Abteilung Pflanzenschutz
der Universität für Bodenkultur Wien

Einfluss von Wurzelexsudatkomponenten auf die Entwicklung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Masterarbeit

verfasst und eingereicht von

Anna Moyses

Wien, Juli 2012

Danksagung!

Ich möchte mich an dieser Stelle recht herzlich bei all jenen bedanken, die durch ihre Unterstützung und ihr Entgegenkommen zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Siegrid STEINKELLNER für die Überlassung des Themas, ihre fachkundige Unterstützung sowie für ihre hervorragende und freundliche Betreuung.

Frau Dipl.-Ing. Karin HAGE-AHMED möchte ich für ihre wertvollen Ratschläge und vor allem für die unterstützende Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten danken.

Bei Frau Dipl.-Ing. Sabine DAXBÖCK-HORVATH bedanke ich mich recht herzlich für ihre Erklärungen und Unterstützung im Labor und ihre überaus nette mentale Hilfe.

Danken möchte ich auch meinen beiden Schwestern Margarete und Maria sowie all meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich allzeit unterstützen und mir diese unvergessliche Studienzeit an der Universität für Bodenkultur Wien ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 5
2. Literaturübersicht 7
2.1 Die *Fusarium*-Welke 7
2.1.1 Bedeutung und Verbreitung der *Fusarium*-Welke 7
2.1.2 Symptome 7
2.1.3 Das Pathogen: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) 8
2.1.4 Entwicklungszyklus und Ausbreitung von *Fol* 9
2.1.5 Bekämpfung 11
2.2 Wurzelexsudation in der Rhizosphäre 11
2.2.1 Die Rhizosphäre 11
2.2.2 Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen in der Rhizosphäre 12
2.2.3 Die Wurzelexsudation 12
2.2.4 Wurzelexsudate der Tomate 13
2.2.4.1 Monosaccharide: Glucose und Fructose 13
2.2.4.2 Organische Säuren: Zitronen-, Apfel- und Bernsteinsäure 14
2.2.4.3 Aminosäure: Tryptophan 16
2.2.4.4 Phenolische Verbindungen: Phenolcarbonsäuren und Phenylpropane 17
2.3 Quantitative Bestimmung pilzlichen Wachstums 19
3. Material und Methoden 20
3.1 Herstellung der Sporensuspension 20
3.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 20
3.1.2 Herstellung der Pilzkulturen 20
3.1.3 Herstellung der Mikrokonidiensuspension 21
3.2 Herstellung der Wurzelexsudat-Einzelkomponenten-Stammlösungen 21
3.2.1 Polare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten 21
3.2.2 Unpolare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten 23
3.3 Testung der Sporenkeimung 24
3.4 Bestimmung der Myzelentwicklung 26
4. Ergebnisse 27
4.1 Testung der Sporenkeimung 27

4.1.1 Wirkung der unterschiedlichen Nährlösungen auf die Keimung von Mikrokonidien 27
4.1.2 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 30 mM auf die Keimung von Mikrokonidien 28
4.1.3 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 3 mM auf die Keimung von Mikrokonidien 30
4.1.4 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Keimung von Mikrokonidien 31
4.1.5 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Keimung von Mikrokonidien 32
4.1.6 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Keimung von Mikrokonidien 34
4.1.7 Wirkung unterschiedlich konzentrierter Wurzelexsudatkomponenten auf die Keimung von Mikrokonidien 35
4.2 Bestimmung der Myzelentwicklung 36
4.2.1 Wirkung der Nährlösungen auf die Myzelentwicklung 37
4.2.2 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 30 mM auf die Myzelentwicklung 39
4.2.3 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 3 mM auf die Myzelentwicklung 41
4.2.4 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Myzelentwicklung 43
4.2.5 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Myzelentwicklung 46
4.2.6 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Myzelentwicklung 48
4.2.7 Wirkung unterschiedlich konzentrierter Wurzelexsudatkomponenten auf die Myzelentwicklung 50
5. Diskussion 52
6. Zusammenfassung 62
7. Abstract 63
8. Abbildungsverzeichnis 64
9. Tabellenverzeichnis 68
10. Literaturverzeichnis 69

1. Einleitung und Problemstellung

Die weltweit verbreitete Gemüsepflanze Tomate (*Solanum lycopersicum* L., Synonym: Paradeiser, Liebesapfel) gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) und wird der Gattung Nachtschatten (*Solanum*) zugeordnet. Sie stammt aus Mittel- und Südamerika und hat sich erst in den letzten 60 Jahren als Kulturpflanze in Nordeuropa stark ausgebreitet (Wonneberger, 2004). Im Jahr 2005 war die Tomate mit rund 4,6 Mio. ha Anbaufläche und über 120 Mio. t Ertrag mit Abstand die weltweit wichtigste Gemüseart (Theurl, 2008). In Österreich wurden im Jahr 2011 laut Statistik Austria auf 185 ha insgesamt 50.400 t Tomaten erzeugt. Die Tomate ist das beliebteste Gemüse der Österreicher. Der Jahres-Pro-Kopf-Verbrauch an Tomaten lag 2008/2009 bei rund 25 kg (Statistik Austria).

In den letzten Jahren wurde die gesundheitliche Bedeutung der Tomaten verstärkt anerkannt. Neben Zucker, Fruchtsäuren, Mineralstoffen und Vitaminen enthalten sie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, welche antikarzinogene Wirkung aufweisen (Wonneberger, 2004).

Diese wertvollen Inhaltsstoffe sind nicht nur in den Früchten der Tomatenpflanze vertreten, sondern werden auch über die Wurzelexsudation in die Rhizosphäre abgegeben. Die Wurzelexsudate stellen einen wesentlichen Beitrag zur Humusbildung des Bodens dar, und sind für den sogenannten Rhizosphäreneffekt verantwortlich. Jener beschreibt das im Vergleich zu „wurzelfreiem Boden“ häufigere Vorkommen von Mikroorganismen in Wurzelnähe. Die Rhizosphärenorganismen werden durch die Wurzelexsudation gefördert, welche wiederum die Pflanzen durch ihre Tätigkeiten positiv oder negativ beeinflussen. Einerseits werden Mikroorganismen aktiviert, welche wesentlich an der Nährstoffmobilisierung und -nachlieferung der Pflanzen beteiligt sind, Wachstumsregulatoren produzieren oder in Symbiosen mit ihren Pflanzen leben und andererseits werden phytopathogene Organismen stimuliert, welche Wurzelkrankheiten hervorrufen und die Pflanze durch phytotoxische Stoffe schädigen (Gisi, 1997).

Wurzelexsudate spielen demnach eine entscheidende Rolle in Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen. Über die Wirkung spezifischer Wurzelexsudat-Moleküle auf Mikroorganismen ist bis heute noch sehr wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einzelner Wurzelexsudatkomponenten der Tomate auf *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* untersucht.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* zählt zu den wichtigsten Pathogenen der Tomate, wobei er als bodenbürtiger Pilz besonders in warmen Klimaregionen mit intensivem Tomatenanbau im Freiland große Schäden verursachen kann. Als Erreger der Tomatenwelke ruft er durch Verstopfung der Leitgefäße Vergilbungs-, Welke- und Absterbeerscheinungen hervor. Neben Mikro- und Makrokonidien werden Chlamydosporen ausgebildet, welche es dem Pilz ermöglichen jahrelang im Boden zu überdauern (Agrios, 1997).

Auf welche Art und Weise bodenbürtige Pilze ihre Wirtspflanzen erkennen und eine Aktivierung ihrer Sporen bzw. ihres Myzelwachstums erfolgt ist bislang noch sehr wenig erforscht. Somit ist auch die Bedeutung einzelner Tomatenwurzelexsudatkomponenten in der Tomate-Fusarium-Interaktion noch unklar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob bedeutende in Tomatenexsudaten enthaltene Substanzen einen Einfluss auf die Mikrokonidienkeimung und das Myzelwachstum von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* haben.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

Welche Effekte zeigen Einzelkomponenten von Wurzelexsudaten auf die Sporenkeimung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*?

Welche Effekte zeigen Einzelkomponenten von Wurzelexsudaten auf die Myzelentwicklung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*?

2. Literaturübersicht

2.1 Die *Fusarium*-Welke

2.1.1 Bedeutung und Verbreitung der *Fusarium*-Welke

Die *Fusarium*-Welke an der Tomate wird durch den Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* verursacht. Diese Erkrankung wurde erstmals im Jahre 1895 von dem englischen Mykologen George Edward Massee beschrieben. Die Fusariumwelke zählt zu den weltweit bedeutendsten Krankheiten an der Tomate und tritt besonders in warmen Klimaregionen auf. Sie kommt im Süden der USA und in südlichen Teilen Europas in Freilandkulturen vor, wobei sie in nördlichen Regionen aufgrund niedriger Temperaturen nur im Glashaus vertreten ist. Die Fusariumwelke kann unter günstigen Witterungsbedingungen erhebliche Ertragsverluste an anfälligen Tomatensorten verursachen. Dank resistenter Kultursortenzüchtungen hat die Erkrankung etwas an Bedeutung verloren (Jones, 1991, Agrios, 1997).

2.1.2 Symptome

Der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* dringt über die Wurzel ein und schädigt die Pflanze durch Verstopfung der Leitbahnen und die Bildung von Toxinen. In der Regel zeigen sich Krankheitserscheinungen erst etwa 2 Monate nach der Pflanzung an 1,5 bis 2 m hohen Tomaten. Die ersten Symptome treten an den älteren Blättern in Form von Vergilbungen, Welke- und Absterbeerscheinungen auf, welche sich oft einseitig auf einen Teil der Pflanze beschränken. Das Leitgewebe im Stängel und in den Blattstielen ist dunkelbraun verfärbt. Die Stängelbasis ist verdickt und gelegentlich bilden sich äußerlich an den Stängeln rosa Pilzsporenlager aus (Jones, 1991, Crüger et al., 2002). Es kann zur Ausbildung von Adventivwurzeln kommen und infizierte Seitenwurzeln verfaulen. Mit fortschreitendem Befall sterben die Pflanzen vollständig ab. Infizierte Jungpflanzen sind verkümmert, welken und sterben früh ab (Jones, 1991, Agrios, 1997). Die Früchte befallener Pflanzen bleiben klein und werden abgestoßen (Crüger et al., 2002).

2.1.3 Das Pathogen: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*)

Der Welkeerreger *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (*Sacc.*) W. C. Snyder & H. N. Hans. ist ein Ascomycet der Gattung *Fusarium* aus der Klasse *Hyphomycetes*. Innerhalb der Art *Fusarium oxysporum* werden wirtsspezialisierte Typen, sogenannte *formae speciales*, unterschieden. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* befällt *Solanum lycopersicum* L. (Tomate) (Hallmann et al., 2009). Er bildet drei Pathotypen (Rasse 1, 2 und 3) aus, wobei die Rasse 1 am weitesten verbreitet und beinahe in jeder geografischen Zone vertreten ist (Jones, 1991).

Der Pilz bildet auf der Oberfläche von abgestorbenem Wirtspflanzenmaterial ein weißlich bis rosa gefärbtes Myzel aus, das einen violetten Farbstich aufweisen und in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden sein kann (Jones, 1991).

Fol produziert drei asexuelle Sporenformen. Dazu zählen Mikrokonidien, Makrokonidien und Chlamydosporen. Die am häufigsten produzierten Sporen sind die ein- bis zweizelligen Mikrokonidien (Abbildung 1), welche aus einfachen Phialiden hervorgehen. Sie sind oval bis elliptisch geformt, weisen einen geraden bis gekrümmten Habitus mit einer Größe von 5-12 x 2,2-3,5 µm auf und sind unseptiert (Jones, 1991).

Die häufiger anzutreffenden Makrokonidien (Abbildung 1) sind die typischen „*Fusarium*“-Sporen und haben eine gekrümmte, an den Enden zugespitzte Form (Agrios, 1997). Sie sind septiert und entstehen an verzweigten Konidiophoren oder an der Oberfläche von Sporodochien. Die dreiseptierten Makrokonidien sind 27-46 x 3-5 µm groß, wohingegen die in 5 Segmenten unterteilten Makrokonidien eine Größe von 35-60 x 3-5 µm aufweisen (Jones, 1991).

Die Chlamydosporen sind von großer Bedeutung, da sie dem Pilz ermöglichen, ohne Wirtsgewebe jahrelang im Boden zu überdauern (Crüger et al., 2002, Booth, 1971). Die Bildung dieser Überdauerungssporen wird eingeleitet, wenn der Kohlenhydratgehalt im absterbenden Wirtsgewebe sinkt (Meyers und Cook, 1972). Sie werden in oder auf älterem Myzel oder in Makrokonidien gebildet (Beckman, 1987, Agrios, 1997). Chlamydosporen sind runde, dickwandige Sporen, welche eine glatte oder raue Oberflächenbeschaffenheit aufweisen. Sie sind ein- oder zweizellig und kommen einzeln, paarweise oder in Ketten vor (Jones, 1991, Agrios, 1997). Ihre Größe beträgt 5-15 µm (Booth, 1971).

Der Erreger stellt hohe Temperaturansprüche. Für seine optimale Entwicklung benötigt er 27 bis 28 °C. Er kommt bevorzugt auf sandigen Böden mit niedrigem pH-Wert unter 6,5 (Crüger et al., 2002) und einer für das Pflanzenwachstum optimalen Bodenfeuchtigkeit (Jones, 1991) vor. Weitere befallsfördernde Faktoren sind kurze Tageslängen und geringe Lichtintensitäten (Jones, 1991).

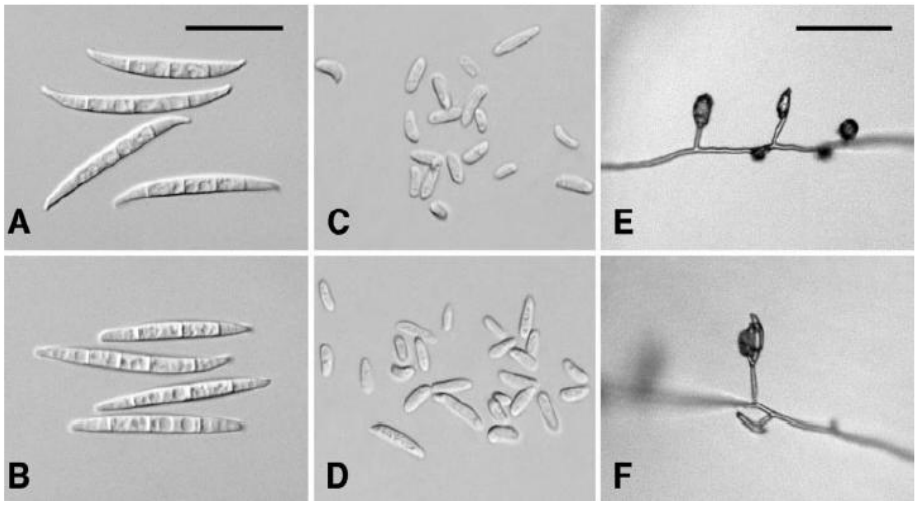

Abbildung 1: A-B: Makrokonidien; C-D: Mikrokonidien; E-F: Mikrokonidien *in situ*.; A-D: Maßstab = 25 µm; E-F: Maßstab = 50 µm (Leslie und Summerell, 2006)

2.1.4 Entwicklungszyklus und Ausbreitung von *Fol*

Der Entwicklungszyklus von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Abbildung 2) wird durch überdauerte Myzelreste in organischem Pflanzenmaterial und die im Boden befindlichen Chlamydosporen gestartet. Der Pilz dringt aktiv mittels Keimschläuche über die Wurzelspitze, Wunden oder an Stellen der Seitenwurzelbildung ein und breitet sich intrazellulär als Myzel durch den Wurzelkortex zum Xylem aus, welches der Pilz zur weiteren Ausbreitung in die oberen Teile der Pflanze nützt (Agrios, 1997). Nach einer erfolgreichen Besiedlung des Xylems, vermehren sich die Pilzhyphen in den Parenchymzellen des vaskulären Gewebes und verursachen eine Deformation der Zellen und Alterung der Zellwände (Olivain und Alabouvette, 1999). Die Verstopfung des Leitgewebes durch Myzel, Sporen, Gele, Gummi und Thyllen und die Verengung der Gefäße durch die Wucherung angrenzender Parenchymzellen sind für den Zusammenbruch der Wasserversorgung der

Pflanze verantwortlich. Die Blätter transpirieren mehr Wasser als die Wurzeln und der Stängel transportieren können. Dadurch schließen sich die Stomata und es kommt zum Welken und Vergilben der Blätter. Der Pilz breitet sich in der gesamten Pflanze aus und beginnt an der Oberfläche der abgestorbenen Pflanzenteile reichlich zu sporulieren (Agrios, 1997).

Die Ausbreitung im Bestand kann durch Wurzelkontakt erfolgen. Von Gewächshaus zu Gewächshaus und von Betrieb zu Betrieb dürfte die Verschleppung in erster Linie über verseuchte Erde erfolgen. Die Gefahr der Saatgutübertragung und der Ausbreitung infektionsfähiger Sporen durch Gewächshauskonstruktionen und Maschinen besteht (Crüger et al., 2002).

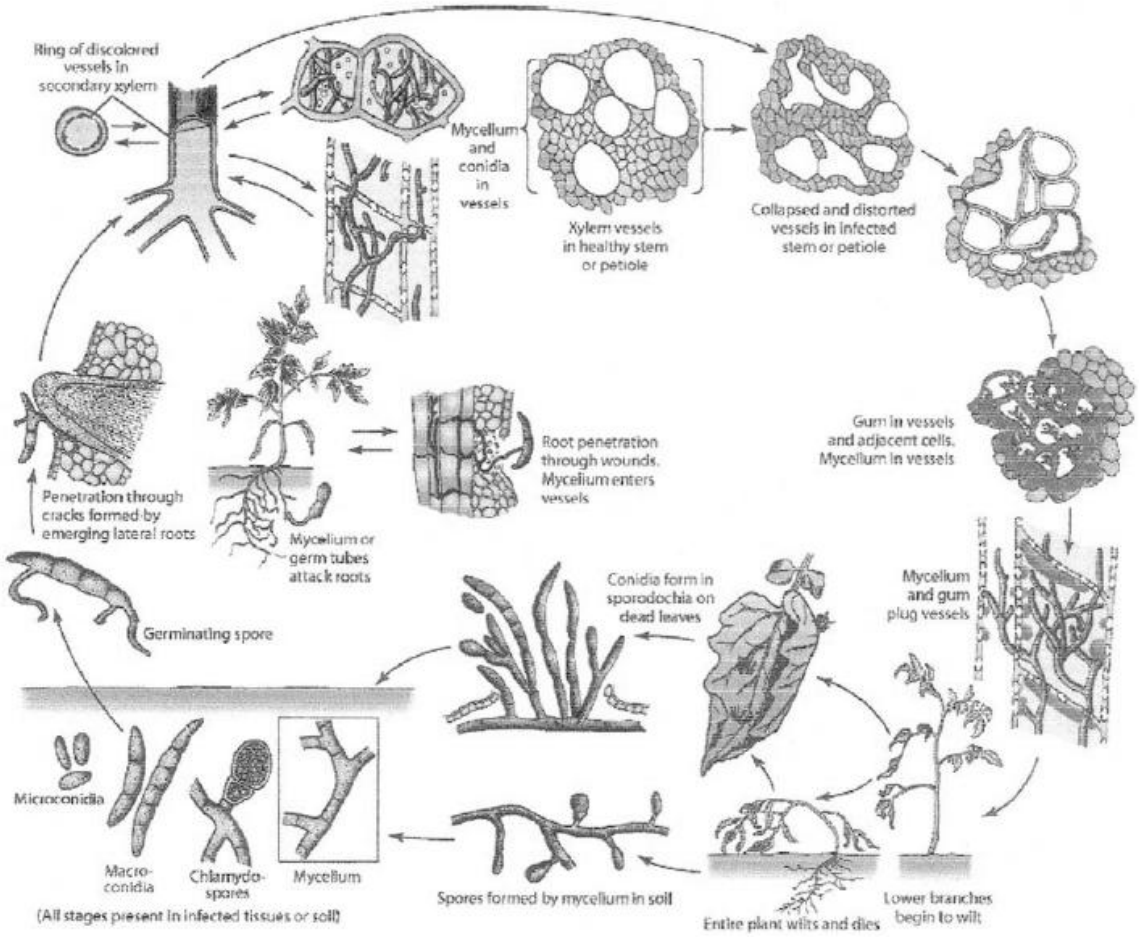

Abbildung 2: Entwicklung der *Fusarium*-Welke an der Tomate verursacht durch *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agrios, 1997)

2.1.5 Bekämpfung

Die Bekämpfung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* kann vorbeugend durch den Anbau resistenter Sorten und die Verwendung von befallsfreiem Saatgut geschehen. Gute Erfolge wurden auch durch resistente Pfropfunterlagen erzielt (Crüger et al., 2002). Weiters bewirkt eine Aufkalkung des Bodens auf pH-Wert 7 und mäßige Mikronährstoff-, Phosphor- und Magnesiumgaben eine Verringerung des Krankheitsbefalls (Jones und Woltz, 1981). Anbaupausen von mindestens 3 Jahren und eine sorgfältige Entsorgung befallener Pflanzen aus dem Bestand reduzieren die Ausbreitung des Pilzes innerhalb des Bestandes. Eine Desinfektion von Arbeitsgeräten und Gewächshauskonstruktionen bewirkt eine Abtötung infektionsfähiger Sporen und kann somit eine Verbreitung des Pathogens auf andere Pflanzen oder Bestände verhindern (Crüger et al., 2002). Eine biologische Bekämpfung mittels mikrobiellen Antagonisten, wie nicht-pathogenen *Fusarium oxysporum*-Biokontrollstämmen (Fravel et al., 2003, Olivain und Alabouvette, 1997) oder *Pseudomonas fluorescence*-Stämmen ist möglich (Kamilova et al., 2008). In Österreich gibt es keine registrierten chemischen Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

2.2 Wurzelexsudation in der Rhizosphäre

2.2.1 Die Rhizosphäre

Die Rhizosphäre wird definiert als diejenige Bodenzone (bis zu 2 mm), die direkt beeinflusst wird durch die Abgabe chemischer Stoffe aus den Wurzeln (Amberger, 1996). Der Rhizosphärenboden ist ein sehr aktiver Bereich, in dem komplexe biologische, chemische und physikalische Prozesse ablaufen (Bais et al., 2006) und das Wurzelwachstum, die Wurzelexsudation und die Populationsentwicklung von Makro- und Mikroorganismen stattfinden (Bertin et al., 2003). Die Rhizosphäre zeichnet sich durch Interaktionen zwischen Wurzeln und deren Interaktionen mit Mikroorganismen und Insekten aus (Bais et al., 2006). Eine sehr bedeutende Rolle spielen die Wechselwirkungen zwischen Bodenpathogenen und ihren Wirtspflanzen, welche durch Wurzelexsudate vermittelt werden (Nelson, 1990, Bais et al., 2006).

