Effekte von Fusariumbefall und Mykorrhizierung bei Tomate und Basilikum in Co-Kultur

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Ingenieur (Dipl.-Ing.)

Masterstudium Agrarbiologie

eingereicht und verfasst von

Johannes Krammer

Universität für Bodenkultur Wien

Betreuung:

Univ.Prof.in Dipl.-Ing.in Dr.in Siegrid Steinkellner

Univ. Ass.in Dipl.-Ing.in Karin Hage Ahmed

Department für Nutzpflanzenwissenschaften,
Abteilung für Pflanzenschutz, Universität für Bodenkultur

Wien, Dezember 2012

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meiner Betreuerinnen Frau Univ. Prof.in Dr.in Steinkellner und Frau Univ. Ass.in DI.in Hage Ahmed sowohl für die äußerst interessante Wahl der Aufgabenstellung als auch für die umfassende beratende und kollegiale Unterstützung bei der Erarbeitung des Themas.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Pflanzenschutz. Mein besonderer Dank gilt hier Frau DI.in Daxböck-Horvath, Frau Agnes Strauss und Herrn Hans Jung, die mich bei der praktischen Versuchsdurchführung tatkräftig unterstützt haben.

Weiters gebührt auch meinen Studienkollegen, Grabmair Andrea, Stauber Mirjam und Heigl Florian Dank, die mein Studienleben bereichert haben und mir immer die Möglichkeit zum Diskutieren und Reflektieren gegeben haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern ganz herzlich bedanken, die mich bei all meinen Vorhaben immer unterstützt und mir mein Studium finanziert haben, sowie bei meinem Bruder, der mich mit seinem Erfahrungen aus seinem Studium immer zur Seite gestanden hat. Ohne Euch wäre ich nicht soweit gekommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract 1

2. Einleitung 2

2.1 Fusariumwelke 3

2.1.1. Schadsymptome 4

2.1.2. Entwicklungszyklus 6

2.1.3. Kontrolle von *Fusarium oxysporum* 6

2.2. Mykorrhiza 8

2.2.1. Die arbuskuläre Mykorrhiza 8

2.2.2. Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza 10

2.2.3. Nutzen der arbuskulären Mykorrhizapilze 10

2.3. Phenolische Verbindungen 12

2.3.1. Entstehung der Grundstruktur 12

2.3.2. Tannine 13

2.3.3. Abwehrstoffe der Pflanze 13

3. Material und Methoden 16

3.1. Versuchsdurchführung 16

3.1.1. Ansaat 16

3.1.2. Substratvorbereitung 16

3.1.3. Herstellung der Pilzsporen-Suspensionen 16

3.1.4. Pikieren und Inokulieren der Pflanzen 17

3.1.5. Kulturführung 18

3.1.6. Ernte 19

3.2. Biometrische und chemische Analysen 20

3.2.1. Bestimmung des Wurzel- und Sprossgewichts 20

3.2.2. Bonitur des Infektionsgrades 20

3.2.3. Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 20

3.2.4. Bestimmung des Gesamtphenol- und Tanningehaltes 22

3.3. Statistische Auswertung 25

4. Ergebnisse ... 26

4.1. Pflanzenvitalität ... 26

4.1.1. Tomate ... 26

4.1.2. Basilikum ... 28

4.2. Biomasseproduktion ... 30

4.2.1. Tomate ... 30

4.2.2. Basilikum ... 34

4.3. Phenolische Inhaltsstoffe ... 38

4.3.1. Tomate ... 38

4.3.2. Basilikum ... 42

4.4. Korrelation von Sprossmasse - Gesamtphenolgehalt ... 47

5. Diskussion ... 48

6. Zusammenfassung ... 53

7. Verzeichnisse ... 55

7.1. Abbildungsverzeichnis ... 55

7.2. Tabellenverzeichnis ... 57

7.3. Literaturverzeichnis ... 58

1. Abstract

The interactions of plant roots, arbuscular mycorrhizal fungi and soil borne fungi lead to changes in the metabolism of the host plant. In the present work the effects of the soil-borne tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici (Fol)*, the basil pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici (Fob)* and the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus mosseae* in dual culture of tomato and basil were determined. 18 treatments were applied and the effect of mycorrhization on the biomass, the production of phenolic plant substances and on plant resistance towards *Fusarium oxysporum was* examined.

Fol disease incidence could not be reduced by the application of AMF, however a protective effect of mycorrhiza against the soil-borne pathogen *Fob was* observed. No beneficial effect of *Glomus mosseae* on plant growth could be detected, but the root and shoot dry weights of basil were negatively affected by the pathogen. Analysis of the plant material elucidated the effect of mycorrhization and the pathogen on the production of secondary plant compounds. The results of the chemical analyses of the tomato and basil leaves gave hints to a decline of the total phenolic content caused by *Fusarium oxysporum*. No explicit enhancement of phenolic compounds could be observed by AMF.

The Results are interesting for organic plant protection in the production of basil and tomato. The use of mycorrhiza in plant production could results in ecological advantages because of the reduction of fungicides.

2. Einleitung

Der Welkeerreger *Fusarium oxysporum*, ein bodenbürtige Pilz, führt oft zu erheblichen Ertragseinbußen in der Pflanzenproduktion weltweit. Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten in der ökologischen Landwirtschaft dem Pathogen Herr zu werden, findet sich in der Rhizosphäre ein interessanter Ansatz zur Bekämpfung des Erregers mit Mykorrhizapilzen. Arbuskuläre Mykorrhizapilze leben als Mikroorganismen in der Rhizosphäre und sind als Symbionten in den Wurzeln von 80% der Gefäßpflanzen beschrieben worden. Sie stellen eine direkte Verbindung zwischen Wirtspflanzen und Boden her und können dadurch die Nährstoff- und Wasseraufnahme erhöhen. Im Gegenzug versorgen die Pflanzen die Pilz-Partner mit Kohlenhydraten (Smith und Read, 2008). Weiters dienen arbuskuläre Mykorrhizapilze den Pflanzen auch der Pathogenabwehr ((Xavier und Boyetchko, 2003), Vierheilig et al., 2008). Azcon-Aguilar und Barea (1996) fassen folgende Mechanismen, die der Kontrolle von Pathogenen dienen könnten, zusammen: Konkurrenz um Photosyntheseprodukte, Konkurrenz um Kolonisierungsraum in der Wurzel, anatomische und morphologische Umgestaltung des Wurzelsystems und Aktivierung von Abwehrsystemen in der Pflanze.

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die Inokulation von Tomaten- und Basilikumpflanzen in Dualkultur mit den Welkepathogenen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*, und dem arbuskulären Mykorrhizapilz, *Glomus mosseae,* zu Veränderungen des Pflanzenstoffwechsels führen. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen auf Infektionsgrad, Sterblichkeitsrate und Trockenbiomasse untersucht. Folgende Fragestellungen wurden behandelt:

- Zeigt die Kolonisierung von Tomaten- und Basilikumwurzeln mit *Glomus mosseae* bzw. die Infektion mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* Effekte in der Pflanzenvitalität?
- Wie wirkt sich die Kolonisierung der Wurzeln mit *Glomus mosseae* bzw. die Infektion mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* auf die Biomasse bei Tomate und Basilikum aus?
- Führen Mykorrhizierung und Fusariumbefall zu biochemischen Veränderungen (phenolische Verbindungen) bei Tomate und Basilikum?

