

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Phytopathologie

Der Effekt von Pflanzenaktivatoren und Biokontrollbakterien auf
Resistenz und Wachstum von Gerste

Andreas Fröhlich

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. R. Hückelhoven
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. J. Durner
	2. Univ.-Prof. Dr. K. J. Hülsbergen

Die Dissertation wurde am 30.04.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.10.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Fachbegriffe	IV
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VI
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen	1
1.1.1 Generelle Resistenz	2
1.1.2 Spezifische Resistenz	2
1.1.3 Die hypersensitive Reaktion und die systemisch erworbene Resistenz	4
1.2 Die Interaktion zwischen Pflanzen und Rhizosphärebakterien	5
1.2.1 Induzierte systemische Resistenz	5
1.2.2 Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Rhizosphärebakterien	7
1.3 Induktion von Resistenz durch Pflanzenaktivatoren	8
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	12
2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Medien	14
2.1.3 Pflanzenaktivatoren	16
2.1.4 Antibiotika	17
2.1.5 Geräte und sonstige Laborausstattung	17
2.1.6 Verbrauchsmaterial	18
2.1.7 Oligonukleotide	18
2.1.8 Reaktionssysteme, Kits und Enzyme	18
2.1.9 Computerprogramme	19
2.1.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse	19
2.2 Pflanzen und Pilze	20
2.2.1 Gerste Sterilkultur	20
2.2.1.1 Sterilisation der Samen	20
2.2.1.2 Anzucht steriler Keimlinge auf ½ MS Platten	20
2.2.1.3 Vorbereitung der Vitro Vent Boxen	20
2.2.1.4 Inokulation der sterilen Keimlinge mit <i>P. fluorescens</i> spec. Proradix	21
2.2.2 Versuche mit Gerste in Phytokammern	21
2.2.3 Gewächshausversuche mit Gerste	22

2.2.4	Open-Top-Versuche mit Gerste	22
2.2.5	Freilandversuche mit Gerste	23
2.2.6	Freilandversuche mit Kartoffel	24
2.2.7	Stammhaltung von Bakterien und Pilzen	25
2.2.7.1	Bakterien	25
2.2.7.2	Pilze	26
2.2.8	Platteninhibitionstest	26
2.2.9	Infektionsversuche mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	27
2.2.10	Infektionsversuche mit <i>Gaeumannomyces graminis var tritici</i>	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Isolation von genomischer DNA aus Gerste	28
2.3.2	Isolation von genomischer DNA aus Pilzen	28
2.3.3	Isolation von Gesamt RNA aus Gerste	29
2.3.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	29
2.3.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.4	Realtime quantitative PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung von Pathogen-DNA in infiziertem Pflanzenmaterial	31
2.4.1	Primer für qRT-PCR	31
2.4.2	Isolation von genomischer DNA aus infiziertem Pflanzenmaterial	31
2.4.3	Herstellung eines Standards für die absolute Quantifizierung durch qRT-PCR	31
2.4.4	PCR-Amplifikation	32
2.4.5	Auswertung	32
2.5	DNA-Mikroarray	33
2.5.1	Markierung der Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen	33
2.5.1.1	Aminoallyl-Labeling von cDNA	33
2.5.1.2	Aufreinigung der cDNA	34
2.5.1.3	Kopplung der Aminoallyl-cDNA an die Cy-Fluoreszenzfarbstoffe	34
2.5.1.4	Aufreinigung zur Entfernung ungebundenen Farbstoffes	34
2.5.2	Hauseigener Gerste cDNA-Mikroarray	35
2.5.2.1	Blockierung freier Aldehyd-Gruppen	35
2.5.2.2	Prähybridisierung	36
2.5.2.3	Hybridisierung	37
2.5.2.4	Auswertung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Der Effekt von <i>Pseudomonas fluorescens</i> spec. Proradix auf Gerste	39
3.1.1	Der Effekt von Proradix auf das Wachstum von Gerste in Sterilkultur	39
3.1.2	Infektionsexperimente mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	42
3.1.3	Infektionsexperimente mit <i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	43

3.1.4	Expressionsanalysen	44
3.1.5	Gewächshausversuche	45
3.2	Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf Gerste	47
3.2.1	Infektionsexperimente mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	47
3.2.2	Expressionsanalysen	48
3.2.3	Gewächshausversuche und Open-Top-Versuche	51
3.3	Freilandversuche im Versuchsgut Scheyern	52
3.3.1	Freilandversuche mit Gerste 2006	53
3.3.2	Freilandversuche mit Gerste 2007	54
3.3.3	Freilandversuche mit Kartoffel	56
4	Diskussion	57
4.1	Der Effekt von <i>Pseudomonas fluorescens</i> spec. Proradix auf die Resistenz von Gerste	57
4.2	Der Effekt von <i>Pseudomonas fluorescens</i> spec. Proradix auf das Wachstum von Gerste	59
4.3	Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf die Resistenz von Gerste	63
4.4	Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf das Wachstum von Gerste	67
4.5	Abschließende Bewertung	69
5	Literaturverzeichnis	71
6	Anhang	83
6.1	Analyse der Genexpression in Gerste nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren und Proradix	83
6.2	Wetterdaten Scheyern 2006	91
6.3	Wetterdaten Scheyern 2007	92
6.4	Schlagkarteien 2006	93
6.5	Schlagkarteien 2007	98
	Danksagung	VIII
	Lebenslauf	IX

Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
AOC	<i>allenoxicyclase</i>
AOS	<i>allenoxidsynthase</i>
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
aa-dUTP	5-(3-Aminoallyl)-2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate
Amp	Ampicillin
Avr-	Avirulenz-
BABA	β-Aminobuttersäure
bci	<i>barley chemical induced</i>
BIT	1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid
BSA	Rinder Serum Albumin
BTH	Benzothiodiazol
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	<i>coiled coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony-forming units</i>
cm	Zentimeter
d	Tag
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Citidintriphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	et alii
ET	Ethylen
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	entsalztes und filtriertes Wasser
HR	<i>hypersensitive response</i>
INA	Methyl-2,6-dichloroisonicotinsäure
ISR	induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonsäure
Km	Kanamycin
l	Liter
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
LOX	<i>lipoxygenase</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	MAP-Kinase

min	Minute
ml	Milliliter
MS	Murashige & Skoog
MW	Mittelwert
NB	<i>nucleotide-binding site</i>
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NPR	<i>nonexpressor of pathogenesis-related genes</i>
OD _x	optische Dichte, gemessen bei eine Wellenlänge von x nm
OPR	<i>12-oxophytodienoate Reductase</i>
Pa	Pascal
PAL	<i>phenylalanine ammonnia-lyase</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBZ	Probenazol, 3-Allyloxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid
PGPR	<i>plant growth promoting rhizobacteria</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RT	Raumtemperatur
qRT PCR	<i>Realtime quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RLK	<i>receptor like kinase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
SA	Salizylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
spec.	Spezies
SSC	<i>saline sodium citrat</i>
ssDNA	<i>salmon sperm DNA</i>
Tab.	Tabelle
ÜN	über Nacht
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Übersichtsmodell zur Interaktion von Pflanzen und Pathogenen	5
Abb. 2:	Modell zur induzierten systemischen Resistenz (ISR)	6
Abb. 3:	Struktur der Salicylsäure (SA) und der Salicylsäureanaloge Methyl-2,6-dichloroisonicotinsäure (INA) und Benzothiadiazol (BTH)	8
Abb. 4:	Parzellenanlagen für Freilandversuche mit Gerste	24
Abb. 5:	Inokulation von sterilen Gerstenkeimlingen mit Proradix	39
Abb. 6:	Inokulation von sterilen Gerstenkeimlingen mit Proradix	41
Abb. 7:	Besiedlung der Gerstewurzel mit Proradix	41
Abb. 8:	Infektion von Gerste mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	42
Abb. 9:	Dualkultur mit Proradix und <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	43
Abb. 10:	Infektion von Gerste mit <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	44
Abb. 11:	Bestimmung ertragsrelevanter Parameter nach Inokulation von Gerste mit Proradix	46
Abb. 12:	Infektion von Gerste mit <i>Rhynchosporium secalis</i>	47
Abb. 13:	Anzahl induzierter Gene nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren	48
Abb. 14:	Freilandversuche mit Gerste 2006	53
Abb. 15:	Freilandversuche mit Gerste 2007	54
Abb. 16:	Analyse des Ernteguts von Schlag A19	55
Tab. 1:	Beispiele für biochemisch charakterisierte Effektorproteine aus phytopathogenen Bakterien und Pilzen	3
Tab. 2:	Analyse der Genexpression in Blättern von sterilen Gerstenkeimlingen	40
Tab. 3:	Analyse der Genexpression in Blättern von aktivatorbehandelter Gerste	50
Tab. 4:	Bestimmung ertragsrelevanter Parameter nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren	51
Tab. 5:	Freilandversuche mit Kartoffel 2007	56
Tab. 6:	Behandlung von Nutzpflanzen mit Rhizosphärebakterien im Freilandversuch	61

Zusammenfassung

Der am meisten limitierende Faktor in der landwirtschaftlichen Produktion von Nutzpflanzen besteht im Befall mit mikrobiellen Pathogenen und Herbivoren. Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien sollen, neben Züchtung und herkömmlichem Pflanzenschutz, eine dritte Säule im Pflanzenschutz etablieren (Kogel, BION Praxis 1998). In dieser Arbeit wurden die Pflanzenaktivatoren Messenger, Neudovital und BioS sowie das Rhizosphärebakterium *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix in Laborversuchen, im Gewächshaus und in Freilandversuchen auf ihren Effekt auf das Wachstum und die Resistenz von Gerste hin untersucht.

In Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, daß die Aktivatoren Messenger, BioS und Neudovital verschiedene Gene der Pathogenabwehr in Gerste induzieren. Vor allem kurz nach der Behandlung wurden viele PR-Gene, Bci-Gene sowie Gene des Octadecanoidwegs und Gene die für antimikrobiell wirksame Proteine kodieren, aktiviert. Neudovital induzierte außerdem Gene des Shikimatweges sowie der Ligninbiosynthese. Expressionsanalysen von Proradix-inokulierten Gersten konnten keine Induktion oder Repression von Genen der Pathogenabwehr in systemischen Blättern zeigen. Obwohl Änderungen in der Genexpression meist nur kurzfristig nach der Behandlung beobachtet werden konnten, bewirkten alle drei Aktivatoren und auch Proradix längerfristig eine erhöhte Resistenz von Gerste gegenüber *Rhynchopsporium secalis*.

In Gewächshausversuchen und Versuchen in Open-Top Anlagen konnte bei keinem der Aktivatoren ein Einfluß auf ertragsrelevante Parameter von Gerste beobachtet werden. Proradix bewirkte allerdings bei schlechter Nährstoffversorgung der Gersten eine Erhöhung des Ertrages sowie des Strohgewichtes und der Anzahl an Ähren.

Der Pflanzenaktivator Messenger sowie Proradix wurden in Freilandversuchen an Gerste und Kartoffel getestet. Während Messenger in keinem der Versuche eine Erhöhung des Ertrages bewirkte, konnte bei drei von acht Versuchen mit Gerste eine Ertragssteigerung nach Anwendung von Proradix beobachtet werden. Proradix bewirkte bei einem der Versuche außerdem ein erhöhtes Strohgewicht sowie ein erhöhtes Tausendkorngewicht. Diese positive Wirkung konnte in den Freilandversuchen mit Kartoffel nicht bestätigt werden.

Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien sind den herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln in ihrer Wirksamkeit noch deutlich unterlegen. Interessant könnte die Anwendung aber im ökologischen Landbau sein, da hier der Einsatz vieler Pflanzenschutzmittel nicht zugelassen ist. Außerdem könnte eine Kombination

herkömmlicher Mittel mit Aktivatoren oder Rhizosphärebakterien eine Reduzierung der Menge an Pflanzenschutzmittel erlauben.

1 Einleitung

Die grüne Revolution in der Mitte des 20. Jahrhunderts führte durch Entwicklung moderner landwirtschaftlicher Methoden zu einer beispiellosen Steigerung der Produktivität. So konnte von 1960 bis 1985 durch Stickstoffdünger, Pestizide und die Züchtung von Hochleistungssorten mehr als eine Verdopplung der globalen Getreideproduktion erreicht werden, obwohl die Anbaufläche im selben Zeitraum kaum zunahm (FAO). Trotz der großen Erfolge der grünen Revolution gehen jährlich aber immer noch weltweit ca. 40% der Erträge der wichtigsten Nutzpflanzen durch Schädlinge, Pathogene und Unkraut verloren (Oerke und Dehne, 1997). Um die landwirtschaftliche Produktivität weiter zu erhöhen sind daher neben den traditionellen Methoden der Züchtung und des Pflanzenschutzes auch neue, zusätzliche Ansätze nötig. So erlaubt die moderne Biotechnologie die Herstellung genetisch modifizierter Nutzpflanzen, mit Eigenschaften die durch herkömmliche Züchtung nicht zu erreichen wäre. Aber auch das zunehmende Verständnis über die Funktion der pflanzlichen Abwehrsysteme eröffnet neue Wege im Pflanzenschutz. Sogenannte Pflanzenaktivatoren aber auch Rhizosphärebakterien stimulieren direkt die Abwehrsysteme der Pflanzen und vermindern dadurch ihre Anfälligkeit für Pathogene.

Im Folgenden soll sowohl ein kurzer Überblick über die Funktionsweise pflanzlicher Abwehr, als auch die Möglichkeiten, diese Abwehrmechanismen durch Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien zu beeinflussen, gegeben werden,.

1.1 Die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen

Pflanzen sehen sich als sessile Organismen in ihrer Umwelt einer großen Anzahl an abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Licht-, Wasser- und Temperaturstress, Nährstoffmangel, Herbivoren und Pathogene stellen die Pflanze vor große Herausforderungen. Nur die Fähigkeit, sich an widrige Umweltbedingungen anzupassen und sich gegen Herbivoren und Pathogene zur Wehr zu setzen, kann das Fortbestehen einer bestimmten Pflanzenspezies sichern. Pflanzen haben daher ein großes Arsenal an Abwehrmaßnahmen entwickelt, um Pathogene rechtzeitig zu erkennen und abzuwehren.

1.1.1 Generelle Resistenz

Die sogenannte generelle Resistenz (engl. non-host-resistance) beschreibt die Resistenz einer Pflanzenspezies gegenüber einer ganzen Pathogenspezies und ist die häufigste Form der Resistenz. Die passive Abwehr der Pathogene erfolgt hier durch präformierte Verteidigungsmechanismen wie die Kutikula, die Zellwand und toxische Verbindungen wie Saponine (Osbourne, 1996). Pathogene können aber auch über sogenannte allgemeine Elicitoren, meist Bestandteile der Pathogene, die sich durch ihre konservierte Struktur, ihre Unabkömmlichkeit für das Pathogen und ihr weit verbreitetes Vorkommen bei verschiedenen Pathogenspezies auszeichnen, erkannt werden. Diese allgemeinen Elicitoren werden auch als PAMPs/MAMPs (pathogen/microbe-associated molecular patterns) bezeichnet (Nürnberger und Brunner, 2002). Zu den allgemeinen bakteriellen Elicitoren gehören Flagelline (Felix *et al.*, 1999), Lipopolysaccharide (Dow *et al.*, 2000), Cold-Shock-Proteine (Felix und Boller, 2003) und der Elongationsfaktor EF-Tu (Kunze *et al.*, 2004). Beispiele für allgemeine Elicitoren aus dem Bereich der Pilze und Oomyceten sind die Elicitine der Spezies *Phytophthora* und *Phytium* (Kamoun *et al.*, 2003) sowie Chitin und β -Glucane, welche Bestandteile der Zellwand von Pilzen bzw. Oomyceten sind (Boller, 1995). Die Erkennung dieser Elicitoren erfolgt durch sogenannte Pattern Recognition Rezeptors (PRRs) und führt über die Aktivierung von Signalkaskaden zur Einleitung von aktiven Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel einer Verdickung der Zellwand und Einlagerung von Kallose oder der Produktion von Phytoalexinen und phenolischen Verbindungen (McLusky *et al.*, 1999).

1.1.2 Spezifische Resistenz

Die meisten potentiell pathogenen Mikroorganismen scheitern an den Abwehrmaßnahmen der generellen Resistenz. Manche Pathogene sind aber in der Lage, mit Hilfe von sogenannten Effektorproteinen diese Abwehrmechanismen zu überwinden. So produzieren z.B. bakterielle Pathogene bis zu 30 Effektoren, die sie über das Typ III Sekretionssystem in die Wirtszellen injizieren (Cunnac *et al.*, 2004; Chisholm *et al.*, 2006). Die Funktion dieser Effektoren umfaßt die Hemmung von frühen PAMP/MAMP-induzierten Signalwegen, Induktion und Repression von Wirtsgenen sowie Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Wirt (Abramovitch *et al.*, 2006) (s. Tab.1).

Tabelle 1: Beispiele für biochemisch charakterisierte Effektorproteine aus phytopathogenen Bakterien und Pilzen: Die Effektorproteine eines pathogenen Organismus manipulieren direkt oder indirekt die Abwehrsysteme der Pflanze. Pflanzliche R-Proteine können Effektorproteine erkennen (nach Chisholm *et al.*, 2006).

Effektor	Organismus	Funktion	Ziel i.d. Pflanze	R-Gen
AvrRprt2	<i>P. syringae</i>	Protease	RIN4	RPS2
AvrPtoB	<i>P. syringae</i>	E3-Ligase	?	Pto
XopD	<i>X. campestris</i>	Cysteine Protease	SUMO	?
Avr2	<i>C. fulvum</i>	Proteinase Inhibitor	Rcr3	Cf-2
Avr-Pita	<i>M. grisea</i>	Metalloprotease	?	Pi-ta

Pflanzen wiederum sind in der Lage diese Effektoren mit Hilfe sogenannter Resistenzproteine (R-Proteine) zu erkennen und eine spezifische Resistenz auszulösen. Die Erkennung einer Pathogenspezies durch die Pflanze führt nur zur Resistenz gegenüber dieser Rasse. Daher wird die spezifische Resistenz auch als rassespezifische Resistenz bezeichnet. Effektorproteine, die durch R-Proteine erkannt werden können und zu einer Resistenz führen, werden auch als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet. Die meisten R-Proteine gehören zur Klasse der sogenannten NB-LRR-Proteine. NB-LRR-Proteine sind intrazellulär lokalisiert und zeichnen sich durch C-terminale leucinreiche Wiederholungen (leucine rich repeats, LRRs) und eine Nukleotidbindestelle aus (NB). Die Proteine dieser Klasse können wiederum aufgrund ihrer verschiedenen N-Termini unterteilt werden in TIR-NB-LRRs, die eine Domäne mit Homologien zum *Drosophila* Toll- und dem Säuger Interleukin-Rezeptor tragen, sowie den CC-NB-LRRs, die eine coiled-coil-Domäne tragen (Nimchuk *et al.*, 2003). Allein das *Arabidopsis*-Genom codiert für circa 150 dieser Proteine (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Die Erkennung der Avr-Proteine durch die R-Proteine kann direkt oder indirekt erfolgen. So wird die spezifische Resistenz von Reis gegen *Magnaporthe grisea* durch die direkte Interaktion des Reis-R-Proteins Pi-ta mit dem Avirulenzprotein Avr-Pita vermittelt (Jia *et al.*, 2000). Die indirekte Erkennung der Effektoren erfolgt oft in Übereinstimmung mit der „Guard-Hypothese“ (Van der Biezen und Jones, 1998). Demnach binden R-Proteine nicht direkt an einen Effektor, sondern überwachen dessen Ziel in der Wirtszelle. Veränderungen an diesem Ziel („pathogen-induced modified-self molecular pattern“) aktivieren das entsprechende R-Protein. Die Erkennung eines Avr-Proteins durch ein R-Protein führt dann über den Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration, der Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden (Romeis *et al.*, 1999) der Produktion von Stickoxid (Durner *et al.*, 1998; Mur *et al.*, 2005) und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (oxidative burst) zur hypersensitiven

Reaktion (HR, hypersensitive response) und zur systemisch erworbenen Resistenz (SAR, systemic acquired resistance).

1.1.3 Die hypersensitiven Reaktion und die systemisch erworbene Resistenz

Während der HR kommt es durch eine Form des programmierten Zelltodes zum lokalen Absterben der Zellen am und um den Infektionsort. Dies allein kann das Wachstum eines biotrophen Pathogens schon einschränken (Glazebrook, 2005). Zusätzlich entfalten die beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) vermutlich eine toxische Wirkung gegenüber dem eindringenden Pathogen. Außerdem werden die Zellwände durch Kalloseauflagerungen und Lignineinlagerungen bzw. -quervernetzungen gegenüber zellwandabbauenden Enzymen des Pathogens verstärkt (Menden *et al*, 2006). Die durch lokalen Pathogenbefall ausgelöste HR führt oft zur systemisch erworbenen Resistenz (SAR, systemic acquired resistance). Zentrales Molekül in der SAR ist die Salicylsäure (SA), die sowohl lokal als auch systemisch angereichert wird und über die Aktivierung des redoxsensitiven Proteins NPR1 (nonexpressor of pathogenesis related genes) (Pieterse, 2004), den Transkriptionsfaktor WRKY70 (Li *et al*, 2004) und die Familie der TGA-Transkriptionsfaktoren (Durrant und Dong, 2004; Kesarwani *et al*, 2007) zur Expression von PR-Genen (pathogenesis related genes) führt. Zur Klasse der PR-Proteine gehören unter anderem Chitinasen, Glucanasen, Proteinasen, Peroxidasen sowie Thionine und Defensine (vanLoon, 1999). Durch die Induktion von SAR wird die Abwehrbereitschaft der Pflanze erhöht. Die weitere Ausbreitung des Pathogens oder eine eventuelle Sekundärinfektion an anderer Stelle kann so verhindert oder erschwert werden.

Abbildung 1 zeigt eine schematische Zusammenfassung der verschiedenen Ebenen der Pflanze-Pathogen-Interaktion: Eine Erkennung der Pathogen- PAMPs/MAMPs durch PRRs führt über Signal-Kaskaden zu einer generellen Resistenz der Pflanze gegenüber dem Pathogen. Manche Pathogene sind aber in der Lage, mit Hilfe von Effektorproteinen die Abwehrmechanismen der generellen Resistenz zu überwinden und die Pflanze zu infizieren. Besitzt die infizierte Pflanze R-Proteine, die wiederum diese Effektoren oder deren Wirkung erkennen können, wird die HR und die SAR ausgelöst.

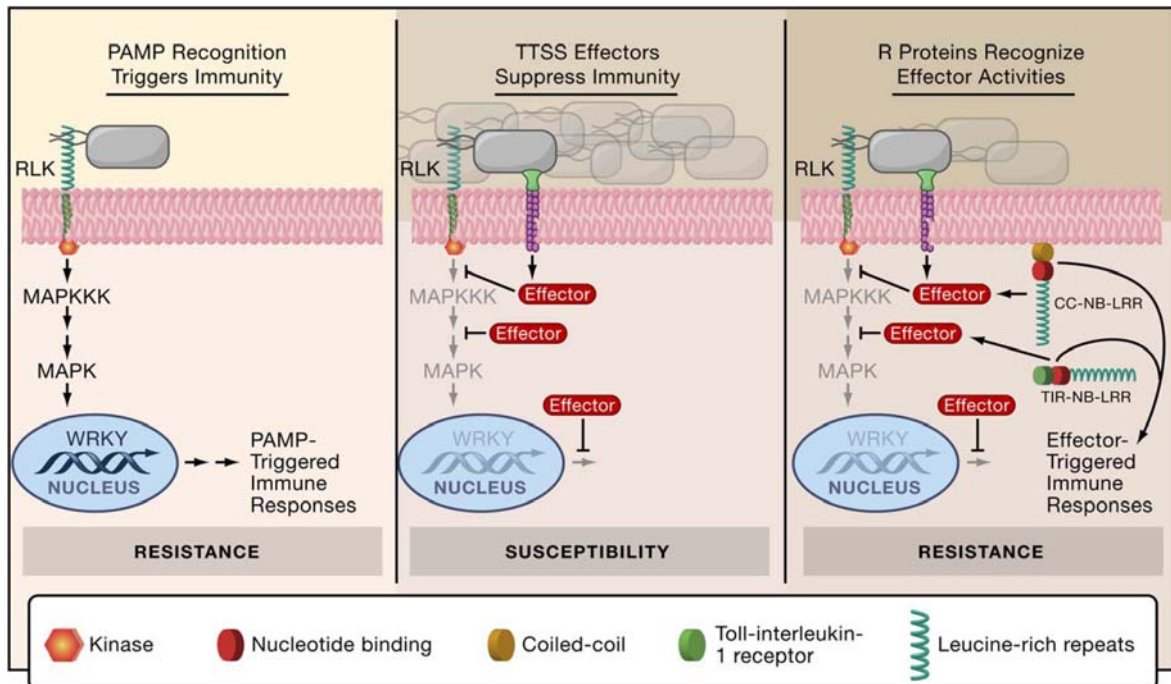


Abb. 1: Übersichtsmodell zur Interaktion von Pflanzen und Pathogenen. Die Erkennung der PAMPs/MAMPs durch PRRs führt über MAP-Kinase-Kaskaden zu einer generellen Resistenz der Pflanze gegenüber dem Pathogen. Manche Pathogene sind in der Lage, mit Hilfe von Effektorproteinen (TTSS-Effektors) die Abwehrmechanismen der generellen Resistenz zu überwinden und die Pflanze zu infizieren. Besitzt die infizierte Pflanze R-Proteine (z.B. TIR-NB-LRRs/CC-NB-LRRs), die wiederum diese Effektoren oder deren Wirkung erkennen können, wird die Abwehrreaktion ausgelöst. (übernommen aus Chisholm *et al*, 2006)

1.2 Die Interaktion zwischen Pflanzen und Rhizosphärebakterien

1.2.1 Induzierte systemische Resistenz

Das pflanzliche Abwehrsystem wird aber nicht nur durch Pathogene beeinflusst. Van Peer *et al.* konnten 1991 zeigen, daß die Infektion von Nelken mit *Fusarium oxysporum* um bis zu 35 Prozent reduziert werden kann, wenn die Pflanzen vor der Infektion mit den nichtpathogenen Rhizosphärebakterien *Pseudomonas fluorescens* WCS417r inokuliert wurden (van Peer *et al*, 1990;1991). Auch in Gurke konnte beobachtet werden, daß Rhizosphärebakterien die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pathogenen verringern können. Diese Art der Resistenz wurde als induzierte systemische Resistenz bezeichnet (ISR, *induced systemic resistance*) (Wei *et al*, 1991).

ISR zeichnet sich dadurch aus, daß die Inokulation der Pflanze mit den Rhizosphärebakterien alleine nicht zur Induktion von bekannten Abwehrgenen und

Signalmolekülen führt (van Wees *et al*, 1999; Verhagen *et al*, 2004; Wang *et al*, 2005). Allerdings wird die Pflanze durch ISR in einen Zustand versetzt („Priming“), der bei einer Infektion mit einem Pathogen eine schnellere und wirkungsvollere Abwehrreaktion erlaubt (Verhagen *et al*, 2004). Im Gegensatz zur SAR ist die ISR unabhängig von der Akkumulation von Salicylsäure, aber abhängig von den Signalmolekülen Ethylen und Jasmonsäure sowie dem redoxsensitiven Protein NPR1 und dem Transkriptionsfaktor MYB72 (Pieterse *et al*, 1996; Ahn *et al*, 2007; van der Ent *et al*, 2008) (Abb.2).

Um die ISR auszulösen ist eine starke und gleichmäßige Besiedlung der Wurzeln durch die Rhizosphärebakterien nötig (Han *et al*, 2006). Verschiedene Bestandteile der Bakterien, wie Lipopolysaccharide, Siderophore und Homoserinlaktone, dienen als passive Signalgeber für die Pflanze (vanLoon *et al*, 1998; Schuegger *et al*, 2006). Rhizosphärebakterien sind aber auch in der Lage über die aktive Produktion von niedermolekularen flüchtigen Substanzen wie 2,3-Butandiol ISR zu induzieren (Ryu *et al*, 2004).

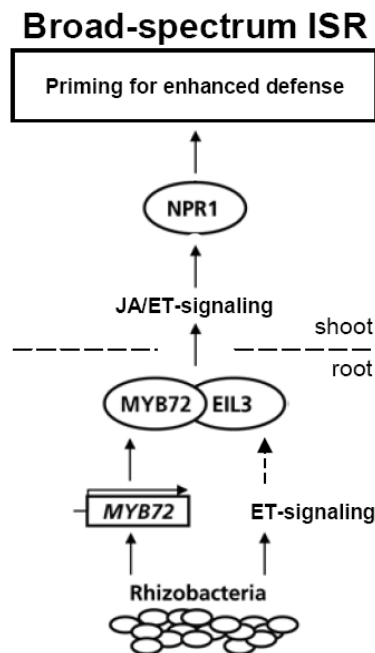


Abb. 2: Modell zur Induzierten systemische Resistenz (ISR): Eine Besiedlung mit Rhizosphärebakterien löst eine lokale Aktivierung des Transkriptionsfaktors MYB72 aus. Zusammen mit dem Ethylen-regulierten Transkriptionsfaktor EIL3 (Ethylen Insensitive 3 (EIN3)-like) wird abhängig von Komponenten des JA/ET-Signalweges und von NPR1 die ISR eingeleitet (übernommen aus van der Ent *et al*, 2008)

1.2.2 Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Rhizosphärebakterien

Die Besiedlung der Wurzeln durch Rhizosphärebakterien kann neben der erhöhten Pathogenresistenz durch ISR auch noch eine Vielzahl weiterer Vorteile für die Pflanzen haben. Sogenannte „plant growth promoting bacteria“ (PGPB) sind in der Lage, das Wachstum der Pflanze positiv zu beeinflussen. Zu dieser Gruppe von Bakterien werden unter anderem Stämme von *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia* und *Erwinia* gezählt.

Lin *et al* (1983) konnten zeigen, daß eine Inokulation von Maiskeimlingen mit *Azospirillum brasilense* zu einer veränderten Morphologie der Wurzeln und einer erhöhten Aufnahme von Nitrat, Kalium und Phosphat führt. Viele Pseudomonaden und bestimmte Bacillus-Stämme sind in der Lage unlösliches, mineralisches Phosphat für die Pflanzen verfügbar zu machen und organischen Phosphor zu mineralisieren (Rodriguez und Fraga, 1999; Pandey *et al*, 2006). Selbst die Wirkung von Mycorrhiza-Pilzen auf Pflanzen kann bei gleichzeitiger Inokulation mit phosphat-solubilisierenden Bakterien verstärkt werden (Singh und Kapoor, 1999).

Rhizosphärebakterien verfügen oft auch über Substanzen, durch die sie direkt das Wachstum der Pflanze beeinflussen. *Azospirillum spec.* produzieren eine Mischung aus Pflanzenhormonen (Auxine, Cytokinine und Gibberelline), unter denen vor allem Auxin zu vermehrtem Wurzelwachstum führt (Steenhoudt und Vanderleyden, 2000). Auch die flüchtigen, niedermolekularen Substanzen die von manchen Bacillus-Stämmen produziert werden (z.B. Acetoin und 2,3-Butandiol) sind nicht nur in der Lage ISR zu induzieren, sondern können direkt ein verstärktes Pflanzenwachstum bewirken (Ryu *et al*, 2003).

Viele Rhizosphärebakterien haben sogenannte Biokontrolleigenschaften, d.h. sie hemmen das Wachstum von potentiell pathogenen Mikroorganismen in der Umgebung der Pflanzenwurzeln („competitive root colonization“). Dies erfolgt zum einen über den Wettbewerb zwischen PGPB und Pathogenen um Nährstoffe im Boden und Exudate der Pflanzenwurzel, zum anderen über die Produktion von verschiedenen Antibiotika, lytischen Enzymen (z.B. Zellwandhydrolasen) und Enzymen die in der Lage sind Virulezfaktoren und Quorumsensing-Signalstoffe der Pathogene abzubauen (Compant *et al*, 2005). Eine wichtige Rolle spielen auch bakterielle Siderophore, die sehr effektiv freies Eisen binden können und dadurch vor allem pilzliche Mikroorganismen durch Eisenmangel am Wachstum hemmen (Kloepper *et al*, 1980; Compant *et al*, 2005).

1.3 Induktion von Resistenz durch Pflanzenaktivatoren

Das Abwehrsystem von Pflanzen basiert hauptsächlich auf induzierbaren Mechanismen. Daher kann zum Beispiel die SAR auch durch äußerliche Behandlung der Pflanzen mit dem zentralen Signalmolekül der SAR, der SA, eingeleitet werden (Ylpani *et al*, 1991; Mur *et al*, 1996).

Schon 1964 vermutete Papavizas, daß Resistenz in Pflanzen aber auch durch Behandlung mit pflanzenfremden Stoffen induziert werden kann. In Versuchen mit Erbse und *Aphanomyces euteiches* konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung mit der nicht-proteinogenen Aminosäure β -Aminobuttersäure (BABA) die Krankheitssymptome deutlich vermindern kann (Papavizas, 1964). Die Wirkungsweise von BABA ist abhängig vom Pflanze-Pathogensystem. Resistenzinduktion durch BABA in *Arabidopsis thaliana* gegen *Botrytis cinerea* benötigt SA-Akkumulation und das Protein NPR1 und führt zu einer SAR-ähnlichen Abwehrreaktion. Gegen den Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* aber wirkt ein Signalweg, der unabhängig von SA, Ethylen und Jasmonsäure zu verstärkter Papillenbildung und somit zu Resistenz führt (Cohen *et al*, 1994; Zimmerli *et al* 2000; 2001).

