

Institut für Pflanzenschutz (IPS), Universität für Bodenkultur, Wien

Diplomarbeit

**Untersuchung der Auswirkungen
von *Piriformospora indica* auf *Arabidopsis thaliana* und
Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) in der Interaktion
mit *Meloidogyne incognita***

eingereicht von

Roshanak Daneshkhah

Wien, Februar 2008

Erstbetreuer: Univ. Prof. Dr. Florian Grundler

Zweitbetreuer: Dr. Krzysztof Wieczorek

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AM | Arbuskuläre Mykorrhiza |
| Col | Columbia, Arabidopsis-Ökotyp |
| cDNA | komplementäre (complementary) DNA |
| ddCT | delta delta cycle threshold |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid) |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| Mig | <i>M. incognita</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid) |
| RNAse | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 7 |
| 1.1 Möglichkeiten zur Bekämpfung von Nematoden durch Einsatz antagonistischer Mikroorganismen | 7 |
| 1.2 Die Lebensweise von Endophyten..... | 7 |
| 1.2.1 Bekämpfung durch pilzliche Endophyten..... | 8 |
| 1.3 Zielsetzung der Arbeit..... | 9 |
| 2 Organismen | 10 |
| 2.1 <i>Piriformospora indica</i> | 10 |
| 2.2 <i>Meloidogyne incognita</i> (Schaden, Bedeutung und Lebensweise) | 11 |
| 2.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 13 |
| 2.4 Tomate | 14 |
| 3 Material und Methoden | 15 |
| 3.1 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 15 |
| 3.2 Kultivierung von Tomate | 15 |
| 3.3 Kultivierung von <i>Piriformospora indica</i> | 15 |
| 3.4 Kultur von Nematoden | 18 |
| 3.5 Wirkung von Pilz-Kulturfiltrat auf das Wachstum von Tomate..... | 19 |
| 3.5.1 Herstellung von Kulturfiltrat | 19 |
| 3.6 Wirkung von Pilz-Kulturfiltrat auf die Gallenbildung der Nematoden in Tomatenwurzeln | 20 |
| 3.7 Wirkung der <i>P. indica</i> -Besiedelung auf das Wachstum und die Ertragsparameter von <i>Arabidopsis thaliana</i> auch in der Interaktion mit <i>M. incognita</i> | 20 |
| 3.8 Wirkung der <i>P. indica</i> -Besiedelung auf die Gallenbildung von <i>M. incognita</i> | 21 |
| 3.9 Untersuchung systemischer Effekte in der Pflanze-Pilz-Nematoden-Interaktion..... | 22 |
| 3.10 Mikroskopische Untersuchung der Wurzelbesiedelung durch <i>P. indica</i> durch Färbungen pilzlicher Strukturen in den Wurzeln..... | 23 |
| 4 Ergebnisse | 24 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1 | Mikroskopischer Nachweis von der Wurzelbesiedlung durch <i>P. indica</i> | 25 |
| 4.2 | Systemischer Einfluss von <i>P. indica</i> auf Gallenbildung von Nematoden in Petrischalen... | 25 |
| 4.3 | Einfluss von Kulturfiltrat auf das Pflanzenwachstum bei Tomate | 27 |
| 4.4 | Einfluss von Kulturfiltrat des Pilzes auf die Gallenbildung der Nematoden bei Tomate.. | 30 |
| 4.5 | Einfluss vom <i>P. indica</i> auf die Ertrags- und Wachstumsparameter bei <i>A. thaliana</i> in Topfversuchen | 31 |
| 4.6 | Direkter Einfluss des Pilzes auf die Gallenbildung bei Tomate im Topfversuch | 36 |
| 5 | Diskussion | 40 |
| 5.1 | Einfluss von <i>P. indica</i> auf das Wachstum und Ertragsmerkmale an <i>A. thaliana</i> und Tomate 41 | |
| 5.2 | Wirkung von Kulturfiltrat..... | 42 |
| 5.3 | Direkter Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Bildung von Wurzelgallen..... | 45 |
| 5.4 | Systemischer Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Bildung von Wurzelgallen durch <i>M.incognita</i> an <i>A. thaliana</i> | 46 |
| 6 | Anhang | 48 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 53 |
| 8 | Danksagung..... | 58 |

Kurzfassung

Der Wurzelendophyt *Piriformospora indica* wurde 1997 in der indischen Halbwüste Thar entdeckt. In entsprechenden Untersuchungen konnten bei verschiedenen Pflanzenarten wachstumsfördernde Eigenschaften dieses Endophyten beobachtet werden, die in vieler Hinsicht den arbuskulären Mykorrhiza-Pilzen ähnlich sind. Im Gegensatz zu den Mykorrhiza-Pilzen lässt sich dieser Pilz axenisch kultivieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wechselwirkungen von *P. indica* mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und der Kulturpflanze *Solanum lycopersicum* (Tomate) der Sorte Moneymaker in Zusammenhang mit dem Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* zu untersuchen und direkte oder systemische Wirkungen des Pilzes auf diesen Schadorganismus zu charakterisieren.

Die Besiedelung von Pflanzenwurzeln mit *P. indica* führte bei *Arabidopsis* unter Langtagbedingungen zu einer signifikanten Förderung des Pflanzenwachstums. Der Effekt führte zu einer früheren Bildung der Schoten, einer erhöhten Schotenanzahl und einer Ertragsteigerung. Die Besiedelung von Tomatenwurzeln unter Langtagbedingung durch den Pilz hatte eine signifikante Reduktion der Bildung von Wurzelgallen durch *M. incognita* zur Folge. Die Untersuchungen bei *Arabidopsis* bestätigten diesen Befund und ergaben weiter, dass es sich hier um einen systemischen Effekt handeln muss. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch Kulturfiltrat des Pilzes Effekte hinsichtlich der Förderung des Wachstums wie auch einer Reduktion des Nematodenbefalls an Tomatenwurzeln zeigt.

Abstract

Piriformospora indica, an endophytic fungus has been isolated in 1997 in Thar Desert in India. Subsequently, a growth promoting effect of this endophytic fungus, which is similar to that of mycorrhizal fungi, could be observed in various plant species. But compared to mycorrhizal fungi, it is possible to cultivate this fungus axenically. The objective of the present work was to determine the interactions of the fungus with *Arabidopsis thaliana* and tomato cf. MoneyMaker also in combination with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* both directly and systemically. The colonization of roots with *P. indica* under long-day conditions led to significant plant growth promotion. The effect on *A. thaliana* demonstrated an earlier development of siliques, an increased number of siliques and an increase in yield. The existence of a systemic plant resistance against *M. incognita* in *Arabidopsis* plants colonized by the fungus could be confirmed. Further evidence was provided on the effect of fungus culture filtrate to induce growth promotion in tomato plants and to interfere with nematode infection in tomato roots.

1. Einleitung

1.1 *Möglichkeiten zur Bekämpfung von Nematoden durch Einsatz antagonistischer Mikroorganismen*

Wegen der Abhängigkeit der Menschen von einer erfolgreichen Ernte konnten Pflanzenschädlinge schlimmstenfalls Hungersnöte und Massenvergiftungen auslösen. Die intensive Nutzung der Ackerfläche in der modernen Landwirtschaft und im Gartenbau führt häufig zum Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln zur Bekämpfung von Pflanzenschädlingen und Pflanzenpathogenen wie Nematoden. Die Anwendung von Nematiziden bietet allerdings nur eine kurzfristige Lösung und zeigt keine nachhaltige Wirkung auf die Nematoden. Außerdem führt sie zu einer starken Belastung von Wasser und Boden und ist damit ökologisch nicht vorteilhaft. Daher hat die Palette zugelassener Nematizide aus ökologischen und toxikologischen Gründen drastisch abgenommen (ANONYM, 1997). Schließlich führt die häufige Anwendung von Nematiziden auch zur Bildung von resistenten Schädlingspopulationen.

Das Prinzip des biologischen Pflanzenschutzes besteht darin, durch eine gezielte Förderung oder Ausbringung von Antagonisten bzw. Nutzorganismen Schaderreger zu unterdrücken (KERRY, 1990).

Seit mehr als 100 Jahren arbeitet man mit pilzlichen Antagonisten gegen phytopathogene Nematoden. Dazu gehören auch nematodenfangende Pilze der Gattung *Arthrobotrys*. Trotz dieser relativ langen Forschungszeit ist jedoch ein größerer praktischer Erfolg noch nicht erreicht, insbesondere wegen der unzureichenden Wirkung und der geringen Wirkungssicherheit.

1.2 *Die Lebensweise von Endophyten*

Endophyten sind Pilze oder Bakterien, die ihr gesamtes Leben oder wenigstens einen Teil ihres Lebenszyklus in einer Pflanze verbringen. Dabei können sie das Gewebe der Pflanze intra- oder interzellulär besiedeln. Ebenso kann die Besiedlung lokal oder systemisch sein und je nach Ort der Besiedlung unterschiedliche Effekte bei der Pflanze hervorrufen.

Typischerweise verursachen die Endophyten keine Krankheitssymptome bei der Pflanze; ist diese jedoch geschwächt, d.h. unter Stressbedingungen, können Infektionen auftreten. Häufiger sind jedoch die für die Pflanze positiven Effekte, die ein Endophyt bewirken kann. Dazu gehören Wachstumsförderung, Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse und der Schutz vor Phytopathogenen und Fraßfeinden.

1.2.1 Bekämpfung durch pilzliche Endophyten

Pilzliche Endophyten und andere Pilze wie *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* und *Gliocladium virens* zeigten sich effektiv bei der Bekämpfung von *Meloidogyne javanica* (PARVEEN et al., 1993). Nach ZUCKERMAN et al. (1994) verminderte ein Isolat von *Aspergillus niger* (PD-42) die Intensität der Vergallung durch *M. incognita* an Tomate und Paprika sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland. Weiterhin reduzierte dieses Isolat die Populationen von *Rotylenchulus reniformis* im Freiland. Als Nematizidkomponente der Kulturfiltrate von *Aspergillus niger* sind Zitronensäure (3-Carboxy-3-hydroxy-pentan-1,5-disäure), Oxalsäure (Ethandisäure) und nicht näher bestimmte Moleküle, die ein Molekulargewicht von mehr als 8000 haben, genannt (ZUCKERMAN et al., 1994). Die Aktivität und Wirksamkeit antagonistischer Pilze wird durch Nährstoffangebot, Temperatur, Licht und Feuchtigkeit beeinflusst (BELDER & JANSEN, 1994).

Endophytische Pilze gehen eine sehr enge Beziehung mit der Pflanze ein. Diese Art der Symbiose hat Auswirkungen auf die Pathogenese verschiedener Wirt-Parasit-Interaktionen, die sich in einer Förderung oder Hemmung manifestiert. HALLMANN (1994) testete endophytische Pilze wie *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium funicola* und *Colletotrichum coccodes* gegen *M. incognita* an Tomate. 20% der geprüften Isolate reduzierten die Gallenbildung um bis zu 50%. Die beste Wirkung wurde durch *Fusarium oxysporum* Isolat 162 erreicht.

Durch Vorinokulation der Kulturpflanze mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) konnte eine nachhaltige Einschränkung der Nematodenpopulation erzielt werden (KRISHNA-PRASAD, 1991; OSMAN et al., 1991). SIKORA (1978) berichtete über eine Verlangsamung der *Meloidogyne*-Entwicklung durch Einsatz von Mykorrhizapilzen an Tomate. Weiterhin konnten SURESH et al. (1985) eine Unterdrückung der Gallenbildung sowie eine Reduzierung der Riesenzellen beobachten. SALEH & SIKORA (1984) konnten durch Einsatz von Mykorrhiza *Glomus fasciculatum* eine beachtliche Befallsreduzierung von *Meloidogyne incognita* erreichen. COOPER & GRANDISON

(1987) erzielten eine deutliche Verminderung der Nematodenanzahl durch Zugabe von AM zu *Meloidogyne hapla*-empfindlichen Tomatensorten. Nach AHMED & ALSYED (1991) reduzierte *Glomus macrocarpus* die Gallenanzahl von *M. incognita* bei Kuherbse (*Vigna sinensis*).

Als Wirkungsmechanismen von AM werden die bessere Nährstoffaufnahme der behandelten Pflanzen, insbesondere von Phosphor (AHMED & ALSYED, 1991) und Veränderungen der Wurzelexsudate, die weniger anlockend auf Nematoden wirken, diskutiert (AHMED & ALSYED, 1991). Weiterhin konnte DUGASSA-GUBBENA (1995) eine höhere Phytohormonproduktion bei behandelten Pflanzen als bei unbehandelten Pflanzen nachweisen. Neuerdings wird auch eine mögliche Induzierung von Resistenz bzw. Verminderung der Prädisposition der Kulturpflanze gegen Krankheitserreger diskutiert (COOPER & GRANDISON, 1987). Allerdings ist ihr Einsatz im großen Maßstab wegen Schwierigkeiten bei der Massenvermehrung und durch teilweise hohe Wirtsspezifität eingeschränkt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion mit und die Auswirkungen des Wurzelendophyten *P. indica* auf die Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und Tomate (*Solanum lycopersicum* c.f. - MoneyMaker) zu charakterisieren. Es sollten zunächst die Auswirkungen auf das Wachstum, die Entwicklung und den Ertrag dieser Pflanzen untersucht werden. Der Einfluss von *P. indica* auf die Interaktion der Pflanze mit dem Erreger des Wurzelgallennematoden *M. incognita* in sowohl systemischer und als auch direkter Beziehung vom Schad- und Nutzorganismus stellte einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt dar. Die Funktion vom Pilzkulturfiltrat in dieser Interaktion wurde in einem weiteren Versuch untersucht.

2 Organismen

2.1 *Piriformospora indica*

Piriformospora indica wurde 1997 in der indischen Thar-Halbwüste entdeckt. Aufgrund der charakteristischen birnenförmigen Form seiner Chlamydosporen bekam er seinen Namen. Durch rDNA Sequenzierungen wurde er der Formgattung *Rhizoctonia* aus der Gruppe der Hymenomyceten (*Basidiomycota*) (VERMA et al., 1998) und vor kurzem einer neu definierten Ordnung, den *Sebacinales*, zugeordnet (WEISS et al., 2004). Diese Gruppe beinhaltet Organismen, welche mit Pflanzen einer breiten Vielfalt an Mykorrhiza-Symbiosen wie Ektomykorrhiza, orchidoide Mykorrhiza oder ericoide Mykorrhiza bilden.

Piriformospora indica besiedelt Wurzeln von Pflanzen aus den verschiedensten phylogenetischen Gruppen (VARMA et al., 1999). Durch inter- und intrazelluläres Hyphenwachstum breitet er sich in der Wurzel aus und ist sowohl in der Rhizodermis, als auch dem äußeren Kortex der Wurzel zu finden. Chlamydosporen werden sowohl innerhalb des Wurzelgewebes, als auch extern in der Umgebung der Wurzel gebildet (VARMA et al., 1998). Die Hyphen sind mit 0,7-3,5µm Durchmesser sehr viel dünner als die der AM-Pilze. In Interaktionen von *P. indica* mit verschiedenen *Dactylorhiza* spp. konnte die Ausbildung einer funktionellen Orchideenmykorrhiza festgestellt werden (BLECHERT et al., 1998). Andererseits zeigte *P. indica* in der Interaktion mit Mais- und *Medicago truncatula* auch nekrotrophen Charakter (RHODY, 1999; FRANKEN et al., 2000).