2.2.2 Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen in der Rhizosphäre

Wurzelexsudate können in Pflanzenrhizosphären sowohl positive als auch negative Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen hervorrufen. Sehr bedeutungsvolle positive Interaktionen zwischen Wurzeln und Mikroben sind die Mykorrhizierung, die symbiotische Stickstofffixierung durch *Rhizobium* spp., *Frankia* spp. und *Nostoc* spp., die Wachstumsförderung durch Bakterien (*plant growth promoting bacteria*, PGPB) und die Biokontrollwirkung (Antibiotikaproduktion, Parasitismus, Raum- und Nährstoffkonkurrenz) (Bais et al., 2006, Blume und Brümmer, 2010). Wurzelexsudate vermitteln auch negative Interaktionen, indem sie beispielsweise die Sporenkeimung bodenpathogener Pilze wie *Fusarium, Phytium, Verticillium, Sclerotium, Rhizoctonia, Phytophthora* und *Aphanomyces* stimulieren (Nelson, 1990). Um bodenbürtige Pflanzenkrankheiten besser verstehen und bekämpfen zu können, ist es von Nöten mehr über die Wirkung von Wurzelexsudaten auf Mikroorganismen in der Rhizosphäre zu wissen.

2.2.3 Die Wurzelexsudation

Wurzelexsudate sind die Ausscheidungen der Wurzel. Je nach Zweck der Ausscheidung unterscheidet man Wurzelexkrete und -sekrete. Während es sich bei Exkreten um Abfallstoffe handelt, welche von der Pflanze nicht mehr benötigt werden, bezeichnen Sekrete Stoffe, welche abgegeben werden um außerhalb der Pflanze für die Pflanze etwas Nützliches zu bewirken, beispielsweise um Nährstoffe zu mobilisieren (Schubert, 2011).

Wurzelexsudate werden durch Diffusion, über Ionenkanäle und über Vesikel abgegeben (Bertin et al., 2003) und können sowohl löslich als auch flüchtig sein (Nelson, 1990).

Die Wurzelexsudation umfasst die Ausscheidung von Ionen, freiem Sauerstoff, Wasser, Enzymen, Pflanzenschleim und verschiedenen kohlenstoffhältigen primären und sekundären Metaboliten (Uren, 2000, Bertin et al., 2003).

Die Hauptbestandteile der Wurzelexsudate sind anorganische Ionen, Wasser und kohlenstoffhältige Verbindungen (Bertin et al., 2003). Zu den niedermolekularen organischen Komponenten zählen Zucker und einfache Polysaccharide (Arabinose, Fructose, Glucose, Maltose, Mannose, Oligosasccharide), Aminosäuren (Arginin, Asparagin, Cystein, Glutamin), organische Säuren (Zitronensäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Essigsäure,

Ascorbinsäure, Benzoesäure, Ferulasäure) und phenolische Verbindungen. Bei den höher molekularen Stoffen handelt es sich um Flavonoide, Enzyme, Fettsäuren, Wachstumsregulatoren, Nukleotide, Tannine, Kohlenstoffhydrate, Steroide, Terpenoide, Alkaloide, Polyacetylene und Vitamine (Fan et al., 1997a, Curl und Truelove, 1986, Hale et al., 1978, Rovira, 1969, Uren, 2000, Schilling et al., 2000). Die Zusammensetzung der Wurzelexsudate ist abhängig von der Pflanzenart, dem Alter und dem Ernährungszustand der Pflanze (Schilling et al., 2000).

Die Wurzelexsudation ist der Initiator für die Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen in der Rhizosphäre. Über die Wirkung spezifischer Wurzelexsudat-Moleküle auf bodenbürtige Krankheitserreger ist noch wenig bekannt. Auf diesem Gebiet bedarf es noch weiterer Forschung.

2.2.4 Wurzelexsudate der Tomate

Die Hauptbestandteile der Wurzelexsudate der Tomate sind verschiedene Zucker, organische Säuren und Aminosäuren. Glucose und Fructose sind neben Xylose, Maltose, Saccharose und Ribose die dominierenden Zuckerkomponenten. Der Gehalt an organischen Säuren ist höher als der Zuckergehalt, wobei Citrat, Malat und Succinat am stärksten vertreten sind (Lugtenberg et al., 1999, Kamilova et al., 2006a). Während der Wachstumsphase von Tomaten wurden 15 verschiedene Aminosäuren in den Wurzelexsudaten festgestellt, wobei am meisten Glutaminsäure, Threonin und Alanin gefunden wurden (Vancura und Hovadik, 1965). Die Aminosäure Tryptophan nimmt eine entscheidende Rolle als Wurzelexsudatkomponente ein (Kamilova et al., 2006a). Im Zuge von Tomatenwurzelexsudatanalysen wurden mittels HPLC-DAD bedeutende phenolische Verbindungen, wie die Chlorogensäure, die Protocatechusäure, die Zimt- und die Salicylsäure identifiziert (Hage-Ahmed, 2011).

2.2.4.1 Monosaccharide: Glucose und Fructose

Kohlenhydrate spielen eine zentrale Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel und nehmen vielfältige Funktionen ein. Einerseits dienen sie dem Energieumsatz und anderseits sind sie Ausgangstoffe für die Synthese aller anderen Stoffe. Die wichtigsten Kohlenhydrate im

Stoffwechsel sind als Zucker bekannt, welche in Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide unterteilt werden. Ihre Synthese erfolgt in grünen Pflanzen in der Photosynthese über den Calvinzyklus (Bickel-Sandkötter und Kiefer, 2001). Monosaccharide sind entweder Polyhydroxialdehyde oder Polyhydroxiketone, je nachdem ob sie eine Carbonyl- oder eine Ketogruppe enthalten. Nach der Anzahl der C-Atome werden Triosen, Tetrosen, Pentosen, Hexosen und Heptosen unterschieden (Richter, 1996). Den Grundkörper aller im Stoffwechsel wichtigen Zucker bildet die Triose Glycerinaldehyd. Die Hexosen Glucose und Fructose stellen die wichtigsten Zucker des Stoffwechsels dar (Bickel-Sandkötter und Kiefer, 2001). Kohlenhydrate sind für die meisten Mikroorganismen eine bedeutende Nährstoffquelle, wobei Glucose ein sehr wichtiges Wachstumssubstrat ist (Fuchs und Schlegel, 2007). Auch bodenpathogene Pilze besitzen die Fähigkeit mittels hydrolytischen Enzymen Kohlenhydrate zu verwerten. Glucose kann von Pilzen universell assimiliert werden und ist eine sehr einfach nutzbare Kohlenstoffquelle für ihre Entwicklung. Im Gegensatz dazu können Polysaccharide als Nährstoffquelle aufgrund von Depolymerisation einen reduzierenden Einfluss auf pilzliche Wachstumsraten haben (Steinberg et al., 1999b).

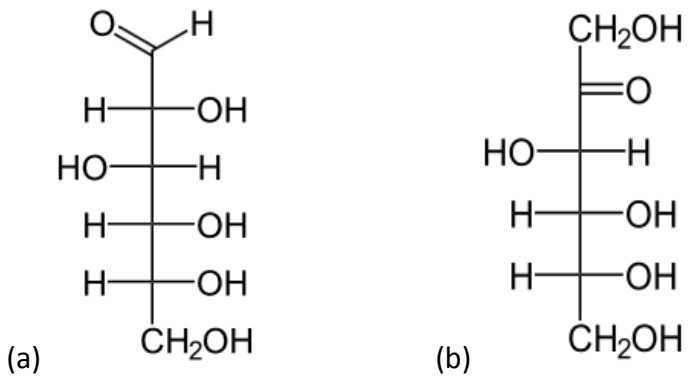

Abbildung 3: Strukturformel der Monosaccharide D-Glucose (a) und D-Fructose (b) (Willmes, 2001)

2.2.4.2 Organische Säuren: Zitronen-, Apfel- und Bernsteinsäure

Eine wichtige Domäne pflanzlicher Vakuolen ist die Speicherung von primären und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Organische Säuren sind neben Zuckern und Aminosäuren nicht nur bedeutende Speicherstoffe in pflanzlichen Vakuolen, sondern wurden auch in

pflanzlichen Wurzelexsudaten nachgewiesen (Richter, 1996, Gisi et al., 1997). Sie spielen in der Pflanze eine zentrale Rolle im Citronensäurezyklus (Abbildung 5), welcher einerseits zum Endabbau aller Metaboliten und somit zum Energiegewinn dient und anderseits als Drehscheibe des Stoffwechsels wirkt (Doenecke et al., 2005). Außerdem tragen organische Säuren entscheidend zur Regulierung des Rhizosphären-pH, zur chemotrophen/chemotaktischen Aktivität von Mikroorganismen und zur Metallchelatbildung im Boden bei (Gisi, 1997).

Die Zitronensäure (*2-Hydroxy-1,2,3-propantricarbonsäure*) bildet den Hauptbestandteil der Säuren in Zitronen, Orangen, Grapefruit, Ananas, Erdbeeren, Johannis- und Preiselbeeren. Ihre Salze werden als Citrat bezeichnet (Wollrab, 1999). Im Citronensäurezyklus wird Citrat gebildet, wenn das Acetyl-Coenzym A, welches aus dem Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Aminosäureabbau resultiert, mit Oxalacetat kondensiert (Richter, 1996).

Die Apfelsäure (*2-Hydroxyy-1,4-butandisäure*) kommt in der Natur nur als L-Apfelsäure in unreifen Früchten, wie Äpfeln, Stachelbeeren, Vogelbeeren und Berberitzen vor. Die Salze der Apfelsäure heißen Malate (Wollrab, 1999). Malat wird im Zuge des Citronensäurezyklus durch Hydratisierung von Fumarat gebildet (Richter, 1996).

Die Bernsteinsäure (*HOOC-$(CH_2)_2$-COOH*) kommt im Bernstein, in Tomaten und in Algen, Pilzen und Flechten vor. Das Salz der Bernsteinsäure wird als Succinat bezeichnet (Wollrab, 1999). Succinat stellt ein Stoffwechselprodukt im Citronensäurezyklus dar und entsteht, wenn das Succinyl-Coenzym A durch die Succinyl-Coenzym A Synthetase aufgespalten wird (Richter, 1996).

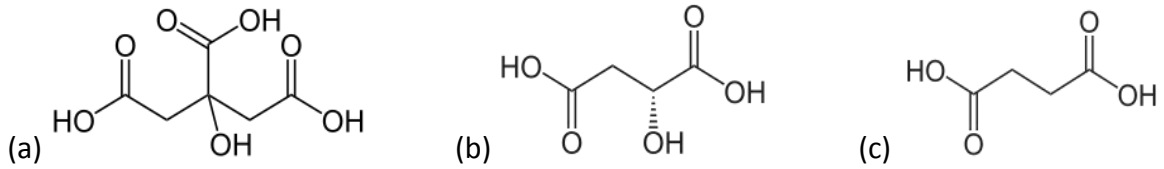

Abbildung 4: Stukturformel der Carbonsäuren Citronensäure (a), Apfelsäure (b) und Bernsteinsäure (c) (Willmes, 2001)

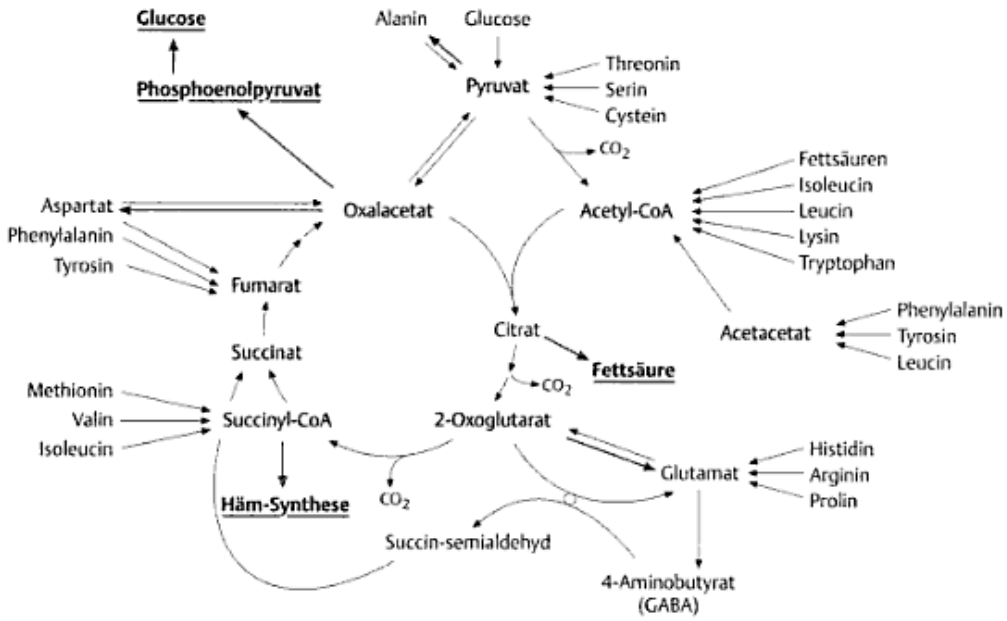

Abbildung 5: Citronensäurezyklus als Drehscheibe des Stoffwechsels (Doenecke et al., 2005)

2.2.4.3 Aminosäure: Tryptophan

Tryptophan zählt neben Phenylalanin und Tyrosin zu den aromatischen Aminosäuren und ist ein Endprodukt des Shikimisäureweges, welcher bei vielen Mikroorganismen und in den Chloroplasten höherer Pflanzen vorkommt. Er ist der einzige Lieferant aromatischer Aminosäuren und liefert Schlüsselverbindungen für die Biosynthese wichtiger Substanzen des Sekundärstoffwechsels, nämlich der Phenole (Richter, 1996, Bickel-Sandkötter und Kiefer, 2001). Tryptophan entsteht, wenn Chorisminsäure zu Anthranilsäure umgewandelt wird und mit Phosphoribosyl-1-diphosphat kondensiert. Über Indol, welches mit Serin reagiert, wird schließlich Tryptophan gebildet (Bickel-Sandkötter und Kiefer, 2001). Das Tryptophan in Bakterien und Pilzen wird für die Proteinsynthese benötigt (Radwanski und Last, 1995).

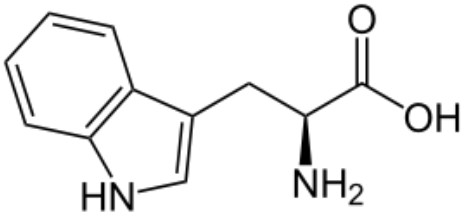

Abbildung 6: Strukturformel der Aminosäure Tryptophan mit Indol-Ringsystem (Willmes, 2001)

2.2.4.4 Phenolische Verbindungen: Phenolcarbonsäuren und Phenylpropane

Die Phenolische Verbindungen stellen neben den Alkaloiden und den Terpenen eine große und bedeutende Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe dar. Diese Stoffe können einerseits als chemische Signalstoffe und andererseits zur Verteidigung gegen Pflanzenfresser, Pathogene oder Konkurrenten dienen oder eine Schutzfunktion gegen abiotische Umweltfaktoren, wie UV-Strahlung darstellen. Einige unter ihnen sind als Phytoalexine antimikrobiell wirksam und werden nur nach Verletzungen oder mikrobiellem Befall gebildet (Raven et al., 2006).

Phenole sind durch einen aromatischen Ring mit mindestens einer Hydroxylgruppe oder einem Derivat derselben charakterisiert (Heß, 2008). Sie sind in allen Pflanzen vorhanden und reichern sich nachweislich in allen Pflanzenteilen (Wurzeln, Sprossachse, Blätter, Blüten und Früchte) an (Raven et al., 2006). Ihre Biosynthese geht meistens von der aus dem Shikimisäureweg stammenden aromatischen Aminosäure Phenylalanin aus. Man unterscheidet einfache Phenole, Phenolcarbonsäuren, Phenylpropane und Flavonoide (Heß, 2008).

Zu den Phenolcarbonsäuren zählen die Hydroxyzimtsäuren und die Hydroxybenzoesäuren, wobei der Gehalt an Hydroxyzimtsäuren in Pflanzen wesentlich höher ist. Sie liegen meist in veresterter Form mit organischen Säuren oder mit Zuckern vor (Manach et al., 2004).

Die Chlorogensäure (*5-O-Caffeoylchinat*), ein Hydroxyzimtsäureester, wird aus der Kaffeesäure und der Chinasäure gebildet und stellt das am weitesten im Pflanzenbereich verbreitete Derivat der Kaffeesäure dar (Heß, 2008). Sie ist ein typischer Inhaltsstoff von Korbblütengewächsen (*Asteraceae*), Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) und Kaffeegewächsen (*Rubiaceae*) (Richter, 1996). Die Chlorogensäure ist ein Phytoalexin und zeigt Aktivität gegen phytopathogene Viren und Pilze. Sie bildet mit vielen Metall-Ionen, z. B. Fe(III) farbige Komplexe (Steglich et al., 1997).

Die Protocatechusäure (*3,4-Dihydroxybenzoesäure*) ist ein universell verbreiteter Hydroxybenzoesäureester (Heß, 2008) und kommt in vielen Höheren Pflanzen vor (Steglich et al., 1997). Sie wirkt allelopathisch und dient als präinfektioneller Abwehrstoff gegen Mikroorganismen (Heß, 2008).

Die Salicylsäure (*2-Hydroxybenzoesäure*) trägt ihren Namen nach dem Vorkommen in der Weide (Salix), ist in vielen Pflanzen nachweisbar und entsteht aus p-Cumarsäure oder Benzoesäure (Heß, 2008). In Pflanzen ist die Salicylsäure einerseits eine Abwehrsubstanz, da sie antifungisch und antibakteriell wirksam ist und andererseits hat sie Phytohormonwirkung, das heißt, dass sie das Wachstum von Blüten, Knospen und Wurzeln beeinflusst (Steglich et al., 1997).

Weitere in Tomatenpflanzen enthaltene Phenolsäuren sind unter anderem die Kaffeesäure, die Ferulasäure und die p-Cumarsäure (Martinez-Valverde et al., 2002).

Die Zimtsäure zählt zur Gruppe der Phenylpropane, welche aus einem aromatischen Ring mit der 3C-Gruppe des Propans bestehen. Die Aminosäure Phenylalanin ist die wichtigste Ausgangssubstanz für die Synthese von Zimtsäuren, welche ihrerseits wieder durch ihren partiellen Abbau in einfache Phenole übergehen können. Das Schlüsselenzym hierfür ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (Heß, 2008). Weiterhin ist sie eine Vorstufe zu Benzochinonen, Cumarinen, Ligninen und anderen phenolischen Substanzen (Bickel-Sandkötter und Kiefer, 2001).

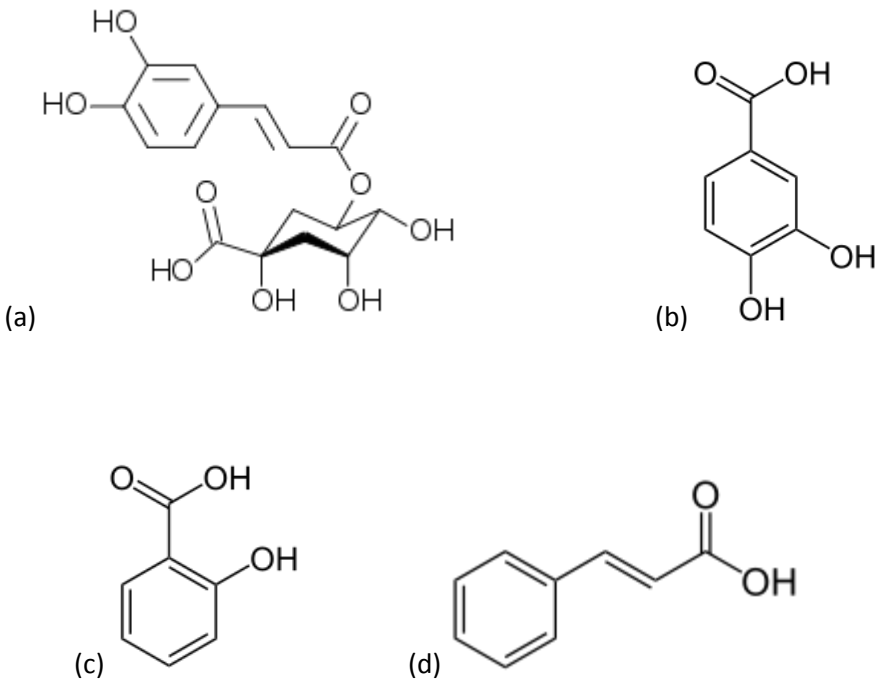

Abbildung 7: Strukturformel der Chlorogensäure (a), der Protocatechusäure (b), der Salicylsäure (c) und der Zimtsäure (d) (Willmes, 2001)

2.3 Quantitative Bestimmung pilzlichen Wachstums

Das Wachstum einer mikrobiellen Population wird gemessen, indem Veränderungen in der Anzahl der Zellen, in dem Gewicht eines bestimmten Bestandteils der Zellmasse, beispielsweise eines Proteins oder einer Nukleinsäure, oder in dem Trockengewicht der Zellen selber verzeichnet werden (Madigan und Martinko, 2006).

Zur quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen werden direkte und indirekte Messmethoden verwendet. Direkte Messungen können mikroskopisch zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl oder als Platten- bzw. Kolonienzählung zur Lebendkeimzahlbestimmung vorgenommen werden. Indirekt kann mikrobielles Wachstum in Form von Trübungsmessungen mittels Photometer oder Spektralphotometer bestimmt werden (Madigan und Martinko, 2006).

Zur Bestimmung pilzlichen Wachstums kann neben der Agar- und Scheibchendiffusionsmethode und der mikroskopischen Messung der Hyphenlänge die Trübungsmessung mittels photometrischen Mikroplatten-Lesegeräten verwendet werden (Ludwig und Boller, 1990, Broekaert et al., 1990), da laut Broekaert et al. (1990) die durch die Pilzkultur verursachte Lichtabsorption mit deren Trockengewicht korreliert und laut Ludwig und Boller (1990) die mittels Mikroskop gemessene Hyphendichte mit den mittels Mikroplatten-Lesegerät ermittelten optische Dichte Werten übereinstimmen.

Bei der Trübungsmessung wird Licht durch eine Zellsuspension geleitet, wobei eine Photozelle das einfallende nichtgestreute Licht misst und Photometereinheiten (Klett-Einheiten) bzw. Einheiten optischer Dichte (OD) beim Spektralphotometer anzeigt (Madigan und Martinko, 2006).

Die Trübungsmessung ist eine sehr genaue Messmethode, welche schnell und leicht durchzuführen ist, ohne die zu untersuchende Probe zu zerstören oder entscheidend zu verändern. Weiters ermöglicht sie eine große Zahl an Proben innerhalb kürzester Zeit mehrere Male zu überprüfen und erfordert nur sehr geringe Mengen an Testsubstanzen (Madigan und Martinko, 2006, Ludwig und Boller, 1990, Broekaert et al., 1990). Auch für nicht sporulierende Pilze kann die Trübungsmessung herangezogen werden, da in diesem Fall Myzelfragmente als Inokulum verwendet werden können (Broekaert et al., 1990).

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung der Sporensuspension

3.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Für sämtliche Tests wurden Mikrokonidien von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Stamm Fol 007, bereitgestellt von B. J. Cornelisson, Institute for Molecular Cell Biology, Amsterdam) verwendet. Die Pilzkulturen wurden vor ihrem Einsatz als Mikrokonidiensuspension in 30% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

3.1.2 Herstellung der Pilzkulturen

Zur Herstellung von sterilen Pilzkulturen wurden Petrischalen mit dem Durchmesser von 9 cm mit autoklaviertem Czapek-Dox-Agar (CzD) (Tabelle 1) ausgegossen. Anschließend wurde auf das feste Medium die bei -80°C gelagerte Mikrokonidiensuspension mittels Impföse aufgebracht. Die mit Nescofilm verschlossenen CzD-Petrischalen wurden im Klimaschrank bei 24°C und Dunkelheit inkubiert. Nach zwei Wochen wurden von den gut entwickelten Pilzkulturen ca. 0,5 cm^2 große Pilz-Agarstückchen auf neue CzD-Petrischalen (Abbildung 8) übertragen, welche wiederum bei 24°C und Dunkelheit zwei Wochen lang inkubiert und für die Tests verwendet wurden.