2.1 Fusariumwelke

Die Fusariumwelke verursacht weltweit durch die geringe Anzahl an verfügbaren Gegenmaßnahmen massive Ertrags- und Qualitätsverluste an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen wie Tomate, Basilikum, Baumwolle, Tabak, Banane. Die Fusariumwelke tritt meist im Gewächshaus und im Freiland bei warmen Bodenbedingungen auf (Agrios, 2004).

Auslöser der Fusariumwelke ist der bodenbürtige, pilzliche Schaderreger *Fusarium oxysporum*, der in mehr als 120 formae speciales unterteilt wird. Das in der Arbeit verwendete Welkepathogen *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici (Fol)* wirkt spezifisch auf Tomate und das Welkepathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici (Fob)* auf Basilikum (Agrios, 2004).

Fol und *Fob* entwickeln gezüchtet auf einem Nährmedium zunächst ein weiß wachsendes Myzel, welches mit zunehmendem Alter einen leichten, violetten Farbstich annehmen kann. Sie produzieren 3 verschiedene Arten von asexuellen Sporen (Abb. 1) (Dermoumi, 2008):

- Mikrokonidien besten aus ein oder zwei Zellen und werden reichlich unter allen Lebensbedingungen produziert. Da die Konidien der Welkeerrger sehr klein sind können sie mit dem Wasserstrom im Xylem transportiert werden.
- Makrokonidien setzten sich aus 3 bis 5 Zellen zusammen und besitzen die typische Krümmung. An einem Ende ist die Fußzelle auszumachen, welche früher am Konidienträger angehaftet war. Sie erscheinen in einem Sporodochium ähnlichem Gebilde auf der Oberfläche der abgestorbenen Pflanze.
- Chlamydosporen sind dickwandige Zellen oder kleine Zellkomplexe. Sie entstehen durch Verdickung und sind im Allgemeinen größer als die vegetativen Nachbarzellen. Fusarien können als bodenbürtiger Erreger in Form von Chlamydosporen jahrelang im Boden überdauern.

Abbildung 1: Mikrokonidien, Makrokonidien und Chlamydosporen von *Fusarium oxysporum,* http://www.botany.hawaii.edu/faculty/gardner/diseases/Koa%20dieback/koa_wilt.htm und http://www.doctorfungus.org/thefungi/Fusarium_oxysporum.php

2.1.1. Schadsymptome

Ein Befall mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* oder *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* ist bereits frühzeitig, meist noch vor dem Auftreten typsicher Welkesymptome, zu diagnostizieren.

In Querschnitten von Wurzeln oder Stängeln ist makroskopisch eine gelbbraune Verfärbung der Gefäßsysteme (Abb. 2) zu erkennen (Schössler, 1997). Weiters führen diese Welkepathogene zum Turgeszenzverlust mit den typischen Welkeerscheinungen (Abb. 3). Das Welken schreitet mehr und mehr von Tag zu Tag voran, die Blätter beginnen sich zu verfärben und vertrocknen endgültig. Pflanzen, die im Keimungsalter befallen werden, sterben meistens rasch nach den ersten Symptomen ab. Ältere Pflanzen können kollabieren, wenn die Infektion zu schwer ausfällt und die Wetterbedingungen günstig für die Entwicklung des Pathogens sind (Agrios, 2004).

Abbildung 2: Verbräunung der Gefäßsysteme bei Basilikum

Abbildung 3: Welkeerscheinung bei Basilikum

Bei Tomate führt *Fol* weiters zu Aufhellungen der Blattadern und anschließend zu gelblichen Verfärbungen der Blätter und Stängeln (Abb. 4). Diese Entwicklung zeigt sich am Blatt oft einseitig. Das Blatt kann sich bereits auf einer Seite verfärbt haben, bevor die andere Seite die Symptome aufweist (Agrios, 2004).

Abbildung 4: Einseitige Gelbverfärbung des Blattes bei Tomate (Blancard, 1991)

Bei Basilikum bilden sich durch *Fob* braune Verfärbungen an den Blättern und Stängeln (Abb. 5). Des Weiteren kann es zu einer weiß-violetten Sporulation durch Makrokonidien entlang von Stängelläsionen kommen (Gamliel et al., 1996).

Abbildung 5: Braune Verfärbungen an den Blättern bei Basilikum

2.1.2. Entwicklungszyklus

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* sind bodenbürtige Erreger und überleben sowohl im Boden als auch in infizierten Pflanzenresten als Myzel und in all ihren Sporenformen. Die Pathogene verbreitet sich über kurze Distanzen mit Hilfe von Wasser und Wind (Agrios, 1997) und auf kontaminierten Samen oder infizierten Pflanzenteilen. Gelangen Wurzeln geeigneter Wirtspflanzen in die Nähe, so werden Sporen zur Keimung und das Pilzmyzel zum Wachsen durch Wurzelausscheidungen stimuliert. Die Pilze dringen dann durch die Wurzelrinde, ohne sie wesentlich zu schädigen, in das Gefäßsystem vor. Nach dem Eindringen besiedeln die Welkeerreger das Xylem. Unter der Wirkung von Toxinen und hydrolytischen Enzymen wird das Gefäßsystem in der Nähe des Eindringungsortes derart angegriffen, dass der Nährstoff- und Wassertransport in weiter entfernt liegenden Pflanzenteile erheblich reduziert oder sogar vollkommen unterbunden wird (Schössler, 1997).

2.1.3. Kontrolle von *Fusarium oxysporum*

Es bieten sich im ökologischen Pflanzenschutz mehrere Verfahren, um den Pilz Herr zu werden.

Pflanzenbautechnische Methoden zur Kontrolle

Ein Langzeit-Fruchtfolgesystem verhindert das Ansammeln von Inokula im Boden, die vor allem von bodenbürtige Pathogene produziert werden. Eine vollständige Abtötung der Inokula ist jedoch nicht möglich, aber deren Anzahl kann dermaßen vermindert werden, dass die ökonomischen Schäden minimal bleiben. Die Entfernung von Pflanzenrückständen auf dem Feld senkt ebenfalls die Infektionsrate (Alabouvette, et al, 2005).