Der am deutlichsten hervortretende und bisher meist beschriebene Effekt ist der Einfluss des Wurzelendopyhten auf das Wachstum der Pflanzen. Dieser wachstumsfördernde Effekt wurde bereits in vielen dikotylen Pflanzen wie Tabak, Petersilie, Pappel (VARMA et al., 1999) und *M. truncatula*, als Modellpflanze innerhalb der Leguminosen (ACHATZ, 2002), beschrieben. Aber auch bei der monokotylen Pflanze *Zea mays* oder in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die keine AM-Entwicklung zulässt, konnte dieser Effekt beobachtet werden (VARMA et al., 1999; PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004). Die Wachstumseffekte sind nicht nur auf junge Pflanzen beschränkt, sondern haben einen positiven Einfluss auf den späteren Ertrag. In entsprechenden Untersuchungen wurden unter Freilandbedingungen unterschiedliche Gerstenkultivare in

Mitscherlichgefäßen kultiviert, um die Entwicklung der Pflanzen wie auch verschiedene Ertragsparameter zu analysieren. *P. indica* besiedelte Pflanzen wiesen einen um bis zu 11% erhöhten Kornertrag auf, der sich vor allem auf eine höhere Ährenzahl zurückführen lässt (WALLER et al., 2005).

Welche Mechanismen hinter den wachstumsfördernden Effekten des Pilzes liegen ist bisher noch nicht geklärt. Ein negativer Effekt wurde das erste Mal 2005 durch Kaldorf et al. (KALDORF et al., 2005) beschrieben. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, d.h. bei Ammonium als Stickstoffquelle im Medium des Pilzes, zeigten Pappelblätter auf Kulturmedium bei Anwesenheit von *P. indica* Nekrosen. In Untersuchungen mit Wurzel- und Blattpathogenen zeigten sich starke bioprotektive Effekte von *P. indica*. Die erhöhte Resistenz gegenüber dem Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* dient dabei als Ausgangspunkt für die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen der Resistenzinduktion. Das Potential des Pilzes an Resistenzinduktion gegen nekrotrophischen Pilz *Fusarium culmorum* und auch induzierte Toleranz gegen Salz-Stress in der Gerste wurden auch bewiesen (WALLER et al., 2005).

Aufgrund seiner Herkunft, der Verwandtschaft und den Einflüssen, die *P. indica* durch seine Besiedelung auf die Pflanzen ausübt, wurde er in seiner Funktion häufig mit arbuskulären Mykorrhizapilzen verglichen (VARMA et al., 1999; SINGH et al., 2000; VARMA et al., 2000a). So könnte die Erhöhung der Transkriptmenge der Nitratreduktase in Wurzeln und Spross besiedelter *A. thaliana* Pflanzen ein Hinweis für die Unterstützung der Stickstoffzufuhr darstellen (SHERAMETI et al., 2005).

Die Möglichkeit zur axenischen Kultur und die damit verbundenen guten Untersuchungsbedingungen im Gegensatz zu den obligat biotrophen arbuskulären Mykorrhizapilzen machen *P. indica* sehr interessant für die Grundlagenforschung aber auch für praktische Anwendung.

2.2 Meloidogyne incognita (Schaden, Bedeutung und Lebensweise)

Wurzelgallennematoden wurden zum ersten Mal von BERKELEY (1855) an Gewächshausgurken beschrieben. Wurzelgallennematoden sind obligate, sedentäre Wurzelparasiten. Global gesehen

sind *Meloidogyne* spp. die weltweit verbreitetste und wirtschaftlich bedeutendste Gruppe pflanzenparasitärer Nematoden, gefolgt von den Gattungen *Pratylenchus* und *Heterodera* (SASSER, 1977). Im Weltmaßstab wird der wirtschaftliche Schaden durch Nematoden auf 10% geschätzt (SASSER, 1971). Auf stark verseuchten Feldern treten nicht selten Ertragsverluste von über 50% auf, in Einzelfällen ist Totalverlust möglich (DECKER & FRITZSCHE, 1991). Weiterhin können Nematoden den Anbau von bestimmten Dauerkulturen auf stark verseuchten Flächen verhindern. Bis heute sind etwa 80 verschiedene Arten der Gattung *Meloidogyne* bekannt (STURHAN, 1995).

Die Nematoden schädigen die Pflanzen durch mechanische Verletzungen, Entzug von Wasser und Nährstoffen und somit durch Verlangsamung ertragsbildender Prozesse. Mit *M. incognita* befallene Pflanzen zeigen an oberirdischen Pflanzenteilen Wachstumsdepressionen, Welkeerscheinungen - insbesondere während der heißen Stunden des Tages - und Gelbfärbungen der Blätter. Stark befallene Pflanzen können eingehen. Wie der Name Wurzelgallennematoden (root-knot nematodes) besagt, verursacht *M. incognita* Gallen (knots) an den Wurzeln anfälliger Pflanzen. Darüber hinaus bieten von dieser Nematodenart verursachten Schäden anderen bodenbürtigen Krankheitserregern Eintrittsöffnungen. Nicht selten bilden Nematoden mit Krankheitserregern aus der Gruppe der Bakterien und Pilze Krankheitskomplexe (TAYLOR, 1990), d.h. es kommt zu synergistischen Schädigungen der Kulturpflanzen, die bis zur Aufhebung einer vorhandenen Resistenz der Pflanze gegen bestimmte Erreger führen können. So kann die Art *M. incognita* z. B. in synergistischer Assoziation mit anderen Nematoden wie *Rotylenchus reniformis* in Tomatenwurzeln (KHAN et al., 1985) auftreten.

M. incognita vermehrt sich parthenogenetisch. In der Regel werden Männchen nur bei schlechten Nahrungs- (TRIANAPHYLLOU, 1960) oder ungünstigen Klimabedingungen gebildet (LAUGHLIN et al., 1969). Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor für die Embryoentwicklung und das Schlüpfen von allen *Meloidogyne* Arten (HUANG & PEREIRA 1994).

M. incognita Individuen besitzen keine Überdauerungsform wie die meisten Pilze und Bakterien. Trotzdem können die Eier bis zu zwei Jahre im Boden überlebensfähig bleiben (HASSAN et al., 1993). Wurzelgallennematoden haben mehrere Generationen innerhalb einer Vegetationsperiode, weshalb sie eine hohe Populationsdynamik aufweisen. Ihre Vermehrung wird von Umweltfaktoren wie Feuchtigkeit, Temperatur und Wirtspflanzenart beeinflusst (ABRANTES & SANTOS, 1990). Die Temperatur steuert z. B. die Populationsdynamik dieser Nematoden durch Beeinflussung der Entwicklung der Eier (GOODELL & FERRIS, 1989), der Aktivität des 2. Larvenstadiums (J₂) im

Boden und des Eindringens in die Wurzel (GOODELL & FERRIS, 1989). Weiterhin wird das Wachstum, die Entwicklung und die Vermehrung der Larven durch die Temperatur reguliert, auch nachdem sie sich in den Wurzeln niedergelassen haben (ROBERTS, 1987).

2.3 *Arabidopsis thaliana*

Das einjährige, zur Familie der *Brassicaceae* zählende Wildkraut *Arabidopsis thaliana* ist besonders geeignet für klassische und molekular-genetische Studien. Mit der Identifizierung und Charakterisierung von Genen dieser Modellpflanze sollen neue Kenntnisse über verschiedenste Stoffwechselprozesse, morphologische Merkmale, Anpassungen an verschiedene Umweltbedingungen, Genregulations- und DNA-Reparaturprozesse und Abwehrreaktionen gegenüber Krankheitserregern in höheren Pflanzen gewonnen werden.

Arabidopsis ist fast ausschließlich autogam, so dass reine Linien leicht hergestellt werden können. Das aus nur 5 Chromosomen bestehende kleine Genom hat einen geringen Anteil an repetitiven Sequenzen. Von großer Wichtigkeit für genetische Studien sind aber auch die hohe Reproduktionsrate (bis zu 10.000 Samen pro Pflanze), das schnelle Reifen der Samen (Samenreife nach 4 - 6 Wochen) und der geringe Platzbedarf. Verschiedene *in vitro* und *in planta* Transformationsmethoden für *Arabidopsis* sind etabliert. Für die Erzeugung von Mutanten zur gezielten Untersuchung bestimmter Phänotypen werden sowohl die physikalische und chemische Mutagenese als auch die Insertionsmutagenese und der Einsatz von Transposonsystemen angewendet.

Seit 1996 wurde im Rahmen der 'Arabidopsis Genome Initiative' (AGI) an der ersten Entschlüsselung des gesamten Genoms einer höheren Pflanze gearbeitet. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* wurde im Dezember 2000 als Ergebnis der Kooperationsarbeit von über 40 Laboratorien in Europa, den USA und Japan erfolgreich abgeschlossen. Insgesamt konnten 25.498 Gene identifiziert werden, die Proteine aus 11.000 Proteinfamilien codieren. Der Anteil an Duplikationen einzelner Gene oder größerer Segmente ist mit ca. 60 % sehr groß im Vergleich zum Genom von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, zwei weiteren vollständig sequenzierten, eukaryotischen Genomen. Da diese Modellpflanze sich sehr gut als Wirtspflanze für beide zu untersuchenden Organismen

eignet, sowohl für *P. indica* als auch *M. incognita*, wurde in dieser Arbeit Ökotyp Columbia verwendet.

2.4 Tomate

Die Tomate steht heute unter den Nahrungsmittelpflanzen der Erde sowohl im Hinblick auf die Produktion als auch auf die Anbaufläche etwa an 10. Stelle (KRUG, 1991). Die Sorte Moneymaker, wurde in den Versuchen dieser Arbeit verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis* Samen wurden für die Versuche in der Petrischale nach der Oberflächesterilisation (durch 10 min. Eintauchen in 5% Calciumhypochlorid $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ gefolgt von 70% Ethanol für 5 Min. und dreimal in sterilem, destilliertem Wasser) auf die Petrischalen, befüllt mit Knop Medium, ausgelegt.

3.2 Kultivierung von *Tomate*

Die Samen wurden vor der Aussaat in NaOCl-Lösung mit 2% aktivem Chlor 5 Minuten sterilisiert und anschließend dreimal mit dem sterilen, destillierten Wasser gewaschen. Danach wurden die Samen in gärtnerischem Erds substrat in Töpfen, auf dem Kulturmedium oder in Petrischalen mit MS-Medium (Murashige & Skoog) ausgesät.

3.3 Kultivierung von *Piriformospora indica*

Der Pilz, *P. indica*, kann auf einer breiten Strecke der synthetischen einfachen und komplizierten Mittel mit Saccharose oder Glukose als Carbonenergiequelle axenisch gewachsen werden. Massenbearbeitung des Pilzes kann auf vereinfachter Suppekultur leicht erzielt werden. Das Wachstum wird gut zwischen 25-35°C und pH 5.8 erreicht. Es wurden hierfür verschiedene Versuche unterschiedliche Nährmedien als Stammkultur für *P. indica* herangezogen:

- **Flüssiges Malz-Extrakt Medium:**

In diesem Medium wächst der Pilz sehr schnell und üppig. Dazu wird ein Stück vom Pilzmyzel aus dem festen PDA-Medium (Potato Dextrose Agar) ausgestochen und durch eine vorher abgeflamte Nadel ins vorher autoklaviertes flüssiges Malz-Medium überimpft. Das Medium ist

in einem Erlenmeyer und wird mit einem Watte-Stöpfenverschluss und im 28 C° Schrank auf einem Schüttler, eingestellt auf 200 rpm, inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde von der in diesem Medium gewachsenen Myzelmasse (14 Tagen nach der Überimpfung) das Inokulumsmaterial zur Inokulation vom Erds substrat für Gefäßversuche verwendet.

- **Flüssiges *Aspergillus nidulans*-Medium:**

Dieses Medium besteht aus drei Lösungen, die getrennt vorbereitet und nach der pH-Bestimmung (der pH-Wert wird nur für die erste Lösung bestimmt) und Autoklavierung zur Anwendung zusammengemischt werden:

Lösung A:

- NaNO₃ 6.00 g
- KH₂PO₄ 1.52g
- KCl 1.52g
- Destilliertes Wasser 500.00ml
(pH auf 6.5 mit 1N NaOH)

Lösung B:

- MgSO₄ × 7 H₂O 0.52g
- FeSO₄ × 7 H₂O trace
- ZnSO₄ × 7H₂O trace
- Destilliertes Wasser 250.00ml

Lösung C:

- Glucose 10.00g
- Destilliertes Wasser 200.00ml

Die Ausgangsmenge vom Pilz, um dieses Medium herzustellen, wurde wieder aus festem PDA-Medium aufgebracht. Es dauert etwa eine Woche, bis der Pilz im Medium anwächst und sich durch Myzelien ausbreitet.

In diesem Medium wurde in der Arbeit der Vorrat für Kulturfiltratversuche angefertigt.

- **Festes 0.2 Knop Medium:**

Für Untersuchung der systemischen Funktion des Pilzes gegen den Wurzelgallennematoden *M. incognita* in *A. thaliana* Pflanzen wurde dieses Medium verwendet. Die Zutaten beinhalten:

- Glukose 20g
- B5 Vitamine 1ml
- Daishin-Agar 7g
- Stammlösung 1 (KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) 2ml
- Stammlösung 2 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$) 2ml
- Stammlösung 3 (KH_2PO_4) 2ml
- Stammlösung 4 (FeNaEDTA) 0.4ml
- Stammlösung 5 (H_3BO_3 , MnCl_2 , $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$,
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, H_2MoO_4 , NaCl) 0.2ml

Der pH-Wert wird auf 6.4 mit 1N KOH reguliert. Auf dem Medium wächst der Pilz hauchdünn und produziert zahlreiche Chlamydosporen. Bei der Herstellung von Sporensuspension vom gewachsenen Pilz auf diesem Medium wurden viele Chlamydosporen entdeckt. Im Original ist dieses Medium mit Saccharose herzustellen jedoch in dieser Arbeit wurde stattdessen Glukose verwendet, weil der Pilz besser darauf wächst.

- **PDA Medium**

Auf Potato-Dextrose-Agar wuchs der Pilz sehr intensiv und üppig. Daher wurde es für die Stammkultur verwendet. Zur Inokulation der Pflanzen in Petrischalen und auch als Ausgangsmaterial zur Herstellung von flüssigen Medien wurden von diesem Medium Pilzstücke ausgestochen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte für die Kultivierung bei 28°C. Flüssigkulturen wurden mit aus den bewachsenen Agarplatten ausgestanzten Agarblöcken angefertigt und bei 28°C auf einem Horizontalschüttler bei ca. 200 rpm inkubiert.

3.4 Kultur von Nematoden

Die Vermehrung von *M. incognita* erfolgte an Gurkenwurzel auf B5-Nährmedium in Petrischalen. Um diese als Stammkultur vorzubereiten, wurden zuerst die Samen von Gurken nach Oberflächesterilisation auf Wasser-Agar ausgelegt. Zur Keimung der Samen wurden die Petrischalen in einer Dunkelkammer gelagert. Nach 4 Tagen wurden die Wurzeln abgeschnitten und dabei auch die Samenschälchen entfernt und die Wurzeln in weiterer Folge auf mit B5 Medium gegossenen Petrischalen umgesetzt. Dieses Medium beinhaltet:

B5 Medium besteht aus (100 ml):

- B5-Salze 0,318g
- Glukose 2g
- MES Monohydrate (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 0,05g
- Daishin Agar 0,7g

(pH-Wert auf 5,7 mit 1N KOH)

Sobald die Wurzeln auf den B5-Petrischalen genügend gewachsen waren (nach 4-5 Tagen), wurden sie mit Infektionslarven *M. incognita* (J2) inokuliert. Die Inokulation der Nematoden erfolgte durch das Abzapfen so genannter Schlupftrichter. Durch das Abzapfen werden die Larven in ein steriles Blockschälchen entleert und für 5 Minuten liegenlassen. Danach wurde das überschussige Wasser abpipettiert. Die Larven wurden für fünf Minuten mit einer Sterilisationslösung gemischt. Danach wurde die Lösung wieder mit einer Pipette abgesaugt und auf dieser Weise die Larven zwei Mal mit dem destillierten Wasser gewaschen. Danach wurden die sauberen Larven mit Gelrite vermischt und gleichmässig auf die Wurzel verteilt. Gelrite wird verwendet, um eine gleichmäßige Verteilung der Larven zu gewährleisten. Das Gemisch von Gelrite und Larven wurde auf Petrischalen mit Gurkenwurzeln in Form von kleinen Tröpfchen pipettiert und anschließend wurden die Petrischalen in einem dunklen Schrank aufbewahrt, weil die Larven im Dunkel leichter in die Wurzel eindringen können.