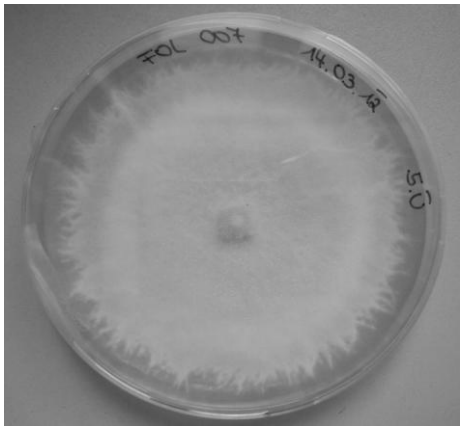

Abbildung 8: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* auf Czapek-Dox-Agar

Tabelle 1: Zusammensetzung von Czapek-Dox-Agar (Singelton et al., 1992)

Bezeichnung	Bestandteile	Menge
Czapek-Dox-Agar	$NaNO_3$	3,00 g
	K_2HPO_4	1,00 g
	KCl	0,50 g
	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,50 g
	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01 g
	Saccharose	30,00 g
	Agar	15,00 g
	dest. H_2O	1 l

3.1.3 Herstellung der Mikrokonidiensuspension

Die zwei Wochen alten Pilzkulturen wurden unter sterilen Bedingungen mit 5-10 ml destilliertem und autoklaviertem Wasser überschichtet und mit einem sterilen Drigalskispatel wurde das Myzel mit den Mikrokonidien vorsichtig vom Agar gelöst. Um das Myzel von den Sporen zu trennen, wurde die entstandene Suspension durch drei Lagen Kannenvlies-Filter (Kannenvlies-Filter, EURO FARM) in einen 250 ml Erlenmeyerkolben filtriert. Anschließend wurde mittels Lichtmikroskop (NIKON JAPAN) und einer Thoma-neu-Zählkammer eine Mikrokonidiendichte von 1 x 10^7 pro ml eingestellt.

3.2 Herstellung der Wurzelexsudat-Einzelkomponenten-Stammlösungen

3.2.1 Polare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten

Zur Herstellung von 0,3 M Stammlösungen der polaren Wurzelexsudat-Einzelkomponenten wurden die aus Tabelle 2 ersichtlichen Stoffe in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, in 25 ml einer mit Acetatpuffer 1:1000 fach verdünnten Czapek-Dox-Nährlösung ohne Zucker (CzD_AcP/-Zu 1:1000) (pH 5,5) (Tabelle 1, ohne Agar und Saccharose) durch Vortexen gelöst und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 5,5 eingestellt. Anschließend wurden die 0,3 M Lösungen durch einen 0,22 µm Filter (Rotilabo®-Spitzenfilter, PVDF, steril, ROTH, Karlsruhe) steril filtriert und als 1 ml – Aliquots bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Polare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten

Wurzelexsudat-Einzelkomponente	M [g/mol]	V [ml]	c [mol/l]	m[6] [g]
Glucose[1]	198,17	25	0,3	1,486
Fructose[2]	180,16	25	0,3	1,351
Zitronensäure (Citrat)[3]	210,14	25	0,3	1,576
Apfelsäure (Malat)[4]	134,09	25	0,3	1,006
Bernsteinsäure (Succinat)[5]	118,09	25	0,3	0,886

[1] α-D(+)-Glucose Monohydrat, ≥99,5%, Ph.Eur., $C_6H_{12}O_6 \bullet H_2O$, 14431-43-7, Carl Roth GmbH + Co KG

[2] D-Fructose, 99%, $C_6H_{12}O_6$, 57-48-7, Alfa Aesar GmbH & Co KG

[3] DL-Apfelsäure, >99%, $C_4H_6O_5$, 6915-15-7, Merck Chemicals Germany

[4] Citronensäure-Monohydrat, ≥99,5% p. a., ACS, ISO, $C_6H_8O_7 \bullet H_2O$, 5949-29-1, Carl Roth GmbH + Co KG

[5] Succinic acid, ≥99%, $C_4H_6O_4$, 110-15-6, Sigma-Aldrich

[6] Zur Berechnung der Masse m wurde folgende Formel verwendet: m = c*M*V.

Zur Herstellung der Czapek-Dox-Nährlösungen (CzD_AcP/+Zu und CzD_AcP/-Zu) wurden die einzelnen Bestandteile (Tabelle 1 ohne Agar, mit bzw. ohne Saccharose) eingewogen, in Acetatpuffer (Tabelle 3) mittels Magnetrührer gelöst und autoklaviert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Acetatpuffer (AcP) (Mortimer, 2001)

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Menge**
Acetatpuffer	dest. H_2O	1 l
(25 mM, pH 5,5)	Natriumacetat	1,71 g
	Essigsäure 100%	238 µl

3.2.2 Unpolare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten

Zur Herstellung von Stammlösungen der unpolaren Wurzelexsudat-Einzelkomponenten wurden die aus Tabelle 4 ersichtlichen Stoffe in Glasröhrchen eingewogen, in variablen Mengen Dimethyl-Sulfoxid (≥99,5%, C_2H_6OS, 67-68-5, SIGMA) durch Vortexen gelöst und mit CzD_AcP/-Zu 1:1000 vermischt. Nach der pH-Wert-Einstellung mit 10 M NaOH auf 5,5, wurden die Lösungen durch einen 0,22 µm Filter (Rotilabo®-Spitzenfilter, PVDF, steril, ROTH, Karlsruhe) steril filtriert und als 1 ml – Aliquots bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Unpolare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten

Wurzelexsudat-Einzelkomponente	M [g/mol]	V [ml]	c [mol/l]	m [g]	DMSO [ml]
Tryptophan[1]	204,23	50	0,015	0,153	0,35
Zimtsäure[2]	148,16	250	0,003	0,111	2,0
Chlorogensäure[3]	363,32	25	0,027	0,250	0,35
Salicylsäure[4]	138,12	250	0,003	0,104	2,0
Protocatechussäure[5]	154,12	25	0,3	1,156	3,5

[1] DL-Tryptophan, 99%, $C_{11}H_{12}N_2O_2$, 54-12-6, Alfa Aesar GmbH & Co KG

[2] trans-Cinnamic acid, 99+%, $C_9H_8O_2$, 140-10-3, Alfa Aesar GmbH & Co KG

[3] Chlorogenic acid hemihydrate, purum, ≥ 98,0% (T), $C_{16}H_{18}O_9 \bullet 0.5H_2O$, 6001-76-9, Fluka Chemie GmbH

[4] Salicylic acid, puriso. p. a., ≥ 99,0% (T), $C_7H_6O_3$, 69-72-7, Fluka Chemie GmbH

[5] 3,4-Dihydroxybencoic acid, 97%, $C_7H_6O_4$, 303-38-8, Alfa Aesar GmbH & Co KG

3.3 Testung der Sporenkeimung

Der Ansatz für die Sporenkeimtests (Abbildung 9) erfolgte in sterilen 96-Well-Platten (NUNCLONTM Δ Surface, F96 MicroWell™ Plates, CAT. NO. 156545, NUNCTM Brand Products, Dänemark). Es wurden jeweils 175 µl Nährlösung bzw. die Wurzelexsudat-Einzelkomponenten-Stammlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (Tabelle 6) und 35 µl Sporensuspension in ein Well pipettiert. Pro Nähr- bzw. Wurzelexsudatstammlösung wurden 3 Wells pro Platte verwendet. In den Plattenrand wurden pro Well 210 µl destilliertes und autoklaviertes Wasser pipettiert. Die mit Alufolie umwickelten Platten wurden 24 Stunden lang auf einem Schüttler (200 U/min) bei 24°C und Dunkelheit inkubiert. Die Tests wurden dreimal durchgeführt.

Tabelle 5: Konzentrationen der Einzelkomponentenstammlösungen

Einzelkomponente	**Konzentrationen**	**gelöst in**
Glucose	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Fructose	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Citronensäure	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Apfelsäure	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Bernsteinsäure	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Tryptophan	3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Zimtsäure	3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Chlorogensäure	3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000
Salicylsäure	3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_Acp/-Zu 1:1000
Protocatechussäure	30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 30 µM, 3 µM	CzD_AcP/-Zu 1:1000

Nach 24 Stunden wurde die Keimung mit 10 µl/Well 1:10 verdünnter Lactophenolblaulösung gestoppt. Zuerst wurde die Keimung in den Czapek-Dox-Nährlösungen (Tabelle 1, ohne Agar) und im Acetatpuffer (Tabelle 3) bestimmt und anschließend jene in den unterschiedlich konzentrierten Wurzelexsudatstammlösungen. Die Auswertung erfolgte innerhalb von 48 Stunden. Dabei wurde ein Tropfen pro Well auf einen Objektträger pipettiert und mittels Lichtmikroskop (NIKON JAPAN) die Anzahl der gekeimten Mikrokonidien aus 200 zufällig ausgewählten Mikrokonidien gezählt. Eine Mikrokonidie galt als gekeimt, wenn der Keimschlauch mindestens so lang war, wie die Spore selbst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand
B	Rand	CzD_AcP/+Zu	CzD_AcP/-Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP							Rand
C	Rand	CzD_AcP/+Zu	CzD_AcP/-Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP							Rand
D	Rand	CzD_AcP/+Zu	CzD_AcP/-Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP							Rand
E	Rand	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	F 30mM	F 3mM	F 0,3mM	F 30µM	F 3µM	Rand
F	Rand	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	F 30mM	F 3mM	F 0,3mM	F 30µM	F 3µM	Rand
G	Rand	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	F 30mM	F 3mM	F 0,3mM	F 30µM	F 3µM	Rand
H	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand

Abbildung 9: Ansatz einer 96-Well-Platte für die Sporenkeimtestung am Beispiel Glucose und Fructose

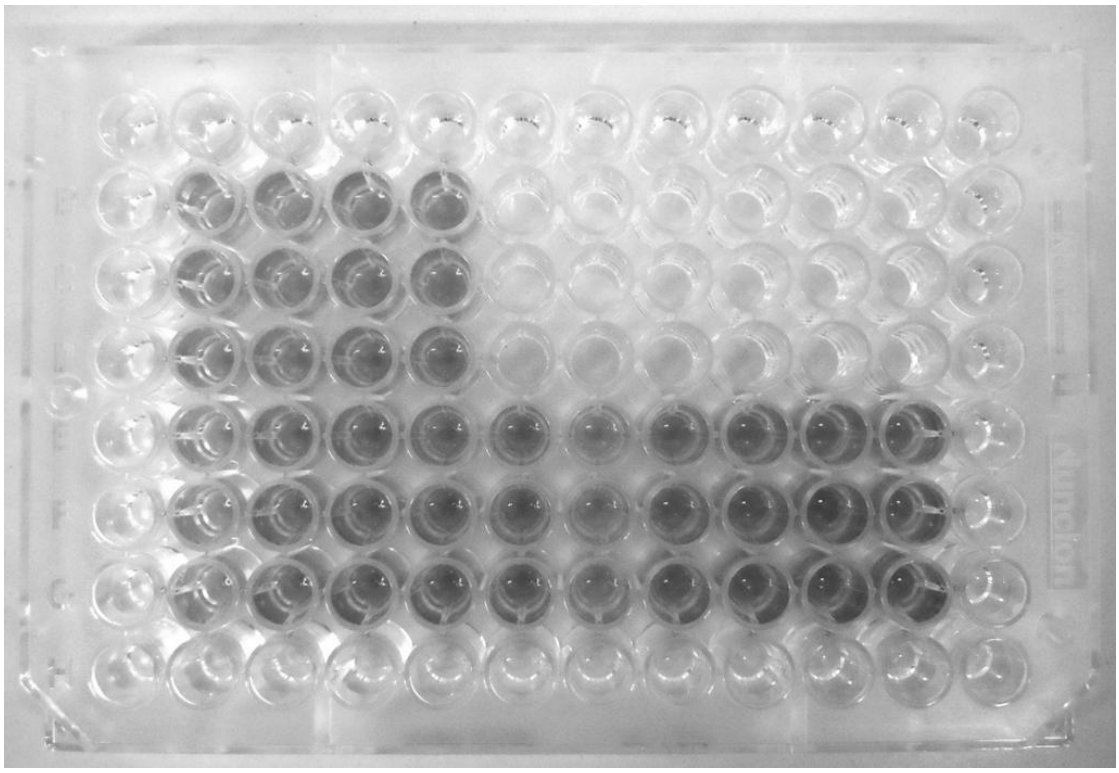

Abbildung 10: 96-Well-Platte für die Sporenkeimtestung

3.4 Bestimmung der Myzelentwicklung

Zur Bestimmung der Myzelentwicklung wurden sterile 96-Well-Platten (NUNCLONTM Δ Surface, F96 MicroWell™ Plates, CAT. NO. 156545, NUNCTM Brand Products, Dänemark) angesetzt (Abbildung 11). In die Reihen B bis E wurden pro Well 175 µl Nährlösung bzw. die Wurzelexsudatstammlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen und 35 µl Sporensuspension pipettiert. Die Reihen F und G enthielten ausschließlich 210 µl der Nährlösung bzw. Wurzelexsudatstammlösung. Pro Nähr- bzw. Wurzelexsudatstammlösung wurden 6 Wells pro Platte verwendet. In den Plattenrand wurden pro Well 210 µl destilliertes und autoklaviertes Wasser pipettiert. Die mit Alufolie umwickelten Platten wurden 5 Tage lang auf einem Schüttler (200 U/min) bei 24°C und Dunkelheit inkubiert, wobei Messungen der optischen Dichte mittels Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH) bei 600 nm im Abstand von 24 Stunden erfolgten. Die Tests wurden dreimal wiederholt.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand
B	mit Sporen	Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
C		Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
D		Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
E		Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
F	keine Sporen	Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
G		Rand	CzD_AcP/ +Zu	CzD_AcP/+Zu 1:1000	CzD_AcP/ -Zu	CzD_AcP/-Zu 1:1000	AcP	G 30mM	G 3mM	G 0,3mM	G 30µM	G 3µM	Rand
H		Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand	Rand

Abbildung 11: Ansatz einer 96-Well-Platte für die Bestimmung der Myzelentwicklung am Beispiel Glucose

4. Ergebnisse

4.1 Testung der Sporenkeimung

In diesem Versuch wurde die Wirkung von verschiedenen Tomatenwurzelexsudat-Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Keimung der Mikrokonidien von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol 007) untersucht. Als Standard diente das Czapek-Dox-Nährmedium ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000). Die prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Nährlösungen/Komponenten wurden in Bezug zum Standard gesetzt, dessen mittlere Keimrate als 100 % angenommen wurde.

4.1.1 Wirkung der unterschiedlichen Nährlösungen auf die Keimung von Mikrokonidien

In Abbildung 12 ist die Wirkung der Nährlösungen Czapek-Dox mit und ohne Zucker und des Acetatpuffers auf die Sporenkeimung dargestellt.

Während in den Nährlösungen CzD+ und CzD- die Keimraten erhöht werden, ist im Acetatpuffer eine Reduktion der Sporenkeimung zu erkennen. Im Czapek-Dox mit Zucker liegt die mittlere Keimrate um 90 % höher als im CzD- 1:1000. Die Keimrate im Czapek-Dox ohne Zucker wird im Mittel um 40 % erhöht, im Acetatpuffer hingegen um 40 % erniedrigt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Nährlösungen ($F = 471{,}315$; $p < 0{,}01$). Es wurde eine Wurzel-Transformation der Daten durchgeführt. Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab, dass sich die Keimung im Czapek-Dox mit und ohne Zucker und im Acetatpuffer signifikant vom Standard und voneinander unterscheidet.

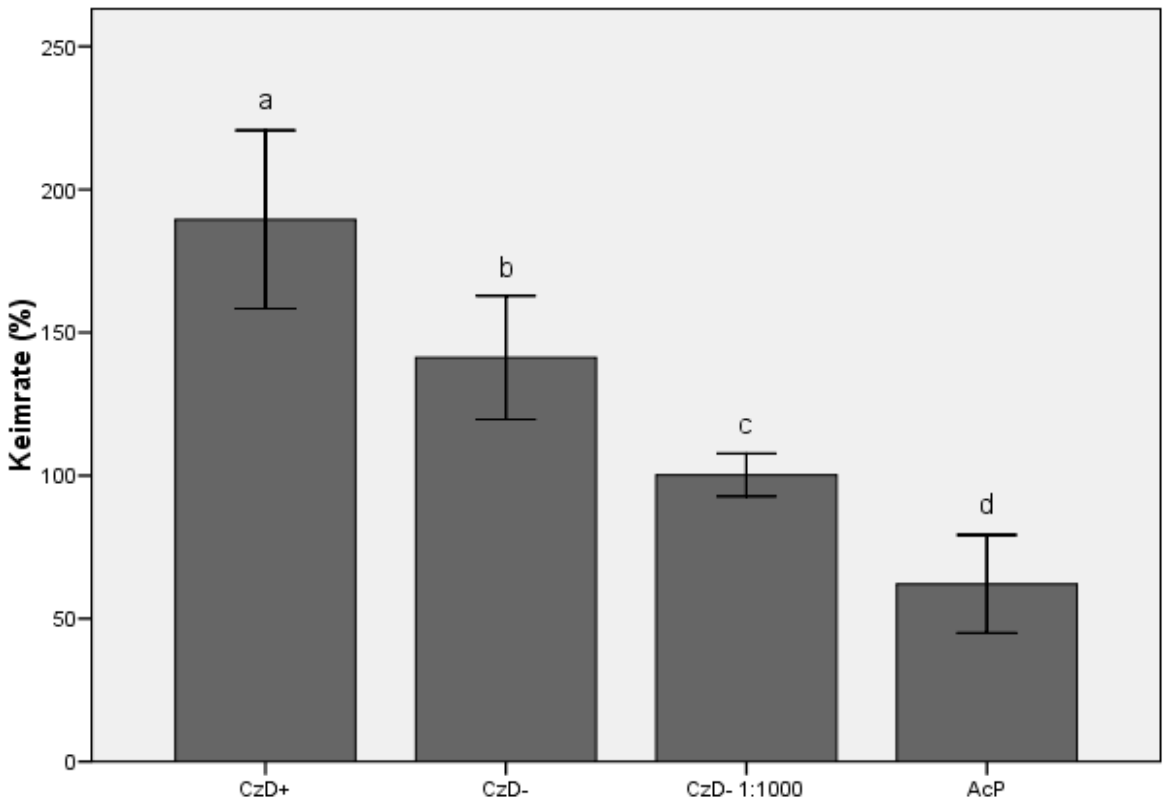

Abbildung 12: Keimrate (%) von Fol 007 in den Nährlösungen Czapek-Dox mit Zucker (CzD+), Czapek-Dox ohne Zucker (CzD-) und im Acetatpuffer (AcP) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 471,315$; $p < 0,01$).

4.1.2 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 30 mM auf die Keimung von Mikrokonidien

Abbildung 13 zeigt die Wirkung von Glucose, Fructose, Citrat, Malat, Succinat und Protocatechusäure in der Konzentration 30 mM auf die Mikrokonidienkeimung.

Eine Erhöhung der Keimrate kann bei den Komponenten Glucose und Fructose festgestellt werden. Während Fructose die Keimrate im Mittel um 12 % erhöht, liegt die mittlere Keimrate bei Glucose um 36 % höher als beim Standard. Succinat erniedrigt die Keimrate im Mittel um 12 %. Bei den restlichen Komponenten liegen die Mittelwerte der Keimraten deutlich unterhalb der 100 % Marke. In Citrat und Malat wird eine Reduktion um 40-41 %

verzeichnet. Die Protocatechusäure verringert die Keimrate um etwa die Hälfte und liegt lediglich bei 53 %.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 58{,}558$; $p < 0{,}05$). Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab, dass sich die Keimung in den Medien Glucose, Citrat, Malat und Protocatechusäure signifikant von jener im Standard unterscheidet. In den Medien Citrat, Malat und Protocatechusäure wurde in etwa eine gleich hohe Keimrate erzielt, welche sich signifikant von den restlichen Komponenten unterscheidet. Glucose und Fructose unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, jedoch weisen sie signifikante Unterschiede zu den anderen Komponenten auf.

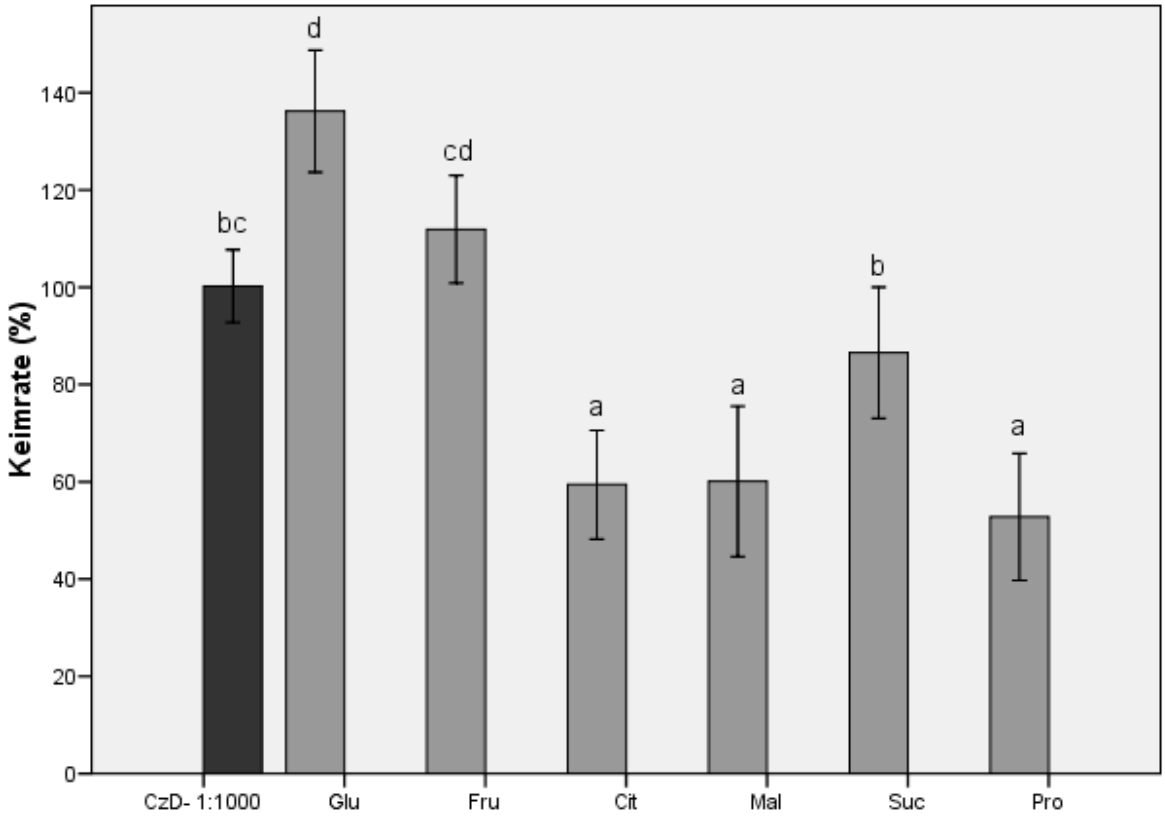

Abbildung 13: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 58{,}558$; $p < 0{,}05$).

