

Universität für Bodenkultur
Institut für Pflanzenschutz

„Bedeutung der Mykorrhizierung für die
Inhaltsstoffzusammensetzung bei Salbei“

DIPLOMARBEIT

Studienrichtung Landwirtschaft

eingereicht von
Marlies VÖTSCH

Betreuung:

PD Dipl.-Ing. Dr. habil. Horst Vierheilig

Ao. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Johannes Novak

Ao. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Siegrid Steinkellner

Wien, Juni 2008

ABSTRACT

The symbiosis of roots with arbuscular mycorrhiza (AM) influences the physiology and the morphology of the host plant. The present study investigates the effects of different AM fungi in symbiosis with sage plants as well the effect of different phosphorous concentrations on the qualitative and quantitative changes of the secondary metabolites.

The experimental setup included seven different treatments with *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea*, a commercially available mycorrhizal mixture “Symbivit” and two phosphorous treatments. A treatment without inoculum and without phosphorous fertilization was taken as control.

Analysis of the dry matter suggested possible quantitative and/or qualitative changes of the secondary metabolites of sage plants. The essential oil content did not increase significantly neither in the treatments with AM fungi nor in the phosphorous treatments. In addition, no significant differences could be observed in the total phenol content, the total flavonoid and caffeic acid content of the leaves. The concentration of rosmarinic acid was significantly higher in plants fertilized with high concentrations of phosphorous compared to the control plants. Analyses of the roots did not show any significant differences of the total antioxidative activity. The concentration of phosphorous in the leaves was significantly higher in plants in symbiosis with *Glomus mosseae* and the Symbivit mixture than in the control plants. In conclusion, sage plants did not show any increase in secondary metabolites through mycorrhization but mycorrhizal symbiosis led to a significant increase of the phosphorous concentration in the leaves.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Eine Symbiose der Wurzeln von Salbeipflanzen und Arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM) kann morphologische und physiologische Veränderungen der Wirtspflanze bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von verschiedenen AM-Pilzen sowie der Einfluss zweier verschiedener Phosphorkonzentrationen in der Nährlösung auf die qualitative und quantitative Veränderung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe getestet.

Die Versuchsanlage bestand aus sieben unterschiedlichen Behandlungen wobei die Einzelpilze *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea* sowie eine kommerzielle Pilzmischung „Symbivit“ als Inokulum dienten. Weiters wurden zwei verschiedene Phosphordüngestufen ohne Mykorrhizierung angewandt. Die Behandlung ohne Inokulation mit AM-Pilzen und ohne Phosphordüngung galt als Kontrollvariante.

Die Analyse des Pflanzentrockenmaterials gab Aufschluss über eine mögliche qualitative und/oder quantitative Veränderung der sekundären Pflanzenstoffe. Weder durch Mykorrhizierung noch durch eine erhöhte P-Düngung konnte der Gehalt an ätherischem Öl signifikant erhöht werden. Weiters konnten auch keine signifikanten Erhöhungen der sekundären Pflanzenstoffe durch die unterschiedlichen Behandlungen gemessen werden.

Nach Inokulation mit der Pilzmischung Symbivit sowie dem AM-Pilz *Glomus mosseae* konnte jedoch ein signifikant erhöhter Gehalt an Gesamtphosphor in den Blättern nachgewiesen werden.

VORWORT

Liebe Mama und lieber Papa als Erstes möchte ich mich bei Euch bedanken. Vielen herzlichen Dank bei der Unterstützung all die Jahre. Während der gesamten Studienzeit konnte ich immer auf Euch zählen, Danke dafür!

Jag vill tacka er, kära familjen Vötsch-Nilsson, framförallt för all stöd och hjälp ni givit mej genom hela min studietid. Medan jag skrev mitt diplomarbete gav ni mej mycket energi och värdefulla råd. Ni motiverade mej till att fortsätta och hålla ut. Tack för att jag fick tillbringa många fina helger tillsammans med er som lät mej slappna av. Tack för allt! Jag älskar er!

Lieber Herr Prof. Vierheilig, ich möchte mich ganz herzlich für die wunderbar funktionierende, länderübergreifende Zusammenarbeit bedanken. Auch bei Ihnen, liebe Fr. Prof. Steinkellner bedanke ich mich vor allem für die Motivation während der Schreibearbeit sowie für die herzliche Aufnahme am Pflanzenschutzinstitut. Ich habe mich immer sehr wohl gefühlt. Herr Prof. Novak, bei Ihnen bedanke ich mich für Ihre stete Bereitschaft mir Auskunft zu geben und für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung, die mit Ihrer Hilfe sehr gut gelungen ist.

Monika, bei dir möchte ich mich für die wunderbare Betreuung während der ganzen Diplomarbeit bedanken! Ich denke, ich hatte wohl eine der Besten Betreuung während eines solchen Unternehmens! Du hast mir nicht nur immer geholfen, sondern hast es immer wieder geschafft, mich weiter zu motivieren und mir viel Selbstvertrauen vor allem bei der Laborarbeit gegeben!

Dem gesamten Institut für Angewandte Botanik an der Veterinärmedizinischen Universität Wien sowie dem Institut für Pflanzenschutz an der Universität für Bodenkultur danke ich für die tolle Unterstützung während der praktischen Teile im Labor. Ich wurde so herzlich aufgenommen, jeder hat sich meinen Anliegen sofort angenommen. Cara Tanja, hai scelto proprio il momento giusto per venire a Vienna! Grazie per il sostegno, i consigli e i bei momenti durante la stesura della mia tesi! Senza di te come 'Coach' non avrei terminato così in fretta! Grazie!

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meinen Studienkollegen und Freunden bedanken, die ich während meines Studiums kennenlernen durfte. Vielen Dank für die viele Unterstützung, Hilfe für die schöne Zeit gemeinsam an der Uni.

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT	I
KURZZUSAMMENFASSUNG	II
VORWORT	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 MYKORRHIZA.....	1
1.1.2 Ektomykorrhiza	2
1.1.3 Ektendomykorrhiza.....	3
1.1.4 Ericaceen-Mykorrhiza	3
1.1.5 Orchideen-Mykorrhiza	3
1.1.6 Endomykorrhiza	4
1.1.7 Arbuskuläre Mykorrhiza (AM)	4
1.2 Aufbau der Symbiose	6
1.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	7
1.4 Salbei (<i>Salvia officinalis</i>)	8
1.4.1 Inhaltsstoffe von Salbei (<i>Salvia officinalis</i>).....	9
2. FRAGESTELLUNG	14
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1 Versuchsplanung	15
3.1.1 Substrat.....	16
3.1.2 Pflanzung	16
3.1.3 Pflanzenernte.....	19
3.1.4 Bestimmung Mykorrhizierungsgrad	20
3.2 Analytik der Inhaltsstoffe.....	22
3.2.1 Methanolextrakte (Blatt und Wurzel)	24
3.2.2 Quantitative Bestimmung des ätherischen Öles.....	25

<i>Material</i>	25
<i>Durchführung</i>	25
<i>Prinzip</i>	26
3.2.3 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes	27
<i>Messprinzip</i>	27
<i>Material</i>	27
<i>Chemikalien</i>	27
<i>Einstellung Photospektrometer</i>	28
<i>Durchführung</i>	28
3.2.4 Antioxidative Aktivität mit DPPH	30
<i>Messprinzip</i>	30
<i>Material</i>	30
<i>Chemikalien</i>	31
<i>Einstellung Photospektrometer</i>	31
<i>Durchführung</i>	31
3.2.5 Messung des Gesamtphosphorgehaltes	33
<i>Messprinzip</i>	33
<i>Material</i>	33
<i>Chemikalien</i>	33
<i>Einstellung Spektralphotometer</i>	34
<i>Durchführung</i>	34
3.2.6 Identifizierung und Quantifizierung der ätherischen	37
Ölkomponenten mittels Gaschromatographie (GC)	37
<i>Messprinzip</i>	37
<i>Gaschromatographie – MS</i>	38
<i>Gaschromatographie – FID</i>	39
3.2.7 Messung von Rosmarinsäure und Kaffeesäure mit HPLC	40
<i>Messprinzip</i>	40
<i>Einstellungen HPLC (Kaffeesäure und Rosmarinsäure)</i>	41
<i>Durchführung der HPLC - Analyse</i>	42
3.2.8 Bestimmung der Gesamtflavonoide	43
<i>Messprinzip</i>	43
<i>Material</i>	43
<i>Chemikalien</i>	43
<i>Einstellung Photospectrometer</i>	44
<i>Durchführung</i>	44
4. Ergebnisse	46
4.1 Biomasse	46
4.1.1 Sprosstrockengewicht	46
4.1.2 Blatttrockengewicht	47

4.1.3	Wurzeltrockengewicht	48
4.1.4	Gesamttrockengewicht.....	49
4.1.5	Gesamtphosphorgehalt	50
	<i>Gesamtphosphorgehalt in den Blättern</i>	<i>50</i>
	<i>Gesamtphosphorgehalt in den Wurzeln</i>	<i>51</i>
4.2	Mykorrhizierung	52
4.3	Ätherischer Ölgehalt	53
4.3.1	Zusammensetzung des ätherischen Öles.....	54
	<i>Bestimmung der Gesamtphenole</i>	<i>57</i>
	<i>Gesamtphenole in den Blättern</i>	<i>57</i>
	<i>Gesamtphenole in den Wurzeln</i>	<i>58</i>
4.3.2	Antioxidative Aktivität	59
	<i>Antioxidative Aktivität in den Blättern.....</i>	<i>59</i>
	<i>Antioxidative Aktivität in den Wurzeln.....</i>	<i>60</i>
4.3.3	Gesamtflavonoide	61
	<i>Gesamtflavonoide Blätter</i>	<i>61</i>
	<i>Gesamtflavonoide Wurzeln.....</i>	<i>62</i>
4.3.4	Rosmarinsäuregehalt	63
	<i>Rosmarinsäuregehalt Blätter</i>	<i>63</i>
	<i>Rosmarinsäuregehalt Wurzeln</i>	<i>64</i>
4.3.5	Kaffeesäuregehalt	65
	<i>Kaffeesäuregehalt Blätter</i>	<i>65</i>
	<i>Kaffeesäure Wurzeln</i>	<i>66</i>
5.	DISKUSSION	67
6.	ZUSAMMENFASSUNG	72
7.	DARSTELLUNGSVERZEICHNIS.....	75
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	78
9.	LITERATURVERZEICHNIS	79

1. EINLEITUNG

1.1 MYKORRHIZA

Mykorrhiza (gr. μυκης (mykes) = Pilz und ρίζα (rhiza) = Wurzel) ist eine Symbiose zwischen Bodenpilzen der Phylum Glomeromycota und Pflanzenwurzeln, wobei der Pilz das Wurzelsystem der Pflanze besiedelt. Diese Symbiose ist von großer Bedeutung für das Pflanzenreich, da ungefähr 80% aller Pflanzenarten diese Symbiose eingehen können. Mykorrhizapilze kolonisieren die Wurzeln und vergrößern dadurch die Kontaktoberfläche zwischen Boden und Wurzeln/Pilz. Somit sind sie in der Lage, einen höheren Anteil an Wasser und Nährstoffen aus dem Boden zu lösen und für die Pflanze verfügbar zu machen. Bei dieser Symbiose stellt der Pilz der Pflanzenwurzel Wasser und Nährstoffe zur Verfügung, dafür stellt die Pflanze dem Pilz wiederum Kohlenhydrate aus der Assimilation für das Wachstum zur Verfügung (BACKHAUS und FELDMANN, 1997). Vor allem in nährstoffarmen und feuchtigkeitsarmen Böden ist diese Form der Symbiose von großem Vorteil für die Pflanze und spielt somit auch für das Überleben der Pflanze eine große Rolle (BACKHAUS und FELDMANN, 1997). Weiters ist eine Minderung von Schwermetallen aus verseuchten Böden durch Mykorrhizierung bewiesen (HASELWANDTER et. al., 1994).

Mykorrhizapilze fördern die Pflanzentwicklung und die Widerstandsfähigkeit gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren. Das äußere Myzel der Mykorrhiza spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen durch die Pflanze. Der Pilz hat die Fähigkeit, organischen Phosphor, der für die Pflanze nicht pflanzverfügbar ist, zu mobilisieren (SMITH and READ, 1997). Durch den komplexen Signalaustausch, der bei der Etablierung der Symbiose zwischen Pilz und Pflanzenwurzel entsteht, verändert sich der gesamte Metabolismus der kolonisierten Pflanze (ATKINSON, 1994). Dadurch kommt es zu einer Veränderung von einigen Wirkstoffgruppen wie zum Beispiel der Gehalt an Flavonoiden oder der Anteil an phenolischen Verbindungen.

Feldmann (1998) beschreibt die grundlegenden Vorteile einer Kolonisierung mit Mykorrhizapilzen beruhend einerseits auf einer verstärkten Wasseraufnahme und andererseits auf eine erhöhte Nährstoffaufnahme in die Pflanze im Besonderen von

gebundenen Phosphat aus dem Boden, weiters Stickstoff und Mikroelemente. Als Folge lässt sich ein erhöhtes Biomassewachstum und damit folglich auch ein erhöhter ökonomischer Wert durch höheren Ertrag bei der Ernte der Pflanzen von mykorrhizierten Pflanzen gegenüber nicht mykorrhizierten schlussfolgern (SYLVIA, 1999).

Einige Beobachtungen anhand wissenschaftlicher Untersuchungen hat Feldmann (1998) gesammelt, bei denen durch mykorrhizierte Pflanzen im Vergleich zu nicht mykorrhizierten erhöhte Trockengewichte, erhöhte Ernteerträge sowie Verbesserungen in der Nährstoffaufnahme gemessen wurden.

Ebenso konnten erhöhte Toleranzen gegenüber biotischen sowie abiotischen Stressfaktoren beobachtet werden (HASELWANDTER et. al., 1994).

Man unterscheidet nach Art der Ausbildung der Symbiose zwischen dem Wurzelsystem der höheren Pflanzen und der Mykorrhiza fünf unterschiedliche Mykorrhiza-Typen:

- **Ektomykorrhiza**
- **Ektendomykorrhiza**
- **Arbuskuläre Mykorrhiza**
- **Ericaceenmykorrhiza**
- **Orchideenmykorrhiza**

1.1.2 Ektomykorrhiza

Ektomykorrhiza stellt vor allem in Wäldern die häufigste Art der Wurzelsymbiose dar. Das Myzel bildet an der Wurzeloberfläche ein dichtes Hyphennetz. Die ausgebildeten Pilzhyphen wachsen in die Wurzelrinde hinein, jedoch dringen sie nicht in die Wurzelzellen ein sondern bilden in den Extrazellularräumen ein Netzwerk (Hartigisches Netz) welches den Nährstoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze zu erleichtern.

Für eine gute Wasser- und Nährstoffaufnahme reichen die Hyphen des Pilzes tief in die Bodenschichten hinein. Diese Mykorrhiza-Art schützt die Baumwurzel außerdem vor Infektionen bzw. anderen Bakterien oder Pilzen.

Typischerweise findet man diese Form der Mykorrhiza meist an Bäumen aus den Familien der Buchen-, Kiefern-, Weiden- und Rosengewächsen.

Ektomykorrhiza besiedelt im Gegensatz zur „Arbuskulären Mykorrhiza“ nur die Wurzelspitzen, während die AM das gesamte Wurzelsystem besiedelt.

1.1.3 Ektendomykorrhiza

Diese Form der Mykorrhiza bildet eine Übergangsform zwischen der Form der Ektomykorrhiza und der Endomykorrhiza. Es treten sowohl Merkmale der Ektomykorrhiza wie auch intrazelluläre Einwüchse auf, die für die Endomykorrhiza charakteristisch sind.

1.1.4 Ericaceen-Mykorrhiza

Pflanzen die eine Symbiose mit ericoider Mykorrhiza eingehen, stammen aus der Ordnung *Ericales*, genauer sind diese Pflanzen der Familie der *Ericaceae*, *Empetraceae* und der *Epacridaceae* zugeordnet. Pflanzen mit dieser Art von Symbiose besiedeln insbesondere nährstoff- bzw. stickstoffarme Böden. Die Pilze selbst können stark gebundene Nährstoffe im Boden freisetzen.

1.1.5 Orchideen-Mykorrhiza

Orchideen haben nur winzige Samen und haben daher für die Keimung und Entwicklung nur sehr wenige Reservestoffe. Nur durch eine Symbiose mit dem Mykorrhiza Pilz, die das Nährsubstrat stellen, kann sich die Pflanze überhaupt weiterentwickeln. Diese Beziehung ist zumindest in der ersten Lebensphase rein parasitisch. Der Pilz penetriert zuerst das Gewebe des Keimes, von wo aus er sich dann in die entstehenden Wurzeln ausbreitet (SMITH and READ, 1997).

1.1.6 Endomykorrhiza

Bei dieser Art der Mykorrhiza wächst ein Teil der Hyphen des Pilzes in die Zellen der Wurzelrinde der Pflanzen ein. Hier fehlt weitgehend das Hyphennetz, das die Wurzel zum Beispiel bei der Ektomykorrhiza umgibt.

Die Pilze bilden innerhalb der Zelle eine Art Haustorium aus. So werden Nährstoffe und Wasser gegen Kohlenhydrate ausgetauscht.

1.1.7 Arbuskuläre Mykorrhiza (AM)

Arbuskuläre Mykorrhizapilze zählen zur Endomykorrhiza. Sie verfügen über ein extrem weites Wirtsspektrum wobei über 80% aller Pflanzenarten eine solche Symbiose mit Pilzen eingehen. Die arbuskulären Mykorrhizapilze stellen die älteste und weitest verbreitete Art der Mykorrhizapilze dar (SMITH and READ, 1997).

Eine Fähigkeit der arbuskulären Mykorrhiza ist die Ausbildung von stark verzweigten, bäumchenartigen Arbuskeln innerhalb der Wurzelzellen. Diese dienen der Oberflächenvergrößerung und sind somit die Schnittstelle zum Austausch der Nährstoffe zwischen Pilz und Wirtspflanze.



Abb. 1: Arbuskeln in der Wurzelzelle, Anfangsstadium (Bar=10µm)

Quelle: BRUNDRETT, <http://mycorrhizas.info/vam.html>

Einige Arbuskuläre Mykorrhizapilze können Vesikeln ausbilden. Vesikeln sind dünnwandige Strukturen die mit Lipiden gefüllt sind und die zumeist im interzellulären Raum produziert werden. Für die Überdauerung des Pilzes sind Sporen verantwortlich.

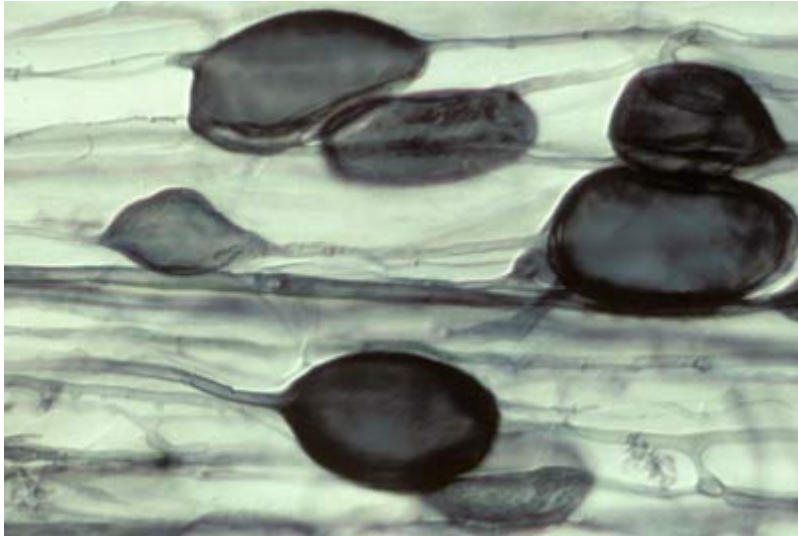


Abb. 2: Vesikeln in der Wurzel (ca. 50µm lang)

Quelle: BRUNDRETT, <http://mycorrhizas.info/vam.html>

Im Boden können weiters Auxillarzellen, sog. „Helferzellen“ gebildet werden, die gebündelt oder knötchenartig vorliegen können. Die Funktion dieser Zellen ist noch nicht bekannt. Außerhalb der Wurzel wird ein lockeres Hyphennetz (= Myzel) gebildet. Sporen werden in der Wurzel gebildet.

Die asexuellen Sporen die durch Differenzierung der vegetativen Hyphe entstanden sind, variieren in Form und Farbe. Durch diese Überdauerungsorgane kann der Pilz auch Extremsituationen wie z.B. Trockenheit überstehen.

