- ROVIRA, A. D. und G. B. WILDERMUTH. The nature and mechanisms of suppression. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 385–415. Academic Press Inc., London, 1981.

- RYDER, M. H., Z. YAN, T. E. TERRACE, A. D. ROVIRA, W. TANG und R. L. CORRELL. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:19–29, 1999.
- SALKIN, I. F. und N. HURD. Quantitative evaluation of the antifungal properties of cycloheximide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1:177–184, 1972.
- SAMBROOK, J. und D. W. RUSSEL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Dritte Ausgabe, 2001.
- SARNIGUET, A., P. LUCAS und M. LUCAS. Relationships between take-all, soil conduciveness to the disease, populations of fluorescent pseudomonads and nitrogen fertilizers. *Plant and Soil*, 145:17–27, 1992.
- SCHENA, L., K. J. D. HUGHES und D. E. L. COOKE. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology*, 7:365–379, 2006.
- SCHESSER, K., A. LUDER und J. M. HENSON. Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:553–556, 1991.
- SCHOENY, A. und P. LUCAS. Modeling of take-all epidemics to evaluate the efficacy of a new seed-treatment fungicide on wheat. *Phytopathology*, 89:954–961, 1999.
- SCHRÖDER, P., B. HUBER, U. OLAZÁBAL, A. KÄMMERER und J. C. MUNCH. Land use and sustainability: FAM Research Network on Agroecosystems. *Geoderma*, 105:155–166, 2002.
- SCOTT, P. R. Variation in host susceptibility. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 219–236. Academic Press Inc., London, 1981.
- SESMA, A. und A. E. OSBOURN. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*, 431:582–586, 2004.
- SHIPTON, P. J., R. J. COOK und J. W. SITTON. Occurrence and transfer of a biological factor in soil that suppresses take-all in wheat in eastern Washington. *Phytopathology*, 63:511–517, 1973.
- SIMON, A. Biological control of take-all of wheat by *Trichoderma koningii* under controlled environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:323–326, 1989.
- SIMON, A. und K. SIVASITHAMPARAM. Pathogen-suppression: a case study in biological suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:331–337, 1989.
- SIVASITHAMPARAM, K. und C. A. PARKER. Physiology and nutrition in culture. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 125–150. Academic Press Inc., London, 1981.

- SKOU, J. P. Morphology and cytology of the infection process. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 175–197. Academic Press Inc., London, 1981.
- SMILEY, R. W. Antagonists of *Gaeumannomyces graminis* from the rhizoplane of wheat in soils fertilized with ammonium- or nitrate-nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 10:169–174, 1978a.
- SMILEY, R. W. Colonization of wheat roots by *Gaeumannomyces graminis* inhibited by specific soils, microorganisms and ammonium-nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 10:175–179, 1978b.
- SMILEY, R. W., H. P. COLLINS und P. E. RASMUSSEN. Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon. *Plant Disease*, 80:813–820, 1996.
- SØRENSEN, D. *Cyclic lipopeptides from Pseudomonas spp. - Study and characterization of novel antibiotics and biocontrol agents*. Dissertation, University of Copenhagen, 2002.
- SØRENSEN, D., T. H. NIELSEN, C. CHRISTOPHERSEN, J. SØRENSEN und M. GAJHED. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta Crystallographica Section C*, 57:1123–1124, 2001.
- SPEAKMAN, J. B. und B. G. LEWIS. Limitation of *Gaeumannomyces graminis* by wheat root responses to *Phialophora radiculicola*. *New Phytologist*, 80:373–380, 1978.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56:845–857, 2005.
- STEPHENS, P. M. und C. W. DAVOREN. Effect of the lumbricid earthworm *Aporrectodea trapezoides* on wheat grain yield in the field, in the presence or absence of *Rhizoctonia solani* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 561–567, 1996.
- SUZUKI, M. T. und S. J. GIOVANNONI. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:625–30, 1996.
- TAN, M. K., P. T. W. WONG und M. P. HOLLEY. Characterization of nuclear ribosomal DNA (rDNA) in *Gaeumannomyces graminis* and correlation of rDNA variation with *G. graminis* varieties. *Mycological Research*, 98:553–561, 1994.
- TER BRAAK, C. J. F. und P. ŠĀMILAUER. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5)*. Microcomputer Power, Ithaca NY, USA, 2002.
- THOMAS, S. L. *The development and utilization of assays to characterize populations of Gaeumannomyces graminis*. Dissertation, The Ohio State University, 2004.
- THOMASHOW, L. S. und D. M. WELLER. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170:3499–3508, 1988.