Der erste synthetische SAR-Aktivator in Pflanzen war Methyl-2,6-dichloroisonicotinsäure (INA). Ward *et al*. (1991) konnten zeigen, daß die Behandlung von Tabakpflanzen mit INA zur Expression von PR-Genen und zur Resistenz der Pflanzen gegen Tabakmosaikvirus (TMV) führt. Auch Benzothiadiazole (BTH) sind in der Lage, SAR zu induzieren (Görlach *et al*, 1996). Sowohl INA als auch BTH wirken vermutlich aufgrund ihrer Struktur als Salicylsäureanaloga (Abb. 3). Beide Aktivatoren führen nicht zu einer Akkumulation von Salicylsäure und induzieren SAR auch in transgenen NahG-Pflanzen die SA zu Catechol abbauen, was darauf hindeutet, daß sie entweder auf derselben Ebene wie SA oder unterhalb von SA in der SAR-Signaltransduktionskette wirken (Oostendorp *et al*, 2001). BTH wurde unter dem Namen BION der erste kommerziell vermarktete SAR-Aktivator, der auch in der Landwirtschaft eingesetzt wurde.

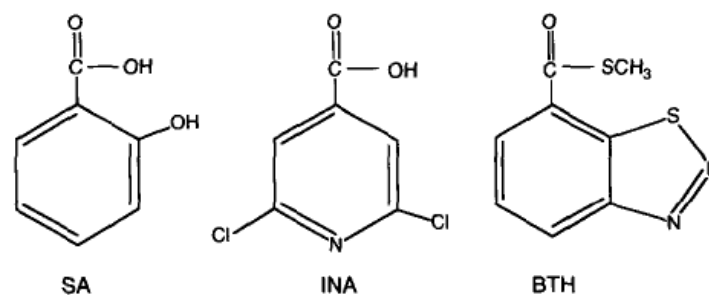


Abb. 3: Struktur der Salicylsäure (SA) und der Salicylsäureanaloga Methyl-2,6-dichloroisonicotinsäure (INA) und Benzothiadiazol (BTH).

Seit über 25 Jahren wird in Asien unter dem Namen ORYZEMATE der Pflanzenaktivator Probenazol eingesetzt. Probenazol (PBZ; 3-Allyloxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid) und sein aktiver Metabolit BIT (1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid) schützen bei prophylaktischer Anwendung Reis vor dem Reisbranderreger *Magnaporthe grisea*. Da beide Verbindungen sowohl in Reis als auch in *Arabidopsis thaliana* zu SA-Akkumulation und PR-Genexpression führen, wird vermutet, daß auch sie durch Stimulierung des SAR-Signalweges wirken. Da in NahG-Pflanzen die Wirkung von PBZ/BIT verloren geht, greifen sie aber im Gegensatz zu INA und BTH wahrscheinlich überhalb von SA in die SAR-Signaltransduktion ein (Yoshioka *et al*, 2001; Iwata, 2001; Nakashita *et al*, 2002).

Auch bei verschiedenen Pestiziden konnte beobachtet werden, daß neben der antibiotischen Wirkung auch ein Primingeffekt bzw. eine Induktion von Abwehrmechanismen auftritt. So bewirkt die Klasse der Strobilurin-Fungizide in Tabak keine direkte Akkumulation von SA und PR-Genen. Eine anschließende Infektion behandelter Pflanzen mit TMV und *Pseudomonas syringae* führt aber zu einer schnelleren Induktion von PR1 und einer erhöhten Resistenz gegenüber den Pathogenen (Herms *et al*, 2002). Das Fungizid Carpropamid wird gegen den Reisbranderreger *Magnaporthe grisea* eingesetzt und entfaltet seine Wirkung durch Inhibition der Melaninsynthese in den Appressorien des Pilzes. Zusätzlich führt eine Behandlung der Pflanzen mit Carpropamid aber auch zu einer erhöhten Einlagerung von Lignin und zu einer verstärkten Bildung von Phytoalexinen in der Pflanze (Thieron *et al*, 1998). Daß die Wirkung vieler Fungizide tatsächlich aus einer Kombination von antibiotischer Wirkung und Aktivierung pflanzlicher Abwehrsysteme besteht, konnte durch Versuche mit NahG-Pflanzen gezeigt werden. Die Wirkung der Fungizide Metalaxyl und Fosetyl ist in diesen SAR-defizienten Pflanzen deutlich eingeschränkt. Eine Kombination von Fungiziden und dem SAR-Aktivator BTH führt in Wildtyp-Pflanzen aber zu einem synergistischen Effekt. Die Abwehrsysteme der Pflanze tragen also zur Wirkung der Fungizide direkt bei (Molina *et al*, 1998).

Neben synthetischen Pflanzenaktivatoren und Fungiziden können auch natürliche Substanzen die Abwehrsysteme von Pflanzen beeinflussen. Riboflavin, ein Vitamin, das in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen als Cofaktor für viele enzymatische Reaktionen dient, ist in der Lage PR-Genexpression und Resistenz gegenüber Pathogenen zu induzieren (Dong und Beer, 2000). Das Vitamin B₁ (Thiamin) sorgt durch einen SA- und NPR1-abhängigen Primingeffekt für eine verstärkte Expression von PR1, Bildung von H₂O₂ und Einlagerung von Kallose, wenn die behandelten Pflanzen mit Pathogenen infiziert werden (Ahn *et al* 2005; 2007).

Harpin, der erste charakterisierte bakterielle HR-Elicitor, ist ein saures, glycinreiches Protein, das von verschiedenen phytopathogenen Bakterien, wie z.B. *Erwinia amylovora*, produziert und über das Typ III Sekretionssystem ausgeschieden wird (Wei *et al*, 1992).

Harpine wirken als Virulenzfaktoren, lösen aber in nicht kompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen neben der HR auch SAR und die Expression von PR-Genen aus. Die Behandlung von Pflanzen mit reinem Harpin-Protein reicht daher aus, um eine Resistenz gegenüber Pathogenen zu induzieren (Dong *et al*, 1999). Der Pflanzenaktivator Messenger, produziert von Eden Bioscience, enthält ein Fragment des Harpin-Proteins, daß keine HR, dafür aber Resistenz gegenüber Pathogenen und ein verstärktes Pflanzenwachstum bewirken soll (United States Patent 6858707).

Neben klar definierten Resistenz-Aktivatoren wie BTH, INA oder auch Harpin, werden zunehmend auch Extrakte aus Bakterien oder Pflanzen zur Stimulation der Abwehrsysteme von Pflanzen verwendet. Der Pflanzenaktivator Milsana besteht aus einem Extrakt des Sachalin-Staudenknöterichs *Reynoutria sachalinensis*. Es konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung mit Milsana zur Stimulation des Phenylpropanweges und zur Bildung von Phytoalexinen in Gurke führt. Die behandelten Pflanzen zeigten auch eine erhöhte Resistenz gegenüber Mehltau (Daayf *et al*, 1997; Fofana *et al*, 2002).

Die Pflanzenextrakte BioS und Neudovital induzieren in *Arabidopsis thaliana* Resistenz gegenüber *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum*. Eine Analyse der Genexpression in behandelten Pflanzen zeigte, daß beide Aktivatoren sowohl den SA-Signalweg als auch den JA-Signalweg aktivieren und vermutlich unter anderem über die Produktion von SA und PR-Proteinen eine Resistenz gegenüber den Pathogenen bewirken (von Rad *et al*, 2004). Welche Bestandteile der Aktivatoren für die Induktion von Abwehrmaßnahmen verantwortlich sind, ist allerdings nicht bekannt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Aufbauend auf den Arbeiten von Uta von Rad im Institut für biochemische Pflanzenpathologie der GSF in Neuherberg (von Rad *et al*, 2004), sollte in dieser Arbeit der Effekt von Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien auf Gerste, und im kleineren Maßstab auf Kartoffel, analysiert werden.

Durch Expressionsanalysen und Untersuchung von Signalmolekülen der Pathogen-Abwehr konnte am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, daß bestimmte Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien in der Lage sind die Abwehrsysteme der Pflanze zu stimulieren und sie somit resistenter gegenüber Pathogenbefall zu machen. Pflanzenaktivatoren die sich in diesen Studien als wirksam herausgestellt hatten (BioS, Neudovital und Messenger) sowie der ebenfalls kommerziell erhältliche Rhizosphärebakterienstamm *Pseudomonas fluorescens spec. Proradix*, sollten in diesem Projekt an der Nutzpflanze Gerste auf ihre Wirksamkeit und ihre Anwendbarkeit in der Landwirtschaft hin untersucht werden.

- Im Labor sollten zunächst Expressionsanalysen mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarray durchgeführt werden.
- In Infektionsexperimenten mit *Rhynchosporium secalis* sollte festgestellt werden, ob die ausgewählten Pflanzenaktivatoren in der Lage sind in Gerste Pathogenresistenz zu induzieren.
- In Gewächshausversuchen sollte der Effekt der Aktivatoren auf ertragsrelevante Parameter von Gerste unter kontrollierten Bedingungen analysiert werden.

In den Jahren 2005, 2006 und 2007 sollten die Aktivatoren Messenger und Proradix außerdem in Freilandversuchen im Versuchsgut der GSF in Scheyern an Gerste und Kartoffel angewendet und auf ihre Auswirkung auf den Ertrag hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Name	Firma
Agar	Sigma
Agarose	Biozym
Aminoallyl-dUTP (aadUTP)	Sigma
Antibiotic Antimycotic Solution (100x)	Sigma
Betaine	Sigma
BION Pflanzenaktivator	Ciba Geigy
BioS Pflanzenaktivator	BIOFA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Chloroform	Merck
Cy3 Mono-Reactive Dye Pack	Amersham
Cy5 Mono-Reactive Dye Pack	Amersham
di-Kalium-Hydrogenphosphat	Merck
di-Natrium-Hydrogenphosphat	Merck
di-Natriumcarbonat	Merck
DMSO	Sigma
DTT	Invitrogen
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidium bromide	Roth
Ficoll 400	Sigma

Formamid	Sigma
Gelrite	Duchefa
Glycerin	Merck
Isopropanol	Merck
Kalium-di-hydrogenphosphat	Merck
Loading Dye Lösung 6x	Fermentas
Magnesiumsulfatheptahydrate	Merck
Malzextrakt	Sigma
Messenger Pflanzenaktivator	Eden Bio
Murashige & Skoog (MS) Medium mit Vitaminen	Duchefa
Natriumacetat	Merck
Natriumborhydrid	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhypochlorit Lösung	Sigma
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck
N-Lauroylsarcosine Lösung	Sigma
Neudovital Rosen-Pilzschutz Pflanzenaktivator	Neudorff
Pepton	Sigma
Phenol sauer	Roth
Polyvinylpyrrolidone	Sigma
ProAct Pflanzenaktivator	Eden Bio
RNaseZAP	Sigma
Saccharose	Sigma
Salzsäure	Merck
ssDNA, low molecular weight salmon sperm	Fluka
Tri-Natriumcitrat	Sigma
Tween 20	USB
Wuxal TopN Dünger	Aglukon

2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Medien

Für die Herstellung aller Lösungen, Puffer und Medien wurde entsalztes und filtriertes Wasser verwendet. Hitzestabile Lösungen, Puffer und Medien wurden in einem Wasserdampfhochdruckautoklaven für 20' bei 121°C und $1,012 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Alle anderen Lösungen wurden vor Verwendung sterilfiltriert. Die pH-Werte wurden mit Hilfe eines pH-Meters eingestellt.

Puffer/Lösungen/Medien	Konzentration
Aminoallyl Labeling Mix (50x)	
dATP	25 mM
dCTP	25 mM
dGTP	25 mM
dTTP	15 mM
aa-dUTP	10 mM
Cy3 und Cy5 Monoreactive Dyes	
40nmol in 73µl DMSO lösen	
Lagerung bei -20°C	
Denhardt´s Lösung (50x)	
Ficoll 400	1% (w/v)
Polyvinylpyrrolidone	1% (w/v)
Bovine serum albumin (BSA)	1% (w/v)
Lagerung bei -20°C	
DEPC-H₂O	
Diethyl Pyrocarbonat autoklavieren	0,1% (v/v)
Hybridisierungspuffer für Mikroarrays	
Formamid	50% (v/v)
SSC	6x
Denhardt´s	5x
SDS	0,5% (w/v)
ssDNA (10 mg/ml)	1% (v/v)
Lagerung bei -20°C	
Kings B Medium	
Bactopecton	20 g/l
Glycerin	10 g/l
K ₂ HPO ₄	1,5 g/l
Agar	15 g/l
Nach Autoklavieren: MgSO ₄ sterilfiltriert zugeben	1,5 g/l

Lysispuffer für DNA-Isolation aus Pilzen

Tris-HCl pH 7,2	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3% (w/v)
Vor Verwendung: β -Mercaptoethanol zugeben	1% (v/v)

Malz Agar

Malzextrakt	30 g/l
Agar	15 g/l
autoklavieren	

½ MS + Saccharose-Medium für Gerste Sterilkultur

Murashigge & Skoog Medium	2,2 g/l
Sacharose	10 g/l
Gelrite	4 g/l
autoklavieren	

½ MS -Medium für Gerste Sterilkultur

Murashigge & Skoog Medium (Duchefa)	2,2 g/l
autoklavieren	

Natriumborhydrid Lösung

NaBH ₄	0,75 g
PBS (1x)	200 ml
Ethanol	75 ml

Natrium Carbonat Puffer

1,08 g Na ₂ CO ₃ in 8ml H ₂ O _{bidest} lösen, pH mit 32% HCl auf 9.0 einstellen, ad 10ml mit H ₂ O _{bidest}	1 M
---	-----

PBS (10x)

NaH ₂ PO ₄	80 mM
Na ₂ HPO ₄	400 mM
NaCl	1,5 M
pH 7,4	

Phosphatpuffer (KPO₄) pH8,5

1M K ₂ HPO ₄ (9,5 ml) mit 1M KH ₂ PO ₄ (0,5 ml) mischen pH 8,5-8,7	1 M
---	-----

Phosphatelutionspuffer

Phosphatpuffer (KPO ₄) pH8,5	4 mM
--	------

Phosphatwaschpuffer

Phosphatpuffer (KPO ₄) pH8,5	5 mM
Ethanol	80% (v/v)

Prähybridisierungspuffer für Mikroarrays

SSC	6x
SDS	0,5% (w/v)
Bovine serum albumin	1% (w/v)
ssDNA (10 mg/ml)	1% (v/v)
Lagerung bei -20°C	

Spotting-Lösung

SSC	3x
Betaine	1,5 M

SSC (20x)

NaCl	
Tri-Natriumcitrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	3 M
pH 7,0 einstellen und sterilfiltrieren oder autoklavieren	0,3 M

ssDNA Lösung (10mg/ml)

Salomon Sperm DNA low molecular weight, lösen in 1xSSC, vor Anwendung bei 100°C denaturieren und auf Eis abkühlen	10 mg/ml
---	----------

TAE-Puffer (50x)

Tris	2 M
Essigsäure	5.7 % (v/v)
EDTA	50 mM

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

2.1.3 Pflanzenaktivatoren

Die Pflanzenaktivatoren wurden nach Angaben der Hersteller angewendet und gelagert. Die Verdünnung der Aktivatoren erfolgte im Labor und im Gewächshaus mit entsalztem Wasser, bei den Freilandversuchen mit Leitungswasser.

Pflanzenaktivator	Hersteller	Konzentration
BION	Ciba Geigy	2mM
BioS	BIOFA	3% (v/v)
Neudovital Rosen-Pilzschutz	Neudorff	1% (v/v)
Messenger	Eden Bioscience	1g/l

2.1.4 Antibiotika

Bezeichnung	Konzentration
Ampicillin in H ₂ O _{bidest} lösen und sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C	Stammlösung: 100 mg/ml Endkonzentration: 100 µg/ml
Kanamycin in H ₂ O _{bidest} lösen und sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C	Stammlösung: 50 mg/ml Endkonzentration: 50 µg/ml

2.1.5 Geräte und sonstige Laborausstattung

Neben der üblichen Laborausstattung wurde verwendet:

Axioskop	Zeiss
Beckmann Spektrophotometer DV640	Beckmann
Genepix 4000A	Axon Instruments
Gel Doc 2000	BioRad
Hybridization Chamber VersArray	Bio Rad
Innova 4340 Shaker	New Brunswick Science
Mikrodismembrator II	B.Braun
MicroGrid DNA Array Roboter	Biorobotics TAS
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Kisker Biotech
Phytokammer VB1014	Vötsch Industrietechnik
7500 Realtime PCR System	Applied Biosystems
Seralpur Pro90C Reinstwasseranlage	Seral
Vakuum-Konzentrator Univapo Typ 150 H	UniEquip
Wasserdampfhochdruckautoklav GVA 4.6	Gössner

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Neben den üblichen Materialien wurde verwendet:

Absolute QPCR Seal	Thermo Scientific
Aldehyde Arraying Slides	Genetix
Deckgläser 24x50mm	Menzel-Gläser
GeneFrames & Copverslips 50x25mm	ABgene
Safe-Lock Tubes 0,5ml	Eppendorf
Sterilfilter Millex HV 0,45µm und 0,22µm	Millipore
Sterilfilter Steritop 0,22µm	Millipore
Thermo-Fast 96 Detection Plates	Thermo Scientific
Vitro Vent Boxen	Duchefa Biochemie

2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonucleotidsynthese wurde bei MWG-Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die Stocklösungen hatten eine Konzentration von 100µM in TE, die Gebrauchslösungen hatten eine Konzentration von 10µM in H₂O_{bidest.}

Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0.5 µg/µl)	Invitrogen
--	------------

RS8mod2	5'-CCA GAG GAC CAC AAC TCT TGT T-3'
RS9mod2	5'-AAG GCG CAA TGT GCG TTC AAA -3'
AV3	5'-TGC TCA TGG TGG TTC CTG CG -3'
Ggt_for1	5'-GGT CAG GAC AAG GAC TAC CC -3'

2.1.8 Reaktionssysteme, Kits und Enzyme

Absolute™ QPCR SYBR® Green Low Rox Mix	ABgene
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
dNTP set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder, 100 bp	Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder, 1kb	Fermentas
Qiaquick PCRpurification	Qiagen

RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RNase, DNase frei	Roche
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
TRizol Reagent	Invitrogen

2.1.9 Computerprogramme

Acuity 4.0	Axon Instruments
Genepix Pro 6.0	Axon Instruments
Primer3 Primerdesign	http://frodo.wi.mit.edu/
Sequence Detection Software 1.2.2	Applied Biosystems
TAS Application Suite	Biorobotics

2.1.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Unterstützung des Image + Statistics Consultancy Lab des HelmholtzZentrums München analysiert.

Die Daten aus Freilandversuchen wurden einem „Duncans multiple range“ test unterzogen ($p < 0,05$). „Duncans multiple range test“ wird häufig in der Landwirtschaft angewandt und wurde mir daher auch für die Freilandversuche empfohlen.

Daten aus Labor- und Gewächshausexperimenten mit nur einem Behandlungstyp wurden durch einen T-Test auf Signifikanz überprüft ($p < 0,05$). Bei Experimenten die mehr als eine Behandlung beinhalteten wurde vorher eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Hierbei wird der p-Wert für die einzelnen T-Tests entsprechend der Anzahl an Behandlungen reduziert, so daß insgesamt ein Niveau von $p < 0,05$ eingehalten werden kann.

2.2 Pflanzen und Pilze

2.2.1 Sterile Gerste-Kulturen

2.2.1.1 Sterilisation der Samen

Zur Oberflächensterilisierung wurden etwa 10 g Gerste-Samen in einem sterilen 50 ml Falcontube mit 70% Ethanol (v/v) für 2' geschüttelt und einmal mit 50 ml sterilem H_2O_{bidest} gewaschen. Anschließend wurden 1 ml 10% Tween20 und 35 ml 6-14% NaOCl -Lösung zugegeben, mit H_2O_{bidest} auf 50 ml aufgefüllt und für 20' geschüttelt. Die NaOCl Lösung wurde verworfen und die Samen zweimal mit 50 ml sterilem $H_2O_{dem.}$ gewaschen. Anschließend wurden die Samen für drei Tage bei 4°C in 25 ml 1x Antibiotic/Antimycotic Solution (SIGMA) aufbewahrt. Vor der weiteren Verwendung wurden die oberflächensterilisierten Samen zweimal für mindestens 15' mit 50 ml sterilem H_2O_{bidest} gewaschen.

2.2.1.2 Anzucht steriler Keimlinge auf 1/2MS-Platten

Von den oberflächensterilisierten Gerstesamen wurden je zehn Stück auf eine Gelrite-Platte (1/2MS, 4 g/l Gelrite, 10 g/l Saccharose) transferiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und in einer Phytokammer bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Tag/Nacht-Temperatur von 16/12°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h für fünf Tage inkubiert. Danach wurden alle Platten die Anzeichen einer Kontamination mit Mikroorganismen aufwiesen aussortiert und die sterilen Keimlinge in Vitro Vent Boxen transferiert.

2.2.1.3 Vorbereitung der Vitro Vent Boxen

Für sterile Gersten-Kulturen wurden Vitro Vent Boxen mit einer Drainageschicht aus 50 g Quarzsand der Korngröße Nr.3 und 150 g Quarzsand der Korngröße Nr.5 (beide Firma Sakret) befüllt. Die Boxen wurden mit einem Deckel verschlossen und anschließend autoklaviert. Vor der weiteren Verwendung wurde in jede Vitro Vent Box 50ml steriles 1/2MS-Medium gegeben.

2.2.1.4 Inokulation der sterilen Keimlinge mit *P. fluorescens spec. Proradix*

P. fluorescens spec. Proradix wurde in 50 ml KingsB Flüssignährmedium bei 30°C in einem Schüttelinkubator über Nacht angezogen. Die Bakterien wurden nach der Inkubation für 15' bei 3500xg und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml einer 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschrittes wurde das Pellet in 50 ml 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen.

Die optische Dichte (OD_{nm}) einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung der Zellsuspension wurde in Kunststoffküvetten (1,5 ml PS halbmikro Einmal-Küvetten, Brand) im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 435 nm in dreifacher Wiederholung gemessen. Zur Inokulation der Pflanzen wurde die Zellsuspension mit einer sterilen 10mM MgSO₄-Lösung je nach Bedarf auf eine OD₄₃₅ von 0,1- 2,0 eingestellt, wobei ein Wert von ca. 0,8 in etwa 10⁸ Zellen/ml entspricht. Die sterilen Gerstenkeimlinge wurden je nach Versuch in dieser Zellsuspension für bis zu 3h inkubiert oder mit einer sterilen Pinzette bis zum Wurzelhals in die Suspension getaucht. Kontrollpflanzen wurden auf die gleiche Weise mit einer 10 mM MgSO₄-Lösung behandelt. Die inokulierten Keimlinge wurden dann in die vorbereiteten Phytotrays transferiert und bis zum Wurzelhals mit sterilem Quarzsand der Korngröße Nr.5 bedeckt. Zur Bestimmung des Frischgewichts von Wurzel und Sproß wurden zu den Zeitpunkten 1d, 3d und 6d jeweils drei Vitro Vent Boxen für Kontrolle und Behandlung geerntet und analysiert.

2.2.2 Versuche mit Gerste in Phytokammern

Gerste-Kultivar: Barke ungebeizt

Je fünf Gerste-Samen pro Topf (Vierecktöpfe 8 cm, Sima) wurden auf angefeuchteter Typ-T-Einheitserde (Terreau Professionell GEPAC Einheitserde) mit 25% (v/v) Perlite (Perligran, Knauf Perlite GmbH) ausgelegt und mit Erde bedeckt. Die Anzucht erfolgte in Phytokammern bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Tag/Nacht-Temperatur von 16/12°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h. Es wurde keine zusätzliche Düngung vorgenommen.

Die Behandlung der Gersten mit Pflanzenaktivatoren erfolgte nach 14 Tagen im Dreiblattstadium. Für eine Inokulation mit *Pseudomonas fluorescens spec. Proradix* wurden die Töpfe mit 50 ml einer Bakteriensuspension gegossen, so daß eine Konzentration von 5x10⁷CFUs/g Boden erreicht wurde.

Für Expressionsanalysen wurden die Pflanzen nach 4h, 1d und 4d geerntet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für jeden Zeitpunkt wurden je drei Töpfe geerntet.

2.2.3 Gewächshausversuche mit Gerste

Gerste-Kultivar: Barke ungebeizt bzw. gebeizt mit *P. fluorescens* spec. Proradix

Je fünf Gerstesamen wurde in 6 l-Töpfen auf angefeuchtetem Tonsubstrat (Ökohum Kultursubstrat Typ RKS2, nährstoffreich) mit 25% (v/v) Perlite oder Typ-O-Einheitserde (Frühstorfer Erde Typ 0, nährstoffarm) mit 25% (v/v) Perlite oder einer 1:1 Mischung aus beiden (mittlerer Nährstoffgehalt) mit 25% (v/v) Perlite ausgelegt und mit Erde bedeckt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Tag/Nacht-Temperatur von 16/12°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h. Eine zusätzliche Düngung erfolgte nach vier und acht Wochen mit 200 ml/Topf einer 0,72% Lösung Wuxal TopN (N/P/K: 12/4/6) in Versuchen mit Tonsubstrat und mit 200 ml/Topf einer 0,18% Lösung Wuxal TopN (N/P/K: 12/4/6) in Versuchen mit Typ-0-Erde bzw. der 1:1 Mischung aus Tonsubstrat und Typ-0-Erde.

Die Behandlung der Pflanzen mit den Pflanzenaktivatoren Messenger, BioS und Neudovital erfolgte nach Angaben der Hersteller einmal zu Beginn der Bestockung. Die Beizung von Barke-Saatgut mit *P. fluorescens* spec. Proradix erfolgte durch die Hersteller-Firma Sourcon Padena vor der Aussaat durch Vakuuminfiltration (s. 2.2.7.1). Für jede Behandlung wurden acht Töpfe angesetzt. Nach der Ausreifung wurden die oberirdischen Teile der Pflanzen für jeden Topf getrennt geerntet, zwei Tage bei 45°C getrocknet und gedroschen. Es wurden für jeden Topf Tausendkorngewicht, Strohgewicht, Ährenanzahl und Ertrag bestimmt.

2.2.4 Open-Top-Versuche mit Gerste

Gerste-Kultivar: Barke ungebeizt bzw. gebeizt mit *P. fluorescens* spec. Proradix

Je fünf Gerstesamen wurde in 6 l-Plastiktöpfen auf angefeuchtetem Tonsubstrat mit 25% (v/v) Perlite ausgelegt und mit Erde bedeckt. Die Aussat erfolgte Mitte April 2007 in den Open-Top Anlagen der GSF in Neuherberg. Eine zusätzliche Düngung erfolgte nach vier

und acht Wochen mit 200 ml/Topf einer 0,72% Lösung Wuxal TopN (N/P/K: 12/4/6). Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nicht durchgeführt.

Die Behandlung der Pflanzen mit den Pflanzenaktivatoren Messenger, BioS und Neudovital erfolgte nach Angaben der Hersteller einmal zu Beginn der Bestockung. Die Beizung von Barke-Saatgut mit *P. fluorescens* spec. Proradix erfolgte durch die Hersteller-Firma Sourcon Padena vor der Aussaat durch Vakuuminfiltration (s. 2.2.7.1). Für jede Behandlung wurden acht Töpfe angesetzt. Das gesamte Experiment wurde an getrennten Standorten in zweifacher Ausführung durchgeführt. Nach der Ausreifung wurden die oberirdischen Teile der Pflanzen für jeden Topf getrennt geerntet, zwei Tage bei 45°C getrocknet und gedroschen. Es wurden für jeden Topf Tausendkorngewicht, Strohgewicht, Ährenzahl und Ertrag bestimmt.

2.2.5 Freilandversuche mit Gerste

Gerste-Kultivar: Barke ungebeizt bzw. gebeizt mit *P. fluorescens* spec. Proradix

Die Pflanzenaktivatoren Messenger und Proradix wurden in Freilandversuchen auf dem Versuchsgut der GSF in Scheyern an Gerste auf ihre Wirksamkeit getestet (s. Abb. 4). Die Anlagen wurden mit Unterstützung der Leitung des Versuchsguts Scheyern geplant und in vierfacher Ausführung auf verschiedenen Schlägen angelegt. Zwei der Anlagen wurden ökologisch, zwei integriert bewirtschaftet. Details über Aussaat und Ernte sowie Pflanzenschutz und Düngung sind den Schlagkarteien im Anhang zu entnehmen.

In den Versuchen sollte mit Proradix gebeiztes Saatgut ausgebracht werden (Parzellen P und MP). Um zu vermeiden, daß durch Regen eine Übertragung der Bakterien auf Kontroll- und Messengerparzellen (K und M) stattfindet, wurde auf eine komplette Randomisierung der Anlagen verzichtet. Zusätzlich wurden Trennparzellen (T) eingefügt und die proradixbehandelten Parzellen wenn möglich hangabwärts angelegt.

Die Beizung von Barke-Saatgut mit *P. fluorescens* spec. Proradix erfolgte durch die Hersteller-Firma Sourcon Padena vor der Aussaat durch Vakuuminfiltration (s. 2.2.7.1). Die Behandlung mit Messenger erfolgte nach Angaben des Herstellers einmal zwischen 3-Blatt-Stadium und Bestockung.

Nach der Abreifung wurden die Parzellen einzeln geerntet und das Saatgut getrocknet und verwogen. Jede Parzelle wurde nach der Ernte vermessen und der Ertrag auf dt/ha umgerechnet.

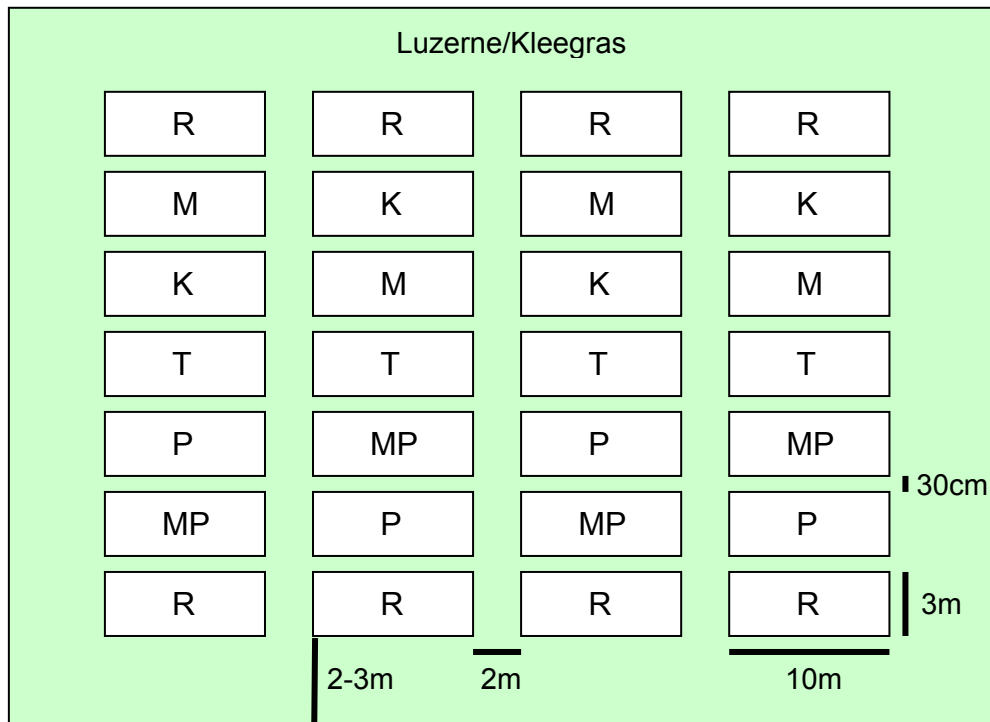


Abb. 4: Parzellenanlagen für Freilandversuche mit Gerste: Die Anlagen enthielten Rand- (R) und Trennparzellen (T). Jede Behandlung war in vierfacher Wiederholung vorhanden. Die Behandlungen umfaßten unbehandelte Kontrolle (K), Messenger (M), Proradix (P) sowie Messenger + Proradix (MP). Die Größe jeder Gersteparzelle betrug 3x10 m.

Im Jahr 2007 wurde das geerntete Saatgut durch die Firma Agrolab weiter auf Tausenkorngewicht, Proteingehalt, Stärkegehalt und Keimungsrate hin untersucht. Außerdem wurden in einem ökologisch und einem integriert bewirtschafteten Schlag für jede Behandlung vier Zusatzparzellen angelegt, um nach der Ernte das Strohgewicht der Pflanzen zu bestimmen.