Biologische Kontrolle

In der biologischen Kontrolle von *Fusarium oxysporum* Stämmen fasst Fravel (2002) folgende Methoden zusammen, die der Kontrolle von Pathogenen dienen könnten:

- Einsatz von Konkurrenzstämmen: Nicht pathogene Pilzstämme, darunter auch Subarten des *Fusarium oxysporum* können als Antagonisten fungieren (Fravel et al., 2002). Deren saprophytischen Konkurrenzkampf um Nährstoffe - vor allem um Kohlenstoffquellen - im Boden und Rhizosphäre ist ausschlaggebend (Larkin und Fravel, 1998). Weiters können nicht pathogene Pilze die begrenzte Zahl an Eindringungsorte auf der Wurzel besetzen und so die Kolonisierung durch *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* vermindern (Mandeel und Baker, 1991).
- Förderung der pflanzlichen Schutzmechanismen - systemisch induzierten Resistenz: Eine Vorbehandlung einer Pflanze mit einem nicht pathogenen Erreger führt zu einer Abschwächung der Symptome, wenn die Pflanze später mit einem kompatiblen Erreger beimpft wird (Matta, 1989). Dieses Phänomen wird als systemisch induzierte Resistenz bezeichnet, was eine allgemeine pflanzliche Abwehrantwort auf eine mikrobielle Infektion oder Stresseinwirkung ist. Die Abwehrreaktion resultiert in der Produktion von Pflanzeabwehrstoffen wie Phytoalexine oder PR-Proteine (vgl. Kapitel 2.3.3) sowie in morphologischen Veränderungen der Zellwände (Olivain, 1999).

  Eine Aktivierung von mehreren Enzymen, die im Zusammenhang mit pflanzlichen Abwehrreaktionen standen, wurde bei mit nicht-pathogenen *Fusarium oxysporum* Stämmen befallenen Tomatenpflanzen nachgewiesen. Die Versuchspflanzen blieben anschließend bei einer späteren Behandlung mit pathogenen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Stämmen symptomfrei (Larkin und Fravel, 1998). Bei Basilikumpflanzen konnte diese Reaktion mit aus Kompost extrahierten nicht-pathogenen *Fusarium oxysporum* Stämmen ebenfalls beobachtet werden. Vorher behandelte Versuchspflanzen zeigten gegenüber *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* mehr Widerstandskraft als unbehandelte (Fravel und Larkin, 2001). Inokulationen mit weiteren antagonistischen Pilzen wie *Trichoderma, Gliocladium, Pseudomonas fluorescens* sowie Mykorrhizapilzen versprechen ähnliche Resistenzbildung (Agrios, 2004).

2.2. *Mykorrhiza*

Über Jahrmillionen unserer Erdgeschichte hat sich im Boden als Ergebnis koevolutiver Strategien eine symbiontische Lebensgemeinschaft zwischen Bodenpilze und höheren Pflanzen entwickelt. Albert Bernhard Frank beschrieb 1885 erstmals diese Symbiose bei verschiedenen Bäumen und nannte sie „Mycorhiza“, was soviel bedeutet wie Pilzwurzel. Die Mykorrhizapilze liefern der Pflanze Nährsalze und Wasser und erhalten dafür durch die Photosynthese der Pflanzen erzeugte Assimilate (Strack, 2001). Nach der Art der Ausbildung der Symbiose zwischen dem Wurzelsystem der höheren Pflanze und der Mykorrhiza werden verschiedene Typen unterschieden (Smith und Read, 2008):

- Ektomykorrhiza
- Ektendomykorrhiza
- Orchideen Mykorrhiza
- Arbuskuläre Mykorrhiza
- Arbutoide Mykorrhiza
- Ericoide Mykorrhiza
- Monotropoide Mykorrhiza

2.2.1. Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM)

Über 80 Prozent aller Landpflanzen und Pilze aus der Ordnung Glomerales der Klasse Glomeromycetes bilden diese Symbiose (Schüßler, 2009). Aufgrund von Fossilienfunde und der Divergenz der 18S-rDNA Sequenzen wird geschätzt, dass die Ordnung Glomerales vor 410 bis 440 Millionen Jahren entstanden und damit der Besiedelung der Erde durch Landpflanzen gefördert worden ist (Simon et al., 1992; Smith und Read, 2008). Wahrscheinlich assoziierten AM-Pilze bereits vor 460 Millionen Jahren mit Bryophyten, den Moostierchen (Schüßler, 2009). Die fehlende Abwehr der Pflanze kann dadurch erklärt werden, dass die AM sich evolutionär bereits entwickelt hatte, bevor es die Wurzeln taten. Im Lauf der früheren Evolution der Gefäßpflanzen existierten wahrscheinlich nie Wurzeln, die nicht mykorrhiziert

waren (Remy und Taylor, 1994). Während der Evolution verloren etwa 20 Prozent der Pflanzen die Fähigkeit zur Ausbildung der AM-Symbiose, darunter Arten aus den Familien Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae und Urticaceae (Smith und Read, 2008).

Innerhalb der AM lassen sich zwei morphologisch verschiedene Kolonisierungsformen unterscheiden, der „Arum"- und der „Paris"-Typ. Der „Arum"-Typ ist durch eine ausgedehnte Kolonisierung mit interzellulären Pilzhyphen im äußeren Bereich der Rindenparenchymzellen gekennzeichnet. Nur sporadisch kommt es beim diesem zur Ausbildung von intrazellulären Hyphen. Ausgehend von den Seitenarmen interzellulärer Hyphen werden die Arbuskel intrazellulär und Vesikeln interzellulär im Wurzelgewebe gebildet (Smith und Read, 2008). Die bäumchenartigen Arbuskeln (lat.: arbusculum = Bäumchen) bilden Verzweigungen innerhalb der Wurzelzellen, sie dienen als Verbindungsstelle für den Stoffaustausch zwischen der Wirtspflanze und dem Pilz (Schüßler, 2009). Die Vesikeln hingegen dienen als Speicherorgan für Lipide und Zucker. Beim „Paris"-Typ hingegen erfolgt die Besiedlung der Wurzelcortex hauptsächlich über intrazelluläre Hyphen, an denen in der Regel mehrere sehr kleine Arbuskel ausgebildet werden (Abb. 6). Welcher der beiden Kolonisierungstypen sich entwickelt, scheint größtenteils von der Pflanzenart abzuhängen (Smith und Read, 2008).