4.1.3 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 3 mM auf die Keimung von Mikrokonidien

In Abbildung 14 ist der Einfluss aller 10 getesteten Komponenten in der Konzentration 3 mM auf die Keimrate der Mikrokonidien dargestellt. Die Komponenten Succinat und Protocatechusäure wurden aufgrund der Inhomogenität der Varianzen von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

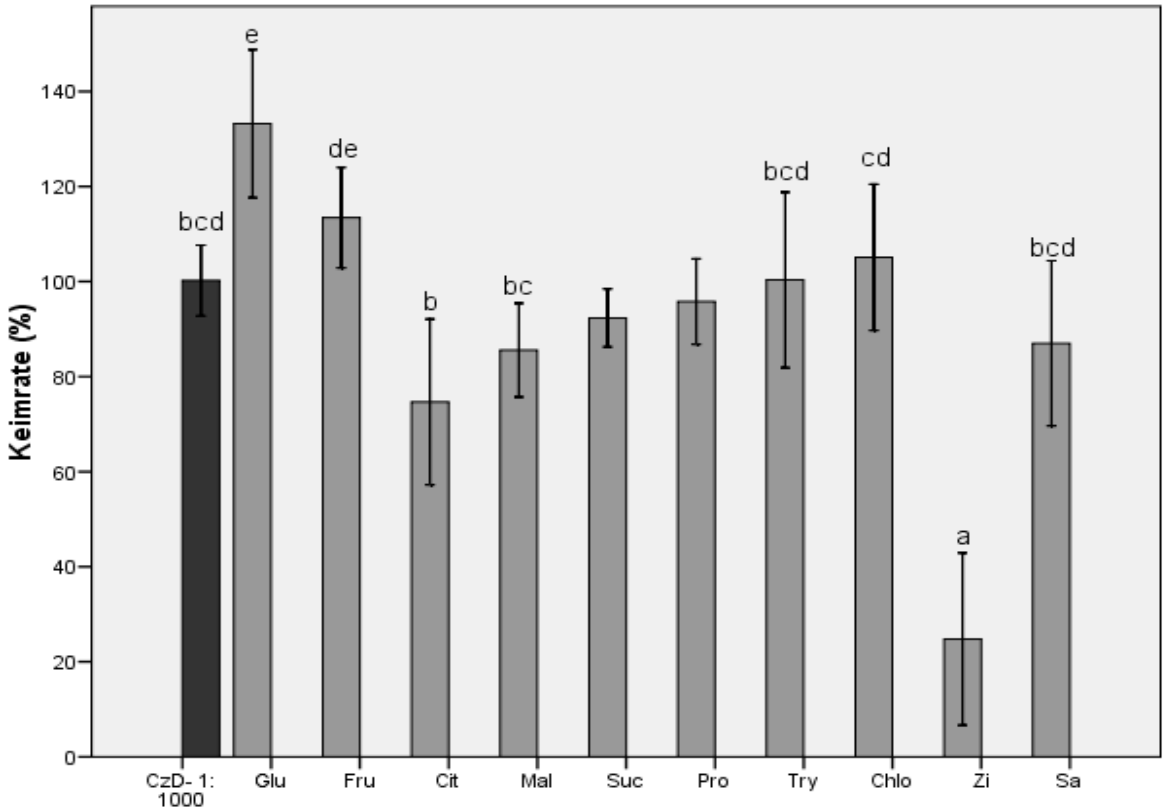

Abbildung 14: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 36{,}908$; $p < 0{,}01$; exkl. Succinat und Protocatechusäure).

Wie in Abbildung 13 ist auch in Abbildung 14 eine Erhöhung der mittleren Keimraten in den Medien Glucose und Fructose zu verzeichnen. Glucose erhöht die Keimung im Mittel um 33 % und Fructose um 13 %. Während Malat die mittlere Keimung um 14 % und Citrat die mittlere Keimung nur um ein Viertel verringert, liegt diese im Zimtsäuremedium bei lediglich 25 %. Die Mittelwerte der restlichen Komponenten schwanken nur geringfügig um die 100 % Marke.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 36{,}908$; $p < 0{,}01$). Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab, dass sich die Keimung in den Medien Glucose und Zimtsäure signifikant von jener im Standard unterscheiden. Bei den restlichen Komponenten ist dies nicht der Fall. Glucose und Fructose unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, jedoch weisen sie signifikante Unterschiede zu den Keimraten in der Zimtsäure, im Citrat und im Malat auf.

4.1.4 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Keimung von Mikrokonidien

Abbildung 15 zeigt den Einfluss aller 10 getesteten Komponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Keimrate der Mikrokonidien.

Aus Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass die Glucose eine Erhöhung der mittleren Keimrate um 26 % bewirkt. Die Keimraten bei Fructose, Succinat, Tryptophan und Salicylsäure unterscheiden sich im Mittel kaum vom Standard. Die Mittelwerte der restlichen Komponenten liegen zwischen 10 % und 20 % unterhalb der 100% Marke.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 7{,}911$; $p < 0{,}01$). Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Keimrate in der Glucose und jener im Standard. Bei den restlichen Komponenten ist dies nicht der Fall. Die Keimung in der Glucose unterscheidet sich nicht signifikant von jener in der Fructose und im Succinat, jedoch bestehen signifikante Unterschiede zu den restlichen Komponenten.

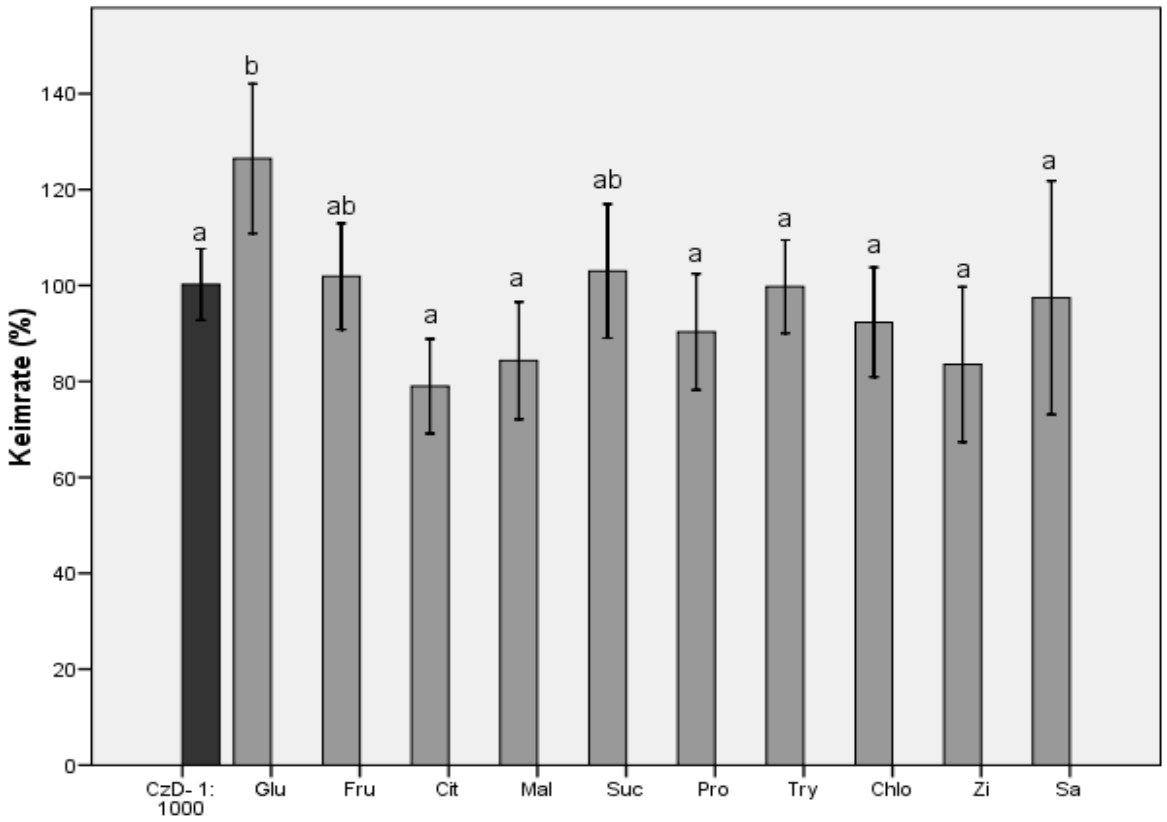

Abbildung 15: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 7{,}911$; $p < 0{,}01$).

4.1.5 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Keimung von Mikrokonidien

In Abbildung 16 ist die Wirkung aller 10 getesteten Komponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Mikrokonidienkeimung dargestellt.

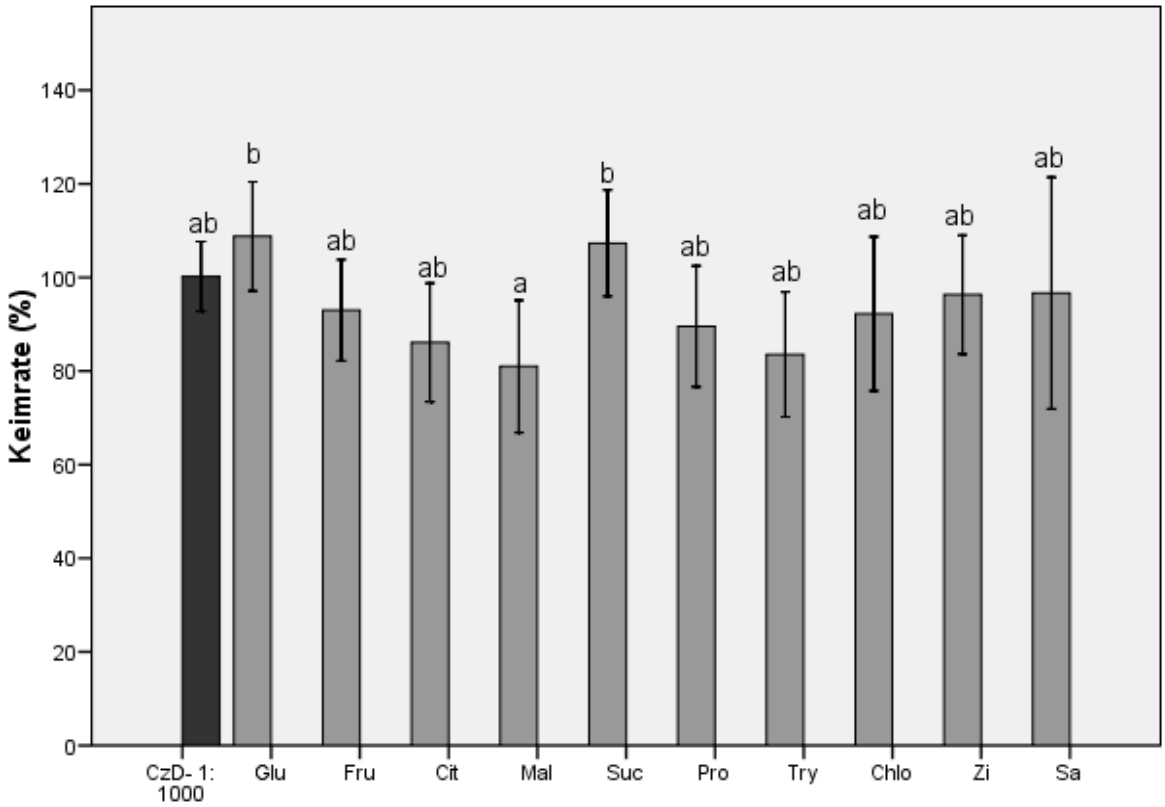

Abbildung 16: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 3{,}916$; $p < 0{,}01$).

In Abbildung 16 liegen die mittleren Keimraten von Glucose und Succinat um etwa 10 % höher als beim Standard. Bei Citrat, Malat und Tryptophan kommt es zu einer Erniedrigung um 15-20 %. Die Mittelwerte der restlichen Komponenten liegen nur knapp unterhalb der 100% Marke.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 3{,}916$; $p < 0{,}01$). Es wurde ein Ranking der Daten vorgenommen. Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Standard und den Komponenten. Malat unterscheidet sich jedoch signifikant von Glucose und Succinat. Zwischen den restlichen Komponenten bestehen keine signifikanten Unterschiede.

4.1.6 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Keimung von Mikrokonidien

Abbildung 17 zeigt die Wirkung aller 10 getesteten Komponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Keimung von Mikrokonidien.

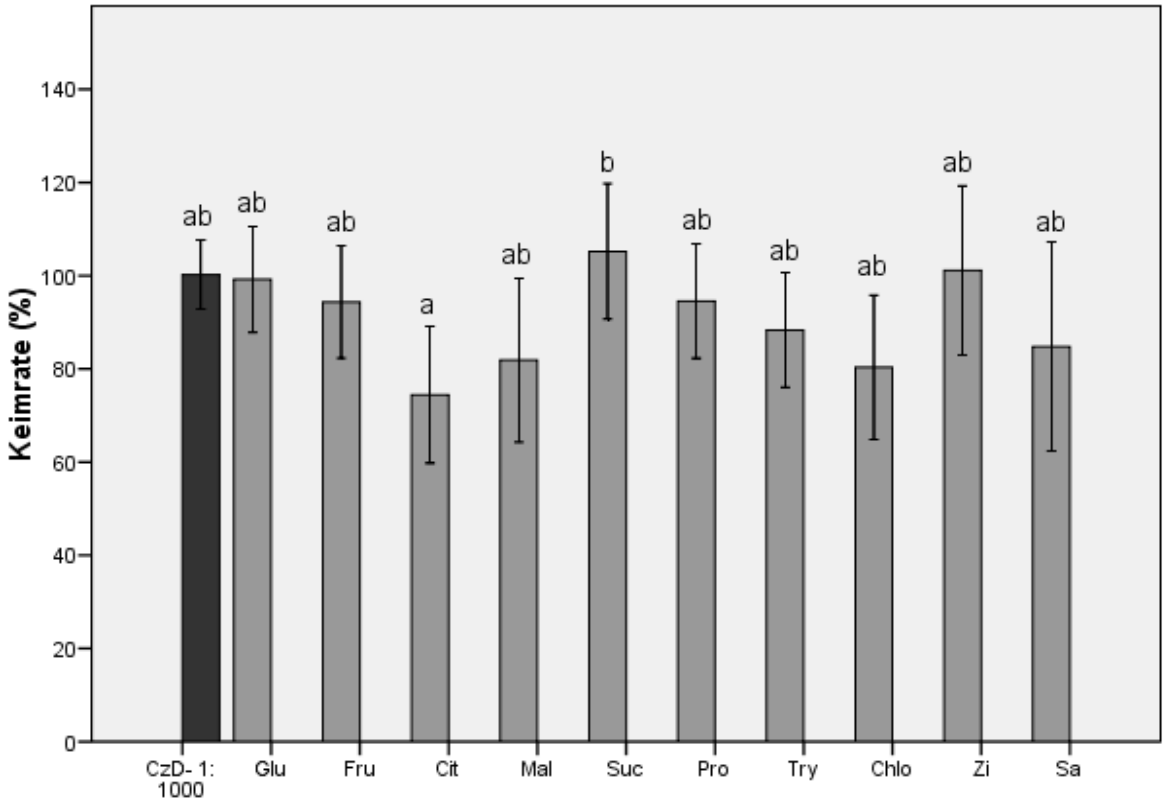

Abbildung 17: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 4{,}039$; $p < 0{,}01$).

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass Citrat, Malat und Chlorogensäure die Keimung im Mittel um 20-25 % senken. Salicylsäure bewirkt eine Erniedrigung der Keimung um 15 % und Tryptophan um 12 %. Die Mittelwerte der restlichen Komponenten bewegen sich nur geringfügig um den Standard.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikante Unterschiede zwischen den prozentuellen Keimraten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 4{,}039$; $p < 0{,}01$). Der Bonferroni-Post-Hoc-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Standard und den Komponenten. Citrat unterscheidet sich jedoch signifikant von Succinat. Zwischen den restlichen Komponenten bestehen keine signifikanten Unterschiede.

4.1.7 Wirkung unterschiedlich konzentrierter Wurzelexsudatkomponenten auf die Keimung von Mikrokonidien

Abbildung 18 zeigt den Einfluss aller 10 getesteten Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Mikrokonidienkeimung. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurde die Wirkung der Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Sporenkeimung untersucht und mittels Tukey-Post-Hoc-Test wurden signifikante Unterschiede dargestellt.

Bei Glucose, Fructose und Chlorogensäure hat sich gezeigt, dass in höheren Konzentrationen die Keimrate höher ist und sich signifikant von der niedrigsten Konzentration unterscheidet. Bei Citrat, Malat, Succinat, Protocatechusäure und Zimtsäure ist dies der umgekehrte Fall. Hier liegen die Keimraten der höher konzentrierten Lösungen signifikant unter jenen der niedrig konzentrierten. Tryptophan und Salicylsäure weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen auf.

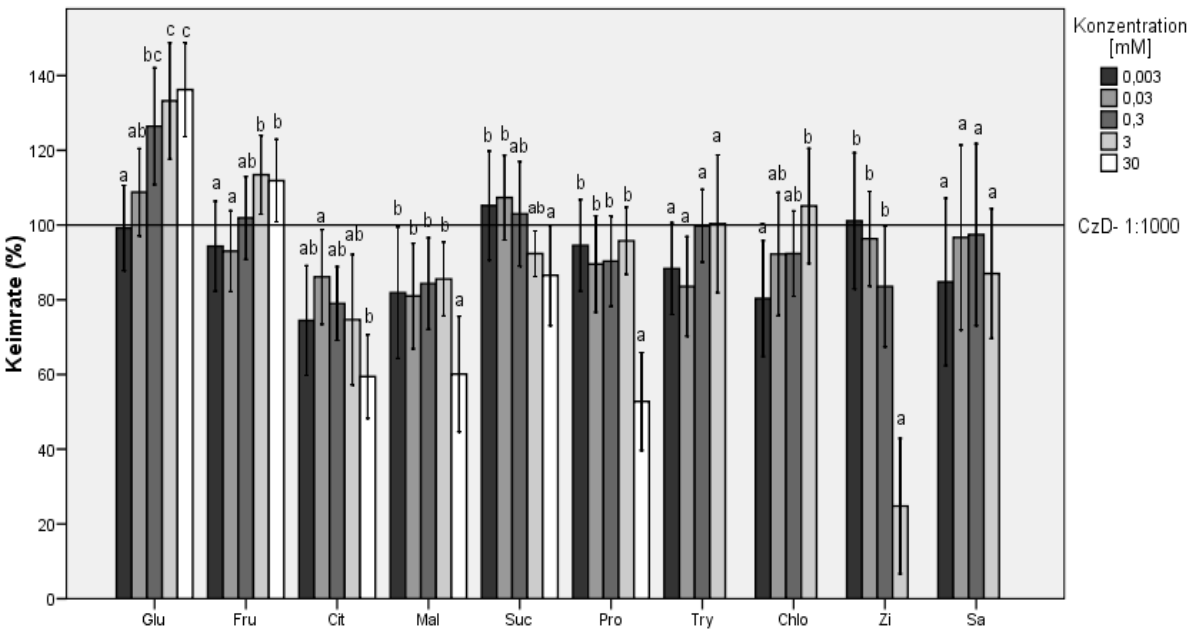

Abbildung 18: Keimrate (%) von Fol 007 in unterschiedlichen Konzentration von Glucose (Glu) ($F = 12,777$; $p < 0,05$), Fructose (Fru) ($F = 6,636$; $p < 0,05$), Citrat (Cit) ($F = 4,759$; $p < 0,05$), Malat (Mal) ($F = 4,970$; $p < 0,05$), Succinat (Suc) ($F = 4,827$; $p < 0,05$), Protocatechusäure (Pro) ($F = 20,335$; $p < 0,05$), Tryptophan (Try) ($F = 3,313$; $p < 0,05$), Chlorogensäure (Chlo) ($F = 4,192$; $p < 0,05$), Zimtsäure (Zi) ($F = 41,308$; $p < 0,05$) und Salicylsäure (Sa) ($F = 0,761$; $p > 0,05$) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (100%) (Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen wurden innerhalb der Komponenten bewertet, d. h. die Buchstaben beziehen sich immer auf die Konzentrationen innerhalb einer Komponente.)

4.2 Bestimmung der Myzelentwicklung

In diesem Versuch wurde die Wirkung von verschiedenen Tomatenwurzelexsudat-Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Myzelentwicklung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol 007) untersucht. Als Standard diente das Czapek-Dox-Nährmedium ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000).

4.2.1 Wirkung der Nährlösungen auf die Myzelentwicklung

In Abbildung 19 ist die Wirkung der Nährlösung Czapek-Dox mit Zucker und des Standards auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden dargestellt. Es zeigt sich, dass die optische Dichte im CzD+ im Mittel um etwa 0,2 OD höher ist als im Standard und bei etwa 0,53 OD liegt.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den OD-Werten der Nährlösungen ($F = 138,240$; $p < 0,05$). Es wurde ein Ranking der Daten durchgeführt.

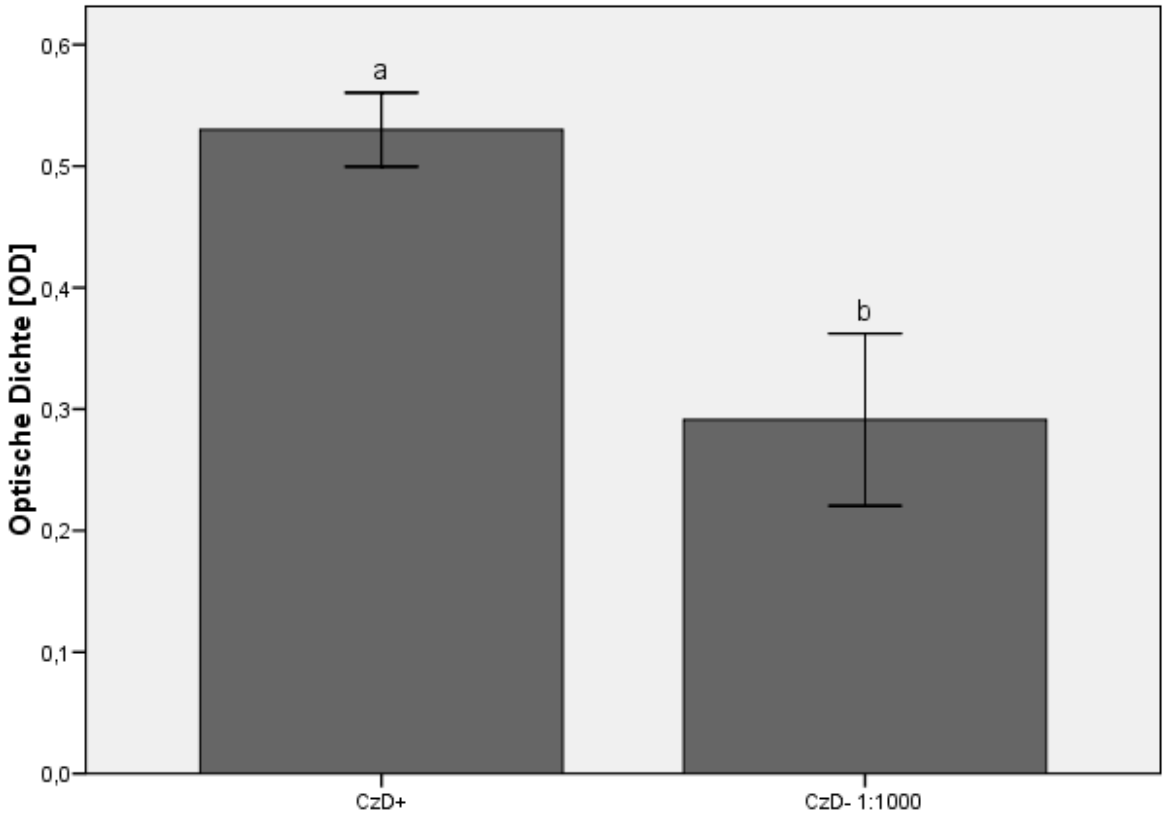

Abbildung 19: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Nährlösung Czapek-Dox mit Zucker (CzD+) und im Standard Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 138,240$; $p < 0,05$).