2.2.6 Freilandversuche mit Kartoffel

Kartoffel-Kultivar: Nicola ungebeizt

Die Pflanzenaktivatoren Messenger und Proradix wurden in Freilandversuchen auf dem Versuchsgut der GSF in Scheyern an Kartoffel auf ihre Wirksamkeit getestet. Die Anlagen wurden mit Unterstützung der Leitung des Versuchsguts Scheyern geplant und in zweifacher Ausführung auf verschiedenen Schlägen angelegt. Der Aufbau der Anlagen entsprach dem Aufbau der Gerstensläge (s. 2.2.5). Die Anlagen enthielten Rand- (R) und Trennparzellen (T). Jede Behandlung war in vierfacher Wiederholung vorhanden. Die Behandlungen umfaßten unbehandelte Kontrolle (K), Messenger (M), Proradix (P) sowie

Messenger + Proradix (MP). Jede Kartoffelparzelle umfaßte vier Dämme von je 10m Länge im Abstand von 75cm. Jeder Damm enthielt ca. 30 Pflanzen. Zwischen den Parzellen wurde ebenfalls ein Abstand von 75cm eingehalten. Je ein Schlag wurde ökologisch bzw. integriert bewirtschaftet. Details über Auslage und Ernte sowie Pflanzenschutz und Düngung sind den Schlagkarteien im Anhang zu entnehmen. Die Behandlung von Kartoffeln mit *P. fluorescens* spec Proradix wurden nach Angaben des Herstellers vor dem Auslegen der Kartoffeln im Tauchverfahren durchgeführt. Die Knollen wurden ausgelegt, solange sie noch feucht waren. Die Behandlung mit Messenger erfolgte nach Angaben des Herstellers einmal zu Beginn der Knollenbildung und ein zweites mal zwei Wochen nach der ersten Behandlung. Bei der Ernte wurde jeder Damm einzeln geerntet und die Kartoffeln verwogen. Über die Anzahl an Pflanzen pro Damm wurde das Stockgewicht berechnet. 2007 wurden die geernteten Kartoffeln zusätzlich nach Größe sortiert (<35 mm; 35-55 mm; >55 mm) und verwogen.

2.2.7 Stammhaltung von Bakterien und Pilzen

2.2.7.1 Bakterien

Pseudomonas fluorescens spec. Proradix, zur Verfügung gestellt von Sourcon Padena

Pseudomonas fluorescens spec. Proradix transformiert mit dem Plasmid pSBA28 (Kan^{Res}) zur konstitutiven Produktion von Green-Fluorescent-Protein (GFP), war im Labor vorhanden

Pseudomonas fluorescens spec. Proradix wurde auf Kings-B-Platten angezogen, *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix pSBA28 wurde auf Kings-B-Platten angezogen die zur Selektion auf das Plasmid pSBA28 mit 50 µg/ml Kanamycin versetzt waren. Die Bakterien wurden einmal im Monat auf frische Platten überstrichen und ÜN bei 30°C neu angezogen. Die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte ÜN in 50 ml KingsB bzw. KingsB mit 50 µg/ml Kanamycin bei 30°C in einem Schüttelinkubator.

Für die Lagerung der Bakterien bei -80°C wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierfür wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 700 µl einer ÜN-Bakterienkultur mit 300 µl 50% (v/v) Glycerin vermischt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Die Beizung von Gerste Saatgut mit Proradix erfolgte durch den Hersteller Sourcon Padena. Von uns zur Verfügung gestelltes Saatgut wurde kurz vor Beginn einer

Experimentreihe mittels Vakuuminfiltration mit Proradix behandelt. Dazu wurden die Samen mit einer Flüssigbeize mit 8×10^{10} CFU/kg Saatgut besprüht. Anschließend wurde ein Vakuum angelegt und die Gerste bei 27°C für vier Stunden rückgetrocknet. Auf diese Weise gebeiztes Saatgut wurde bis zur Aussaat kurzzeitig bei 4°C gelagert

Sourcon Padena war nicht bereit, uns weitere Informationen über den Vorgang der Beizung und über weitere Beimengungen in der Beize zukommen zu lassen.

2.2.7.2 Pilze

Gaeumanomyces graminis var. *tritici* zur Verfügung gestellt von Karin Schreiner, IBÖ, GSF-Neuherberg.

Gaeumanomyces graminis var. *tritici* wurde auf Malzagar-Platten bei RT im Dunkeln angezogen. Der Transfer auf frische Platten erfolgte einmal im Monat, indem ein Stück bewachsener Agar mit der Mycelseite nach unten auf eine frische Platte gesetzt wurde. Um Pilz-Mycel zur Isolation von DNA zu erhalten, wurde ein Stück bewachsener Agar in einen Kolben mit 50 ml flüssigem Malzagar gegeben. Das Wachstum erfolgte bei RT im Dunkeln für mehrere Wochen. Das Mycel wurde vor weiterer Verwendung mit Wasser gründlich gewaschen.

2.2.8 Platteninhibitionstests

Um die Hemmwirkung von *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix auf das Wachstum von *Gaeumanomyces graminis* abschätzen zu können wurden Dualkulturen auf Malzagar-Platten durch geführt. Hierfür wurden 100 µl einer ÜN-Kultur von *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix auf eine Malzagarplatte aufgebracht. Im Abstand von ca. 2 cm wurde ein von *Gaeumanomyces graminis* bewachsenes Agarblöckchen mit der Mycelseite nach unten auf dieselbe Platte gesetzt. Das Wachstum des Pilzes wurde über eine Woche beobachtet.

2.2.9 Infektionsversuche mit *Rhynchosporium secalis*

Gerste-Kultivar: Alexis ungebeizt

Rhynchosporium secalis; zur Verfügung gestellt von Günther Schweizer, Landesanstalt für Landwirtschaft Freising.

Je vier Gerste-Samen pro Topf (Viereckttöpfe 8 cm, Sima) wurden auf angefeuchteter Typ-T-Einheitserde (Terreau Professionell GEPAC Einheitserde) mit 25% (v/v) Perlite (Perligran, Knauf Perlite GmbH) ausgelegt und mit Erde bedeckt. Die Anzucht erfolgte für 14 Tage in einer Phytokammer bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Tag/Nacht-Temperatur von 16/12°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h. Es wurde keine zusätzliche Düngung vorgenommen.

Die Behandlung der Gersten mit Pflanzenaktivatoren erfolgte nach Angaben der Hersteller im Dreiblattstadium der Pflanzen (14 Tage nach Aussaat). Für eine Inokulation mit *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix wurden die Töpfe mit 50 ml einer Bakteriensuspension gegossen, so daß eine Konzentration von ca. 5×10^7 CFUs/g Boden erreicht wurde. Die verwendete Bakteriensuspension wurde wie in 2.2.7.1 beschrieben hergestellt.

Die Infektion mit *Rhynchosporium secalis* erfolgte in der Arbeitsgruppe von Günther Schweizer (Landesanstalt für Landwirtschaft Freising) vier Tage nach der Behandlung mit den Aktivatoren durch Besprühen der Pflanzen mit einer Sporensuspension (nach Pickering *et al*, 2006).

Zur Quantifizierung der Infektion durch Realtime quantitative PCR (qRT-PCR) wurden sieben bzw. 14 Tage nach der Infektion die oberirdischen Teile der Pflanzen geerntet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für jede Behandlung und jeden Zeitpunkt wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungen mit je vier Pflanzen geerntet.

2.2.10 Infektionsversuche mit *Gaeumanomyces graminis* var *tritici*

Infektionen mit *Gaeumanomyces graminis* wurden in sterilen Gerstekulturen durchgeführt (s. 2.2.1). An Stelle der Vitro Vent Boxen wurden Glaszylinder mit einem Durchmesser von 13cm und einer Höhe von 23 cm verwendet. Die Glaszylinder wurden mit 400 g Quarzsand der Korngröße Nr.3 (Sakret, Brunthal) befüllt, mit einem Glasdeckel verschlossen und autoklaviert. Anschließend wurde 50 ml steriles 1/2MS Medium

dazugegeben. Das Experiment erfolgte in Phytokammern bei einer Luftfeuchtigkeit von 65%, einer Tag/Nacht-Temperatur von 16/12°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12h/12h.

Sterile Gerstenkeimlinge wurden mit *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix behandelt und über Nacht in sterilen Vitro Vent Boxen inkubiert. Jeder inokulierte Keimling wurde am nächsten Tag in einem Glaszylinder auf ein mit Gaeumanomyces-Mycel bewachsenes Agablöckchen gesetzt und bis zum Wurzelhals mit Quarzsand der Korngröße Nr.3 bedeckt. Die Probenahme erfolgte acht Tage bzw. 15 Tage nach Infektion. Hierfür wurden die Wurzeln der Pflanzen zusammen mit dem Wurzelhals geerntet. Eine erfolgreiche Infektion konnte nach 8 Tagen an einer Schwarzfärbung des Wurzelhalses erkannt werden. Für jeden Zeitpunkt wurden drei unabhängige Proben bestehend aus je fünf Pflanzen geerntet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht im Besonderen beschriebenen Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.1 Isolation von genomischer DNA aus Gerste

Zur Isolation genomischer DNA aus Gerste wurde frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Dismembrator zu feinem Pulver gemahlen. DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Plant Mini-Kits von Qiagen isoliert. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde vor der Elution zusätzlich einmal mit 750 µl 100% Ethanol gewaschen. Das Protokoll ergab DNA mit einer Konzentration von ca. 70ng/µl.

2.3.2 Isolation von genomischer DNA aus Pilzen

Zur Isolation genomischer DNA aus *R. secalis* and *G. graminis* wurde frisches Pilzmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Dismembrator zu feinem Pulver gemahlen. 100 mg des Pulvers wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 800 µl Lysispuffer vermischt und für 1h bei 65°C inkubiert. Danach wurde 800 µl Chloroform beigegeben, kurz durch Vortexen gemischt und bei RT und 10000xg für 15' zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden mit 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 8,0) und 0,54 Volumen

Isopropanol gemischt. Die ausgefallene DNA wurde 2' bei RT und 10000xg abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz angetrocknet und in 100 µl Puffer EB (Qiagen) gelöst.

Die DNA-Lösung wurde mit DNase freier RNase versetzt (Enkonzentration 5 µg/ml) und für 15' bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 2x 30 µl H₂O_{bidest} eluiert. Das Protokoll ergab DNA mit einer Konzentration von ca. 50 ng/µl.

2.3.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Gerste

Für Expressionsanalysen wurde Gesamt-RNA aus Gerste isoliert. Die Isolation erfolgte mit TRIZOL (Invitrogen) nach folgendem Protokoll:

Das Pflanzenmaterial wurde nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das gefrorene Material wurde in einem Dismembrator zu feinem Pulver gemahlen. 90-100 mg des Pulvers wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml TRIZOL versetzt und durch starkes Vortexen gemischt. Die Suspension wurde 10' bei 4°C und 12000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß abgegossen und für 5' bei RT inkubiert. Dannach wurde 200 µl Chloroform beigegeben, 15'' per Hand geschüttelt, erneut 3' bei RT inkubiert und anschließend 15' bei 4°C und 12000xg zentrifugiert. 550 µl des Überstandes wurden mit 550 µl Isopropanol versetzt und zuerst 10' bei RT und dann 10' auf Eis inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde 10' bei 4°C und 12000xg abzentrifugiert, zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 4°C und 5' 7500xg) und anschließend maximal 15' in einem Abzug an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 200 µl DEPC-Wasser gelöst. Um das Lösen der RNA zu unterstützen wurde die RNA für 30' auf Eis inkubiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Die RNA wurde vor der weiteren Verwendung einmal 1' bei 4°C und 20000xg zentrifugiert, um ungelöste RNA zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Protokoll ergab RNA mit einer Konzentration von ca. 500 ng/µl. Die Qualität der RNA wurde immer durch eine Agarose-Gelelektrophorese sichergestellt.

2.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die Auftrennung von genomischer DNA, Gesamt-RNA und PCR-Produkten wurde eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel (0,8-1,5%) durchgeführt. Als Laufpuffer

diente 1xTAE versetzt mit Ethidiumbromid (10 µg pro 100 ml Laufpuffer). Als Längenstandard wurde der PeqGOLD 1kb DNA-Standard verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 75-125 V und 30 bis 55 mA. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht photographiert.

2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration an RNA bzw. DNA in einer wässrigen Lösung zu bestimmen, wurde eine geeignete Verdünnung hergestellt (1:100 und 1:1000) und in einem Photometer die Extinktion der Verdünnung bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Eine Extinktion von 1, gemessen bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm, entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml.

Die Konzentration an DNA in einer Lösung berechnet sich nach:

$$[\text{DNA}] \text{ in } \mu\text{g/ml} = (E_{260\text{nm}} \times 50) / \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Konzentration an RNA in einer Lösung berechnet sich nach:

$$[\text{RNA}] \text{ in } \mu\text{g/ml} = (E_{260\text{nm}} \times 40) / \text{Verdünnungsfaktor}$$

Eine Kontamination mit Polysacchariden läßt sich über das Verhältnis von $E_{230\text{nm}}$ zu $E_{260\text{nm}}$ abschätzen, wobei ein Wert von $<0,6$ zeigt, daß die Lösung nahezu frei von Polysacchariden ist.

Eine Kontamination mit Proteinen läßt sich über das Verhältnis von $E_{260\text{nm}}$ zu $E_{280\text{nm}}$ abschätzen, wobei ein Wert von $>2,0$ zeigt, daß die Lösung nahezu frei von Proteinen ist.

Alternativ wurde die Konzentration von DNA und RNA in einem Drop-Photometer nach Angaben des Herstellers gemessen.

2.4 Realtime quantitative PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung von Pathogen-DNA in infiziertem Pflanzenmaterial

2.4.1 Primer für qRT-PCR

Die Primer für die Quantifizierung der *Gaeumannomyces*-DNA in infizierten Gerste-Wurzeln wurden abgeleitet aus der Sequenz des Avenacinase-like-Gens von *Gaeumannomyces graminis* (Rachdawong *et al*, 2002):

AV3	5'- TGC TCA TGG TGG TTC CTG CG -3'
Ggt_for1	5'- GGT CAG GAC AAG GAC TAC CC -3'

Die Primer für die Quantifizierung der *Rhynchosporium*-DNA in infizierten Gerste-Pflanzen wurden abgeleitet aus der Sequenz des 5.8S-RNA-Gens von *Rhynchosporium secalis* (Lee *et al*, 2001):

RS8mod2	5'- CCA GAG GAC CAC AAC TCT TGT T -3'
RS9mod2	5'- AAG GCG CAA TGT GCG TTC AAA -3'

Die Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer haben eine Länge von 20-25 Basen und eine Schmelztemperatur T_m von 58-62°C. Die entstehenden PCR-Produkte bestehen aus 100-150 Basen.

2.4.2 Isolation von genomischer DNA aus infiziertem Pflanzenmaterial

Genomische DNA aus infiziertem Pflanzenmaterial wurde isoliert wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die Konzentration der DNA wurde auf 25 ng/μl eingestellt. Die Qualität der DNA wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.3 Herstellung des Standards für die absolute Quantifizierung durch qRT-PCR

Genomische-DNA aus Pilzmycel wurde isoliert wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Die Konzentration der DNA wurde auf 5 ng/μl eingestellt. Die Qualität der DNA wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

Der Standard für die absolute Quantifizierung durch qRT-PCR wurde durch serielle 1:10 Verdünnung der genomischen Pilz-DNA hergestellt. Die Verdünnung erfolgte in TE mit 10 µg/µl Lamda-DNA. Jede Verdünnung wurde für 30'' durch Vortexen gemischt, 5' auf Eis inkubiert und erneut für 30'' durch Vortexen gemischt. Ausgehend von einer Konzentration von 5 ng/µl wurden die Verdünnungen 500 pg/µl, 50 pg/µl, 5 pg/µl und 0,5 pg/µl hergestellt. In der qRT-PCR wurden von jeder Verdünnung jeweils 4 µl eingesetzt, so daß der Standard aus 20 ng, 2 ng, 200 pg, 20 pg und 2 pg genomischer Pilz-DNA bestand.

2.4.4 PCR Amplifikation

Die PCR Amplifikation wurde in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 25 µl pro Ansatz durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 4 µl der Standard-DNA oder 4 µl der genomischen DNA aus infiziertem Pflanzenmaterial oder 4 µl TE mit 10 µg/µl Lamda-DNA (no template control, NTC) vorgelegt und mit 21 µl Mastermix gemischt. Der Mastermix hatte folgende Zusammensetzung:

Absolute™ QPCR SYBR® Green Low Rox Mix	12,5 µl
Forward Primer (10µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10µM)	1,0 µl
H ₂ O _{dest}	6,5 µl

Jede Mikrotiterplatte enthielt die Standardverdünnsreihe, eine Kontrolle ohne DNA (NTC, no template control) sowie die zu untersuchenden Proben in jeweils dreifacher Wiederholung. Alle Proben wurden auf Eis und möglichst lichtgeschützt pipettiert. Die Amplifikation erfolgte mit dem 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) nach folgendem Programm: 2' bei 50°C, 15' bei 95°C und 40x *cycling* für 15'' bei 95°C und für 1' bei 60°C. Um Primerdimere auszuschließen wurde für jedes Experiment eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt.

2.4.5 Auswertung

Für die Auswertung der qRT PCR wurde der für jede Probe charakteristische Ct-Wert (*Threshold cycle*) herangezogen. Dieser Schwellenwert beschreibt den PCR-Zyklus, an dem die gemessene Fluoreszenzintensität zum ersten mal deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Durch den Vergleich des Ct-Wertes einer Probe mit den Ct-Werten der Standardverdünnsreihe kann der Gehalt an Pilz-DNA in einer Probe

bestimmt werden. Die Analyse mit Hilfe der Standardkurve erfolgte automatisch am Ende des Laufes durch die Software des 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems).

2.5 DNA-Mikroarray

2.5.1 Markierung der Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.5.1.1 Aminoallyl-Markierung von cDNA

Die Markierung von cDNA mit Aminoallyl-dUTPs (aadUTP) erfolgte in Anlehnung an eine Standardmethode des *Institute for Genomic Research TIGR* (siehe: <http://www.tigr.org/tdb/microarray/protocolsTIGR.shtml>).

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial wurde wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben durchgeführt. In einem 0,5 ml Eppendorfgefäß wurden 30 µg der isolierten RNA in 11 µl H₂O_{bidest} gelöst, mit 4 µl Oligo dT Primer (0,5 µg/µl) gut vermischt und für 10' bei 70°C in einem Thermocycler inkubiert (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Minnesota, USA). Die Proben wurden nach der Inkubation für 30'' in einer Wasser/Eis Mischung abgekühlt und in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde jeder Probe folgende Komponenten für die cDNA Synthese zugegeben:

First Strand buffer 5x	6 µl
DTT 0,1 M	3 µl
Aminoallyl Labeling Mix10x	3 µl
Superscript II (200 U/µl)	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl

Die Proben wurden gemischt und über Nacht bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Die Hydrolyse der RNA erfolgte nach Zugabe von 10µl 1M NaOH und 10µl 0,5M EDTA durch Inkubation bei 65°C für 15' im Thermocycler. Zur Neutralisation wurden anschließend 10µl 1M HCl zugegeben.

2.5.1.2 Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA zur Entfernung nicht eingebauter aa-dUTPs und freier Amine erfolgte in modifizierter Form mit Hilfe des Qiaquick® PCR Purification–Kits (Quiagen).

Die Proben wurden mit 300 µl Puffer PB gemischt, auf Qiaquick Säulchen, die in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen platziert wurden, transferiert und 1' bei 17900xg zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Sammelgefäß geleert. Zum Waschen wurde 750 µl Phosphatwaschpuffer auf die Säulchen pipettiert und erneut für 1' bei 17900xg zentrifugiert. Nach Wiederholung des Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurden die Säulen bei 24000xg für 1' zentrifugiert und anschließend in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. In die Mitte der Säulchenmembran wurde 30 µl Phosphatelutionspuffer pipettiert. Die Säulchen wurden 1' bei Raumtemperatur inkubiert und durch 1' Zentrifugation bei 17900xg eluiert. Der Elutions- und Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, wodurch das Endvolumen ca. 60 µl betragen sollte. Die Proben wurden anschließend in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet.

2.5.1.3 Kopplung der Aminoallyl cDNA an die Cy-Fluoreszenzfarbstoffe

Die mit aadUTP markierten cDNA-Sonden wurden nun mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Cy3 gekoppelt. Cy5 zeigt bei einer Wellenlänge von 635 nm eine rote, Cy3 bei einer Wellenlänge von 532 nm eine grüne Fluoreszenz.

Für jede zu untersuchende Probe und die dazugehörige Kontrolle wurden je zweimal 30 µg Gesamt-RNA revers transkribiert und mit aadUTP markiert, so daß für jede Probe ein Dye-Swap durchgeführt werden konnte.

Die aadUTP-markierte und getrocknete cDNA wurde in 4,5 µl 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 9,0) resuspendiert. Anschließend wurden 4,5 µl der in 74 µl DMSO gelösten Farbstoffe zugegeben und gut mit den Proben vermischt. Um die Farbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen wurden die Proben zur Inkubation im Dunkeln aufbewahrt und nur möglichst kurz dem Licht ausgesetzt. Die Inkubation zur Kopplung der Cy-NHS- Ester an die freien Aminogruppen der cDNA erfolgte für 1h bei 20°C. Alle 10' wurden die Proben für 10'' geschüttelt.

2.5.1.4 Aufreinigung zur Entfernung ungebunden Farbstoffes

Die Aufreinigung der Proben zur Entfernung nicht gebundener Farbstoffe erfolgte in modifizierter Form mit Hilfe des Qiaquick® PCR Purification –Kits (Quiagen).

Die Proben wurden mit 35 µl 100 mM NaOAc (pH 5,2) und 250 µl Puffer PB vermischt und auf Quiaquick-Säulchen, die in 2 ml Reaktionsgefäßen platziert wurden, pipettiert. Die Säulchen wurden 1' bei 17900xg zentrifugiert und das Sammelgefäß geleert. Zum Waschen wurde 750 µl Puffer PE auf die Säulchen pipettiert und 1' bei 17900xg zentrifugiert. Nach Wiederholung des Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurden die Säulen bei 24000xg für 1' zentrifugiert und anschließend in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. In die Mitte der Säulchenmembran wurde 30 µl Puffer EB pipettiert. Die Säulchen wurden 1' bei Raumtemperatur inkubiert und durch 1' Zentrifugation bei 17900xg eluiert. Der Elutions- und Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, wodurch das Endvolumen an aufgereinigter und Cy-gelabelter cDNA etwa 60 µl betragen sollte. Die Sonden wurden bei -80°C im Dunkeln bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.5.2 Hauseigener Gerste cDNA-Microarray

Der hauseigene *Hordeum vulgare* cDNA Microarray wurde am Institut für biochemische Pflanzenpathologie (Neuherberg) entwickelt und trägt ca. 1400 Spots. Die Spots bestehen aus PCR-Fragmenten, die durch Amplifikation von Gerste EST-Klonen der Gerste EST-Bank des IPK Gatersleben hergestellt wurden. Die Gerste EST-Klone wurden aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Genen aus Literatur und verschiedenen Datenbanken ausgesucht. Das Hauptgewicht liegt bei Genen die eine Rolle in der Streßantwort von Pflanzen spielen.

Die PCR Produkte wurden aus 384-well Microarray Platten mit Hilfe des MicroGrid DNA Array Roboters (Biorobotics Microgrid II System, Biorobotics) und der zugehörigen Software (TAS Application Suite) auf Aldehyd beschichtete Objektträger gespottet. Die Amino-modifizierte DNA bindet dabei kovalent an die mit Aldehyd beschichtete Oberfläche. Die Reaktion wird stabilisiert durch die Abspaltung von Wasser unter Bildung einer Schiffschens Base. Um die Stabilisierungsreaktion zu ermöglichen wurden die gespotteten Objektträger vor der Verwendung für mindestens eine Woche in einer Objektträger Box bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.2.1 Blockierung freier Aldehyd Gruppen

Um ungebundenes Material zu entfernen und freie Aldehyd-Gruppen zu reduzieren und somit unspezifische Bindungen während der Hybridisierung zu minimieren wurden die

gespotteten Objektträger in einem Glasgefäß mit passendem Objektträgergestell und einem Rührfisch wie folgt gewaschen (Skena *et al.*, 1996):

- 1) 2 Minuten in 0,1% SDS
- 2) 2 Minuten in 0,1% SDS
- 3) zweimal Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 4) 2 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 5) 2 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 6) 5 Minuten in einer Natriumborhydrid-Lösung
(0,75 g NaBH_4 in 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 75 ml 100% Ethanol)
- 7) 2 Minuten in 95-100°C $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 8) 1 Minute in 0,1% SDS
- 9) 1 Minute in 0,1% SDS
- 10) zweimal Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 11) 2 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
- 12) Kurz Spülen in 100% Ethanol

Die blockierten Objektträger wurden einzeln in 50 ml Falcon Gefäßen für 2' bei 100xg zentrifugiert und anschließend bei RT im Dunkeln gelagert.

2.5.2.2 Prähybridisierung

Um unspezifische Bindungen der Sonden an die Objektträgeroberfläche zu verhindern und eine möglichst geringe Hintergrundreaktion zu erhalten wurden die Objektträger vor der eigentlichen Hybridisierung prähybridisiert. Auf jeden Objektträger wurden 70 μl der Prähybridisierungslösung aufgebracht, mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und in Hybridisierungskammern für 45' bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde in die Hybridisierungskammern zusätzlich 30 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ pipettiert. Anschließend wurden die Objektträger einzeln in 50ml Falcon Röhrchen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 15'' leicht von Hand geschüttelt und durch 2' Zentrifugation bei 100xg getrocknet. Die prähybridisierten Objektträger wurden innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet, da bei einer längeren Aufbewahrungszeit die Hybridisierungseffizienz deutlich nachläßt (Hegde *et al.*, 2000) .

2.5.2.3 Hybridisierung

Zunächst wurden die Cy-markierten cDNA Sonden der behandelten Proben mit den entsprechenden Kontrollproben vermischt und in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Sonden wurden in 200 µl Hybridisierungslösung resuspendiert, für 5' bei 95°C denaturiert und anschließend für 5' in einer Eis/Wasser Mischung abgekühlt. Bis zur Hybridisierung wurden die Sonden im Dunkeln bei 42°C im Wasserbad aufbewahrt. Auf die prähybridisierten Objektträger wurde ein Gene Frame aufgeklebt, die Sondenlösung innerhalb des Gene Frame aufgebracht und mit einem Coverslip verschlossen. Die Objektträger wurden in Hybridisierungskammern über Nacht bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gene Frames entfernt und die Objektträger in einem Glasgefäß mit passendem Objektträgergestell und einem Rührfisch jeweils für 2' in 3xSSC, 1xSSC, 0,5xSSC, 0,25xSSC und H₂O_{bidest} gewaschen, kurz in Isopropanol gespült und einzeln in 50 ml Falcon Gefäßen durch 2' Zentrifugation bei 100xg getrocknet. Die Objektträger wurden bis zum Einscannen im Dunkeln aufbewahrt.

2.5.2.4 Auswertung

Mikroarrays wurden mit dem AXON GenePix 4000A Microarray Scanner und der GenPix Pro 4.1/6.0 Software eingescannt. Für jede Behandlung und jeden Zeitpunkt wurden drei Microarrays mit je einem Dye-Swap hybridisiert, so daß insgesamt pro Zeitpunkt und Behandlung sechs Microarrays analysiert wurden. Das Hintergrund-Fluoreszenzsignal wurde aus dem Median des Fluoreszenzsignals des den Spot direkt umgebenden Pixel-Bereichs berechnet. Spots die weniger als 50% Unterschied zwischen Hintergrund und Signal zeigten wurden ausgeschlossen. Um Arrays aus verschiedenen Experimenten zuverlässig miteinander vergleichen zu können und um Fehler zu eliminieren, die sich aus unterschiedlichen Einbauraten und Fluoreszenzstärken der verwendeten Farbstoffe ergeben können wurden alle Arrays nach folgenden Kriterien normalisiert.

- 1) Mindestens 55% der Pixel beider Fluoreszenzsignale (635 und 532 nm) eines Spots müssen stärker als der Hintergrund plus Standardabweichung sein:
[$\% > B_{635} + 1SD$] >55 und [$\% > B_{532} + 1SD$] >55
- 2) Das Bestimmtheitsmaß des Regressionsverhältnisses [$R_{gn} R^2 (635/532)$] ist größer als 0,5

- 3) Nur Spots mit weniger als 3% gesättigter Pixel wurden in Betracht gezogen:
[F635 % Sat.]<3 und [F532 % Sat.]<3
- 4) Nicht detektierte oder schwache Signale wurden ausgeschlossen:
[Flags]<>[Bad], [Flags]<>[Absent], [Flags]<>[Not Found], LCase([ID])<> "empty"
- 5) Die Summe der Mediane ist größer als 500:
Sum of Medians > 500

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Acuity 4.0 Software durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden im Logarithmus zur Basis 2 ($\lg_2(\sim)$) des Verhältnisses beider Fluoreszenzsignale angegeben. Es wurden nur Expressionsdaten zur Auswertung herangezogen die Signalintensitäten zeigten, die größer als der 3-fache lokale Hintergrund waren ($\text{SNR}_{532} \geq 3$ oder $\text{SNR}_{635} \geq 3$) und deren CV-Wert ≤ 100 betrug. Exprimierte Gene wurden ab einem $\lg_2(\sim)$ Verhältnis von 0,7 als signifikant aktiviert bzw. von -0,7 als signifikant reprimiert bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix auf Gerste

3.1.1 Der Effekt von Proradix auf das Wachstum von Gerste in Sterilkultur

Viele Bakteriengattungen, darunter auch *Pseudomonas*, sind in der Lage, die Wurzeln von Pflanzen zu besiedeln und das Wachstum der Pflanzen zu beeinflussen.

Um den Einfluß von *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix auf das Wachstum von Gerstenkeimlingen zu untersuchen, wurden fünf Tage alte, sterile Keimlinge mit Proradixkulturen inokuliert und in Vitro Vent Boxen angezogen. Das Frischgewicht der Wurzeln und der Sprosse wurde einen Tag, drei Tage sowie sechs Tage nach Inokulation bestimmt.

In Vorversuchen wurden die Keimlinge in einer Proradixkultur mit einer OD_{435} von 0,8 für drei Stunden inokuliert. Derartig behandelte Pflanzen zeigten schon einen Tag nach Behandlung ein deutlich reduziertes Wachstum (Abb. 5). Drei Tage nach Behandlung waren starke Schäden an den Blättern der Keimlinge zu erkennen, die sich auch bis zum Ende des Versuchs nicht mehr zurückbildeten.

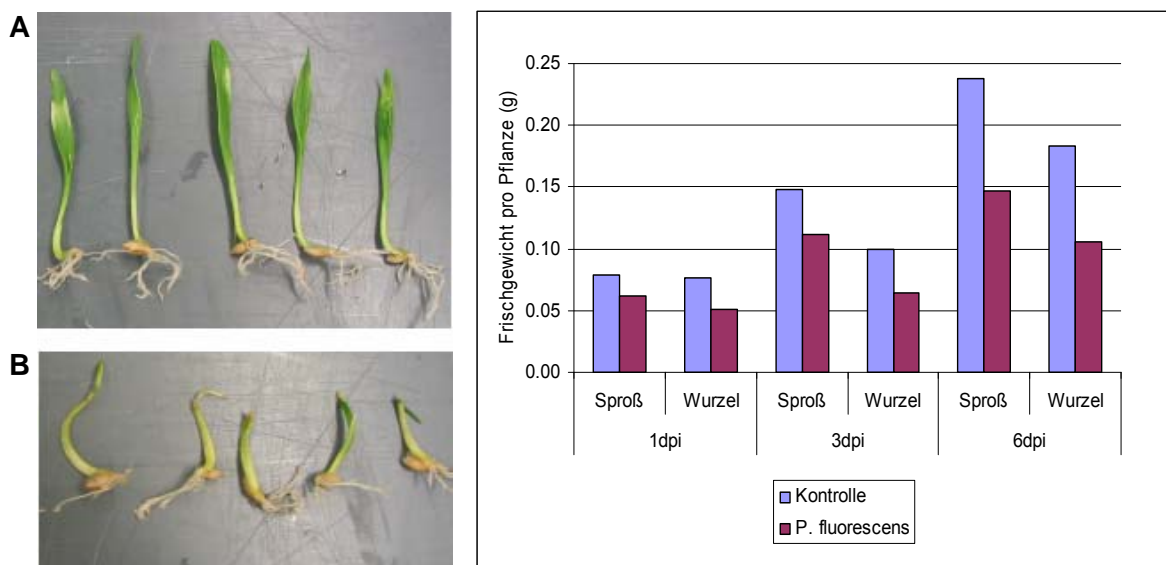


Abb. 5: Inokulation von sterilen Gerstenkeimlingen mit Proradix: sterile Gerstenkeimlinge wurden für 3h in einer Proradixkultur mit $OD_{435} = 0,8$ inokuliert und anschließend in sterilen Vitro Vent Boxen angezogen. Proben wurden einen Tag (1dpi), drei Tage (3dpi) und sechs Tage (6dpi) nach Inokulation genommen. Gezeigt sind Mittelwerte aus jeweils 45 Pflanzen. **A)** Kontrollpflanzen und **B)** mit Proradix inokulierte Pflanzen drei Tage nach Inokulation.

Eine Analyse des Vorversuches mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray zeigte eine Induktion von typischen Abwehrgenen, wie z.B. PR-Genen (PR1, PR4), Lipoxygenasen (LOX1, LOX2), Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und Peroxidasen sowie eine Reprimierung von Genen, die an photosynthetischen Prozessen beteiligt sind (Tab. 2).