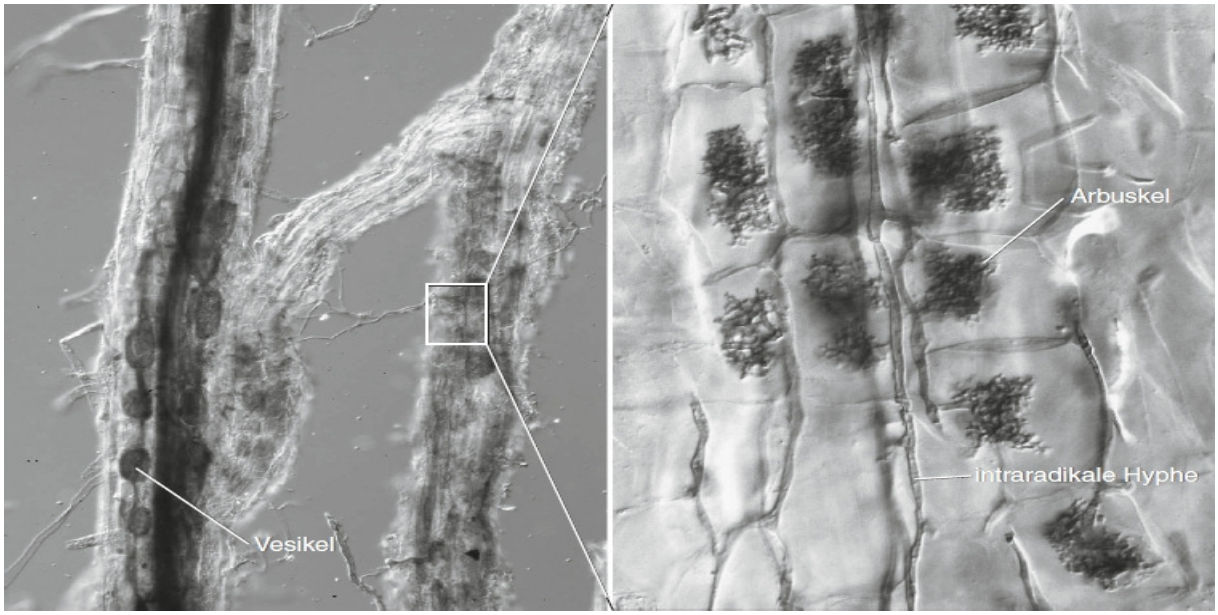

Abbildung 6: Vesikeln, Arbuskeln und interradikale Hyphen der arbuskulären Mykorrhiza (Schüßler, 2008)

2.2.2. Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza

Die Kolonisierung von Wirtswurzeln durch arbuskulären Mykorrhizapilze erfolgt durch Sporen, Hyphen sowie durch bereits kolonisierte Wurzelstücke. Die Interaktion zwischen einem AM-Pilz und einer Wirtspflanze nimmt seine Anfang, wenn eine Pilzhyphe in Kontakt mit der Wurzel des Wirtes tritt. Die Hyphenkeimung wird durch Wurzelexsudate stimuliert - es ist jedoch noch nicht geklärt, inwieweit spezifische Signalstoffe für die Etablierung der Symbiose erforderlich sind (2008). Nach dem Keimen der Spore in Wasser werden septenfreie Hyphen gebildet, die ihre Entwicklung nur in der Anwesenheit von Pflanzenwurzeln oder Wurzelexsudaten fortsetzen (Barker et al., 1998). Die enge Beziehung zwischen AM-Pilze und ihren Wirtspflanzen wird auch dadurch deutlich, dass ohne Kontakt zu einer Wirtswurzel Hyphen nur 20 bis 30 Tage überleben können (Bonfante und Perotto, 1995).

Trifft die auskeimende Spore auf eine kompatible Wurzel, wird - wahrscheinlich nach einem Signalaustausch - der Pilz als Symbiosepartner erkannt. An der Rhizodermis findet die Ausbildung eines Appressoriums statt, gefolgt von einem Eindringen der Hyphe in die Wurzelrinde. Nach dem Eindringen der Hyphe in Parenchymzellen der inneren Wurzelrinde entstehen zuerst die oben erwähnten Arbuskeln. Nach einigen Tagen treten die Arbuskeln in eine Abbauphase ein. Die sich auflösende Pilzstrukturen werden dann von der Pflanze verdaut. Während der fortschreitenden Mykorrhizierung der Pflanzwurzel entsteht bei den meisten arbuskulären Mykorrhizen zusätzlich eine Vielzahl von intra- und interzellulären reservestoffspeichernden Vesikeln. Schließlich bilden sich in der Regel außerhalb der Wurzeln Sporen, in die große Mengen an Kohlenhydraten transportiert werden (Strack, 2001).

2.2.3. Nutzen der arbuskulären Mykorrhizapilze (AMP)

Versorgung der Pflanze

Hauptgründe für die verbesserte Versorgung der Pflanze sind einerseits die die Erschließung von Feinporen durch das Pilzmyzel. Durch die sehr geringen Hyphendurchmesser (bis 1 µm) können diese in feinste Bodenporen vorstoßen und dort viel effizienter als Pflanzenwurzeln Nährstoffe aufnehmen. Weiters können die Mykorrhizahyphen einen großen Bodenbereich erschließen und die Nährstoffe mittels Ferntransport über 20-30 cm an die Pflanze liefern, während die Pflanze nur

dazu fähig ist, vor allem aus der sehr begrenzten Wachstumszone nahe der Wurzelspitze Nährstoffe aufzunehmen (Schüßler, 2009).
Für die Pflanze spielt der AMP wahrscheinlich unter Phosphorlimitierung die größte positive Rolle. Pflanzen bekommen so oft 80 % des benötigten Phosphors über den Pilz geliefert, der Phosphat sehr viel effizienter aufnehmen kann. Ähnliches gilt wohl für Ammonium, einige Spurenelemente und auch Wasser, sofern diese Substanzen wachstumslimitierend sind (Schüßler, 2009).

Biologischer Pflanzenschutz

Neben der besseren Versorgung mit Nährstoffen fassen Azcon-Aguilar und Barea (1996) und Xavier (2003) folgende Mechanismen, die der Kontrolle von Pathogenen dienen könnten, zusammen:

- Konkurrenz:
  Konkurrenz kann um Infektionseindringungsorte, die Besiedelung des inneren Wurzelraums und Photosyntheseprodukten auftreten. Wenn es in der Wurzel zu einer gleichzeitigen Besiedlung der AMP und des Erregers kommt, zeigt der AMP aber aufgrund seiner langsamen Wachstumsrate gegenüber dem Erreger verringernde Konkurrenzkraft.
- Physiologische und biochemische Veränderung der Wirtspflanze:
  Mit AMP-besiedelte Pflanzen zeigen höheren Gehalt an Phosphor im Wurzelgewebe. Die Phospholipid-Zusammensetzung wird verändert und damit auch die Wurzelmembranpermeabilität, was zu einer Verringerung des Ausflusses von Zuckern, Carbonsäuren und Aminosäuren in die Rhizosphäre führt. Diese morphologische Umgestaltung beeinflusst die Chemotaxis von Krankheitserregern und erschwert das Eindringen von Pathogenen in die Wurzel.

  Weiters führt die Kolonisation mit AMP zu biochemische Veränderungen und kann eine systemisch induzierte Resistenz in der Pflanze bewirken.

2.3. *Phenolische Verbindungen*

Phenolische Verbindungen stellen die größte Gruppe der sekundären Pflanzstoffe dar. Zurzeit sind ungefähr 80.000 pflanzliche Sekundärstoffe bekannt. In der Natur kommen mindestens 8000 unterschiedliche phenolische Vertreter vor. Phenole bestehen aus einem aromatischen Ringsystem, an das direkt zumindest eine Hydroxy-Verbindung gebunden ist. Unter dem Begriff Polyphenole werden Verbindungen mit mindestens zwei phenolischen Hydroxygruppen am Ring zusammengefasst (Richter, 1996).