Eine Woche nach der Inokulation bildeten die Larven Gallen auf den Wurzeln und nach einem Monat schließlich Eiersäcke aus. Die Eiersäcke waren in Form von kleinen runden und braunfärbigen Punkten auf den den Wurzelgallen zu finden. Für weitere Inokulationen wurden sie

durch eine abgeflamnte Nadel in einen sterilen Schlupftrichter übertragen. Der Schlupftrichter wurde anschließend mit destilliertem Wasser gefüllt. Dabei musste möglichst die Bildung von Luftblasen vermieden werden. Im Trichter schlüpften dann die Larven aus den Eiersäcken.

3.5 Wirkung von Pilz-Kulturfiltrat auf das Wachstum von Tomate

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Fähigkeit von Pilz-Kulturfiltrat bezüglich des eventuellen Wachstumsförderungspotentials auf die Pflanzen festzustellen. Der Versuch wurde mit Tomate (Moneymaker) durchgeführt. Vorsterilisierte Tomatensamen keimten auf Wasser-Agar und danach wurden die Keimlinge auf MS-Medium umgesetzt. Der Versuch wurde auf zwei MS-Medien durchgeführt: MS-Medium mit Saccharose und MS-Medium mit Glukose. Die Pflanzen wurden 14 Tage nach der Aussaat in den nachfolgend beschriebenen Varianten behandelt. Bis diesem Zeitpunkt wurden sie im Klimaraum aufbewahrt.

- 1) H₂O
- 2) Medium (*Aspergillus nidulans*-Medium ohne Pilz)
- 3) Autoklaviertes Pilzkulturfiltrat
- 4) Kulturfiltrat

Die Pflanzen wurden 14 Tage nach Behandlung geerntet. Die Kriterien zur Auswertung waren:

- Biomasse (frisch und trocken)
- Anzahl von Wurzelspitzen
- Wurzellänge

3.5.1 Herstellung von Kulturfiltrat

Das Material für den Kulturfiltrat-Versuch wurde aus flüssigem *Aspergillus nidulans*-Medium extrahiert. Die Ausgangsmenge vom Pilzmaterial zur Herstellung der Lösung, aus der das Inokulum für Kulturfiltrat genommen wurde, waren drei Stücke von Pilzhyphen aus PDA Medium. Sie wurden in eine Erlenmeyerkolbe mit *Aspergillus nidulans*-Medium überführt und bei 28°C auf einem Schüttler, eingestellt auf 200 rpm, 7 Tage inkubiert. Danach wurde das Pilz-

Kulturfiltrat mit Hilfe eines Sterilfilters von Myzel und Sporen gereinigt. Anschließend wurden jeweils 100 µl von allen Varianten auf Pflanzenwurzel pipettiert wobei die ganze Wurzel damit abgedeckt wurde.

3.6 Wirkung von Pilz-Kulturfiltrat auf die Gallenbildung der Nematoden in Tomatenwurzeln

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Auswirkung von Pilz-Kulturfiltrat auf Gallenbildung von *M. incognita* in Tomatenwurzeln zu untersuchen. Die Samen (Moneymaker) wurden zur Keimung auf Wasser-Agar ausgelegt. Nach 7 Tagen wurden sie auf MS-Medium umgesetzt. 3 Tage danach (sobald die Pflanzen 10 Tage alt waren) wurde die Hälfte von ihnen mit Kulturfiltrat inokuliert und die andere Hälfte als Kontrolle ohne Inokulation mit Kulturfiltrat aufbewahrt.

In Abstand von 4 Tagen wurden die Pflanzen mit den Nematoden inokuliert und nach 12 Tagen zur Auswertung geerntet. Bei der Auswertung wurde Biomasse (Frisch- und Trockengewicht) sowie Gallenzahl pro Gramm Wurzel gemessen.

3.7 Wirkung der P. indica-Besiedelung auf das Wachstum und die Ertragsparameter von Arabidopsis thaliana auch in der Interaktion mit M. incognita

Zur Untersuchung der Auswirkung der Pflanzenbesiedelung durch den Pilz und auch in Anwesenheit von *M. incognita* wurde in dieser Arbeit die Modellpflanze *A. thaliana* verwendet. Hierzu wurden folgende Merkmale berücksichtigt:

Biomasse, Schotenproduktion und Samenproduktion.

Dafür wurden die Samen in Substrat zur Keimung gebracht. Nach 7 Tagen wurden die Jungpflanzen einzeln in kleine Töpfe (Durchmesser 6.5 cm) umgesetzt. Gleich beim Umsetzen der Pflanzen in einzelne Töpfe wurde das autoklavierte Substrat (3 Erde : 1 Sand) mit dem Pilzmyzel aus der Flüssigkultur vermischt. Die Pilzmyzelmasse wurde dem flüssigen Malz-Medium entnommen, zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und abgetupft. Das Substrat wurde entsprechend der Behandlung entweder mit 1g Pilzmyzel pro 100g Substrat oder mit 3g Pilzmyzel pro 100g Substrat vermischt. Dabei wurde versucht das Inokulum möglichst gleichmäßig im

Substrat zu verteilen. Zwei Wochen nach dem Pickieren wurden sie mit den Nematoden inokuliert. Innerhalb der Wachstumsperiode wurden die Pflanzen unter Langtagsbedingungen bei 22°C/18°C Tag/Nacht Zyklus, 60% relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16h mit 30 kLux kultiviert.

Kontrollpflanzen wurden in gleichem Substrat, jedoch ohne Pilzinokulum, angezogen. In den Varianten, die auch mit Nematoden inokuliert wurden, wurde die Inokulation zwei Wochen nach Pilzinokulation vorgenommen. Die Inokulation wurde durch Pipettieren von 50 Larven pro Pflanze in die Erde dicht neben den Wurzeln ausgeführt.

Die behandelten Varianten waren:

- 1) Kontrolle (Pflanze ohne Behandlung)
- 2) Pflanze + *M. incognita*
- 3) Pflanze + (1%) Pilzinokulum
- 4) Pflanze + (3%) Pilzinokulum
- 5) Pflanze + (1%) Pilzinokulum + *M. incognita*
- 6) Pflanze + (3%) Pilzinokulum + *M. incognita*

Bestimmung der Ertragsparameter

Zur Auswertung des Ertrags der besiedelten bzw. nichtbesiedelten Pflanzen wurden 3 Parameter untersucht. Nach Abreife der Pflanzen wurden die Anzahl der Samen pro 20 Schoten, die Biomasse des Sprosses (Frisch- und Trockengewicht) bestimmt. Nach der Ernte wurden die Pflanzen 3 Tage in den Trockenschrank gestellt und danach wurde die Trockenmasse bestimmt.

3.8 Wirkung der P. indica-Besiedlung auf die Gallenbildung von M. incognita

Für die Untersuchung der Auswirkung der Besiedlung durch *P. indica* auf die Gallenentwicklung der Nematoden in der Wurzel wurden Tomatenpflanzen verwendet, die sich besser für Wurzeluntersuchungen eignen.

Die Tomatewurzeln sind leichter von der Erde auszuspülen so dass weniger Wurzelmasse verlorengeht. Die Infektion der Wurzel durch den Pilz wurde nach der Färbung im

Durchlichtsmikroskop nachgewiesen (Abb. 2-12). Die Keimlinge wurden nach einer Woche in einzelne Töpfe umgesetzt. Das Substrat (3 Erde : 1 Sand), mit dem die Töpfe gefüllt wurden, wurde in der oben beschriebenen Weise für die entsprechenden Varianten mit Pilzmyzel gemischt. Nach 10 Tagen erfolgte die Inokulation mit Nematoden. Die Pflanzen wurden unter Langtagsbedingungen (siehe oben) kultiviert. Auswertungskriterien waren die Biomasseproduktion (Frischgewicht) einschließlich der Gallenanzahl pro Gramm Wurzel.

3.9 Untersuchung systemischer Effekte in der Pflanze-Pilz-Nematoden-Interaktion

Zur Untersuchung der systemischen Wirkung von *P. indica* auf den Befall von *M. incognita* in der Pflanze müssen das Pathogen und der Nutzorganismus räumlich getrennt auf die Pflanze wirken. Aus diesem Grund wurden Petrischalen mit 3 Kammern verwendet, damit die mit Nematoden inokulierten Wurzeln nicht mit den mit dem Pilz infizierten Wurzeln in Kontakt kommen (Abb.4-1-2). Die Arabidopsis Samen wurden zuerst nach der Oberflächesterilisation auf Knop-Medium angesät. Nach 4 Tagen wurden die Wurzelspitzen abgeschnitten mit einem Skalpel, um die Bildung von Seitenwurzeln auszulösen. Die Pflänzchen wurden nach 6 Tagen vorsichtig und möglichst ohne Wurzelverletzung auf die dreigeteilte Petrischale, gefüllt mit Knop-Medium, übertragen, wobei die Wurzeln möglichst gleichmäßig auf beide Seiten aufgeteilt wurden. Die Pflanzen wurden nach 14 Tagen mit 50 Infektionslarven von *M. incognita* inokuliert. Die Inokulation mit Pilz wurde zu 3 Zeitpunkten durchgeführt:

- 1) 3 Tage vor der Nematoden-Inokulation (-3) Variante
- 2) Zugleich mit der Nematoden-Inokulation (0) Variante
- 3) 3 Tage nach der Nematoden-Inokulation (+3) Variante
- 4) Kontrollpflanzen, deren Wurzel nur auf einer Seite mit den Nematoden inokuliert werden.

Die Pilzinokulation erfolgte mit einem Stück Myzel (Durchmesser 1cm), ausgestanzt aus PDA-Medium etwa 1cm entfernt von der Wurzel. Die Petrischalen wurden danach noch 14 Tagen im

Klimaraum aufbewahrt. Sie wurden nach Inokulation mit Nematoden etwa 24 Stunden im Dunkel gelagert.

14 Tage nach der Nematoden-Inokulation wurden die produzierten Gallen pro 10 Wurzelspitze ausgezählt. Deswegen wurde jedesmal bei der Nematodeninokulation die Anzahl von Wurzelspitzen in Nematodenkammer gezählt. Der Versuch wurde 3 Mal unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

3.10 Mikroskopische Untersuchung der Wurzelbesiedelung durch P. indica durch Färbungen pilzlicher Strukturen in den Wurzeln

Für die Anfärbung wurden die Wurzeln in 10% (w/v) KOH im Wasserbad bei 90°C 5 min inkubiert, danach mit Wasser gewaschen und anschließend in 1%ige HCl-Lösung überführt. Darin wurden die Wurzel bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nach dem Ansäuern der Wurzel wurden diese in Cottenblue-Färbelösung überführt und durch erneutes Erhitzen im Wasserbad erfolgte der Färbeprozess. Die Wurzeln wurden danach mit Wasser gewaschen und darin bis zur mikroskopischen Betrachtung gelagert. Die Besiedelung der gefärbten Wurzeln wurde mittels Lichtmikroskopie (Inverses Mikroskop, Axiovert 200M, Zeiss) überprüft. Zur Erkennung der sehr dünnen Hyphenstrukturen und der birnenförmigen Chlamidosporen des Pilzes wurden die Wurzelstücke von unterschiedlichen Bereichen präpariert. Nach der Färbung der Wurzeln wurden sie auf Objektträger aufgelegt und mikroskopisch untersucht.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Besiedlung von *Arabidopsis thaliana* mit dem pilzlichen Wurzelendophyten *P. indica* auf Wurzel und Spross und der Einfluss des Pilzes auf den Befall des Wurzelgallennematoden *M. incognita* untersucht.

Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Kapitel. Im ersten Teil wird die Besiedelung der Arabidopsis Wurzeln durch den Pilz und deren systemischer Einfluss auf *M. incognita* Befall untersucht. Im zweiten Teil werden die Auswirkungen von Kulturfiltrat des Pilzes auf das Wachstum, die Entwicklung und die Biomasseproduktion der Tomate charakterisiert.

Im dritten Kapitel steht der Einfluss von Kulturfiltrat auf die Gallenproduktion durch den Befall von *M. incognita* und in der Interaktion mit den Nematoden im Vordergrund. Das vierte Kapitel beschäftigt sich mit dem Einfluss des Pilzes auf die Ertragskomponente von *A. thaliana* auch in der Interaktion mit den Nematoden. Schließlich das letzte Kapitel beleuchtet den Einfluss des Wurzelendophyten auf den Nematodenbefall durch die Untersuchung der gebildeten Gallen in Tomate-Töpfen.

4.1 Mikroskopischer Nachweis von der Wurzelbesiedlung durch *P. indica*

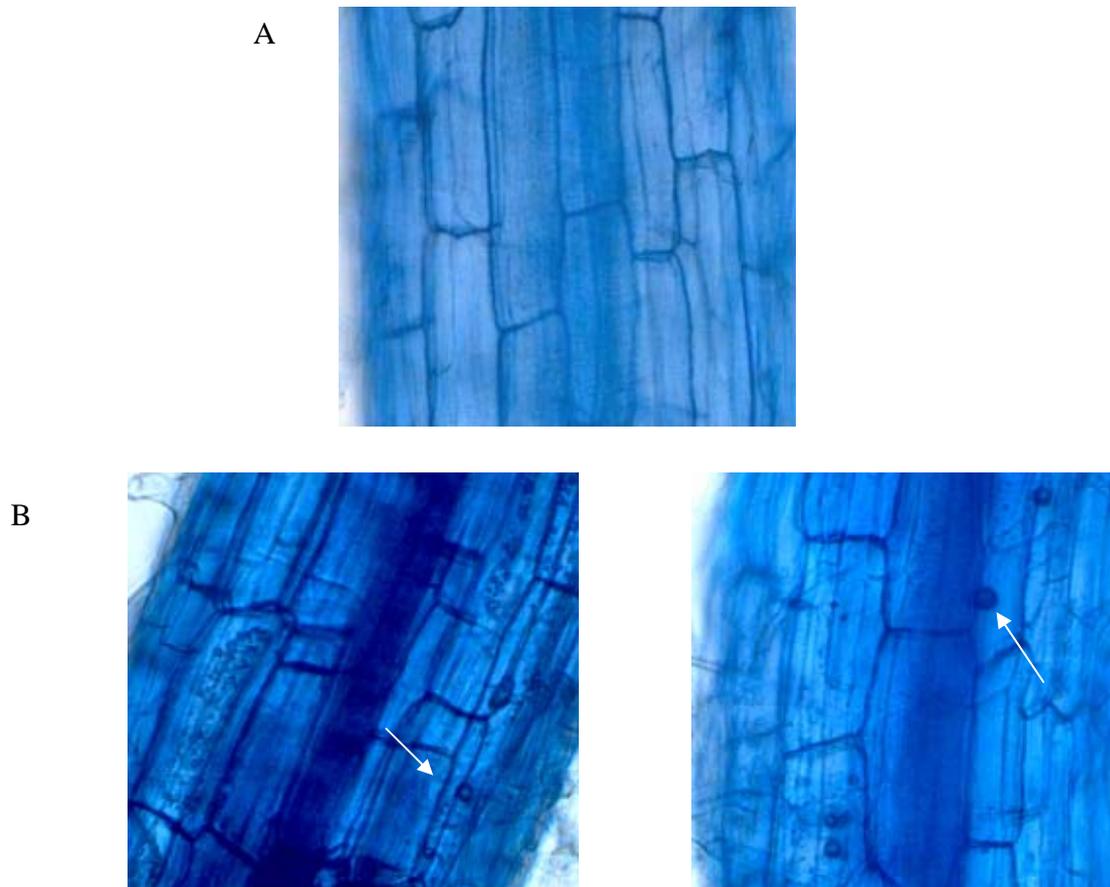


Abb. 4-1: Wurzel von Tomate (Moneymaker) nach der Inokulation mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica*. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von nichtbesiedelten (A) bzw. besiedelten (B) Tomatenwurzeln im Durchlicht. Zu erkennen sind die mit Cottenblue angefärbten intrazellulären Chlamydo-sporen des Pilzes in besiedelten Pflanzenwurzeln. Pfeil: Chlamydo-sporen.