Tab. 2: Analyse der Genexpression in Blättern von sterilen Gerste-Keimlingen: Die Analyse wurde mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray durchgeführt. Jede Probe des Vorversuchs bestand aus Blättern von 45 Pflanzen. Es wurde für jede Probe ein Dye-Swap durchgeführt. Gleich annotierte und vergleichbar regulierte ESTs wurden zusammengefaßt, gezeigt ist jeweils ein repräsentativer EST. Signifikant regulierte Gene sind farbig markiert. Gelb markierte Felder enthalten Gene mit 0.7 bis <1-facher Aktivierung, orange Felder beinhalten Gene mit 1 bis < 1.5-facher Aktivierung, rote Felder zeigen Gene mit ≥ 1.5 -facher Aktivierung. Abgestufte grüne Farben stehen für reprimierte Gene. Alle Ergebnisse wurden im Logarithmus zur Basis 2 ($\lg_2(\sim)$) des Verhältnisses beider Fluoreszenzsignale angegeben. Eine Tabelle mit der vollständigen Liste der induzierten ESTs und den dazugehörigen CV-Werten ist im Anhang aufgeführt.

EST id	Homolog	1d	3d	6d
HV08L06	PR1	-0.25	0.72	1.22
HO38C23	PR4	1.15	1.46	2.39
HX14M06	defensin	0.69	0.88	1.39
HH04L19	proteinase inhibitor (bci-7)	0.90	0.65	1.22
HV03J23	LOX 1	-0.03	0.80	1.72
HY04L18	LOX 2	0.24	0.98	0.94
HC08K11	AOC	0.12	0.60	0.95
HH04F21	catalase 1	1.40	1.01	1.85
HX06A19	superoxide dismutase-4AP	0.41	0.66	0.95
HY01C15	glutathione transferase	0.32	0.85	1.26
HT10H12	alternative oxidase	0.20	0.18	0.72
HW04D19	cytochrome P450	0.50	0.86	1.03
HW07F11	PAL	0.51	0.73	1.35
HC15P18	peroxidase	0.64	1.46	1.44
HH05O04	RUBISCO subunit binding-protein beta-subunit	-0.80	-0.59	-0.82
HP05E15	putative chloroplast inner envelope protein	-1.73	-0.44	-0.87
HA04J10	23kDa oxygen evolving protein of photosystem II	-0.76	-1.12	-1.05
HA06C03	putative photosystem II subunit (22KDa) precursor	-0.62	-0.89	-1.05
HP02H02	type III LHCII CAB precursor protein	-0.90	-1.19	-1.27
HZ46K11	photosystem II subunit PsbS precursor	-0.81	-1.17	-1.43

Das reduzierte Wachstum der Keimlinge sowie die Schäden an Blättern und Sproß konnten vermieden werden, wenn die Keimlinge zur Inokulation mit Proradix nur noch kurz mit den Wurzeln in die Proradixlösung getaucht wurden. Allerdings führte so weder die Inokulation mit einer unverdünnten Proradixkultur (OD_{435} ca. 7,5), noch die Inokulation mit einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung nach sechs Tagen zu einem reproduzierbar erhöhten Frischgewicht der Wurzeln oder des Sprosses (Abb. 6).

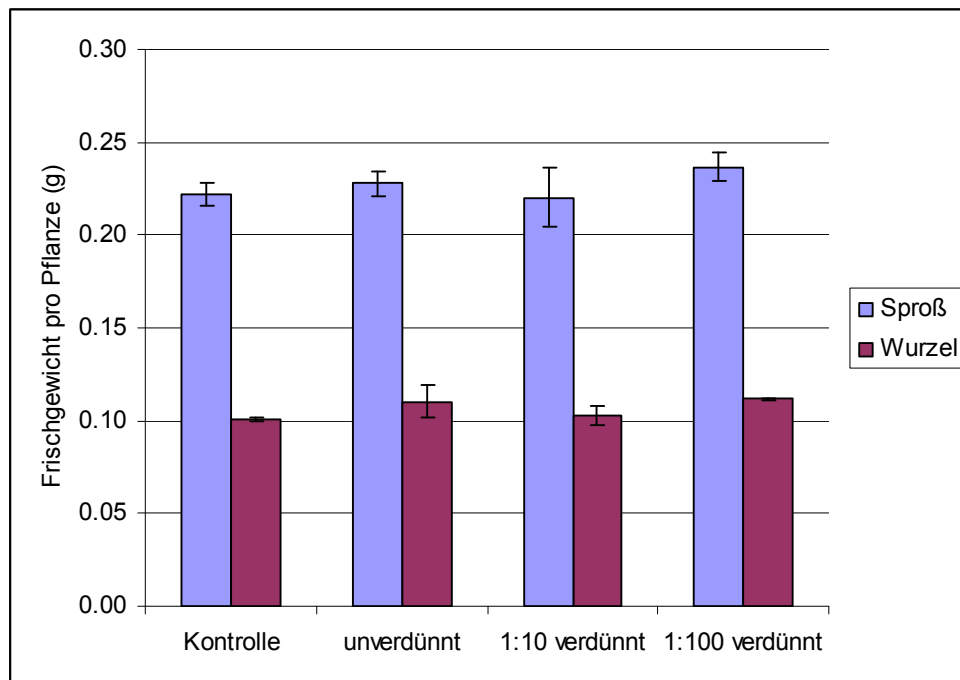


Abb. 6: Inokulation von sterilen Gerstenkeimlingen mit Proradix: sterile Gerstenkeimlinge wurden mit den Wurzeln in eine unverdünnte Proradixkultur (OD_{435} ca. 7,5) sowie eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung dieser Kultur getaucht und anschließend für sechs Tage in sterilen Vitro Vent Boxen angezogen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen zu je 9 Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Um die Besiedlung der Gerstewurzeln durch Proradix zu zeigen, wurde die Inokulation von sterilen Keimlingen auch mit einem Proradixstamm durchgeführt, der das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) produziert. Die mikroskopische Detektion der GFP-markierten Bakterien erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Es konnte eine deutliche Besiedlung der Wurzel und vor allem der Wurzelhaare beobachtet werden (Abb. 7).

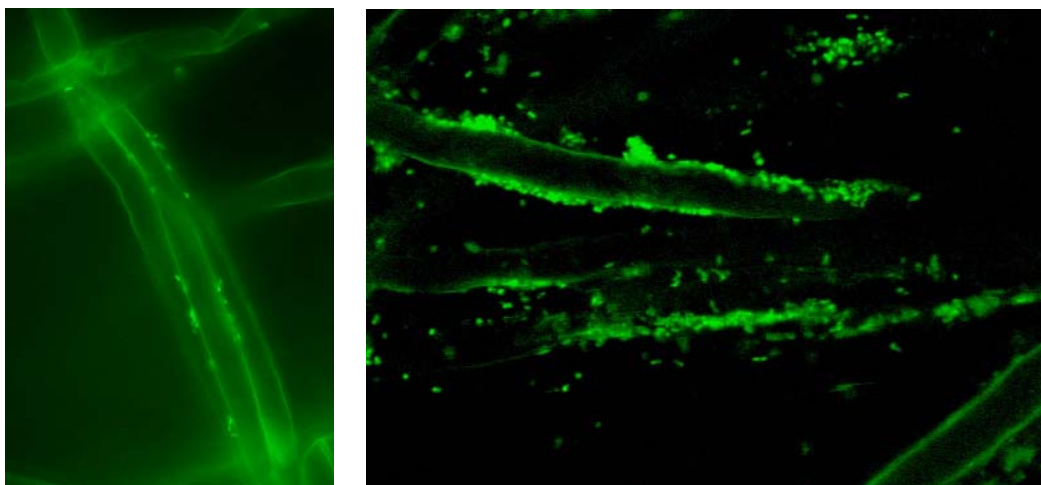


Abb. 7: Besiedlung der Gerstewurzel mit Proradix: Die Detektion der GFP-markierten Bakterien erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop drei Tage nach Inokulation der Keimlinge mit den Bakterien. Es konnte vor allem eine Besiedlung der Wurzelhaare beobachtet werden.

3.1.2 Infektionsexperimente mit *Rhynchosporium secalis*

Die Besiedlung der Pflanzenwurzel durch Rhizosphärebakterien führt oft zur Induktion von systemischer Resistenz (ISR) gegenüber Pathogenen. Um den Einfluß von Proradix auf die Pathogenabwehr der Gerste zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente mit *Rhynchosporium secalis* durchgeführt.

Zwei Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Proradixsuspension gegossen, so daß die Bakterienkonzentration im Boden ca. 5×10^7 CFU/g betrug. Vier Tage nach Inokulation wurden die Gersten in der Arbeitsgruppe von Günther Schweizer (Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising) mit *Rhynchosporium secalis* infiziert. Die Proben wurden sieben und vierzehn Tage nach Infektion genommen. Die Quantifizierung der Infektion erfolgte durch quantitative Realtime PCR.

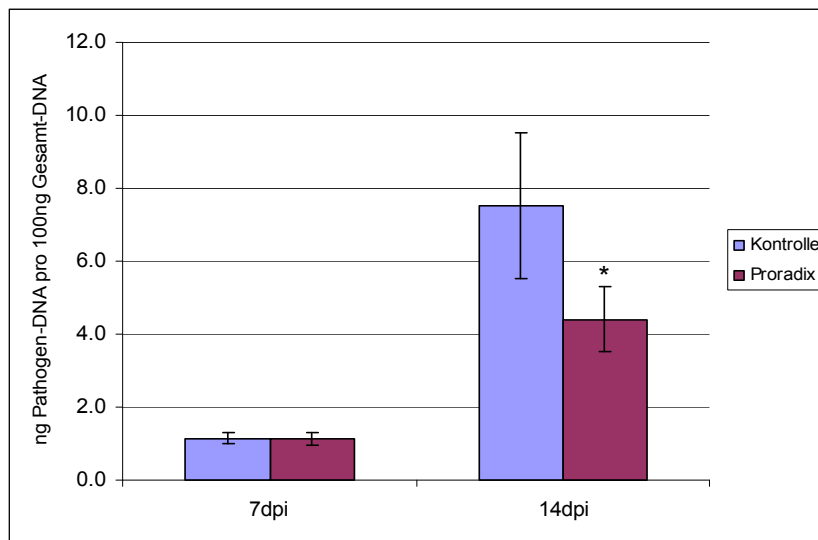


Abb. 8: Infektion von Gerste mit *Rhynchosporium secalis*: zwei Wochen alte Gersten wurden mit Proradix inokuliert und mit *Rhynchosporium secalis* infiziert. Die Proben wurden sieben Tage (7dpi) und vierzehn Tage (14dpi) nach Infektion genommen und durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen zu je vier Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach T-Test mit $p < 0,05$)

Sieben Tage nach Infektion waren noch keine sichtbaren Symptome erkennbar. *R. secalis* konnte zwar durch qRT-PCR nachgewiesen werden, es zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den mit Proradix inokulierten Pflanzen. Vierzehn Tage nach Infektion zeigten die Pflanzen deutlich sichtbare Symptome. Die Quantifizierung durch qRT-PCR zeigte eine deutliche Reduzierung des Pathogenbefalls in Pflanzen, die vor Infektion mit Proradix inokuliert wurden (Abb. 8).

3.1.3 Infektionsexperimente mit *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Viele Rhizosphärebakterien sind in der Lage das Wachstum von Wurzelpathogenen durch Produktion von Hemmstoffen wie Antibiotika und Siderophoren oder durch Wettbewerb um Nährstoffe zu hemmen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß Proradix in einer Dualkultur auf Malzagarplatten das Wachstum des Wurzelpathogens *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* hemmen kann (Abb. 9).

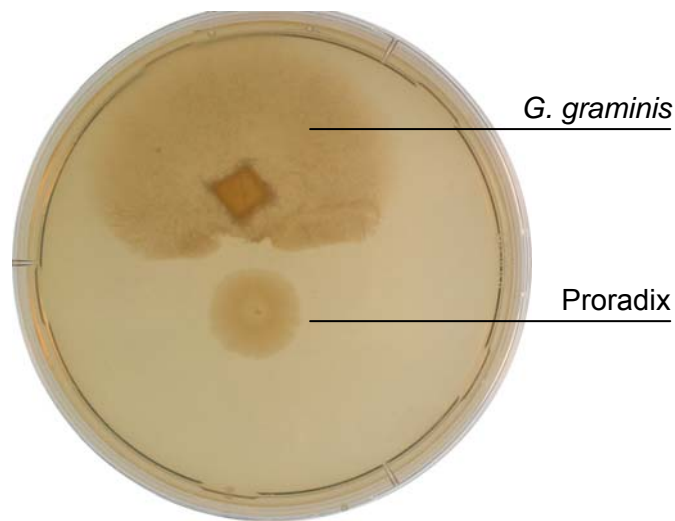


Abb. 9: Dualkultur mit Proradix und *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. 50µl einer Proradix ÜN-Kultur wurden in die Mitte einer Malzagarplatte pipettiert. Ein mit Pilzmycel bewachsener Agarblock wurde mit der Mycelseite nach unten ebenfalls auf die Platte gesetzt. Das Wachstum von *G. graminis* wurde anschließend über zwei Wochen beobachtet. Es war eine deutliche Hemmung des Pilzwachstums im Bereich um die Bakterienkolonie zu erkennen.

Aufgrund der Hemmwirkung von Proradix auf *G. graminis* in der Dualkultur auf Malzagarplatten wurden Infektionsexperimente mit Gerste und *G. graminis* durchgeführt. Hierfür wurden sterile Gerstenkeimlinge über Nacht mit Proradix inokuliert und anschließend in Sandkultur mit *G. graminis* infiziert. Schon acht Tage nach Infektion konnte eine deutliche Schwarzfärbung der Wurzelhäuse und der Wurzeln von infizierten Pflanzen beobachtet werden. Die Quantifizierung des Pathogenbefalls wurde acht und 15 Tage nach Infektion mit qRT-PCR durchgeführt und ergab bei beiden Zeitpunkten eine starke Reduzierung des Pathogenbefalls in Pflanzen die zuvor mit Proradix inokuliert wurden (Abb. 10).

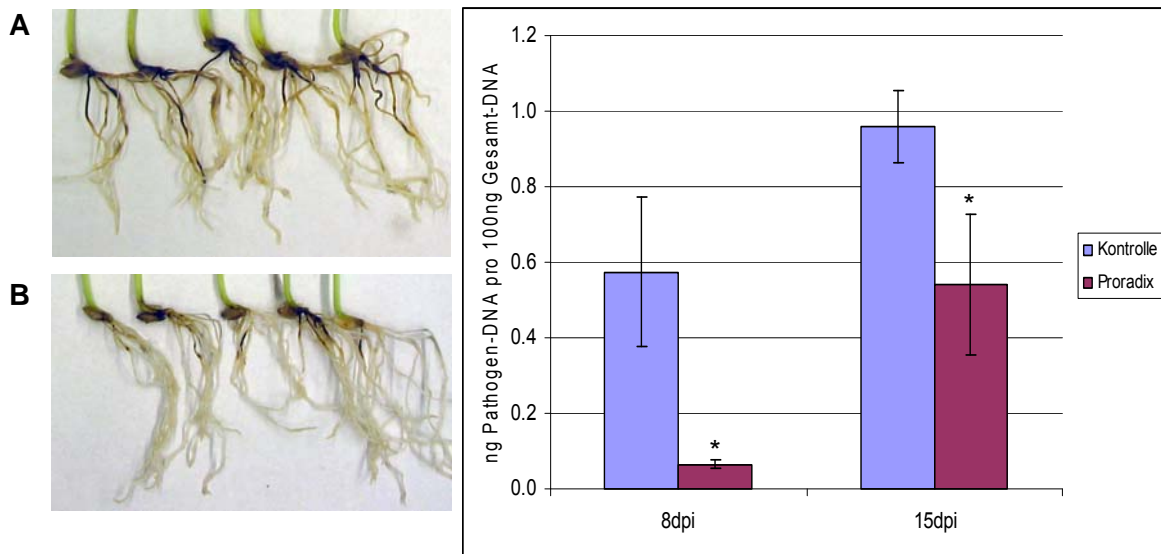


Abb. 10: Infektion von Gerste mit *Gauemannomyces graminis* var. *tritici*: zwei Wochen alte Gersten wurden mit Proradix inokuliert und mit *G. graminis* infiziert. Die Proben wurden acht und 15 Tage nach Infektion genommen und durch qRT-PCR analysiert. **(A)** Kontrollpflanzen und **(B)** mit Proradix behandelte Pflanzen 15 Tage nach Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen zu je fünf Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach T-Test mit $p < 0,05$)

3.1.4 Expressionsanalysen

Inokulation von Gersten mit Proradix führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *R. secalis* (Abb. 8). In steriler Gerstekultur führte der Kontakt der Blätter mit einer konzentrierten Proradixsuspension zur Induktion von Abwehrgenen und zu irreversiblen Schäden an den Pflanzen (Abb. 5 und Tab. 2). Um die Genexpression in Gerste nach Proradixinokulation unter möglichst natürlichen Bedingungen zu analysieren, wurde das Experiment daher nicht in steriler Sandkultur sondern in unsteriler Einheitserde durchgeführt. Zwei Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Proradixsuspension gegossen, so daß die Bakterienkonzentration im Boden ca. 5×10^7 CFUs/g betrug. Vier Stunden, einen Tag und vier Tage nach Inokulation wurden Proben genommen. Jede Probe bestand aus drei unabhängigen Wiederholungen zu je fünf Pflanzen. Die Analyse durch den hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarray konnte aber zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Induktion oder Repression von Genen in den behandelten Gersten nachweisen.

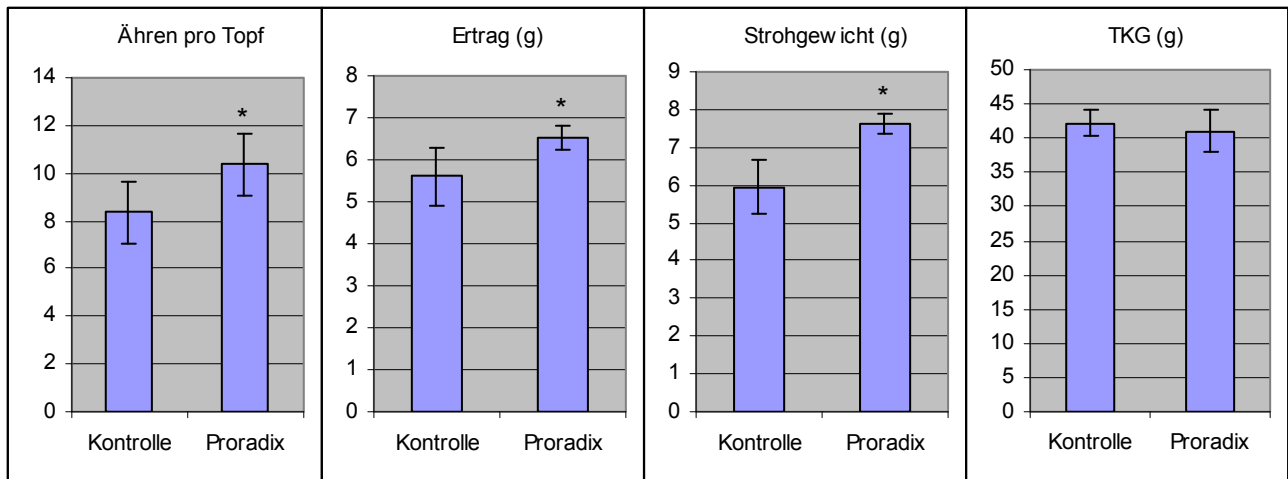
3.1.5 Gewächshausversuche

Viele Rhizosphärebakterien sind in der Lage, das Wachstum der Pflanzen über die Produktion von Hormonen oder die Verbesserung der Nährstoffaufnahme zu beeinflussen. Um den Effekt von Proradix auf ertragsrelevante Parameter bei Gerste zu untersuchen, wurden im Gewächshaus der GSF in Neuherberg entsprechende Versuche durchgeführt. Die Pflanzen wurden in nährstoffarmem Boden, Boden mit mittlerem Nährstoffgehalt und in nährstoffreichem Boden angezogen. Das verwendete Saatgut wurde durch den Hersteller Sourcon Padena vor dem Versuch mit Proradix gebeizt. Nach der Abreifung wurden die Pflanzen gedroschen und das Strohgewicht, die Anzahl Ähren, der Ertrag und das Tausenkorngewicht (TKG) bestimmt.

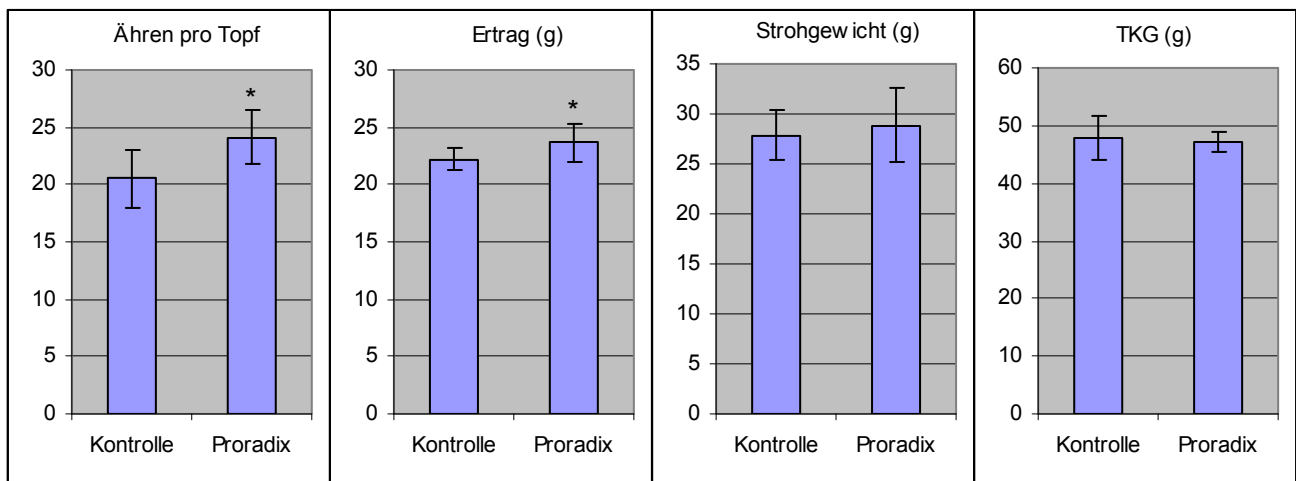
Im Vergleich zu Pflanzen in nährstoffreichem Boden führte die Reduzierung des Nährstoffgehalts zu einer durchschnittlichen Abnahme von Strohgewicht, Anzahl Ähren und Ertrag um ca. 50% im Boden mit mittlerem Nährstoffgehalt und um ca. 80% im nährstoffarmen Boden.

Eine Inokulation des Gerstensaatguts mit Proradix führte im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen zu unterschiedlichen Ergebnissen, abhängig vom verwendeten Boden. In nährstoffarmem Boden konnte eine erhöhte Anzahl an Ähren, ein erhöhter Ertrag und ein erhöhtes Strohgewicht beobachtet werden. Beim TKG war kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen. In Boden mit mittlerem Nährstoffgehalt war die Anzahl Ähren und der Ertrag leicht erhöht. Strohgewicht und TKG zeigten keine Zunahme. Wurden die Gersten in Boden mit hohem Nährstoffgehalt angezogen, konnte bei keinem der ertragsrelevanten Parameter eine Zunahme im Vergleich mit der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 11).

A)



B)



C)

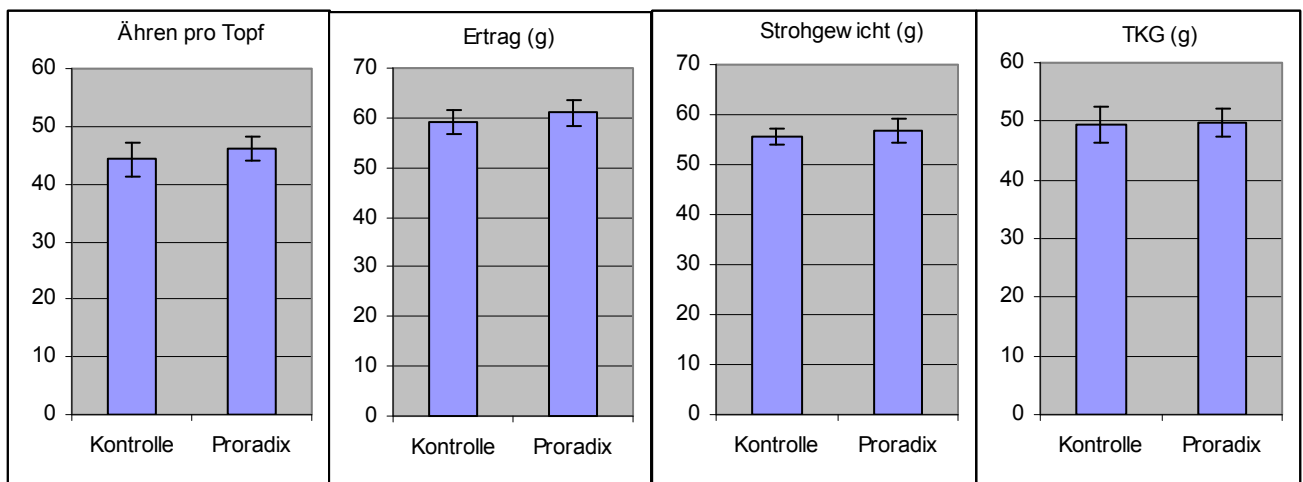


Abb. 11: Bestimmung ertragsrelevanter Parameter nach Inokulation von Gerste mit Proradix: Gersten wurden in nährstoffarmem Boden (A), in Boden mit mittlerem Nährstoffgehalt (B) und in nährstoffreichem Boden (C) angezogen. Das Saatgut war durch den Hersteller Sourcon Padena mit Proradix gebeizt, Kontrollpflanzen waren unbehandelt. Gezeigt sind Mittelwerte aus acht Töpfen zu je fünf Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach T-Test mit $p < 0,05$).

3.2 Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf Gerste

3.2.1 Infektionsversuche mit *Rhynchosporium secalis*

Pflanzenaktivatoren sollen die Abwehrsysteme der Pflanzen zu induzieren und so zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen führen. Um den Effekt der Aktivatoren BioS, Neudovital und Messenger auf die Resistenz von Gerste zu untersuchen wurden Infektionsexperimente mit *R. secalis* durchgeführt.

Zwei Wochen alte Pflanzen wurden nach Angaben der Hersteller mit den Pflanzenaktivatoren behandelt. Vier Tage nach der Behandlung wurden die Gersten in der Arbeitsgruppe von Günther Schweizer (Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising) mit *R. secalis* infiziert. Die Proben wurden sieben und vierzehn Tage nach Infektion genommen. Die Quantifizierung der Infektion erfolgte durch quantitative Realtime PCR.

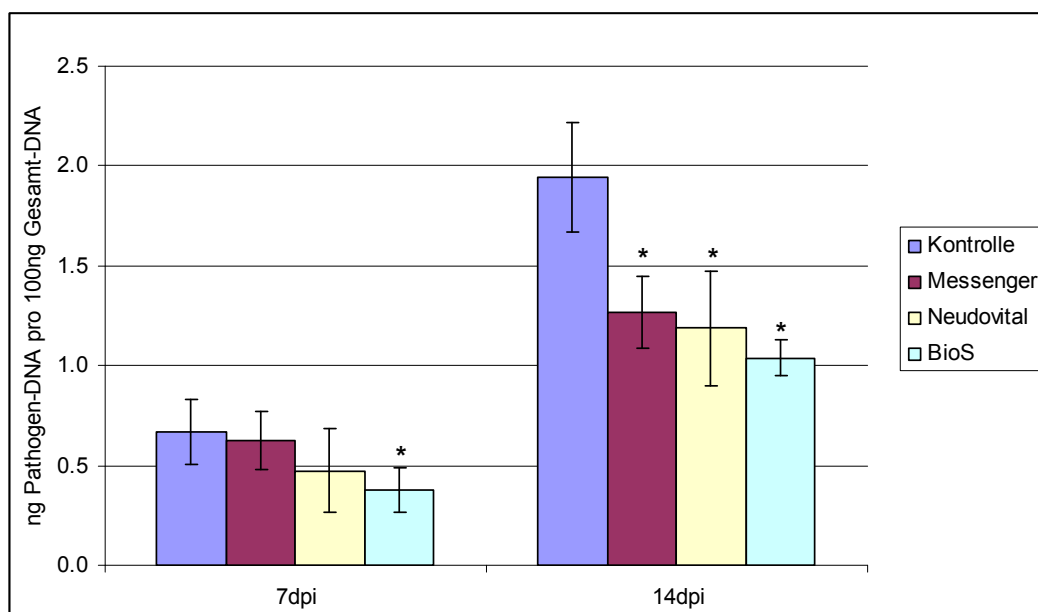


Abb. 12: Infektion von Gerste mit *Rhynchosporium secalis*: zwei Wochen alte Gersten wurden mit Pflanzenaktivatoren behandelt und mit *R. secalis* infiziert. Die Proben wurden sieben Tage (7dpi) und vierzehn Tage (14dpi) nach Infektion genommen und durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen zu je vier Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle nach T-Test mit $p < 0,05$)

Sieben Tage nach Infektion waren noch keine sichtbaren Symptome erkennbar. *R. secalis* konnte zwar durch qRT-PCR nachgewiesen werden, es zeigten sich aber keine

Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den behandelten Pflanzen. Vierzehn Tage nach Infektion zeigten die Pflanzen deutlich sichtbare Symptome. Die Quantifizierung durch qRT-PCR ergab eine deutliche Reduzierung des Pathogenbefalls in Pflanzen, die vor Infektion mit den Pflanzenaktivatoren BioS, Neudovital und Messenger behandelt wurden (Abb. 12).

3.2.2 Expressionsanalysen

Um den Effekt der Aktivatoren auf die Genexpression von Gerste zu untersuchen, wurden behandelte Pflanzen mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarray analysiert. Zwei Wochen alte Pflanzen wurden hierfür nach Angaben der Hersteller mit den Pflanzenaktivatoren behandelt. Vier Stunden, einen Tag und vier Tage nach Behandlung wurden Proben genommen.

Die Anzahl an signifikant regulierten Genen variierte stark, abhängig vom verwendeten Aktivator und dem Zeitverlauf. Alle Aktivatoren zeigten die stärkste Induktion vier Stunden nach Behandlung. Die Anzahl an induzierten Genen nahm aber schon einen Tag nach Behandlung deutlich ab, und vier Tage nach Behandlung war nur noch eine geringe Anzahl an Genen induziert. Neudovital erwies sich als der stärkste Aktivator. Vier Stunden nach Behandlung waren durch Neudovital ca. 70 verschiedene Gene induziert, während BioS nur ca. 15 und Messenger nur ca. 10 Gene induzierten. Eine Repression von Genen konnte bei keiner der Behandlungen beobachtet werden (Abb. 13).

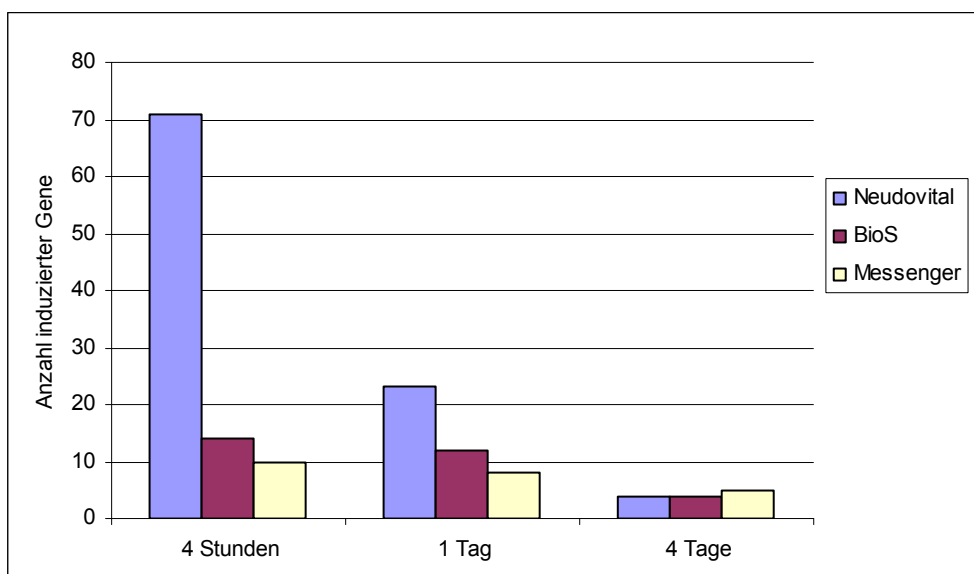


Abb. 13: Anzahl induzierter Gene nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren: Pflanzen wurden nach Angaben der Hersteller mit Messenger, BioS oder Neudovital behandelt und nach vier Stunden, einem Tag und vier Tagen mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarray analysiert. Gleich annotierte und vergleichbar regulierte ESTs wurden zusammengefaßt und einfach gezählt.

Unterschiede zwischen den Behandlungen waren in Gerste vor allem in der Anzahl an regulierten Genen der Pathogenabwehr zu beobachten, weniger in der Aktivierung unterschiedlicher Gen-Gruppen oder Signalwege (Tab. 3). So induzierten z.B. alle drei Behandlungen Gene der Jasmonsäuresynthese (LOX, AOS, AOC und OPR), wobei aber nur Neudovital den kompletten Octadecanoidweg induzierte. Die Aktivierung des JA-Synthesewegs durch die Aktivatoren war schon vier Stunden nach Behandlung zu beobachten, klang aber einen Tag nach Behandlung fast vollständig ab. Nur die Induktion von LOX durch Messenger nahm über den beobachteten Zeitraum zu und erreichte den maximalen Wert nach vier Tagen.