Abbildung 20 zeigt die Myzelentwicklung in der nährstoffreichsten und -ärmsten Lösung. Während das mittlere Myzelwachstum im Czapek-Dox mit Zucker bei 0,53 OD liegt, erreicht jenes im Acetatpuffer nur 0,26 OD.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der Nährlösungen ($F = 138,240$; $p < 0,05$). Es wurde ein Ranking der Daten durchgeführt.

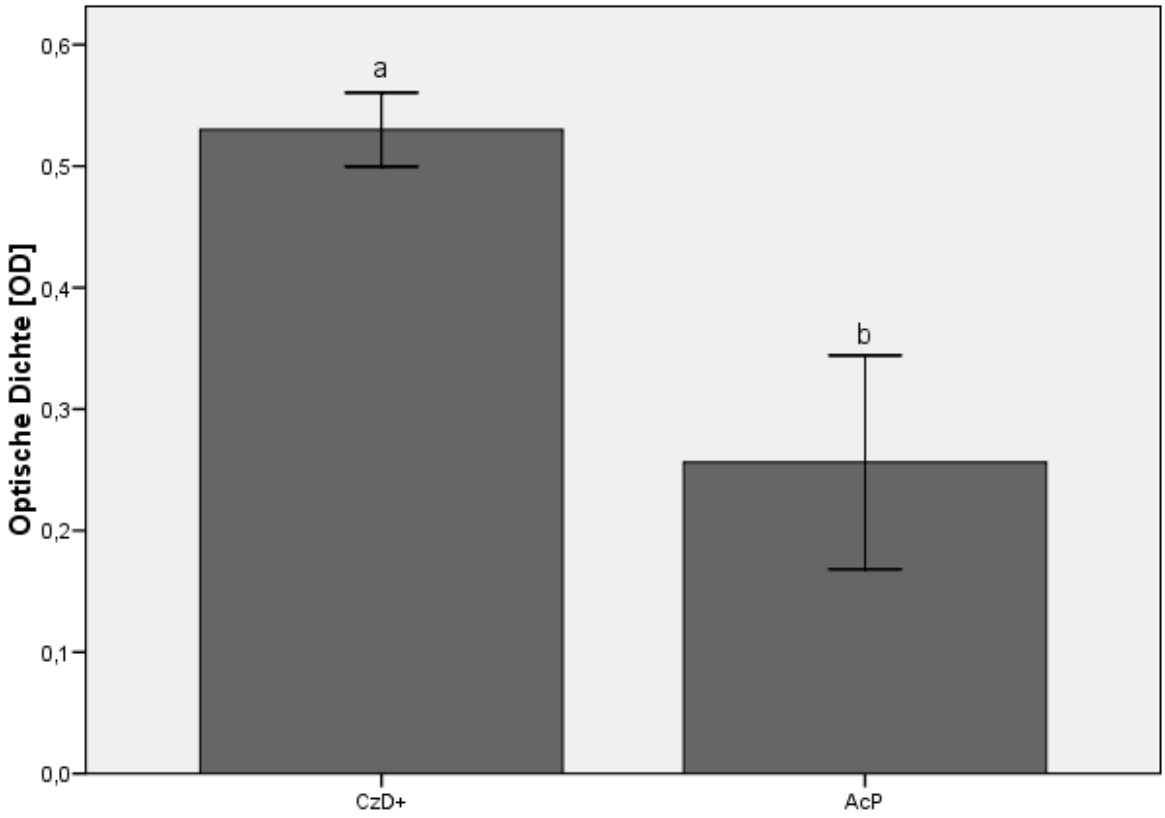

Abbildung 20: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Nährlösung Czapek-Dox mit Zucker (CzD+) und im Acetatpuffer (AcP) ($F = 138,240$; $p < 0,05$).

4.2.2 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 30 mM auf die Myzelentwicklung

Abbildung 21 zeigt die Wirkung von Glucose, Fructose, Citrat, Malat, Succinat und Protocatechusäure in der Konzentration 30 mM auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden im Vergleich zum Standard an.

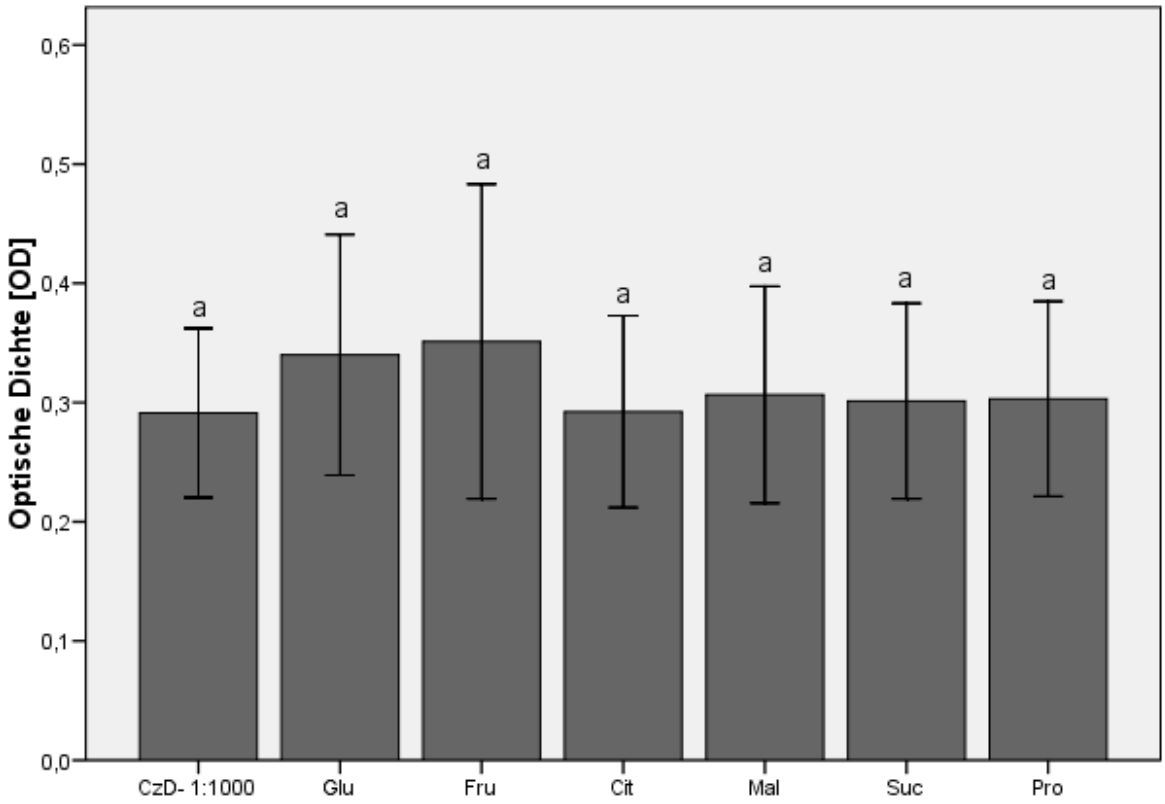

Abbildung 21: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 0,809$; $p > 0,05$).

Aus Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass die Mittelwerte der optischen Dichte aller Medien zwischen 0,29 OD und 0,35 OD liegen und die OD-Werte im Allgemeinen stark schwanken.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der unterschiedlichen Komponenten ($F = 0{,}809$; $p > 0{,}05$). Es wurde eine Wurzel-Transformation der Daten durchgeführt.

In Abbildung 22 ist die Myzelentwicklung im zeitlichen Verlauf in den Medien Glucose, Fructose, Citrat, Malat, Succinat und Protocatechusäure der Konzentration 30 mM im Vergleich zum Standard dargestellt.

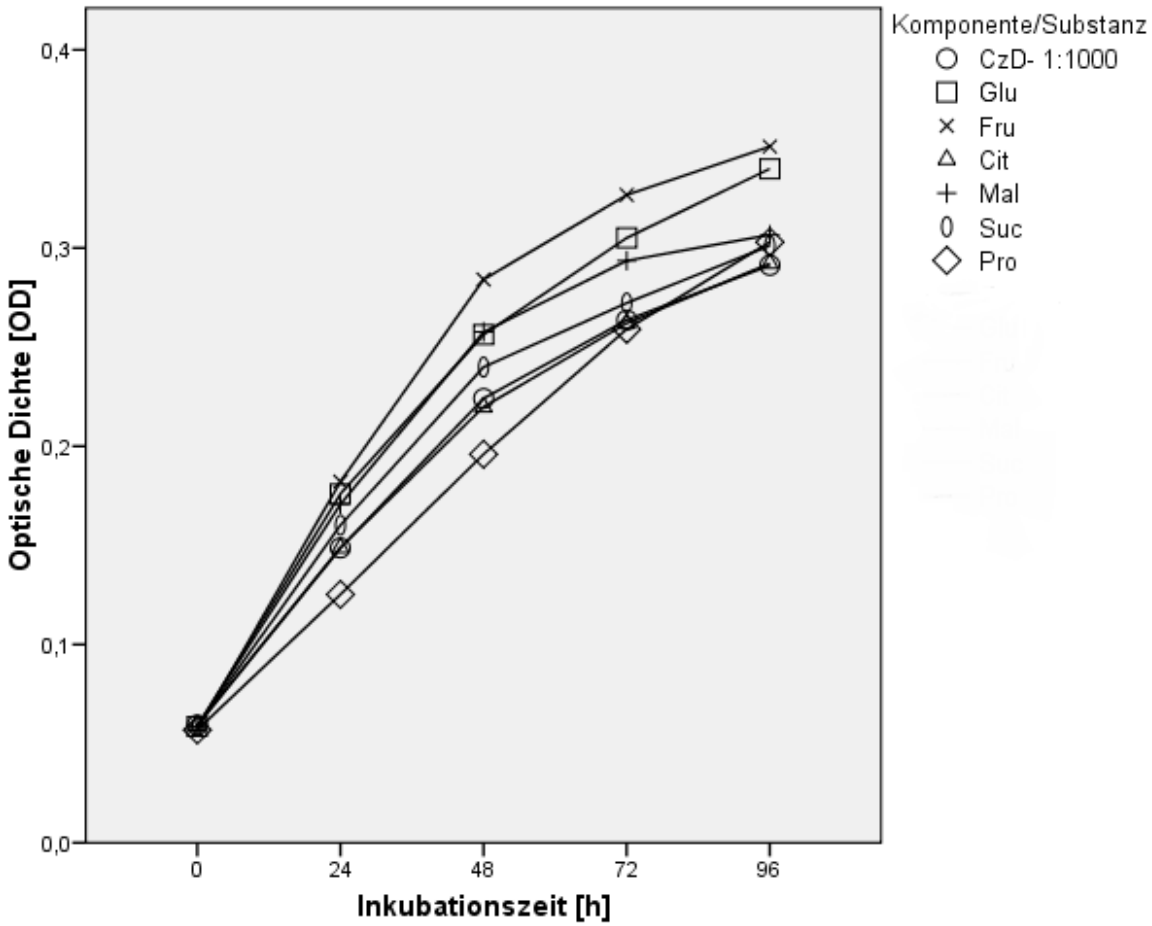

Abbildung 22: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt in AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: $F = 0{,}809$; $p > 0{,}05$).

Abbildung 22 zeigt, dass sich das Myzel innerhalb der ersten 48 Stunden im Mittel von etwa 0,05 OD auf 0,2 OD bzw. 0,3 OD stark entwickelt. Danach verlangsamt sich das Myzelwachstum. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten festgestellt werden.

4.2.3 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 3 mM auf die Myzelentwicklung

In Abbildung 23 ist die Wirkung aller 10 Komponenten in der Konzentration 3 mM auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden im Vergleich zum Standard dargestellt. Die Komponente Tryptophan wurde aufgrund der Inhomogenität der Varianzen von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Bei den Komponenten Chlorogensäure und Protocatechusäure kam es während der Versuchsdurchführung zu ungewollten Verfärbungen. Während sich das Chlorogensäure-Medium bereits nach 48 Stunden hellgelb zu verfärben begann und nach 96 Stunden eine dunkelgelbe Farbe aufwies, kam es bei der Protocatechusäure erst nach 72 Stunden zu einer schwachen Rosafärbung. Diese Verfärbungen, welche zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, müssen bei der Bewertung der optischen Dichte Messungen berücksichtigt werden.

Abbildung 23 zeigt, dass die Zimtsäure im Mittel die niedrigste optische Dichte mit 0,2 OD aufweist. Die OD-Mittelwerte der restlichen Komponenten liegen zwischen 0,3 OD und 0,4 OD. Wie in Abbildung 21 weisen auch hier die OD-Werte starke Schwankungen auf.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der unterschiedlichen Medien ($F = 5{,}103$; $p < 0{,}01$). Es wurde eine Logarithmus-Transformation der Daten durchgeführt. Das Myzelwachstum in der Zimtsäure unterscheidet sich signifikant von jenem in der Glucose, Fructose, Chlorogensäure und dem Standard. Die restlichen Komponenten weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

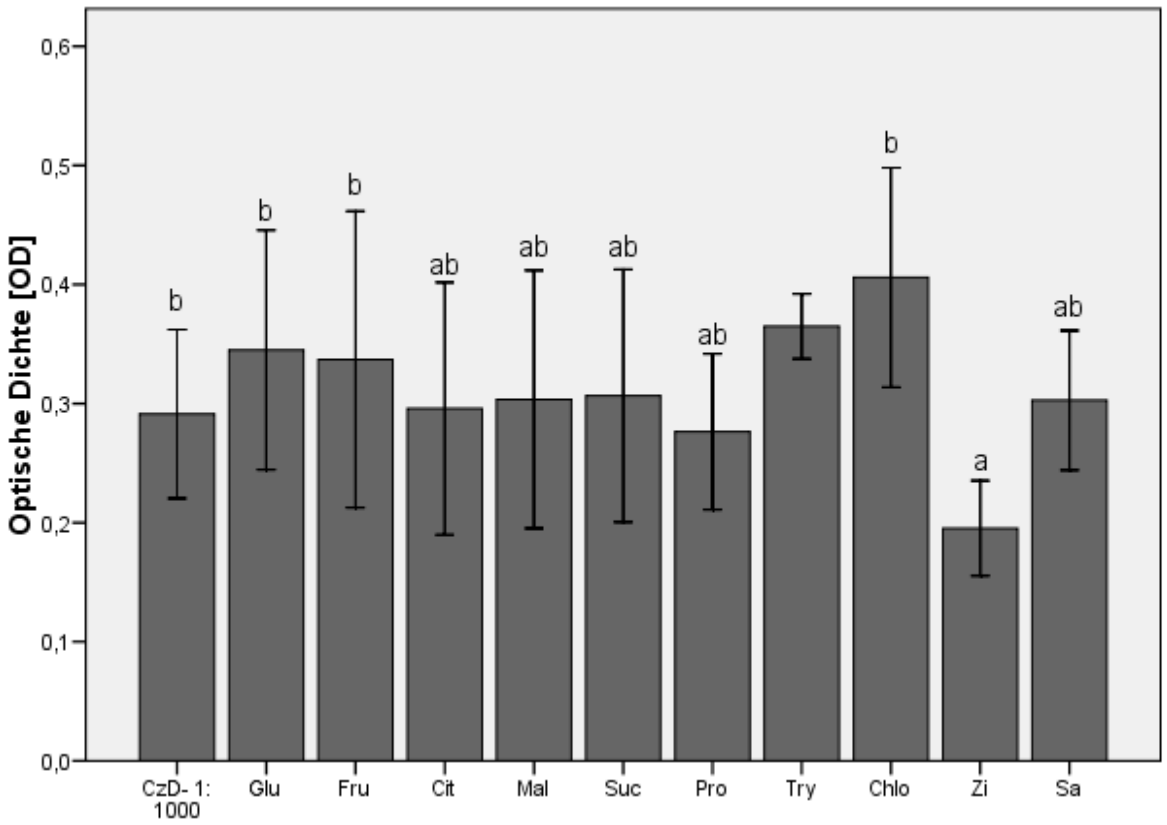

Abbildung 23: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 5{,}103$; $p < 0{,}01$; exkl. Tryptophan).

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die Myzelentwicklung in der Zimtsäure in den ersten 24 Stunden nur sehr langsam vorangeht, danach stark zunimmt und gegen Ende nur mehr geringfügig ansteigt. Das Myzelwachstum der restlichen Komponenten ist jenem der Zimtsäure von Beginn an weit voraus. Nach 48 Stunden ($F = 9{,}647$; $p < 0{,}01$), 72 Stunden ($F = 5{,}555$; $p < 0{,}01$) und 96 Stunden ($F = 5{,}103$; $p < 0{,}01$) unterscheidet sich die optische Dichte in der Zimtsäure signifikant von den restlichen OD-Werten.

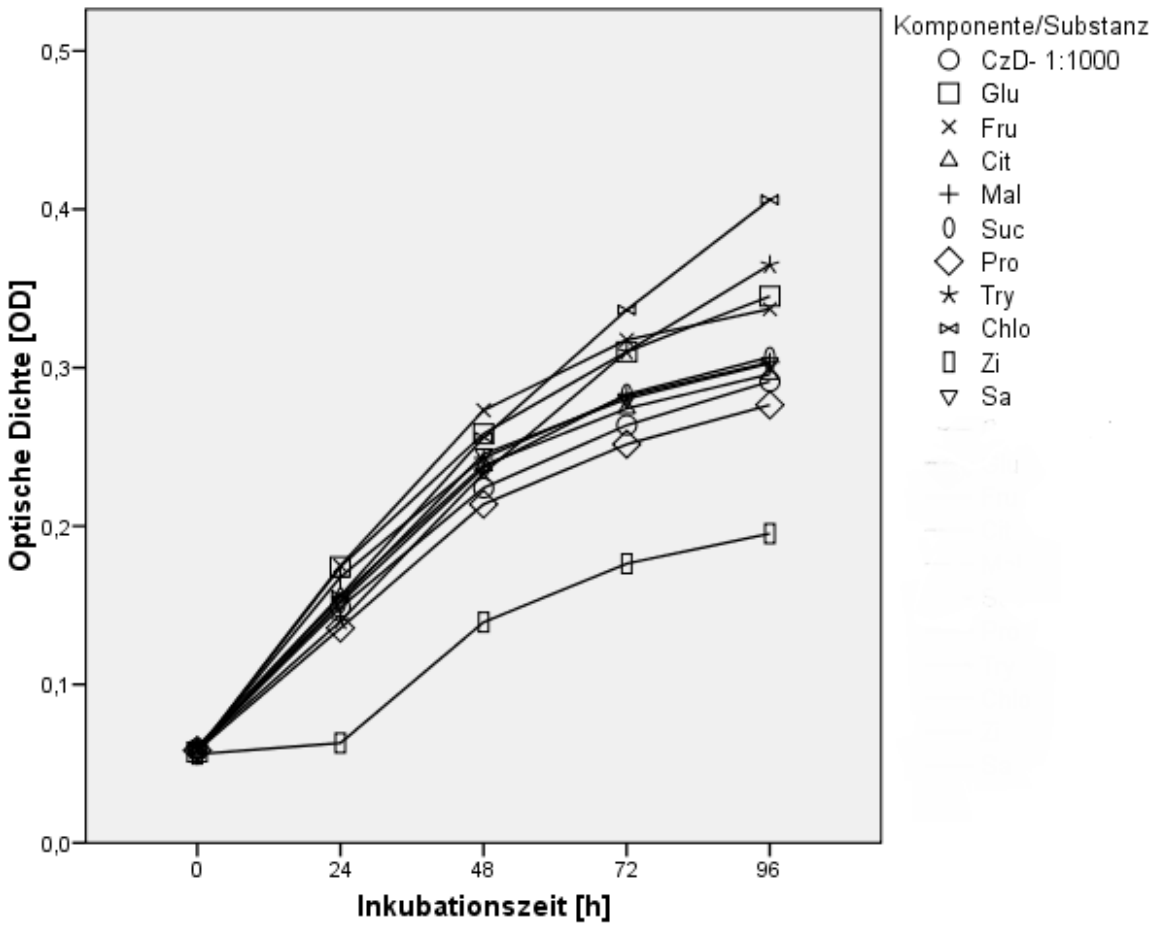

Abbildung 24: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 48 h: $F = 9{,}647$; $p < 0{,}01$; exkl. Tryptophan; nach 72 h: $F = 5{,}555$; $p < 0{,}01$; exkl. Tryptophan; nach 96 h: $F = 5{,}103$; $p < 0{,}01$; exkl. Tryptophan).

4.2.4 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Myzelentwicklung

In Abbildung 25 ist die Wirkung aller 10 Komponenten in der Konzentration 0,3 mM auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden im Vergleich zum Standard dargestellt. Die Komponente

Tryptophan wurden aufgrund der Inhomogenität der Varianzen von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Bei den Komponenten Chlorogensäure und Protocatechusäure kam es während der Versuchsdurchführung zu ungewollten Verfärbungen. Die Chlorogensäure wies nach 96 Stunden eine hellgelbe Farbe und die Protocatechusäure eine helle Rosafärbung auf. Diese Verfärbungen, welche zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, müssen bei der Bewertung der optischen Dichte Messungen berücksichtigt werden.

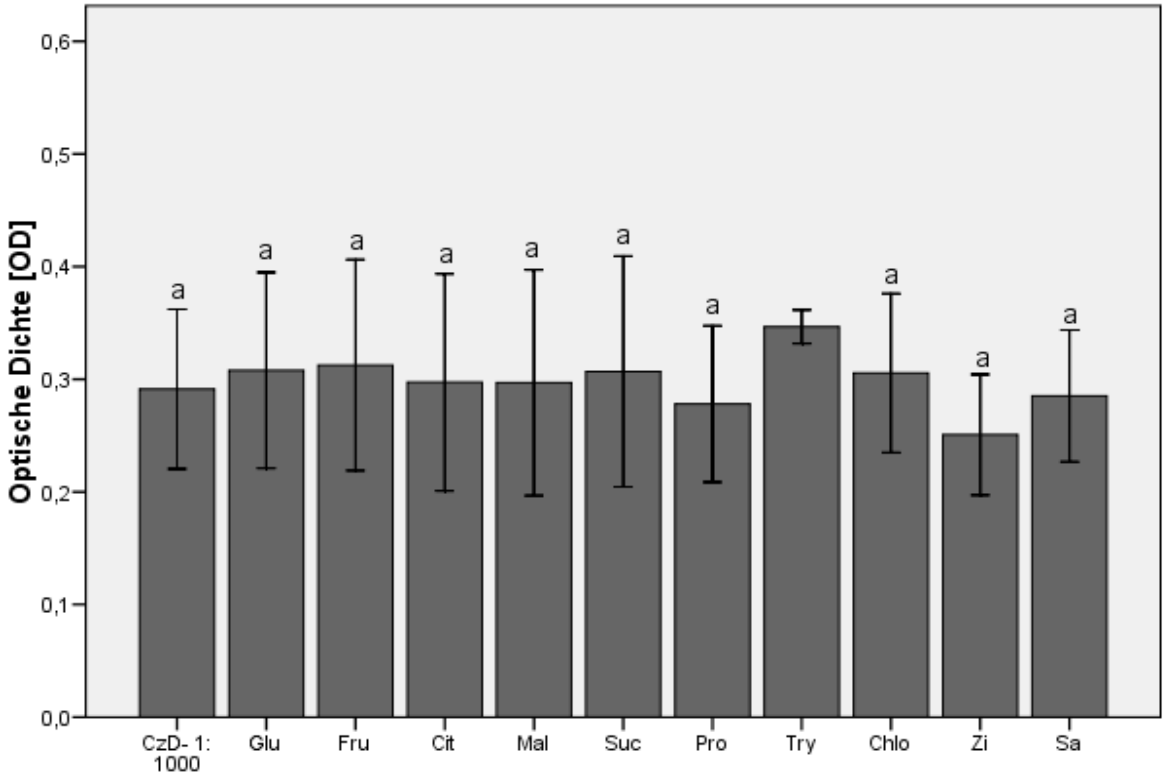

Abbildung 25: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 0,610$; $p > 0,05$; exkl. Tryptophan).