- TORSVIK, V., J. GOKSOYR und F. L. DAAE. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:782–787, 1990.
- TOTTMAN, D. R. und H. BROAD. The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology*, 110:441–454, 1987.
- TRAN, H., A. FICKE, T. ASIIMWE, M. HOFTE und J. M. RAAIJMAKERS. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175: 731–742, 2007.
- VATER, J., B. KABLITZ, C. WILDE, P. FRANKE, N. MEHTA und S. S. CAMEOTRA. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:6210–6219, 2002.
- VINCENT, C., M. S. GOETTEL und G. LAZAROVITS. *Biological Control: A Global Perspective*. CAB International, Wallingford, UK, 2007.
- VOLLENBROICH, D., M. OZEL, J. VATER, R. M. KAMP und G. PAULI. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25:289–297, 1997a.
- VOLLENBROICH, D., G. PAULI, M. OZEL und J. VATER. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:44–49, 1997b.
- VON WINTZINGERODE, F., U. B. GOBEL und E. STACKEBRANDT. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21:213–229, 1997.
- WAGNER, M., H. SMIDT, A. LOY und J. ZHOU. Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: challenges and future directions. *Microbial Ecology*, 53:498–506, 2007.
- WALKER, J. Type studies on *Gaeumannomyces graminis* and related fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 58:427–457, 1972.
- WALKER, J. Taxonomy of take-all fungi and related genera and species. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 15–74. Academic Press Inc., London, 1981.
- WALLER, J. M. Observations on *Pythium* root rot of wheat and barley. *Plant Pathology*, 28:17–24, 1979.
- WARD, D. M., R. WELLER und M. M. BATESON. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345:63–65, 1990.
- WARD, E. Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *European Journal of Plant Pathology*, 101:561–566, 1995.

- WARD, E. und A. Y. AKROFI. Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycological Research*, 98:219–224, 1994.
- WARD, E. und G. L. BATEMAN. Comparison of *Gaeumannomyces*- and *Phialophora*-like fungal pathogens from maize and other plants using DNA methods. *New Phytologist*, 141:323–331, 1999.
- WAWRIK, B., L. KERKHOF, G. J. ZYLSTRA und J. J. KUKOR. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2232–2238, 2005.
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNES, D. A. PELLETIER und D. J. LANE. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173:697–703, 1991.
- WELLER, D., J. RAAIJMAKERS, B. MCSPADDEEN GARDENER und L. THOMASHOW. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology*, 40:309–348, 2002.
- WELLER, D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97:250–256, 2007.
- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26:379–407, 1988.
- WELLER, D. M., B. B. LANDA, O. V. MAVRODI, K. L. SCHROEDER, L. DE LA FUENTE, S. B. BANKHEAD, R. A. MOLAR, R. F. BONSALE, D. V. MAVRODI und L. S. THOMASHOW. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, 9:4–20, 2007.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52:487–511, 2001.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE und J. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY und T. J. WHITE (Hrsg.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, S. 315–322. Academic Press, San Diego, 1990.
- WILLIAMS, B. H., Y. HATHOUT und C. FENSELAU. Structural characterization of lipopeptide biomarkers isolated from *Bacillus globigii*. *Journal of Mass Spectrometry*, 37: 259–264, 2002.
- WILMSMEIER, B. *Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen von Fluquinconazol gegen den Erreger der Schwarzbeinigkeit, Gaeumannomyces graminis (Sacc.) von Arx et Olivier var. tritici Walker, nach Saatgutbehandlung von Weizen*. Dissertation, Universität Hohenheim, 2002.
- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3741–3751, 1997.
- WONG, P. T. W. *Gaeumannomyces wongoonoo* sp. nov., the cause of a patch disease of buffalo grass (St Augustine grass). *Mycological Research*, 106:857–862, 2002.

- WONG, P. T. W. Cross-protection against the wheat and oat take-all fungi by *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 7:189–194, 1975.
- WONG, P. T. W. Biological control by cross-protection. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 417–431. Academic Press Inc., London, 1981.
- WONG, P. T. W., J. A. MEAD und M. P. HOLLEY. Enhanced field control of wheat take-all using cold tolerant isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and *Phialophora* sp. (lobed hyphopodia). *Plant Pathology*, 45:285–293, 1996.
- YAO, J. M., Y. C. WANG und Y. G. ZHU. A new variety of the pathogen of maize take-all. *Acta Mycologica Sinica*, 11:99–104, 1992.
- YARHAM, D. J. Practical aspects of epidemiology and control. In ASHER, M. J. C. und P. J. SHIPTON (Hrsg.), *Biology and Control of Take-all*, S. 353–384. Academic Press Inc., London, 1981.
- YOUNG, I. M. und J. W. CRAWFORD. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, 304:1634–1637, 2004.
- ZADOKS, J., T. CHANG und C. KONZAK. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14:415–421, 1974.

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Institut für Bodenökologie des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jean Charles Munch angefertigt. Herrn Munch möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für die konstruktive Diskussion der Ergebnisse sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Oßwald und Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Schloter für die Betreuung dieser Arbeit bedanken, für die vielen Ideen und Anregungen, mit denen er sie immer wieder in neue Bahnen gelenkt hat und seine ständige Bereitschaft zum Gespräch. Und dafür, dass er uns nicht nur an den Chiemsee entführt hat, sondern auch in die Schweizer Bergwelt.