Unter Berücksichtung ihrer chemischen Struktur lassen sich Phenole grob in folgende Gruppen einteilen:

- Flavonoide
  - Anthocyanide
  - Flavone
  - Flavanone
- Phenolcarbonsäure
  - Cumarine
  - Lignane
  - Capsaicinoide
- Naphthochinone und Anthrachinone

2.3.1. Entstehung der Grundstruktur

Das Endprodukt des Shikimat-Weges, die Aminosäure Phenylalanin, ein essentieller Bestandteil von vielen Proteinen und Peptiden, kann als Schlüsselverbindung in der Entstehung von Phenole betrachtet werden. Die Umwandlung dieser aromatischen Aminosäure zur Zimtsäure liefert den zentralen Molekülbestandteil für zahlreiche abzweigende Synthesewege. Dem Enzym Phenylalanin-ammonium-lyase fällt die entscheidende Rolle zu, welches den Weg zum Phenolstoffwechsel öffnet, damit die Proteinbiosynthese den Baustein Phenylalanin entzieht und die Umwandlung zur trans-Zimtsäure katalysiert (Rimpler, 1990).

Der zweite Mechanismus zur Erreichung aromatischer Ringsysteme wird als Acetat-Malonat-Weg bezeichnet und nimmt Bezug auf ein vergleichbares

Reaktionsgeschehen bei Mikroorganismen, welches Acetat als Molekülbaustein verwendet. Über diese Reaktion wird der A-Ring des Flavan Grundgerüstes erstellt (Richter, 1996).

Der dritte Weg zu aromatischen Ringstrukturen bedient sich der Ausgangsverbindungen Acetat und Mevalonat, daher wird er auch Acetat-Mevalonat-Weg genannt. Er wird jedoch nur in Ausnahmefällen von höheren Pflanzen genutzt (Richter, 1996).

2.3.2. Tannine

Tannine sind polyphenolische Sekundärpflanzenstoffe. Die besondere Eignung zum Gerben, das heißt zur Herstellung von Leder aus tierischen Häuten, hat zu deren Namen (franz.: *tanin* = Gerbstoffe) geführt. Sie sind vor allem in Stauden, Sträuchern und Baumblättern weit verbreitet.

Bei Tanninen handelt es sich hierum meist um scharf oder bitter schmeckende bzw. reizauslösende Substanzen, welche in der Regel toxisch für Phytophagen und -pathogene wirken. Sie werden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in vier Gruppen aufgeteilt (Serrano, 2009) :

- Hydrolysierbare Tannine
- Kondensierte Tannine
- Phlorotannine
- Komplexe Tannine

2.3.3. Abwehrstoffe der Pflanze

Permanente Abwehr

Zu permanenten Abwehrstoffen zählen Alkaloide und Tannine. Da in dieser Arbeit Tannine untersucht wurden, wird nur auf diese eingegangen. Bei Gewebeverletzungen werden Tannine aus den Gerbstoffzellen frei, infiltrieren das umliegende Gewebe und machen es für den Aggressor ungenießbar. Tannine haben

ein weites Abwehrspektrum gegen Pflanzenfresser, da sie hauptsächlich die Verdauung stören, indem sie Proteine deaktivieren. Antimikrobielle Eigenschaften werden ihnen ebenfalls zugesprochen. Bei Mikroorganismen wird eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung diskutiert. Die Phosphorylierung stellt eine der wichtigsten Regulationen von biologischen Prozessen vor allem in der Proteinaktivierung in der Zelle dar (Serrano, 2009).

Induzierte Abwehr

Eine systemisch induzierte Resistenz ist eine Abwehrantwort der Pflanze auf eine mikrobielle Infektion oder Stresseinwirkung. Pflanzen produzieren infolge eines Befalls antibiotisch wirkende Produkte des Sekundärstoffwechsels, sogenannte Phytoalexine (Smith, 1996).

Während bei dem vorher beschriebenen Abwehrmechanismus die Abwehrstoffe permanent vorhanden sind, werden Phytoalexine von der Pflanze unmittelbar nach einer Infektion durch Mikroorganismen wie Pilze oder Bakterien produziert. Die Phytoalexine sind chemisch eine heterogene Gruppe von Verbindungen, welche im Verlauf der Pathogen-Wirt-Beziehung im pflanzlichen Stoffwechsel induziert werden und das Wachstum von Mikroorganismen beeinträchtigen. Sie haben daher die Funktion von Antibiotika (Richter, 1996). Charakteristisch für alle diese Verbindungen ist, dass sie unspezifisch das Wachstum von (pathogenen und nicht-pathogenen) Mikroorganismen hemmen können. Die physiologische Wirkung dieser Verbindungen auf die Pathogene ist unterschiedlich. Häufig wird eine Zerstörung der Zellmembran, verbunden mit einem Austritt von Elektrolyten und Metaboliten sowie die die Hemmung von Lyasen beobachtet (Börner, 2009). Die Synthese der Phytoalexine wird durch Elicitoren ausgelöst, welche nach der Infektion von der Pflanze gebildet werden. In manchen Fällen kann die Phytoalexinsynthese auch durch abiogene Stressfaktoren (Bsp.: Schwermetalle, UV-Strahlung, Verwundung) ausgelöst werden. Phytoalexine sind chemische Verbindungen, die aus einer Vielzahl verschiedener Stoffklassen bestehen wie zum Beispiel phenolische Verbindungen, Alkaloiden oder Stilbenoiden (Richter, 1996).

Neben der Bildung antimikrobieller Phytoalexine setzt sich das Abwehrprogramm aus einer weiteren Vielzahl von Reaktionen zusammen. In vielen Pflanzen kommt es zu einer erhöhten Aktivität von Genen, die für in der Pathogenabwehr essentielle

Proteine kodieren. Ein Teil der Proteine, die nach Pathogeninfektion akkumulieren und deren Funktion nicht in allen Fällen geklärt ist, wurde unter dem Sammelbegriff PR-Proteine (“pathogenesis-related“) zusammengefasst (Kombrink und Somsich, 1997). Dazu werden unter anderem lytische Enzyme wie beispielsweise Proteasen und Chitinasen gezählt. Diese Enzyme lagern sich in den pflanzlichen Vakuolen und im Apoplasten ein, wo sie pilzliche oder bakterielle Zellmembranen und -wände abbauen (Kombrink und Somssich, 1997). Weiters kann es zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) kommen. Welche Rolle diese Ausschüttung an ROS in der Pflanze einnimmt ist noch nicht geklärt. Ob Sauerstoffradikale direkt auf das Pathogen oder die Wirtszellen (in der Form der bekannten Hypersensitiven Reaktion) einwirken, ist noch unklar (Torres et al., 2006).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsdurchführung

3.1.1. Ansaat

Vor der Aussaat wurden die Tomaten- und Basilikumsamen oberflächensterilisiert, um sicher zu stellen, dass keine Mikroorganismen auf den Samen haften. Dazu wurden die Samen in ein Glas mit Haushaltsbleiche (Dan Klorix) gegeben. Die Samen verblieben ca. 2 Minuten lang in dieser Lösung und wurden anschließend mit Wasser sorgfältig abgespült.