4.2 Systemischer Einfluss von *P. indica* auf Gallenbildung von Nematoden in Petrischalen

Eine signifikante Abnahme in der Gallenzahl wurde in der Variante (-3) festgestellt, in der die Pflanzen 3 Tage vor der Nematoden-Inokulation das Pilz-Inokulum bekommen haben, im

Vergleich zu der Kontrolle, die nicht mit dem Pilz behandelt wurde. Bei den anderen zwei Varianten, die entweder zugleich mit den Nematoden oder 3 Tage nach der Nematodeninokulation mit *P. indica* inokuliert wurden, zeigte sich zwar eine Reduktion der Gallenproduktion im Vergleich zu der Kontrolle, aber ohne statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 4-2-1).

Zu den oftmals deutlich sichtbaren Unterschieden in der Größe der Pflanzen zeigte sich hier aber keine deutliche Erhöhung der Pflanzengröße zwischen behandelten Varianten und der Kontrolle mit *P. indica* und es wurden visuell keine Wachstumsunterschiede verzeichnet (siehe die Abb. 4.2.2).

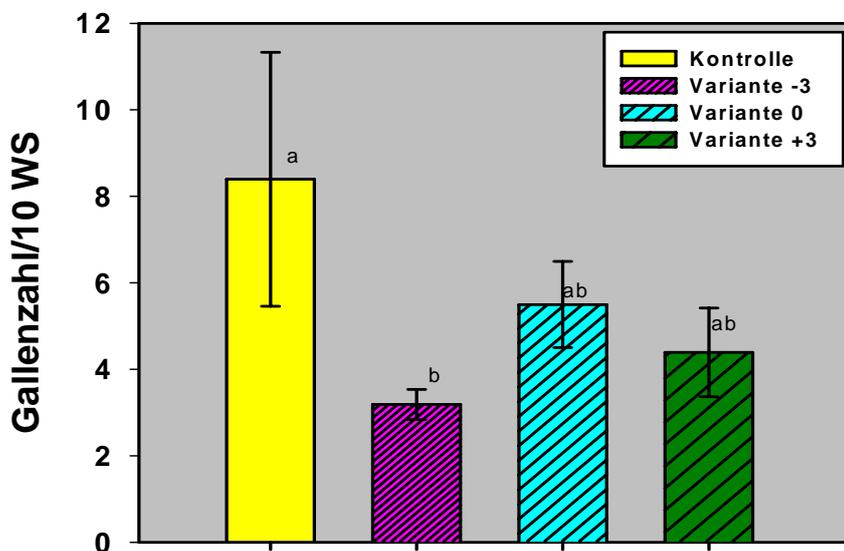


Abb. 4-2-1: Auswirkung der Behandlung mit *P. indica* auf die Gallenentwicklung von *M. incognita* in *A. thaliana*-Pflanzen. Kontrolle: nematodeninfizierte, nicht mit *P. indica* behandelte Pflanzen, Variante -3: Behandlung mit *P. indica* 3 Tage vor Nematodeninokulation, Variante 0: zum selben Zeitpunkt mit Pilz und Nematoden inokulierte Wurzeln und Variante (+3): Behandlung mit *P. indica* 3 Tage nach der Nematodeninokulation (a, b, ab- signifikante Unterschiede bei $P < 0,05$).

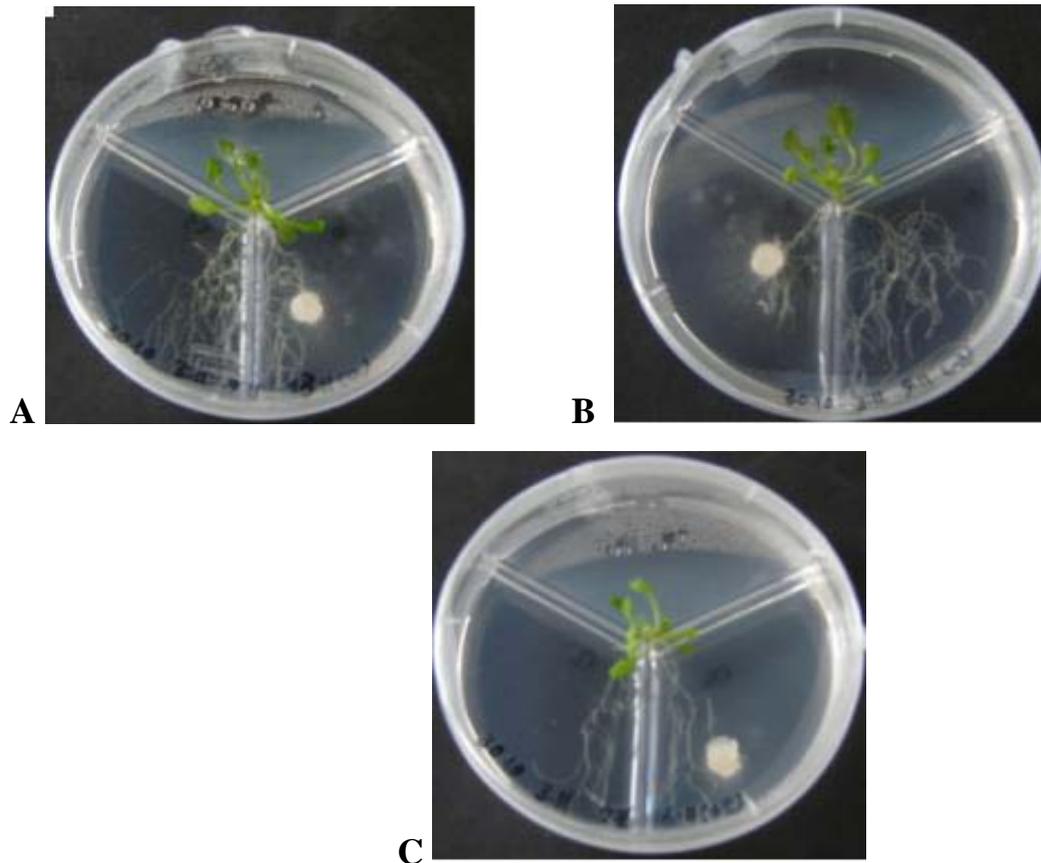


Abb. 4-2-2: Systemische Reaktion der mit *P. indica* besiedelten Arabidopsiswurzeln gegenüber nicht-besiedelten Kontrollpflanzen nach dem *M. incognita*-Befall. Fotos von *A.thaliana*-Pflanzen in drei-kammerige Petrischalen, die auf einer Seite in 3 Zeitpunkten mit dem Pilz und auf anderer Seite mit Nematoden inokuliert wurden. A (0), B (-3) und C (+3) Varianten.

4.3 Einfluss von Kulturfiltrat auf das Pflanzenwachstum bei Tomate

In diesem Teil der Arbeit wurde es untersucht, ob sich neben dem wachstumsfördernden Effekt des Pilzes auch das Kulturfiltrat des Pilzes auf das Wachstum, die Wurzelentwicklung und die Verzweigung auswirkt.

Im Falle von MS-Medium mit Saccharose haben alle Parameter bei der Auswertung zwar steigend zugenommen (Kulturfiltrat und das autoklavierte Filtrat mit der Kontrolle (H₂O) und dem Medium verglichen) aber die Unterschiede sind nicht überall signifikant. Der Zuwachs der Frisch- und Trockengewichtswerte bei der Behandlung mit dem Kulturfiltrat ist im Vergleich mit der Behandlung mit Wasser und mit Medium statistisch signifikant. Bei der Wurzellänge erreicht die

Kulturfiltratbehandlung eine signifikante Differenz nur gegenüber den wasserbehandelten Pflanzen. Im Gegensatz dazu zeigt sich ein deutlicher Anstieg in allen ausgewerteten Wachstumsparametern zwischen den mit dem Wasser und mit dem Medium behandelten Pflanzen gegenüber der mit Kulturfiltrat behandelten Variante, wenn das Kulturmedium, auf dem die Pflanzen angezchtet wurden, Glukose beinhaltete. Es lassen sich auch dabei signifikante Unterschiede zwischen den mit autoklaviertem Kulturfiltrat behandelten Pflanzen und den Kontrollpflanzen bezüglich der Biomasseproduktion (Frisch- und Trockengewicht) und Wurzellänge erkennen. Nur in der Wurzelverzweigung wurde keine erhebliche Zunahme zwischen den oben genannten Behandlungen beobachtet (Abb 4-3-2).

In keinem von beiden Medien wurde eine deutliche Zunahme der Wachstumskriterien beobachtet, wenn die mit reinem Medium (ohne Pilzmyzel) behandelten Pflanzen mit den mit Wasser behandelten Kontrollpflanzen verglichen wurden (Abb 4-3-2, Abb. 4-3-3).



Abb. 4-3-1: Einfluss von *P. indica*-Kulturfiltrat auf das Wachstum von Tomatenpflanzen. Die Petrischalen auf der linken Seite zeigen 10 Tage Pflanzen nach der Behandlung mit dem Kulturfiltrat und die Petrischalen auf der rechten Seite stellen wasser-behandelte Pflanzen dar.

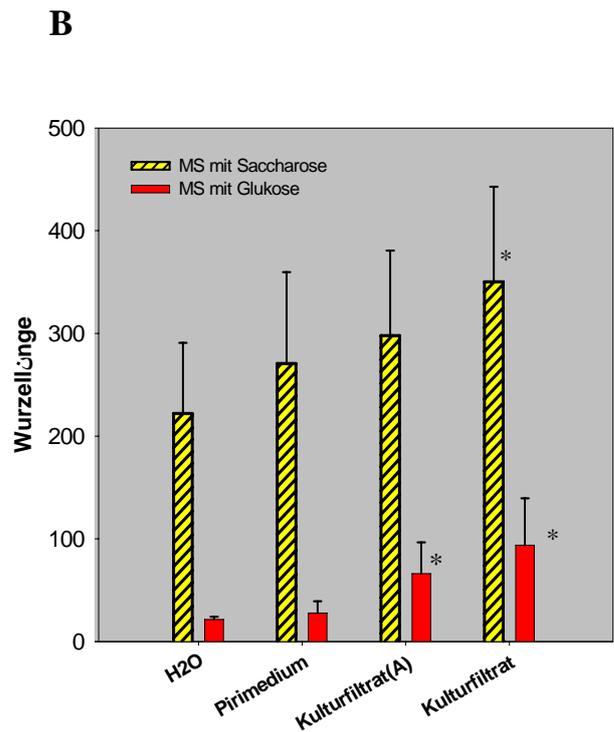
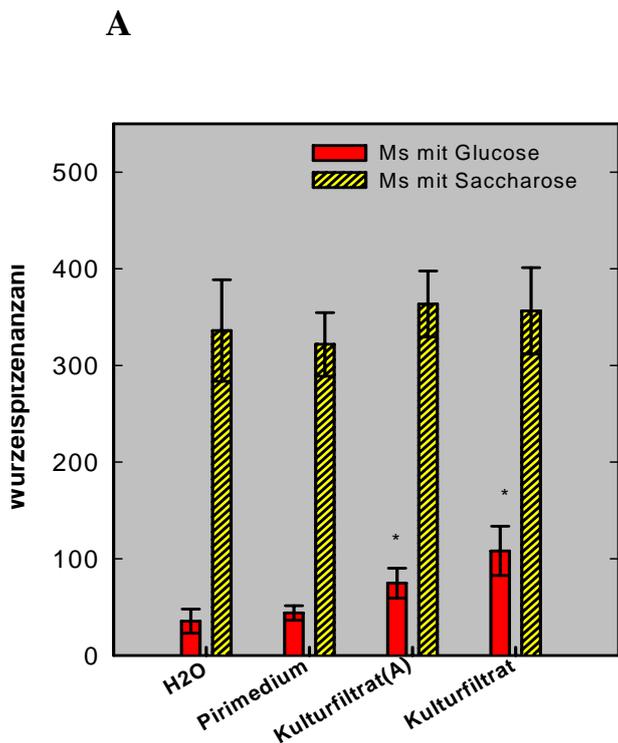


Abb. 4-3-2: Die Auswirkung des Kulturfiltrats des Pilzes auf Wurzelsystem der Tomate: (A), in dieser Graphik wurde die mit H₂O behandelte Variante als Kontrolle betrachtet. Die Zunahme der Wurzelspitzenanzahl auf Nährmedium mit Glukose ist statistisch signifikant. In (B) ist die Wurzellänge von Tomatenpflanzen, behandelt mit Kulturfiltrat und autoklaviertem Kulturfiltrat auf MS Medium mit Glukose, singnifikant höher als im Falle von Kontrollpflanzen. Auf dem Ms Medium mit Saccharose ist nur die Auswirkung des Kulturfiltrats in dieser Hinsicht statistisch signifikant [LSD(0,05)].

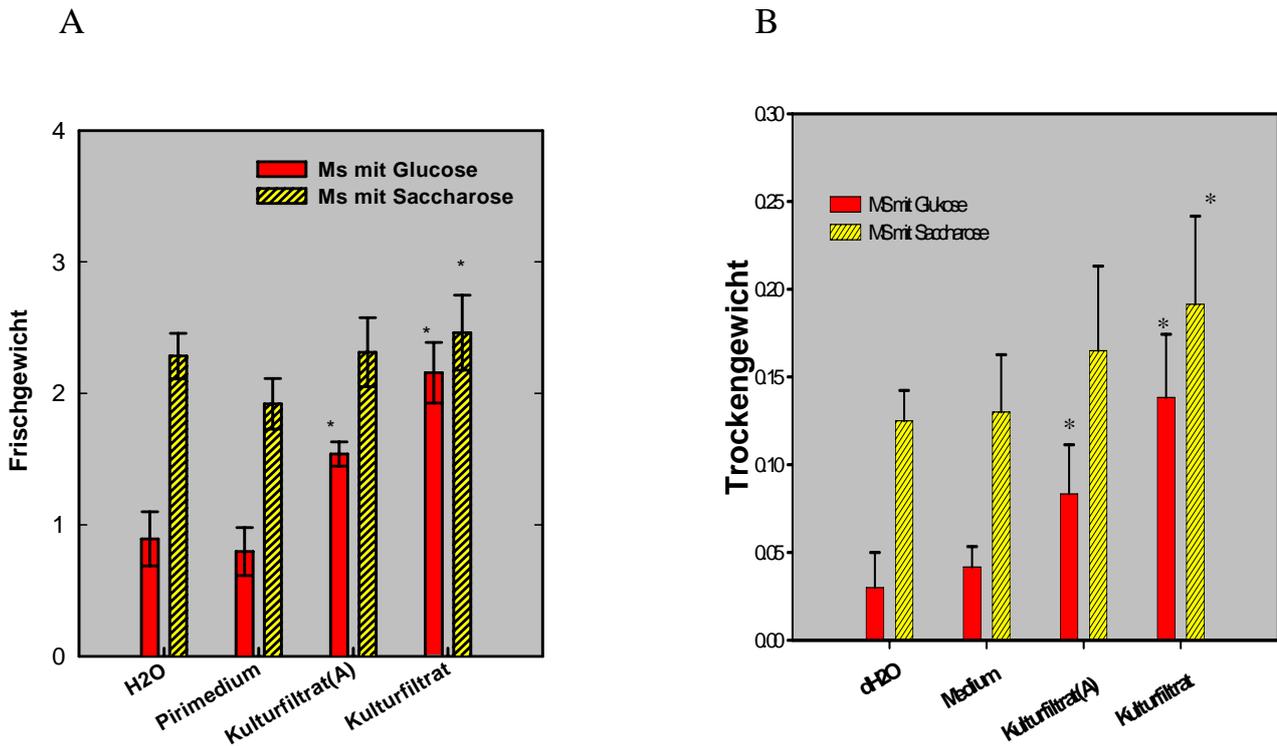


Abb. 4-2-3: Die Auswirkung von *P. indica*-Kulturfiltrat auf die Biomasse-Produktion in Tomate (Moneymaker): Auf dem MS-Medium mit Glukose erreicht die Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen bei Behandlungen mit dem Kulturfiltrat und dem autoklavierten Kulturfiltrat die höchsten Werte, die sich bei der statistischen Analyse signifikant herausstellten. Auf dem Medium mit Saccharose ist die signifikante Erhöhung diesbezüglich nur bei Behandlung mit dem Kulturfiltrat sichtbar. Zwischen dem Medium und der Behandlung mit Wasser ist kein Unterschied zu sehen [LSD(0,05)].