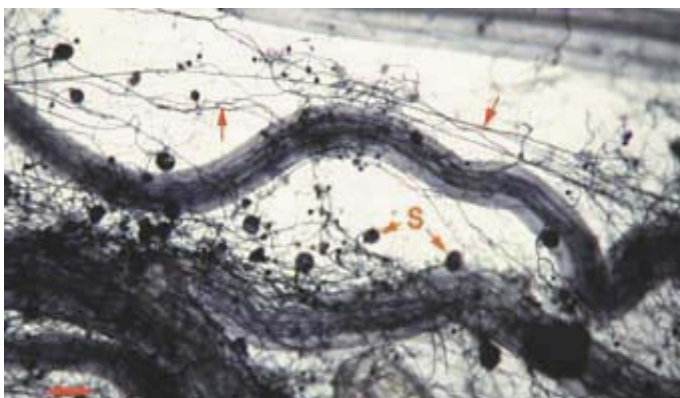


Abb. 3: Hyphen (Pfeil) mit Sporen (S) von *Glomus mosseae* (Bar = 100µm)

Quelle: BRUNDRETT, <http://mycorrhizas.info/vam.html>

1.2 Aufbau der Symbiose

Für die Etablierung der Symbiose zwischen dem Pilz sowie der Pflanzenwurzel sind eine geeignete Wirtspflanze sowie eine ausreichende Menge an Pilzinokulum notwendig.

Der Entstehungszyklus wird in drei Abschnitte unterteilt:

1. Präinfektionsphase
2. Infektionsphase
3. Postinfektionsphase

In der Präinfektionsphase keimt die Pilzspore im Boden, worauf ungerichtetes Wachstum der Pilzhyphen folgt. In dieser Phase erfolgt ebenso das Aufeinandertreffen der Pilzhyphen mit der Wirtswurzelzelle.

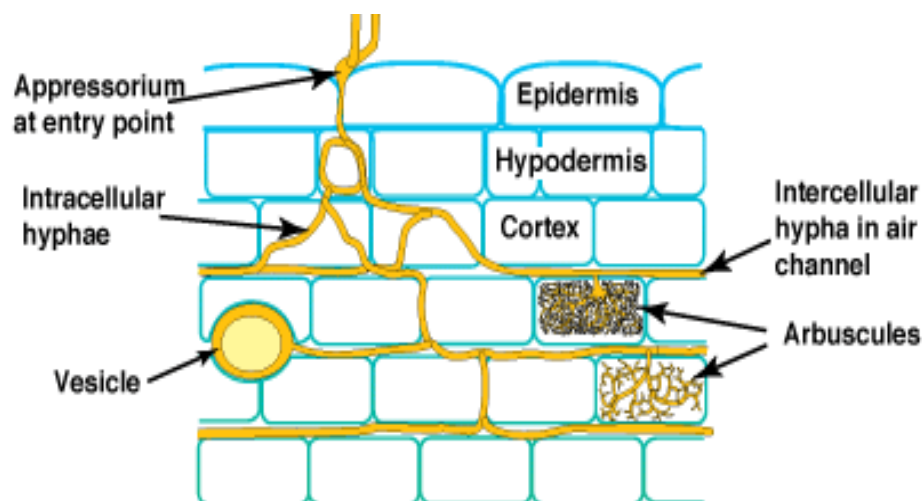


Abb. 4: Schematische Darstellung des AMP vom Eindringen in die Epidermis bis zur Bildung der Vesikeln und Arbuskeln

Quelle: BRUNDRETT, <http://mycorrhizas.info/vam.html>

In der Infektionsphase bildet der Pilz ein Appressorium an der Rhizodermis der Wirtspflanze. Die ausgebildeten Penetrationshyphen durchstoßen anschließend die Wurzelepidermis. Gleichzeitig mit diesem Ereignis wird die dritte Phase, die Postinfektionsphase eingeleitet.

Die Pilzhyphe breitet sich nun interzellulär in beide Richtungen aus. Während dieses Entwicklungszykluses kommt es nur zu einer Einstülpung der Wirtszellmembranen in die Rindenparenchymzellen des Wirtes. Das Plasmalemma wird also nie penetriert (WULFF, 1997).

Arbuskuläre Mykorrhizapilze besitzen keine ausgeprägte Wirtsspezifität, eine Ausnahme bilden jedoch Vertreter der Kreuzblüter (Cruciferen) oder Gänsefußgewächse (Chenopodiaceen), die, man kann sagen nie, eine Symbiose mit Mykorrhizapilzen eingehen.

1.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe, auch Sekundärmetaboliten genannt, werden, wie der Name bereits hinweist, im sekundären Stoffwechsel aufgebaut. Diese chemischen Verbindungen werden im Stoffwechsel gebildet, jedoch für den primären Stoffwechsel nicht benötigt. Im primären Stoffwechsel, auch Grundstoffwechsel genannt, werden von allen Pflanzen jene Stoffe gebildet, die für die Pflanzenzelle essentiell sind und für den Aufbau der Gerüst- und Reservestoffe verantwortlich sind. Zu den bekanntesten Primärmetaboliten zählen zum Beispiel Kohlehydrate, Proteine, Fette und Ballaststoffe.

Sekundärpflanzenstoffe werden abhängig von der Pflanzenspezies meist in speziell ausdifferenzierten Zellen, jedoch nicht bei allen Pflanzen, gebildet. Sie sind für die Pflanze als einzelne nicht essentiell, können für den Organismus als Ganzes jedoch nützlich sein. Sekundäre Pflanzenstoffe können auch physiologische Funktionen erfüllen, zum Beispiel Wachs als Transpirationsschutz, das Anlocken von Bestäubern durch Farbpigmente (Anthocyane, Carotinoide oder Flavonoide) oder als Geruchsbeziehungsweise Geschmackstoffe (Mono- und Sesquiterpene) (RICHTER, 1996). Einige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wirken antioxidativ durch ihre -OH Gruppe am der Ringstruktur. Das H-Atom wird geladen und kann so freie Radikale binden. Freie Radikale bezeichnen Atome oder Moleküle, die aufgrund ihrer instabilen Struktur hochreaktiv sind und mit anderen Verbindungen reagieren. Die Antioxidantien die in

Gewürzpflanzen enthalten sind, wirken auch später in den aus ihnen hergestellten Extrakten. Durch Einsatz von Extrakten, kann die Konzentration der Antioxidans erhöht werden (GERHARDT et al., 2005).

1.4 Salbei (*Salvia officinalis*)

Salbei (*Salvia officinalis*) gehört wie Thymian, Majoran, Rosmarin und Oregano der Familie der Lippenblüter (Lamiaceae) an. *Salvia officinalis* ist innerhalb der Familie sehr formenreich. Die verschiedenen Salbeiarten sind nicht nur in der Wuchsform unterschiedlich, sondern auch in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe (DACHLER und PELZMANN, 1999). Der bis zu 80 cm große Halbstrauch ist eine immergrüne Heil- und Gewürzpflanze, die aus dem Mittelmeerraum stammt. An den aufrecht verzweigten Stängeln wachsen gegenständig langgestielte, eiförmige Blätter, die zwischen drei und zehn Zentimeter lang sind. In der frühen Wachstumsphase sind die Blätter oft dicht silbrig behaart. Ein weiteres Charakteristikum der Blätter stellt die netzartige Nervatur dar, die an der Oberfläche eingesenkt ist und an der Blattunterseite hervortritt.

Die meist violetten Blüten sind in sechs bis acht Scheinquirlen (Blütenkrone) übereinander stehend angeordnet. Die Blütezeit beginnt im Juni und endet im Oktober (TEUSCHER, 2003). Die Bestäubung erfolgt durch meist größere Hautflügler wie Bienen oder Hummeln. Salbei bevorzugt steinige, trockene und kalkhaltige Böden mit viel Sonneneinstrahlung und trockenen Wintern.

Im Handel werden hauptsächlich getrocknete, ganze oder gemahlene Salbeiblätter verwendet. Ebenso das ätherische Salbeiöl. Schon lange wird Salbei als Gewürz- bzw. Heilpflanze verwendet.

„Salvus“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet soviel wie „retten, heilen“.

Der Echte Salbei wird in der Küche gerne zum Würzen von Fleisch, für die Zubereitung von Fisch, Käse, Suppen sowie Tomatengerichte verwendet. Weiters wird *S. officinalis* als Gewürzmischung verwendet oder als Tee getrunken.

Der Geschmack von Salbei ist würzig bitter aber auch leicht brennend. Aufgrund des Thujongehaltes ist uneingeschränkter Einsatz nicht möglich (DACHLER und PELZMANN, 1999).



Abb. 5: Echter Salbei (*Salvia officinalis*)

Quelle: <http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-eng.htm>

1.4.1 Inhaltsstoffe von Salbei (*Salvia officinalis*)

Das ätherische Öl besteht hauptsächlich aus Mono- und Sesquiterpenen. Monoterpen-Keton-Verbindungen wie z.B. α - und β - Thujon, sind bis zu 60 % vorhanden.

Im Detail sind die Hauptkomponenten (mengenmäßig gereiht) wie folgt

Camphene

Limonene und 1,8-Cineole

α - Thujon

β - Thujon

Camphor

Borneol

Bornyl Acetate

α - Humulene

Viridiflorol

Manool

Salvia officinalis enthält bis zu 2,5 % ätherisches Öl. Das würzig-bittere Aroma beruht auf diesen Hauptkomponenten

Terpene

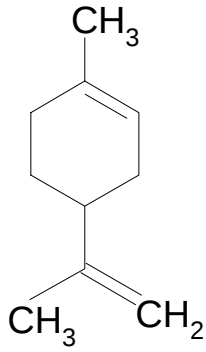
Terpene sind Moleküle, die aus dem Grundgerüst Isopren bestehen. Diese können linear, cyclisch oder beides gleichzeitig sein. Sie können C-Doppelbindungen, Hydroxygruppen oder andere funktionale Gruppen aufweisen. Sind die Terpene durch Oxidation oder Neuordnung der Kohlenstoffstruktur verändert worden, werden sie Terpenoide genannt.

Klassifizierung der Terpene

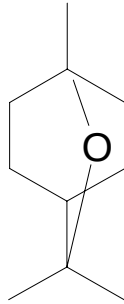
Bezeichnung	Nr. der Terpeneinheiten	Kohlenstoffatome
Emiterpen	n=1	C ₅
Monoterpen	n=2	C ₁₀
Sesquiterpen	n=3	C ₁₅
Diterpen	n=4	C ₂₀
Sesterterpene	n=5	C ₂₅
Triterpene	n=6	C ₃₀
Tetraterpene	n=8	C ₃₅
Polyterpene	n>8	C ₄₀

Strukturformeln einiger Terpene:

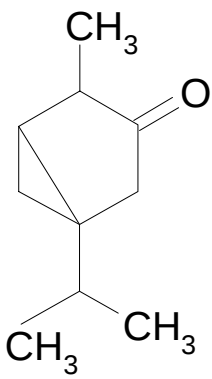
Monoterpene:



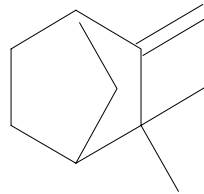
Limonene



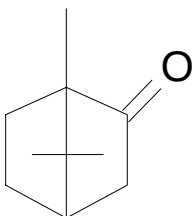
1,8-Cineol



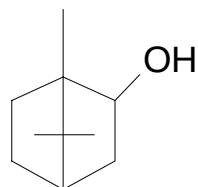
Thujon



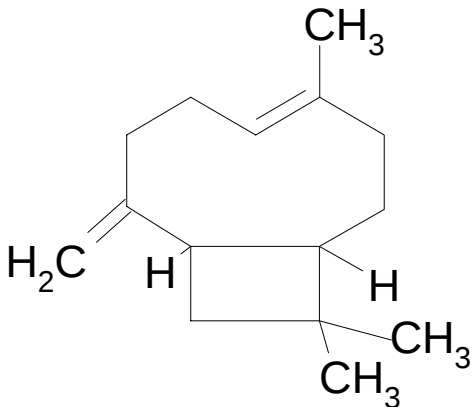
Champhene



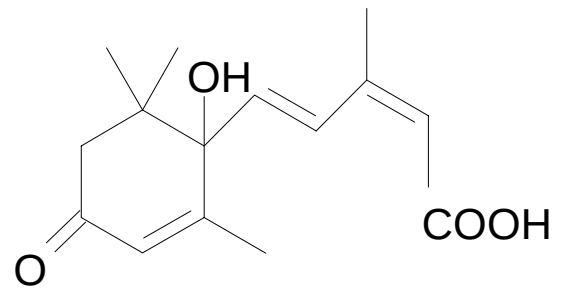
Champhor



Borneol

Sesquiterpene

Caryophyllene

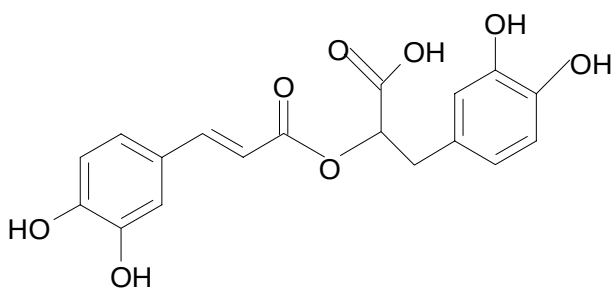


Abscisinsäure

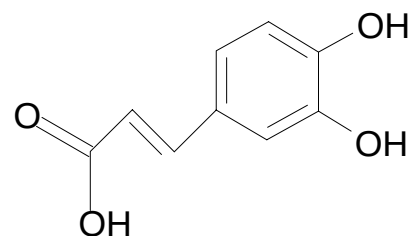
Phenole und Polyphenole

Phenole sind Verbindungen, die aus einem aromatischen Ring und mindestens einer daran gebundenen Hydroxylgruppe besteht.

Polyphenole sind Verbindungen, die direkt am aromatischen Ring zwei oder mehr Hydroxylgruppen gebunden haben. Polyphenole stellen eine große Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe dar und kommen in fast allen Pflanzen vor. Zu dieser Gruppe zählen Flavonoide, die als Antioxidantien wirken. Beispiele für Polyphenole sind Rosmarinsäure und Kaffeesäure.



Rosmarinsäure



Kaffeesäure

Vor allem Kaffeesäure und Rosmarinsäure sind in ihrer Antioxidativen Aktivität um einiges höher als die der Flavonoide.

Flavonoide

Flavonoide, die zu den Polyphenolen gehören, werden im sekundären Stoffwechsel von den meisten höheren Pflanzen gebildet. Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen und einem heterozyklischen Ring. Durch strukturelle Unterschiede können die Flavonoide in sechs Gruppen eingeteilt werden (WATZL und RECHKEMMER, 2001):

Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide.

In den Pflanzen haben Flavonoide unter anderem die Funktion des Anlockens von Insekten und der Schutz vor Infektionen.

Flavonoide haben antioxidative Wirkungen im menschlichen Organismus, sie können das Wachstum von Bakterien und Viren hemmen und die Zellen vor freien Radikalen schützen. Ihre pharmakologische Wirkung ist vielfältig und reicht von krampflösend über entzündungshemmend oder abführend. (DACHLER und PELZMANN, 1999).

In der Pharmazie sind vor allem die ätherischen Öle, Flavonoide und Bitterstoffe sowie Labiatengerbstoffe wichtig. Im medizinischen Bereich wird Salbei in Form von Tee, alkoholischen Auszügen sowie Extrakten aber auch in Form von reinem ätherischem Öl angewandt.

2. FRAGESTELLUNG

In einigen vorangegangenen Studien ist es durch Mykorrhizierung in Pflanzen, die der Familie der Lamiaceae angehören, zu einer signifikanten Erhöhung von bioaktiven Wirkstoffen gekommen. Bisherige Studien zeigten unter anderen auch eine Erhöhung der Gesamttrockenmasse sowie Veränderungen der sekundären Pflanzenstoffe.

Die Fragestellung der folgenden Arbeit lautet:

- **Verändert die Wurzelkolonisierung durch symbiontische Mykorrhizapilze in Salbei (*Salvia officinalis*) die Gehalte an sekundären Pflanzenstoffen und ihre Bioaktivität?**

Im Speziellen sollen Veränderungen durch unterschiedliche symbiontische Mykorrhizapilze auf die Antioxidative Aktivität, dem Gehalt an Gesamtflavonoiden, dem Gehalt an phenolischen Verbindungen untersucht werden.

Weiters soll der Einfluss von zwei unterschiedlichen Phosphordüngestufen auf den Biomasseertrag sowie auf bioaktiver Wirkstoffe bei Salbei (*Salvia officinalis*) beobachtet werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsplanung

Setzen der Stecklinge: 19. Jänner 2007

Datum der Inokulation: 28. März 2007

Ernte der Pflanzen: 1. August 2007

Bei diesem Versuch wurden Salbeistecklinge verwendet. Bei Stecklingen handelt es sich um vegetative Vermehrung, was bedeutet, dass das Erbgut unverändert bleibt und es so zu keiner genetischen Diversität zwischen den Pflanzen kommt.

Folgende Daten wurden bei der Ernte erhoben:

- Bestimmung von Frischgewicht von Spross und Wurzeln
- Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

An dem Trockenmaterial wurden folgende chemische Analysen durchgeführt:

- Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels spektroskopischer Methode nach Folin-Ciocalteu
- Messung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode
- Analyse der ätherischen Ölkomponenten durch qualitative und quantifizierende Messmethoden
- Quantifizierung von Rosmarinsäure und Kaffeesäure mittels HPLC Methode
- Bestimmung der Gesamtflavonoide
- Bestimmung des Phosphorgehaltes mittels Ammonium-Vanadat-Molybdat Methode nach Gericke und Kurmies (1952)

3.1.1 Substrat

Für die Ansaat wurde ein selbst gemischtes Substrat verwendet. Es bestand zu gleichen Teilen aus:

- feinem Blähton – Leca
- Quarzsand
- gesiebter Erde

Damit das Substrat keimfrei von Unkrautsamen oder Krankheitserregern ist, wurde die selbst hergestellte Mischung in Säcke abgefüllt und autoklaviert.

3.1.2 Pflanzung

Grundsätzlich wurden die Salbeipflanzen in Perlit gezogen. Danach erfolgte die Vermehrung vegetativ über Stecklinge, sodass es keine genetische Diversität unter den Pflanzen gab. Die Bewurzelung der Stecklinge fand in steriler Aussaaterde statt.

Zuerst wurden die Töpfe mit dem autoklavierten Substrat befüllt. Jeder Topf sollte bis auf zwei Fingerbreit befüllt werden. Die Unterschalen der Töpfe wurden mit Wasser gefüllt, sodass sich das Substrat von unten her voll saugen kann. Dies hat den Vorteil, dass die Pflanzlöcher später besser bestehen bleiben.

Nun wurden Löcher in das feuchte Substrat gestochen und mit dem jeweiligen Pilz inokuliert.

Das Inokulum besteht aus Trägermaterial aus getrockneten mykorrhizierten Wurzeln sowie aus Hyphen und Sporen.

Die bewurzelten Grünstecklinge wurden danach in die inokulierte Erde gesetzt. In jeden Topf wurden drei Salbeipflanzen gesetzt.

Die Hauptversuchsanlage bestand aus:

Pflanzen mit Mykorrhiza Pilz

Pflanzen ohne Mykorrhiza Pilz; ohne Phosphordüngung

Pflanzen ohne Mykorrhiza Pilz; mit halbe Phosphor Versorgung

Pflanzen ohne Mykorrhiza Pilz; mit voller Phosphor Versorgung

Insgesamt bestand der Versuch aus 7 Varianten:

Tab. 1: Versuchsanlage

Variante	Wiederholungen
Kontrolle	mind. 3
Symbivit	mind. 3
G. mosseae	mind. 3
G. intraradices	mind. 3
G. roseae	mind. 3
Phosphor voll	mind. 3
Phosphor halb	mind. 3

Die kommerziell erhältliche Pilzmischung „Symbivit“ ("Symbivit", SYMBio-M; Czech Republic) wurde aus wirtschaftlichen Gründen verwendet. Sie ist leicht erhältlich und weit kostengünstiger als Einzelpilze. Dieses Inokulum besteht aus *Glomus intraradices* BEG 98, *G. mosseae* BEG99, *G. claroideum* BEG93, *G. microagregatum* BEG56, *G. caledonium* BEG97 and *G. etunicatum* BEG92.

Die Verwendung der Einzelpilze der Gattung *Glomus* sowie *Gigaspora* ist in der Mykorrhizaforschung weit verbreitet und wird daher auch für diese Arbeit angewandt.