In Abbildung 25 liegen die OD-Mittelwerte in der Zimtsäure am niedrigsten bei 0,25 OD und im Tryptophan am höchsten bei 0,35 OD. Die OD-Werte schwanken im Allgemeinen stark.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der unterschiedlichen Medien (F = 0,610; p > 0,05). Es wurde eine Logarithmus-Transformation der Daten durchgeführt.

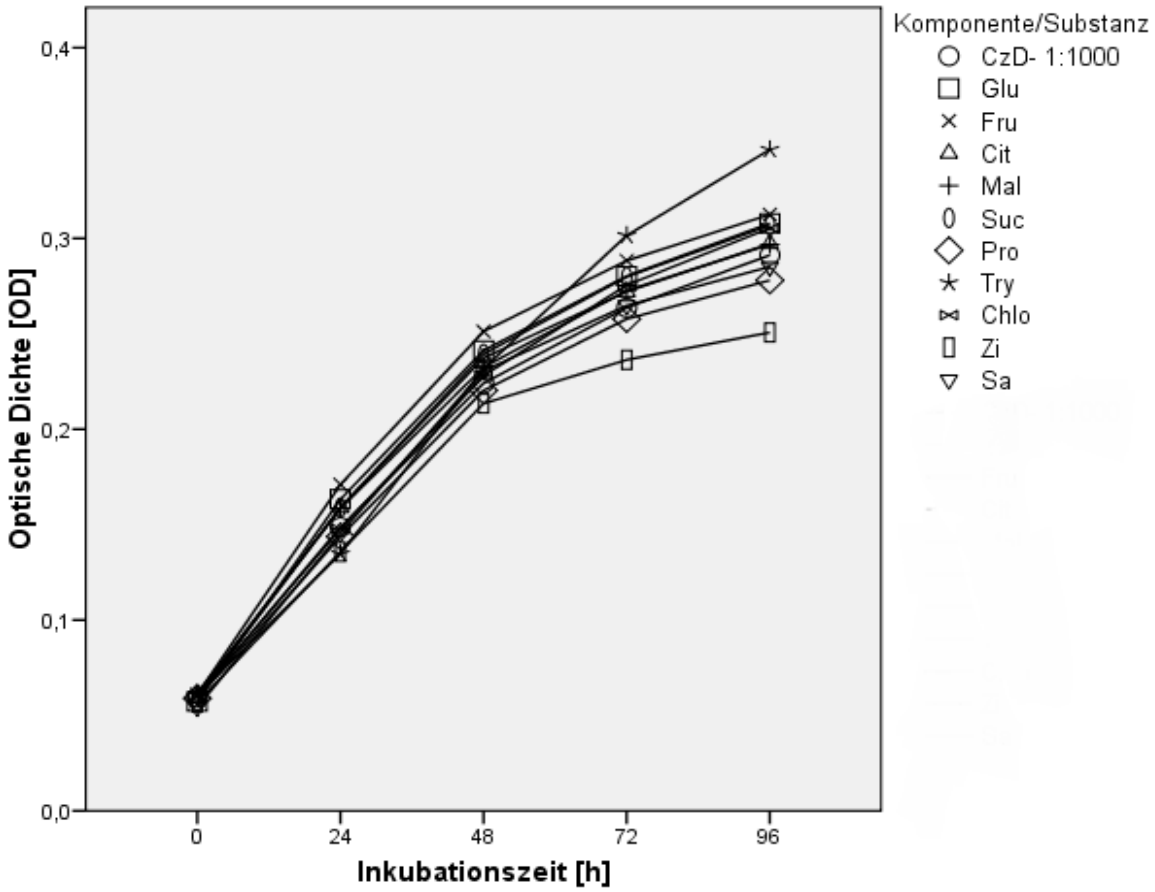

Abbildung 26: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,610; p > 0,05; exkl. Tryptophan).

Abbildung 26 zeigt, dass sich das Myzel innerhalb der ersten 48 Stunden im Mittel von etwa 0,05 OD auf 0,2 OD bzw. 0,25 OD stark entwickelt. Danach verlangsamt sich das Myzelwachstum. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten festgestellt werden.

4.2.5 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Myzelentwicklung

Abbildung 27 zeigt die Wirkung aller 10 Komponenten in der Konzentration 0,03 mM auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden im Vergleich zum Standard an.

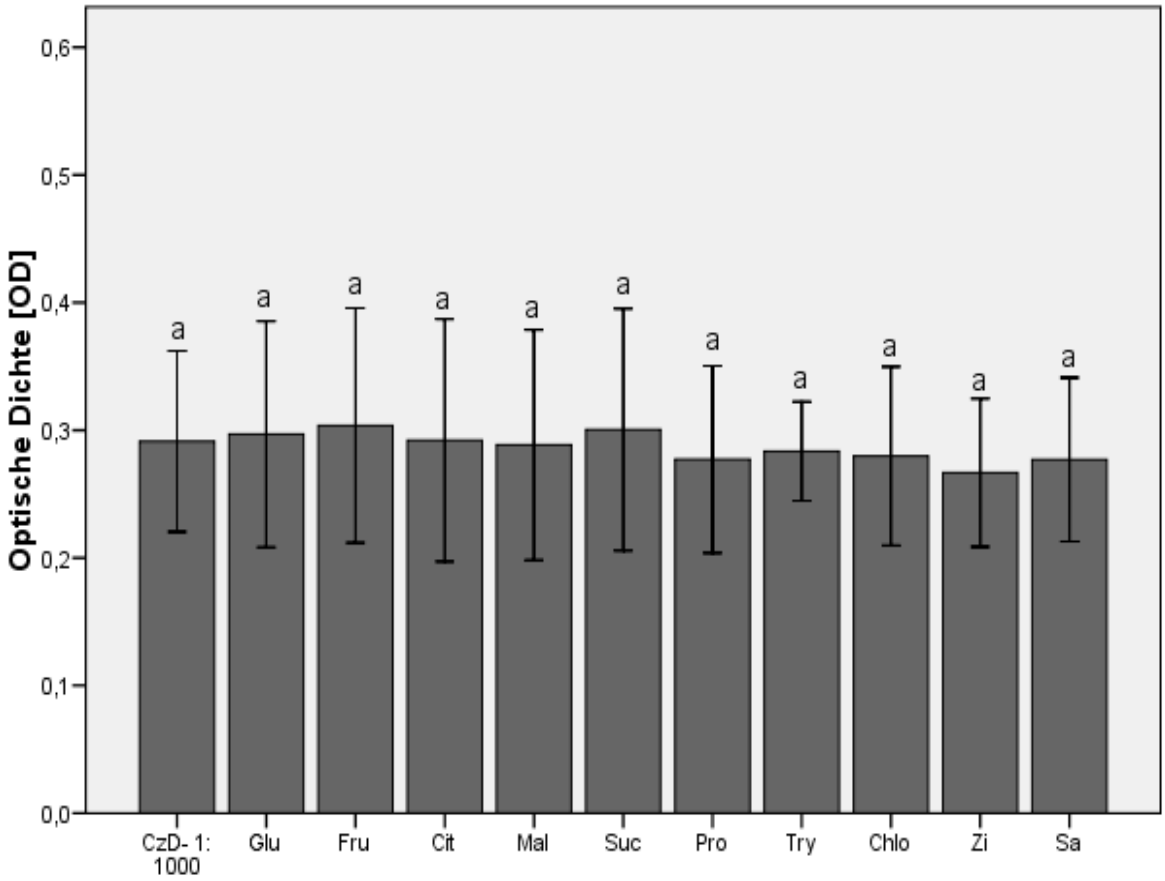

Abbildung 27: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 0,215$; $p > 0,05$).

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass sich die OD-Mittelwerte des Standards und der 10 Komponenten nur geringfügig unterscheiden. Sie bewegen sich zwischen 0,27 OD und 0,3 OD und unterliegen starken Schwankungen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der unterschiedlichen Medien ($F = 0,215$; $p > 0,05$). Es wurde eine Logarithmus-Transformation der Daten durchgeführt.

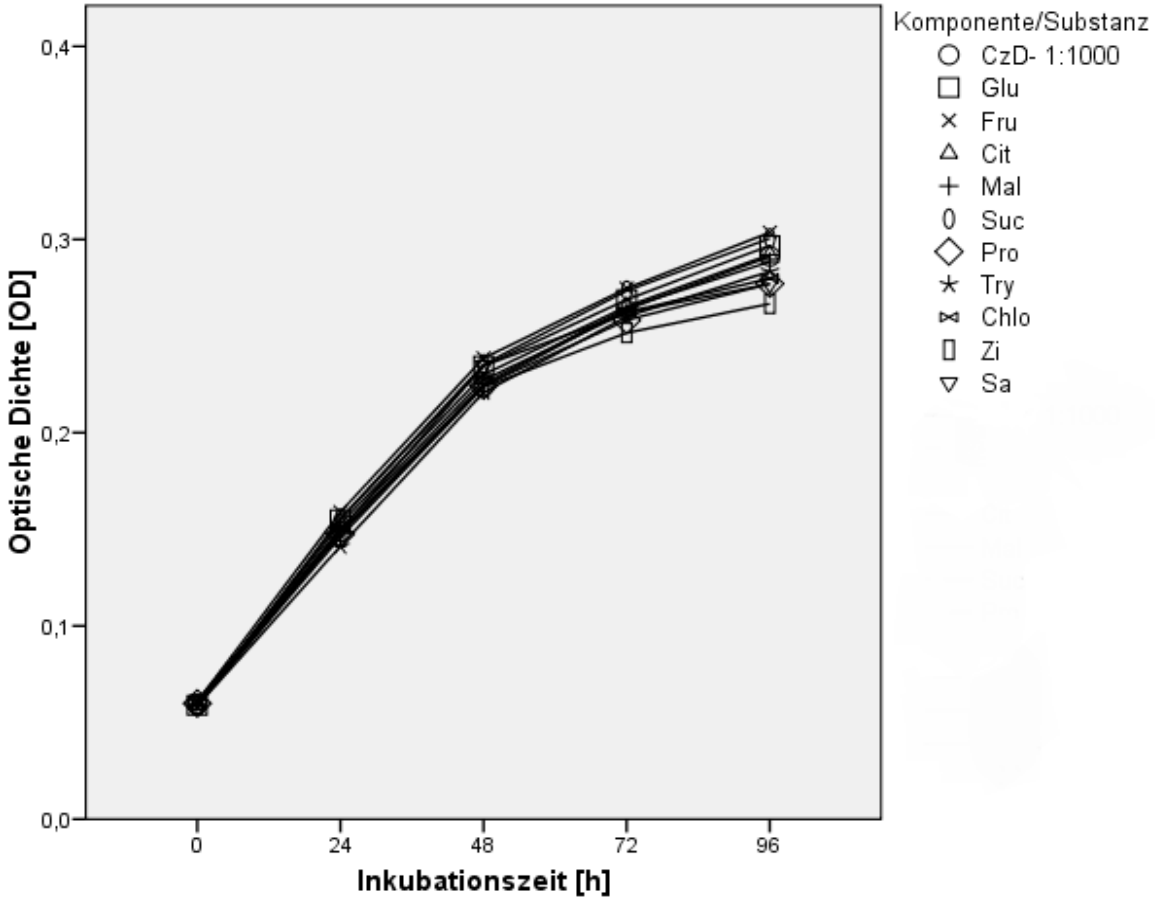

Abbildung 28: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: $F = 0,215$; $p > 0,05$).

Wie in Abbildung 26 zeigt auch Abbildung 28, dass sich das Myzel innerhalb der ersten 48 Stunden im Mittel von etwa 0,05 OD auf 0,2 OD bzw. 0,25 OD stark entwickelt und sich danach im Wachstum verlangsamt. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten festgestellt werden.

4.2.6 Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Myzelentwicklung

Abbildung 29 zeigt die Wirkung aller 10 Komponenten in der Konzentration 0,003 mM auf die Myzelentwicklung nach 96 Stunden im Vergleich zum Standard an.

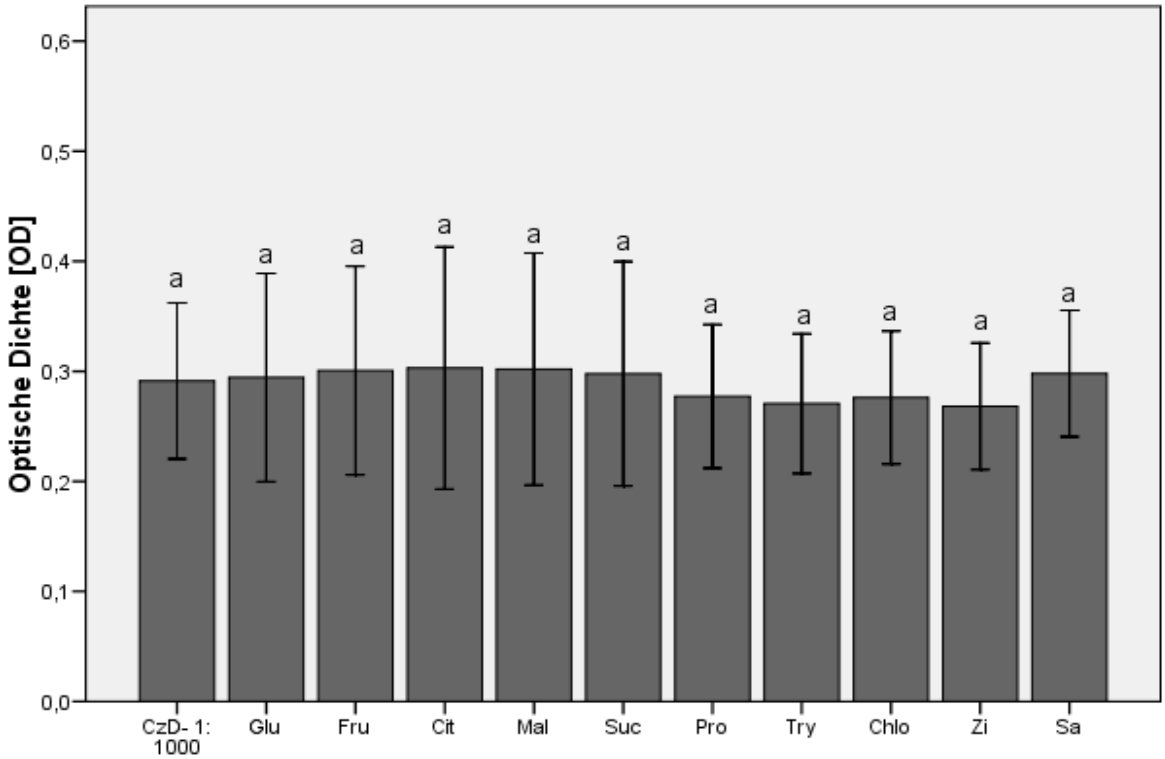

Abbildung 29: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h ($F = 0,241$; $p > 0,05$).

Wie in Abbildung 27 ist auch in Abbildung 29 ist festzustellen, dass sich die OD-Mittelwerte des Standards und der 10 Komponenten nur geringfügig unterscheiden, sich zwischen 0,27 OD und 0,3 OD bewegen und starken Schwankungen unterliegen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den OD-Werten der unterschiedlichen Medien (F = 0,241; p > 0,05). Es wurde eine Logarithmus-Transformation der Daten durchgeführt.

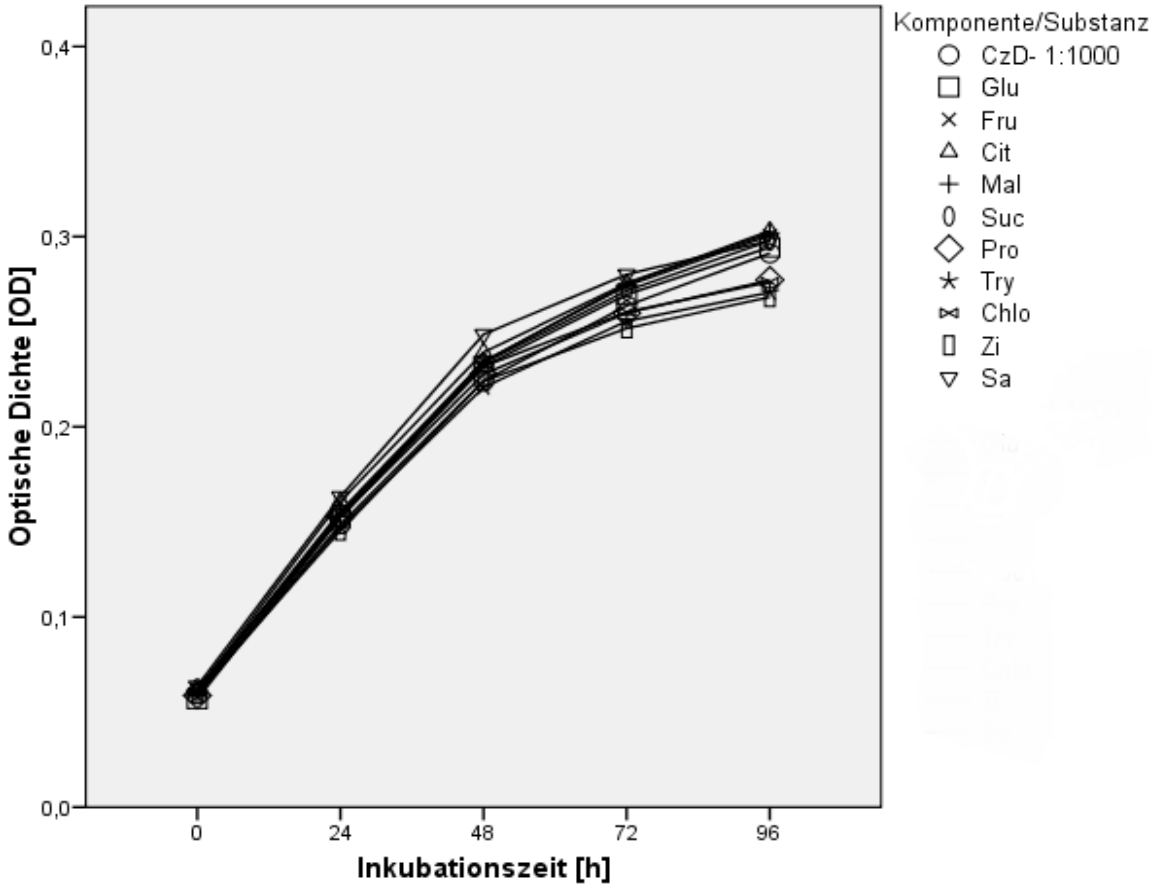

Abbildung 30: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,241; p > 0,05).

Abbildung 30 ist mit den Abbildungen 26 und 28 vergleichbar.

4.2.7 Wirkung unterschiedlich konzentrierter Wurzelexsudatkomponenten auf die Myzelentwicklung

Abbildung 31 zeigt die Wirkung aller 10 getesteten Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Myzelentwicklung.

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse wurde die Wirkung der Komponenten in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Myzelentwicklung untersucht und mittels Tukey-Post-Hoc-Test wurden signifikante Unterschiede dargestellt. Die bei der 30 mM konzentrierten Chlorogensäure aufgetretenen Verfärbungen müssen berücksichtigt werden.

Bei Tryptophan und Chlorogensäure hat sich gezeigt, dass sich höhere Konzentrationen stimulierend auf die Myzelentwicklung auswirken und sich signifikant von der niedrigsten Konzentration unterscheiden. Bei Zimtsäure ist dies der umgekehrte Fall. Hier führen höhere Konzentrationen zu einer signifikanten Erniedrigung des Myzelwachstums. Die restlichen Komponenten weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen auf.

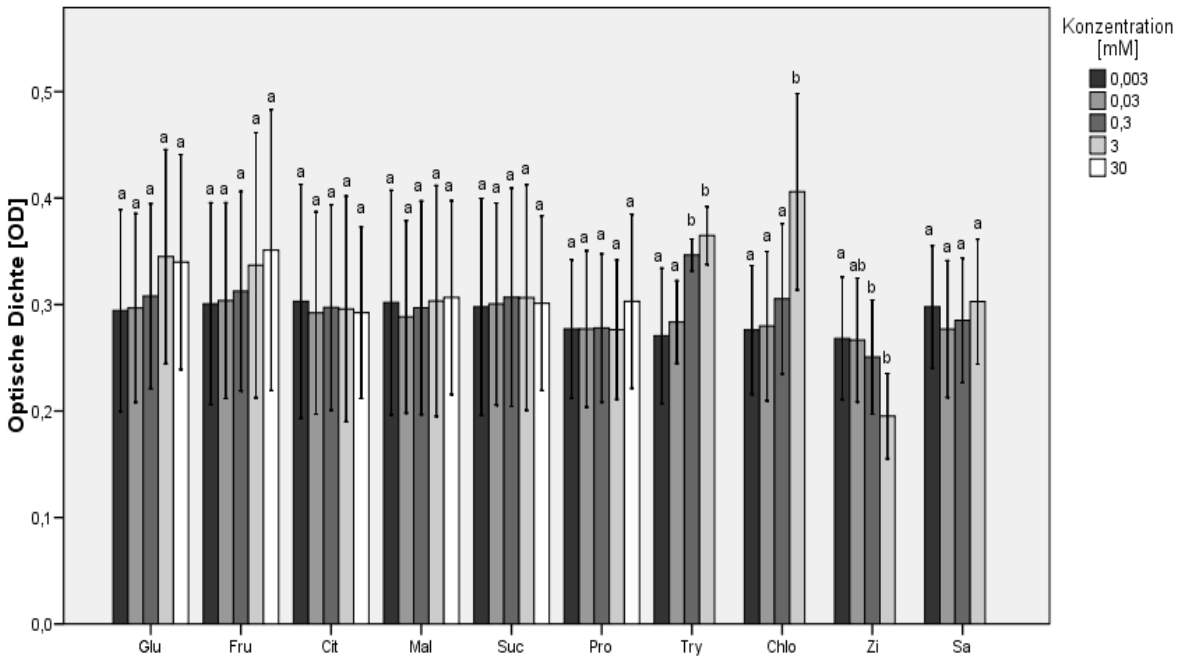

Abbildung 31: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose (Glu) ($F = 0{,}777$; $p > 0{,}05$), Fructose (Fru) ($F = 0{,}495$; $p > 0{,}05$), Citrat (Cit) ($F = 0{,}025$; $p > 0{,}05$), Malat (Mal) ($F = 0{,}061$; $p > 0{,}05$), Succinat (Suc) ($F = 0{,}020$; $p > 0{,}05$), Protocatechusäure (Pro) ($F = 0{,}315$; $p > 0{,}05$), Tryptophan (Try) ($F = 25{,}535$; $p < 0{,}05$), Chlorogensäure (Chlo) ($F = 8{,}068$; $p < 0{,}05$), Zimtsäure (Zi) ($F = 5{,}043$; $p < 0{,}05$) und Salicylsäure (Sa) ($F = 0{,}465$; $p > 0{,}05$) (Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen wurden innerhalb der Komponenten bewertet, d. h. die Buchstaben beziehen sich immer auf die Konzentrationen innerhalb einer Komponente.)