4.4 Einfluss von Kulturfiltrat des Pilzes auf die Gallenbildung der Nematoden bei Tomate

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss von *P. indica*-Kulturfiltrat auf den Befall von *M. incognita* charakterisiert. Es wurde die Reduktion der produzierten Wurzelgallen durch den Einfluss von Kulturfiltrat auf die Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die nicht mit *P. indica* Kulturfiltrat behandelt wurden, festgestellt. Diese Abnahme an Gallenentwicklung hat sich allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit als signifikant herausgestellt.

Gleiche Tendenzen ergaben sich auch für die Sprossgewicht (frisch und trocken). Die waren allerdings sehr geringfügig und nicht signifikant.

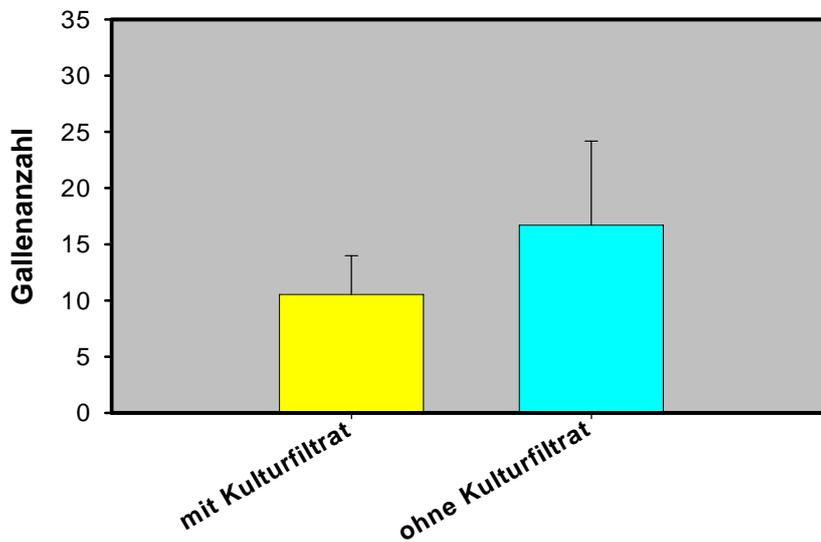


Abb-4.4: Vergleich des Effektes von *P. indica*-Kulturfiltrat auf Gallenbildung von *M. incognita* an Tomate. Angegeben ist die gemittelte Gallenanzahl pro g Wurzel. Behandlung mit dem Kulturfiltrat (1) und Kontrolle (2).

4.5 Einfluss vom *P. indica* auf die Ertrags- und Wachstumsparameter bei *A. thaliana* in Topfversuchen

Die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* zeigt unterschiedliche Auswirkungen auf die Pflanzen, von denen der Einfluss auf das Wachstum die deutlichste und am häufigsten beschriebene ist (Sahay & Varma, 1999; Varma *et al.*, 1999; Varma *et al.*, 2000a; Peskan-Berghöfer *et al.*, 2004; Kaldorf *et al.*, 2005). In diesem Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der Besiedelung des Pilzes in den Wurzeln von *A. thaliana* auf das Wachstum und den Ertrag der Pflanzen untersucht. Nebenbei wurden die Auswirkungen vom Pilz auf diese Parameter in der Pflanze in der Interaktion mit dem Wurzelgallennematoden *M. incognita* untersucht.

- **Frischgewicht:**

Die Besiedelung der Wurzeln von *P. indica* hatte einen positiven Effekt auf das Wachstum der gesamten Pflanze zur Folge. Die besiedelten Pflanzen waren insgesamt größer und zeigten einen kräftigeren Spross, mehrere Blätter, breitere Blattspreiten, sowie ein stärkeres Wurzelwachstum

und mehr Produktion an Schoten. Zudem war die Schotenentwicklung in den mit *P. indica* besiedelten Pflanzen beschleunigt.

Die Frischgewichte aller Varianten, die von *P. indica* besiedelt sind, zeigen auf einem deutlichen Niveau und statistisch betrachtet unabhängig von der Menge des Inokulums gleichermaßen anwachsende Werte, verglichen mit den Pflanzen, mit denen keine Pilzbehandlung durchgeführt wurde und den Pflanzen, die mit den Nematoden inokuliert wurden. Dagegen zeigen in diesem Experiment die unbehandelten (Col) und die mit den Nematoden behandelten Pflanzen keinen erheblichen Unterschied bezüglich des Frischgewichts zueinander.

Die höchste Menge am produzierten Frischgewicht zeigen die mit 3% Pilzinokulum besiedelten Pflanzen. Die mit 1% Pilzmyzel behandelten Pflanzen nehmen die zweite Stelle bezüglich Frischgewichtproduktion ein und die geringste Menge tritt auf, als die Pflanzen von Nematoden befallen waren und keiner Behandlung mit dem Pilz unterzogen wurden. In den von Nematoden befallenen Varianten, die mit *P. indica* behandelt wurden, scheint es, dass der beträchtliche negative Einfluss auf das Wachstum und das Frischgewicht der Pflanzen hervorgerufen durch den Befall von den Wurzelgallennematoden, aufgrund der aufhebenden Funktion von *P. indica* gelindert wird.

A



B



Abb. 4-5-1: *A. thaliana* nach Besiedelung mit *P. indica*. Behandelte Pflanzen jeweils oben eine Woche und unten zwei Wochen nach der Behandlung mit *P. indica* zeigen gegenüber den Kontrollen deutliche Unterschiede in Blattbreite (jüngste Blätter) (A) und Sprosslänge (B). Von rechts nach links: Kontrolle, (1%) Pilzinokulum, (3%) Pilzinokulum.

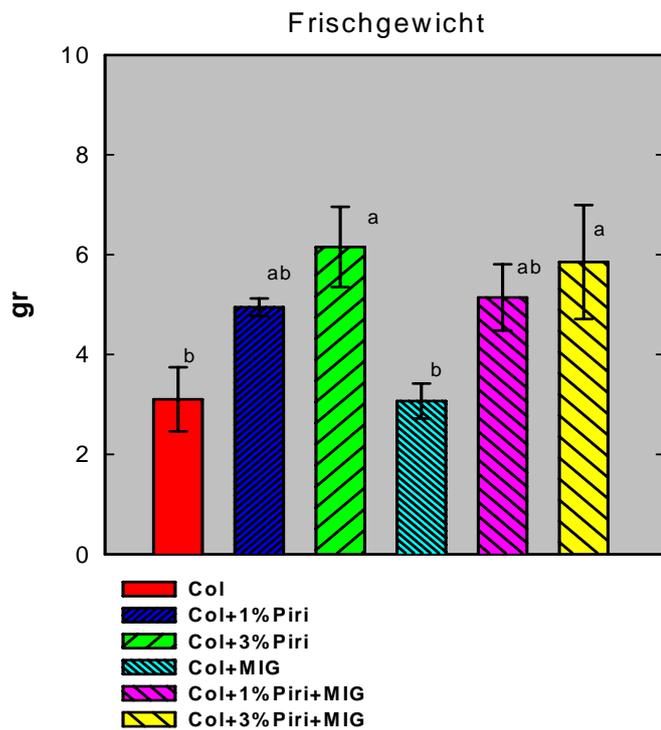


Abb.4-5-2: Einfluss der Besiedlung mit *P. indica* auf das Frischgewicht von *Arabidopsis thaliana* auch in der Interaktion mit *M.incognita*. Dargestellt sind die Mittelwerte der Frischgewichte und deren Standardfehler. Signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen allen mit 3% Inokulum behandelten und nicht-behandelten Pflanzen ($P < 0,05$). Die mit 1% Pilzinokulum infizierten Pflanzen zeigen jedoch keine statistisch signifikante Zunahme an Frischgewicht.

Trockengewicht

Ähnliche signifikante Unterschiede zeigen sich auch bei dem Trockengewicht-Kriterium, jedoch weist die Behandlung mit (1%) Inokulum diesbezüglich mehr Effekt im Vergleich zu (3%) Variante auf. Es wurde weiterhin keine Störung in der Produktion der Trockenmasse durch die Nematodeninfektion registriert, wenn die Pflanzen durch den Pilz besiedelt sind.

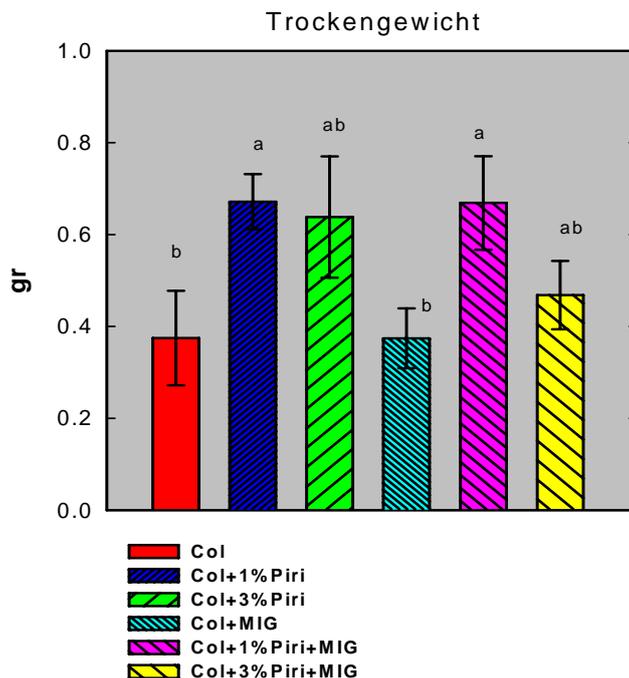


Abb. 4-5-3: Einfluss der Besiedlung von *P. indica* auf das Trockengewicht von *Arabidopsis thaliana* auch in der Interaktion mit Wurzelgallennematoden *M. incognita*. Dargestellt sind die Mittelwerte der Trockengewichte und deren Standardfehler. Die signifikante Zunahme des Trockengewichtes von den mit (1%) Pilzinokulum behandelten zu nicht behandelten (Col) und den von *M. incognita* befallenen (Col+Mig) Pflanzen ist gezeigt ($P < 0,05$).

- **Samenproduktion**

Bezüglich der Samenproduktion hat die Variante mit (1%) Inokulum die höchste Leistung erbracht, während sie beim Frischgewicht interessanterweise in den Varianten mit (3%) Pilz zu finden ist. An zweiter Stelle zeigt sich die Variante (Col+3% Pilz). Im Gegensatz zu den anderen ausgewerteten Parametern (Frisch- und Trockengewicht) zeigen hier die durch Nematoden befallenen und nicht befallenen Pilzvarianten einen deutlichen Unterschied zueinander. Die Besiedlung der Pflanzen durch (1%) Pilzmyzel verhält sich dem Nematodenbefall gegenüber ausgleichend, während dieser Effekt nicht bei (3%) Pilzinokulum zu verzeichnen ist. Bei diesem ist zwar die Erhöhung an Samenentwicklung im Vergleich zu der Variante (Col+Mig) zu sehen, doch ist sie nicht signifikant. Die geringste Anzahl an Samen weist die Variante (Col+Mig) auf. Unerwartet ist die geringe Samenmenge bei der Variante Col+Mig+3 % Pilz im Vergleich zu der unbehandelten Variante (Col), obwohl sie beim Frischgewicht im Vergleich zur unbehandelten Variante (Col) deutlich höhere Werte aufweist.

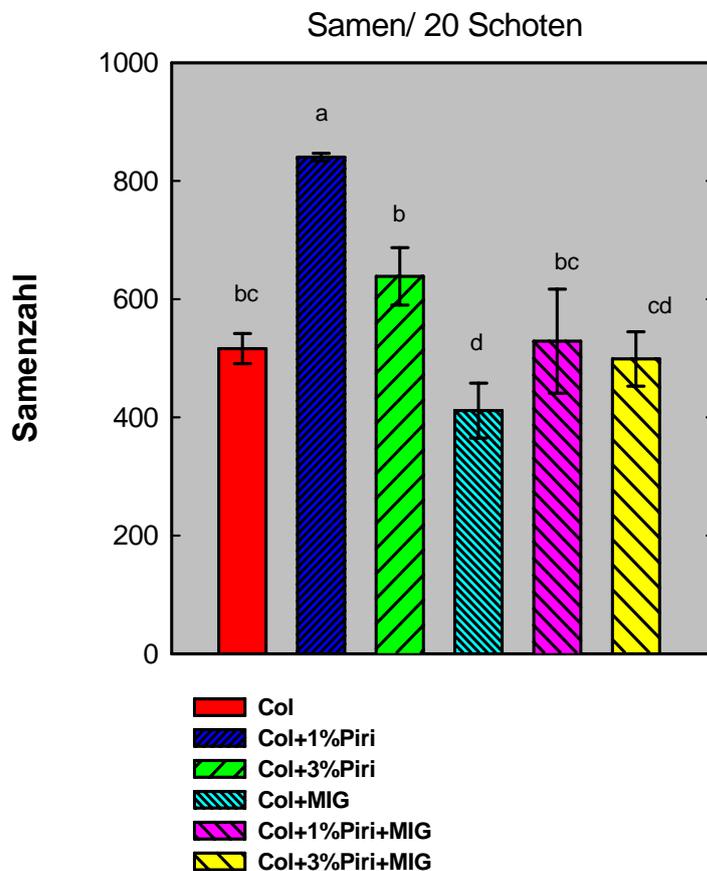


Abb. 4-5-4: Die Auswirkung von *P. indica* auf die Samenproduktion von *A. thaliana* auch in Wechselwirkung mit Wurzelgallennematoden *M. incognita*. Samenproduktion wurde in behandelten Varianten durch (1%) und (3%) Pilzinokulum zu den unbehandelten (Col) und mit *M. incognita* inokulierten (Col+Mig) Pflanzen statistisch signifikant erhöht ($P < 0,05$). Der Anteil von (3%) Pilzinokulum zu Verringerung des beträchtlichen Effekts von den Nematoden bezüglich der Samenentwicklung ist jedoch nicht groß.

4.6 Direkter Einfluss des Pilzes auf die Gallenbildung bei Tomate im Topfversuch

Zur Untersuchung der Frage, ob sich bei neben dem wachstumsfördernden Effekt des Pilzes auch ein Einfluss auf die Entwicklung der Wurzelgallen beobachten lässt, wurde ein Gefäßexperiment unter Langtagbedingungen durchgeführt. Die Wahl der Versuchspflanze basierte auf der Überlegung, dass die Besiedelung der Tomate mit *P. indica* ihre Nährstoffaufnahme verbessern könnte und, dass sich Tomatenwurzel für die Untersuchungen gut eignen würden.

Der Einfluss des Pilzes zeigte sich in beiden Parametern, besonders jedoch bei der Gallenentwicklung pro (g) Wurzel, als sehr deutlich. In Abb. (4-6-1) ist die relative Anzahl der gebildeten Gallen der Pilzvarianten im Vergleich zu der nicht mit dem Pilz infizierten Kontrolle dargestellt. Diese Graphik zeigt, dass die verringerte Gallenbildung in den Wurzeln sowohl in der Variante mit (1%) Pilz als auch in der Variante (3%) im Vergleich zu der Kontrolle (Col+Mig) auf dem positiven Einfluss des Pilzes zurückzuführen ist.