Die Nährlösung für die unterschiedlichen Phosphordüngungsstufen bestand aus folgenden Konzentrationen:

Verwendete Chemikalien für 100 Liter Nährlösung:

	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Calciumnitrat	47,23 g
	K_2SO_4	Kaliumsulfat	26,14 g
	KH_2PO_4	Kalium-di-hydrogenphosphat	13,6 g
	MgSO_4	Magnesiumsulfat	36,94 g
	NH_4NO_3	Ammoniumsulfat	0,80 g
A	$\text{Fe}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$	Fetrilon	5 g
B	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 4\text{H}_2\text{O}$	Natriumtetraborat	0,13 g
C	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	Mangansulfat	0,15 g
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Zinksulfat	0,06 g
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Kupfersulfat	0,045 g
D	$(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3)$	Aluminiumsulfat	0,00028 g
	$\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Nickelsulfat	0,00028 g
	$(\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O})$	Kobaltnitrat	0,00028 g
	TiO_2	Titandioxid	0,00028 g
	LiCl_2	Lithiumchlorid	0,00014 g
	SnCl_2	Zinnchlorid	0,00014 g
	KJ	Kaliumjodid	0,00014 g
	KBr	Kaliumbromid	0,00014 g
E	MoO_3	Molybdänoxid	0,01 g

Oben angeführte Konzentrationen galten für die volle Phosphordüngung. Für die halbe Phosphorvariante betrug die Konzentration von KH_2PO_4 (Kalium-di-hydrogenphosphat) für 100 Liter Nährlösung 1,36 g.

Bei den Varianten ohne Phosphorgabe wurden alle Elemente außer KH_2PO_4 hinzugegeben.

3.1.3 Pflanzenernte

Die Pflanzen wurden vorsichtig aus dem Topf gezogen und unter fließendem Wasser vom Substrat befreit.

Anschließend wurde das Frischgewicht des Sprosses und der Wurzel bestimmt.

Die Wurzel wurde nun vom Spross getrennt und das Frischgewicht der Wurzel bestimmt.

Ein etwa 1 cm großes Stück wurde aus den oberen 5 cm der Wurzel herausgeschnitten und in Reagenzgläser mit Aqua dest. gegeben, um später den Mykorrhizierungsgrad bestimmen zu können.



Abb. 6: Entnahme von 1 cm Wurzelprobe



Abb. 7: 1 cm Wurzelproben
für die Bestimmung des
Mykorrhizierungsgrades

Je Behandlung wurden alle Sprosse und Wurzeln in Papiersäcke gegeben und einige Tage im Trockenschrank bei 35 °C getrocknet.



Abb. 8: Trockenschrank mit Proben

Anschließend wurde das Trockengewicht jeder Behandlung ermittelt.

3.1.4 Bestimmung Mykorrhizierungsgrad

Um den Mykorrhizierungsgrad bestimmen zu können, wurden jene Wurzelproben, die bei der Pflanzenernte entnommen und in ein Reagenzglas mit Aqua dest. gegeben wurden, eingefärbt. Die Färbung erfolgte nach der Methode von VIERHEILIG et al (1998).

Vor der Färbung mussten die Wurzeln mit 10% Kalilauge gebleicht werden. Diese Proben wurden anschließend für 3 Minuten in das 90° C heiße Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Wurzeln mit einer Essig – Tinte Lösung gefärbt. Dafür wurden 5 % Tinte: Schaeffer; black sowie Haushaltsessig: 5 % Essigsäure zusammengemischt.

Die Wurzeln mit der Essig-Tintenlösung im Reagenzglas wurden dann für ca. 4 Minuten ins Wasserbad bei 90 °C gestellt. Anschließend wurden die Wurzeln wiederum mit Aqua dest. abgespült, bis keine Tinte mehr aus der Wurzelmasse geronnen ist.

Die angefärbten Wurzeln wurden nun in eine Petrischale mit Raster und etwas destilliertem Wasser gegeben.

Mithilfe dieser Rasterung wurden nun die mykorrhizierten Wurzeln unter dem Binokular gezählt. Jede Wurzel die an eine Rasterlinie kreuzt wurde dabei gezählt.

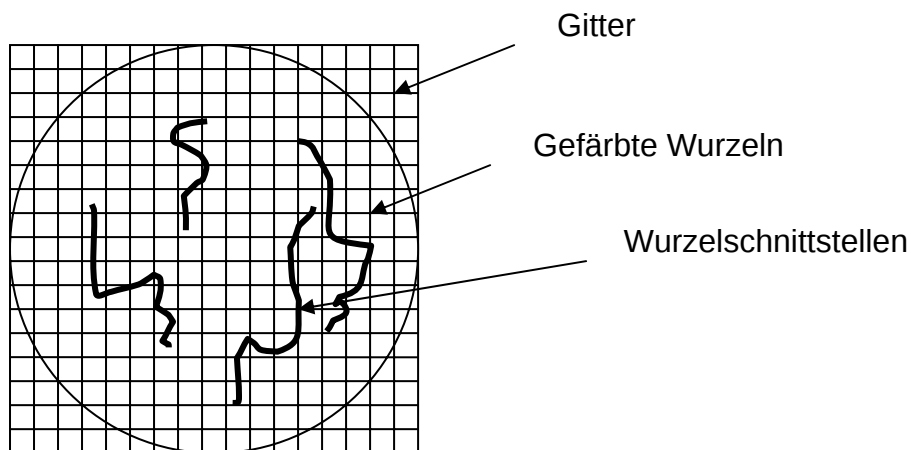


Abb. 9: Gridline intercept Methode

Insgesamt wurden mit der Gridline intercept Methode genau 100 Wurzelschnittstellen ausgezählt.

Der Mykorrhizierungsgrad in Prozent wurde mittels der Anzahl der mykorrhizierten Wurzeln im Verhältnis zu den 100 ausgezählten Wurzeln ermittelt.

Mykorrhizierungsgrad % = Anzahl mykorrhizierte Wurzeln / 100 Wurzeln

3.2 Analytik der Inhaltsstoffe

Mit dem getrockneten Pflanzenmaterial der Blätter und Wurzeln wurden folgende Analysen durchgeführt.

Die Analysen erfolgten im Labor des Institutes für Angewandte Botanik an der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

- Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels spektroskopischer Methode nach Folin-Ciocalteu
- Messung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode
- Analyse der ätherischen Ölkomponenten durch qualitative (GC-MS) und quantifizierende (GC-FID) Messmethoden
- Quantifizierung von Rosmarinsäure und Kaffeesäure mittels HPLC Methode
- Bestimmung der Gesamtflavonoide

Die folgende Analyse wurde am Department für Pflanzenbau an der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt.

- Bestimmung des Phosphorgehaltes mittels Ammonium-Vanadat-Molybdat Methode (GERICKE und KURMIES, 1952)

Auflistung der verwendeten Chemikalien

- **Folin-Ciocalteu-Reagenz**: Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)
- **DPPH** (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) sowie **Kaffeesäure** (für die HPLC Analyse): Firma Sigma Aldrich (Wien, Österreich).
- **Trolox** (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra172 methylchromane-2-carboxylic acid): Fluka (Wien, Österreich).
- **Rosmarinsäure** (für die HPLC Analyse): Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland).
- **Methanol** sowie **Ethanol** (für die Extrakterstellung und für die unterschiedlichen Analysen): Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), Reinheitsgrad: p. A

Weitere Chemikalien:

5 % NaNO_2

10% $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

1 M NaOH

Catechin

gesättigte Na_2CO_3 Lösung

1 l HNO_3 (conc. 65 %)

100 ml H_2SO_4 (conc. 95-95%)

50 ml HClO_4 (conc. 60%)

300 ml Ammonvanadat

300 ml Ammonmolybdat

100 ml HNO_3

3.2.1 Methanolextrakte (Blatt und Wurzel)

Für die Blattextraktion wurde ein Teil der getrockneten Blattmasse mit der Culatti Mikro-Schlagmühle (mittlerer Einsatz) vermahlen. Für die Extraktion der Wurzeln wurden die Wurzeln mit der Schlagmühle vermahlen. Die weitere Extraktion erfolgt ebenso wie die der Blattmasse.

Je 0.05 g gemahlene Probe wurde in ein Schraubglas eingewogen. Anschließend wurden 8 ml 50%iges Methanol zugesetzt und das Schraubglas verschlossen. Die Proben wurden eine Stunde im gekühlten Ultraschallbad extrahiert.

Auf ein dunkles 10 ml Glasgefäß wurde ein Glastrichter gegeben. Das Extrakt wurde durch einen 604 ½ Faltentrichter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) ca. ½ Stunde gefiltert, das Gefäß mit einem Schnappdeckel verschlossen und bis zur weiteren Analyse bei -18°C gelagert, um einen Abbau der gelösten Inhaltsstoffe zu verhindern.

Die MeOH-Extrakte der Blätter und Wurzeln wurden für die photometrischen Bestimmungen (Gesamtphenole, Antioxidative Komponente sowie Gesamtflavonoide) sowie für die Rosmarin- u. Kaffeesäure Bestimmung herangezogen.

3.2.2 Quantitative Bestimmung des ätherischen Öles

Material

500 ml Rundkolben

Kolbenring

Glaskugeln

Destillations-Apparatur

Aqua dest.

Aceton

Durchführung

In einen 500 ml Rundkolben wurden 5 g der getrockneten und gerebelten Blattmasse eingewogen. Um Siedeverzug zu vermeiden wurden anschließend 4-5 Glaskugeln hinzugegeben. In jeden Rundkolben wurden danach 200 ml Aqua dest. hinzugefügt.

Die Kühlung wurde langsam aufgedreht, wobei der Fluss langsam erhöht wurde, um ein Platzen des Kühlungsschlauches zu verhindern.

Die Messskala der Destillationsapparatur wurde luftblasenfrei mit Aqua dest. befüllt. Der mit der Probe befüllte Rundkolben wurde mit Hilfe einer Klemme an der Apparatur befestigt. Anschließend wurde die Heizhaube an den Kolben angepasst und auf die Stufe 10 (höchste Stufe) eingeschalten.

Prinzip

Ab Beginn des Siedens verdampft Wasser mit den ätherischen Ölkompontenten. Kühlt dieses ab, trennen sich Wasser und Öl. Das Öl schwimmt auf.

Die Rücktropfgeschwindigkeit wurde laufend gemessen und durch die Temperaturregelung eingestellt. Ein optimales Ergebnis wurde bei 10 Tropfen pro 15 Sekunden erreicht.

Nach einer Stunde wurde die Heizung abgeschaltet und die Heizhaube entfernt.

Das Wasser in der Messskala wurde vorsichtig abgelassen. Anschließend wurde das Ölvolumen an den Teilstrichen abgelesen, wobei ein Teilstrich 0,01 ml (Mensureneinheit) bedeutet.

Das Wasser wurde anschließend soweit abgelassen bis das ätherische Öl beim Kükeneingang ist. Das Restwasser aus dem Hahn wurde mittels saugfähigem Papier abgesaugt.

Das ätherische Öl wurde abschließend in ein beschriftetes Eppendorf-Tube abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

Die Apparatur wurde vor der nächsten Destillation zweimal mit Aceton und zweimal mit Aqua dest. gespült.

Der Hahn wurde wieder geschlossen und die Messskala wiederum mit Aqua dest. für den nächsten Durchgang gefüllt.

Berechnung

ml = Teilstrich x Mensureneinheit

$$\text{ätherisches Öl (\%)} = \frac{\text{ml} \times 100}{\text{Einwaage in g}}$$

3.2.3 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

Messprinzip

Polyphenole ergeben mit der Folin-Ciocalteu-Reagenz im alkalischen Milieu eine Blaufärbung, welche dann photometrisch gemessen und anhand einer Kalibriergeraden berechnet wird.

Mit dieser Methode misst man den gesamten Gehalt an phenolischen Verbindungen in den Salbeiextrakten.

Die Ergebnisse werden in Kaffeesäure Äquivalente ausgedrückt.

Material

25 ml Erlenmeyerkolben

Bechergläser

Pipetten mit versch. Volumina und dazugehörige Spitzen

Einweg-Küvetten

Chemikalien

Folin-Ciocalteu-Reagenz

gesättigte Na_2CO_3 Lösung (0,035 g Na_2CO_3 / 100 ml Aqua dest. in einem Erlenmeyerkolben mit Teflonverschluss im warmen Wasserbad etwa eine halbe Stunde bei 70 ° C gelöst)

Kaffeesäure (10 mg / 10 ml Aqua dest. gelöst im warmen Wasserbad, ergibt eine farblose Lösung)

Einstellung Photospektrometer

Gerät: Hitachi 150-20 double beam spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)

Mode: Absorbance

Wellenlänge: 725 nm

Response: Medium

Durchführung

Für den Blindwert wurden je 2 ml Aqua dest. in Epruvetten pipettiert. Anschließend wurden je 40 µl 50%iges MeOH hinzupipettiert.

Für die Eichreihe wurden zuerst je 2 ml Aqua dest. in Epruvetten gefüllt.

Anschließend wurde folgende Eichreihe pipettiert.

Tab. 2: Kaffeesäure Eichreihe

Eichreihe:	Kaffeesäure	Aqua dest.
	40 µl	0 µl
	30 µl	10 µl
	20 µl	20 µl
	15 µl	25 µl
	10 µl	30 µl
	5 µl	35 µl
	0 µl	40 µl

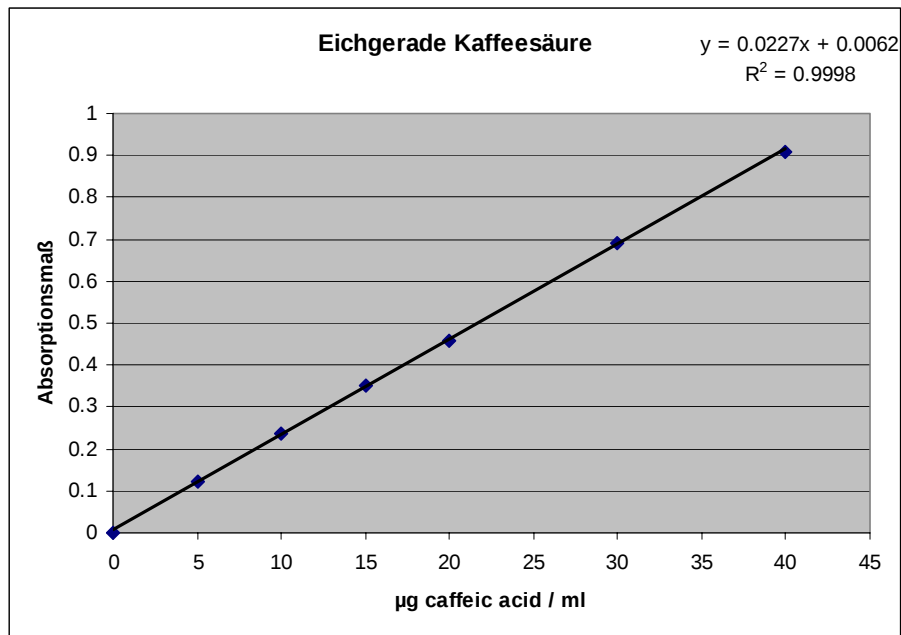


Abb. 10: Eichgerade Kaffeesäure

Für die Messung der Proben wurden zuerst je Epruvette 2 ml Aqua dest. pipettiert. Anschließend wurden 40 µl Probe hinzugegeben.

In jede Epruvette (Blindwert, Eichreihe sowie Proben) wurden danach 100 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz zugesetzt. Nach 3 Minuten Wartezeit wurden 20 µl gesättigte zugesetzt und mit 2660 µl Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Mit Zusetzung der gesättigten Na_2CO_3 Lösung kommt es zu einem Farbumschlag von farblos/hellgelb auf blau.

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten im Dunkeln erfolgte anschließend die Messung im Photospektrometer gegen den Blindwert.

Jede Probenreihe bestand aus max. 7 bzw. 8 Einzelproben.

Die Werte des Photospektrometers wurden auf mg Kaffeesäure / g Trockenmasse (mg KS / g TM) umgerechnet.

3.2.4 Antioxidative Aktivität mit DPPH

Messprinzip

Mit Hilfe von DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil), einem Farbstoff, wird die antioxidative Aktivität gemessen. Die photospektrometrische Methode beruht auf dem Prinzip, dass die intensiv violettfarbenen DPPH-Radikale mit den in der Probe enthaltenen Antioxidantien reagiert und dadurch entfärbt werden.

DPPH ist ein stabiles Radikal, welches mit den in den Salbeiextrakten enthaltenen Antioxidantien einen Komplex bildet. Bei dieser Komplexbildung entsteht eine lila Färbung.

Je höher der Gehalt an Antioxidantien im Salbeiextrakt ist, desto mehr Komplexe werden gebildet, desto heller ist die Reaktionsfarbe. Das Radikal DPPH wird in diesem Fall rasch abgebaut.

Die Antioxidative Aktivität wird in Trolox Äquivalente, einem wasserlöslichen Vitamin E Derivat, ausgedrückt.

Material

Messbecher

Erlenmeyerkolben

Kurze Epruvetten

Pipetten versch. Volumina und dazugehörige Spitzen

Einweg – Küvetten

Alufolie

Rührmagnete

Chemikalien

DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazil (0,0075g / 50 ml konz. MeOH, Erlenmeyerkolben mit Alufolie umhüllen, ständiges Rühren während des Gebrauches)
Trolox	(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchromane-2-carboxylic-acid (0,0314g / 50 ml konz. EtOH)
Methanol	MeOH
Ethanol	EtOH

Einstellung Photospektrometer

Gerät:	Hitachi 150-20 double beam spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Mode:	Absorbance
Wellenlänge:	515 nm
Response:	Medium

Durchführung

Alle Messungen wurden in doppelter Bestimmung durchgeführt. Je Lauf wurden maximal 7 bzw. 8 Proben gemessen, da es sonst durch die Pipettierzeit bereits zu Reaktionen kommen könnte.

Je Lauf wurde der Blindwert sowie die Eichreihe neu hergestellt und gemessen.

Für den Blindwert wurden 2 kurze Epprovetten mit je 500 µl Trolox sowie je 500 µl konzentriertem Methanol pipettiert.

Anschließend wurden folgende Troloxvolumina in Epprovetten zur Berechnung der Eichreihe pipettiert.

Tab. 3: Trolox Eichreihe

Eichreihe:	Trolox	Konz. MeOH
	0 µl	1000 µl
	10 µl	990 µl
	20 µl	980 µl
	40 µl	960 µl
	60 µl	940 µl
	80 µl	920 µl

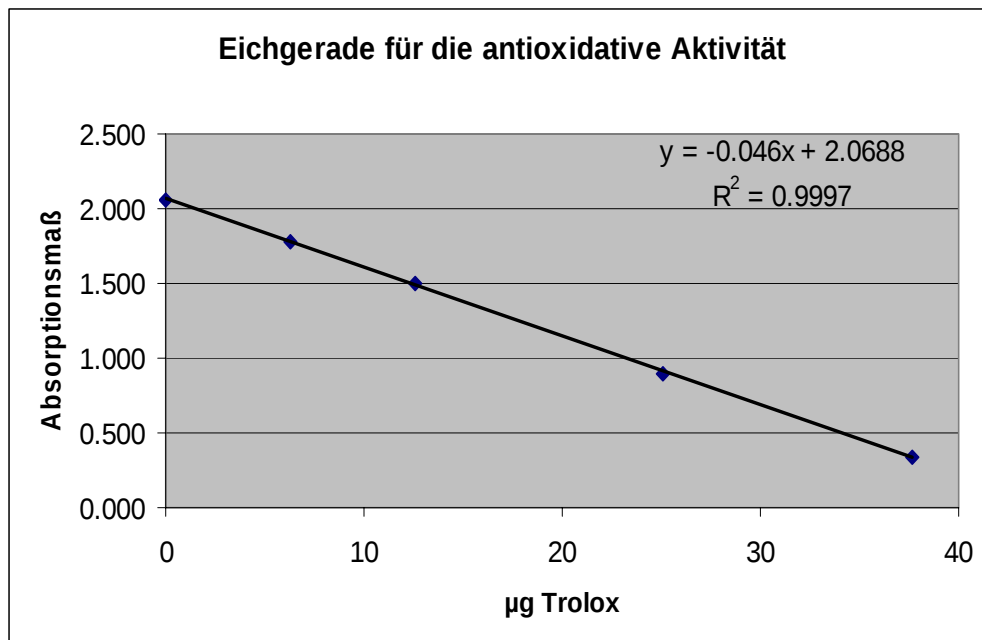


Abb. 11: Trolox Eichgerade Blattextrakte

Für die Messung der Proben wurden in jede Epprouvette zuerst 50 µl der Probe pipettiert und anschließend jeweils 950 µl MeOH hinzugefügt.

Anschließend wurden in alle Epprouvetten 1000 µl DPPH hinzugefügt.

Sobald man das DPPH zufügt beginnt die Reaktion.

Danach wurden die Epprouvetten verschlossen und gevortext.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln wurde die Absorption der Reaktionslösungen gegen den Blindwert gemessen.

3.2.5 Messung des Gesamtphosphorgehaltes

Messprinzip

Die Bestimmung der gesamten Phosphorgehalte erfolgt durch einen nassen Säureaufschluss. Bei dieser Methode werden Nährelemente wie Fe, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Zn und Phosphor aus dem Probenmaterial gelöst.