Die Aussaat der Basilikumpflanzen erfolgte eine Wochen vor der Aussaat der Tomatenpflanzen jeweils in Töpfen, die mit Perlit gefüllt und bereits angegossen waren. Insgesamt wurden 1200 Samen, 600 Tomaten (*Solanum lycopersicum;* Sorte: Tiny Tim) und 600 Basilikum (*Ocimum basilicum*; Sorte: Genovese) ausgesät. Die Töpfe wurden 3 Wochen (bei Basilikum) und 2 Wochen (bei Tomate) lang bei ca. 26 Grad Celsius in den Klimaschrank gegeben. Das Substrat sollte immer genügend befeuchtet sein.

3.1.2. Substratvorbereitung

Zum Topfen wurde ein Substrat verwendet, das zu gleichen Teilen aus Aussaaterde, Quarzsand und Leca bestand. Die Aussaaterde wurde in Säcke gefüllt und im Autoklaven zweimal autoklaviert, um es keimfrei zu machen. Vor dem Topfen wurde das Substrat aus den vorher genannten Bestandteilen gemischt und angefeuchtet.

3.1.3. Herstellung der Pilzsporen-Suspensionen

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden die einzelnen Pilze (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol Isolat 007) und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* (zur Verfügung gestellt von Dr. Matias Pasquali von der Universität Turin/Italien)) auf festen Nährböden kultiviert. Hierfür wurde das Nährmedium Czapek Dox Agar (3 g $NaNO_3$, 1 g K_2HPO_4, 0,5 g KCl, 0,5 g $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,01 g $FeSO_4$, 30 g Saccharose, 15 g Agar, 1 Liter destilliertes H_2O) bei 121°C für 20 min autoklaviert

und anschließend in Petrischalen gegossen. Die Pilzkulturen wurden auf das Nährmedium überimpft und bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Wochen Inkubation wurde die sich auf dem Nährmedium ausbreitende Pilzkultur mit sterilem, destilliertem Wasser übergossen und behutsam vom Nährmedium mit einem Drigalskispatel abgeschabt. Die entstandene Suspension wurde durch 3 Schichten Filtervlies (20-150 µm Porendurchmesser; Laporte, Wels, Österreich) filtriert, wodurch das Myzel zurückgehalten und eine reine Sporen-Wasser-Suspension gewonnen wurde. Bevor die Suspension zur Inokulation herangezogen werden konnte, musste die Sporenkonzentration mit Hilfe einer Thomakammer ermittelt und auf 10^5 Mikrokonidien pro ml eingestellt werden.

3.1.4. Pikieren und Inokulieren der Pflanzen

Insgesamt wurden 1080 Pflanzen (540 Tomaten- und 540 Basilikumpflanzen) für den Versuch benötigt. Der Versuch beinhaltete 18 Varianten zu 20 Pflanzen und 3 Wiederholungen. Der Versuch umfasst folgende 3 Kulturkombinationen

- Tomate/Tomate (Dualkultur)
- Basilikum/Basilikum (Dualkultur)
- Tomate und Basilikum (Dualkultur)

und folgende 6 Behandlungen

- Unbehandelte Kontrolle (Kon)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici (Fob*)
- Arbuskulärer Mykorrhizapilz (AMP) (*Glomus mosseae,* Firma Biorize, Frankreich)
- AMP+*Fol*
- AMP+*Fob*.

4 Wochen nach der Ansaat der Basilikumpflanzen erfolgte das Pikieren und Inokulieren der Versuchspflanzen. Zunächst wurden die mit den Etiketten der verschiedenen Behandlungsvarianten markierten Töpfe mit dem autoklavierten Substrat befüllt und angegossen. Die Keimlinge wurden aus dem Perlit gezogen und von diesem gereinigt, wodurch leichte Wurzelverletzungen entstanden. Diesen Stellen dienen anschließend als potenzielle Eindringungsorte für die applizierten Pilze. Jeweils zwei Keimpflanzen wurden paarweise in den Topf pikiert.

Bei der Kontrollvariante bedurfte es keiner Behandlung. Die *Fol*- und *Fob*-Varianten wurden mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* inokuliert. Hierzu wurden die Wurzel der Pflanzen 3 min. lang in die Sporensuspension getaucht. Jeder Topf der AMP-Variante wurde mit 4 ml *Glomus mosseae* inokuliert. Jeweils 2 ml Inokulum wurden mit einem 2 ml Tube in die zwei Pikierlöcher überführt. Die Varianten AMP+*Fol* und AMP+*Fob* wurden sowohl mit Mykorrhiza als auch mit Fusarium behandelt. Nach dem Pikieren wurden die Töpfe ins Glashaus gestellt.

3.1.5. Kulturführung

Eine zusätzliche Beleuchtung mit einem Tag- und Nachtzyklus von 14 h zu 10 h wurde installiert (Abb. 7). Ab der 2 Woche wurden die Pflanzen nach Bedarf mit einer Nährlösung gegossen. Die dabei verwendete Nährlösung wies folgende Zusammensetzung je Liter auf:

472,30 mg $Ca(N0_3)_2$, 261,40 mg K_2SO_4, 136,00 mg KH_2PO_4, 369,72 mg $MgSO_4$, 50,000 mg $Fe_6H_5O_7$ x 3H2O, 10,005 mg NH_4NO_3, 1,30 mg $Na_2Bo_40_7$ x $4H_2O$, 1,500 mg $MnS0_4$ x $4H_2O$, 0,60 mg $ZnS0_4$ x $7H_2O$, 0,450 mg $CuSO_4$ x 5H2O, 0,028mg $Al_2(SO_4)_3$, 0,028mg $NiSO_4$ x $7H_2O$, 0,028 mg $Co(N0_3)_2$ x $6H_2O$, 0,028 mg $Ti0_2$, 0,014 mg $LiCl_2$, 0,014 mg $SnCl_2$, 0,014 mg KJ, 0,014 mg KBr, 0,070 mg MoO_3

Um eine Ausbreitung der unterschiedlichen Pilze über das Gießwasser zu vermeiden, wurden die getopften Pflanzen der einzelnen Varianten in separate Anzuchtkisten gestellt.

Abbildung 7: Versuchspflanzen im Glashaus mit Beleuchtung

3.1.6. Ernte

Die Ernte fand 10 Wochen nach dem Pikieren zwischen statt. 414 der Pflanzen wurden per Zufallsprinzip geerntet. Bei der Ernte wurden folgende Daten erhoben: Frischgewicht von Wurzel und Spross, Sterblichkeitsrate der verschiedenen Versuchspflanzen und Fusariuminfektion. Ebenfalls wurde für die anschließende Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 2 cm unter dem Wurzelhals Wurzelstücke von 1,5 cm Länge entnommen und bis zur weiteren Verwendung in Ethanol (30%) aufbewahrt. Nach der Ernte wurden das Trockengewicht von Wurzel und Spross, der Mykorrhizierungsgrad, der Gesamtphenol- und Tanningehalt bestimmt.