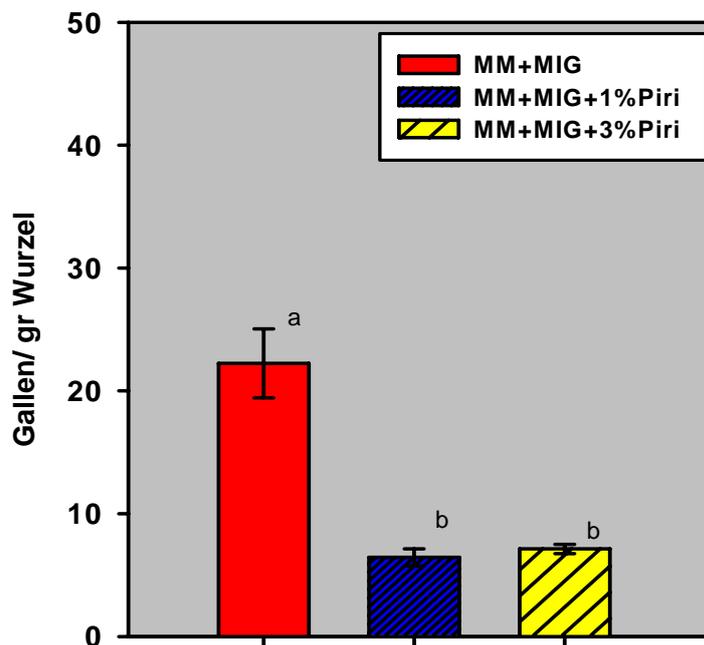


Abb. 4-6-1: Befallreduktion von *M. incognita* in den von *P. indica* besiedelten Tomatenpflanzen ($P < 0,01$). Die Anzahl der gebildeten Gallen wurde durch die Pilzinfektion in Varianten: MM+MIG+1% Pilz und MM+MIG+3% Pilz im Vergleich zu der Kontrolle signifikant reduziert.

Ähnlich wie bei Arabidopsis trägt das (3%) Pilzinokulum mehr als (1%) zur Frischgewichtsentwicklung bei. Bei Tomate jedoch, rein visuell gesehen, zeigen die durch (3%) *P. indica* besiedelten Pflanzen eine deutlich stärkere Vergrößerung der Wuchshöhe im Vergleich mit den mit (1%) inokulierten Pflanzen. Die Sprosslänge wurde als doppelt so groß wie bei den durch (1%) besiedelten Pflanzen bemessen, aber die Erhöhung der Frischgewicht ist nicht statistisch absicherbar. Es wird vermutet, dass der Pilz mehr Raum und dadurch mehr Nährstoffnachschub für

die Offenbarung seiner wachstumsförderten Effekte braucht als die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gefäße zur Verfügung stellen.

Aus den Werten erkennt man, dass sich die Behandlung mit (3%) Pilz, sowohl in Zusammenhang mit Nematodeninokulation (MM+Mig+Pilz3%) als auch ohne Nematodeninokulation (MM+Pilz3%) im Vergleich zu den entsprechenden Varianten mit (1%) Pilzinokulum stärker fördernd auf die Biomasse-Produktion auswirkt. Die durch Wurzelendophyten besiedelten Pflanzen zeigen in jedem Fall im Vergleich zu den unbehandelten (MM) und durch Nematoden befallenen (MM+Mig) Pflanzen ein deutlich verbessertes Wachstum.

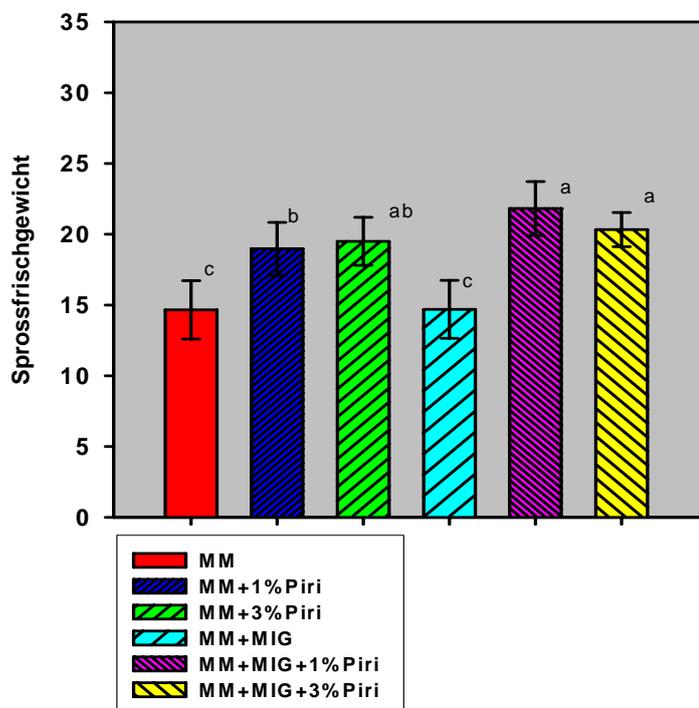


Abb. 4-6-2: Einfluss der Besiedlung von *P. indica* auf das Frischgewicht von Tomate (MoneyMaker) auch in der Interaktion mit *M. incognita*. Dargestellt ist der positive Einfluss des Pilzes auf das Frischgewicht in Tomatenpflanzen in Vergleich zu der Kontrolle und den durch Nematoden inokulierten Pflanzen.

A



B



Abb. 4-6-3: Vergleich der Wachstumsunterschiede durch den Einfluss von *P. indica* in Tomatenpflanzen. In (A) ist das Potenzial von *P. indica*, höhere Sprosslänge zu schaffen, dargestellt. Von rechts nach links sind die Varianten (MM), (MM+1%Pilz), (MM+3%Pilz) zu sehen. In (B) sind die Unterschiede in der Wuchshöhe in Varianten (von rechts nach links), MM+Mig, MM+Mig+1%Pilz, MM+Mig+3%Pilz, gezeigt. Alle Pflanzen wurden 21 Tage nach der Pilzbehandlung und 14 Tage nach der Inokulation mit Nematoden fotografiert.

5 Diskussion

Einflüsse von Mikroorganismen, die mit Pflanzen interagieren, können sehr unterschiedlich sein. Das Spektrum reicht von parasitären bis zu mutualistischen Interaktionstypen und ist damit breit und äußerst vielfältig. In der Rhizosphäre sind die Pflanzen vielen dieser Mikroorganismen ausgesetzt. Pilze, die in enger Assoziation mit Pflanzen leben, können eine beträchtliche Bandbreite von Wirkungen auf diese haben. Sie können in Abhängigkeit der betreffenden Interaktionspartner und zusätzlicher biotischer und abiotischer Faktoren von schädlich bis nützlich reichen. Die verschiedenen Mykorrhiza-Typen sind gut untersuchte Beispiele symbiontischer Wechselwirkungen solcher Pilze. Sie sind von großer Bedeutung für die Mobilisierung von Nährstoffen aus dem Boden und deren Bereitstellung für die Wirtspflanze. Dies erfolgt mittels der in der Umgebung der Pflanze übergreifenden Pilzhyphen, die wesentlich feiner als Wurzelhaare sind und daher eine größere Oberfläche besitzen.

Endophytische Pilze sind ein weiteres Beispiel einer potentiell symbiontischen Interaktion. Hierbei leben die Pilze ohne offenkundige Symptome zu verursachen vollständig im Inneren des Pflanzengewebes. Sie vermitteln ihrer Wirtspflanze erhöhte Vitalität und erhalten von dieser im Gegenzug Nährstoffe und einen sicheren Lebensraum. Die Besiedlung einer Pflanze mit endophytischen Pilzen kann eine tiefgreifende Änderung des physiologischen Zustands der Pflanze bewirken, welcher sich unter anderem in einer veränderten Interaktion mit Schaderregern ausdrückt.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem direkten und systemischen Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf *Arabidopsis thaliana* und Tomate in der Interaktion mit dem pflanzenparasitären Nematoden *Meloidogyne incognita*.

5.1 Einfluss von *P. indica* auf das Wachstum und Ertragsmerkmale an *A. thaliana* und Tomate

Die deutlichste Auswirkung von *P. indica* zeigte sich bisher in einem verstärkten Wachstum der von ihm besiedelten Pflanzenarten (SHAHAY & VARMA, 1999; VARMA et al., 1999; PESKAN-BERGHÖFER et al., 2004). In der Literatur werden vor allem drei Gründe für eine Wachstumsförderung von Wurzelendophyten auf ihren Wirt diskutiert: (i) verbesserte Nährstoffversorgung der Pflanze durch die Mikroorganismen („Biodünger-Wirkung“), (ii) ein Eingriff in den Hormonhaushalt der Pflanzen („Bioregulator-Wirkung“), oder (iii) der Schutz vor biotischem als auch abiotischem Stress („Bioprotektor-Wirkung“) (GIANINAZZI et al., 1995; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieser Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Pflanzen festgestellt werden. Es wurde unabhängig von der Inokulummenge des Wurzelendophyten (Myzelzusatz 3% oder 1%) eine Änderung des Pflanzenwachstums beobachtet. Statistisch signifikante waren diese Änderungen, als die Pflanzen mit 3% Pilzmyzel behandelt wurden. Selbst eine Infektion mit Wurzelgallennematoden, *M. incognita*, führte dank der Besiedlung der Pflanzen durch *P. indica* zu keiner Wachstumsbeeinträchtigung

In Tomatenpflanzen wirkte sich die Behandlung mit *P. indica* ebenfalls wachstumsfördernd und schadensvermindernd aus. Besonders die mit 3% Pilzmyzel behandelten Pflanzen zeigen enorme Wuchshöhe verglichen mit Kontrollpflanzen, die nicht mit dem Pilz behandelt sind (Abb. 4-6-3). In diesem Experiment weisen die sowohl mit *M. incognita* als auch mit *P. indica* befallenen Pflanzen beinahe doppelt so viel Sprossgewicht auf als die nematodeninfizierten Pflanzen, die nicht mit dem Pilz inokuliert waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde immer das Pilzmyzel als Inokulum benutzt. Es wurde aber schon früher gezeigt, dass die positiven Wachstumseffekte des Pilzes unabhängig davon sind, ob die Inokulation mit Myzel oder auch Sporen durchgeführt wird (WALLER et al., 2005).

Es wurde in anderen Experimenten von einer Kompensation der von *M. incognita* verursachten Verluste mit Hilfe des wachstumsfördernden Effekts anderer pilzlichen Endophyten und auch Mykorrhiza-Pilze berichtet. So untersuchten TALAVERA et al. (2001) die Auswirkung von *Glomus mosseae*, einem Mykorrhiza-Pilz, gegen *M. incognita* in Tomate und stellten fest, dass bei einer gleichzeitigen Inokulation von *M. incognita* und Mykorrhiza-Pilz kein kompensierender Effekt auftrat. Wenn die Pflanzen dagegen 3 Wochen nach der Behandlung der Pflanzen mit *Glomus*

mosseae mit den Nematoden inokuliert wurden, zeigte das Sprossgewicht 24% Erhöhung im Vergleich zu den Pflanzen, die nur mit Nematoden inokuliert wurden. In dieser Arbeit wurde zwischen der Pilz-Inokulation und der Nematoden-Inokulation ein Zeitraum von 2 Wochen eingeräumt.

In einem Gefäßexperiment von VARMA et al. (1998) haben sich das Sprossgewicht und Wurzelgewicht von Mais (*Zea mays* L.), Tabak (*Nicotiana tabaccum* L.) und der Petersilie (*Petroselinum crispum* L.) angesichts der Besiedlung ihrer Wurzeln durch *P. indica* verdoppelt. Dieser Effekt in den infizierten Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen lässt sich in dieser Arbeit bei Tomatenpflanzen ebenfalls feststellen, auch wenn die Tomaten durch die Nematoden befallen sind. Gleiche Ergebnisse wurden bei Arabidopsis Pflanzen erzielt, wenn die mit 3% Pilzinokulum inokuliert waren.

Durch *P. indica*-Besiedelung konnte neben dem Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Arabidopsis Pflanzen auch ein größerer Ertrag pro Gefäß gezeigt werden. Hier zeigt die Behandlung mit 1% Pilzinokulum das höchste Potenzial zur Samenproduktion. Die Behandlung mit 3% Pilzinokulum führt auch bei befallenen Pflanzen zu einer erhöhten Biomasseproduktion. Im Bezug auf die Samenentwicklung (Samen/Schote) ist dieser Effekt deutlich geringer bzw. ist sogar eine Reduktion zu beobachten. Hier konnte eine Konkurrenz zwischen den generativen Organen der Pflanze, dem Pilz und den Nematoden wirksam werden.

Die Besiedelung der Pflanzen mit (1%) *P. indica* wirkt sich scheinbar in erster Linie mit einer Ertragssteigerung der Pflanzen aus. WALLER et al. (2005) haben einen ähnlichen Effekt bei der Gerste, *Hordeum vulgare*, die mit *P. indica* inokuliert war, festgestellt. Hier wurde eine Ertragssteigerung um bis 11% beobachtet.

5.2 Wirkung von Kulturfiltrat

Aus dem *P. indica* angefertigten Kulturfiltrat wurde hier in Bezug auf eine mögliche pflanzenwachstumsfördernde Fähigkeit an Tomate zwei Nährmedien getestet. Das Kulturfiltrat des Pilzes optimiert erheblich alle Wachstumsparameter der Pflanzen, die auf dem suboptimalen Medium mit Glukose wachsen, wenn mit der Wasser- oder der Medium-Behandlung verglichen. Auch das autoklavierte Kulturfiltrat erweist sich hier als deutlich nützlich zur Förderung des

Pflanzenwachstums, wobei Wurzelverzweigung signifikant geringer ist als die nach der Behandlung mit dem nicht autoklavierten Filtrat. Auf dem für Pflanzen optimalen Medium (mit Saccharose) hat das autoklavierte Filtrat allerdings überhaupt keine fördernde Funktion. Durch Autoklavierung des Kulturfiltrates wird die Funktion von hitzeempfindlichen Komponenten wie Hormonen und Proteinen ausgeschlossen. Eine weitere Analyse des Kulturfiltrates ist sicherlich angebracht, denn Substanzen, die die Entwicklung der Pflanzen positiv beeinflussen, wurden in verschiedenen Pflanze-Pilz-Interaktionen festgestellt. Zu diesen gehören Pflanzenwachstumshormone, deren alle fünf Klassen (Auxine, Abscisine, Ethylene, Gibbereline und Kinetine) durch endophytische Mikroorganismen freigesetzt werden können (GOODMAN *et al.* 1986). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Komponente, die der Pilz ins Medium absondert, positive Effekte auf die Pflanzenentwicklung haben und dass der fördernde Effekt des Filtrats im suboptimalen Medium größer ist. In einem Versuch von VARMA *et al.* (1998) wurde der Einfluss des *P. indica*-Kulturfiltrats auf Mais geprüft. Das Frischgewicht von Maispflanzen wurde hierbei ähnlich wie in dieser Arbeit erheblich von Kulturfiltrat des Pilzes beeinflusst, nicht aber die Wurzelentwicklung.

Die Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze je nach Art des Wirtes kann unterschiedlich ausfallen. Häufig als pathogen beschriebene Pilzarten (CANDAU *et al.*, 1991) können in anderen Wirtsarten auch als kommensale oder mutualistische Endophyten vorkommen. Ektomykorrhiza-Pilze (SCAGEL & LINDERMAN, 1998) und AM-Pilze (BAREA & AZCON-AGUILAR, 1982) verbessern nicht nur die Entwicklung der Pflanzen, sondern auch ihre Ernährungsweise bei bidirektionalem Transfer der Nährstoffe und auch ihren Schutz gegen Pathogenen. Durch diese Interaktion erhält die Pflanze vom Pilz vor allem Phosphor, den der Pilz effizienter aufnehmen und in Form von Polyphosphaten in seiner Vakuole akkumulieren kann. Phosphor liegt zwar meist in relativ großen Mengen im Boden vor, ist jedoch in Form von schwerlöslichen Salzen oder Phytinsäuren für die Pflanze nur schwer zugänglich (HOLFORD, 1997). Die verbesserte Aufnahme von Phosphor durch den Pilz wird durch die insgesamt größere Oberfläche der feinen Hyphen, ein dadurch größeres Einzugsgebiet im Boden, Sekretion von Phosphatasen und organischen Säuren sowie durch besonders hochaffine Phosphattransporter begründet (DUFF *et al.*, 1991; BÜCKING und SHACHAR-HILL, 2005). Neben der effizienteren Aufnahme gewährleistet der Pilz durch die in der Vakuole gespeicherten Polyphosphate einen konstanten Fluß an Phosphor in Richtung Pflanzenwurzel, was einen wohl nicht zu unterschätzenden Vorteil für die Pflanze darstellt

(HARLEY und SMITH 1983). Es ist bekannt, dass Aufnahme, Transport und Transfer von Phosphat, sowie dessen Freisetzung aus Polyphosphaten durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Kohlenhydraten im Pilz gesteigert werden können (BÜCKING und SHACHAR-HILL, 2005). Ob der Wuchsförderungseffekt von *P. indica* auch wie bei der AM-Pilzen reguliert wird, ist noch fraglich.