Frau Dr. Alexandra Hagn gilt mein herzlicher Dank für die Betreuung des praktischen Teils dieser Arbeit, ihre zahlreichen Hilfestellungen und die Bereitschaft, mir immer mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Danke vor allem auch fürs gründliche Durchlesen des Manuskripts, die vielen Anregungen und die Durchhalteemails aus der Ferne.

Vielen Dank allen Mitarbeitern der Abteilung Terrestrische Ökogenetik, die nicht müde wurden, in unseren Gruppentreffen immer wieder den Vorträgen über meine Arbeit zu lauschen, bei der Interpretation der Ergebnisse mitzuwirken und mit neuen Ideen weiterzuhelfen. Danke auch für die immer währende Hilfsbereitschaft im Labor und das nette Arbeitsklima. Und dafür, dass man es mit ihnen sowohl im Kloster als auch bei Wind und Wetter in der urigsten, winzigsten aller Berghütten hervorragend aushalten kann.

Besonderen Dank möchte ich meinem Kollegen Felix Häslar aussprechen, der gleichzeitig mit mir seine Doktorarbeit begonnen hat und mir seither ein stets gut gelaunter und immer hilfsbereiter Zeit- und manchmal auch Leidensgenosse in „unserem“ Pilzlabor war. Danke auch für die große Hilfe bei der statistischen Datenauswertung.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an Frau Cornelia Galonska für ihre zuvorkommende Hilfe und Unterstützung im Labor.

Bei Herrn Georg Gerl bedanke ich mich herzlich für die gewissenhafte Überwachung und Pflege des Feldversuchs, ebenso wie für die tatkräftige Hilfe beim Start des Gewächshausversuchs. Den Kollegen von der Abteilung Experimentelle Umweltsimulation, Frau Dr. Barbro Winkler und Herrn Peter Kary, danke ich für die Bereitstellung der Röhren und Gerätschaften für den Gewächshausversuch. Ein großes Dankeschön auch an die Saatzucht Josef Breun, Herzogenaaurach, die mir das Saatgut für die Biokontrollexperimente zur Verfügung stellte.

Meinen Kooperationspartnern im Projekt „Molekulare Interaktionen in der Rhizosphäre“ danke ich für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Atmosphäre bei unseren Projekttreffen und das große Interesse an meiner Arbeit, vor allem aber für die Möglichkeit, die Ergebnisse in einen größeren Kontext zu stellen. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Moritz Frommberger, Herrn Dr. Philippe Schmitt-Kopplin und Frau Dr. Agnes Fekete vom Institut für Ökologische Chemie sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit und ihre Expertise bei der Metabolitanalyse danken.

Ein riesiges Dankeschön allen Hiwis, Zivis, FÖJlern, Studenten und Praktikanten für ihre tatkräftige Hilfe bei den Probenahmen, beim Waschen unzähliger Wurzeln und beim Boden schleppen.

Dem Helmholtz Zentrum München danke ich für die vielen Möglichkeiten, die es mir im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorandin geboten hat. Dazu gehörte es, eine hervorragende Geräteausstattung nutzen zu können, an interessanten Fortbildungen teilzunehmen und zahlreiche Kongresse zu besuchen. Etwas ganz Besonderes war für mich die Teilnahme am 7. PGPR Workshop 2006 in den Niederlanden, wo ich die Koryphäen der Forschung an Schwarzbeinigkeit und suppressiven Böden, James Cook, David Weller, Linda Thomas-how, Geneviève Défago und viele mehr aus nächster Nähe erleben konnte. Diese Erfahrung war ungemein motivierend und gab mir viele Impulse für meine eigene Arbeit.

Vielen lieben Dank meinen Freunden Elisabeth und Markus Schumacher, die immer ans Gelingen dieser Arbeit geglaubt haben, für ihr Verständnis in den letzten drei Jahren.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Henriette und Johann Huber für ihr Vertrauen in mich, ihren Rat und ihre Hilfe. Und auch dafür, dass sie mich die Liebe zu den Bergen und zur Natur gelehrt haben. Unsere gemeinsamen Touren haben mir immer wieder geholfen, den Kopf frei zu bekommen und mit neuer Kraft und Energie durchzustarten.

Meinem Mann Erich Schreiner möchte ich für seinen schier unerschöpflichen Fundus an Computerwissen und die Begeisterung danken, dieses Wissen auch weiterzugeben. Vor allem aber danke ich ihm für seine bedingungslose Unterstützung und seine unendliche Geduld, mit der er immer für mich da ist.

Nun bin ich ganz nervös vom schon
schreiben.

Ernst



PS: Herrn Ernst Gäumann (1893–1963), Professor für spezielle Botanik an der ETH Zürich, danke ich dafür, dass ich ungefähr tausendmal die Frage beantworten durfte, wie man einen gewissen Pilz überhaupt ausspricht.