Deutliche Unterschiede zeigten sich auch in der Induktion von bci-Genen (barley chemical induced) und PR-Genen (pathogenesis related genes). In beiden Fällen induzierte Neudovital die größte Anzahl an Genen (bci-1, bci-2, bci7, bci-8, PR1b, PR2, PR3, PR4). In BioS-behandelten Pflanzen war nur eine Induktion von bci-2 und PR-2 zu beobachten, während Messenger bci-3, bci-9 und PR2 leicht induzierte.

Gene die für Komponenten der Signaltransduktion kodieren, wurden nur durch Neudovital deutlich induziert. Vier Stunden nach Behandlung waren erhöhte Transkriptmengen eines WRKY-Transkriptionsfaktors und zweier Rezeptorkinasen (LecRK und LRR familiy protein) erkennbar.

Alle Behandlungen aktivierten die Transkription von Genen, deren Genprodukte vermutlich direkte antimikrobielle Eigenschaften besitzen. So sind in Neudovital-behandelten Pflanzen Thionin (bci2), Thionin-precursor, Defensin und ein „antifungal-protein-S“ noch bis zu vier Tagen nach Behandlung induziert. Thionin und Thionin-precursor wurden ebenfalls durch BioS induziert. Messenger führte dagegen zu allen Zeitpunkten zu einer erhöhten Expression einer Cystein Protease. Gene für einen Proteaseinhibitor und eine β -1,3-Glucanase (PR2) wurden dagegen in allen drei Behandlungen vermehrt transkribiert.

Spezifisch in Neudovital-behandelten Pflanzen konnte eine Induktion von Schlüsselgenen des Shikimatweges (z.B. *Chorismat-synthase*, *Prephenatdehydratase*, *Tryptophan-synthase*) und der Ligninbildung (z.B. PAL, *Caffeoyl-CoA-3-O-Methyltransferase*, *Cinnamylalkoholdehydrogenase*, *Peroxidase*) beobachtet werden. Gene dieser Stoffwechselwege waren allerdings nur kurzfristig induziert und erreichten nach einem Tag wieder das Niveau der Kontrolle.

Tab. 3: Analyse der Genexpression in Blättern von aktivatorbehandelter Gerste: Pflanzen wurden nach Angaben der Hersteller mit Messenger, BioS und Neudovital behandelt. Die Analyse wurde mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray durchgeführt. Jeder Wert besteht aus drei biologischen Wiederholungen zu je fünf Pflanzen. Gleich annotierte und vergleichbar regulierte ESTs wurden zusammengefaßt, gezeigt ist jeweils ein repräsentativer EST. Signifikant regulierte Gene sind farblich markiert. Gelb markierte Felder enthalten Gene mit 0.7 bis <1-facher Aktivierung, orange Felder beinhalten Gene mit 1 bis < 1.5-facher Aktivierung, rote Felder zeigen Gene mit ≥ 1.5 -facher Aktivierung. Abgestufte grüne Farben stehen für reprimierte Gene. Alle Ergebnisse wurden im Logarithmus zur Basis 2 ($\lg_2(\sim)$) des Verhältnisses beider Fluoreszenzsignale angegeben. Eine Tabelle mit der vollständigen Liste der induzierten ESTs und den dazugehörigen CV-Werten ist im Anhang aufgeführt.

EST id	Homolog	Org.	Gruppe	Messenger			BioS			Neudovital		
				4h	1d	4d	4h	1d	4d	4h	1d	4d
HC09G24	AOS	H.v	JA	0.86	0.56	0.50	0.55	0.80	-0.16	1.39	0.78	0.26
HC08K11	AOC	H.v	JA	0.75	0.03	0.06	0.48	0.14	-0.17	1.55	0.01	0.03
HU03G16	LOX	/	JA	-0.08	0.00	-1.59	0.31	0.11	0.99	2.72	0.10	0.27
HV02B09	LOX	H.v	JA	0.42	0.89	1.55	-0.04	0.33	-0.50	0.47	0.57	0.22
HW04I04	OPR1	A.th.	JA	0.45	-0.09	0.09	0.10	-0.08	0.01	0.80	-0.01	0.05
HZ38L17	OPR3	O.s.	JA	0.32	0.07	0.35	0.34	0.01	0.14	1.47	-0.18	0.14
HY07F20	lipoxigenase 2 (bci-1)	H.v	bci	0.26	0.01	-0.17	0.50	0.13	-0.11	1.42	0.28	-0.02
HC14K12	thionin (bci-2)	H.v	bci	0.18	0.68	0.22	0.06	1.64	0.83	0.60	1.25	0.99
HC07O04	acid phosphatase (bci-3)	H.v	bci	0.75	0.78	0.66	-0.36	0.33	-0.10	-0.09	0.32	0.31
HH04L19	proteinase inhibitor (bci-7)	H.v	bci	0.35	0.50	0.11	0.87	0.43	-0.03	1.23	0.59	0.01
HC15E11	fatty acid desaturase (bci-8)	H.v	bci	0.70	-0.06	0.14	0.72	0.18	-0.13	0.83	-0.17	-0.02
HR01A06	apyrase (bci-9)	H.v	bci	0.69	0.49	1.04	-0.41	0.14	-0.35	-0.10	0.56	0.22
HT01K05	thaumatin-like protein (PR1b)	H.v	PR	0.22	0.05	0.02	0.01	0.25	0.01	0.71	0.57	-0.09
HO19D08	beta-1,3-glucanase (PR2)	H.v	PR	0.81	0.23	0.16	0.72	0.67	0.23	0.69	0.85	0.09
HO16H11	chitinase (PR3)	H.v	PR	0.27	0.15	-0.11	-0.22	0.35	0.01	1.10	1.11	-0.12
HO38C23	chitinase (PR4)	H.v	PR	0.35	0.10	0.00	-0.25	0.44	0.06	1.00	0.95	0.05
HX12M10	WRKY transcription factor	H.v	Def	0.28	-0.27	0.30	0.61	0.23	-0.33	1.45	0.29	0.46
HY05N04	WRKY transcription factor	H.v	Def	-0.03	-0.38	0.12	0.80	0.34	0.23	0.91	0.31	0.97
HI08K09	BTH induced AP2/ERF transcription factor	O.s.	Def	-0.15	-0.24	0.11	0.71	0.14	-0.04	0.47	0.26	0.26
HI12A05	lectin-like receptor kinase (LecRK)	O.s.	Def	-1.60	-0.73	-0.09	0.54	0.22	0.06	1.01	0.21	-0.02
HO10C02	LRR family / protein kinase family protein	A.th.	Def	-0.27	0.25	-0.19	1.01	0.17	0.35	0.76	0.25	0.04
HC09A11	thionin precursor	H.v	Def	0.24	0.61	0.33	0.04	1.59	0.81	0.54	0.98	0.96
HX14M06	defensin	T.a	Def	-0.09	0.01	-0.17	0.12	-0.08	0.16	0.92	-0.28	-0.08
HT04J16	antifungal protein S	H.v	Def	0.33	0.11	-0.12	-0.57	0.36	0.12	0.89	0.46	0.11
HO06E22	cystein proteinase	H.v	Def	1.18	2.95	1.43	0.12	0.06	/	-1.63	0.02	-0.02
HF01D02	protease inhibitor	/	Def	0.97	1.32	0.48	1.18	0.87	-0.41	1.66	0.89	-0.02
HZ39A14	chorismate synthase	O.s.	SK	0.26	0.19	-0.03	0.08	-0.21	0.00	1.07	-0.17	-0.05
HZ59C11	prephenate dehydratase	A.th.	SK	-0.02	-0.13	0.10	0.15	0.14	0.09	1.24	0.04	-0.04
HV02J21	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	O.s.	SK	-0.11	0.02	-0.08	0.12	0.06	0.07	1.19	0.11	-0.10
HD03L05	tryptophan-synthase	/	SK	0.13	-0.05	0.00	0.28	-0.16	-0.04	0.82	-0.13	-0.07
HY08M03	putative indole-3-glycerol phosphate synthase	O.s.	SK	0.84	0.12	-0.10	-0.17	-0.13	0.07	0.99	-0.01	0.09
HM02L09	PAL	H.v	Lig	0.20	-0.11	0.11	0.56	0.19	0.07	1.54	0.12	0.05
HC15J04	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	H.v	Lig	0.06	-0.14	-0.20	0.50	0.06	0.00	1.26	0.29	-0.09
HA12E09	cinnamyl-alcohol-dehydrogenase	O.s.	Lig	0.81	0.52	0.38	-0.14	0.00	0.01	0.94	-0.19	-0.02
HA09B21	caffeic acid 3-O-methyltransferase	/	Lig	0.03	-0.04	-0.04	0.19	0.68	0.32	0.75	0.69	-0.08
HO29C01	peroxidase	O.s.	Lig	0.12	0.20	0.35	1.28	1.48	0.83	1.90	1.61	0.11

H.v. = *Hordeum vulgare*, O.s. = *Oryza sativa*, A. th. = *Arabidopsis thaliana*, T.a. = *Triticum aestivum*

JA = Jasmonsäureweg, bci = barley chemical induced, PR = pathogenesis related, Def = Pathogenabwehr, SK = Shikimatweg, Lig = Ligninbildung

3.2.3 Gewächshausversuche und Open-Top-Versuche

Um zu untersuchen, ob Pflanzeaktivatoren auch einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen haben, wurden Topfversuche unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus und unter Freilandbedingungen in den Open-Top-Anlagen durchgeführt. Die Anwendung der Pflanzenaktivatoren Neudovital, Messenger und BioS erfolgte nach Angaben der Hersteller zwischen Dreiblattstadium und Bestockung. An den Pflanzen die unter Freilandbedingungen angezogen wurden, wurden keine zusätzlichen Pflanzenschutzmaßnahmen durchgeführt. Nach der Abreifung wurden die Pflanzen gedroschen und das Strohgewicht, die Anzahl Ähren, der Ertrag und das Tausenkorngewicht (TKG) bestimmt. Allerdings konnte bei keiner der Behandlungen weder in den Gewächshausversuchen noch in den Open-Top-Versuchen ein Einfluß auf ertragsrelevante Parameter festgestellt werden (Tab. 4).

Tab. 4: Bestimmung ertragsrelevanter Parameter nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren: Gersten wurden unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus und unter Freilandbedingungen in Open-Tops angezogen und nach Angaben der Hersteller mit den Pflanzenaktivatoren Messenger, Neudovital und BioS behandelt. Ertragsrelevante Parameter wurden für jeden Topf getrennt bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus acht Töpfen zu je fünf Pflanzen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Gewächshausversuche				
	<i>Anzahl Ähren</i>	<i>Ertrag (g)</i>	<i>Strohgewicht (g)</i>	<i>TKG (g)</i>
Kontrolle	44,3 ± 3,1	59,0 ± 2,3	55,6 ± 1,5	49,4 ± 3,0
Messenger	45,3 ± 1,5	59,1 ± 1,9	56,0 ± 3,6	49,2 ± 1,5
Neudovital	44,9 ± 2,9	61,8 ± 3,0	57,9 ± 2,5	50,3 ± 1,7
BioS	47,8 ± 1,7	59,0 ± 3,1	57,2 ± 1,6	48,1 ± 2,0

Open-Top-Versuche				
	<i>Anzahl Ähren</i>	<i>Ertrag (g)</i>	<i>Strohgewicht (g)</i>	<i>TKG (g)</i>
Kontrolle	27,1 ± 2,9	26,6 ± 1,3	23,3 ± 2,3	47,8 ± 2,0
Messenger	23,6 ± 3,7	24,7 ± 3,1	21,2 ± 1,6	49,8 ± 1,3
Neudovital	24,6 ± 3,9	23,5 ± 2,3	21,1 ± 2,2	47,6 ± 5,7
BioS	25,8 ± 4,0	24,6 ± 4,1	20,8 ± 2,5	47,8 ± 2,4

3.3 Freilandversuche im Versuchsgut Scheyern

Die beiden kommerziell erhältlichen Produkte Messenger und Proradix wurden im Versuchsgut der GSF in Scheyern unter Freilandbedingungen an Gerste und Kartoffel getestet. Die Versuche wurden in den Jahren 2005, 2006 und 2007 durchgeführt. Die Betreuung und Planung der Versuche erfolgte durch den Leiter des Versuchsguts Scheyern, Georg Gerl, nach guter landwirtschaftlicher Praxis.

Der erste Freilandversuch mit Gerste wurde 2005 durchgeführt. Die Parzellenanlage umfaßte zusätzlich zu Messenger und Proradix noch die Aktivatoren Neudovital, BioS und BION, sowie jeweils eine Kombination dieser Aktivatoren mit Proradix. Der Versuch fand auf dem Schlag A30 statt. Weitere Versuche wurden nicht durchgeführt.

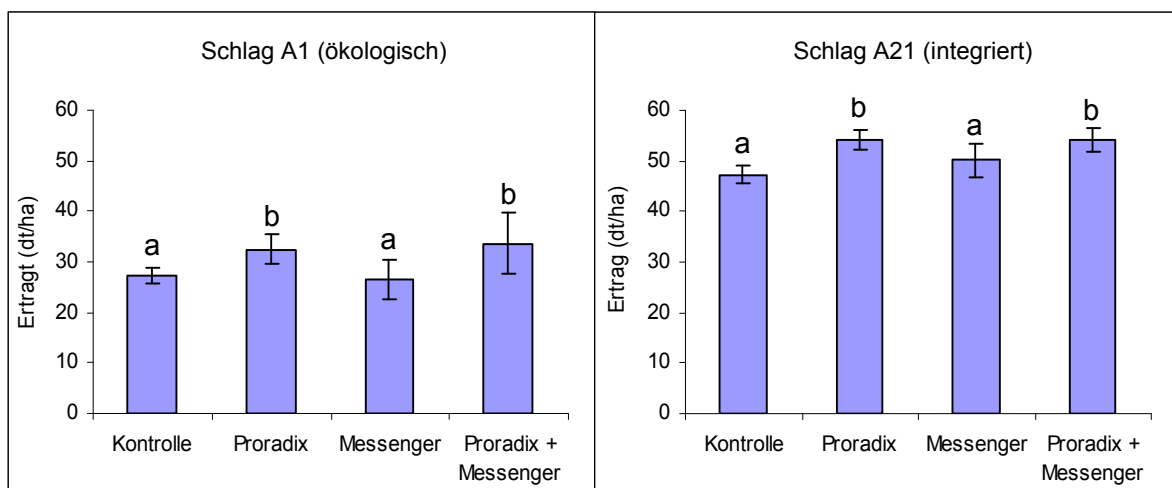
Mehrere aufeinanderfolgende Unwetter führten allerdings zu einem Totalverlust der Versuchspartellen. Auf eine Ernte der Gerste wurde verzichtet. Daher konnten 2005 keine auswertbaren Ergebnisse gewonnen werden.

Um in den Folgejahren einen derartigen Verlust zu verhindern, wurden die Parzellen vergrößert sowie Wiederholungen des Experiments auf weiteren Schlägen angelegt. Dies führte allerdings dazu, daß nur noch zwei Aktivatoren getestet werden konnten. Aufgrund der Kooperationen mit der Arbeitsgruppe von Toni Hartmann (IBÖ, HelmholtzZentrum München) sowie den Herstellern Eden Bioscience und Sourcon Padena fiel die Entscheidung auf die Produkte Messenger und Proradix.

3.3.1 Freilandversuche mit Gerste 2006

Freilandversuche mit Gerste wurden auf je zwei integriert (A19 und A21) und zwei ökologisch bewirtschafteten Schlägen (A1 und A26) durchgeführt. Die Behandlung mit Messenger erfolgte einmal zu Beginn der Bestockung. Saatgut wurde durch den Hersteller Sourcon Padena vor der Aussaat mit Proradix gebeizt. Nach der Ernte wurde der Ertrag bestimmt.

Die Behandlung mit Messenger führte auf keinem der Schläge zu einem erhöhten Ertrag. Die Verwendung von proradixgebeiztem Saatgut bewirkte aber eine Ertragssteigerung auf den Schlägen A1 und A21. Im Schlag A26 konnte zumindest ein entsprechender Trend festgestellt werden. Auch die Kombination von Messenger und Proradix zeigte eine Steigerung des Ertrages im Vergleich zu den Kontrollen. Im Vergleich zu den proradixbehandelten Parzellen konnte aber auch hier kein Unterschied im Ertrag festgestellt werden, der auf Messenger zurückzuführen wäre (Abb. 14).



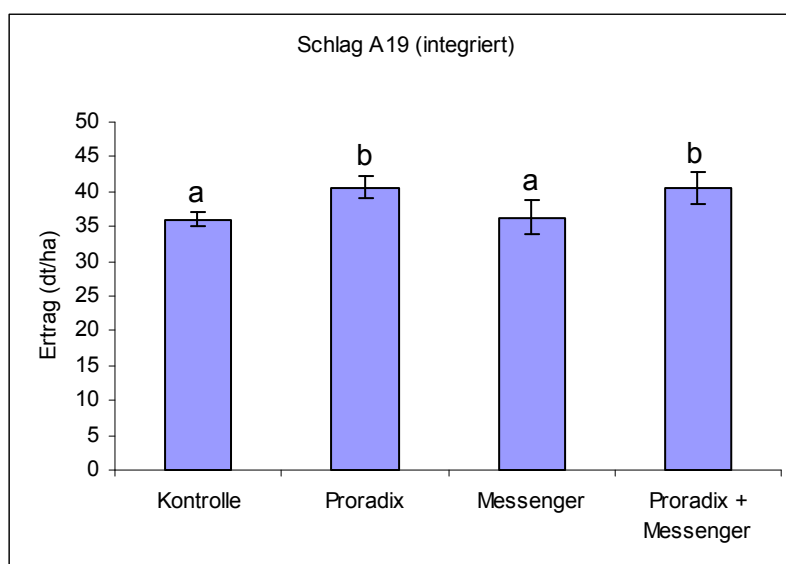
Erträge der Freilandversuche 2006 (dt/ha)

	Ökologischer Anbau		Integrierter Anbau	
	Schlag A1	Schlag A26	Schlag A19	Schlag A21
Kontrolle	27,3 ± 1,6	29,1 ± 5,6	52,8 ± 4,2	47,2 ± 1,8
Proradix	32,5 ± 3,0	32,3 ± 4,0	55,0 ± 2,9	54,3 ± 2,0
Messenger	26,4 ± 4,0	31,3 ± 6,6	54,2 ± 4,6	50,1 ± 3,2
Pro + Mess	33,7 ± 5,9	33,9 ± 1,3	53,6 ± 2,6	54,1 ± 2,4

Abb. 14: Freilandversuche mit Gerste 2006: Die Versuche wurden im Versuchsgut Scheyern durchgeführt. Das Saatgut wurde durch den Hersteller Sourcon Padena mit Proradix gebeizt. Messenger wurde nach Angaben des Herstellers aufgesprüht. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Wiederholungen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (a, b kennzeichnen Mittelwerte die nach Duncans multiple range test ($p < 0,05$) nicht signifikant verschieden sind)

3.3.2 Freilandversuche mit Gerste 2007

Auch 2007 wurden die Freilandversuche mit Gerste auf je zwei integriert (A19 und A20) und zwei ökologisch bewirtschafteten Schlägen (A1 und A26) durchgeführt. Die Behandlungen erfolgten wie im Jahr zuvor. Nach der Ernte wurde der Ertrag bestimmt. Das Erntegut von Schlägen die einen erhöhten Ertrag aufwiesen, sollte zusätzlich auf Strohgewicht, TKG, Stärkegehalt, Proteingehalt und Keimungsrate hin untersucht werden. Wie im Jahr zuvor konnte nur in Parzellen mit einer Proradixbehandlung eine erhöhter Ertrag festgestellt werden. Allerdings beschränkte sich dieser Effekt auf einen von vier Schlägen (A19, integriert). In keinem der anderen Schläge konnte eine Erhöhung des Ertrages oder zumindest ein entsprechender Trend festgestellt werden (Abb. 15).

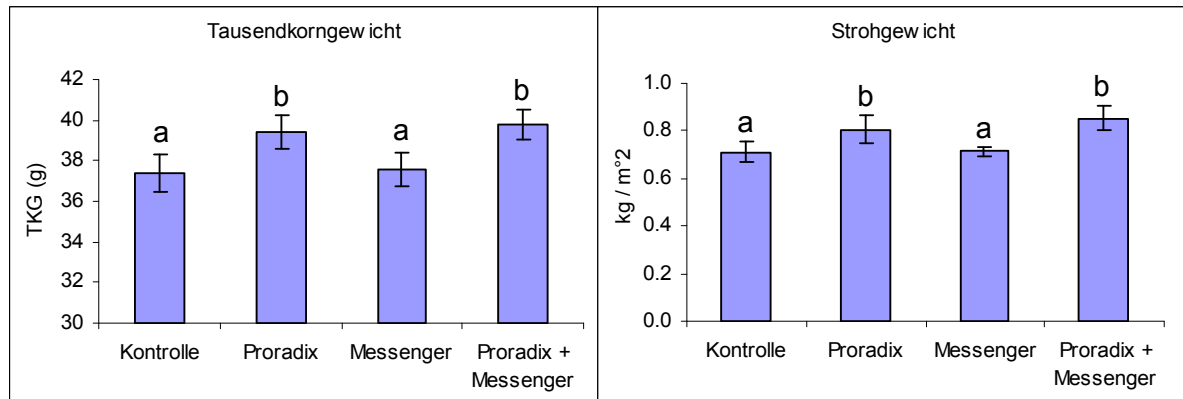


Erträge der Freilandversuche 2007 (dt/ha)				
	Ökologischer Anbau		Integrierter Anbau	
	Schlag A1	Schlag A26	Schlag A19	Schlag A20
Kontrolle	16,8 ± 2,4	17,1 ± 0,9	36,0 ± 1,1	34,8 ± 1,9
Proradix	17,2 ± 2,7	17,2 ± 1,8	40,6 ± 1,7	34,2 ± 2,0
Messenger	17,2 ± 3,0	17,6 ± 1,4	36,3 ± 2,5	34,4 ± 1,5
Pro + Mess	17,4 ± 3,0	17,7 ± 1,4	40,5 ± 2,3	34,2 ± 2,6

Abb. 15: Freilandversuche mit Gerste 2007: Die Versuche wurden im Versuchsgut Scheyern durchgeführt. Das Saatgut wurde durch den Hersteller Sourcon Padena mit Proradix gebeizt. Messenger wurde nach Angaben des Herstellers aufgesprüht. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Wiederholungen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (a, b kennzeichnen Mittelwerte die nach Duncans multiple range test ($p < 0,05$) nicht signifikant verschieden sind)

In Schlag A19 wurde zusätzlich zum Ertrag für jede Parzelle das Strohgewicht bestimmt. Auch hier führte die Verwendung von proradixgebeiztem Saatgut zu einer Zunahme im Vergleich mit der Kontrolle. Die Analyse des Ernteguts von Schlag A19 ergab zudem noch

eine leichte Steigerung des TKG in proradixbehandelten Parzellen. Stärkegehalt, Proteingehalt und Keimungsrate wiesen keine Unterschiede zur Kontrolle auf (Abb. 16). Die Behandlung mit Messenger beeinflusste keinen der bestimmten Parameter.



Analyse der Ernte von Schlag A19 (integriert)				
	<i>TKG (g)</i>	<i>Proteingehalt (%)</i>	<i>Stärkegehalt (%)</i>	<i>Keimungsrate (%)</i>
Kontrolle	37,4 ± 0,9	12,1 ± 0,4	54,6 ± 0,1	97,0 ± 2,4
Proradix	39,4 ± 0,9	12,5 ± 0,6	54,5 ± 0,7	98,3 ± 0,5
Messenger	37,6 ± 0,8	12,1 ± 0,2	54,7 ± 0,3	98,8 ± 0,5
Pro + Mess	39,8 ± 0,8	12,4 ± 0,3	54,5 ± 0,8	97,5 ± 1,9

Abb. 16: Analyse des Ernteguts von Schlag A19: Analyse von TKG, Proteingehalt, Stärkegehalt und Keimungsrate wurden durch die Firma Agrolab nach anerkannten landwirtschaftlichen Standards durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Wiederholungen und die dazugehörigen Standardabweichungen. (a, b kennzeichnen Mittelwerte die nach Duncans multiple range test ($p < 0,05$) nicht signifikant verschieden sind)

3.3.3 Freilandversuche mit Kartoffel

Versuche mit Kartoffel wurden 2006 und 2007 auf je einem integriert und einem ökologisch bewirtschafteten Schlag durchgeführt. Die Behandlung mit Proradix erfolgte im Tauchverfahren vor dem Auslegen der Kartoffeln. Die Behandlung mit Messenger erfolgte einmal zu Beginn der Knollenbildung und ein zweites mal zwei Wochen später. Nach der Ernte wurde das Stockgewicht bestimmt.

In beiden Versuchsjahren konnte für keine der Behandlungen ein Einfluß auf den Ertrag festgestellt werden. Daher wurden 2007 die geernteten Knollen sortiert, um zu untersuchen, ob die Behandlungen einen Effekt auf die Größe der Knollen hatten. Allerdings konnten auch hier keine Unterschiede festgestellt werden. Beispielfhaft gezeigt sind daher nur die Ergebnisse des Versuchsjahres 2007 (Tab. 5).

Tab. 5: Freilandversuche mit Kartoffel 2007: Die Versuche wurden im Versuchsgut Schyern. Die Behandlung der Kartoffelknollen mit Proradix erfolgte nach Angaben des Herstellers im Tauchverfahren vor dem Auslegen. Messenger wurde nach Angaben des Herstellers aufgesprüht. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier Wiederholungen und die dazugehörigen Standardabweichungen.

Integrierter Anbau Schlag A20 2007				
	<i>Stockgewicht (kg)</i>	<i>Sortierung (%)</i>		
		<i>< 35mm</i>	<i>35-55mm</i>	<i>> 55mm</i>
Kontrolle	1,77 ± 0,21	7,0 ± 5,7	63,6 ± 4,1	29,4 ± 3,0
Proradix	1,71 ± 0,15	10,0 ± 1,2	63,4 ± 2,5	26,6 ± 2,7
Messenger	1,76 ± 0,20	12,7 ± 5,3	61,5 ± 6,9	25,8 ± 5,5
Pro + Mess	1,81 ± 0,17	9,9 ± 1,0	62,5 ± 2,5	27,7 ± 1,8

Ökologischer Anbau Schlag A26 2007				
	<i>Stockgewicht (kg)</i>	<i>Sortierung (%)</i>		
		<i>< 35mm</i>	<i>35-55mm</i>	<i>> 55mm</i>
Kontrolle	0,95 ± 0,14	10,3 ± 0,7	80,4 ± 2,8	9,3 ± 3,2
Proradix	0,83 ± 0,11	10,5 ± 1,9	83,0 ± 3,8	6,4 ± 2,1
Messenger	0,91 ± 0,11	9,8 ± 0,9	82,0 ± 2,3	8,2 ± 2,5
Pro + Mess	0,86 ± 0,13	9,3 ± 1,2	83,8 ± 2,6	6,8 ± 1,8

4 Diskussion

4.1 Der Effekt von *P. fluorescens spec. Proradix* auf die Resistenz von Gerste

Neben Pflanzenaktivatoren werden auch Rhizosphärebakterien als eine Alternative zu herkömmlichen Methoden des Pflanzenschutzes angesehen. Rhizosphärebakterien können durch Wettbewerb um ökologische Nischen und Nährstoffe, durch Produktion von Hemmstoffen wie Antibiotika, Siderophoren oder lytischen Enzymen und durch Induktion von systemischer Resistenz (ISR) zur Abwehr von Pathogenen beitragen (Compant *et al*, 2005).

In dieser Arbeit sollte der kommerziell erhältliche, nicht phytopathogene *P. fluorescens*-Stamm Proradix unter Laborbedingungen auf seine Fähigkeit zur Induktion von Resistenz in Gerste untersucht werden. Infektionsversuche konnten zeigen, daß Proradix eine erhöhte Resistenz gegenüber *Rhynchosporium secalis* induzieren kann (Abb. 8). Mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray sollte untersucht werden, ob eine Behandlung mit Proradix alleine schon zu einer Induktion von Abwehrgenen führt.

In *Arabidopsis thaliana* induziert eine Behandlung mit einem ethanolischen Extrakt dieses Stammes sowohl Gene des SAR-Signalweges als auch Gene des ISR-/JA-Signalweges. Außerdem kann nach der Behandlung erhöhte Mengen an SA und JA in den Pflanzen nachgewiesen werden (von Rad *et al*, 2005). In Vorversuchen zur Inokulation von sterilen Gerste-Keimlingen mit Proradix konnten irreversible Schäden an den Blättern der Pflanzen beobachtet werden, wenn die Blätter der Keimlinge während der Inokulation in Kontakt mit hoch konzentrierter Bakteriensuspension kamen (Abb. 5). Eine Behandlung der Wurzeln alleine rief aber auch bei hoch konzentrierten Bakteriensuspensionen keine Schäden hervor (Abb. 6). Eine Analyse der beschädigten Pflanzen mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray zeigte eine starke Induktion von verschiedenen Abwehrgenen, wie z.B. PR-Genen und Defensinen. Außerdem wurden Gene induziert, die am Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind, wie z.B. Katalase und Superoxiddismutase, oder eine Entgiftungsfunktion in der Zelle besitzen, wie z.B. Gluthathion-S-Transferase (GST) oder Cytochrom-P450-Proteine. Auffällig ist auch eine Repression von Genen deren Produkte an der Photosynthese beteiligt sein könnten (Tab. 2). Offensichtlich führt intensiver Kontakt der Blätter mit Proradix zu einer Überreaktion der Abwehrsysteme in der Pflanze. Auslöser für diese Reaktion könnten Bestandteile der Bakterien, wie z.B. Flagellin und Lipopolysaccharide, oder von den Bakterien produzierte Stoffe sein. Die

Induktion von Abwehrgenen durch Extrakte von Proradix in *Arabidopsis thaliana* bestärken diese Annahme. Da diese Bestandteile von Bakterien auch als Auslöser von ISR gelten (vanLoon *et al*, 1998; Schuegger *et al*, 2006), könnte dies einen Hinweis auf die Wirkungsweise von Proradix bei der Induzierung von Resistenz geben.

Die Analyse der Genexpression in Gerste nach Behandlung mit Proradix-Bakterien wurde in einem unsterilen System durchgeführt. Detaillierte Untersuchungen zur Besiedlung von Gerstewurzeln durch Proradix zeigten, daß eine Behandlung in steriler Sandkultur zu einer sehr viel stärkeren Besiedlung der Wurzeln als in unsteriler Kultur in Erde führt (Katharina Buddrus, IBÖ, persönliche Kommunikation). Um die Analyse mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Microarray unter möglichst natürlichen Bedingungen durchzuführen, wurde daher auf die weitere Analyse der Sterilkulturen verzichtet. Die Bedingungen für die Versuche wurden so gewählt wie in den Infektionsversuchen mit *Rhynchosporium secalis*, um eventuell Hinweise auf den Mechanismus der induzierten Resistenz zu bekommen. Obwohl eine Behandlung von Gerste mit Proradix zu einer deutlich erhöhten Resistenz gegenüber *R. secalis* führte (Abb. 8), konnte mit Hilfe der Arrayanalysen aber zu keinem Zeitpunkt eine Geninduktion oder -reprimierung in Gerstebältern durch Proradix alleine festgestellt werden.

Induzierte systemische Resistenz wurde bisher hauptsächlich an der Interaktion von *Arabidopsis thaliana* und *P. fluorescens* WCS417r untersucht. Van Wees *et al* (1999) analysierten die Expression verschiedener SA-, JA- und Ethylen-responsiver Abwehrgene in diesem System, konnten aber keine Induktion oder Repression dieser Gene feststellen. Im selben experimentellen System führten Verhagen *et al* (2004) eine Transkriptanalyse von ca. 8000 Genen durch, wobei zwar in Wurzeln ca. 100 regulierte Gene gefunden wurden, systemisch in den Blättern aber keine Änderung der Genexpression festgestellt wurde. Eine Infektion der behandelten Pflanzen führte allerdings zu einer verstärkten Expression von 81 hauptsächlich JA- und Ethylen-regulierten Genen in den Blättern, was die Autoren als Primingeffekt durch WCS417r interpretierten. Die umfassendste Transkriptomanalyse der ISR wurde von Wang *et al* (2005) durchgeführt. Mit Hilfe des Affymetrix Genechip Arrays, der ca. 22 800 Gene repräsentiert, wurde die Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. fluorescens* FPT9601-T5 untersucht. Insgesamt konnten ca. 200 Gene identifiziert werden, die in Blättern von inokulierten Pflanzen differentiell reguliert waren. Weitere Analysen der Interaktionen von *A. thaliana* mit *P. fluorescens* WCS417r und *P. thivervalensis* MLG45 zeigten, daß die Genexpressionsmuster in allen drei Systemen nur leicht überlappen. Trotz dieser detaillierten Analysen können die Autoren aller drei Untersuchungen über die Mechanismen der ISR nur spekulieren. Weiterhin sind auch keine eindeutigen Markergene für ISR in *A. thaliana* identifiziert. Auch über ISR in monocotylen Pflanzen ist noch wenig bekannt. Der endophytische Pilz

Piriformospora indica bewirkt zwar erhöhte Resistenz von Gerste gegenüber Mehltau, induziert aber keinen der bekannten Abwehrsignalwege in systemischen Blättern (Waller *et al.*, 2005). Array-Analysen von mit Proradix inokulierten und mit *R. secalis* infizierten Pflanzen könnten einen Primingeffekt aufdecken. Die Erweiterung des Gerste-DNA-Microarrays um Gene mit Homologie zu den aus *Arabidopsis* bekannten, durch ISR regulierten Genen könnte eventuell Ähnlichkeiten und Unterschiede der ISR in monocotylen und dicotylen Pflanzen zeigen.