Antagonisten können durch die Bildung antibiotischer Substanzen, Parasitierung und Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum auf die Pflanze bzw. in der Rhizosphäre direkt auf die Schaderreger einwirken. Die antagonistischen Pilze können in einer direkten Methode als biologisches Bekämpfungspotential durch hohe Besiedlung der Pflanzenwurzelzone mit den Pilzhyphen agieren. Da durch die Verwendung von Kulturfiltrat kein Pilzmyzel als Inokulumquelle gebraucht wird, musste die in dieser Arbeit gezeigte Gallenreduktion auf den indirekten Grundlagen der biologischen Pilzbekämpfung beruhen. Zu den indirekten Wirkungen zählen die Induzierung von Resistenzreaktionen der Pflanze, Produktion von toxisch-wirkenden Substanzen (Antibiosis) oder die Förderung des allgemeinen Pflanzenwachstums wodurch die Widerstandsfähigkeit der Pflanze verbessert wird. Die Aufklärung der Wirkmechanismen eines Antagonisten sollten vor allem auch Anhaltspunkte zur Verbesserung seines Bekämpfungserfolgs liefern.

Es wurde neulich aus zehn Basidiomycet-Isolaten einige pilzliche Metaboliten wie Omphalotin isoliert, die einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Nematizide gegen *M. incognita* gezeigt haben. Sie reduzieren entweder die Eindringung der Larven in die Pflanze oder vermindern ihre Aktivität im Boden wodurch die Bewegung der Larven zur Wurzel und auch die weitere Entwicklung negativ beeinflusst werden. Manche von diesen Substanzen haben eine stadienabhängige Wirkung gegenüber anderen pflanzenparasitären Nematoden wie *Pratylenchus zaeae* und *Radopholus similis* gezeigt, wobei die zweiten und dritten Larvenstadien am höchsten inaktiviert werden. Als Nematizidkomponente der Kulturfiltrate von *Aspergillus niger* wurden Zitronensäure (3-Carboxy-3-hydroxy-pentan-1,5-disäure), Oxalsäure (Ethandisäure) und nicht näher bestimmte Moleküle, die ein Molekulargewicht von mehr als 8000 haben, identifiziert (ZUCKERMAN et al., 1994).

Die Analyse eines möglichen hemmenden Effektes vom *P. indica*-Kulturfiltrat auf die Nematodenentwicklung wurde in Rahmen dieser Arbeit analysiert. Im Vergleich der mit dem Kulturfiltrat behandelten Varianten mit der Kontrolle wurde ersichtlich, dass die Substanzen in der Zusammensetzung des Kulturfiltrates eine hemmende Wirkung auf die Gallenbildung haben. Die

statistische Auswertung der Ergebnisse war jedoch wegen der beschränkten Anzahl der Pflanzen innerhalb der Behandlungen nicht signifikant.

5.3 Direkter Einfluss von P. indica auf die Bildung von Wurzelgallen

In der Literatur wurde der Wirkungsmechanismus von *P. indica* bezüglich des fördernden Effektes auf das Pflanzenwachstum, die Phosphor-Zufuhr und biologische Kontrolle gegen verschiedene Krankheitserreger ähnlich wie der von den arbuskulären Mykorrhizapilzen eingeschätzt (VERMA et al., 1998; SAHAY et al., 1999). Die Schutzaktivität des Pilzes wurde neulich gegen nekrotrophisches Pilz-Pathogen, *Fusarium culmorum*, in der Gerste in einer direkten Zusammenwirkung untersucht. Der negative Effekt des Pathogens wurde durch die Anwesenheit von *P. indica* von einer 12-fachen auf eine 2-fache Reduktion vermindert (WALLER et al., 2005). Dabei wurde spekuliert, dass der schützende Effekt des Pilzes auf den erhöhten Ascorbate-Gehalt und den Anstieg des Antioxidantenlevel in der Wurzel, der durch die Pilzinfektion induziert wird, zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit wurde hinsichtlich der Analyse der eventuellen Schutzwirkung des Pilzes gegen *M. incognita* ein Gefäßexperiment durchgeführt. Dabei war eine deutliche Reduktion der Nematodengallenanzahl sichtbar, als das Resultat der Behandlung mit dem Wurzelendophyten, unabhängig davon, ob die Pflanzen mit 1% oder 3% Pilzinokulum behandelt wurden.

Aus verschiedenen Experimenten wurden über die unterschiedlichen Funktionen der pilzlichen Endophyten gegen *M. incognita* und andere pflanzenparasitären Nematoden berichtet. HALLMANN (1994) testete endophytische Pilze wie *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium funicola* und *Colletotrichum coccodes* gegen *M. incognita* an Tomate. 20% der geprüften Isolate reduzierten die Gallenbildung um bis zu 50%. Die beste Wirkung wurde durch *Fusarium oxysporum* Isolat 162 erreicht. Neben den endophytischen Pilzen zeigen Mykorrhizapilze auch große Wirksamkeit gegen den Befall von *M. incognita* und anderen *Meloidogyne*-Arten.

Durch Vorinokulation der Tomate mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) konnte eine nachhaltige Einschränkung der Gallenbildung von *M. incognita* (bis 33%) erzielt werden (TALAVERA et al., 2001). COOPER & GRANDISON (1987) erzielten eine deutliche Verminderung der

Nematodenanzahl durch Zugabe von AM zu *M. hapla*-empfindlichen Tomatensorten. Nach AHMED & ALSYED (1991) reduzierte *G. macrocarpus* die Gallenanzahl von *M. incognita* bei Kuherbse (*Vigna sinensis*).

Als Wirkungsmechanismen von AM werden eine bessere Nährstoffaufnahme der behandelten Pflanzen, insbesondere von Phosphor (AHMED & ALSYED, 1991), und Veränderungen der Wurzelexsudate, die weniger anlockend auf Nematoden wirken, diskutiert (AHMED & ALSYED, 1991). Weiterhin konnte DUGASSA-GUBBENA (1995) eine höhere Phytohormonproduktion bei behandelten Pflanzen als bei unbehandelten Pflanzen nachweisen. Neuerdings wird auch eine mögliche Induzierung von Resistenz bzw. Verminderung der Prädisposition der Kulturpflanze gegen Krankheitserreger diskutiert (COOPER & GRANDISON, 1987).

5.4 Systemischer Einfluss von P. indica auf die Bildung von Wurzelgallen durch M.incognita an A. thaliana

Es können grundsätzlich zwei Typen von endophytischem Mutualismus unterschieden werden (CARROLL, 1988). Der erste Typ ist ein induzierbarer Mutualismus, der durch eine lockere Assoziation zwischen einem Pilz und einem Wirt charakterisiert ist (CARROLL, 1988). Dieser Typ ist in der Natur weit verbreitet und ist besonders häufig bei Holzpflanzen der *Angiospermae* (Bedecktsamer) anzutreffen. Die Wirkungen solcher Endophyten auf die Vitalität ihrer Wirtspflanzen sind häufig noch unklar; allgemein wurde bisher vermutet, dass sie nur wenig zur Abwehr des Wirtes gegen Schädlinge beitragen. Eine mögliche Schutzwirkung ist hierbei nicht systemisch, sondern lokal auf das vom Endophyten besiedelten Gewebe beschränkt. Der Mechanismus dieser Wirkung basiert vermutlich auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Endophyt und Pathogen.

Der zweite Typ stellt eine konstitutive Form des Mutualismus dar. Konstitutiver endophytischer Mutualismus ist durch eine systemische Infektion gekennzeichnet. In einem von WALLER et al. (2005) durchgeführten Experiment wurde die systemische Reaktion von *P. indica* gegen den Erreger von Gerstemehltau, *Blumeria graminis f.sp. hordei*, als positiv beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit bei der Auswertung des systemischen Effektes von *P. indica* gegen Gallenbildung von *M. incognita* hat sich die (-3) Behandlung mit den Pilz (die Pflanzen wurden 3 Tage vor den Nematoden mit *P. indica* inokuliert) wirksam herausgestellt. Die Pilzbehandlungen

in anderen Zeitpunkten haben auch zwar weniger Gallenbildung auf der Wurzel bewirkt, die Abnahme ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht statistisch bedeutsam. Dies weist darauf hin, dass der Pilz einer systemischen Bekämpfungsleistung gegen Wurzelgallennematoden dienen kann und für seinen abweisenden Effekt gegen das Pathogen nicht unbedingt eine direkte Wechselwirkung mit dem Erreger braucht.

In der Arbeit von AHMED SEID (1999) wurde das antagonistische Potenzial der systemischen Wirkung eines Isolats von, *B. subtilis* (nützliches Rhizobakterium) auf den *M. incognita*-Befall und auf das Wachstum der Tomate untersucht. Hierzu wurde ein Versuch mit dem „Split-root-Testsystem“ durchgeführt, das die räumliche Trennung der beiden Organismen ermöglicht. Im Gegensatz zu den aus dieser Arbeit hervorgehenden Ergebnissen wurde die Vermehrung der Nematoden durch die Bakterisierung im Vergleich zur Kontrolle gefördert. Das Rhizobakterium hat nämlich stärkere Anlockwirkung gegenüber den Nematoden produziert.

In anderer Untersuchung wurde das Rhizosphärebakterium *Rhizobium etli* G12 in diesem Zusammenhang überprüft, das in Kartoffel und Tomate systemische Resistenz gegen *M. incognita* induziert. Dabei drückt sich die Resistenz in einer verringerten Eindringung der Larven aus. HALLMANN (2001) vermutet für Endophyten eine sehr viel bessere Resistenzinduktionsleistung als Rhizosphärebakterien, da sie über einen längeren Zeitraum in engerem Kontakt mit der Pflanze stehen.

Über die Grundlagen des hier beschriebenen Effekts können derzeit noch keine Aussagen gemacht werden. Künftig durchzuführende Analysen, zu der alle verfügbaren Methoden eingesetzt werden sollten, könnten zeigen, inwieweit bereits beschriebene Mechanismen wie etwa die Aktivierung von PR-Proteinen zu dem beobachteten Phänomen beitragen.

6 Anhang

Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von 4 Genen mittels real-time PCR untersucht: *AtEXPA3*, *AtEXPA16*, *KOR3* und *AtCel2*.

Die Expression von diesen Genen wurde in Wurzeln und Blättern von mit Pilz-Inokulum und Pilz-Kulturfiltrat behandelten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit nicht behandelten Pflanzen verglichen. Die Kokultivierungsdauer der Pflanze und des Pilzmaterials (Myzel oder Kulturfiltrat) betrug 21 Tage.

Endo-1,4- β -Glukanase

Die Endo-1,4- β -Glukanasen sind cellulolytische Proteinen, die die 1,4- β glukosidischen Verbindung zwischen Glukose-Resten hydrolysieren. In *Arabidopsis* bilden diese Enzyme eine relativ große Gen-Familie mit 25 Gliedern. Die allgemeine Rolle von Endo-1,4- β -Glukanasen ist bekannt, aber die spezifische Funktion von den meisten der Mitgliedern dieser Familie ist noch nicht geklärt. Die allgemeine Funktion ist üblicherweise im direkten Zusammenhang mit Prozessen, wie Biosynthese und Modifikationen der Zellwand-, Elongation und Differenzierung der Zellen und Reifeprozess der Früchte. Diese Familie besteht aus zwei Gruppen: (i) die Enzyme mit einem putativen Signalpeptid (α - und β -Unterfamilie), die für abgesonderte Proteine kodieren, und (ii) die membrangebundenen Enzyme (γ -Unterfamilie), die für nicht-abgesonderte Proteine kodieren. Die abgesonderten Proteine fungieren in der Zellwand einschließlich ihrer äußersten Schichten. Ihre potentialen Substrate sind Cellulose und Xyloglukan. Es wurden zwei Glukanasen von der Pappel (*Populus alba*), PopCel1 und PopCel2, untersucht und es wird behauptet, dass diese Enzyme die Cellulose im kristallinen Bereich hydrolysieren und die Zellwand durch das Lösen der Xyloglukanen von Cellulose-Mikrofibrillen abbauen. Es wird vermutet, dass diese irreversible Modifikation die Streckung der Zellwand begünstigt. Unlängst wurde gezeigt, dass die Expression von PopCel1 in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen zur erhöhten Wachstumsrate und der Stimulation von Cellulose-Biosynthese führen kann.

Die membrangebundenen Proteine (KOR und Homologen KOR2 und KOR3) fungieren in den innersten Schichten der Zellwand und hydrolysieren nicht kristallinische Cellulose. Die wirken nicht auf kristallinische Cellulose, Xyloglukan oder Xylanen.

Es gibt 3 Hypothese bezüglich ihrer Funktion. Es wird spekuliert, sie sind involviert (1) in der Kette-Termination während der Cellulose-Biosynthese, (2) in der Degradation von β -D-Glukanen, die nicht in Cellulose-Mikrofibrillen krystallisiert wurden und (3) in der Hydrolyse von den lipidgebundenen Zwischenprodukten, die als Primer für die Elongation von β -Glukan-Ketten fungieren. Bisher wurde rausgefunden, dass die *AtCel2*-Expression in den Blüten erfolgt, in der Entwicklung von Septum und Ovule Primordia während der ersten Phasen von Blütentwicklung (YUNG et al.,1999). Folglich haben die Autoren angedeutet, dass *AtCel2* an der Extension der Zellwand während des Wachstums und der Organogenese beteiligt ist.

AtCel3 ist bekannt als Parolog von *AtCel5* und beide Gene spielen eine Rolle bei dem Ablösen der Randzellen von der Wurzelspitze. Die anderen Gene von dieser Gruppe sind zwar annotiert aber sind noch nicht in Details beschrieben.

Expansine

Expansine wurden zum ersten Mal vor mehr als einem Jahrzehnt als die Zellwandproteine, die für "acid growth" (saurer Wachstum) verantwortlich sind. Charakteristischerweise induzieren sie die Ausdehnung der Zellwand in einem optimalen sauren pH-Wert *in vitro* und erhöhen den Lockerungsstress von isolierten Zellwänden innerhalb einer weiten Zeitspanne. Expansine sind in zwei große Gen-Familien unterteilt: α -Expansine (EXPA) und β -Expansine (EXPB).

EXPA Proteine binden sich fest an Cellulose und Hemicellulose, aber die haben keine hydrolytische Aktivität gegen diese großen Polysaccharide der Zellwand. Es wurde vorgeschlagen, dass die Expansine nicht kovalente Bindungen zwischen Cellulose-Mikrofibrillen und Matrix-Glukanen spalten und dadurch das Gleiten von Mikrofibrillen ermöglichen. Vergleichbare Studien über EXPB verkündigen keine hydrolytische Aktivität, aber ihr Einfluss auf Zellwandlockerung ist ähnlich wie der von EXPA. Expansine sind in der Wachstumssteuerung von verschiedenen Zelltypen in verschiedenen Phasen des Pflanzenwachstums involviert. Sie spielen eine Rolle in der Vergrößerung der Zellen, Pollenschlauch-Einbruch, Zellwandabbau während des Reifprozesses der Früchte und Zellwandenthärtung, Organabtrennung und der Organentwicklung in den Blättern. Die Kenntnis über die Regulation von Expansin-Genen ist noch sehr begrenzt aber in vielen Fällen werden diese Gene durch Pflanzenhormone wie Auxin, Gibberellin und Ethylene reguliert. Auch Umweltauslöser wie Wasserstress, die Infektion durch Mykorrhiza-Pilze und Rhizobium Interaktion können die Expansine-Expression beeinflussen.