3.2. Biometrische und chemische Analysen

3.2.1. Bestimmung des Wurzel- und Sprossgewichts

Das pflanzliche Probenmaterial wurde ca. 2 Wochen bei 33°C und Luftumwälzung schonend getrocknet. Anschließend wurde die getrocknete Wurzel- bzw. Sprossmasse jeder einzelnen getrockneten Probe bestimmt. Da Mykorrhizaproben aus den Wurzeln bei der Ernte entnommen wurden, musste deren Trockenmasse indirekt bestimmt werden. Dazu musste der Wert des Frischgewichts der Wurzel durch den des Frischgewichts ohne den Gewichtsanteil der entnommenen Mykorrhizaprobe dividiert und anschließend mit dem Wert des Trockengewichts ohne Mykorrhizaprobe multipliziert werden.

3.2.2. Bonitur des Infektionsgrades

Bei den Probenahmen wurden sowohl Spross als auch Wurzeln auf Krankheitssymptome untersucht. Um im Xylem wachsende Pilzhyphen entdecken zu können, wurde die Hauptwurzel und der Spross aufgeschnitten. Wenn ein Befall beobachtet werden konnte, wurde sowohl der Abstand von der Spitze der Primärwurzel bis zum Ende der ersichtlichen Verbräunung im Xylem (Infektionslänge) als auch die Gesamtlänge der Pflanze gemessen. Aus dem Verhältnis der Infektions- und Gesamtlänge konnte der Infektionsgrad bestimmt werden.

3.2.3. Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Das Färben der Wurzeln erfolgt nach der Methode von Vierheilig (1998). Zur Quantifizierung der Mykorrhizakolonisation wurden 2 cm unter dem Wurzelhals Wurzelstücke von 1,5 cm Länge entnommen. Um Zellinhalte und Zellwandpigmente zu entfernen, wurden die Wurzelstücke 4 Minuten lang bei 90° C in 10% KOH gekocht und danach mit Leitungswasser dreimal gespült. Anschließend wurden die Wurzeln durch 3-minütiges Kochen in einer Tinten/Essig-Lösung (v:v 5:95; Shaeffer, schwarz; Haushaltsessig, 5% Essigsäure) gefärbt und wieder mit Leitungswasser gereinigt. Die gefärbten Wurzeln wurden in Ethanol (30%) eingelagert.

Die Bestimmung der Mykorrhizakolonisation entsprach der Methode von Giovanetti and Mosse (1980). Die angefärbten Wurzeln wurden mit etwas destilliertem Wasser in eine Petrischale mit Raster gegeben und in ungefähr 5-10 mm lange Stücke mit einem Skalpell zerschnitten. Unter dem Binokular wurden nun die mykorrhizierten Wurzeln mit Hilfe des Gitters ausgezählt. Jedes Wurzelstück, das eine Linie kreuzte, wurde gezählt. Mykorrhizierte Wurzeln wurden an den blau/schwarz eingefärbten Arbuskeln oder Vesikeln in der Wurzel erkannt. Insgesamt werden 200 Wurzelstücke je Probe ausgezählt. Das Verhältnis von mykorrhizierten Wurzeln zu den 200 ausgezählten Wurzeln ergab den Mykorrhizierungsgrad (Abb. 8).

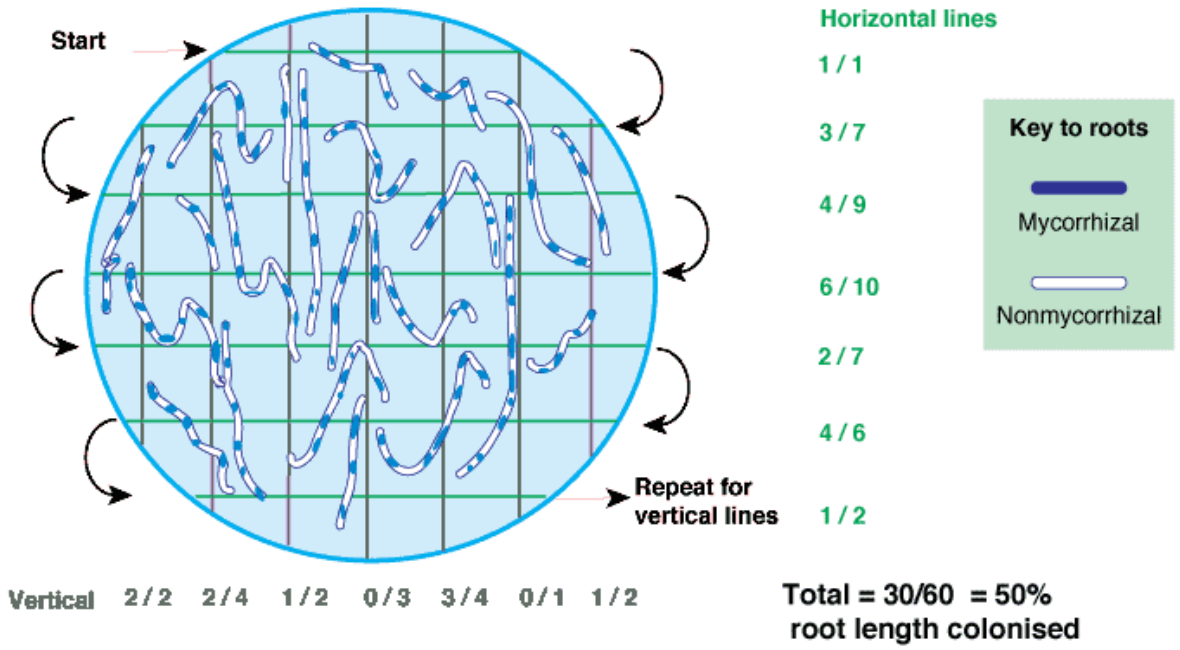

Abbildung 8: Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades, http://mycorrhizas.info/method.html

3.2.4. Bestimmung des Gesamtphenol- und Tanningehaltes

Die Bestimmung der Phenole und Polyphenole erfolgte mit der Methode nach Singleton (1999). Phenolische Verbindungen ergaben mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz im alkalischen Milieu eine Blaufärbung (Abb. 9), welche anschließend photometrisch bestimmt und anhand einer Kalibrationsgeraden berechnet wurden. Die Ergebnisse wurden in Kaffeesäure Äquivalente ausgedrückt (siehe dazu weiter unten).

Abbildung 9: Blaufärbung des Folin-Ciocalteu-Reagenz bei ansteigender Phenolkonzentration

Materialien und Chemikalien

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet: Spektrophotometer (Abb. 10) (FLUOstar omega; BMG Labtech; Messeinstellung: Wellenlänge - 725 nm, Response – Medium, Mode - Absorbance), Eprouvetten (Höhe 100 mm, Außendurchmesser 14 mm, Dicke 1 mm), verschiedene Pipetten, Folin-Ciocalteu-Reagenz (Merck), gesättigte Na_2C0_3-Lösung (Herstellung: 35 g Na_2CO_3 + 100 ml destilliertes H_2O), Hautpulver (FILK), Filterpapier (Macherey Nagel, MN 616).