5. Diskussion

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* zählt zu den wirtschaftlich bedeutendsten bodenbürtigen Pathogenen an der Tomate, dessen Keimung und Wachstum durch die Tomatenwurzelausscheidungen beeinflusst werden (Steinberg et al., 1999a, Steinkellner et al., 2005). Da noch sehr wenig über die Signalwirkung der Exsudatinhaltsstoffe gegenüber Pathogenen in der Rhizosphäre bekannt ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte unterschiedlicher Wurzelexsudatkomponenten der Tomate auf die Mikrokonidienkeimung und die Myzelentwicklung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* untersucht.

Steinkellner et al. (2005) konnten zeigen, dass Mikrokonidien von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) und f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*) unter der Einwirkung von Wurzelexsudaten der Tomate eine erhöhte Keimrate aufweisen. Welche Stoffe im Speziellen stimulierend beziehungsweise hemmend auf die Keimung wirkten, wurde jedoch nicht untersucht. Folglich war ein Schwerpunkt dieser Arbeit die spezifische Wirkung von Einzelkomponenten der Tomatenwurzelexsudate auf die Mikrokonidien von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* zu testen. Zusätzlich wurde die Keimung in den Nährlösungen ermittelt.

Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Keimrate im CzD+ deutlich höher war als in den restlichen Lösungen. Die Keimrate im Acetatpuffer (AcP) hingegen war im Mittel um 40 % niedriger als im Standard. Auch visuell konnten deutliche Unterschiede bezüglich Keimschlauchlänge festgestellt werden, wobei die Keimschläuche im CzD+ am längsten ausgebildet waren. Diese Unterschiede dürften auf den unterschiedlichen Zuckergehalt der jeweiligen Lösungen zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass das Monosaccharid Glucose in den höheren Konzentrationen (30 mM, 3 mM und 0,3 mM) zu einer signifikanten Erhöhung der Keimrate führt. Das Monosaccharid Fructose hingegen nicht. Die hohe Mikrokonidienkeimung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in den höher konzentrierten Glucosemedien stimmt mit Untersuchungen von Steinberg et al. (1999b) und Kamilova et al. (2006b) überein, die zeigten konnten, dass Monosaccharide eine bedeutende Nahrungsquelle für Rhizosphärenorganismen darstellen. Steinberg et al. (1999b) untersuchten die Effekte unterschiedlicher Nahrungsquellen auf das Wachstum von

Fusarium oxysporum Stämmen. Dabei stellten sie fest, dass Glucose die Biomasseproduktion der Pilzstämme am stärksten stimuliert und somit die am besten nutzbare Kohlenstoffquelle für ihre Entwicklung darstellt. Alle untersuchten *Fusarium oxysporum* Stämme konnten unter der Einwirkung von Glucose (5 g/l) sehr schnell eine große Menge an Myzel ausbilden. Kamilova et al. (2006b) untersuchten inwiefern das Tomatenpathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*) und der Biokontrollorganismus *Pseudomonas fluorescens* WCS365 die Zuckerzusammensetzung in Tomatenwurzelexsudaten beeinflussen. Sie stellten fest, dass der Zuckergehalt steriler Tomatenwurzelexsudate in Anwesenheit von *Forl* und WCS365 um mehr als 75 % sinkt und der Fructose- und der Glucosegehalt zur Gänze verbraucht werden. Weiters wurde das Wachstum in Glucose- und Fructosemedien (0,3 mM) getestet. Es zeigte sich sowohl eine Erhöhung der Gesamtzahl der Bakterien als auch der *Forl*-Verbreitungseinheiten. Die von Kamilova et al. (2006b) beschriebene stimulierende Wirkung der Fructose auf *Forl*, konnte in den vorliegenden Untersuchungen mit *Fol* jedoch nicht bestätigt werden.

Laut Lugtenberg et al. (1999) zählen Glucose, Fructose, Maltose und Xylose zu den am häufigsten vorkommenden Saccharide der Exsudate der Tomatensamen, der Tomatenkeimlinge und der Tomatenwurzeln und sind somit in allen Wachstumsstadien der Tomatenpflanze vertreten. Sie machten deutlich, dass der Zuckergehalt und die Zuckerzusammensetzung vom Wachstumsstadium der Tomate beeinflusst werden. In den Samenexsudaten sind Glucose und Maltose und in Exsudaten 4 Tage alter Keimlinge Glucose und Fructose am stärksten vorhanden. Zwei Wochen später waren Glucose, Xylose und Fructose die dominierenden Zucker in den Wurzelexsudaten. Weiters war die Gesamtzuckermenge in Wurzelexsudaten um das Siebeneinhalbfache höher als in Exsudaten der Tomatensamen. Ähnliche Ergebnisse ergaben Tomatenexsudatuntersuchungen von Kamilova et al. (2006a).

Lugtenberg et al. (1999) untersuchten, ob der aus Exsudaten stammende Zucker als wesentliche Nährstoffquelle für Pseudomonas-Biokontrollstämme dient, um die Tomatenrhizosphäre zu besiedeln. Ihre Untersuchungen ergaben, dass die Rhizospärenkompetenz nicht mit der Fähigkeit die Exsudathauptzucker als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen korreliert. Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass andere Verbindungen, wie organische Säuren und Polymere als Energiequellen herangezogen werden.

Laut Lugtenberg et al. (1999) und Kamilova et al. (2006a) ist der Gehalt an organischen Säuren in Tomatenwurzelexsudaten deutlich höher als der Gesamtzuckergehalt. Citrat, Succinat und Malat machen hierbei den größten Anteil aus (Kamilova et al., 2006a). Außerdem konnten Kamilova et al. (2006b) in Untersuchungen zeigen, dass der Gehalt von Succinat in Anwesenheit von *Forl* in Tomatenwurzelexsudaten um das Zwei- bis Dreifache erhöht, der Citrat-Anteil jedoch um ein Drittel verringert war.

Inwiefern organische Säuren auf die Mikrokonidienkeimung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* wirken, wurde in der vorliegenden Arbeit getestet. Die Tests ergaben, dass die höchste Konzentrationsstufe der organischen Säuren Citrat und Malat (30 mM) eine signifikante Erniedrigung der Keimung zufolge haben und somit antifungal wirksam sind.
Die aus den Versuchen dieser Arbeit resultierenden antimikrobiellen Effekte der organischen Säuren, Citrat und Malat, stimmen mit einer Reihe von Studien überein. Schon 1950 berichtete Murdock, dass einige aus Tomatensaft isolierte Mikroorganismen durch die Zitronensäure inhibiert werden. Auch die Schimmelpilze *Aspergillus parasiticus* und *A. versicolor* wurden durch die Einwirkung von Zitronensäure in ihrem Wachstum gehemmt (Reiss, 1976). Eine weitere Studie zeigt die inhibierende Wirkung der Zitronen- und Apfelsäure auf die Bakterien *Listeria monocytogenes*, *Salmonella gaminara* und *Escherichia coli* (Eswaranandam et al., 2004). Laut Barnen und Keenan (1970) ist die antimikrobielle Aktivität des Citrats auf die Fähigkeit, Metallchelate zu bilden zurückzuführen. Weiters verringern organische Säuren den pH-Wert, was die Wachstumsbedingungen von Mikroorganismen erschwert. Sie bewirken eine Senkung des pH-Werts innerhalb der mikrobiellen Zellen, welcher unter hohem Energieverlust für die Zelle wieder korrigiert werden muss, und eine Unterbrechung des Substrattransportes durch eine Veränderung der Zellmembranpermeabilität (Beuchat, 1998).

Das Succinatmedium hingegen hat in der vorliegenden Arbeit die Keimrate weder in hoch- noch in schwachkonzentrierter Form positiv bzw. negativ beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Wu et al. (2011) zum Einfluss von Succinat (0, 200, 400, 800, 1600 mg/l) auf das Wachstum, die Konidienbildung, die Konidienkeimung und die Pathogenität von *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*), den Erreger der *Fusarium*-Welke der Wassermelone. Wu et al. (2011) stellten fest, dass Succinat das Wachstum und die Keimrate von *Fon* reduzieren und den Pilz in seiner Pathogenität schwächt.

Auch die Aminosäure Tryptophan wirkt sich weder stimulierend noch reduzierend auf die Mikrokonidienkeimung von *Fol* aus. Andere Ergebnisse wurden bereits in früheren Studien erzielt, in welchen ebenfalls der Einfluss von Tryptophan auf Mikroorganismen getestet wurde. Barazani und Friedman (2000) untersuchten die Wirkung von Tryptophan unterschiedlicher Konzentration auf *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR) und stellten bei höheren Tryptophankonzentrationen (40-50 mM) eine Verringerung der Wachstumsrate einiger PGPR fest. Coll und Leal (1972) hingegen führten die starke Myzelbildung der Schimmelpilze *Aspergillus nidulans* und *Penicillium italicum* auf die Nutzung des Kohlenstoffgerüsts des L-Tryptophan als zusätzliche Energiequelle zurück.

Bei den phenolischen Verbindungen verhält es sich ganz unterschiedlich: Während die Protocatechusäure und die Zimtsäure die Keimrate in der höchsten Konzentration signifikant senken, konnten bei der Chlorogen- und Salicylsäure weder positive noch negative Effekte auf die Keimung festgestellt werden. Steinkellner et al. (2005) konnten zeigen, dass die Mikrokonidienkeimung von *Fol* und *Forl* höher war, wenn die Tomatenwurzelexsudate mit Polyvinylpolypyrrolidonen (PVPP) versetzt waren. Der Grund hierfür ist eine mögliche Bindung der phenolischen Verbindungen an das PVPP, wodurch deren Hemmwirkung auf die Mikrokonidienkeimung verloren geht. Diese durch Phenole verursachte hemmende Wirkung konnte teilweise auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass das Phenylpropan Zimtsäure (3 mM) die stärkste Hemmwirkung aufweist. Diese antifungale Wirkung spiegelt sich in einer Studie von Wu et al. (2008) wieder, welche die Effekte von Zimtsäure auf *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*) getestet haben. Es konnte ebenfalls eine starke Unterdrückung des Wachstums und eine massive Inhibition der Konidienkeimung und Sporulation festgestellt werden. Genauso wie in dieser Arbeit konnten Wu et al. eine Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition verzeichnen: Je höher die Zimtsäurekonzentration (0, 200, 400, 800, 1600 mg/l) war, desto höher fiel die Hemmwirkung aus. Weiters wurde jedoch eine Stimulierung der Produktion von Mykotoxin und hydrolytischen Enzymen beobachtet, was wiederum eine Förderung der Infektion bewirkt. Folglich existieren hier unterschiedliche Wirkungsmechanismen der Zimtsäure auf das Myzelwachstum und die Pathogenität von *Fon*. Wu et al. (2008) zufolge spielt die Zimtsäure als Signalstoff eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen. Ein möglicher Ansatzpunkt die Resistenz der

Wassermelone gegenüber *Fon* zu verstärken, wäre laut Wu et al. (2008) eine genetische Modifizierung des Zimtsäuregehaltes in der Pflanze. Untersuchungen von Fujii et al. (2002) haben ergeben, dass Zimtsäure bei einer Konzentration von 1 g/l eine Wachstumshemmung und eine Reduktion der Respiration von *Rhodotorula* hervorruft, ohne den Hefepilz abzutöten. Fujii et al. (2002) schlussfolgerten, dass Zimtsäure im Allgemeinen das Wachstum von Basidiomyceten unterdrückt. Anderen Berichten zufolge inhibiert Zimtsäure auch die Entwicklung von *Phytophthora parasitica* (Snook et al., 1992), *Pythium* sp. (Tawata et al., 1996) und dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* (Said et al., 2004).

Weiters ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit die antifungale Wirkung der Protocatechusäure zu erkennen. Das Protocatechusäuremedium mit der höchsten Konzentration (30 mM) reduzierte die Keimrate um beinahe die Hälfte. Rauha et al. (2000) testeten die Effekte der Protocatechusäure auf einige bedeutende Bakterien und auf die Pilzarten *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*. Zwar wirkte die Protocatechusäure geringfügig bakteriostatisch gegen *Micrococcus luteus* und *Pseudomonas aeruginosa*, jedoch konnte keine antifungale Wirkung festgestellt werden. Auch Curir et al. (2003) konnten in ihren Versuchen keinerlei Auswirkungen der Protocatechusäure auf *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ermitteln. Während die Ergebnisse von Rauha et al. (2000) und Curir et al. (2003) gegen antifungale Effekte der Protocatechusäure sprechen und von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abweichen, stimmen diese mit den Ergebnisse von Al-Mughrabi et al. (2001) überein, welche eine 70 %-ige Hemmung des Myzelwachstums von *Fusarium oxysporum* durch die Protocatechusäure zeigten.

In der Frucht der Tomatenpflanze stellt die Chlorogensäure die mengenmäßig am stärksten vertretene Hydroxyzimtsäure dar und ihr Gehalt steigt mit zunehmender Reife (Martinez-Valverde et al., 2002). Auch in Tomatenwurzeln wurde die Chlorogensäure als die phenolische Hauptkomponente identifiziert. Die Chlorogensäure zeigt laut Jay (2000) antibakterielle und antifungale Wirkung. Diese Wirkung konnte in den vorliegenden Versuchen nicht beobachtet werden. Hier bewirkte die Chlorogensäure keine Keimreduktion von *Fol*, jedoch war die Keimung im niedrig konzentrierten Chlorogensäuremedium (0,003 mM) niedriger als im hoch konzentrierten (3 mM). Die Chlorogensäure war in niedrig konzentrierter Form antifungal wirksamer als in hoch konzentrierter. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen somit nicht mit den nachfolgenden Studien überein, welche antifungale

Effekte der Chlorogensäure aufzeigen. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass die phenolischen Verbindungen Chlorogensäure und Ferulasäure *Fusarium oxysporum* und *Sclerotinia sclerotiorum* inhibieren (Lattanzio et al., 1995, zitiert in (Barkai-Golan, 2001)). Auch Sung und Lee (2010) beschrieben den antifungalen Effekt gegen humanpathogene Hefepilze. Die Hyphen von *Candida albicans* wurden in ihren Versuchen durch die Chlorogensäurebehandlung nicht nur gehemmt, sondern auch zerstört, indem sie der Membranpermeabilität schadet.

Genauso wie bei der Chlorogensäure konnten bei der Salicylsäure in der vorliegenden Arbeit keine antifungalen Effekte auf *Fol* festgestellt werden. Jedoch besteht die Vermutung, dass die Salicylsäure das Pathogen *Fol* indirekt beeinflusst, indem sie die Pflanzenabwehr stärkt: Laut Surplus et al. (1998) handelt es sich bei der Salicylsäure um eine bedeutende phenolische Komponente, welche die Pflanzenrestistenz gegenüber Pathogenen und anderen Stressfaktoren induziert. Ohja und Chatterjee (2012) untersuchten die Wirkung der Salicylsäure und des Biokontrollorganismus *Trichoderma harzianum* auf mit *Fol* infizierte Tomatenpflanzen. Es stellte sich heraus, dass in den Blättern infizierter Pflanzen, welche mit Salicylsäure (0 mM bis 3 mM) behandelt waren, der Gehalt phenolischer Substanzen und die Polyphenoloxidase- und Peroxidaseaktivität erhöht waren. Diese Tatsache spielt eine entscheidende Rolle in der Resistenz und Abwehr gegenüber *Fol*. Auch Mandal et al. (2009) kamen zu dem Ergebnis, dass die Salicylsäure eine Resistenz in Tomaten induziert, sie konnten jedoch keinen signifikanten Effekt der Salicylsäure auf das Myzelwachstum von *Fol* feststellen. Keine der getesteten Konzentrationen (100 µM, 200 µM und 300 µM) führten zu einer Wachstumsreduktion. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

Zusätzlich wurde innerhalb der Komponenten untersucht, inwiefern die unterschiedlichen Konzentrationen die Keimrate beeinflussen. Hier stellte sich heraus, dass die Keimung bei Glucose, Fructose und Chlorogensäure in höheren Konzentrationen signifikant höher liegt als in niedrigen Konzentrationen. Bei Citrat, Malat, Succinat, Protocatechusäure und Zimtsäure ist dies der umgekehrte Fall. Tryptophan und Salicylsäure wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Wirkung der Wurzelexsudatkomponenten auf das Myzelwachstum von *Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici untersucht. Schon Steinberg et al. (1999a) stellten fest, dass sich sowohl das Myzelwachstum als auch die Myzelverzweigung von verschiedenen *Fusarium oxysporum* Stämmen in der Nähe von Tomatenwurzeln stark erhöhen. Steinberg et al. (1999a) untersuchten nur die Wirkung von Glucose und Casaminosäuren auf die Myzelentwicklung. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen die Effekte zehn bedeutender Einzelkomponenten der Tomatenwurzelexsudate auf das Myzelwachstum von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* überprüft, basierend auf der von Broekaert et al. (1990) und Ludwig und Boller (1990) entwickelten Trübungsmessung mittels photometrischem Mikroplatten-Lesegerät. Sowohl Broekaert et al. (1990) als auch Ludwig und Boller (1990) konnten anhand ihrer Untersuchungen zeigen, dass Rückschlüsse von der gemessenen Absorption auf das Myzelwachstum geschlossen werden können. Außerdem stellten sie fest, dass weder die überimpften Sporendichten noch die unterschiedlichen Medienvolumina in den Wells das Ergebnis beeinflussen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten deutlich, dass das Myzelwachstum im CzD+ die höchsten Werte annahm, was wiederum auf den erhöhten Zuckergehalt der Nährlösung zurückzuführen ist. Die Myzelentwicklung in den restlichen Nährlösungen (CzD+ 1:1000, CzD-, CzD- 1:1000, AcP) unterschied sich nicht signifikant von jener in den Stammlösungen unterschiedlicher Konzentration, mit Ausnahme der 3 mM konzentrierten Zimtsäurestammlösung. Dies deckt sich mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Wu et al. (2008), welche inhibierende Effekte der Zimtsäure auf das Wachstum von *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*) zeigten. Die restlichen getesteten Komponenten bewirkten weder eine Stimulierung noch eine Inhibierung des *Fol*-Myzelwachstums. Die positive Wirkung der Glucose auf das Myzelwachstum von *Fol* blieb aus und stimmt somit nicht mit der bereits erwähnten Studie von Steinberg et al. (1999b) überein. Jedoch deckt sich dieses Ergebnis mit einer weiteren von Steinberg et al. (1999a) durchgeführten Studie, in der ebenfalls die Effekte von Glucose unterschiedlicher Konzentration auf die Myzelentwicklung von *Fusarium oxysporum* Stämmen untersucht wurden und keine Myzelwachstumsstimulierung festgestellt werden konnte. Das Ergebnis, dass die Fructose keine Erhöhung des Myzelwachstums bewirkt, widerspricht der bereits angeführten Studie von Kamilova et al. (2006b), in der sehr wohl eine Stimulierung von *Forl* durch die Fructose beschrieben wurde. Weiters konnten keine inhibierenden Effekte der getesteten organischen Säuren Citrat, Malat und Succinat auf das *Fol*-Myzelwachstum festgestellt

werden, die in den oben genannten Studien erwähnt wurden. Auch die von Coll und Leal (1972) aufgezeigte Myzelwachstumsstimulierung einiger Schimmelpilze durch Tryptophan konnte in der vorliegenden Arbeit an *Fol* nicht beobachtet werden. Überdies stimmt auch die bereits genannte Studie von Al-Mughrabi et al. (2001), welche eine Myzelwachstumshemmung von *Fusarium oxysporum* durch die Protocatechusäure beschreibt, nicht mit den vorliegenden Ergebnissen überein. Auch die oftmals erforschte antifungale Wirkung der Chlorogensäure, bestätigte sich in der vorliegenden Studie nicht. Das Ergebnis, dass die Salicylsäure weder stimulierend noch inhibierend auf die Myzelentwicklung wirkt, entspricht der bereits erwähnten Studie von Mandal et al. (2009).

Weiters konnte festgestellt werden, dass beim Großteil der Komponenten, abgesehen von Tryptophan, Chlorogensäure und Zimtsäure, die Konzentration keinen Einfluss auf die Myzelentwicklung hat. Während das Myzelwachstum in der hoch konzentrierten Zimtsäure im Gegensatz zu den niedrigen Konzentrationen signifikant erniedrigt war, war dies bei Tryptophan und Chlorogensäure der umgekehrte Fall. Die Konzentrationsabhängigkeit des Myzelwachstums bei der Zimt- und der Chlorogensäure deckt sich mit jener, welche bei der Sporenkeimung beobachtet worden ist.

Aus den Verlaufsdiagrammen ist ein relativ einheitlicher Verlauf der gemessenen Absorptionswerte zu entnehmen. Zu Beginn lagen die Messwerte in allen Medien unterschiedlicher Konzentration zwischen 0,05 OD und 0,1 OD. In den ersten 48 Stunden war ein starker Anstieg des Myzelwachstums zu verzeichnen. Lediglich bei der Zimtsäure entwickelte sich das Myzel anfangs sehr langsam. Von da an konnte in beinahe allen Medien nur noch eine leichte Zunahme der Myzelentwicklung festgestellt werden.

In den vorliegenden Versuchen wurde eine Mikrokonidiensuspension in 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert und das Myzelwachstum anhand der Absorption ermittelt. Die gebildete Myzeltrockenmasse wurde allerdings nicht gemessen. Für die Tests wurde eine Sporendichte von 1×10^7 Sporen/ml verwendet, jedes Well enthielt etwa 35000 Sporen und die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 600 nm. Broekaert et al. (1990) zufolge reicht ein Sporensuspensionsvolumen von mindestens 75 µl pro Well oder mindestens 1000 Sporen pro Well aus, um ein zuverlässiges Testergebnis zu erhalten. Weiters empfiehlt Broekaert et al. (1990) eine Wellenlänge zwischen 492 nm und 595 nm, da hier ein fast linearer Zusammenhang zwischen Absorptionsrate und der gebildeten Myzeltrockenmasse

besteht. Im Gegensatz dazu haben Ludwig und Boller (1990) in ihren Versuchen die Messungen bei einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt.

Im Zuge der Versuchsdurchführung kam es bei der 3 mM und der 0,3 mM konzentrierten Chlorogensäure und Protocatechusäure zu Verfärbungen. Während sich das Chlorogensäure-Medium zuerst hellgelb und später dunkelgelb verfärbte, wies die Protocatechusäure eine schwache Rosafärbung auf. Die veränderte Probenfarbe bewirkte eine Störung der Messung, welche sich in einer Erhöhung der Messwerte äußerte. Aus diesem Grund sind hier die Effekte auf die Myzelentwicklung schwer zu beurteilen.

Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine enzymatische Bräunungsreaktion, auch Phenoloxidasereaktion genannt, hervorgerufen durch Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Die Diphenole, Chlorogensäure und Protocatechusäure können durch die Polyphenoloxidase zu reaktiven o-Chinonen umgesetzt werden, welche spontan zu dunkel gefärbten Produkten polymerisieren (Hänsel und Sticher, 2010). Die Polyphenoloxidase (PPO) ist ein weitverbreitetes Enzym, welches sowohl in Tieren, als auch in Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommt. Bis heute ist die Funktion von PPO noch nicht eindeutig geklärt. In Pflanzen wurde eine positive Korrelation zwischen dem PPO-Level und der Resistenz gegenüber Pathogenen und Herbivoren beobachtet. In Pilzen unterscheidet sich PPO hinsichtlich ihrer Funktion, jedoch gibt es Beweise, welche darauf hindeuten, dass sie hier ebenfalls eine Schutzfunktion gegenüber Pathogenen einnimmt. Weiters spielt PPO in Pilzen eine entscheidende Rolle in der Melaninbildung, was wiederum zur pilzlichen Pathogenität beiträgt (Mayer, 2006).

Die Schlussfolgerung aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist, dass die unterschiedlichen Komponenten der Tomatenwurzelexsudate die Keimung und das Myzelwachstum von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* nicht in gleicher Weise beeinflussen. Glucose bewirkte zwar eine Keimstimulierung der *Fol*-Mikrokonidien, jedoch kam es zu keinem vermehrten Myzelwachstum. Auch die hemmende Wirkung des Citrats auf die Keimung, konnte in den Myzelwachstumsversuchen nicht festgestellt werden. Lediglich beim Zimtsäuremedium konnte sowohl eine Reduktion der Keimrate als auch des Myzelwachstums verzeichnet werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine Keimstimulierung bzw. -hemmung nicht gleichzeitig eine Myzelwachstumsstimulierung bzw. -hemmung bewirken muss. Weiters ist anzumerken, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten fehlenden Effekte auf die Mikrokonidien, eine Wirkung auf andere *Fol*-

Sporenformen, wie Makrokonidien bzw. Chlamydosporen oder eine indirekte Wirkung durch die Mobilisierung der Pflanzenabwehrkräfte nicht ausschließen. Außerdem wäre es sinnvoll die genauen molekularen Wirkungsmechanismen der einzelnen Komponenten auf *Fol* zu untersuchen.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich im Labor unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Komponenten wurden einzeln, bei einem genau definierten pH-Wert und einer bestimmten Temperatur getestet. Dies bedeutet, dass *Fol* weder durch abiotische noch durch biotische Faktoren in seiner Entwicklung beeinflusst worden ist. Es wirkte ausschließlich eine Komponente auf die *Fol*-Mikrokonidien.

Derartige Bedingungen herrschen im Ökosystem Boden nicht vor. In der Rhizosphäre liegen die einzelnen Substanzen nebeneinander vor, sind uneinheitlich verteilt und meist nicht in gelöster Form vorhanden. Folglich kann es zu additiven, antagonistischen und synergistischen Effekten zwischen den Substanzen kommen. Weiters ist mit einer Konkurrenzwirkung durch andere in der Rhizosphäre lebende Mikroorganismen zu rechnen. Deshalb wäre es in weiteren Versuchen wichtig zu überprüfen, inwiefern die jeweiligen Wurzelexsudatkomponenten in kombinierter Form auf *Fol* wirken und welche Effekte jene auf *Fol* in Glashaus- bzw. Freilandkulturen zeigen.

Überdies wäre es sinnvoll zu testen, ob Komponenten, welche in der vorliegenden Arbeit antifungale Wirkung zeigten, zur Bekämpfung von *Fol* in Form von Bodenapplikationen eingesetzt werden könnten. Auf diesem Gebiet bedarf es noch weiterer Forschung.

6. Zusammenfassung

Unter Wurzelexsudation versteht man die Abgabe einer Vielzahl organischer Substanzen der Pflanzenwurzel in den unmittelbar benachbarten Bodenbereich. Sie wird qualitativ und quantitativ von physiologischen Bedingungen, wie der Art, dem Entwicklungsstadium und der Produktionsrate der Pflanzen, von Umweltfaktoren, wie Licht, Temperatur, Wasserpotential, Durchlüftung und Nährstoffangebot des Bodens sowie mikrobiellen Aktivitäten beeinflusst. Zwischen Pflanzen und ihren Rhizosphäreorganismen existieren überaus komplexe Kommunikationsmechanismen, welche heute nur ansatzweise verstanden werden. Man weiß, dass hier Wurzelexsudate eine entscheidende Rolle spielen.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde getestet, inwiefern die Tomatenwurzelexsudatkomponenten Glucose, Fructose, Citrat, Malat, Succinat, Tryptophan, Protocatechu-, Chlorogen-, Salicyl- und Zimtsäure in unterschiedlichen Konzentrationen (30 mM, 3 mM, 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM) die Mikrokonidienkeimung und das Myzelwachstum von Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Fol 007) beeinflussen.

Die Ergebnisse der Sporenkeimtests zeigten deutlich, dass Glucose (30 mM, 3 mM und 0,3 mM) eine signifikante Erhöhung der Keimrate zufolge hatte. Citrat (30 mM) und Malat (30 mM) sowie Protocatechusäure (30 mM) und Zimtsäure (3 mM) hingegen haben die Keimung signifikant erniedrigt. Die restlichen Komponenten (Fructose, Succinat, Tryptophan, Chlorogensäure und Salicylsäure) hatten keinen Einfluss auf die Keimrate.

Die Myzelwachstumsversuche ergaben, dass nur die Zimtsäure (3 mM) die Myzelentwicklung von Fol inhibiert.

Zusätzlich konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Keimrate bzw. des Myzelwachstums bei einigen Komponenten festgestellt werden. Die Keimrate bei Glucose, Fructose und Chlorogensäure lag in höheren Konzentrationen signifikant höher als in niedrigen Konzentrationen. Bei Citrat, Malat, Succinat, Protocatechusäure und Zimtsäure war dies der umgekehrte Fall. Das Myzelwachstum war in der hoch konzentrierten Zimtsäure im Gegensatz zu den niedrigen Konzentrationen signifikant erniedrigt, bei Tryptophan und Chlorogensäure wirkten sich hohe Konzentrationen eher stimulierend aus.

7. Abstract

Root exudates play a key role in root-microbe interactions in the rhizosphere. In the present study the effect of different compounds in tomato root exudates on the germination and fungal growth of the soil-borne tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) was studied. Out of 10 compounds only glucose (30 mM, 3 mM and 0,3 mM) induced a significant increase of microconidia germination of *Fol*. However, the compounds citrate (30 mM), malate (30 mM), protocatechuic acid (30 mM) and cinnamic acid (3 mM) resulted in a significant inhibition of microconidia germination of *Fol*. The other compounds (fructose, succinic acid, tryptophan, chlorogenic acid and salicylic acid) tested were inactive when applied at five or four concentrations. In our study only cinnamic acid (3 mM) affected fungal growth adversely. Additionally a concentration dependency of the germination and fungal growth of *Fol* was observed. The microconidia germination in glucose, fructose and chlorogenic acid was significantly higher at high concentrations than at lower ones, whereas exactly the opposite was the case in citrate, malate, succinic acid, protocatechuic acid and cinnamic acid. While the mycelial growth was more inhibited in low-concentrate than in high-concentrate cinnamic acid, tryprophan and chlorogenic acid were more stimulating at high concentration.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: A-B: Makrokonidien; C-D: Mikrokonidien; E-F: Mikrokonidien *in situ*.; A-D: Maßstab = 25 µm; E-F: Maßstab = 50 µm (Leslie und Summerell, 2006) 9

Abbildung 2: Entwicklung der *Fusarium*-Welke an der Tomate verursacht durch *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agrios, 1997) 10

Abbildung 3: Strukturformel der Monosaccharide D-Glucose (a) und D-Fructose (b) (Willmes, 2001) 14

Abbildung 4: Stukturformel der Carbonsäuren Citronensäure (a), Apfelsäure (b) und Bernsteinsäure (c) (Willmes, 2001) 15

Abbildung 5: Citronensäurezyklus als Drehscheibe des Stoffwechsels (Doenecke et al., 2005) 16

Abbildung 6: Strukturformel der Aminosäure Tryptophan mit Indol-Ringsystem (Willmes, 2001) 16

Abbildung 7: Strukturformel der Chlorogensäure (a), der Protocatechusäure (b), der Salicylsäure (c) und der Zimtsäure (d) (Willmes, 2001) 18

Abbildung 8: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* auf Czapek-Dox-Agar 20

Abbildung 9: Ansatz einer 96-Well-Platte für die Sporenkeimtestung am Beispiel Glucose und Fructose 25

Abbildung 10: 96-Well-Platte für die Sporenkeimtestung 25

Abbildung 11: Ansatz einer 96-Well-Platte für die Bestimmung der Myzelentwicklung am Beispiel Glucose 26

Abbildung 12: Keimrate (%) von Fol 007 in den Nährlösungen Czapek-Dox mit Zucker (CzD+), Czapek-Dox ohne Zucker (CzD-) und im Acetatpuffer (AcP) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 471,315$; $p < 0,01$). 28

Abbildung 13: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) ($F = 58,558$; $p < 0,05$). 29

Abbildung 14: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure

(Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (F = 36,908; p < 0,01; exkl. Succinat und Protocatechusäure). 30

Abbildung 15: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (F = 7,911; p < 0,01). 32

Abbildung 16: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (F = 3,916; p < 0,01). 33

Abbildung 17: Keimrate (%) von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (F = 4,039; p < 0,01). 34

Abbildung 18: Keimrate (%) von Fol 007 in unterschiedlichen Konzentration von Glucose (Glu) (F = 12,777; p < 0,05), Fructose (Fru) (F = 6,636; p < 0,05), Citrat (Cit) (F = 4,759; p < 0,05), Malat (Mal) (F = 4,970; p < 0,05), Succinat (Suc) (F = 4,827; p < 0,05), Protocatechusäure (Pro) (F = 20,335; p < 0,05), Tryptophan (Try) (F = 3,313; p < 0,05), Chlorogensäure (Chlo) (F = 4,192; p < 0,05), Zimtsäure (Zi) (F = 41,308; p < 0,05) und Salicylsäure (Sa) (F = 0,761; p > 0,05) in Bezug zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) (100%) (Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen wurden innerhalb der Komponenten bewertet, d. h. die Buchstaben beziehen sich immer auf die Konzentrationen innerhalb einer Komponente.). 36

Abbildung 19: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Nährlösung Czapek-Dox mit Zucker (CzD+) und im Standard Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 138,240; p < 0,05). 37

Abbildung 20: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Nährlösung Czapek-Dox mit Zucker (CzD+) und im Acetatpuffer (AcP) (F = 138,240; p < 0,05). 38
Abbildung 21: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 0,809; p > 0,05). 39
Abbildung 22: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 30 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc) und Protocatechusäure (Pro) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt in AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,809; p > 0,05). 40
Abbildung 23: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 5,103; p < 0,01; exkl. Tryptophan). 42
Abbildung 24: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 48 h: F = 9,647; p < 0,01; exkl. Tryptophan; nach 72 h: F = 5,555; p < 0,01; exkl. Tryptophan; nach 96 h: F = 5,103; p < 0,01; exkl. Tryptophan). 43
Abbildung 25: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 0,610; p > 0,05; exkl. Tryptophan). 44
Abbildung 26: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,3 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt

mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,610; p > 0,05; exkl. Tryptophan). 45

Abbildung 27: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 0,215; p > 0,05). 46

Abbildung 28: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,03 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,215; p > 0,05). 47

Abbildung 29: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) nach 96 h (F = 0,241; p > 0,05). 48

Abbildung 30: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in der Konzentration 0,003 mM von Glucose (Glu), Fructose (Fru), Citrat (Cit), Malat (Mal), Succinat (Suc), Protocatechusäure (Pro), Tryptophan (Try), Chlorogensäure (Chlo), Zimtsäure (Zi) und Salicylsäure (Sa) im Vergleich zum Czapek-Dox ohne Zucker 1:1000 verdünnt mit AcP (CzD- 1:1000) im zeitlichen Verlauf (nach 96 h: F = 0,241; p > 0,05). 49

Abbildung 31: Optische Dichte [OD] von Fol 007 in unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose (Glu) (F = 0,777; p > 0,05), Fructose (Fru) (F = 0,495; p > 0,05), Citrat (Cit) (F = 0,025; p > 0,05), Malat (Mal) (F = 0,061; p > 0,05), Succinat (Suc) (F = 0,020; p > 0,05), Protocatechusäure (Pro) (F = 0,315; p > 0,05), Tryptophan (Try) (F = 25,535; p < 0,05), Chlorogensäure (Chlo) (F = 8,068; p < 0,05), Zimtsäure (Zi) (F = 5,043; p < 0,05) und Salicylsäure (Sa) (F = 0,465; p > 0,05) (Die Unterschiede zwischen den Konzentrationen wurden innerhalb der Komponenten bewertet, d. h. die Buchstaben beziehen sich immer auf die Konzentrationen innerhalb einer Komponente.) 51

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Czapek-Dox-Agar (Singelton et al., 1992) 21

Tabelle 2: Polare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten..... 22

Tabelle 3: Zusammensetzung des Acetatpuffer (AcP) (Mortimer, 2001)..... 22

Tabelle 4: Unpolare Wurzelexsudat-Einzelkomponenten 23

Tabelle 5: Konzentrationen der Einzelkomponentenstammlösungen 24

10. Literaturverzeichnis

AGRIOS, G. N. (1997): Plant pathology. 4. ed., San Diego, Calif. [u.a.]: Acad. Press.

AL-MUGHRABI, K. I. et al. (2001): Antifungal activity of olive cake extracts. Phytopathologia Mediterranea 40: 240-244.

AMBERGER, A. (1996): Pflanzenernährung, Ökologische und physiologische Grundlagen, Dynamik und Stoffwechsel der Nährelemente. 4., völlig neubearb. Aufl., Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.

BAIS, H. P. et al. (2006): The role of root exudates in rhizosphere interations with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology. Palo Alto, Annual Reviews.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. (2000): Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Journal of Chemical Ecology 26: 343-349.

BARKAI-GOLAN, R. (2001): Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control. 1st ed, Amsterdam: Elsevier.

BECKMAN, C. H. (1987): The nature of wilt diseases of plants. St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society.

BERTIN, C.; YANG, X. H.; WESTON, L. A. (2003): The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant and Soil 256: 67-83.

BEUCHAT, L. R. (1998): Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: an review. Food safety issues. Geneva, Switzerland: Food Safety Unit/World Health Organisation. 42.

BICKEL-SANDKÖTTER, S.; KIEFER, K. (2001): Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. Wiebelsheim: Quelle & Meyer.

BLUME, H.-P.; BRÜMMER, G. W. (2010): Lehrbuch der Bodenkunde. 16. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

BOOTH, C. (1971): The genus Fusarium. 1. publ., Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.

BRANEN, A. L.; KEENAN, T. W. (1970): Growth stimulation of *Lactobacillus casei* by sodium citrate. Journal of Dairy Science 53: 593-&.

BROEKAERT, W. F. et al. (1990): An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. Fems Microbiology Letters 69: 55-59.

COLL, J.; LEAL, J. A. (1972): Utilization of L-tryptophan as nitrogen source by *Fusarium culmorum*, *Aspergillus nidulans* and *Penicillium italicum*. Canadian Journal of Microbiology 18: 1353-&.

CRÜGER, G. et al. (2002): Pflanzenschutz im Gemüsebau. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

CURIR, P. et al. (2003): Fungitoxic phenols from carnation (Dianthus caryophyllus) effective against Fusarium oxysporum f. sp dianthi. Phytochemical Analysis 14: 8-12.

CURL, E. A.; TRUELOVE, B. (1986): The Rhizosphere. New York: Springer.

DOENECKE, D. et al. (2005): Biochemie und Pathobiochemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

ESWARANANDAM, S.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. (2004): Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157 : H7, and Salmonella gaminara. Journal of Food Science 69: M79-M84.

FAN, T. W. M. et al. (1997a): Comprehensive analysis of organic ligands in whole root xudate using nuclear magnetic resonance and gaschromatography-mass spectrometry. Anal Biochem. 251: p. 57.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. (2003): Fusarium oxysporum and its biocontrol. New Phytologist 157: 493-502.

FUCHS, G.; SCHLEGEL, H. G. (2007): Allgemeine Mikrobiologie. 8., vollständig überarb. u. erw. Aufl., Stuttgart [u.a.]: Thieme.

FUJII, T. et al. (2002): Suppression of the growth of the basidiomycete yeast, Rhodotorula minuta, by cinnamic acid. Biotechnology Letters 24: 151-154.

GISI, U. (1997): Bodenökologie. 2., neu bearb. u. erw. Aufl., Stuttgart [u.a.]: Thieme.

GISI, U. et al. (1997): Bodenökologie. Stuttgart: Thieme Verlag.

HAGE-AHMED, K. (2011): Effects on pathogenic and symbiotic fungi on root exudation of tomato in intercropping systems. 1. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Wurzelforschung. Irdning, Österreich.

HALE, M. G.; MOORE, L. D.; GRIFFIN, G. J. (1978): Root exudae and exudation. *In* Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Eds. V. R. Domergues and S. V. Krupa. Amsterdam, Elsevier.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; VON TIEDEMANN, A. (2009): Phytomedizin, Grundwissen Bachelor. 2., überarb. Aufl., Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

HEß, D. (2008): Pflanzenphysiologie. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.

HÄNSEL, R.; STICHER, O. (2010): Pharmakognosie - Phytopharmazie. 9., überarb. und aktualisierte Aufl., Heidelberg: Springer.

JAY, J. M. (2000): Modern food microbiology. 6. ed., Gaithersburg, Md.: Aspen Publ.

JONES, J. B. (1991): Compendium of tomato diseases. St. Paul, Minn.: APS Pr.

JONES, P. J.; WOLTZ, S. S. (1981): *Fusarium*-indiced diseases of tomato and potato and their control. *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Cook, R. J., The Pennsylvania State University Press.

KAMILOVA, F. et al. (2006a): Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 250-256.

KAMILOVA, F. et al. (2006b): Effects of the tomato pathogen Fusarium oxysporum f. sp radicis-lycopersici and of the biocontrol bacterium Pseudomonas fluorescens WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 1121-1126.

KAMILOVA, F.; LAMERS, G.; LUGTENBERG, B. (2008): Biocontrol strain Pseudomonas fluorescens WCS365 inhibits germination of Fusarium oxysporum spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. Environmental Microbiology 10: 2455-2461.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. (2006): The fusarium laboratory manual. 1st ed., Ames, Iowa: Oxford : Blackwell.

LUDWIG, A.; BOLLER, T. (1990): A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. Fems Microbiology Letters 69: 61-66.

LUGTENBERG, B. J. J.; KRAVCHENKO, L. V.; SIMONS, M. (1999): Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by Pseudomonas biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environmental Microbiology 1: 439-446.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. (2006): Brock Mikrobiologie. 11., überarb. Aufl., München [u.a.]: Pearson Studium.

MANACH, C. et al. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition 79: 727-747.

MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. (2009): Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp lycopersici in tomato. Plant Physiology and Biochemistry 47: 642-649.

MARTINEZ-VALVERDE, I. et al. (2002): Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (Lycopersicum esculentum). Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 323-330.

MAYER, A. M. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry 67: 2318-2331.

MEYERS, J. A.; COOK, R. J. (1972): Introduction of chlamydospore ormation in *Fusarium solani* by abrupt removal of the organic carbon substrate. Phytopathology 1148-1153.

MORTIMER, C. E. (2001): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

MURDOCK, D. I. (1950): Inhibitory action of citric acid on tomato juice flat sour organisms. Food Research 15: 107-113.

NELSON, E. B. (1990): Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. Plant and Soil, Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA 129: 61-73.

OJHA, S.; CHATTERJEE, N. C. (2012): Induction of resistance in tomato plants against *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediated through salicylic acid and *trichoderma harzianum*. Journal of Plant Protection Research 52: 220-225.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. (1997): Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Pathologist 137: 481-494.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. (1999): Process of tomato root colonization by a pathogenic strain *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. New Pathologist 141: 497-510.

RADWANSKI, E. R.; LAST, R. L. (1995): Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. The Plant Cell 7: 921-934.

RAUHA, J. P. et al. (2000): Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology 56: 3-12.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (2006): Biologie der Pflanzen. 4. Aufl., Berlin [u.a.]: <<de>> Gruyter.

REISS, J. (1976): Prevention of formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric cid and lactic acid. Experientia 32: 168-169.

RICHTER, G. (1996): Biochemie der Pflanzen. Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag.

ROVIRA, A. D. (1969): Plant root exudates. Bot. Rev. 35, p. 35.

SAID, S.; NEVES, F. M.; GRIFFITHS, A. J. F. (2004): Cinnamic acid inhibits the growth of the fungus Neurospora crassa, but is eliminated as acetophenone. International Biodeterioration & Biodegradation 54: 1-6.

SCHILLING, G. et al. (2000): Pflanzenernährung und Düngung. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.

SCHUBERT, S. (2011): Pflanzenernährung, Grundwissen Bachelor. 2., korr. Aufl., Stuttgart (Hohenheim): Eugen Ulmer Verlag.

SINGELTON, L. L.; MIHAI, J. D.; RUSH, C. M. (1992): Methodes for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul, Minn.: APS Pr.

SNOOK, M. E.; CSINOS, A. S.; CHORTYK, O. T. (1992): Inhibition of growth of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* by aromatic acids and coumarins in a laboratory bioassay. Journal of Chemical Ecology 18: 1287-1297.

STEGLICH, W.; FUGMANN, B.; LANG-FUGMANN, S. (1997): Naturstoffe. RÖMPP LEXIKON. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

STEINBERG, C. et al. (1999a): Mycelial development of Fusarium oxysporum in the vicinity of tomato roots. Mycological Research 103: 769-778.

STEINBERG, C. et al. (1999b): Effects of nutritional sources on growth of one non-pathogenic strain and four strains of Fusarium oxysporum pathogenic on tomato. Mycological Research 103: 1210-1216.

STEINKELLNER, S.; MAMMERLER, R.; VIERHEILIG, H. (2005): Microconidia germination of the tomato pathogen Fusarium oxysporum in the presence of root exudates. Journal of Plant Interactions 1: 23-30.

SUNG, W. S.; LEE, D. G. (2010): Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. Pure and Applied Chemistry 82: 219-226.

SURPLUS, S. L. et al. (1998): Ultraviolet-B-induced responses in Arabidopsis thaliana: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. Plant Cell and Environment 21: 685-694.

TAWATA, S. et al. (1996): Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 60: 909-910.

THEURL, M. C. (2008): CO_2-Bilanz der Tomatenproduktion: Analyse acht verschiedener Produktionsysteme in Österreich, Spanien und Italien. Diplomarbeit am Fakultätszentrum Ökologie. Wien, Universität Wien.

UREN, N. C. (2000): Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *In:* The Rhizospere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Eds. R. Pinton, Z. Varanini and P. Nannipieri. pp. 19-40. New York, Marcel Dekker, Inc.

VANCURA, V.; HOVADIK, A. (1965): Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. Plant and Soil 22: 21-32 p.

WILLMES, A. (2001): Taschenbuch chemische Substanzen. Elemente, Anorganika, Organika, Naturstoffe, Polymere. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl., Frankfurt am Main: Deutsch.

WOLLRAB, A. (1999): Organische Chemie, eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten. Braunschweig [u.a.]: Vieweg.

WONNEBERGER, C. (2004): Gemüsebau. Stuttgart: Ulmer.

WU, H. S. et al. (2011): Succinic acid inhibited growth and pathogenicity of in vitro soil-borne fungus Fusarium oxysporum f. sp. niveum. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science 61: 404-409.

WU, H. S. et al. (2008): Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by in vitro cultures of Fusarium oxysporum f.sp niveum. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 1316-1321.