Die Infektionsexperimente mit *R. secalis* deuten auf einen Primingeffekt von Proradix hin. Zusätzlich zu diesem systemisch wirkenden Effekt, scheint Proradix auch eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von bodenbürtigen Pathogenen auszuüben. Proradix hemmte in Dualkulturen mit *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* das Wachstum des Pilzes (Abb. 9). In Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß der Befall der Wurzeln von Proradix-inokulierten Pflanzen deutlich niedriger war als in Kontrollpflanzen (Abb. 10). Die Hemmung des Pilzwachstums in Dualkultur deutet darauf hin, daß Proradix antimikrobiell wirksame Stoffe produziert. Ob hier, wie bei der Abwehr von *R. secalis*, induzierte Resistenz eine Rolle spielt, ließe sich z.B. durch Analysen in einem Split-root-system klären.

4.2 Der Effekt von *P. fluorescens* spec. Proradix auf das Wachstum von Gerste

Rhizosphärebakterien können neben der Induktion von Resistenz gegenüber Pathogenen auch durch die sogenannte „Biofertilisation“ und die sogenannte „Phytostimulation“ einen positiven Effekt auf das Wachstum der Pflanzen und den Ertrag von Nutzpflanzen haben. „Biofertilisation“ bedeutet, daß Pflanzen durch Mikroorganismen die Stickstoff fixieren oder unlösliche, den Pflanzen nicht zugängliche Nährstoffe solubilisieren bzw. mineralisieren können, zusätzliche Nährstoffe für ihr Wachstum zur Verfügung gestellt werden. „Phytostimulatoren“ beeinflussen direkt das Wachstum der Pflanzen (Bloemberg und Lugtenberg, 2001). In dieser Arbeit sollte der Effekt des kommerziell erhältlichen Rhizosphärebakterienstammes *Pseudomonas fluorescens* spec. Proradix auf das Wachstum von Gerste im allgemeinen und ertragsrelevante Parameter im speziellen untersucht werden.

In Gerste-Sterilkultur wurde zunächst der Effekt von Proradix auf das Wachstum von Gerste-Keimlingen untersucht. Durch Inokulation der Keimlinge mit einem GFP-markierten Proradixstamm konnte eine Besiedlung vor allem der Wurzelhaare von Gerste

mit Proradix gezeigt werden (Abb. 7). Ein reproduzierbarer Effekt dieser Besiedlung auf das Frischgewicht oder die Morphologie der Blätter oder der Wurzeln konnte allerdings nicht beobachtet werden (Abb. 6). Das Wachstum von Gerste in steriler Sandkultur führte in allen Versuchen aber zu einem sehr kurzen Wurzelsystem und dickeren Wurzeln als in Erde. Detaillierte Vergleiche der Wurzel-Besiedlung durch Proradix in steriler Sandkultur und in Erde konnten außerdem zeigen, daß die Besiedlung in Sterilkultur um ein Vielfaches höher war als in Erde (Katharina Buddrus, IBÖ, persönliche Kommunikation). In *Arabidopsis thaliana* führt die Besiedlung der Wurzeln mit Pseudomonaden oft zu einer Änderung der Wurzelarchitektur. Abhängig vom verwendeten Stamm und vor allem der Konzentration des Inokulats können positive Effekte wie längere oder stärker verzweigte Wurzelsysteme aber auch negative Effekte wie irreversible Schäden an den Pflanzen beobachtet werden (Persello-Cartieaux *et al*, 2001). Da die Besiedlungsdichte der Wurzeln bei der Interaktion von Pflanze und Rhizosphärebakterien offensichtlich eine wichtige Rolle spielt, müssen die Versuche in Sterilkultur kritisch betrachtet werden. Eine zu dichte Besiedlung des Wurzelsystems könnte zu unnatürlichen Effekten führen. Außerdem konnten die Experimente auf Grund der Größe der Vitro-Vent-Boxen nur in einem sehr begrenzten Zeitrahmen (bis maximal sechs Tage nach Inokulation mit Proradix) durchgeführt werden. Es läßt sich nicht ausschließen, daß entsprechende, durch Proradix induzierte Änderungen im Wachstum der Pflanzen erst in späteren Wachstumsphasen auftreten.

Im Gewächshaus wurden daher Untersuchungen zum Einfluß von Proradix auf ertragsrelevante Parameter in Gerste gemacht. Im Gegensatz zu den Versuchen in Sterilkultur wurde mit Proradix gebeiztes Saatgut verwendet. In Topfversuchen mit unterschiedlichem Nährstoffgehalt des Substrates konnte gezeigt werden, dass ein wachstumsfördernder Effekt durch Proradix hauptsächlich bei schlechter Nährstoffversorgung der Pflanzen auftritt, während unter idealen Bedingungen kein wachstumsfördernder Effekt beobachtet werden konnte (Abb. 11). Rhizosphärebakterien können auf unterschiedliche Weise Einfluß auf die Nährstoffversorgung nehmen. So sind z.B. Vertreter der Gattungen *Rhizobium* oder der *Azospirillum* in der Lage atmosphärischen Stickstoff zu fixieren (Steenhoudt und Vanderleyden, 2000). Während endosymbiotisch lebende Bakterien, wie z.B. Rhizobien, den Pflanzen diesen Stickstoff in Form von Ammonium zur Verfügung stellen, ist dies für Rhizosphärebakterien wie z.B. *Azospirillum* allerdings nicht eindeutig gezeigt (Mantelin und Touraine, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Bakterien die Nährstoffversorgung der Pflanzen zu verbessern, besteht darin, Einfluß auf die Morphologie der Wurzel zu nehmen und so z.B. die Wurzeloberfläche zu vergrößern so daß die Pflanze vermehrt Nährstoffe und Wasser aufnehmen kann. Allerdings ist nicht klar, ob Bakterien direkt Einfluß auf die

Wurzelmorphologie nehmen, oder ob sie nur die Aufnahme von Nährstoffen wie z.B. Nitrat stimulieren und die Vergrößerung des Wurzelsystems durch die verbesserte Nährstofflage zu Stande kommt (Mantelin und Touraine, 2004). Viele Rhizosphärebakterien sind außerdem in der Lage, Nährstoffe die den Pflanzen nicht verfügbar sind, durch Mineralisierung oder Solubilisierung zur Verfügung zu stellen. So können z.B. Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acetobacter* oder *Rhizobium* unlösliche Formen von Phosphat wie z.B. Tricalciumphosphat oder Hydroxyapatit in Lösung bringen. Phosphatase-produzierende Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Serratia* oder *Enterobacter* sind außerdem in der Lage organische Phosphate zu mineralisieren und sie so den Pflanzen zugänglich zu machen (Rodriguez und Fraga, 1999). Im Fall der Topfversuche scheint letztere Möglichkeit am ehesten die Ursache für die erhöhten Wachstumsparameter unter schlechter Nährstoffversorgung zu sein. Die im Versuch verwendete Einheitserde ist reich an organischem Material. Abbau und Aufschluß dieses Materials durch Proradix könnte eine bessere Versorgung der Gersten mit Nährstoffen bewirken. In Pflanzen mit optimaler Nährstoffversorgung fällt diese Zusatzversorgung vermutlich nicht sonderlich ins Gewicht, so daß eine Ertragssteigerung nicht meßbar ist. Da das Volumen der Töpfe stark begrenzt ist, könnte eine Vergrößerung der Wurzeloberfläche zumindest in diesen Versuchen wohl nur zu Beginn einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen haben.

In den Jahren 2006 und 2007 wurde Proradix auch in Freilandversuchen im Versuchsgut Scheyern an Gerste getestet. Freilandversuche mit Rhizosphärebakterien wurden seit Mitte des 20. Jahrhunderts schon an vielen Nutzpflanzen durchgeführt, wobei eine Vielzahl an Auswirkungen auf die Pflanzen beobachtet werden konnte, wie z.B. erhöhter Ertrag, erhöhte Keimungsrate, erhöhter Chlorophyllgehalt oder stärkeres Wurzelwachstum (Lucy *et al*, 2004). Diese Effekte hängen aber sehr stark von den Bedingungen ab, unter denen der jeweilige Versuch durchgeführt wurde. So können z.B. bei Ertragsmessungen von Jahr zu Jahr starke Schwankungen auftreten, bis hin zu einer Reduktion des Ertrages durch die Anwendung von Rhizosphärebakterien (Tab. 6).

Bakterium	Pflanze	Ertragssteigerung
<i>Azospirillum spec.</i>	Weizen	- 16% bis + 31%
<i>Bacillus spec.</i>	Weizen	± 0% bis + 114%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kartoffel	± 0% bis + 33%
<i>Serratia liquefaciens</i>	Mais	+ 8% bis + 14%
<i>Azospirillum spec.</i>	Senf	+ 16% bis + 128%

Tab. 6.: Behandlung von Nutzpflanzen mit Rhizosphärebakterien im Freilandversuch. (Nach Lucy *et al*, 2004)

In den Freilandversuchen mit Gerste und Proradix konnte nur auf wenigen Schlägen eine Zunahme des Ertrages beobachtet werden (Abb. 14 und 15). Für solche inkonsistenten Ergebnisse bei der Anwendung von Rhizosphärebakterien im Freiland kommen eine Vielzahl an Gründen in Frage. So ist die effiziente Besiedlung des Wurzelsystems durch die Bakterien sehr wichtig. Nur Bakterien die die Wurzelexudate der Pflanze nutzen und sich gegen andere Mikroorganismen behaupten können, sind in der Lage das Wurzelsystem zu besiedeln (Persello-Cartieaux *et al*, 2003). Eine wichtige Rolle bei der Besiedlung der Wurzeln spielen die herrschenden Umweltbedingungen. Vor allem der Wassergehalt des Bodens kann hier positive oder negative Effekte auf Rhizosphärebakterien haben. So kann sowohl starke Trockenheit (de Freitas und Germida, 1992) als auch zu hohe Feuchtigkeit (Lucy *et al*, 2004) die Besiedlung der Wurzeln hemmen und eine Wachstumsförderung durch die Bakterien verhindern. Abhängig vom verwendeten Rhizosphärebakterium kann auch die Umgebungstemperatur wichtig für die Interaktion der Bakterien mit den Pflanzen sein. Egamberdiyeva *et al* (2003) konnten zeigen, daß verschiedene Temperaturen bei gleichbleibenden Bodenbedingungen zu unterschiedlich starken Effekten führt. Auch der Gehalt des Bodens an Nährstoffen und organischem Material kann einen Einfluß auf die Wirkung der Bakterien haben. So scheint z.B. *Azopsirillum* spec. hauptsächlich in Böden mit niedrigem Gehalt an organischem Material und mäßiger Düngung eine Wachstumsförderung zu bewirken (Dobbelare *et al*, 2001). In den Freilandversuchen in Scheyern trat der wachstumsfördernde Effekt im Jahr 2006 in drei von vier Gerste-Schlägen auf, im Jahr 2007 nur in einem der vier Schläge. 2007 war durch eine sehr trockene erste Jahreshälfte gekennzeichnet (s. Anhang 6.3), so daß die Gerste-Parzellen gewässert werden mußten (s. Anhang 6.5). Derartige Bedingungen können das Wachstum der Rhizosphärebakterien und die Besiedlung der Wurzeln hemmen oder ganz verhindern. Zusätzlich bestand 2007 in den ökologisch bewirtschafteten Schlägen ein erhöhter Unkrautdruck. Die Ergebnisse dieser Schläge müssen daher kritisch bewertet werden, da dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Obwohl im Gewächshaus vor allem bei schlechter Versorgung mit Nährstoffen eine Wachstumsförderung auftrat, war im Freiland kein Zusammenhang zwischen Wachstumsförderung und einer integrierten oder ökologischen Bewirtschaftung der Schläge zu beobachten. Auch eine Analyse der Schläge auf Gesamtgehalt an Stickstoff, Phosphor, Magnesium und Kalium konnte kein Zusammenhang zwischen beobachteter Ertragssteigerung und dem Gehalt des Bodens an diesen Elementen aufzeigen.

In den Freilandversuchen mit Kartoffeln konnte in keinem der Versuchsjahre ein Einfluß von Proradix auf den Ertrag oder die Größe der Knollen festgestellt werden (Tab. 5). Proradix wird zwar kommerziell für den Anbau von Kartoffeln angeboten, da mit Kartoffel

aber in dieser Arbeit keine Labor- und Gewächshausversuche durchgeführt wurden, kann nicht mit Sicherheit von einer Kompatibilität zwischen Proradix und Kartoffel ausgegangen werden. Inkonsistente Ergebnisse in derartigen Freilandversuchen werden in der Literatur oft mit variierenden Umweltbedingungen erklärt, es muß aber in Betracht gezogen werden, daß Rhizosphärebakterien eventuell auch nur einen wirtsspezifischen Effekt haben können, und so bei bestimmten Pflanzen keine Wachstumsförderung bewirken (Dobbelaere *et al*, 2001).

4.3 Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf die Resistenz von Gerste

Der am meisten limitierende Faktor in der landwirtschaftlichen Produktion von Nutzpflanzen besteht im Befall mit mikrobiellen Pathogenen und Herbivoren. Neben klassischen Methoden der Züchtung und des Pflanzenschutzes besteht die Möglichkeit, die Induzierbarkeit der pflanzlichen Abwehrsysteme zu nutzen, um Pflanzen weniger anfällig für den Befall mit Pathogenen und Herbivoren zu machen. Die Entwicklung von Pflanzenaktivatoren soll, neben Züchtung und herkömmlichem Pflanzenschutz, eine dritte Säule im Pflanzenschutz etablieren und Nachteile herkömmlicher Methoden, wie Resistenzbildung, umgehen (Kogel, BION Praxis 1998). Neben klar definierten Wirkstoffen wie dem Salicylsäure-Analoga BTH (BION) oder Harpin (Messenger) kommen auch immer mehr komplexe Aktivatoren zum Einsatz, wie z.B. Milsana, Neudovital und BioS, die aus Pflanzenextrakten bestehen.

Die Wirksamkeit von Pflanzenaktivatoren konnte in mehreren Untersuchungen schon gezeigt werden. So induziert Milsana in Gurke die Expression mehrerer Gene aus dem Flavonoid-Stoffwechsel und die Bildung von Phytoalexinen, was zu einer erhöhten Resistenz gegen Mehltau führt (Daayf *et al*, 1997; Fofana *et al*, 2002). Von Rad *et al* (2005) führten eine umfassende Analyse der Genexpression in aktivatorbehandelten *Arabidopsis thaliana* durch. Zur Anwendung kamen unter anderem die Aktivatoren BION, BioS und Neudovital. Während eine Behandlung mit dem SA-Analogen BION oder Jasmonsäure in *Arabidopsis thaliana* zu einer klaren Aktivierung der jeweiligen Signalwege und der dazugehörigen Markergene führten, induzierten die Aktivatoren BioS und Neudovital teilweise Gene aus dem SAR- und dem JA-Signalweg. Vier Stunden nach Behandlung zeigten sowohl BioS- als auch Neudovital-behandelte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen eine Reaktion ähnlich der JA-Behandlung, mit einer Aktivierung von Genen wie LOX, AOS, OPR3 und PDF1.2. Ein Tag nach Behandlung zeigten die Pflanzen dagegen eher eine deutliche Koregulation mit BION-behandelten Pflanzen und eine Aktivierung von Genen wie PR1, PR2 und PR5. Von Rad *et al* (2005) konnten auch zeigen, daß die

Aktivatoren BioS und Neudovital in *Arabidopsis thaliana* zu einer erhöhten Resistenz gegen *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum* führten.

Harpin, der aktive Bestandteil des Aktivators Messenger, induziert in *A. thaliana* systemische Resistenz und die Expression von PR-Genen, abhängig von SA und NPR1 (Dong *et al*, 1999). Auch in Tabak (Baker *et al*, 1993), Melone (Yang *et al*, 2005) und Wein (Tubajika *et al*, 2006) werden durch Behandlung mit Harpin Mechanismen der Pathogenabwehr und erhöhte Resistenz aktiviert.

In dieser Arbeit wurde eine Analyse der Genexpression in Gerste nach Behandlung mit den Aktivatoren Messenger, BioS und Neudovital durchgeführt, bei der ebenfalls eine Aktivierung von Genen der Pathogenabwehr beobachtet werden konnte (Tab. 3). Eine Behandlung der Gersten mit den Aktivatoren führte außerdem in Infektionsexperimenten zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Rhynchosporium secalis* (Abb. 12)

Neudovital führte nach Behandlung zu einer vollständigen Aktivierung des Octadecanoidwegs (LOX, AOS, AOC, OPR), während Messenger und BioS nur einzelne Gene des JA-Synthesewegs induzierten. In dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* spielt das Signalmolekül JA neben der Salicylsäure unter anderem eine zentrale Rolle in der Abwehr von Pathogenen, vor allem von Pilzen. Mutationen in Genen der JA-Synthese oder JA-Perzeption führen zu Pflanzen mit einer höheren Anfälligkeit gegenüber Pathogenen (z.B. Thomma *et al*, 1998), während Pflanzen mit konstitutiver Aktivierung des JA-Signalweges eine erhöhte Resistenz zeigen (z.B. Ellis *et al*, 2001). Die Rolle der JA und des JA-Syntheseweges in Gerste und anderen monokotylen Pflanzen ist weniger klar. Während eine Überexpression von AOS in Reis zu erhöhten Mengen an endogenem JA, PR-Genexpression und erhöhter Resistenz gegenüber *Magnaporthe grisea* führt (Mei *et al*, 2006), scheint endogene JA in der Abwehr von *Blumeria graminis* durch Gerste keine Rolle zu spielen (Kogel *et al*, 1995; Kogel, 2005). Im Gegensatz dazu konnten aber Walters *et al* (2002) beobachten, daß eine exogene Behandlung von Gerste mit JA die Resistenz gegenüber Mehltau erhöht. Kramell *et al* (2000) postulierten sogar getrennte Signalwege für die Wirkung von exogen applizierter und endogen produzierter JA in Gerste.

Vor allem Neudovital induzierte eine Reihe von PR-Genen, allerdings ebenfalls nur transient. PR-Proteine sind sowohl in dicotylen als auch in monocotylen Pflanzen nachweisbar. Sie sind unter anderem durch Pathogene und Herbivore induzierbar, wobei es stark von Pflanze und Stimulus abhängt, welche Kombination von PR-Genen induziert wird. In *Arabidopsis thaliana* sind PR-Gene außerdem durch SA und BTH induzierbar, was sie zu Markern für die systemische Resistenz macht, während PR-Proteine in monocotylen Pflanzen nicht SA-induzierbar sind (Molina *et al*, 1999; Kogel und Langen, 2005). Die biochemische Aktivität vieler PR-Proteine läßt oft auf eine direkte

antimikrobielle Funktion schließen. So haben z.B. Proteine der PR2-Klasse bzw. der PR3- und PR4-Klassen β -1,3-glucanase Aktivität bzw. Endochitinaseaktivität (van Loon und van Strien, 1999). Beide Arten von PR-Proteinen können durch Abbau der pilzlichen Zellwand bzw. Störung des Zellwandaufbaus eine Infektion mit Pilzen einschränken (Muthukrishnan *et al*, 2001).

Neben PR-Genen wurden durch Aktivatorbehandlung auch BCI-Gene induziert (barley chemical induced). Vertreter dieser Gruppe von Genen treten auch in anderen monokotylen Getreiden auf, so z.B in Weizen (WCI, wheat chemical induced) und Reis (RCI, rice chemical induced). BCIs wurden nach Behandlung von Gerste mit BTH identifiziert und können als Marker für chemisch induzierte Resistenz dienen, da sie nicht durch Pathogene wie z.B. Mehltau induziert werden (Beßer *et al*, 2000). Die Funktion von BCIs liegt in den meisten Fällen nicht in der Pathogenabwehr. Nur bci-2 (Thionin) und bci-9 (Apyrase) scheinen z.B. eine Rolle in der Abwehr von Mehltau zu spielen (Kogel und Langen, 2005).

Neudovital und BioS induzierten auch Gene, deren Produkte eine Rolle in der Signaltransduktion der Pathogenabwehr spielen könnten. Sowohl BioS- als auch Neudovital-behandelte Pflanzen zeigten eine Induktion von Genen mit Homologie zu WRKY-Transkriptionsfaktoren, AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren bzw. Rezeptorkinasen (LecRK und LRR-protein kinase). Die frühe Erkennung von Pathogenen und die Aktivierung von Abwehrmaßnahmen erfolgt in Pflanzen oft durch Rezeptorkinasen wie LRR-Proteinkinasen und LecRKs (lectin-like receptor kinases). So scheinen LecRKs Glycane sowohl endogenen Ursprungs (der pflanzlichen Zellwand) als auch exogenen Ursprungs (z.B. der Zellwand von Pathogenen und Symbionten) zu binden (Barre *et al*, 2002). WRKY-Proteine sind pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren, die eine sogenannte WRKY-Domäne besitzen und an Promotorregionen binden, die ein spezifisches DNA-Motiv enthalten, die sogenannte W-Box. Besonders Gene die eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen, unter anderem manche PR-Gene, besitzen in der Promotorregion eine W-Box. So induziert z.B. eine Überexpression von OsWKRY13 in Reis die Expression von SA-responsiven Genen und eine erhöhte Pathogenresistenz (Ryu *et al*, 2006; Qiu *et al* 2007). Auch die Klasse der AP2-Transkriptionsfaktoren ist pflanzenspezifisch. Mitglieder dieser Gruppe, die eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen, gehören zur Untergruppe der ERFs (ethylene-responsive-element-binding-factors). Sie zeichnen sich durch eine oder mehrere konservierte AP2-DNA-Bindedomänen aus und sind in der Lage an Promotoren von Ethylen- und JA-induzierten Genen sowie PR-Genen zu binden (Gutterson und Reuber, 2004).

Die Aktivatoren induzierten auch Gene deren Produkte eine direkte antimikrobielle Funktion haben. Darunter Gene mit Homologie zu Defensinen, Thioninen und Thionin-

Vorstufen, Proteasen und Protease-Inhibitoren. Defensine und Thionine gehören zu einer Gruppe kleiner Cystein-reicher Proteine mit antimikrobieller Funktion (Lay und Anderson 2005). Proteaseinhibitoren wird vor allem eine Rolle in der Abwehr von Herbivoren, aber auch mikrobiellen Pathogenen zugeschrieben. Sie können direkt die Aktivität von Proteasen die von Mikroorganismen und Insekten abgegeben werden hemmen (Ryan, 1990).

Bei Pflanzen die mit Neudovital behandelt wurden, konnte eine Induktion von Genen aus dem Biosyntheseweg aromatischer Aminosäuren (Shikimatweg) beobachtet werden. *Chorismatsynthase*, *Prephenatdehydratase*, *Phosphoshikimatcarboxyvinyltransferase*, *Indol-3-glycerolphosphatsynthase* und *Tryptophansynthase* sind an der Bildung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin beteiligt. Ausgehend von diesen Aminosäuren werden in Pflanzen eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten mit einer Rolle in der Abwehr von Pathogenen gebildet (z.B. Ligninmonomere, Alkaloide und Flavonoide). Des Weiteren waren Gene aus der Ligninsynthese induziert. *Phenylalaninammoniaklyase* (PAL) katalysiert den ersten Schritt in der Synthese von Ligninmonomeren, während *Caffeoyl-CoA-3-O-Methyltransferase* und *Caffeoesäure-3-O-Methyltransferase* essentielle Schritte in der Bildung der G- und S-Lignin-Monomere katalysieren. Die *Cinnamylalkoholdehydrogenase* führt den letzten Schritt der Ligninmonomersynthese, die Reduzierung von Hydroxyzimtaldehyd zu Hydroxyzimtalkohol, durch (z.B. Guo et al, 2001). Die Lignin-Monomere werden anschließend durch Peroxidasen zu einem Heteropolymer verknüpft.

Die Analyse von aktivatorbehandelten Pflanzen mit dem hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarray konnte zeigen, daß die Pflanzenaktivatoren Messenger, BioS und Neudovital auch in Gerste zu einer Induktion von Genen der Pathogenabwehr führen. Die induzierten Gene und der Zeitverlauf der Induktion unterschieden sich bei Messenger, BioS und Neudovital deutlich von den Ergebnissen an *A. thaliana* (vgl. mit von Rad *et al*, 2005 und Dong *et al*, 1999). Über den Mechanismus der erhöhten Resistenz gegenüber *Rhynchosporium secalis* nach Aktivatorbehandlung kann anhand dieser Arrayanalysen nur spekuliert werden. Die durch Neudovital induzierte Aktivierung des Shikimatweges und der Ligninbiosynthese könnte zum einen zu einer Verstärkung der pflanzlichen Zellwand führen und so das Eindringen und die Ausbreitung eines Pathogens einschränken. So wird z.B. vermutet, daß Mehltau nicht in der Lage ist, Lignin-ähnliches Material abzubauen (Hückelhoven, 2005). Zum anderen könnte die Aktivierung des Shikimatweges auch die Bildung und Einlagerung von antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z.B. Phytoalexinen bewirken, die einen Befall mit Pathogenen hemmen könnten. Ob die durch die Aktivatoren induzierten PR-Gene zur verstärkten Resistenz

gegenüber *Rhynchosporium secalis* beitragen, ist wegen der nur kurzen Induktion fraglich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Die Induktion von bci-Genen (vor allem bci-2 und bci-9) und antimikrobiell wirksamen Proteinen wie Proteasen und Defensinen könnten eine Rolle in der Abwehrreaktion spielen, vor allem da sie als einzige auch über einen längeren Zeitraum aktiv waren. Welchen Effekt die transiente Aktivierung der Gene des Octadecanoidwegs durch die Aktivatoren hat, läßt sich ohne weitere Untersuchungen nur schwer abschätzen. Über eine Analyse der endogenen JA-Mengen ließen sich eventuell Rückschlüsse darauf ziehen, ob z.B. die Aktivierung von PR-Genen durch die Aktivatoren wie in Reis mit der Aktivierung der JA-Synthese zusammenhängt. Ein „Priming“ durch die Aktivatoren kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden und könnte die geringe Anzahl aktivierter Gene im Fall von Messenger und BioS erklären. Allerdings konnte in bisherigen Untersuchungen zu Harpin (dem Wirkstoff in Messenger), BioS und Neudovital in *A. thaliana* kein Primingeffekt sondern nur eine direkte Aktivierung der Abwehrwege beobachtet werden (Dong *et al*, 1999, von Rad *et al*, 2005). Arrayanalysen infizierter Pflanzen könnte hier einen Aufschluß über einen eventuellen Primingeffekt geben (wie z.B. in Verhagen *et al*, 2004).

4.4 Der Effekt von Pflanzenaktivatoren auf das Wachstum von Gerste

Hersteller von Pflanzenaktivatoren betonen häufig die positive Wirkung ihrer Produkte auf das Wachstum und die generelle „Fitness“ der behandelten Pflanzen. So soll z.B. eine Anwendung von Messenger an Pflanzen zu mehr Blüten, Früchten und Blättern führen (<http://www.edenbio.com>). Aus der Literatur ist bekannt, daß Harpin, der aktive Bestandteil von Messenger, bei Behandlung von Tomatensaatgut eine verbesserte Keimung und ein verstärktes Wachstum der Pflanzen bewirkt (Qiu *et al*, 1997). Eine Behandlung von *A. thaliana*- Samen bzw. Besprühen der Pflanzen mit Harpin führt bei den ausgewachsenen Pflanzen zu längeren Wurzeln und Resistenz gegenüber herbivoren Insekten. Es wird vermutet, daß bei beiden Effekten eine Stimulation des Ethylen-Signalweges eine Rolle spielt (Dong *et al*, 2004). Auch in weiteren wichtigen Nutzpflanzen induziert eine Harpinbehandlung verstärkt das Pflanzenwachstum (Wei *et al*, 1998). Harpin, und damit Messenger, kann also unabhängig von der Resistenzinduktion zu verbessertem Wachstum bei Pflanzen führen. Die Aktivatoren BioS und Neudovital bestehen beide aus Pflanzenextrakten von unbekannter Zusammensetzung. Daher kann über die mögliche Funktionsweise dieser Aktivatoren nur spekuliert werden. Denkbar wäre die Aufnahme von enthaltenen Nährstoffen über die Blätter der behandelten Pflanze. Auch besteht die Möglichkeit, daß die Pflanzenextrakte

pflanzliche Hormone oder Signalstoffe enthalten, die einen Einfluß auf das Wachstum ausüben könnten. So ist bekannt, daß z.B. Extrakte aus Seegrass und marinen Algen Cytokinine, Auxine und Gibberelin-ähnliche Verbindungen enthalten (Crouch und van Staden, 1993). Vermutlich entfalten komplexe Aktivatoren wie BioS und Neudovital eine kombinierte Wirkung aus obengenannten Effekten und der induzierten Resistenz gegenüber Pathogenen.

Ausgehend von den Arrayanalysen mit aktivatorbehandelten Pflanzen ließen sich keine Rückschlüsse auf eine eventuelle wachstumsstimulierende Wirkung von Messenger, BioS und Neudovital ziehen. Der hauseigene Gerste-DNA-Microarray enthält zwar auch eine begrenzte Anzahl an ESTs mit Homologie zu Genen aus dem Hormonstoffwechsel, der hormonellen Signaltransduktion und dem Grundstoffwechsel, keine der Behandlungen bewirkte aber eine deutliche Aktivierung oder Reprimierung dieser Gene. Aufgrund der geringen Anzahl an entsprechenden ESTs auf dem Gerste-Array läßt dieses Ergebnis aber keine klare Aussage über eine eventuell wachstumsfördernde Wirkung der Aktivatoren zu.

Um zu untersuchen, ob die Aktivatoren Messenger, BioS und Neudovital unabhängig von der Induktion von Resistenz gegenüber Pathogenen einen Effekt auf das Wachstum von Gerste haben, wurden im Gewächshaus Versuche unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt (Tab. 4). Keine der Behandlungen führte aber unter diesen Bedingungen zu einer Zunahme ertragsrelevanter Parameter, wie Strohgewicht, Ährenzahl, Ertrag oder TKG. Auch bei Topfversuchen unter Freilandbedingungen (Tab. 4) und Parzellenversuchen mit Messenger unter landwirtschaftlichen Bedingungen (Abb. 14 und 15 und Tab. 5) konnte keine Veränderung der gemessenen Wachstumsparameter beobachtet werden.

Daß im Gewächshaus kein Effekt zu beobachten war, kann darauf zurückzuführen sein, daß die Pflanzen ideal mit Nährstoffen und Licht versorgt waren und ein zusätzlicher wachstumsfördernder Effekt daher nur sehr schwach oder gar nicht auftrat. Allerdings zeigten Pflanzen, die in Töpfen unter Freilandbedingungen gezogen wurden, auch keine Unterschiede im Wachstum nach einer Aktivatorbehandlung, und das, obwohl bei gleicher Nährstoffversorgung Ährenzahl, Ertrag, Strohgewicht und sogar das TKG deutlich unter den Werten der Gewächshausversuche blieb (Tab. 4).

Sollte der Haupteffekt der Aktivatoren auf der Aktivierung pflanzlicher Abwehr und damit der Vermeidung von Schäden durch Pathogene und Herbivore basieren, kann auch dies das Ausbleiben von meßbaren Effekten erklären. Beide Jahre der Freilandversuche mit Messenger zeichneten sich durch eher außergewöhnliche klimatische Bedingungen aus. 2006 war durch eine sehr warme, trockene zweite Jahreshälfte, 2007 durch eine sehr warme, trockene erste Jahreshälfte gekennzeichnet (s. Anhang 6.2 und 6.3). In beiden

Jahren war in den Freilandversuchen mit Gerste kaum Pathogenbefall zu beobachten (Georg Gerl, Scheyern, persönliche Kommunikation). Eine Stimulation der Resistenz durch Messenger könnte daher auch nicht zu einem deutlich meßbaren Effekt führen. Auch bei den Topfversuchen unter Freilandbedingungen und natürlich den Gewächshausversuchen war so gut wie kein Pathogenbefall zu beobachten, so daß für diese Versuche die gleichen Rückschlüsse wie für die Freilandexperimente gezogen werden können.

4.5 Abschließende Bewertung

Sowohl für Proradix als auch für die Pflanzenaktivatoren Messenger, BioS und Neudovital konnte in Labor- und Gewächshausversuchen gezeigt werden, daß sie Einfluß auf die Resistenz von Gerste gegenüber Pathogenen ausüben können und zum Teil wachstumsfördernde Eigenschaften besitzen. Die Versuche mit Proradix und Pflanzenaktivatoren im Freiland zeigten aber einmal mehr, daß eine Übertragung von Laborergebnissen auf Versuche im Freiland nur bedingt möglich ist. In beiden Fällen scheint die Wirkung auf die Pflanze stark von den herrschenden Umweltbedingungen abhängig zu sein.

Die Anwendung von Aktivatoren und Rhizosphärebakterien muß prophylaktisch erfolgen, was in der Landwirtschaft zusätzliche finanzielle Mittel und zusätzlichen Arbeitsaufwand erfordern würde. Daher sind Pflanzenaktivatoren und Rhizosphärebakterien den herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln in ihrer Wirksamkeit noch deutlich unterlegen. Interessant könnte die Anwendung aber im ökologischen Landbau sein, da hier der Einsatz vieler Pflanzenschutzmittel nicht zugelassen ist. Außerdem könnte eine Kombination herkömmlicher Mittel mit Aktivatoren oder Rhizosphärebakterien eine Reduzierung der Menge an Pflanzenschutzmittel erlauben.