RNA-Extraktion aus Blättern und Wurzeln

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurden jeweils die vollentwickelten Blätter von 21 Tage alten Pflanzen (die Behandelten Pflanzen waren 2 Wochen mit dem Pilz-Inokulum kokultiviert) geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert.

Zur RNA-Extraktion aus den Wurzeln wurden die Wurzeln zuvor gründlich vom Agar befreit und nach dem Mörsern wurde das Material bis zur Extraktion bei -80°C gelagert.

Für die Extraktion wurden ca. 100 mg des gemörserten Pflanzenmaterials in 450 μl RNA-Extraktionslösung durch Vortexen homogenisiert. Nach 1-3 minütiger Inkubation bei 56°C wurde das Material (Inhalt von der aufgelösten Zellen, Lysate) 2 Minuten zentrifugiert bei der maximalen Geschwindigkeit. Der Überstand wurde mit 225 μl Ethanol (96%-100%) versetzt und mit diesem durch Pipettieren vermischt. Das Material mit gebildeten Ablagerungen wurde erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde 700 μl RW1 Puffer zur Entfernung von DNA zugesetzt und nochmal für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurden zur Fällung der RNA aus dem Überstand zweimal 500 μl RPE Puffer pipettiert und zur Trocknung der RNA und Eluierung von Ethanol wurden die Proben unter gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert.

Durch Zentrifugation wurde die RNA aus der Lösung gefällt und das erhaltene RNA-Präzipitat zweimal mit der Rnase-freien Wasser gewaschen. Anschließend wurde die in Lösung enthaltene RNA bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle der Qualität der RNA erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA (Bioanalyser).

cDNA-Synthese

Die cDNA für RT-PCR wurde durch direkte reverse Transkription hergestellt.

cDNA-Herstellung mittels SuperscriptTM II RT

Für die cDNA-Synthese wurde SuperscriptTM II Kit (Invitrogen, Karlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Real time RT-PCR

Die Primer für die quantitative RT-PCR:

AtCel2

Forward: 5'-TCCAATGGCTTCTCGTCCTC-3' ,

Reverse: 5'-ACGTTGAGAGCAGAGCCATCA-3' ;

KOR3

Forward: 5'-GGAACAGGTCGGATCTGGA-3

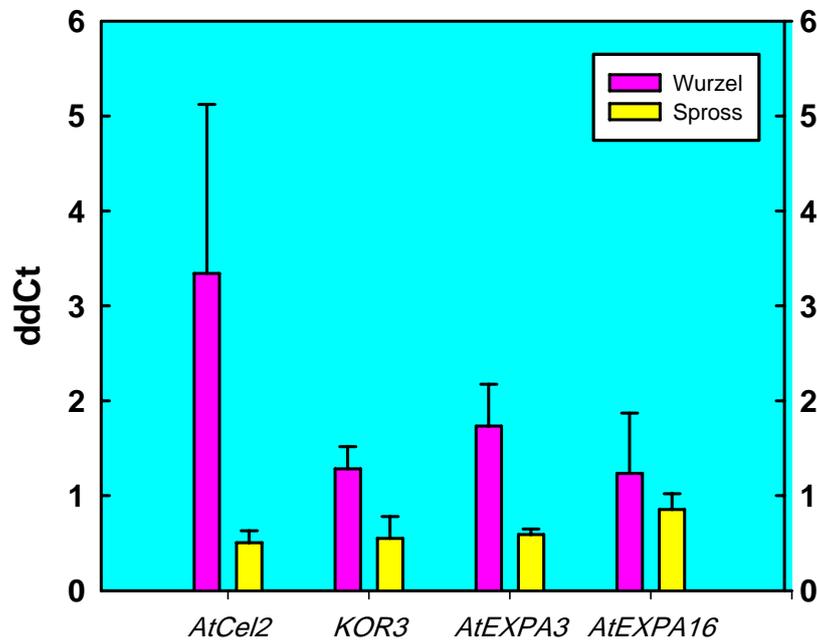
Reverse: 5'-AGCGTCTTAGCACCATGAACA-3 ;

AtEXPA3

Forward: 5'-TCCTTTCTCTTAACCGCAACAAAC-3' ,

Reverse: 5'-CCAAGTGTCTTTGATCCCTTTAC-3

Als endogene Kontrollgene wurden 18S rRNA und UBP22 verwendet. Die Reaktionen wurden in 25 µl Volumen mit 1xSYBR®Green, 0.5u Biotherm Polymerase, 3mM MgCl₂ (50mM), dNTP (10µM), Forward und Reverse Primers (10µM) durchgeführt. Die Reaktion im 7300 Real Time PCR System erfolgte mit 10 min Denaturierung bei 95°C, 40 Amplifizierungszyklen (15 s bei 95°C, 30 s Annealing, 1 Min bei 72° C).



Wie aus der Graphik hervorgeht, wurde die Expression aller untersuchten Genen durch *P. indica*-Besiedlung raufreguliert. Eine deutliche Regulation der Gene durch Kulturfiltrat des Pilzes wurde jedoch nicht festgestellt.

7 Literaturverzeichnis

- Abrantes, I.M.DE O.; Santos, M.S.N. DE A. 1990 Effects of temperature on embryogenic development of three populations of *Meloidogyne* spp. (Abstr.). *Nematologica* 36:327-328
- Achatz, B. (2002) Wachstumsförderung, Wechselwirkung mit Blattpathogenen und Regulation der Genexpression in *Medicago truncatula* durch arbuskuläre Mykorrhiza und *Piriformospora indica*. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Ahmed, S.S.; Alsayed, A.A. 1991 Interaction between the vesicular-arbuscular mycorrhiza *Glomus macrocarpum* and *Meloidogyne incognita* infecting cowpea. *Ann. Agric. Science* 29(4):1765-1772
- Ahmed Seid E. 1999 Wirkung des Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* auf den Befall von Tomatenpflanzen durch Wurzelgallen (*Meloidogyne* spp.) und Wurzelläsions-Nematoden (*Pratylenchus* spp.). Dissertation Humboldt Universität, Berlin.
- Anonym (1997). Pflanzenschutzmittelverzeichnis. Teil 2 : Gemüsebau - Obstbau - Zierpflanzenbau. 39. Aufl., Biol. Bundesanst., Braunschweig
- Belder, E.D.; Jansen, E. (1994). Capture of plant-parasitic nematodes by an adhesive hyphae forming isolate of *Arthrobotrys oligospora* and some other nematode-trapping fungi. *Nematologica* 40:423-437
- Berkeley, M.J. 1855 Vibro forming excrescences on the roots of cucumber plants. *Gard. Chron.* 14:220
- Blechert, O., Kost, G., Hassel, A., Rexer, K.H. & Varma, A. (1998) First remarks on the symbiotic interaction between *Piriformospora indica* and terrestrial orchids. In Varma, A.&Hock, B. (eds.), *Mycorrhiza*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 683-688.
- Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion Plant Biology*, 4, 343-350.
- Carroll, G. C. (1988): Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69 (1), 2-9.
- Cooper, K.M.; Grandison, G.S. 1987 Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. *Helminthological Abstracts* 56(1):5
- Decker, H.; Fritzsche, R. 1991 Resistenz von Kulturpflanzen gegen Nematoden. Akademie-Verlag Berlin

- Duff SMG, Plaxton WC, Lefebvre DD. 1991. Phosphate-starvation response in plant cells: Denovo synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (21). 9538-9542.
- Dugassa-Gubena, D. 1995 Zum Einfluß der vesikulären-arbuskulären Mykorrhiza auf Wachstum, Entwicklung und Gesundheit von Lein (*Linum usitatissimum* L.). Dissertation Universität Hannover
- Franken, P., Requena, N., Bütehorn, B., Krajinski, F., Kuhn, G., Lapopin, L., Mann, P., Rhody, D. & Stommel, M. (2000) Molecular analysis of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 45, 271-286.
- Gianinazzi, S., Trouvelot, A., Lovato, P., Vantuinen, D., Franken, P. & Gianinazzipearson, V. (1995) Arbuscular mycorrhizal fungi in plant production of temperate agroecosystems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 305-311.
- Goodel, P.; Ferris, H. 1989 Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *J. Nematology* 21:328-334
- Goodman R, Kiraly Z, Wood R; The biochemistry and physiology of plant disease. Univ of Missouri Press, Columbia 1986
- Hallmann, J. (1994). Einfluß und Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* an Tomate. Dissertation Universität Bonn
- Hallmann, J. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria. In: Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations. Herausgegeben von M.J. Jeger und N.J. Spence., CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 87-119.
- Hassan, S.A.; Albert, R.; Rost, W.M. 1993 Pflanzenschutz mit Nützlingen im Freiland und unter Glas. Verlag Eugen, Ulmer
- Holford, ICR. 1997. Soil phosphorus - its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*. 35. 227-239.
- Huang, S.P.; Pereira, A.C. 1994 Influence of inoculum density, host, and low-temperature period on delay hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. *J. Nematology* 26:72-75
- Kaldorf, M., Koch, B., Rexer, K.H., Kost, G. & Varma, A. (2005) Patterns of interaction between populus Esch5 and *Piriformospora indica*: a transition from mutualism to antagonism. *Plant Biology*, 7, 210-218.
- Kerry, B.R. (1990). An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *J. Nematology* 22(4S):621-631

- Khan, R.M.; Khan, M.W.; Khan, A.M. 1985 Cohabitation of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* in tomato roots and effects on multiplication and plant growth. *Nemtologie Mediteranea*. 13:153-159
- Krishna-Prasad, K.S. 1991 Influence of a vasicular abuscular mycorrhiza on the development and reproduction of rootknot nematode affecting fue cured tobacco. *Afro-Asian J. Nematology* 1(2):130-134
- Krug, H. 1991 *Gemüseproduktion*. Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg
- Laughlin, G.W.; Williams, A.S.; Fox, J.A. 1969 The influence of temperature on development and sex differentiation of *Meloidogyne graminis*. *J. Nematology* 1:212-215
- Osman, H.A.; Korayem, A.M.; Ameen, H.H.; Badr-Eldin, S.M.S. 1991 Interaction of root knot nematode and mycorrhizal fungi on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Beiträge zur tropischen Landwirtschaft und Veterinarmedizin* 29(3):341-346
- Parveen, S.; Ehteshamul-Haque, S.; Ghaffar, A. (1993). Biological control of *Meloidogyne javanica* on tomato and okra in soil infested with *Fusarium oxysporum*. *Pakistan J. Nematology* 11(2):151-156
- Peskan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P.H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A. & Oelmüller, R. (2004) Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum*, 122, 465-477.
- Rhody, D. (1999) Mikroskopische und molekulare Analyse der Wechselwirkungen zwischen *Piriformospora indica* und Wurzeln von *Zea mays*. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Roberts, P.A. 1987 The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots. *Nematologica* 33:335-342
- Sahay, N.S. & Varma, A. (1999) *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiol Lett*, 181, 297-302.
- Saleh, H.; Sikora, R.A. 1984 Relationship between *Glomus fasciculatum* root Colonization of cotton and its effect on *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 30:230-237
- Sasser, J.N. 1971 Einführung in die Probleme des Nematodenbefalls an den Kulturpflanzen der Welt mit einer Übersicht über gegenwertige Bekämpfungsverfahren. *Pflschutz-Nachrichten Bayer* 24:3-50
- Sasser, J.N. 1977 Worldwide dessimination and importance of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *J. Nematology* 9(1):26-27

- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. & Oelmüller, R. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucanwater dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor which binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 26241-26247
- Sikora, R.A. 1978 Einfluß der endotrophen Mykorrhiza (*Glomus mosseae*) auf das Wirt-Parasit-Verhältnis von *Meloidogyne incognita* an Tomaten. *Z. Pflkrankheiten Pflschutz* 85:197-202
- Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.-H. & Varma, A. (2000) Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*: A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science*, 79, 1548-1554.
- Sturhan, D. 1995 *Meloidogyne*-Arten in Deutschland, Vorkommen, Verbreitung, morphologische Merkmale (Vortrag). 23. Tagung des Arbeitses Nematologie, 29.-30. März in Bonn
- Suresh, C.K.; Bagyaraji, D.J.; Reddy, D.D. 1985 Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on survival, penetration and development of rootknot nematode in tomato. *Plant Soil* 87:305-308
- Talavera, M., Ito, K and Mizukubo, T.(2001). Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato-*Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) and carrot-*Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: Pratylenchidae) pathosystems, *Appl. Entomol. Zool.* 36 (3): 387–392
- Taylor, C.E. 1990 Nematode interactions with other pathogens. *Ann. Appl. Biology* 116(3):403-416
- Triantaphyllou, A.C. 1960 Sex determination in *Meloidogyne incognita* CHITWOOD, 1949 and intersexuality in *M. javanica* (TREUB, 1885) CHITWOOD, 1949. *Ann. Inst. Phytopathology* 3:12-13
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N.S., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., Deka, D., Bharti, K., Hurek, T., Blechert, O., Rexer, K.H., Kost, G., Hahn, A., Maier, W., Walter, M., Strack, D. & Kranner, I. (2000a) *Piriformospora indica*: An axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In Hock, B. (ed.), *The Mycota IX-Fungal Associations*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Varma, A., Verma, S., Sahay, S. N., Butehorn, B. and Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, N (1) , p. 2741–2744
- Varma, A., Verma, S., Sudah, Sahay, N. & Franken, P. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Applied & Environmental Microbiology*, 65, 2741-2744.

- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Buetehorn, B. & Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90, 896-903.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Buetehorn, B. & Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90, 896-903.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. & Kogel, K.H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13386-13391.
- Weiss, M., Selosse, M.A., Rexer, K.H., Urban, A. & Oberwinkler, F. (2004) Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res*, 108, 1003-1010.
- Yung, M., Schaffer, R. & Putterill, J (1999) Identification of genes expressed during early *Arabidopsis* carpel development by mRNA differential display: characterization of ATCEL2, a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene. *The Plant Journal*, 17 (2), 203-208.
- Zuckerman, B.M.; Matheny, M.; Acosta, n. (1994) Control of plant-parasitic nematodes by a nematicidal strain of *Aspargillus niger*. *Nematol. Abstracts* 63(3):98.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Grundler für das Vergeben dieser Arbeit an mich. Seine wertvolle Unterstützung und sein Optimismus haben mich immer ermüht. Vielen Dank für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Diplomarbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. Krzysztof Wieczorek, dass er sich als Zweitbetreuer zur Verfügung gestellt hat, für seine unendliche Geduld und sein liebenswürdiges Verantwortungsgefühl für die Lösung aller entstandenen Probleme während der Arbeit.

Vielen Dank auch den Herrn Dr. Horst Vierheilig dafür, dass er sehr hilfreich meine theoretischen Fragen im Laufe der Arbeit geantwortet hat.

Ich danke Herrn Dr. Ali Moghaddam für die Statistikanalyse der Versuchen und dafür, dass ich darüberhinaus seine zahlreiche Erfahrungen in diesem Bereich nützen durfte.

Ich danke meinen Freundinnen, Verena Wallner für die schönen Momenten der gemeinsamen Arbeit im Labor, und Dr. Zahra Ghelichipour, meinem besten Gesprächspartner, die immer für mich da war und mich mit ihrem Rat unterstützt hat.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts besonders Frau Dr. Julia Hofmann und Frau Dipl. Ing. Sabine Daxböck-Horvath für ihre freundliche Hilfe.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meinen Hossein. Sein Beistand und seine Zuversicht haben mich die ganze Zeit über begleitet.

Mein heftigster Dank an meine Eltern für ihre lebenslange Unterstützung und dafür, dass ich in aller Hinsicht an ihnen Rückhalt haben konnte.