Durch Zugabe des Reaktionsgemisches mit Ammonium-Vanadat-Molybdat, welches mit Phosphor reagiert, entsteht ein Farbumschlag, der mittels Photospektrometer gemessen und berechnet wird. Mit Hilfe der mitgeführten Phosphorstandards wird der Phosphorgehalt anschließend berechnet. Der Säureaufschluss bewirkt die vollständige Auflösung der Probe in ihre Elemente.

Material

50 ml Meßkölbchen

kurze Eprouvetten

Pipetten mit versch. Volumina und dazugehörige Spitzen

Chemikalien

3 – Säuregemisch:

1 l HNO_3 (conc. 65 %) – Salpetersäure

100 ml H_2SO_4 (conc. 95-95%) – Schwefelsäure

50 ml HClO_4 (conc. 60%) – Perchlorsäure

P – Reaktionsgemisch:

300 ml Ammonvanadat (2,5g in heißem Wasser lösen und 20 ml HNO₃ vorsichtig hinzugeben)

300 ml Ammonmolybdat (50g x 4 H₂O/l in heißem Wasser lösen und auf 1 l auffüllen)

100 ml HNO₃ (conc. 65%)

200 ml Aqua dest.

Einstellung Spektralphotometer

Gerät: Varian DMS 200 Spektralphotometer

Mode: Absorbance

Wellenlänge: 436 nm

Response: Medium

Durchführung

Das gemahlene Pflanzenmaterial wurde im Trockenschrank bei 103 ° C für 4 Stunden getrocknet und anschließend im Exsikkator für eine halbe Stunde ausgekühlt.

Jede Probe wurde in zweifacher Ausführung aufgeschlossen und analysiert.

Pro Meßkölbchen wurden 500 mg des vermahlenden Pflanzenmaterials eingewogen.

Anschließend wurden jeweils 10 ml des 3 – Säuregemisches hinzugefügt.

Für den Blindwert wurden zwei Meßkölbchen nur mit je 10 ml 3 – Säuregemisch befüllt. Der Blindwert wurde im Weiteren gleich wie die anderen Proben behandelt.

Die Meßkölbchen blieben unverschlossen über Nacht unter dem Abzug stehen.

Am darauf folgenden Tag erfolgte der Aufschluss auf der Heizplatte. Das Heizprogramm beinhaltete 7 Schritte.

Es startete bei 120 °C und endet bei 290 °C. Anschließend wurden die Proben ausgekühlt und anschließend für 1 ½ Stunden bei 100 °C gekocht.

Danach wurden die Proben wiederum abgekühlt und mit Aqua dest. aufgefüllt.

Herstellung der Stammlösung

Primäres K-Phosphat KH_2PO_4 wurde 4 Stunden bei 103° C getrocknet (Mol. Gew. 136,09), davon wurden 1,0984 g in einer HNO_3 – Lösung mit einer Dichte von 1,005 auf 1 l aufgelöst (HNO_3 Dichte 1,005 = 25 ml HNO_3 /2l H_2O).

Tab. 4: Zusammensetzung der Phosphorstandards

Phosphorstandard	Stammlösung in 500 ml (= 250 ppm)
0 ppm	
2,5 ppm	5 ml mit HNO_3 (D=1,005 auffüllen)
5 ppm	10 ml - „ -
10 ppm	20 ml - „ -
20 ppm	40 ml - „ -
30 ppm	60 ml - „ -

Anschließend wurde folgende Eichreihe pipettiert:

Stammlösung ppm	Stammlösung ml	Phosphorreagenz ml
0 ppm	7 ml	3 ml
2,5 ppm	7 ml	3 ml
5 ppm	7 ml	3 ml
10 ppm	7 ml	3 ml
20 ppm	7 ml	3 ml
30 ppm	7 ml	3 ml

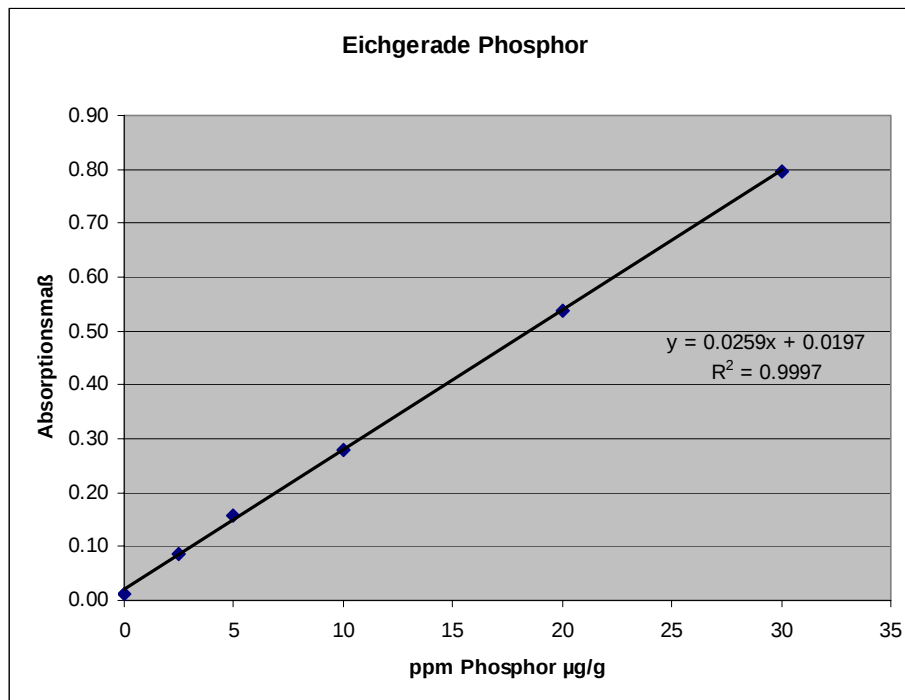


Abb. 12: Eichgrade Phosphor Blattproben

Für die Probenmessungen wurden je 40 ml der Probenreagenz sowie 3 ml H₂O und 3 ml der Phosphorreagenz in kurze Eprouvetten pipettiert und gut vermischt.

Die Proben inkubierten abgedeckt über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Absorption mit dem Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen.

Die Eichlösungen wurden vor und ebenfalls nach der Probenmessung gemessen.

Die Analyse wurde in einer Serie durchgeführt. Diese bestand aus 44 Blattproben (Doppelbestimmung), aus 2 Blindwerten und der Eichreihe. Jede Extinktion wurde zweifach gemessen.

Berechnet wird der Mittelwert % Phosphor je Behandlung.

3.2.6 Identifizierung und Quantifizierung der ätherischen Ölkomponenten mittels Gaschromatographie (GC)

Messprinzip

Bei der Gaschromatographie handelt es sich um eine physikalische Trennmethode, bei der die Auftrennung des Stoffgemisches aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelkomponenten sowie der intensiven Wechselwirkungen mit der stationären Phase der Säule erfolgt.

Mit dieser Methode werden leicht flüchtige Substanzen mit geringem Molekulargewicht gemessen.

Zur Identifikation vergleicht man die Retentionszeit und das Massenspektrum der Substanz mit Reinstoffen, beziehungsweise mit der Datenbank.

Die Retentionszeit ist die Zeit, die die zu messende Substanz benötigt, um durch die Säule zu wandern (= Zeitdifferenz zwischen Injektion und Detektion) (NAUMER und HELLER, 2002).

Gaschromatographie – MS

Für die Identifizierung der Komponenten des ätherischen Öles werden Gaschromatographie und Massenspektroskopie gekoppelt. Die Massenspektrometrie dient der Strukturaufklärung von Komponenten. Die Häufigkeit, mit der geladene Moleküle und deren Massenfragmente auftreten werden bestimmt und mit geeigneten Datenbanken verglichen.

Zur Identifikation der Komponenten werden die Retentionszeiten der Ölkompnenten mit den Retentionszeiten des Standards, einem Gemisch aus aliphatischen Kohlenwasserstoffen (von C8 – C32), dem sogenannten Kovats-Index verglichen (ADAMS, 2001).

Für die GC-MS wird folgendes Gerät verwendet:

HP 6890 gekoppelt mit HP 5972 MSD (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)

Einstellungen GC-MS

Trennsäule:	DB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm Schichtdicke; Agilent, Palo Alto, CA, USA)
Trägergas:	Helium
Injektortemperatur:	250 ° C
Injektionsvolumen:	1 µl
Split ratio:	50 : 1
Temp.-Programm:	60°C für 4 min, Erhöhung der Temperatur auf 100°C (5°C per Minute), 100-280°C (5°C per Minute), 280°C für 3 Minute

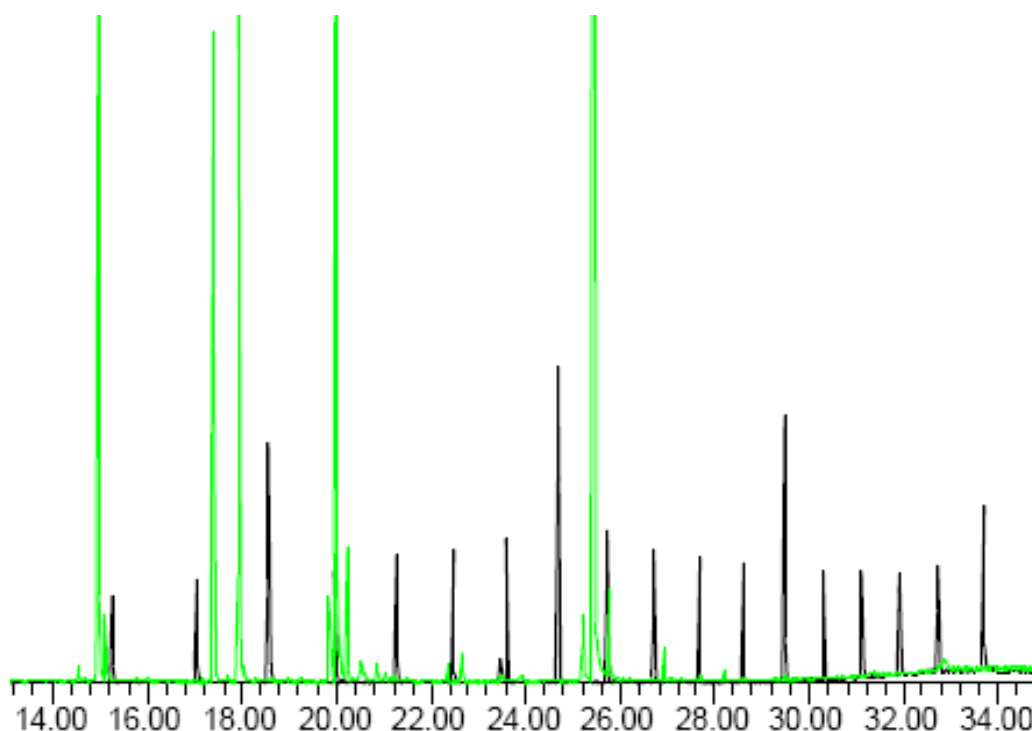


Abb. 13: GC/MS Chromatogramm Overlay vom Kovats-Standard (schwarz) und einer Probe (grün)

Gaschromatographie – FID

Für die Quantifizierung der Komponenten für das ätherische Öl wird der Flammenionisationsdetektor verwendet (GC/FID).

Dieser Detektor ist um ein Vielfaches empfindlicher und robuster als die GC/MS.

Mit Hilfe einer ätherischen Ölprobe, welches als Standard (1 µl ätherisches Öl plus 1000 µl CH₂Cl₂) für die Messung herangezogen wird, sowie der Flächenberechnung der bereits durch die GC-MS identifizierten Peaks, können die relativen Flächenprozent der Ölkompnenten bestimmt werden.

Die Zuordnung der auf der GC/MS identifizierten Substanzen erfolgt hier ebenfalls anhand des Kovats-Standards (Retention index standard für Gaschromatographie, Sigma, Wien, Österreich).

Für die Gaschromatographie FID wurde folgendes Gerät verwendet:

Agilent 6890 GC-FID

Einstellungen GC-FID

Trennsäule:	DB-5 (10 m x 0,1mm; 0,17 µm Schichtdicke; Agilent, Palo Alto, CA, USA)
Trärgas:	Helium
Injektortemperatur:	250 ° C
Injektionsvolumen:	0,2 µl
Split ratio:	15 : 1
Temp.-Programm:	60°C für 30 sec, Erhöhung der Temperatur auf 85°C (6°C per Minute), 86-300°C (10°C per Minute), 300°C für 3 Minute

3.2.7 Messung von Rosmarinsäure und Kaffeesäure mit HPLC

Messprinzip

Bei der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) – Methode werden Substanzen getrennt und mit der Retentionszeit und Wellenlängenspektren der Referenzsubstanzen (Reinsubstanzen) für Kaffeesäure und Rosmarinsäure verglichen. Die Auftrennung der Einzelkomponenten und die Identifizierung erfolgen aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen der Substanz mit der stationären Phase (Kieselgel).

Die HPLC Analyse wurde mit folgendem Gerät durchgeführt:

Waters modular System (626 Pump, mit Heizstation für Säule, In-Line Degasser AF, Autosampler 717 plus, Photodiode Array Detektor PDA996)

Einstellungen HPLC (Kaffeensäure und Rosmarinsäure)

HPLC Säule: Symmetry C18 , 5,0 µm, 4,6x150 mm

Injektionsvolumen: 20µl

Solvent D: 1%ige HAc : Acetonitril = 85 : 15

Solvent C: Methanol

Fluss: 1,5 ml/min

Temperatur: 25°C

Detektion: 330 nm

Datastart: 1 min

Laufzeit: 35 min

Vor jeder Probe wurden 5 Minuten mit einem Gemisch von 90% D : 10% C (Laufzeitbedingungen) equilibriert.

Rosmarinsäure kann bei oben angeführten Konditionen bei einer Laufzeit von etwa 9 Minuten und die Kaffeensäure bei einer Laufzeit von etwa 3 Minuten erwartet werden.

Es wird eine Eichgerade mit der Reinsubstanz Kaffeensäure und Rosmarinsäure erstellt.

Diese wird wie folgt pipettiert:

1. 500 µl reine Kaffeensäure
2. 500 µl reine Rosmarinsäure
3. 250 µl Kaffeensäure : 250 µl Rosmarinsäure = Stammlösung
4. 125 µl Stammlösung : 875 µl MeOH = 1 : 2
5. 200 µl Stammlösung : 800 µl MeOH = 1 : 5
6. 100 µl Stammlösung : 900 µl MeOH = 1 : 10
7. 50 µl Stammlösung : 950 µl MeOH = 1 : 20

Durchführung der HPLC - Analyse

Für die HPLC wurden zuerst die Methanolextrakte durch einen Spritzenfilter (RC 25, 0,2 µl) gefiltert um einer Verstopfung der Säule in der HPLC – Apparatur mit eventuellen Partikeln im Extrakt vorzubeugen.

Etwa 1,5 ml des gefilterten Extraktes wurden in HPLC – Probefläschchen abgefüllt. Diese Fläschchen konnten für die Messung in den Autosampler gestellt wurden.

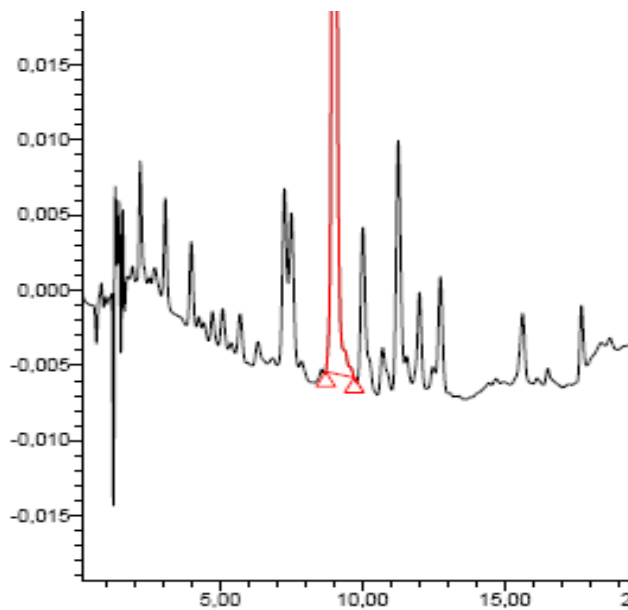


Abb. 14: Ausschnitt des integrierten Probenchromatogramms

3.2.8 Bestimmung der Gesamtflavonoide

Messprinzip

Die Gesamtflavonoide ergeben im alkalischen Milieu eine Gelbfärbung, die dann photometrisch gemessen wird und anhand einer Kalibriergeraden ausgedrückt wird.

Mit dieser Methode misst man den gesamten Gehalt an Flavonoiden in den Salbeiextrakten.

Die Ergebnisse werden in mg Catechin-Äquivalenten ausgedrückt.

Material

Kurze Eprouvetten

Messbecher in versch. Größen

Pipetten mit versch. Volumina und dazugehörige Spitzen

Erlenmeyerkolben

Einweg - Küvetten

Chemikalien

5 % NaNO_2 (0,9996 g / 20 ml Aqua dest.)

10% $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (2g /20 ml Aqua dest.)

1 M NaOH (1,9998 g / 50 ml Aqua dest.)

Catechin (0,010 g / 10 ml konz. MeOH)

Einstellung Photospectrometer

Gerät: Hitachi 150-20 double beam spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Mode: Absorbance
Wavelength: 510 nm
Response: Medium

Durchführung

Für den Blindwert wurden zuerst zwei kurze Eprouvetten mit 100 µl 50 % MeOH befüllt und anschließend 1400 µl Aqua dest. hinzugefügt.

Folgende Eichgerade wurde in zweifacher Ausführung in kurze Eprouvetten pipettiert

Tab. 5: Eichreihe Catechin

Eichreihe:	Catechin	Aqua dest.
	150 µl	1350 µl
	100 µl	1400 µl
	50 µl	1450 µl
	25 µl	1475 µl
	10 µl	1490 µl
	0 µl	1500 µl

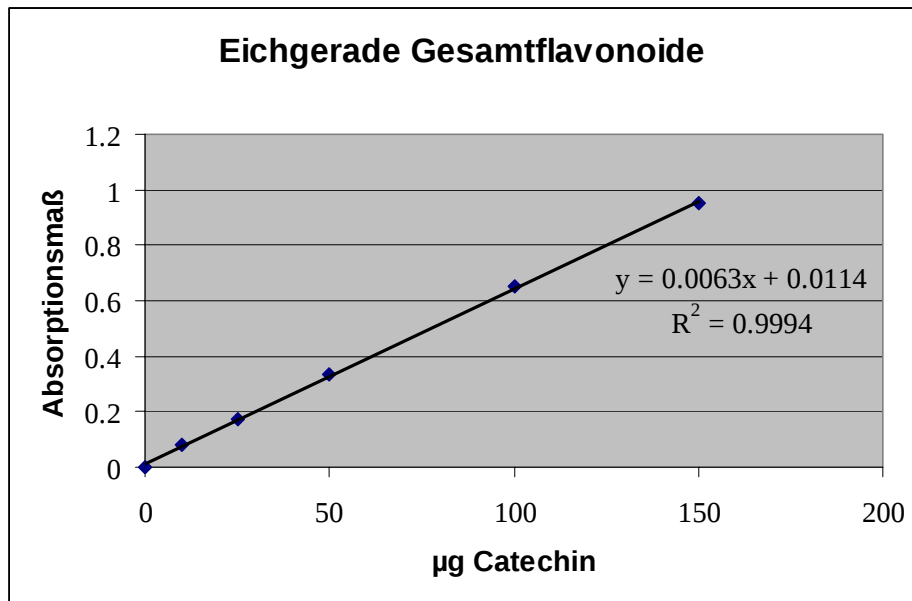


Abb. 15: Eichgerade Gesamtflavonoide

Für die Messung der Proben wurden je 100 µl Methanolextrakt in 1400 µl Aqua dest. verdünnt.

Anschließend wurden in jede der Epruvetten jeweils 75 µl 5 % NaNO₂ Lösung sowie 150 µl 10% AlCl₃ hinzugegeben, die Epruvetten gut verschlossen und gut gemischt (gevortext).

Die Farbe der Reaktionslösung verändert sich von farblos nach gelb.

Nach 5 Minuten Wartezeit wurden 500 µl 1M NaOH hinzupipettiert. Die Farbe der Flüssigkeit erhielt dadurch eine rote Farbe.

Danach wurden die Epruvetten auf ein Gesamtvolumen von 2.5 ml aufgefüllt. Dies bedeutete eine Zugabe von jeweils 275 µl Aqua dest.

Anschließend wurden die Proben in Küvetten geleert und im Photospectrometer bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen.

Der Blindwert, die Eichreihe sowie die Proben wurden in zweifacher Ausführung hergestellt.