Um die Effizienz von Aktivatoren und Rhizosphärebakterien zu verbessern sind weitere Untersuchungen nötig. Da die Wirkung von Aktivatoren sowohl bei der Resistenzinduktion als auch bei der Wachstumsförderung auf der Induktion von pflanzlichen Signalwegen basiert, könnte ein tieferes Verständnis dieser Signalwege zur Entwicklung effizienterer Aktivatoren führen. Negative Effekte wie z.B. die schlechte Verträglichkeit vieler SA-Analoga für Pflanzen oder das Ausbleiben der gewünschten Wirkung unter bestimmten Bedingungen könnte so vermieden werden. Rhizosphärebakterien werden zwar schon lange im Freiland getestet und auch in der Landwirtschaft angewendet, aber auch hier wäre ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Bakterium und Pflanze hilfreich. Untersuchungen in verschiedenen Böden, mit verschiedenen Temperaturen und vor allem

auch mit unterschiedlichen monokotylen und dikotylen Nutzpflanzen könnten zeigen, welche Rhizosphärebakterien für welche Anwendung geeignet sind.

5 Literaturverzeichnis

Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006): Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature*, **7**:601-611

Ahn IP, Kim S, Lee YH (2005): Vitamin B₁ functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol*, **138**:1505-1515

Ahn IP, Kim S, Lee YH, Suh SC (2007): Vitamin B₁-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **143**:838-848

Ahn IP, Lee SW, Suh SC (2007): Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Mol Plant Microbe Interact*, **7**:759-768

Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol*, **102**:1341-1344

Barre A, Herve C, Lescure B, Rouge P (2002) Lectin receptor kinases in plants. *Crit Rev Plant Sci*, **21**:379-399

Bion Praxis: Das Info-Magazin von Novartis (1998) Ausgabe 4

Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promoting and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opin Plant Biol*, **4**:343-350

Boller T (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant*, **46**:189-214

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006): Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**:803-814

Cohen Y, Nidermann T, Möisinger E, Fluhr R (1994): β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*, **104**:59-66

-
- Comapnt S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005): Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, **71**:4951-5959
- Crouch und van Staden (1993): Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regul*, **13**:21-29
- Cunnac S, Ochialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S (2004): Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol*, **53**:115-128
- Daayf F, Schmitt A, Belanger RR (1997): Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol*, **113**:719-727
- De Freitas JR, Germida JJ (1992) Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under field conditions. *Soil Biol Biochem*, **24**:1137-1146
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapilnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol* **28**:871-879
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999): Harpin induces resistance in *Arabidopsis* through systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J*, **20**:207-215
- Dong H und Beer SV (2000): Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* **90**:801-811
- Dong HP, Peng J, Bao Z, Meng X, Bonasera JM, Chen G, Beer SV, Dong H (2004) Downstream divergence of the ethylene signalling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. *Plant Physiol* **136**:3628-3638
- Dow M, Newman MA, von Roepenack E (2000): The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol*, **38**:241-261

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**: 10328-10333

Durrant WE und Dong X (2004): Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 185-209

Egamberdiyeva D, Höflich G (2003) Influence of growth promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biol Biochem* **35**:973-978

Ellis C, Turner JG (2001). The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* **13**:1025-1033

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

<http://www.fao.org>

Felix G und Boller T (2003): Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem*. **278**:6201-6208

Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, **18**:265-276

Fofana B, McNally DJ, Labbe C, Boulanger R, Benhamou N, Seguin A, Belanger RR (2002): Milasana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiol Mol Plant Pathol*, **61**:121-132

Glazebrook J (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**:205-227

Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**:629-643

Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2001) Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin-structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell* **13**:73-88

Gutterson N, Reuber TL (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **7**:465-471

Han SH, Anderson A, Yang KY, Cho BH, Kim KY, Lee MC, Kim, YH, Kim YC (2006): Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* 06. *Mol Plant Pathol*, **7**:463-472

Herms S, Seehaus K, Koehle H, Conrath U (2002): A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Physiol*, **130**:120-127

Hückelhoven R (2005) Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett*, **245**: 9-17

Iwata M (2001): Probenazole - A Plant defence activator. *The Royal Society of Chemistry, Pesticide Outlook*: 28-31

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000): Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, **19**:4004-4014

Kamoun et al (2003): Variation in structure and activity among elicitors from *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Pathol*, **4**:119-124

Kesarwani M, Yoo J, Dong X (2007): Genetic Interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **144**:336-346

Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980): Enhanced plant growth by siderophore product by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**:885-886

- Kogel KH, Ortel B, Jarosch B, Atzorn R, Schiffer R, Wasternack C (1995) Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eu. J Plant Pathol* **101**:319-332
- Kogel KH, Langen G (2005) Induced resistance and gene expression in cereals. *Cell Microbiol*, **7**:1555-1564
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C (2000). Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signalling pathways. *Plant Physiol* **123**:177-187
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004): The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in arabidopsis plants. *Plant Cell*, **16**: 3496-3507
- Lay und Anderson (2005) Defensins – Components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci* **6**:85-101
- Lee HK, Tewari JP, Turkington TK (2001): A PCR-based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. *Plant Dis*, 85:220-224
- Li J, Brader G, Palva ET (2004): The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, **16**:319-331
- Lin W, Okon Y, Hardy RWF (1983): Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol*, **45**:1775-1779
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **86**:1-25
- Mantelin S, Touraine B (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot*, **55**:27-34

Mei C, Qi M, Sheng G, Yang Y (2006) Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**:1127-1137

Menden B, Kohlhoff M, Moerschbacher BM (2006): Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive response. *Phytochemistry*, **68**:513-520

McLusky SR, Bennet MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW (1999): Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J*, **17**:523-534

Molina A, Hunt MD, Ryals JA (1998): Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *Plant Cell*, **10**:1903-1914

Molina A, Görlach J, Volrath S, Ryals J (1999) Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**:53-58

Mur LAJ, Naylor G, Warner SAJ, Sugars JM, White RF und Draper J (1996): Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J*, **9**:559-571

Mur LAJ, Tim LW, Prats E (2006): NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot*, **57**:489-505

Muthukrishnan S, Liang GH, Trick HN, Gill BS (2001) Pathogenesis related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **64**:93-114

Nakashita H, Yoshioka K, Yasuda M, Nitta T, Arais Y, Yoshida S, Yamaguchi I (2002): Probenazole induces acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiol Plant Pathol*, **61**:197-203

Nimchuk Z, Eulgem T, Holt III BF, Dangl JL (2003): Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet*, **37**:579-609

- Nürnberg T und Brunner F (2002): Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*, **5**:1-7
- Oerke EC und Dehne HW (1997): Global crop production and the efficacy of crop protection- current and future trends. *Eur J Plant Pathol*, **103**:203-215
- Osbourne A (1996): Saponins and plant defence- a soap story. *Trends Plant Sci*, **1**:4-9
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T (2001): Induced resistance in plants by chemicals. *Eur J Plant Pathol*, **107**:19-28
- Pandey A, Trivedi P, Kumar B, Palni LMS (2006): Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (BO) isolated from a sub-alpine location in the indian central himalaya. *Curr Microbiol*, **53**:102-107
- Papavizas GC (1964): Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of pea with aminobutyric acid and methylaspartic acid. *Plant Dis Rep* **48**: 537-541
- Persello-Cartieaux F, David, P, Sarrobert C, Thibaud MC, Achouak, Robaglia C, Nussaume L (2001) Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* **212**:190-198
- Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ*, **26**:189-199
- Pickering R, Ruge-Wehling B, Johnston PA, Schweizer G, Ackermann P, Wehling P (2006) The transfer of a gene conferring resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) from *Hordeum bulbosum* into *H. vulgare* chromosome 4HS. *Plant Breed* **125**:576-579
- Pieterse CMJ, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA und van Loon LC (1996): Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrolbacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**:1225-1237
- Pieterse CMJ und van Loon LC (2004): NPR1: the spider in the web of induced resistance signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **7**:456-464

Qiu D; Wei ZM, Bauer DW, Beer SV (1997) treatment of tomato seed with harpin enhances germination and growth and induces resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:80

Qiu D, Yiao J, Ding X, Yiong M, Cai M, Cao Y, Xianghua L, Xu C, Wang S (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate dependent signalling. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**: 492-499

Rachdawong S, Cramer CL, Grabau EA, Stromberg VK, Lacy GH, Stromberg EL (2002): *Gaeumannomyces graminis* vars. *avenae*, *graminis*, and *tritici* identified using PCR amplification of avenacinase-like genes. *Plant Dis*, **86**:652-660

Rodriguez H und Fraga R (1999): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*, **17**:319-339

Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JDG (1999): Rapid, Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell culture and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell*, **11**:273-287

Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and herbivores. *Annu Rev Phytopathol* **28**:425-449

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wie HX, Pare PW, Kloepper JW (2003): Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Nat Acad Sci USA*, **100**:4927-4932

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW und Pare P (2004): Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **134**:1017-1026

Ryu HS, Han M, Lee SK, Cho JI, Ryoo N, Sunggi H, Lee YH, Bhoo SH, Wang GL, Hahn TR, Jeon JS (2006) A comprehensive expression analysis of the QRKY gene subfamily in rice plants during defense response. *Plant Cell Rep* **25**: 836-847

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW (1996): Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Nat Acad Sci USA*, **93**:10614-10619

Schuhegger R, Ihrinh A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A und Langebartels C (2006): Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ*, **29**:909-918

Singh S und Kapoor KK (1999): Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in sandy soil. *Biol Fertil Soils*, **28**:139-144

Steehnoudt O, Vanderleyden J (2000): *Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, **24**:487-506

The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**:796-815

Thieron M, Pontzen R, Kurahashi Y (1998): Carpropamid: a rice fungicide with two modes of action. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **51**:257-278

Tubajika KM, Civerolo EL, Puterka GJ, Hashim JM, Luvisi DA (2006) The effects of kaolin, harpin and imidacloprid on development of pierces's disease in grape. *Crop Prot*, **26**:92-99

Thomma BPHJ, Eggermont K, Pennickx IAMA, Mauch Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**: 15107-15111

United States Patent 6858707

Van der Biezen EA und Jones JDG (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, **23**:454-456

Van der Ent S, Verhagen BWM, Van Doorn R, Bakker D, Verlaan MG, Pel MJC, Joosten RG, Proveniers MCG, van Loon LC, Ton J und Pieterse MJ (2008). MYB72 is required in early signalling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **146**:1293-304

Van Loon LV, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998): Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **36**:453-483

Van Loon LC und Van Strien EA (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, **55**:85-97

Van Peer R, Van Kuik AJ, Rattink H, Schippers B (1990): Control of fusarium wilt in carnation grown on rock wool by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r and by Fe-EDDHA. *Neth J Pl Path*, **96**:119-132

Van Peer R, Niemann GJ, Schippers B (1991): Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**:728-734

Van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I, van Loon LC, Pieterse CMJ (1999): rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol*, **41**:537-549

Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CMJ (2004): The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**:895-908

Von Rad U, Mueller MJ, Durner J (2005): Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytol*, **165**:191-202

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker, K Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Wettstein D, Franken P, Kogel KH (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **102**:13386-13391

Walters D, Cowley T, Mitchell A (2002) Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J Exp Bot* **53**:747:756

Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahi-Goy P, Metraux JP, Ryals JA (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**:1085-1084

Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2005): Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **5**:385-396

Wei G, Kloepper JW, Tuzun S (1991): Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81**:1508-1512

Wei ZM, Qiu D, Kropp MJ, Schading RI (1998) harpin an HR elicitor, activates both defense and growth systems in many commercially important crops. *Phytopathology* 88:96

Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992): Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**:85-88

Yang B, Shiping T, Jie Z, Yonghong G (2005) Harpin induces local and systemic resistance against *Trichothecium roseum* in harvested hami melons. *Postharvest Biol Technol*, **38**:183-187

Ylpani N, Silvermann P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I (1991): Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, **3**:809-818

Yoshioka K, Nakashita H, Klessig DF, Yamaguchi I (2001): Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J*, **25**:149-157

Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B (2000): Potentiation of pathogen-specific defense mechanism in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc Nat Acad Sci USA*, **97**:12920-12925

Zimmerli L, Metraux JP und Mauch-Mani B (2001): β -Aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, **126**:517-523

6 Anhang

6.1 Analyse der Genexpression in Gerste nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren und Proradix

Die Mikroarray Analyse wurde 4h, 1d und 4d nach Inokulation mit den Pflanzenaktivatoren bzw. 1d, 3d und 6d nach Inokulation mit Proradix durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung des hauseigenen Gerste-DNA-Mikroarrays erfolgte wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Alle Ergebnisse wurden im Logarithmus zur Basis 2 ($\lg_2(\sim)$) des Verhältnisses beider Fluoreszenzsignale angegeben. Jeder Wert besteht aus drei biologischen Wiederholungen, die jeweils im Dye-Swap analysiert wurden. Jeder EST ist zweifach auf dem Array vorhanden, so daß jeder Wert den Mittelwert aus zwölf ausgewerteten Spots darstellt. Für jeden EST ist der dazugehörige CV-Wert aufgeführt. Die ESTs sind nach ihrer Identifikationsnummer (id) alphabetisch angeordnet. Die Annotation wurde ohne weitere Bearbeitung aus dem Array übernommen.

Tabelle 1: Analyse der Genexpression nach Messenger-Behandlung

Tabelle 2: Analyse der Genexpression nach BioS-Behandlung

Tabelle 3: Analyse der Genexpression nach Neudovital-Behandlung

Tabelle 4: Analyse der Genexpression nach Proradix-Behandlung

Tabelle 1: Analyse der Genexpression nach Messenger-Behandlung

EST id	Homolog	4h	CV	1d	CV	4d	CV
HA02P15	GST	0.87	51.39	0.62	90.11	-0.14	115.92
HA12E09	CAD (ELI3-1) Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase	0.81	58.97	0.52	60.22	0.38	83.38
HC07O04	putative acid phosphatase (bci-3)	0.75	26.49	0.78	15.11	0.66	13.32
HC09G24	Allene oxide synthase AOS	0.86	40.92	0.56	38.59	0.50	13.87
HF01D02	put protease Inhibitor	0.97	89.55	1.32	78.89	0.48	86.09
HH07N08	putative acid phosphatase (bci-3)	0.71	37.20	0.79	26.06	0.61	25.00
HI01K19	AOS (JA-Synthese)	0.86	51.47	0.59	32.00	0.61	31.63
HO06E22	fruit bromelain	1.18	67.68	2.95	21.69	1.43	21.88
HO13E22	beta-glucanase	0.75	49.06	0.26	86.72	0.08	166.48
HO19D08	beta-glucanase	0.81	40.87	0.23	61.63	0.16	120.05
HO22B04	glucan endo-1-3-beta-glucosidase	0.76	30.15	0.40	70.50	0.25	85.98
HO28G17	hypothetical protein pBH6-12	-0.78	62.39	-0.41	74.97	-0.30	118.70
HO31J12	putative 33 kDa secretory protein	0.57	74.33	0.16	88.35	-0.19	188.08
HR01A06	olfactory receptor pla34	0.69	24.77	0.49	33.62	1.04	18.21
HU13K17	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase precursor	0.20	152.37	0.77	44.12	1.13	39.40
HV01B17	At-ELI 14	0.71	60.04	0.23	100.42	-0.23	50.69
HV02B09	lipoxygenase 2	0.42	93.84	0.89	36.23	1.55	27.90
HW01P13	putative acid phosphatase	0.76	37.65	0.83	21.91	0.66	37.87
HW02C21	putative calcium-dependent protein kinase	0.58	28.65	0.28	37.54	0.70	40.28
HW02I10	apyrase	0.67	26.51	0.53	28.19	1.09	21.43
HW05L06	apyrase	0.65	30.83	0.46	54.36	0.96	23.31
HW06K13	putative annexin	0.60	52.81	0.82	42.75	0.29	94.42
HW08E14	putative acid phosphatase	0.73	47.20	0.75	32.66	0.61	49.09
HX10I11	putative acid phosphatase (bci-3)	0.72	29.90	0.79	15.69	0.67	23.61
HY01C17	Allene oxide synthase AOS	0.92	43.78	0.58	37.94	0.65	56.41
HY01E11	Allene oxide synthase AOS	0.94	44.21	0.60	55.80	0.58	54.76

Tabelle 2: Analyse der Genexpression nach BioS-Behandlung

EST id	Homolog	4h	CV	1d	CV	4d	CV
2H11	Peptidylprolyl cis-trans Isomerase	0.84	30.06	0.34	117.16	0.01	2001.19
HC02C18	thionin	0.05	870.84	1.47	34.52	0.53	91.71
HC05B07	thionin precursor	0.08	725.31	1.17	32.40	0.74	90.83
HC06A19	putative heavy-metal-associated protein	-0.05	454.47	0.73	44.61	0.08	239.17
HC09A11	thionin precursor	0.04	1523.14	1.59	34.57	0.81	90.00
HC09G24	Allene oxide synthase AOS	0.55	103.54	0.80	47.62	-0.16	83.70
HC12H17	thionin precursor	0.04	1352.32	1.48	38.81	0.83	86.17
HC14K12	thionin	0.06	840.68	1.64	40.03	0.83	84.52
HC15P18	Peroxidase	0.96	16.64	0.39	65.05	0.54	46.20
HD03A19	putative proteinase inhibitor-related protein	-0.05	661.06	0.96	50.30	0.13	167.97
HF01D02	put protease Inhibitor	1.18	136.46	0.87	75.83	-0.41	117.84
HI08K09	BTH-induced ERF transcriptional factor 4	0.71	18.99	0.14	127.73	-0.04	621.14
HI08L23	cytochrome P450	0.72	16.25	0.12	168.75	0.01	2334.10
HM14O16	xyloglucan endotransglycosylase	-0.71	60.16	-0.11	158.18	-0.02	1607.68
HO05D18	early drought induced protein	0.83	50.12	0.41	84.47	-0.07	206.44
HO09N17	putative hydroxycinnamoyl transferase	0.85	39.52	0.07	223.83	-0.05	36.55
HO10C02	put leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	1.01	32.42	0.17	33.65	0.35	42.10
HO13E22	beta-glucanase	0.76	37.11	0.65	25.22	0.24	75.51
HO18N18	iron/ascorbate-dependent oxidoreductase	0.93	36.42	0.65	64.44	0.67	49.71
HO19B15	GST	0.67	38.91	0.26	56.87	0.46	81.53
HO19D08	beta-glucanase	0.72	37.88	0.67	29.87	0.23	93.33
HO26H04	Peroxidase	0.93	33.82	1.38	42.84	0.81	31.44
HO29C01	putative peroxidase	1.28	22.96	1.48	49.84	0.83	19.43
HO29D06	Peroxidase	0.76	29.61	1.09	39.43	0.67	44.45
HO29P06	Thionin BTH7 precursor	0.05	998.17	1.46	29.24	0.75	92.17
HO31J12	putative 33 kDa secretory protein	1.54	16.55	1.71	26.40	1.07	18.07
HO36H17	Peroxidase	0.99	7.10	0.45	33.52	0.50	36.82
HP02G14	putative monosaccharide transport protein	1.57	37.87	0.98	41.19	0.52	58.64
HR01H03	PR3 AIII	0.11	219.36	0.76	42.36	0.08	189.89
HU03J11	Thi 21	-0.03	1496.00	1.56	42.82	0.76	103.01
HV02E13	PRXCB	0.89	57.40	1.23	80.98	0.61	/
HV04I15	Thi 21	0.03	1439.30	1.40	44.75	0.53	152.07
HV08G06	thionin	0.09	449.37	1.33	49.15	0.45	185.56
HV12F02	leaf-specific thionin	0.00	16932.97	1.27	45.18	0.68	113.10
HX07B20	nucleoid DNA-binding - like protein	-0.83	75.28	-0.23	220.24	0.20	312.13
HY05N04	WRKY transcription factor	0.80	42.65	0.34	121.23	0.23	44.27
HY08F02	sucrose transporter 1	0.08	282.23	0.28	118.27	-0.22	97.88

Tabelle 3: Analyse der Genexpression nach Neudovital-Behandlung

EST id	Homolog	4h	CV	1d	CV	4d	CV
2H1	Alanin-Aminotransferase	1.37	32.94	0.13	183.52	-0.01	2206.46
HA02P15	GST	0.74	36.91	0.16	171.14	-0.07	170.86
HA05D15	COMT Caffeic acid o-methyltransferase	0.54	65.91	0.42	54.98	0.30	116.17
HA08I01	A PR4	0.73	19.23	0.48	57.40	0.07	189.29
HA08P15	no hit	1.50	52.03	0.49	94.29	-0.15	219.53
HA09B21	COMT Caffeic acid o-methyltransferase	0.75	65.52	0.69	82.61	-0.08	523.71
HA11B05	CCMT Cytochrome c	0.99	20.40	0.26	71.48	0.02	1145.66
HA11J04	GPX1	1.28	17.30	0.47	70.27	-0.05	111.11
HA12E09	CAD (ELI3-1) Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase	0.94	61.67	-0.19	365.25	-0.02	1109.31
HA21L06	putative choline kinase	0.82	20.92	0.15	126.39	-0.03	341.42
HC02C18	thionin	0.51	47.17	1.21	76.96	0.83	43.16
HC06A19	putative heavy-metal-associated protein	0.66	36.09	1.08	57.88	-0.09	179.93
HC08K11	allene oxide cyclase (aoc gene)	1.55	34.51	0.01	3061.96	0.03	372.48
HC09A11	thionin precursor	0.54	57.25	0.98	83.10	0.96	36.75
HC09G24	Allene oxide synthase AOS	1.39	11.60	0.78	49.19	0.26	46.63
HC09N10	cytochrome P450 [1.16	20.88	0.07	327.26	-0.01	2187.84
HC12H17	thionin precursor	0.59	47.85	0.81	96.30	1.03	38.41
HC14F24	putative peroxidase	-0.76	18.64	0.26	113.95	-0.07	317.44
HC14K12	thionin	0.60	45.73	1.25	78.51	0.99	38.34
HC15E11	omega-3 fatty acid desaturase/bci-8	0.83	16.36	-0.17	122.25	-0.02	456.27
HC15J04	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	1.26	11.58	0.29	34.52	-0.09	190.68
HC15P18	Peroxidase	0.78	9.53	0.68	17.59	0.15	81.38
HD01K05	CYP71B6	0.90	32.78	0.04	639.54	-0.07	213.53
HD03A19	putative proteinase inhibitor-related protein	0.87	36.39	1.44	47.20	-0.11	246.78
HD03F06	CYP71B6	1.31	38.75	0.01	1646.27	-0.02	523.28
HD03L05	TSB Tryptophan-Synthase	0.82	21.58	-0.13	74.20	-0.07	86.66
HD05D09	cytochrome P450	2.32	20.43	-0.16	200.57	-0.05	327.82
HF01D02	put protease Inhibitor	1.66	21.67	0.89	58.12	-0.02	567.55
HF06B06	allene oxide cyclase	1.13	38.38	0.03	1029.00	-0.05	422.78
HF09I04	omega-3 fatty acid desaturase	-0.70	22.95	-0.12	165.93	-0.09	127.20
HF24A05	putative NADH dehydrogenase	0.80	63.40	-0.33	78.63	-0.05	409.97
HH04L04	caffeic acid O-methyltransferase	-0.09	127.54	0.95	47.40	0.11	140.17
HH04L19	putative proteinase inhibitor (bci-7)	1.23	60.97	0.59	53.26	0.01	1180.68
HI01K19	AOS (JA-Synthase)	1.39	6.71	0.46	50.70	0.12	76.08
HI04A03	HIN1	0.96	38.60	0.14	181.54	0.07	139.40
HI12A05	putative lectin-like receptor kinase	1.01	21.34	0.21	147.82	-0.02	1310.20
HM02L09	PAL 123	1.54	21.80	0.12	118.73	0.05	294.09
HM10C02	Catalase 2 (CAT2)	0.72	46.99	0.15	180.39	-0.04	319.52
HO05D18	early drought induced protein	1.55	11.41	0.48	102.11	0.08	145.14
HO06F12	put chorismate synthase	0.93	43.65	0.01	4757.39	-0.01	1722.96

Fortsetzung Tabelle 3: Analyse der Genexpression nach Neudovital-Behandlung

EST id	Homolog	4h	CV	1d	CV	4d	CV
HO06N11	chitinase II (pathogenesis-related protein 3) (cht2 gene)	1.18	33.55	0.86	27.25	-0.13	165.82
HO09N17	putative hydroxycinnamoyl transferase	1.01	30.00	0.02	168.35	0.00	3270.65
HO10C02	put leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0.76	43.11	0.25	43.75	0.04	212.29
HO13E22	beta-glucanase	0.63	27.99	0.73	52.51	0.08	150.04
HO16H11	PR3/chitinase 2a	1.10	34.67	1.11	16.10	-0.12	142.85
HO18N18	iron/ascorbate-dependent oxidoreductase	1.74	16.23	0.71	75.46	-0.04	127.72
HO19D08	beta-glucanase	0.69	34.39	0.85	40.36	0.09	127.82
HO24C13	putative CPRD2	0.80	59.92	0.06	157.35	-0.06	197.23
HO25K15	cinnamyl alcohol dehydrogenase 1a	0.96	43.63	0.26	75.80	-0.02	636.60
HO26H04	Peroxidase	2.04	29.15	1.91	46.37	0.61	35.73
HO29C01	putative peroxidase	1.90	23.83	1.61	41.29	0.11	111.37
HO29D06	Peroxidase	1.74	34.78	1.51	53.85	0.46	36.86
HO29P06	Thionin BTH7 precursor	0.56	57.41	0.90	90.51	0.93	42.63
HO31J12	putative 33 kDa secretory protein	1.73	14.35	1.84	26.26	0.54	47.13
HO33P17	putative cytochrome P450 monooxygenase (exon 4)	0.97	72.83	0.08	231.35	0.02	1079.82
HO36H17	Peroxidase	0.97	29.39	0.80	31.44	0.22	56.08
HO37O08	putative NADH dehydrogenase	1.74	42.17	-0.17	151.13	-0.03	213.20
HO38C23	pathogenesis-related protein 4	1.00	59.81	0.95	37.86	0.05	424.40
HO38K04	somatic embryogenesis receptor-like kinase 2	0.41	153.42	1.01	60.10	0.08	100.81
HP02G14	putative monosaccharide transport protein	1.80	19.27	1.35	25.11	0.29	24.43
HP05D11	mitochondrial uncoupling protein 4	1.29	81.99	-0.35	36.62	-0.04	576.33
HP07J01	chitinase	1.24	38.67	1.03	20.08	-0.13	160.98
HP09D10	PAL phenylalanine ammonia-lyase	1.04	15.02	0.03	1402.72	-0.06	412.40
HR01A16	hypothetical protein ei2	0.98	79.87	0.15	229.37	0.10	189.75
HS01J15	GST1 Glutathion-S-Transferase	0.66	89.36	0.25	200.70	0.56	125.26
HS08D16	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like	1.57	56.12	-0.25	380.86	-0.04	453.08
HT01K05	thaumatin-like protein TLP4	0.71	57.03	0.57	44.36	-0.09	172.63
HT02K21	GST1	1.66	57.10	-0.18	338.60	0.16	273.92
HT04J16	thaumatin-like protein TLP8	0.89	80.21	0.46	84.48	0.11	225.11
HT07M09	putative protein phosphatase 2C	0.86	62.88	-0.11	160.29	-0.06	251.84
HT09H17	putative latex protein allergen	0.75	59.83	0.08	307.34	-0.01	1734.27
HT10G01	putative senescence-associated protein 5	0.76	42.06	0.60	33.55	0.26	74.32
HT11H11	cytochrome P450 CYP709C1	3.08	56.60	-0.13	571.77	-0.04	864.30
HT11I12	putative MtN19	2.05	38.50	0.12	205.59	0.12	114.60
HT11M20	putative MtN19	1.91	36.70	0.01	2459.02	-0.02	442.10
HT14C16	beta-glucosidase	1.29	34.26	0.02	1429.09	0.09	266.17
HU02E18	CAT1	-0.02	770.55	0.71	23.52	0.28	58.87
HU03G16	LOX 1 Lipoxygenase	2.72	52.88	0.10	914.71	0.27	/
HU03J11	Thi 21	0.64	51.11	1.26	68.02	0.98	42.03
HU03P04	auxin-induced protein-like	0.74	90.33	-0.15	431.23	0.09	203.48
HU04C19	chorismate synthase	1.37	57.08	-0.03	913.74	-0.11	175.19

Fortsetzung Tabelle 3: Analyse der Genexpression nach Neudovital-Behandlung

EST id	Homolog	4h	CV	1d	CV	4d	CV
HU04L02	MRP-like ABC transporter	0.36	60.70	0.86	47.52	0.47	58.40
HU07D12	dehydrin 4	1.28	31.69	0.06	1748.84	0.06	592.94
HV01B17	At-ELI 14	0.76	24.44	0.09	288.92	-0.21	148.82
HV01P03	CYP 83 B1	0.51	42.13	0.87	62.91	0.57	52.17
HV02E13	PRXCB	1.92	31.84	1.34	53.39	0.52	36.76
HV02F12	CYP 83 B1	1.52	24.77	-0.06	476.79	-0.06	440.88
HV02J21	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	1.19	42.60	0.11	252.90	-0.10	118.72
HV02P22	PIN1	0.90	48.53	0.71	43.13	0.40	66.16
HV03J23	LOX 1 Lipoxygenase	2.38	26.60	0.18	212.50	-0.02	1126.30
HV04I15	Thi 21	0.64	44.44	1.14	72.73	1.10	40.87
HV08G06	thionin	0.68	53.78	1.15	68.03	0.88	53.46
HV08O12	lichenase	-0.70	22.70	-0.01	10580.86	0.24	103.09
HV09A23	lichenase	-0.71	37.49	-0.04	1357.41	0.25	104.62
HV12F02	leaf-specific thionin	0.65	56.69	1.13	68.80	0.84	50.39
HW01F14	DHPS2	0.74	27.04	-0.05	401.29	-0.10	207.56
HW01K08	glutathione-S-transferase 2	1.66	80.96	-0.16	225.47	0.09	379.18
HW03A22	peroxidase	1.62	30.65	0.60	104.14	0.41	67.01
HW04D19	cytochrome P450	1.22	23.51	-0.07	53.50	0.02	1292.59
HW04I04	OPR1	0.80	37.97	-0.01	1721.78	0.05	235.85
HW06E21	mitochondrial substrate carrier family protein	0.81	35.02	-0.06	968.01	0.04	694.08
HW06M24	Lipoxygenase 1	1.57	31.31	-0.14	455.91	0.43	138.18
HW07F11	PAL phenylalanine ammonia-lyase	1.13	21.83	0.05	674.76	-0.05	578.60
HW08D02	PAL phenylalanine ammonia-lyase	1.19	19.09	0.07	546.77	-0.05	549.12
HW08D06	ABA-responsive protein-like	0.73	65.33	-0.08	621.24	-0.05	/
HW09M16	Oxalatoxidase	0.86	33.99	0.74	22.28	-0.11	136.36
HX02D24	WAK1 wall associated protein kinase	0.89	86.43	-0.72	24.79	-0.05	367.09
HX08A04	putative proteinase inhibitor (bci-7)	1.46	87.77	-0.02	1793.41	0.02	731.54
HX08G24	Dof zinc finger protein	-0.70	40.59	-0.07	755.13	-0.06	356.58
HX12M10	WRKY transcription factor	1.45	75.93	0.29	215.15	0.46	225.09
HX14M06	defensin	0.92	58.58	-0.28	193.76	-0.08	201.39
HY01C17	Allene oxide synthase AOS	1.52	15.99	0.49	35.42	0.26	102.77
HY01E11	Allene oxide synthase AOS	1.54	13.16	0.48	44.40	0.19	155.29
HY04L18	lipoxygenase 2	1.42	16.56	0.06	634.11	-0.15	83.12
HY06K15	hydroxymethyltransferase	0.94	17.85	-0.01	2260.86	-0.19	168.39
HY07F20	lipoxygenase 2	1.42	11.08	0.28	86.38	-0.02	970.52
HY08M03	putative indole-3-glycerol phosphate synthase	0.99	8.81	-0.01	2794.44	0.09	239.80
HZ38L17	putative 12-oxophytodienoate reductase	1.47	54.95	-0.18	176.36	0.14	157.86
HZ39A14	chorismate synthase	1.07	57.13	-0.17	47.22	-0.05	255.64
HZ39O24	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1	0.88	28.34	0.04	507.81	-0.11	188.73
HZ59C11	prephenate dehydratase	1.24	38.78	0.04	923.19	-0.04	532.62
HZ65E12	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like	1.36	79.48	-0.52	29.90	-0.08	90.31