Jede Probenreihe bestand aus maximal 7 bzw. 8 Einzelproben.

Die Werte des Photospectrometer wurden auf mg Catechin pro g Probentrockenmaterial (mg Catechin/g DM) umgerechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Biomasse

4.1.1 Sprosstrockengewicht

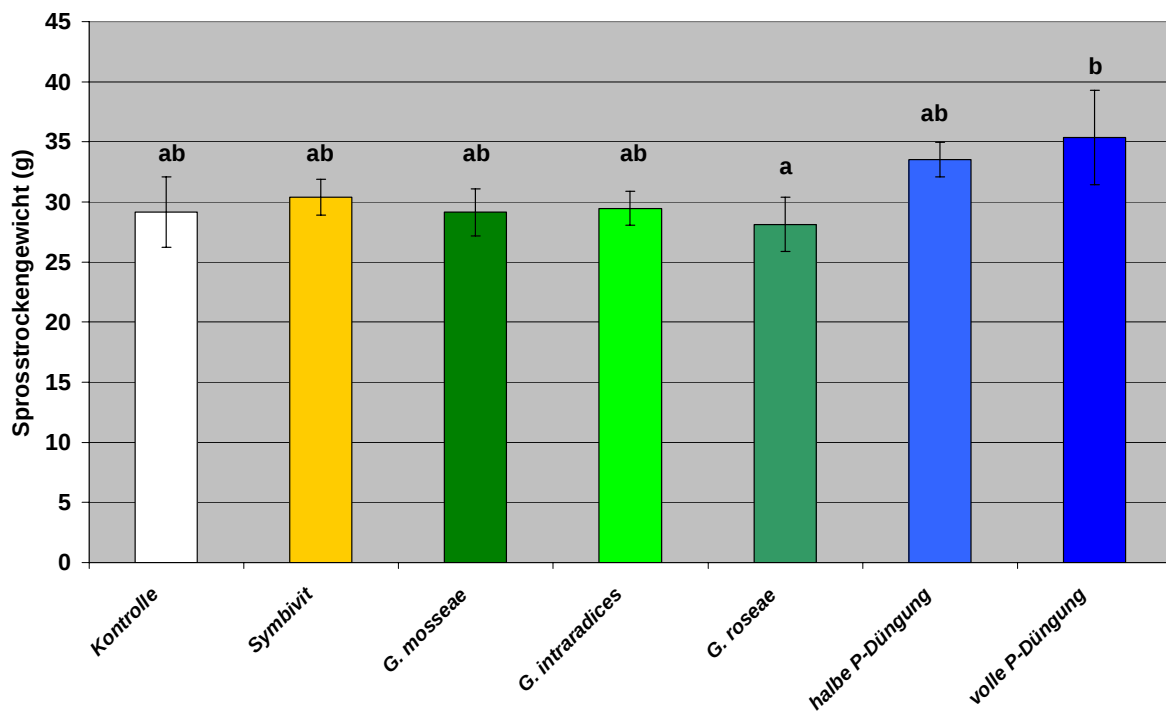


Abb. 16: Mittelwert des Sprosstrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Beim Sprosstrockengewicht (inkl. Blattanteil) zeigte die Variante der vollen Phosphordüngung den höchsten Wert von 35,4 g Trockengewicht. Variante *G. roseae* zeigte das niedrigste Sprosstrockengewicht von 28,1 g Trockengewicht und war somit signifikant niedriger als die Variante der vollen Phosphordüngung mit dem höchsten Sprosstrockengewicht.

4.1.2 Blatttrockengewicht

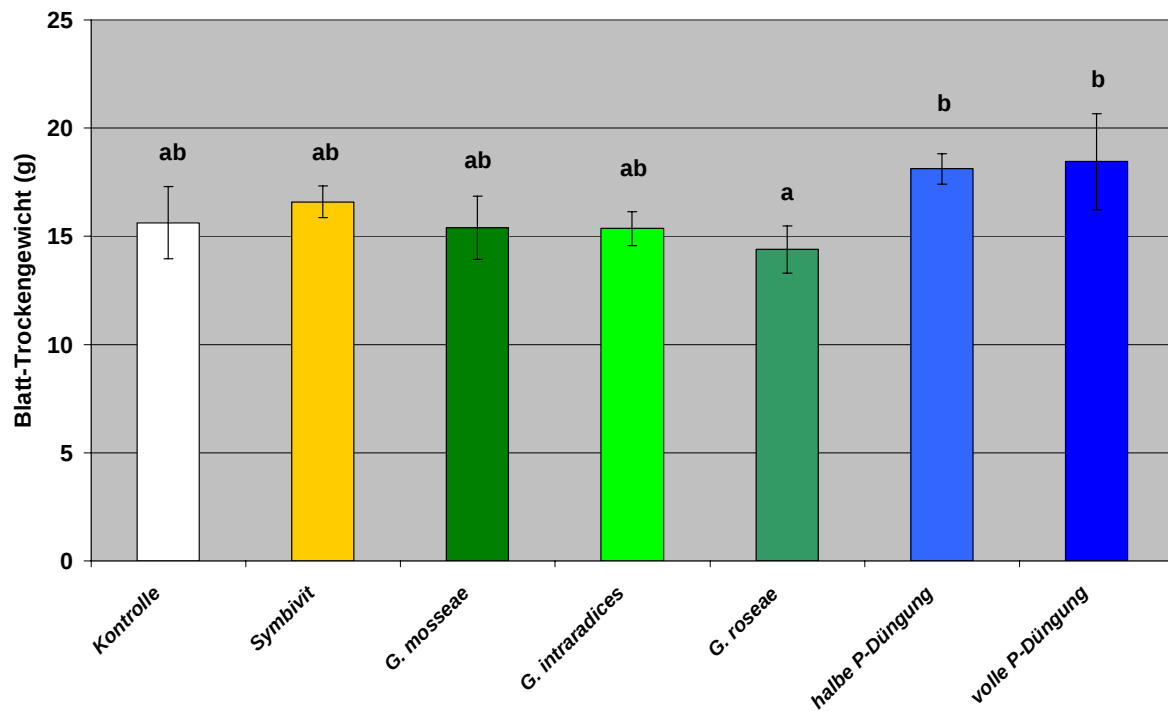


Abb. 17: Mittelwert des Blatttrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Das mittlere Blatt-Trockengewicht der Variante *G. rosea* war signifikant niedriger als die Varianten der halben sowie der vollen P-Düngung. Weiters zeigte Variante *G. rosea* mit 14,5 g das geringste Blatt-Trockengewicht.

4.1.3 Wurzeltrockengewicht

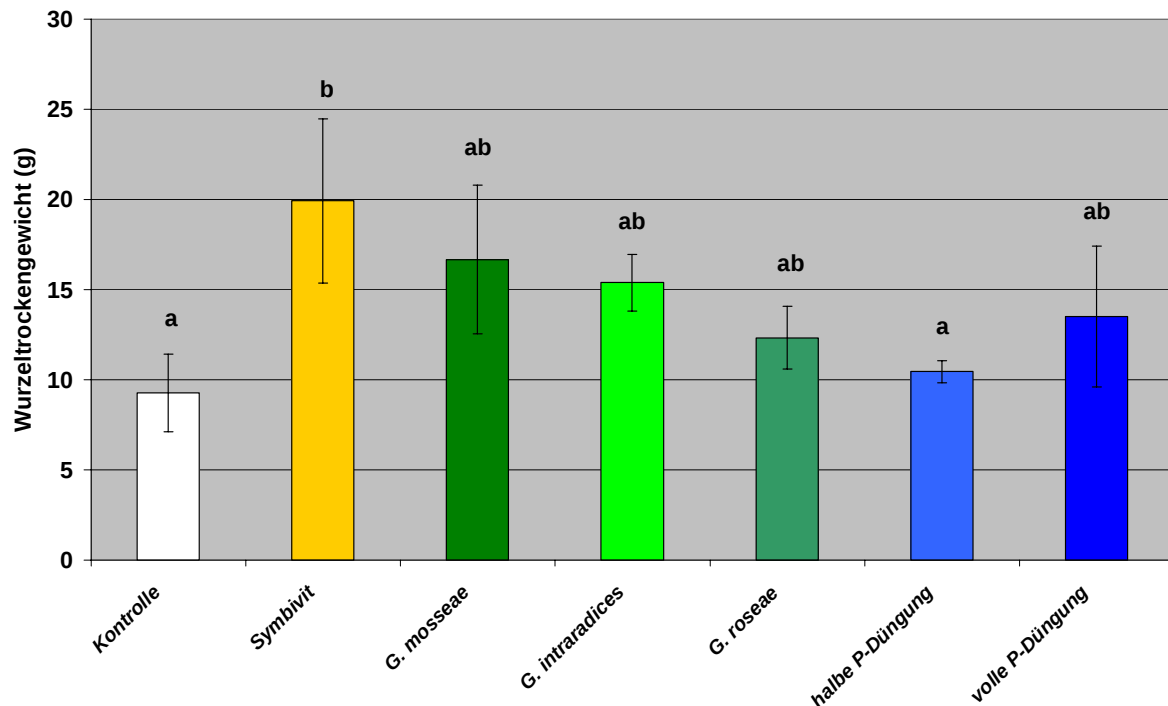


Abb. 18: Mittelwert des Wurzeltrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante Symbivit zeigte mit einem Wert von 19,9 g den höchsten Gehalt an Wurzeltrockenmasse. Dieser Wert war signifikant höher im Vergleich zur Kontrollvariante sowie zur Variante mit der halben P-Düngung.

Bei den Varianten *G. mosseae*, *G. intraradices* und *G. rosea* zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied zur Kontrollvariante, noch zu den beiden Phosphorvarianten. Die Werte lagen zwischen 12,3 g bei *G. rosea*, 15,4 g bei *G. intraradices* und 16,7 g bei *G. mosseae*.

4.1.4 Gesamttrockengewicht

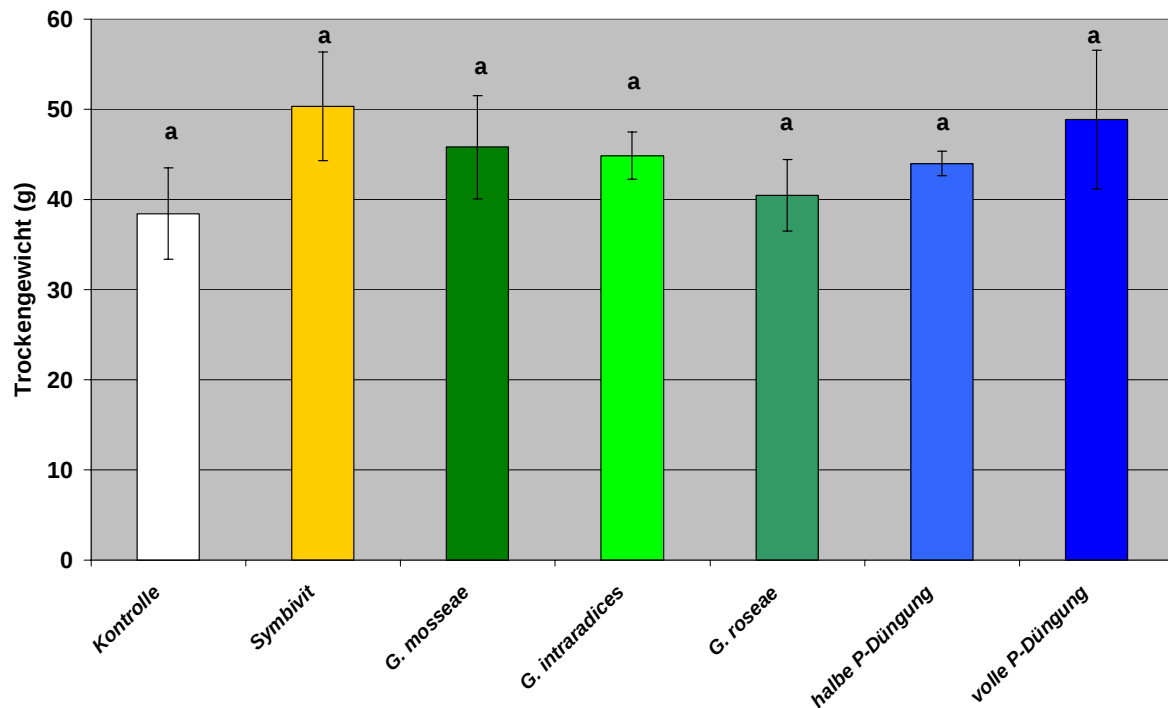


Abb. 19: Gesamttrockengewicht (Wurzel und Spross) in g der unterschiedlichen Behandlungen, Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zwischen den Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

4.1.5 Gesamtphosphorgehalt

Gesamtphosphorgehalt in den Blättern

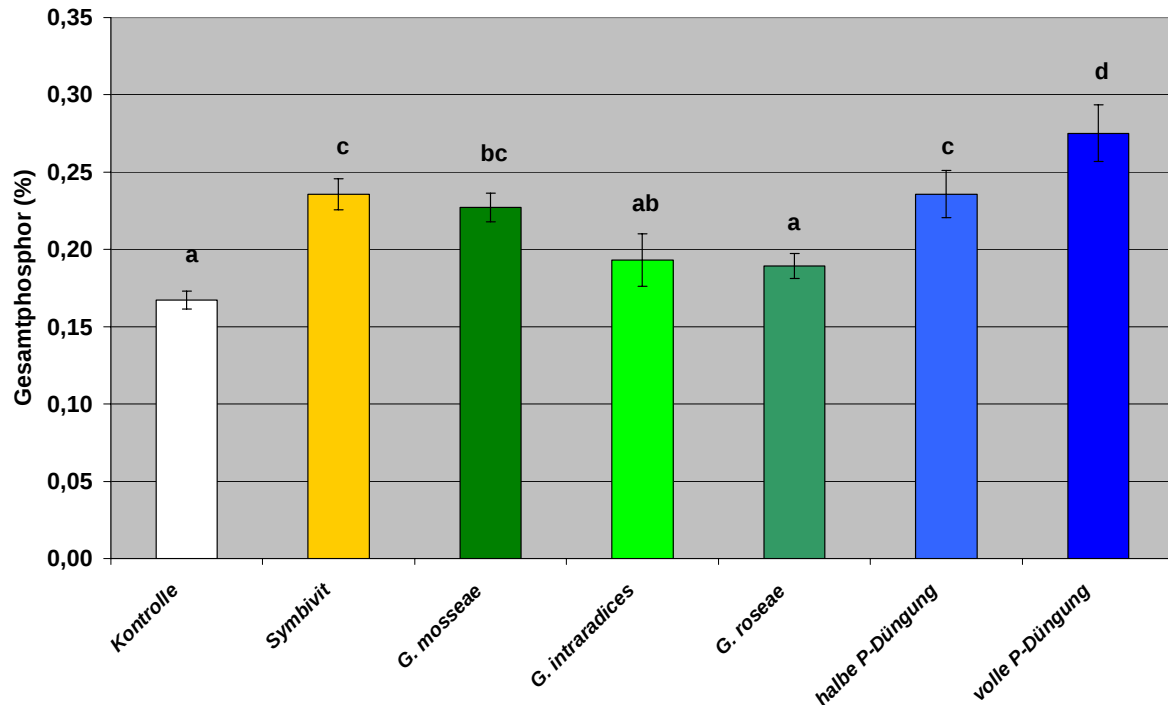


Abb. 20: Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante der vollen P-Düngung zeigte den höchsten Gehalt an Gesamtphosphor mit einem Wert von 0,3 %. Dieser Wert war signifikant höher zur Kontrollvariante (0,2 %), welcher gleichzeitig den geringsten Gehalt an Gesamtphosphor zeigte.

Die Variante der vollen P-Düngung war ebenfalls signifikant höher zur Variante Symbivit, die einen Gehalt von 0,2 % aufwies. Zu den drei Varianten mit Einzelpilzen, *G. mosseae*, *G. intraradices* sowie *G. rosea* war die Variante der vollen P-Düngung ebenfalls signifikant höher.

Variante *G. mosseae* zeigte einen Gehalt von 0,2 %, Variante *G. intraradices* einen Gehalt von 0,2 % und Variante *G. rosea* einen Gehalt von 0,2 %.

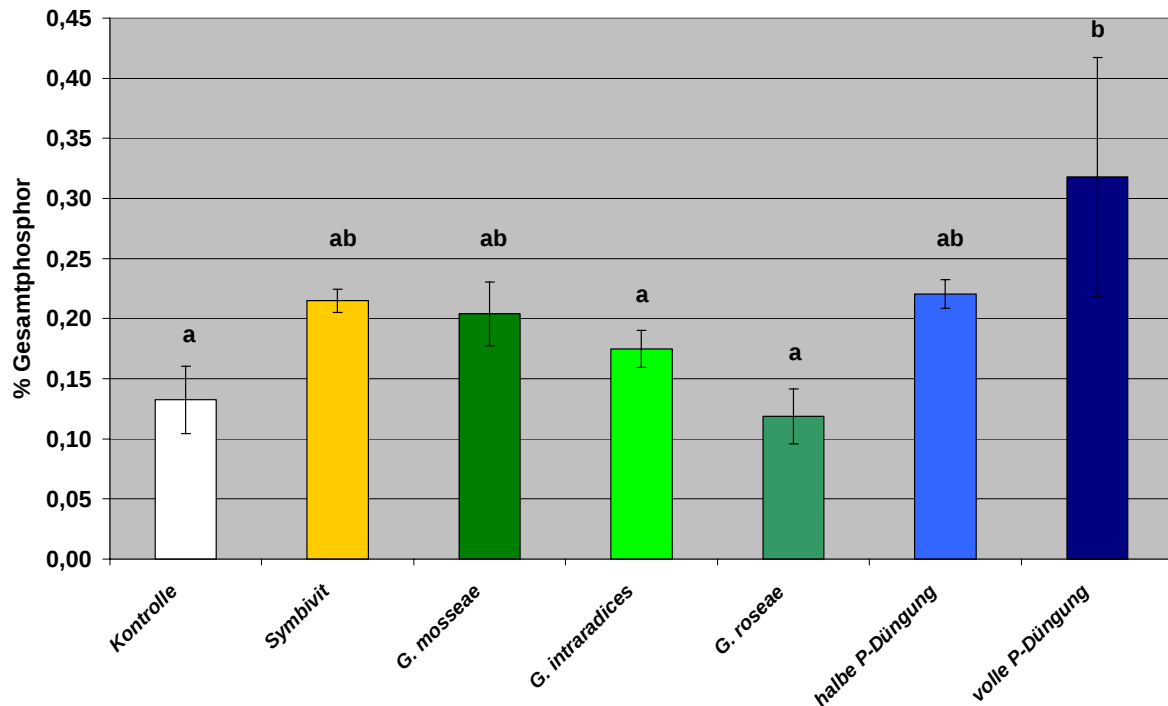
Gesamtphosphorgehalt in den Wurzeln

Abb. 21: Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante der vollen P-Düngung zeigte auch hier den höchsten Gehalt an Gesamtphosphor mit einem Wert von 0,3 %. Dieser Wert war signifikant höher zur Kontrollvariante, die einen Gehalt von 0,1 % aufwies.

Zur Variante *G. intraradices* mit einem Wert von 0,1 %, sowie zur Variante *G. rosea* war die volle P-Düngung ebenfalls signifikant höher. Variante *G. rosea* zeigte mit einem Gehalt von 0,1 % zugleich den niedrigsten Wert.

4.2 Mykorrhizierung

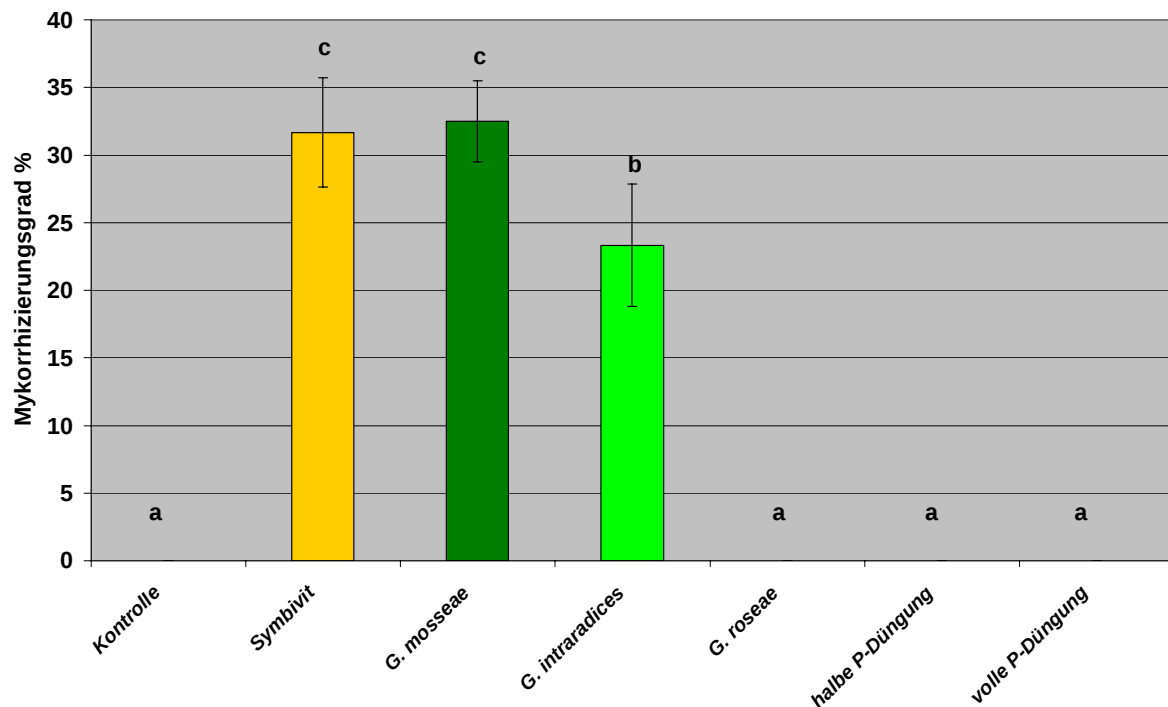


Abb. 22: Mykorrhizierungsgrad von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Kontrollvariante, die Variante *G. rosea* sowie die halbe und die volle P-Düngung Phosphor zeigten keine Mykorrhizierung. Die Variante *G. mosseae* zeigte den höchsten Mykorrhizierungsgrad mit 32,5 %, wohingegen die Variante *G. intraradices* einen signifikant niedrigeren Unterschied zeigte. Der Wert bei dieser Variante lag bei 23,3 %.

4.3 Ätherischer Ölgehalt

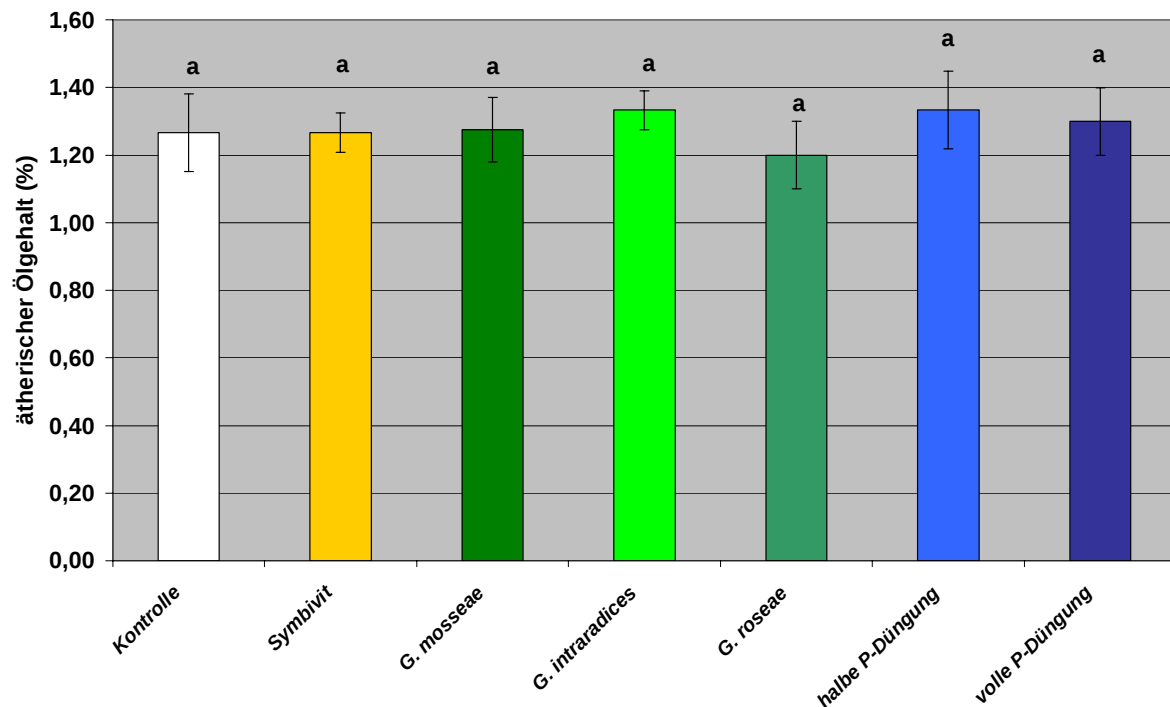


Abb. 23: Gehalt an ätherischem Öl von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für jede Variante wurde der mittlere Gesamtgehalt an ätherischem Öl berechnet. Der mittlere Gesamtgehalt lag zwischen 1,2 % und 1,3 %. Zwischen den Behandlungen ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen, es konnte also keine Erhöhung des ätherischen Öles durch die Mykorrhizierung festgestellt werden.

4.3.1 Zusammensetzung des ätherischen Öles

Insgesamt konnten 30 Komponenten mittels Gaschromatographie identifiziert werden, zehn Substanzen davon gingen mengenmäßig als Hauptkomponenten hervor.

Identifizierte Komponenten nach Auftreten bzw. Retentionszeit

Tricyclene	Alpha-Humulene
alpha-Thujene	Caryophyllene oxid
alpha-Pinene	Viridiflorol
Camphene	Humulene epoxide II
Sabinene	Manool
Beta-Pinene	
Myrcene	
Alpha-Phellandrene	
Alpha-Terpinene	
Para-Cymene	
Limonene und 1,8-Cineole	
Gamma-Terpinene	
Sabinene hydrat trans	
Terpinolene	
Linalool	
Alpha-Thujone	
Beta-Thujone	
Isothujol (iso-3-)	
Thujanol	
Camphor	
Pinocamphone (trans)	
Borneol	
Terpinen4ol	
Bornyl acetate	
Beta-Caryophyllene	

Tab. 6: Mittelwert der Flächenanteile der Hauptkomponenten im ätherischem Öl; nach Auftreten bzw. nach Retentionszeit; unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$)

	Kontrolle	Symbivit	G. mosseae	G. intraradices	G. roseae	halbe P-Düngung	volle P-Düngung
Camphene	3,24 a	3,38 a	3,30 a	3,34 a	3,15 a	3,42 a	3,28 a
Limonene und 1,8-Cineole	8,71 a	8,89 a	8,71 a	8,87 a	8,61 a	9,46 a	9,17 a
Alpha-Thujone	27,25 a	26,12 a	25,43 a	25,67 a	25,06 a	27,07 a	25,97 a
Beta-Thujone	9,46 a	9,27 a	9,41 a	9,49 a	9,43 a	9,38 a	9,28 a
Camphor	19,04 ab	17,70 a	18,31 a	18,48 a	19,42 a	19,48 a	18,42 a
Borneol	1,98 ab	2,16 ab	2,12 ab	2,12 ab	2,17 ab	1,88 a	2,39 b
Bornyl acetate	2,39 ab	2,27 ab	2,47 ab	2,57 ab	2,98 b	2,08 a	2,50 ab
Alpha-Humulene	2,50 a	2,57 a	2,57 a	2,63 a	2,59 a	2,36 a	2,35 a
Viridiflorol	4,52 a	5,14 a	5,21 a	4,98 a	4,96 a	4,44 a	4,99 a
Manool	8,63 a	9,51 a	9,88 a	9,12 a	9,54 a	8,16 a	9,27 a

Bei der Messung der Hauptkomponenten konnten bei zwei Komponenten signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Borneol

Die Variante der vollen P-Düngung hatte mit einem Wert von 2,4% Fläche einen signifikant höheren Wert als die Variante mit der halben P-Düngung. Der Wert dieser Variante lag bei 1,88 % Fläche.

Bornyl Acetate

Die Variante *G. rosea* zeigte mit einem Wert 3 % Fläche einen signifikant höheren Wert als die Variante der halben P-Düngung. Diese Variante zeigte einen Wert von 2,1 % Flächenanteil.

Bestimmung der Gesamtphenole

Gesamtphenole in den Blättern

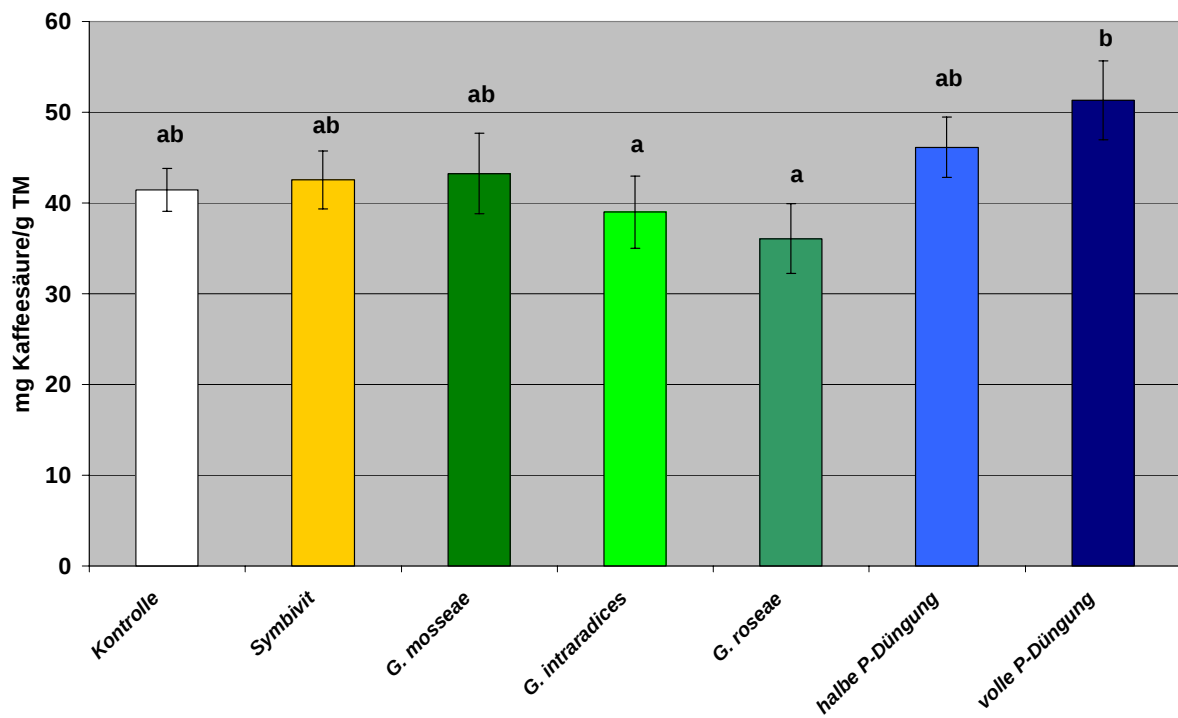


Abb. 24: Gesamtphenolbestimmung der Blätter von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante *G. rosea* zeigte einen Gehalt von 36 mg/g TM an Gesamtphenolen und war signifikant niedriger zur Variante der vollen P-Düngung mit einem Wert von 51 mg/g TM.

Ebenso war die Variante *G. intraradices* mit einem Gesamtphenolgehalt von 39 mg/g TM signifikant unterschiedlich zur Variante der vollen P-Düngung.

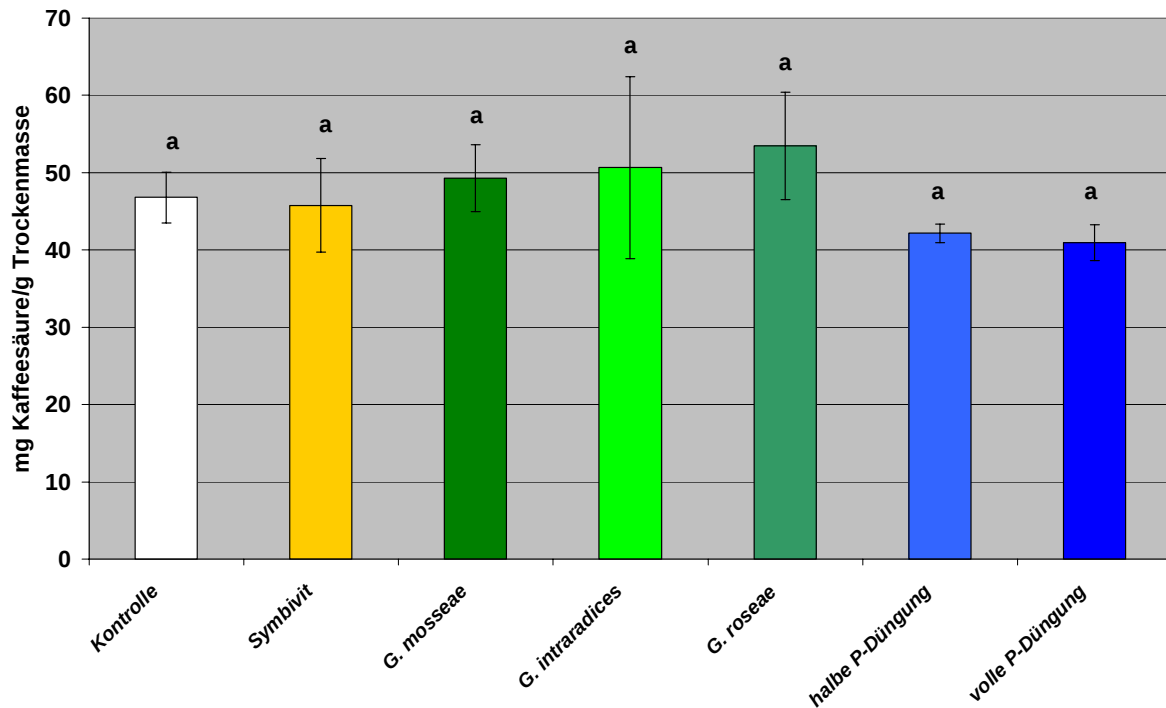
Gesamtphenole in den Wurzeln

Abb. 25: Gesamtphenolbestimmung der Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Bei der Messung der Gesamtphenole konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gemessen werden.

4.3.2 Antioxidative Aktivität

Antioxidative Aktivität in den Blättern

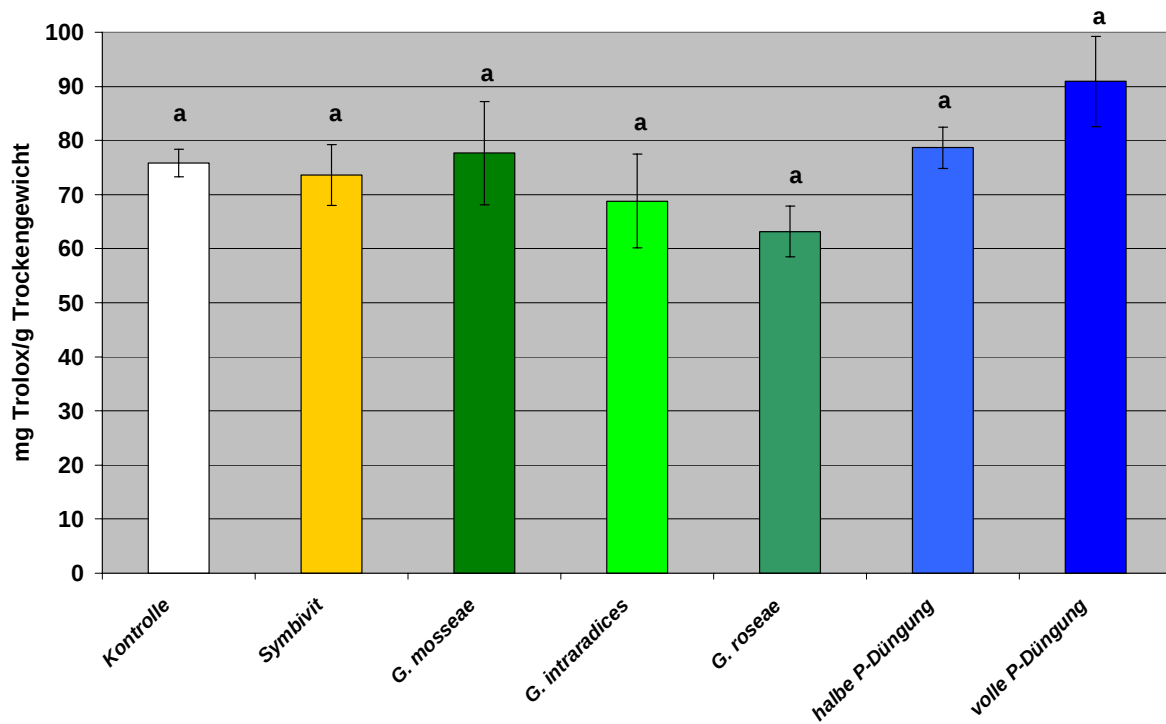


Abb. 26: Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (als mg Trolox Äquivalente ausgedrückt) in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Bei der Bestimmung der Antioxidativen Aktivität in den Blättern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungen gemessen werden.

Die Antioxidative Aktivität lag zwischen 63,2 mg Trolox/g TM und 90,9 mg Trolox/g TM.

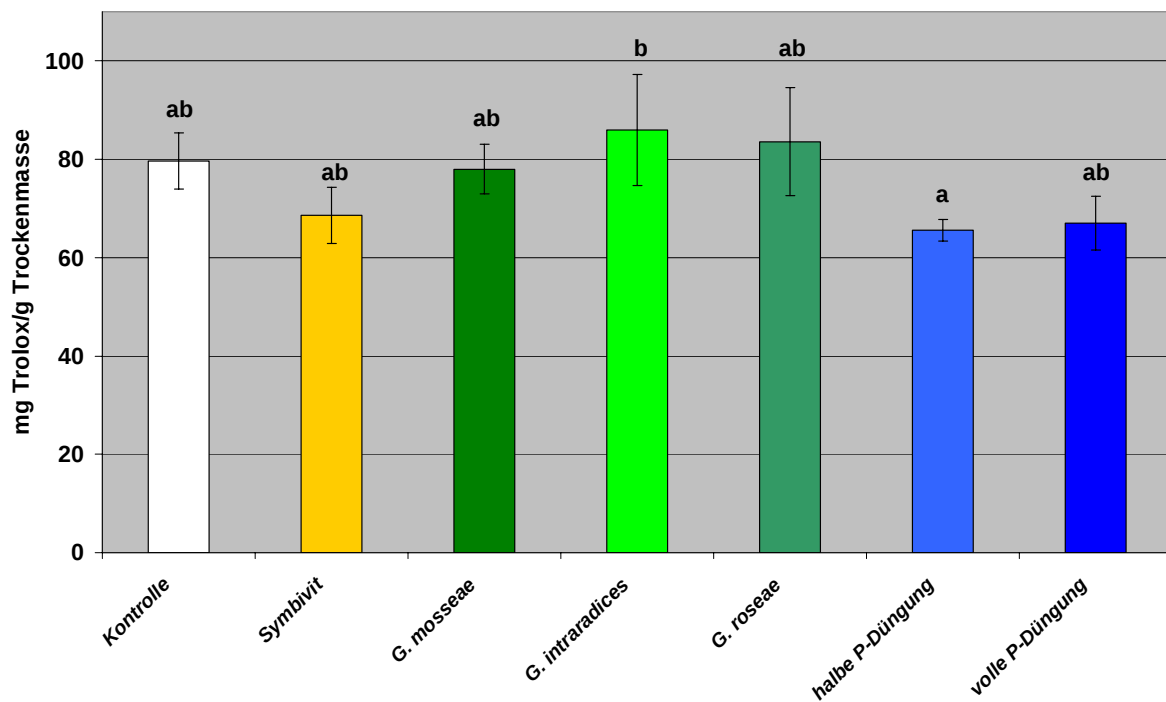
Antioxidative Aktivität in den Wurzeln

Abb. 27: Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (als mg Trolox Äquivalente ausgedrückt) in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Variante *G. intraradices* zeigte mit 85,9 mg/g Trockenmasse den höchsten Gehalt an Trolox in den Wurzeln. Dieser Wert war signifikant höher zur Variante der halben P-Düngung mit einem Gehalt von 65,5 mg/g Trockenmasse. Diese Variante zeigte gleichzeitig den geringsten Wert.