Tabelle 4: Analyse der Genexpression nach Proradix-Behandlung

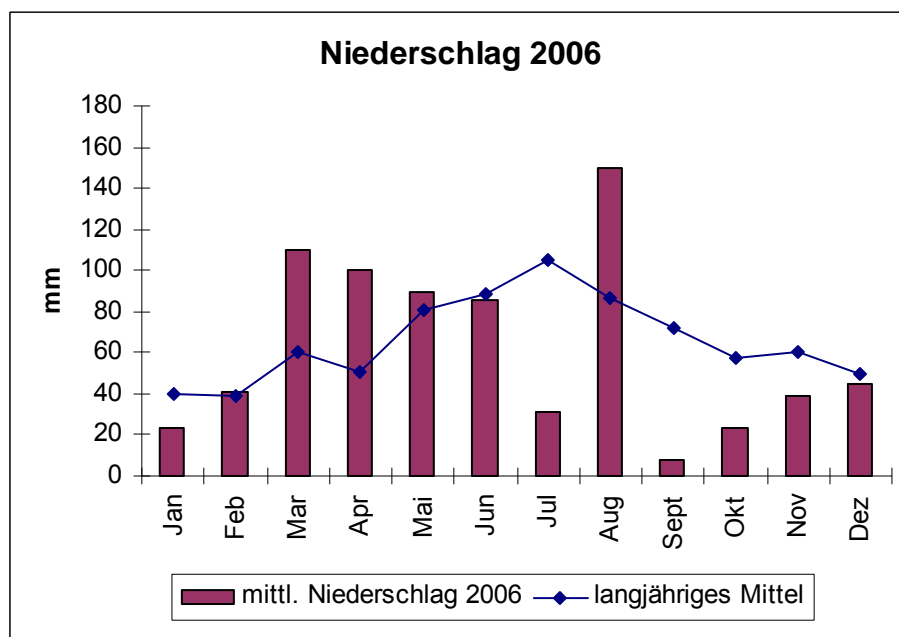
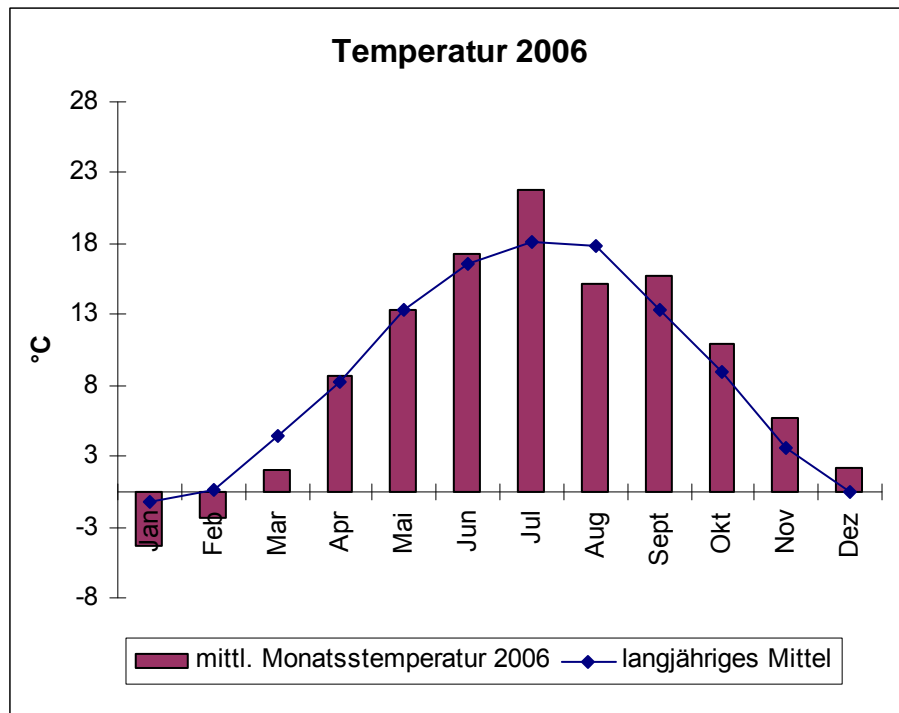
EST id	Homolog	1d	CV	3d	CV	6d	CV
HA01B19	GA 3-oxidase 1	-0.75	40.16	-0.99	14.85	-1.42	1.45
HA04J10	23kDa oxygen evolving protein of photosystem II	-0.76	39.64	-1.12	9.15	-1.05	5.00
HA04O12	PIN2	0.29	130.83	0.10	444.42	1.05	20.24
HA06C03	putative photosystem II subunit (22kDa) precursor	-0.62	43.66	-0.89	8.06	-1.05	0.37
HA06N18	Glutaredoxin	-0.13	153.63	-0.84	1.78	-1.00	18.95
HA08I01	A PR4	0.57	22.83	0.64	42.84	1.07	70.31
HA10B13	FNR1	-0.79	4.19	-0.87	10.08	-1.17	3.25
HA11J04	GPX1	0.61	21.26	1.04	21.68	0.99	5.37
HA20G08	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	0.09	232.09	0.36	37.18	1.16	41.30
HA22B08	putative NADP-dependent oxidoreductase	0.68	20.10	0.24	263.57	0.91	46.93
HB14L17	sucrose synthase 2	-0.16	181.95	-0.94	38.50	-0.94	26.61
HB25K03	photosystem II chlorophyll a-binding protein psbC precursor	-0.44	27.30	-0.72	42.32	-0.45	103.73
HC05G18	indeterminate spikelet 1	0.34	63.50	0.58	86.22	0.91	34.16
HC08K11	allene oxide cyclase (aoc gene)	0.12	153.59	0.60	39.41	0.95	14.70
HC11H04	class I low-molecular-weight heat shock protein 179	0.56	31.80	0.78	37.02	0.76	86.91
HC15P18	Peroxidase	0.64	12.22	1.46	14.68	1.44	14.77
HD01A05	GLP1	0.05	4.65	0.67	56.66	0.83	22.44
HD01P22	PIN1	1.51	6.08	2.33	22.41	2.33	33.57
HD02H13	APX1	0.58	8.21	0.16	148.25	0.83	38.60
HD03A19	putative proteinase inhibitor-related protein	0.40	13.27	1.07	51.20	1.92	4.67
HD03E20	PIN1	0.90	26.31	1.43	46.02	1.49	40.84
HD04K03	thaumatin-like protein TLP6 PR5	0.40	25.72	1.05	34.99	2.16	11.96
HD08O14	ChaC-like family protein/cation transporter	-0.64	6.81	-1.07	22.72	-1.02	17.61
HD11K04	Alpha-amylase type B isozyme precursor	0.56	42.16	1.17	22.75	1.58	1.68
HD14O01	thioredoxin peroxidase	-0.71	7.15	-0.77	81.21	-1.27	12.33
HF01D02	put protease Inhibitor	0.86	31.07	1.47	26.46	1.40	13.81
HH04F21	Catalase 1 (CAT1)	1.40	4.66	1.01	53.49	1.85	1.17
HH04L19	putative proteinase inhibitor (bci-7)	0.90	2.60	0.65	23.12	1.22	76.91
HH05O04	RUBISCO SUBUNIT BINDING-PROTEIN BETA SUBUNIT	-0.80	10.13	-0.59	77.36	-0.82	10.13
HI01A12	CBF3-like protein BCBF3	-0.44	13.44	-0.94	53.78	-0.41	120.06
HI01C17	Cab 1	-0.94	22.95	-1.27	7.86	-0.92	8.43
HI04K13	putative Potential phospholipid-transporting ATPase 8	-0.77	20.26	-1.18	12.11	-0.85	3.86
HI12A10	Nt-gh3 deduced protein- auxin responsive	-0.01	473.76	0.15	447.76	0.82	2.77
HK06G07	non specific lipid transfer protein	0.26	90.07	0.60	26.37	0.79	52.01
HO09K04	cytochrome P450 monooxygenase CYP72A16-like protein	-0.64	35.87	-0.83	14.32	-0.91	20.05
HO28P01	putative RNA-binding protein	-0.87	1.63	-0.35	257.44	-0.93	6.41
HO29I20	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	-0.72	13.83	-0.59	8.70	-0.81	27.20
HO31F02	putative thiol protease	-1.23	15.25	-1.37	6.62	-0.95	108.35
HO31J12	putative 33 kDa secretory protein	1.12	14.22	0.46	49.50	0.06	347.23
HO38C23	pathogenesis-related protein 4	1.15	1.41	1.46	26.31	2.39	13.27
HP01J03	PLC2 Phospho lipase C1	-0.81	6.74	-0.79	12.66	-0.99	15.55
HP02A05	chitinase 2	-0.80	8.47	-1.07	43.64	-1.26	13.87
HP02H02	type III LHCII CAB precursor protein	-0.90	38.43	-1.19	11.65	-1.27	30.94

Fortsetzung Tabelle 4: Analyse der Genexpression nach Proradix-Behandlung

EST id	Homolog	1d	CV	3d	CV	6d	CV
HP05A20	cytosolic acetyl-CoA carboxylase	-0.09	45.47	0.90	29.60	1.58	42.83
HP05E15	putative chloroplast inner envelope protein	-1.73	45.37	-0.44	121.26	-0.87	15.40
HP09D10	PAL phenylalanine ammonia-lyase	0.30	5.93	0.60	4.99	1.12	33.63
HP10M10	nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	-0.84	21.56	-1.07	20.14	-1.14	13.43
HS01F01	pyruvate decarboxylase	0.17	73.19	0.83	35.27	0.91	30.62
HS03H24	PAL Phenylalanin-Ammonia-Lyase	0.25	66.28	0.67	35.97	1.03	9.54
HS05L09	zinc-finger protein C60910-like	0.50	8.24	0.83	68.61	0.83	13.86
HT01E20	beta-glucosidase	-0.02	194.71	0.14	7.37	0.72	55.19
HT08K15	MYB transcription factor	0.80	17.19	0.87	41.22	1.19	33.97
HT10H12	alternative oxidase	0.20	88.87	0.18	29.08	0.72	59.63
HT11I12	putative MtN19	0.48	0.66	0.64	48.94	1.48	71.91
HU02G01	PLD	1.21	13.35	1.13	62.38	1.69	34.73
HU03D01	GST	-0.20	110.83	0.71	95.70	0.46	140.80
HU03G06	sucrose synthase type I	0.46	44.21	0.88	29.70	1.19	44.97
HU13O10	putative ATP synthase delta chain	0.46	61.74	0.33	97.21	0.90	31.57
HV02E13	PRXCB	0.49	25.13	0.63	42.34	1.04	34.79
HV03I17	RaR 047 Flavonol-Sulpho-Transferase	0.60	11.81	0.73	70.35	1.05	46.00
HV03J23	LOX 1 Lipoxygenase	-0.03	777.82	0.80	129.56	1.72	20.61
HV04B05	thaumatin-like protein TLP2	0.77	37.73	0.93	35.52	1.34	1.30
HV04J09	ERF3 Ethylen responsive factor 3	1.09	15.10	1.09	37.27	1.68	25.66
HV08L06	type-1 pathogenesis-related protein	-0.25	14.06	0.72	31.39	1.22	13.92
HW03D06	PRXCB	0.52	41.63	0.79	105.35	0.97	36.40
HW04D19	cytochrome P450	0.50	14.45	0.86	43.06	1.03	73.67
HW04H20	GST1 Glutathion-S-Transferase	0.44	56.26	0.79	85.64	1.25	41.45
HW06G07	PAL phenylalanine ammonia-lyase	0.17	46.73	0.69	77.07	0.98	62.12
HW06M24	Lipoxygenase 1	0.25	15.94	-0.16	818.99	1.50	51.27
HW07D04	Alcohol dehydrogenase 1	0.50	24.06	2.34	36.44	1.94	14.27
HW07F11	PAL phenylalanine ammonia-lyase	0.51	7.41	0.73	58.69	1.35	56.78
HW07H16	PRXCB	1.10	2.38	1.13	10.47	1.95	38.43
HW07I12	4CL 4-coumarate co-enzymeA-Ligase	-0.02	20.20	-0.83	79.67	1.34	131.61
HW09M16	Oxalatoxidase	3.62	7.53	3.63	17.42	4.46	16.02
HX05N06	translation elongation factor EF-G	-0.71	19.20	-0.49	96.64	-1.01	24.68
HX06A19	superoxide dismutase-4AP	0.41	23.79	0.66	96.14	0.95	36.43
HX12J19	putative peroxidase	0.37	45.09	0.66	22.89	0.73	43.89
HX14M06	defensin	0.69	12.49	0.88	82.83	1.39	40.48
HY01C12	putative fructose-bisphosphate aldolase	0.11	156.80	0.56	26.01	0.79	67.15
HY01C15	glutathione transferase	0.32	36.62	0.85	3.17	1.26	36.93
HY01G01	adenosine 5-phosphosulfate reductase 2	-0.78	20.37	-0.26	68.50	0.55	166.52
HY03N04	similar to IAA12 protein	0.05	68.34	0.39	141.06	1.05	90.56
HY04L18	lipoxygenase 2	0.24	13.25	0.98	60.69	0.94	53.67
HY06E01	adenosine 5-phosphosulfate reductase 1	-1.06	9.18	0.10	877.36	0.41	107.59
HY07F20	lipoxygenase 2	0.27	10.82	0.59	30.98	0.88	62.39
HY07M08	PRXCB	0.54	3.47	0.98	52.31	0.88	41.86
HY08P04	endo-beta-glucanase Cel1	-0.32	10.26	-0.74	35.81	-0.37	55.42
HY09O11	putative late embryogenesis abundant protein	0.76	7.64	0.27	91.28	1.54	76.21
HY10H08	peroxidase BP-2A precursor	0.46	46.78	0.77	64.16	1.08	42.61
HZ46K11	photosystem II subunit PsbS precursor	-0.81	2.02	-1.17	45.37	-1.43	1.63

6.2 Wetterdaten Scheyern 2006

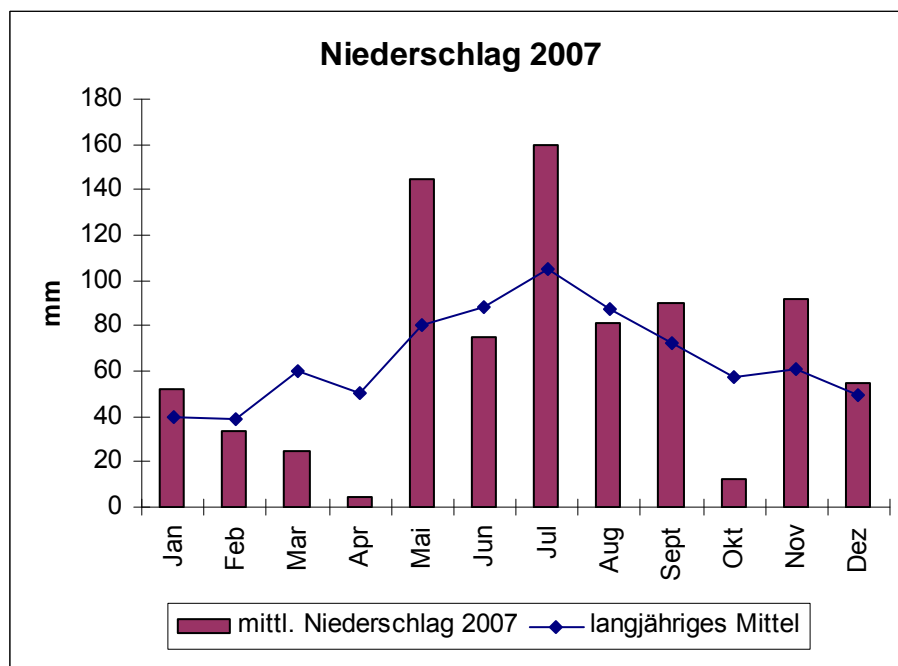
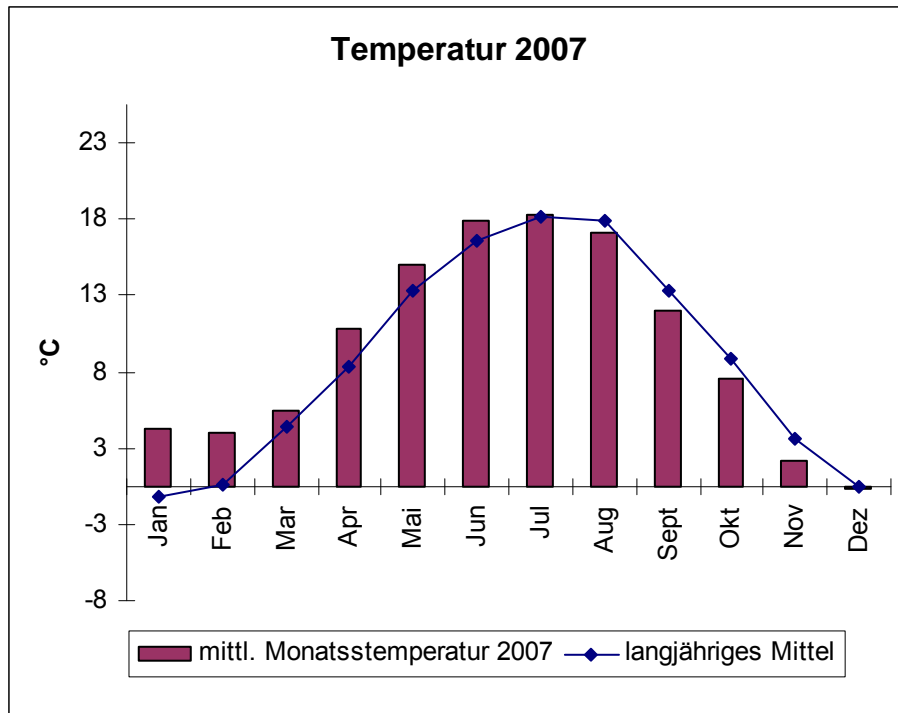
Die Wetterdaten sind der Homepage des Versuchsguts Scheyern entnommen:
<http://www.helmholtz-muenchen.de/neu/scheyern/wetter1.php>



6.3 Wetterdaten Scheyern 2007

Wetterdaten sind der Homepage des Versuchsguts Scheyern entnommen:

<http://www.helmholtz-muenchen.de/neu/scheyern/wetter1.php>



6.4 Schlagkarteien 2006

Die Schlagkarteien wurden den Aufzeichnungen des Versuchsguts Scheyern entnommen.

Schlag A01		2005/2006		Bodenart	Bodenzahl	
Ökolog. Landbau				SL 4D	44	
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste	Barke	Weizen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
24.4.06	Sog	Z-Saatg.	420			13.0
						3
Bodenbearbeitung/Saat				Bedingungen	Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen			tiefe cm	
30.11.05	1	Pflug		trocken	23	
24.4.06	1	Kreiselegge		trocken	5	
Düngung						
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
23.5.06		Striegel			1	
3.6.06		Striegel			1	
7.6.06		Messenger Behandlung				
21.6.06		Distel schneiden				
25.6.06		Distel schneiden				
Ernte						
Datum	Erntegut	% H20	dt /ha	Bemerkung		
27.7.06	Korn					

Schlag A 26		2005/2006		Bodenart	Bodenzahl	
Ökolog. Landbau				sL 4D	52	
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste	Barke	Weizen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
24.4.06	Sog	Z-Saatg.	420			13.0
						3
Bodenbearbeitung/Saat					Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen	Bedingungen	tiefe	cm	
1.11.05	1	Pflug	trocken	23		
24.4.06	1	Kreiselegge	trocken	5		
Düngung						
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
23.5.06		Striegel			tiefe cm	
3.6.06		Striegel			1	
7.6.06		Messenger Behandlung			1	
21.6.06		Distel schneiden				
25.6.06		Distel schneiden				
Ernte						
Datum	Erntegut	% H20	dt /ha	Bemerkung		
27.7.06	Korn					

Schlag A19/21 2005/2006			Bodenart	Bodenzahl		
Integr. Landbau			L 4D	53		
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste	Barke	Weizen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
24.4.06	Sog	Z-Saatg.	420			13.0
						3
Bodenbearbeitung/Saat						Arbeits-
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen		Bedingungen	tiefe cm	
20.10.05	1	Grubber		trocken	15	
24.4.06	1	Kreiselegge		trocken	5	
Düngung						
Datum	BBCH	Dünger		Aufwand	Bemerkung	kg N/ha
15.5.06	24	Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)		167 l/ha		50
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						Arbeits-
Datum	BBCH	Maßnahme		Aufwand	Bemerkung	tiefe cm
25.5.06	25	Herbizid: Plattform S		0,9 l/ha		
		+ Gropper		10 g/ha		
17.6.06		Insektizid: Bulldog		300 ml/ha		
7.6.06		Messenger Behandlung				
Ernte						
Datum	Erntegut		% H2O	dt/ha	Bemerkung	
8.8.06	Korn					

Schlag A 31 2005/2006		Bodenart	Bodenzahl				
Ökolog. Landbau		L 3D	67				
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:				
Kartoffeln	Nicola	Luzerne- Kleegras	Versuch				
			Anbauverfahren: Pflanzung				
Saat-/Pflanzgut		Kno	TKG	Reihenabst.	Saattiefe		
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm	cm
8.5.06	Kart	Z-Saatg.			3600	75.0	
Bodenbearbeitung/Saat					Arbeits- tiefe cm		
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen	Bedingungen				
16.10.05	1	Pflug	trocken		25		
7.5.06	1	Kreiselegge	trocken		10		
Düngung							
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha		
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen					Arbeits- tiefe cm		
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung			
25.5.06		häufeln		trocken	8		
6.6.06		Dammfräse		trocken	10		
16.6.06		häufeln		trocken	8		
7.6.06		Messenger Behandlung					
21.6.06		Messenger Behandlung					
4.7.06		BT Extrakt gegen Kart-Käfer:					
		Novodor	5,0 l/ha				
		Fungizid: Cuprozin	1,0 l/ha				
15.7.06		Fungizid: Cuprozin	1,3 l/ha				
24.7.06		Fungizid: Cuprozin	1,2 l/ha				
9.8.06		Fungizid: Cuprozin	1,0 l/ha				
24.8.06		Fungizid: Cuprozin	1,0 l/ha				
Ernte							
Datum	Erntegut	% H2O	dt/ha	Bemerkung			
9.10.06	Kartoffeln						

Schlag A 21		2005/2006		Bodenart	Bodenzahl		
Integr. Landbau				L 3D	67		
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:			
Kartoffeln	Nicola	Winterweizen	Versuch	Pflanzung			
Saat-/Pflanzgut			Kno	TKG	Reihenabst. Saattiefe		
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm	cm
8.5.06	Kart	Z-Pflanzg.			3600	75.0	
Bodenbearbeitung/Saat					Arbeits-		
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen		Bedingungen	tiefe cm		
29.11.05	1	Pflug		trocken	25		
7.5.06	1	Kreiselegge		trocken	10		
16.6.06	1	Dammfräse		trocken	10		
Düngung							
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha		
15.5.06		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)	374 l/ha		100		
3.7.06		Harnstoff (Blattdüng.)	13 kg/ha		6		
10.7.06		Microtop (S, Mg, Mn, B) (Blattdüng.)	20 kg/ha		-		
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen							
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-		
26.5.06		Herbizid:			tiefe cm		
		Boxer	4,5 l/ha				
		Sencor	0,6 l/ha				
28.6.06		Fungizid: Ridomil	2 kg/ha				
		Insektizid: Sumicidin Alpha	100 ml/ha				
7.6.06		Messenger Behandlung					
21.6.06		Messenger Behandlung					
3.7.06		Insektizid: Dantop	150 g/ha				
10.7.06		Fungizid: Ranman	0,20 kg/ha				
27.7.06		Fungizid: Ranman	0,20 kg/ha				
8.7.06		Fungizid: Curzate	2,5 kg/ha				
23.8.06		Fungizid: Shirlan	0,4 l/ha				
Ernte							
Datum	Erntegut	% H2O	dt/ha	Bemerkung			
10.10.06	Kartoffeln						

6.5 Schlagkarteien 2007

Die Schlagkarteien wurden den Aufzeichnungen des Versuchsguts Scheyern entnommen.

Schlag A01		2006/2007		Bodenart	Bodenzahl	
Ökolog. Landbau				SL 4D	44	
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste	Barke	Sonnenblumen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
5.4.07	Sog	Z-Saatg.	320			13.0
						3
Bodenbearbeitung/Saat					Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen		Bedingungen	tiefe cm	
13.3.07	1	Pflug		trocken	24	
4.4.07	1	Kreiselegge		trocken	5	
7.4.07	1	walzen		trocken		
Düngung / Bewässern						
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
27.4.07		bewässern	10-12 l/m ²			
3.5.07		bewässern	10-12 l/m ²			
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
25.4.07		Striegel			tiefe cm	
2.5.07		Striegel			1	
16.5.07		Messenger Behandlung			1	
17.7.07		Distel schneiden				
Ernte						
Datum	Erntegut	% H2O	dt /ha	Bemerkung		
2.8.07	Korn					

Schlag A 26		2006/2007		Bodenart	Bodenzahl		
Ökolog. Landbau				SL/sL			
Hauptkultur:				4D	48/52		
Sommergerste				Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:
				Barke	Sonnenblumen	Versuch	Drillsaat
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.		Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm	cm
5.4.07	Sog	Z-Saatg.	320			13.0	3
Bodenbearbeitung/Saat						Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge		Maschinen		Bedingungen	tiefe cm	
3.3.07	1	Pflug			trocken	24	
4.4.07	2	Kreiselegge			trocken	5	
7.4.07	1	walzen			trocken		
Düngung / Bewässern							
Datum	BBCH	Dünger		Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
27.4.07		bewässern		10-12 l/m ²			
3.5.07		bewässern		10-12 l/m ²			
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						Arbeits-	
Datum	BBCH	Maßnahme		Aufwand	Bemerkung	tiefe cm	
25.4.07		Striegel				1	
24.5.07		Striegel				1	
16.5.07		Messenger Behandlung					
17.7.07		Distel schneiden					
Ernte							
Datum	Erntegut		% H2O	dt /ha	Bemerkung		
1.8.07	Korn						

Schlag A 19		2006/2007		Bodenart	Bodenzahl		
Integr. Landbau				L 4D	53		
Hauptkultur:		Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste		Barke	Weizen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.		Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm	cm
5.4.07	Sog	Z-Saatg.	320			13.0	3
Bodenbearbeitung/Saat						Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge		Maschinen		Bedingungen	tiefe cm	
5.9.06	1	Grubber			trocken	16	
3.4.07	1	fräsen			trocken	7	
4.4.07	1	Kreiselegge			trocken	5	
7.4.07	1	walzen			trocken		
Düngung / Bewässern							
Datum	BBCH	Dünger		Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
12.3.07		Schwefelsaures Ammoniak		1 dt/ha		20	
3.5.07		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)		100 l/ha		30	
9.6.07		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)		133 l/ha		40	
27.4.07		bewässern		10-12 l/m ²			
3.5.07		bewässern		10-12 l/m ²			
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen							
Datum	BBCH	Maßnahme		Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
12.3.07		Totalherbizid Glyphosate		3,5 l/ha		tiefe cm	
22.5.07		Herbizid: Primus		100 ml/ha			
27.5.07		Herbizid: Axial		0,45 l/ha			
7.6.07		Insektizid: Karate		75 ml/ha			
16.5.07		Messenger Behandlung					
Ernte							
Datum	Erntegut		% H2O	dt/ha	Bemerkung		
1.8.07	Korn						

Schlag A 20		2006/2007		Bodenart	Bodenzahl	
Integr. Landbau				L 4D	57	
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:		
Sommergerste	Barke	Weizen	Versuch	Drillsaat		
Saat-/Pflanzgut			Kö	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
5.4.07	Sog	Z-Saatg.	320			13.0
						3
Bodenbearbeitung/Saat					Arbeits-	
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen	Bedingungen	tiefe	cm	
5.9.07	1	Grubber	trocken	16		
3.4.07	1	Kreiselegge	trocken	7		
4.4.07	1	Kreiselegge	trocken	5		
7.4.07	1	walzen	trocken			
Düngung / Bewässern						
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
12.3.07		Schwefelsaures Ammoniak	1 dt/ha		20	
3.5.07		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)	100 l/ha		30	
9.6.07		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)	133 l/ha		40	
27.4.07		bewässern	10-12 l/m ²			
3.5.07		bewässern	10-12 l/m ²			
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
12.3.07		Totalherbizid Glyphosate	3,5 l/ha		tiefe	
			100		cm	
22.5.07		Herbizid: Primus	ml/ha			
27.5.07		Herbizid: Axial	0,45 l/ha			
7.6.07		Insektizid: Karate	75 ml/ha			
16.5.07		Messenger Behandlung				
Ernte						
Datum	Erntegut	% H2O	dt/ha	Bemerkung		
1.8.07	Korn					

Schlag A 20		2006/2007		Bodenart	Bodenzahl	
Integr. Landbau				L 4D	59	
Hauptkultur:		Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:	Anbauverfahren:	
Kartoffeln		Nicola	Winterweizen	Versuch	Pflanzung	
Saat-/Pflanzgut			Kno	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
18.4.07	Kart	Z-Pflanzg.	40,000		3600	75.0
Bodenbearbeitung/Saat						Arbeits-
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen		Bedingungen		tiefe cm
5.9.06	1	Grubber		trocken		16
3.4.07	1	Kreiselegge		trocken		11
24.4.07	1	Dammfräse		trocken		10
Düngung						
Datum	BBCH	Dünger		Aufwand	Bemerkung	kg N/ha
24.4.07		Ammoniumnitrat-Harnstoff (AHL)		374 l/ha		100
3.7.07		Harnstoff (Blattdüng.)		13 kg/ha		6
10.7.07		Microtop (S, Mg, Mn, B) (Blattdüng.)		20 kg/ha		-
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme		Aufwand	Bemerkung	Arbeits-
7.4.07		Totalherbizid Glyphosate		3,5 l/ha		
		Herbizid: Boxer		4,5 l/ha		
		Sencor		0,6 l/ha		
18.6.07		Fungizid: Ridomil		2 kg/ha		
		Insektizid: Dantop		150 ml/ha		
7.6.07		Messenger Behandlung				
25.6.07		Messenger Behandlung				
20.6.07		Fungizid: Infinito		1,5 l/ha		
30.6.07		Fungizid: Curzate		2,5 kg/ha		
		Insektizid: Plenum		300 g/ha		
11.7.07		Fungizid: Ranman		0,20 kg/ha		
		Insektizid: Tamaron		0,8 l/ha		
28.7.07		Fungizid: Curzate		2,5 kg/ha		
		Insektizid: Sumicidin		250 ml/ha		
14.8.07		Fungizid: Curzate		2,5 kg/ha		
		Shiralan		0,3 l/ha		
27.8.07		Krautabtötung: Reglone		3,0 l/ha		
Ernte						
Datum	Erntegut			dt/ha	Bemerkung	
15.10.07	Kartoffeln					

Schlag A 26/Ö7 2006/2007		Bodenart	Bodenzahl			
Integr. Landbau		sL 3D	57			
Hauptkultur:	Sorte :	Vorfrucht:	Verwendung:			
Kartoffeln	Nicola	Winterweizen	Versuch			
		Anbauverfahren:				
		Pflanzung				
Saat-/Pflanzgut			Kno	TKG	Reihenabst.	Saattiefe
Datum	Kultur	Herkunft	je m ²	g	kg/ha	cm
18.4.07	Kart	Z-Pflanzg.	40,000		3600	75.0
Bodenbearbeitung/Saat						Arbeits-
Datum	Arbeitsgänge	Maschinen	Bedingungen		tiefe cm	
29.12.06	1	Grubber	trocken		15	
15.1.07	1	Grubber	trocken		15	
17.4.07	1	Kreiselegge	trocken		5	
7.5.07	1	Dammfräse	trocken		10	
Düngung						
Datum	BBCH	Dünger	Aufwand	Bemerkung	kg N/ha	
Pflanzenschutz/Pflegemaßnahmen						
Datum	BBCH	Maßnahme	Aufwand	Bemerkung	Arbeits-	
27.4.07	1	häufeln			tiefe cm	
27.5.07	1	häufeln				
5.6.07	1	häufeln				
9.6.07		Windhalm, Kamille entfernen				
7.6.07		Messenger Behandlung				
25.6.07		Messenger Behandlung				
14.6.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
15.6.07		Insektizid: Novodor	5,0 l/ha			
20.6.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
25.6.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
29.6.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
6.7.07		Insektizid: Novodor	5,0 l/ha			
7.7.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
24.7.07		Fungizid: Cuprocin	1,0 l/ha			
14.8.07		Krautabtötung: mulchen				
Ernte						
Datum	Erntegut	dt/ha		Bemerkung		
16.10.07	Kartoffeln					

Danksagung:

Diese Arbeit wurde am Institut für biochemische Pflanzenpathologie der GSF Neuherberg durchgeführt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Durner für das Interesse an meiner Arbeit und seine Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Uta von Rad für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Vielen Dank auch allen Arbeitskollegen aus dem Institut für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Schorsch Gerl möchte ich mich für die Betreuung der Freilandversuche in Scheyern bedanken.

Bei Dr. Günther Schweizer bedanke ich mich für die Durchführung unserer Infektionsversuche an seinem Institut.

Bei Katharina Buddrus bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Gewächshaus- und den Freilandversuchen.

Lebenslauf

Name: Andreas Fröhlich

Geburtsdatum: 13. September 1976

Geburtsort: München

Wohnort: Schäufeleinstraße 42
80687 München

Familienstand: verheiratet

SCHULAUSSBILDUNG

09/1983 – 07/1987 Volksschule, Feldkirchen-Westerham

09/1987 – 07/1996 Gymnasium, Bad Aibling

ZIVILDIENT

09/1997 – 09/1998 Caritas Sozialstation, Rosenheim , Ambulante Alten- und Krankenpflege

UNIVERSITÄTSSTUDIUM

10/1998 Studium der Biologie an der LMU München

02/2000 Vordiplom - Studiengang Biologie an der LMU München

07/2004 Diplom - Studiengang Biologie an der LMU München

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zu Avr1b, einem vermuteten Avirulenzprotein von *Phytophthora sojae*“

Seit 11/2004 Doktorarbeit – GSF Neuherberg, Institut für biochemische Pflanzenpathologie

Thema der Doktorarbeit: „Der Effekt von Pflanzenaktivatoren und Biokontrollbakterien auf Resistenz und Wachstum von Gerste“