4.3.3 Gesamtflavonoide

Gesamtflavonoide Blätter

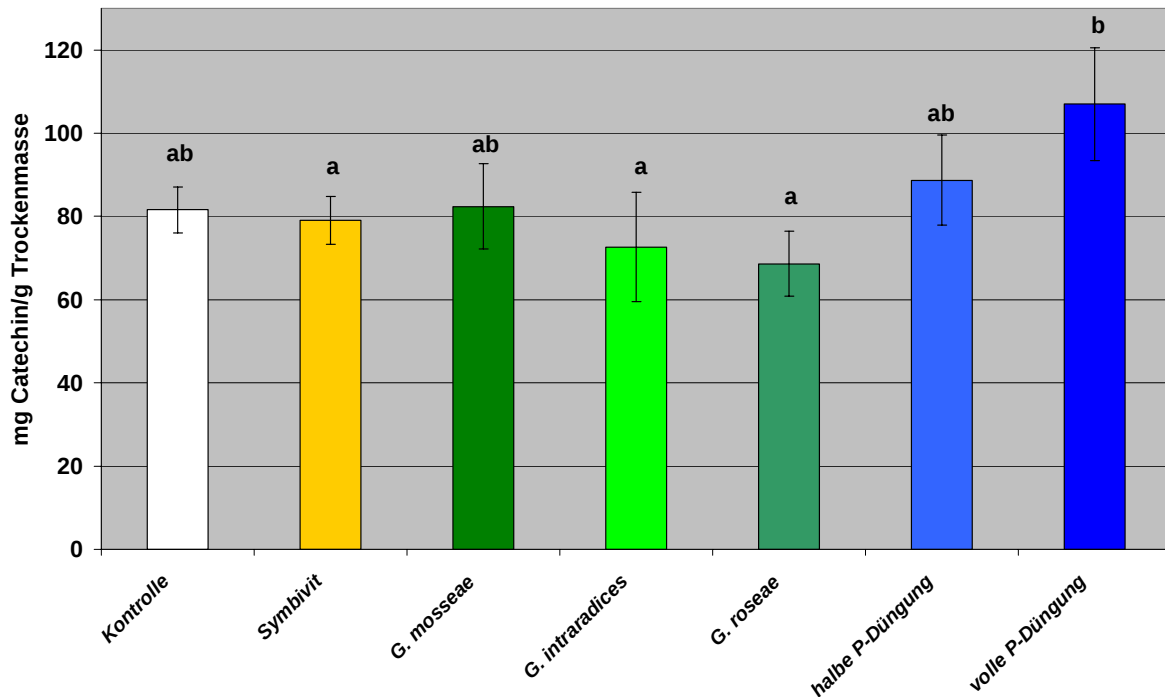


Abb. 28: Bestimmung der Gesamtflavonoide (als mg Catechin Äquivalente ausgedrückt) in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante der vollen P-Düngung zeigte den höchsten Wert an Gesamtflavonoiden (107 mg/g TM) und war signifikant höher als die Werte der Behandlung mit *G. intraradices* mit einem Wert von 72,6 mg/g TM. Ebenfalls war die Behandlung der vollen P-Düngung signifikant höher zur Variante der Behandlung mit *G. roseae*, der Wert betrug hier 68,6 mg/g TM, welcher zugleich den niedrigsten Wert darstellte. Variante Symbivit war mit einem Wert von 79,1 mg/g TM signifikant niedriger als die Variante der vollen P-Düngung.

Die Varianten *G. mosseae*, die Kontrollvariante sowie die Variante der halben P-Düngung haben ähnlich hohe Gesamtflavonoidgehalte.

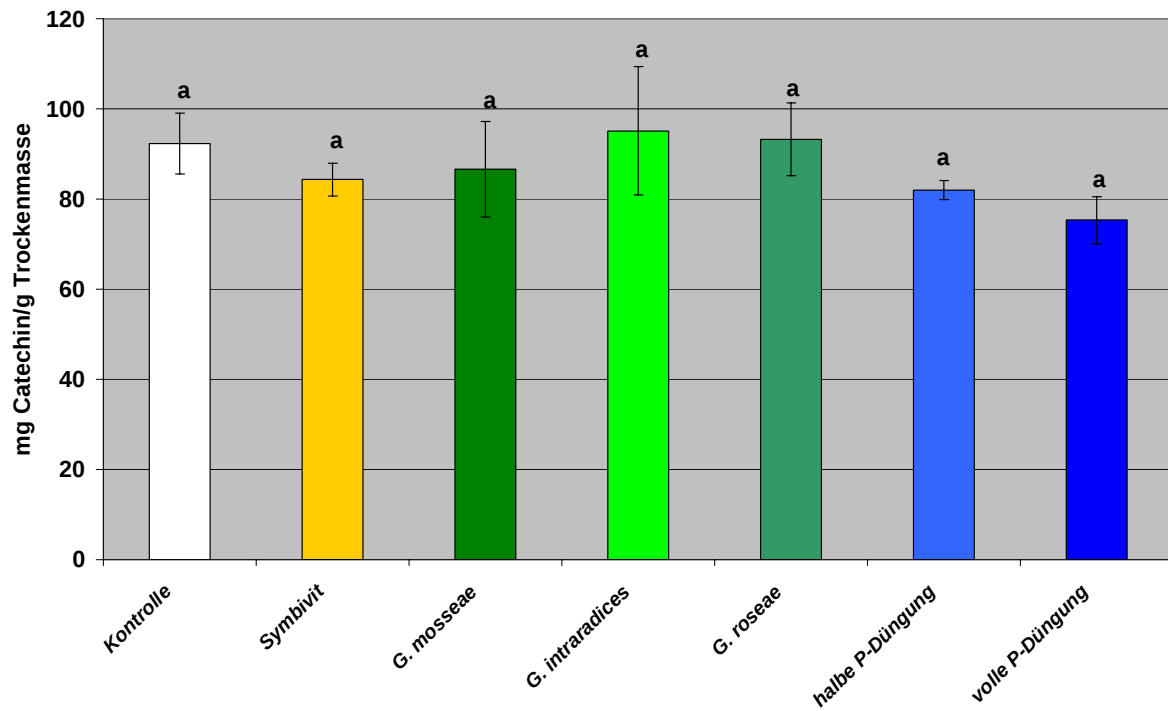
Gesamtflavonoide Wurzeln

Abb. 29: Bestimmung der Gesamtflavonoide (als mg Catechin Äquivalente ausgedrückt) in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

4.3.4 Rosmarinsäuregehalt

Rosmarinsäuregehalt Blätter

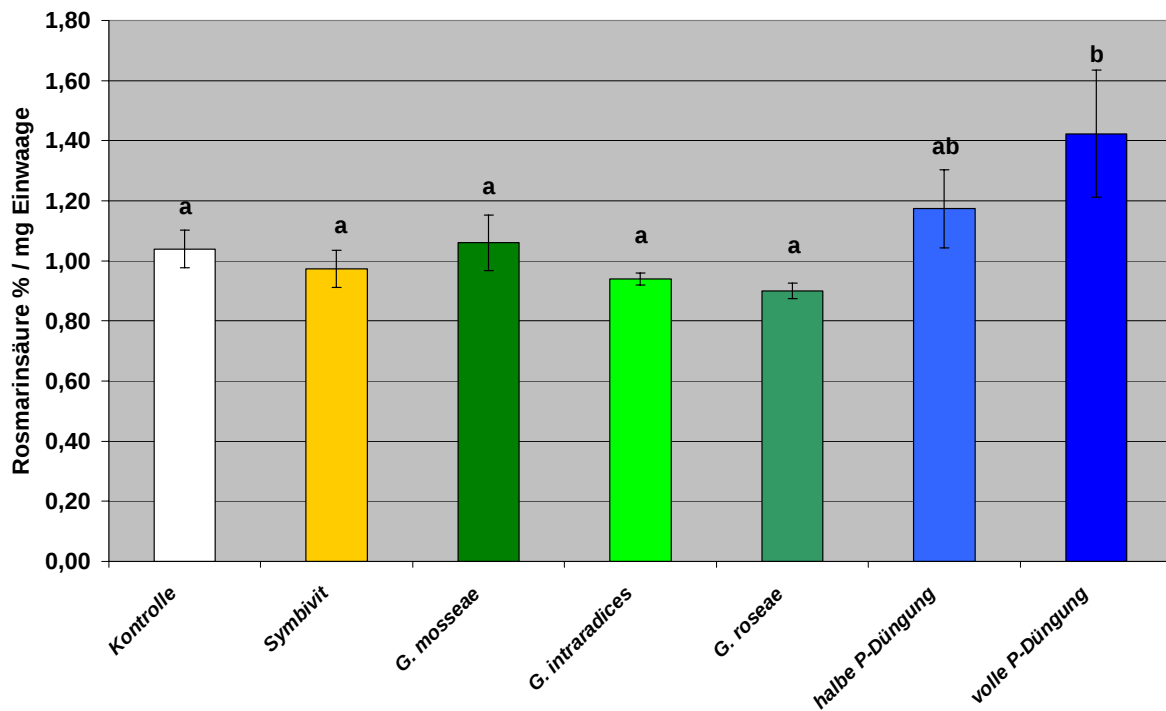


Abb. 30: Bestimmung der Rosmarinsäure in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Variante der vollen P-Düngung zeigte den höchsten Gehalt an Rosmarinsäure mit einem Wert von 1,4 % Extrakteinwaage. Dieser Wert war signifikant höher als bei allen anderen Varianten.

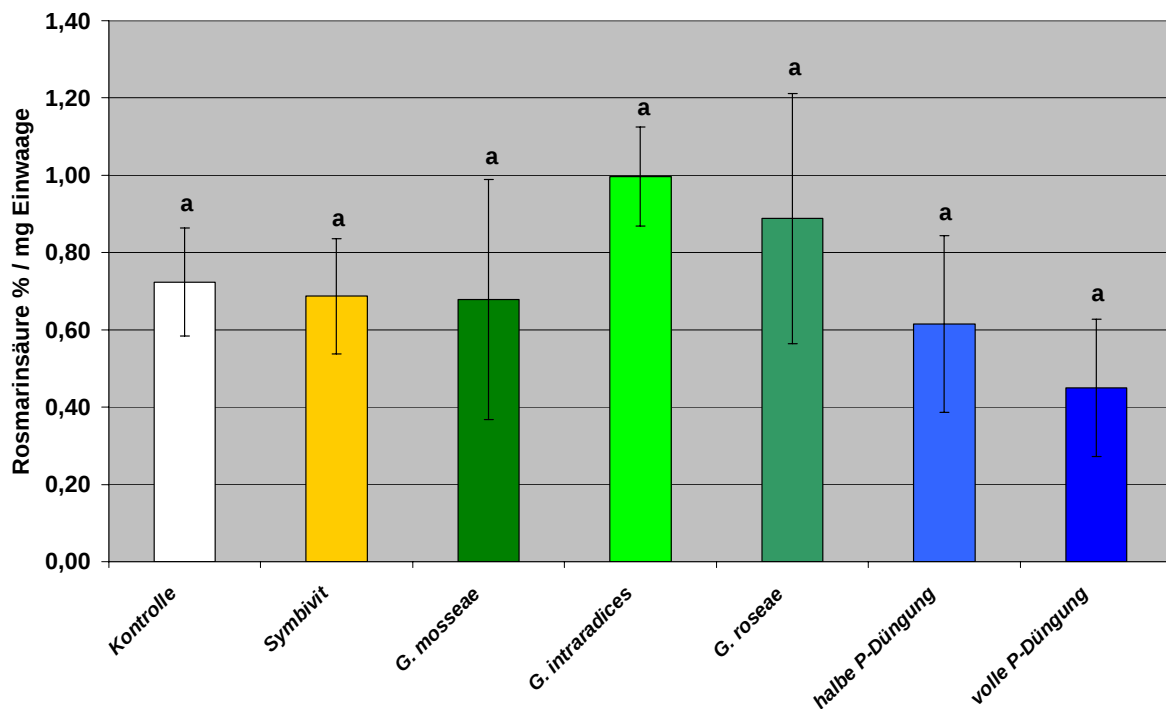
Rosmarinsäuregehalt Wurzeln

Abb. 31: Bestimmung der Rosmarinsäure in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zwischen den Varianten konnten bei der Messung von Rosmarinsäure in den Wurzelextrakten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

4.3.5 Kaffeesäuregehalt

Kaffeesäuregehalt Blätter

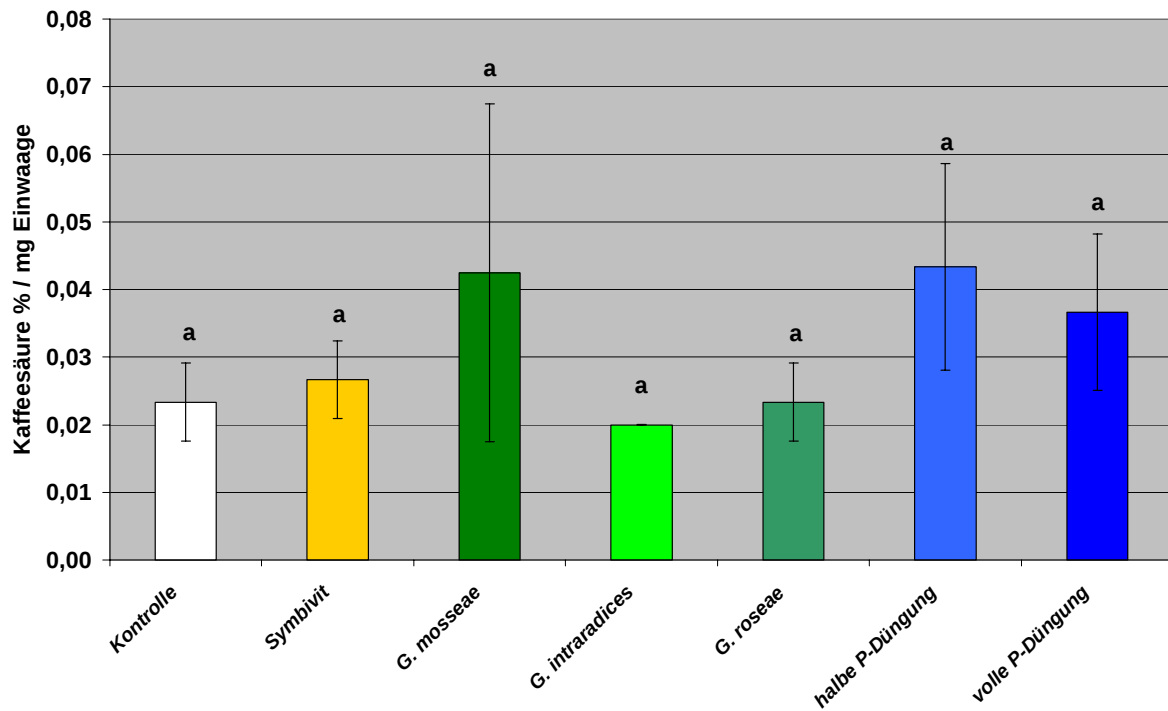


Abb. 32: Bestimmung der Kaffeesäure in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Bei der Messung der Kaffeesäure konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

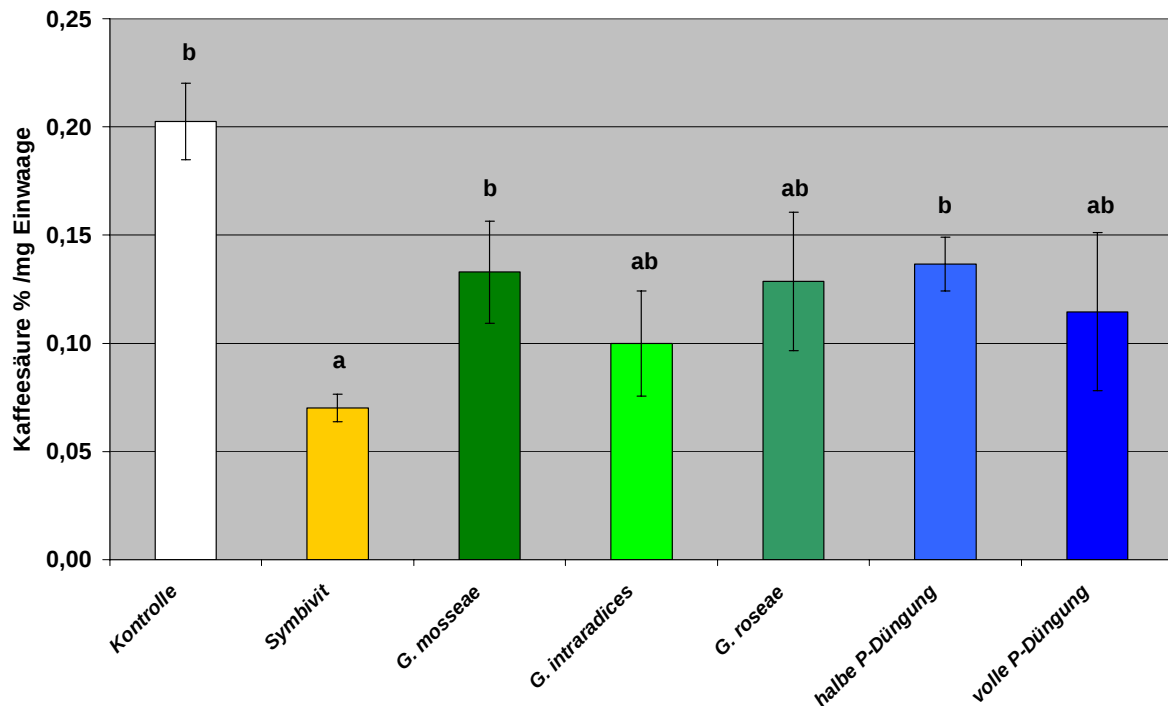
Kaffeesäure Wurzeln

Abb. 33: Bestimmung der Kaffeesäure in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Kontrollvariante zeigte bei der Messung der Kaffeesäure in den Wurzeln den höchsten Gehalt mit 0,2 %. Dieser Wert war signifikant höher zur Variante Symbivit. Der Wert dieser Variante lag bei 0,07 % und zeigte gleichzeitig den geringsten Gehalt an Kaffeesäure. Die Variante der halben P-Düngung war mit einem Wert von 0,14 % ebenso signifikant höher als die Variante mit Symbivit.

Variante *G. mosseae* war mit einem Wert von 0,1 % signifikant höher als die Variante Symbivit.

5. DISKUSSION

Die Variante des AM-Pilzes *Gigaspora rosea* zeigt keine Mykorrhizierung. Diese Variante wird daher wie eine Kontrollvariante gesehen.

Die Pilzmischung Symbivit sowie die Einzelpilze *Glomus mosseae* und *Glomus intraradices* zeigten nach Inokulation einen Mykorrhizierungsgrad zwischen 23% und 31%, wobei die Pilzmischung und der AM-Pilz *Glomus mosseae* einen annähernd gleichen Wert zeigen. In einer Studie von KHAOSAAD et. al (2007) konnte im Gegensatz zu unserer Studie, bei inokuliertem Rotklee ein Mykorrhizierungsgrad von nahezu 80% gemessen werden. Bei Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades kam es in den Varianten der Kontrolle, der halben und vollen Phosphordüngung wie erwartet zu keiner Mykorrhizierung der Wurzeln.

Durch die Mykorrhizierung kommt es zu keiner Erhöhung des Gehaltes an ätherischem Öl. Der Gesamtgehalt an ätherischem Öl war im Vergleich zu KHAOSAAD et al. (2006) sehr niedrig. In dieser Studie wurden an mit *Glomus mosseae* inokuliertem Oregano *Origanum* sp., Gehalte von über 1,5 % an ätherischen Öl gemessen. In der vorliegenden Studie liegt der höchste Gehalt an ätherischem Öl bei 1,3%. Weiters konnten zwischen den Varianten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies widerspricht einer Studie von KHAOSAAD et al. (2006), in der der Gehalt an ätherischem Öl in drei Oregano (*Origanum* sp.) Genotypen untersucht wurde, die mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* inokuliert wurden. In dieser Studie wurden sowohl mykorrhizierte als auch nicht mykorrhizierte Varianten untersucht, wobei in zwei der drei untersuchten Oreganoarten eine Erhöhung des ätherischen Ölgehaltes festgestellt werden konnte. Meine Daten stimmen mit der Arbeit von KRAML (2007) überein, bei deren Studie über die Auswirkung der Mykorrhizierung auf die Produktion sekundärer Pflanzenstoffe bei *Ocimum basilikum* untersucht wurde. Auch hier konnte keine signifikante Erhöhung der Menge an ätherischem Öl durch Mykorrhizierung mit *Glomus mosseae* gemessen werden.

Eine weitere Studie von FREITAS (2004) besagt jedoch, das durch Inokulierung mit *Acaulospora scrobiculata*, einem weiteren AM-Pilz, eine signifikante Erhöhung an ätherischen Öl bei Ackermintze erreicht werden konnte.

In den Phosphorbehandelten Varianten der vorliegenden Untersuchungen konnte ebenfalls keine signifikante Erhöhung des Gehaltes an ätherischem Öl gemessen werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Studie von FREITAS MSM, (2004). Hier nahm der Gehalt an ätherischem Öl in Ackermanze (*Mentha arvensis*) durch eine erhöhte Phosphordüngung ebenfalls nicht zu.

Durch Mykorrhizierung mit drei Einzelpilzen sowie der Pilzmischung Symbivit gab es im Muster von zehn ausgewerteten Hauptkomponenten eine Veränderung in der Komponente Borneol. Die Mykorrhizierung nimmt folglich Einfluss auf die Zusammensetzung des ätherischen Öles von Salbei. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie von Copetta et al. (2006) mit *Ocimum basilicum* L., überein, wo ebenfalls eine Veränderung im Muster des ätherischen Öles gemessen werden konnte.

Das Sprosstrockengewicht von Salbeipflanzen konnte durch die Inokulation mit verschiedenen Einzel-AM Pilze nicht erhöht werden. Einzig die Variante mit der vollen Phosphordüngung bewirkte ein signifikant höheres Spross-Trockengewicht im Vergleich mit der Variante des AM-Pilzes *Gigaspora rosea*, die wie eine Kontrollvariante behandelt wird, da keine Mykorrhizierung stattfand. Dies widerspricht der Studie von Toussaint et. al, (2008), wo die Inokulation mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* das Spross-Trockengewicht signifikant erhöhte. Diese unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf das Wachstum weisen darauf hin, dass die Wachstumsfördernde Wirkung der AM-Pilze pflanzenabhängig ist.

Allein durch Inokulation der Salbeipflanze mit der Pilzmischung Symbivit konnte eine signifikante Steigerung des Wurzeltrockengewichtes erreicht werden. Eine Myorrhizierung mit dieser Mischung, führt zu einem verstärkten Wachstum der Wurzeln in Salbei. Bei der Bestimmung der Gesamtbiomasse des Salbeis fanden sich keine signifikanten Unterschiede, somit kann eine Erhöhung der Biomasse durch Mykorrhizierung ausgeschlossen werden. Ebenfalls bewirkt weder die halbe noch die volle Phosphorkonzentration in der Nährlösung ein signifikant erhöhtes Pflanzwachstum. Diese Studie deckt sich mit vorangegangenen Studien mit *Ocimum basilicum* wobei zwei verschiedene Arten von nicht mykorrhiziertem Oregano ein ähnliches Spross-Trockengewicht zeigten mit oder ohne P-Gabe (Khaosaad et al., 2006).

Interessant ist jedoch, dass mit zunehmender P-Konzentration in der Nährlösung auch das Gesamttrockengewicht der nicht-mykorrhizierten Variante zunimmt. Dies ergab ebenfalls eine Studie an *Ocimum basilicum* von Toussaint et. al (2006), wo

untersucht wurde, ob sich der Gehalt an Rosmarinsäure oder Kaffeesäure durch drei verschiedene Phosphor-Düngestufen verändert.

Bei der Messung des Gesamtphosphorgehaltes zeigt vor allem die Pilzmischung Symbivit und der Einzelpilz *Glomus mosseae* der Kontrolle gegenüber signifikant höhere Werte. Die Inokulation von Salbeipflanzen mit der Mischung aus unterschiedlichen Einzelpilzen bedeutet somit eine höhere Aufnahme an pflanzenverfügbarem P. Der Einzelpilz *Glomus mosseae* führt ebenfalls bei Inokulation zu einer signifikant erhöhten Phosphoraufnahme aus dem Substrat.

Sowohl eine Düngung mit der halben sowie der vollen P-Düngung zeigen in den Blättern signifikant höhere Werte an Gesamtphosphor gegenüber der Kontrollvariante. Bei der Messung des Gesamtphosphors in den Wurzeln zeigt nur die Variante der vollen P-Düngung signifikant höhere Unterschiede zur Kontrollvariante ohne P-Düngung. Hier zeigen weder die Pilzmischung noch die 3 Einzelpilze signifikante Unterschiede in Bezug auf den Phosphorgehalt in den Wurzeln. Die volle P-Konzentration in der Nährlösung erhöht signifikant das Wurzelwachstum der Salbeipflanze. Eine Mykorrhizierung mit der Pilzmischung Symbivit bzw. mit den Einzelpilzen führte jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung des P-gehaltes in den Wurzeln. Hohe Werte an P in den Wurzeln können auch daran liegen, dass P zwar in den Wurzeln ist, dieses jedoch eigentlich in den Hyphen der AM-Pilze eingeschlossen ist. Bei der Bestimmung der Gesamtphenole in den Blättern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten und der Kontrolle gemessen werden. Diese Untersuchung bestätigt die Messungen von Kraml (2007), wo eine Inokulation mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* in Basilikum ebenfalls keine signifikante Erhöhung des Gesamtphenolgehaltes durch eine Inokulation mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* erbracht werden konnte.

Weiters konnten bei den Messungen des Gehaltes an phenolischen Verbindungen in der vorliegenden Studie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten zur Kontrolle in den Wurzeln von Salbei gemessen werden.

Durch Mykorrhizierung mit unterschiedlichen AM-Pilzen konnte weiters in der vorliegenden Studie keine Erhöhung der Gesamtflavonoide in den Blättern gemessen werden. Laut der Arbeit von Khaosaad et. al (2007) konnte jedoch im Spross von Weißklee, welcher mit dem AM-Pilz *Glomus mosseae* inokuliert war, eine Erhöhung des Isoflavon-Gehaltes gemessen werden. Eine Erhöhung dieses zu den

Flavonoiden gehörenden Derivats, konnte ebenfalls in der Phosphorvariante festgestellt werden.

In den Wurzeln konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede bei der Messung der Gesamtflavonoide aufgrund der Mykorrhizierung mit Einzelpilzen wie auch durch die Pilzmischung gemessen werden.

In der vorliegenden Studie konnte weder durch Mykorrhizierung mit den unterschiedlichen Einzelpilzen, noch durch Inokulation mit der Pilzmischung Symbivit ein positiver Einfluss auf die antioxidative Aktivität gezeigt werden.

Der Rosmarinsäuregehalt in den Blättern konnte sich nur durch volle Phosphordüngung signifikant zur Kontrollvariante erhöhen. In den Phosphorvarianten ohne Mykorrhizierung wurde der höchste Anteil an Rosmarinsäure gemessen, was sich mit einer Studie von Toussaint et al. (2008) deckt. In dieser Studie wurde der Schutzeffekt von *Glomus mosseae* gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* in Basilikum untersucht, der jedoch nicht durch Erhöhung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe vermittelt wurde.

In den Wurzeln war der Gehalt an Rosmarinsäure zwischen den Varianten nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz zu der Studie von Toussaint et al. (2008), wo ein höherer Gehalt an Rosmarinsäure in den Wurzeln im Gegensatz zu den Blättern gemessen wurde. In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse nicht erbracht werden. Außerdem konnten ebenso weder ein erhöhter Gehalt an Rosmarinsäure durch Phosphordüngung noch durch die Inokulation mit *Glomus mosseae* festgestellt werden. Bei Messung des Kaffeesäuregehaltes in den Blättern wurde in der vorliegenden Untersuchung keine signifikante Erhöhung der Kaffeesäure durch Mykorrhizierung beziehungsweise durch zwei verschiedene Phosphordüngestufen gefunden. Diese Ergebnisse decken sich wiederum mit Kraml, 2007 wo in den Blättern von Basilikum ebenfalls keine signifikanten Erhöhungen des Kaffeesäuregehaltes durch Mykorrhizierung stattgefunden haben.

Ein erhöhter Wert an Kaffeesäure konnte auch in den Wurzeln durch Inokulation mit AM-Pilzen nicht gemessen werden. Insgesamt zeigt eine Inokulation von unterschiedlichen Einzel-AM Pilzen sowie Inokulation mit der Pilzmischung Symbivit keine signifikante Erhöhung der antioxidativen Aktivität. Die Studie von Kraml (2007) mit Basilikum bestätigt auch diese Erkenntnis meiner Daten.

Grundsätzlich kann gesagt werden, dass die Wurzeln diesbezüglich wenig erforscht sind, da aus ökonomischer Sicht der Pharmaindustrie vor allem die Blätter

interessant sind. Da jedoch in meiner Studie auch Antioxidative Aktivität in den Wurzeln gemessen werden konnte, könnte man auch in Zukunft die Forschungsarbeit auf die Wurzeln fokussieren. Gerade in der heutigen Zeit ist die Wirkung von Gewürz- und Arzneipflanzen ein wichtiger Punkt, da Heilungsmethoden in Richtung natürliche Wirkstoffe zunehmend an Bedeutung gewinnen. Das wachsende Bewusstsein der Bevölkerung über mögliche gesundheitsfördernde, prophylaktische und heilende Wirkungen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe von Salbei fordern eine möglichst biologische sowie regionale Herkunft der Pflanzen. Mit der Anwendung von Mykorrhizapilzen im Gewürz- und Arzneipflanzenanbau könnte auf kommerzielle Dünger zum Teil verzichtet werden. Dies würde auch zu einem nachhaltigerem Anbau führen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Folgende Fragestellung wurde in dieser Arbeit in Bezug auf Salbei und symbiontischen Mykorrhizapilzen erarbeitet.

- **Verändert die Wurzelkolonisierung durch symbiontische Mykorrhizapilze in Salbei (*Salvia officinalis*) die Gehalte an sekundären Pflanzenstoffen und ihre Bioaktivität ?**

Um diese Fragestellungen untersuchen zu können, wurde eine Versuchsreihe mit Salbei (*Salvia officinalis*) angelegt, wobei die Pflanzen in sieben unterschiedlichen Varianten angebaut und behandelt wurden.

Variante	Wiederholungen
Kontrolle	mind. 3
Symbivit	mind. 3
Glomus mosseae	mind. 3
Glomus intraradices	mind. 3
Gigaspora rosea	mind. 3
halbe Phosphordüngung	mind. 3
volle Phosphordüngung	mind. 3

Bei der Ernte wurden folgende Daten erhoben:

- Bestimmung von Frischgewicht von Spross und Wurzeln
- Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Anschließend wurden aus dem Trockenmaterial folgende chemische Analysen durchgeführt:

- Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels spektroskopischer Methode nach Folin-Ciocalteu
- Messung der antioxidativen Aktivität mittels DPPH-Methode
- Analyse der ätherischen Ölkomponenten durch qualitative und quantifizierende Messmethoden
- Quantifizierung von Rosmarinsäure und Kaffeesäure mittels HPLC Methode
- Bestimmung der Gesamtflavonoide
- Bestimmung des Phosphorgehaltes mittels Ammonium-Vanadat-Molybdat Methode nach Gericke und Kurmies

Folgende Ergebnisse konnten bei meiner Arbeit festgestellt werden:

Durch Inokulation mit dem AM-Pilz *Gigaspora rosea* kam es aufgrund der Fehlerhaftigkeit des Inokulums zu keiner Symbiose mit der Salbeipflanze. Alle weiteren Behandlungen mit Einzelpilzen bzw. der Pilzmischung Symbivit führten zu einer Symbiosebildung. Insgesamt gab es jedoch nur bei der Messung der Wurzeltrockenmasse eine signifikante Erhöhung durch Mykorrhizierung. Bei der Gesamttrockenmasse insgesamt konnte keine Erhöhung gemessen werden. Durch die zwei verschiedenen Phosphordüngestufen konnte ebenfalls keine Erhöhung der Gesamtbiomasse festgestellt werden.

Untersuchungen der Antioxidativen Wirkungen der Gesamtflavonoide, der Gesamtphenole, der Rosmarinsäure sowie der Kaffeesäure zeigten, dass es aufgrund von Inokulation mit unterschiedlichen AM-Pilzen beziehungsweise der Pilzmischung, insgesamt zu keinen signifikanten Erhöhungen der Antioxidativen Aktivität in der Blattmasse gekommen ist.

In den Wurzeln fand sich der einzige signifikante Unterschied zwischen der halben P-Düngung und dem Einzelpilz *Glomus intraradices* wobei die halbe P-Düngung einen signifikant niedrigeren Wert zeigte. Weiters war der Gehalt an Kaffeesäure bei den Pflanzen die mit der Pilzmischung Symbivit behandelt waren signifikant niedriger als die der Kontrollvariante sowie der Behandlung mit der halben Phosphordüngung.

Die Ermittlung des Gesamtphosphorgehaltes in den Blättern ergab eine signifikante Erhöhung durch die Pilzmischung Symbivit sowie durch den AM-Pilz *Glomus mosseae* zur Kontrollvariante. Durch die volle Phosphordüngung war der P-Gehalt in den Blättern ebenso signifikant erhöht.

In den Wurzeln ergab nur die Anwendung der vollen P-Düngung eine signifikante Erhöhung des Gesamtphosphors zur Kontrollvariante. Da durch Inokulation mit dem AM-Pilz *Gigaspora rosea* keine Symbiose entstand und in dieser Variante gleichzeitig der geringste Gehalt an Phosphor gemessen wurde, kann auf die positive Wirkung der Mykorrhiza in Bezug auf die Phosphoraufnahme geschlossen werden.

Diese Studie ergab somit keine eindeutigen Steigerungen der Gesamtbiomasse in den Salbeiblättern aufgrund einer Inokulation von AM-Pilze beziehungsweise unterschiedlichen P-Düngungsstufen.

Gerade bei den Stoffen, die eine Antioxidative Aktivität zeigen, wäre noch einiges an Forschungsarbeit möglich.

7. DARSTELLUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGEN:

Abb. 1: Arbuskeln in der Wurzelzelle, Anfangsstadium (Bar=10µm)	4
Abb. 2: Vesikeln in der Wurzel (ca. 50µm lang).....	5
Abb. 3: Hyphen (Pfeil) mit Sporen (S) von <i>Glomus mosseae</i> (Bar = 100µm)	5
Abb. 4: Schematische Darstellung des AMP vom Eindringen in die Epidermis bis zur Bildung der Vesikeln und Arbuskeln.....	6
Abb. 5: Echter Salbei (<i>Salvia officinalis</i>)	9
Abb. 7: 1 cm Wurzelproben	19
Abb. 8: Trockenschrank mit Proben	20
Abb. 9: Gridline intercept Methode	21
Abb. 10: Eichgerade Kaffeesäure	29
Abb. 11: Trolox Eichgerade Blattextrakte	32
Abb. 12: Eichgrade Phosphor Blattproben.....	36
Abb. 13:GC/MS Chromatogramm Overlay vom Kovats-Standard (schwarz) und einer Probe (grün)	39
Abb. 14: Ausschnitt des integrierten Probenchromatogramms.....	42
Abb. 15: Eichgerade Gesamtflavonoide	45
Abb. 16: Mittelwert des Sprosstrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, P< 0,05); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.....	46
Abb. 17: Mittelwert des Blattrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, P< 0,05); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.....	47
Abb. 18: Mittelwert des Wurzeltrockengewichtes von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, P< 0,05); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.....	48
Abb. 19: Gesamttrockengewicht (Wurzel und Spross) in g der unterschiedlichen Behandlungen, Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.....	49
Abb. 20: Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, P< 0,05); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.....	50

Abb. 21: Bestimmung des Gesamtposphorgehaltes in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	51
Abb. 22: Mykorrhizierungsgrad von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	52
Abb. 23: Gehalt an ätherischem Öl von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	53
Abb. 24: Gesamtphenolbestimmung der Blätter von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	57
Abb. 25: Gesamtphenolbestimmung der Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	58
Abb. 26: Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (als mg Trolox Äquivalente ausgedrückt) in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	59
Abb. 27: Bestimmung der Antioxidativen Aktivität (als mg Trolox Äquivalente ausgedrückt) in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	60
Abb. 28: Bestimmung der Gesamtflavonoide (als mg Catechin Äquivalente ausgedrückt) in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	61
Abb. 29: Bestimmung der Gesamtflavonoide (als mg Catechin Äquivalente ausgedrückt) in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	62

Abb. 30: Bestimmung der Rosmarinsäure in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	63
Abb. 31: Bestimmung der Rosmarinsäure in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	64
Abb. 32: Bestimmung der Kaffeesäure in den Blättern von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit gleichen Buchstaben bezeichnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	65
Abb. 33: Bestimmung der Kaffeesäure in den Wurzeln von Salbeipflanzen der unterschiedlichen Behandlungen; Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$); Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.	66

TABELLEN

Tab. 1: Versuchsanlage.....	17
Tab. 2: Kaffeesäure Eichreihe	28
Tab. 3: Trolox Eichreihe.....	32
Tab. 4: Zusammensetzung der Phosphorstandards.....	35
Tab. 5: Eichreihe Catechin	44
Tab. 6: Mittelwert der Flächenanteile der Hauptkomponenten im ätherischem Öl; nach Auftreten bzw. nach Retentionszeit; unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten (Tukey-Test, $P < 0,05$)	55

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter (10^{-6})
µg	Mikrogramm (10^{-6})
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
dest.	destiliert
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
g	Gramm
gr.	Griechisch
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
KOH	Kalilauge
KS	Kaffeesäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter (10^{-3})
mm	Millimeter
MS	Massenspektroskopie
nm	Nanometer
P	Phosphor
ppm	parts per million
RS	Rosmarinsäure
RT	Retentionszeit
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmaterial

9. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS R. P. (2001): Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Pblished Corporation, Carol Stream, Illinois.

BACKHAUS G.F. FELDMANN F. (1997): Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. Heft 332. Berlin: Parey Buchverlag Berlin.

BACKHAUS G.F. , FELDMANN F. (1999): Arbuskuläre Mykorrhiza in der Pflanzenproduktion: Praxisbeispiele und Perspektiven. Heft 363. Berlin: Parey Buchverlag Berlin.

COPETTA A., LINGUA G., BERTA G. (2006): Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. Mycorrhiza, 16, 485-489.

DACHLER M. und PELZMANN H. (1999): Arznei- und Gewürzpflanzen. Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg.

GERICKE S. und KURMIES B. (1952): Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdad und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde, 59, 235-247.

GIOVANETTI M. und MESSE B. (1980): An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84, 489-500.

JAVANMARDI J., KHALIGHI A., KASHI A., BAIS H.P., and VIVANCO J.M. (2002): Chemical Characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural Food Chemistry, 50, 5878-5883

KHAOSAAD T., VIERHEILIG H., NELL M., ZITTERL-EGELSEER K. and NOVAK J. (2006): Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza*, 16, 443-446.

KHAOSAAD T., KRENN L., MEDJAKOVIC S., RANNER A., LÖSSL A., NELL M., JUNGBAUER A., VIERHEILIG H. (2007): Effect of mycorrhization on the isoflavone content and the phytoestrogen activity of red clover. In press.

KRAML M. (2007): Basilikum und symbiontischer Mykorrhizapilz. Auswirkung der Mykorrhizierung auf die Produktion sekundärer Pflanzenstoffe und die Pathogenität von *Fusarium oxysporum*. Wien: Masterarbeit aus Agrarbiologie, Universität für Bodenkultur Wien.

LEONTOWICZ M., GORINSTEIN S., LEONTOWICZ H., KRZEMINSKI A.L., KATRICH E., CIZ M., MARTIN-BELLOSO O., SOLIVA-FORTUNY R., HARUENKIT R., TRAKHTENBERG S. (2003): Apple and Pear Peel and Pulp and Their Influence on Plasma Lipids and Antioxidant Potentials in Rats Fed Cholesterol-Containing Diets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 5780 – 5785.

FREITAS MSM., MARTINS MA., CURCINO VIEIRA IJ. (2004): Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 39, 887-894.

NAUMER H. und HELLER W. (2002): Untersuchungsmethoden in der Chemie: Einführung in die moderne Analytik. 3. erw. und überarb. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.

NEWMAN E. (1966): A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, 3, 139-145.

RAVEN H.P., EVERT F. R., EICHHORN E.S. (1999): Biology of Plants. New York: W.H. Freeman and Company

RICHTER G. (1996) Biochemie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S.

SILVIA D.M. (1999): Mycorrhizal symbiosis. In: Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P. G. and Zuberer D.A. (eds.). Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 408-426.

SMITH S.E und READ D.J. (1997): Mycorrhizal Symbiosis. Second Edition. Academic Press, London.

STEINER G. (2003): Ätherische Öle und phenolischen Verbindungen bei verschiedenen Oregano-Herkünften. Wien: Diplomarbeit Universität für Bodenkultur.

TOUSSAINT J.P., KRAML M., NELL M., SMITH S.E., SMITH F.A., STEINKELLNER S., SCHMIDERER C., VIERHEILIG H., NOVAK J.: The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* confers a bioprotective effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* in basil, which is not mediated by increases in phytochemicals. In press.

TOUSSAINT J.P., SMITH F.A., SMITH S.E. (2006): Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorous nutrition. Mycorrhiza, 17, 291-297.

VIERHEILIG H., COUGHLAN A., WYSS U. and PICHE Y. (1998): Ink and vingar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied Environmental Microbiology, 64, 5004-5007.

WULFF K. (1996): Einfluss von Kulturmaßnahmen auf die arbuskuläre Mykorrhiza in landwirtschaftlichen Nutzflächen. Stuttgart: Verlag Ulrich E. Grauer.

WATZL B. und RECHHEMMER G. (2001): Flavonoide. Basiswissen aktualisiert. Ernährungs-Umschau 48, Heft 12.