Abbildung 10: Spektrophotometer

Durchführung

<u>Herstellung des Phenolextraktes</u>

Der Phenolextrakt diente der Bestimmung der Gesamtphenole sowie der Tannine. Dazu mussten zuerst die Blätter von Tomate und Basilikum in einer Schlagmühle vermahlen werden. Danach wurde von jeder Probe 0,1 g fein vermahlendes Pflanzenmaterial in Glasgefäße eingewogen. Anschließend wurden 16 ml

Methanol (50%) als Lösungsmittel zugesetzt. Die Gefäße wurden mit einem Deckel verschlossen und für 30 Minuten zur Extraktion ins Ultraschallbad gestellt. Die Extrakte wurden anschließend abfiltriert. Dazu wurden Glasgefäße mit einem Glastrichter und einem Filter verwendet. Die Filtrate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° Celsius im Tiefkühlschrank dunkel gelagert.

Erstellung der Kalibrationsgerade

Die Messresultate wurden mit Hilfe einer Kalibrationsgerade in Kaffeesäure-Äquivalenten (mg Kaffeesäure / g Trockensubstanz) ausgedrückt (Singleton, 1999). Zur Erstellung der Kalibrierungsgerade wurden 20 mg Kaffeesäure in 20 ml destilliertem Wasser auf einem beheizbaren Magnetrührer bei 70 °C gelöst. In weiterer Folge wurden 7 Eprouvetten mit 2 ml destilliertem H_2O aufgefüllt und anschließend folgende Reihe pipettiert (Tab. 1). Für den Blindwert wurden 2 ml destilliertes Wasser in eine Eprouvette gefüllt und 40 µl 50%iger Methanol hinzupipettiert.

Tabelle 1: Kalibrationsreihe Kaffeesäure

Kalibrationsreihe	Kaffeesäure	dest. H_2O
1	0 µl	40 µl
2	5 µl	35 µl
3	10 µl	30 µl
4	15 µl	25 µl
5	20 µl	20 µl
6	30 µl	10 µl
7	40 µl	0 µl

Im nächsten Schritt folgte 0,1 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR). Nach 3 Minuten leichtem Schütteln wurden jeweils 0,2 ml gesättigte Na_2CO_3-Lösung hinzugefügt und anschließend mit 2,66 ml H_2O auf 5 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgte danach die photometrische Messung unter Verwendung des Spektrophotometer mit den oben genannten Messeinstellungen. Der Messwert jeder Konzentrationsstufe abzüglich des Blindwertes wurde zur Erstellung der Kalibrationsgerade verwendet (Abb. 11).

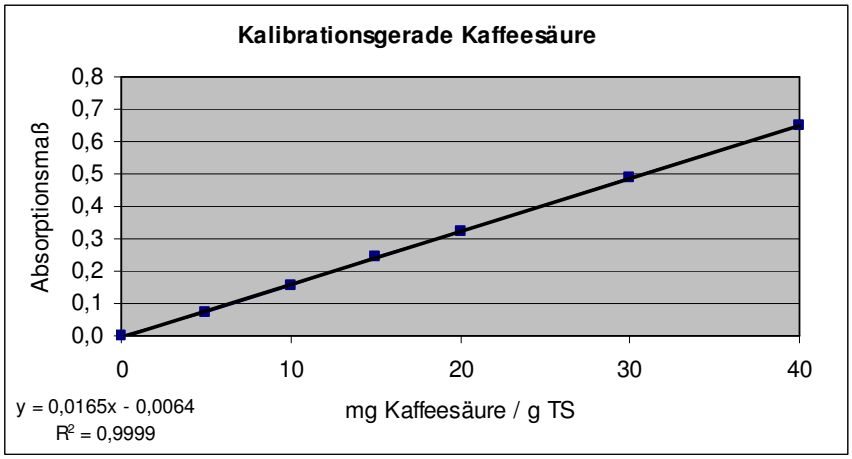

Abbildung 11: Kalibrationsgerade Kaffeesäure

Messung des Gesamtphenolgehaltes nach Singleton (1999)

In einem ersten Schritt wurden in Eprouvetten 2 ml destilliertem H_2O gefolgt von 0,1 ml Probenextrakt und 0,1 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (FCR) pipettiert. Nach 3 Minuten leichtem Schütteln wurden jeweils 0,2 ml gesättigte Na_2CO_3-Lösung hinzugefügt und anschließend mit 2,6 ml H_2O auf 5 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde folgte danach die photometrische Messung gegen den Blindwert mit oben genannten Messeinstellungen.

Messung des Tanningehaltes nach Pharmacopoea europaea (1998)

Um den Tanningehalt zu bestimmen, wurden zuerst 0,05 g Hautpulver in Erlenmeyerflasche gefüllt und mit 5 ml Phenolextrakt versetzt. Diese Mischung wurde bei 150 U/min 1 Stunde lang geschüttelt und anschließend konnte das Hautpulver mit einem Filter vom Phenolextrakt getrennt werden. Mit dem gewonnen Filtrat wurde nun nach denselben Verfahren wie bei der vorher beschriebenen Messung des Gesamtphenolgehalt der Phenolgehalt bestimmt. Da das Hautpulver dem Phenolextrakt die Tannine entzog, wurde bei dieser Messung ein niedriger Wert erwartet. Es wurden anschließend die Werte des Gesamtphenolgehaltes und des Phenolgehaltes ohne Tannine voneinander subtrahiert, die Differenz ergab den Tanningehalt an.

3.3. Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Statistikprogrammes „SPSS für Windows, Version 15" wurde das Datenmaterial analysiert und graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA, Chi Quadrat-Test, Kruskal Wallis-Test bzw. Mann Whitney U-Test. Die nichtparametrischen Testverfahren wurden bei jenen Daten angewendet, die keine Normalverteilung oder Homogenität der Varianzen aufwiesen. Die ermittelten Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ dem Wert 0,05 war.

4. Ergebnisse

4.1. Pflanzenvitalität

4.1.1. Tomate

Dualkultur Tomate - Tomate

Die mit *Glomus mosseae* inokulierten Varianten zeigten bezüglich der Mykorrhizierung keine signifikanten Unterschiede. Es zeigten sich nur bei den Varianten, die mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* inokuliert wurden, Infektionen. Die *Fol*-Variante hatte eine Befallshäufigkeit von 59,1%, die AMP+*Fol* von 68,4%. Die Mykorrhizierung reduzierte die Infektionsrate nicht. Alle Pflanzen waren zum Erntezeitpunkt vital (Tab. 2).

Tabelle 2: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Tomate (TT);

Behandlungen	AMP Kolonisierungsgrad in %[1]	Befallshäufigkeit Fusarium oxysporum in %[2]	Sterblichkeitsrate in %[2]
Kontrolle	0,00 a	0 a	0 a
Fol	0,00 a	59,1 b	0 a
Fob	0,00 a	0 a	0 a
AMF	1,00 ± 0,00 b	0 a	0 a
AMF + *Fol*	1,07 ± 0,26 b	68,4 b	0 a
AMF + *Fob*	1,07 ± 0,26 b	0 a	0 a

[1]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (ANOVA); [2]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (Chi Quadrat Test)

Dualkultur Tomate - Basilikum

Bei den Tomatenpflanzen der Tomate/Basilikum Kultur zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der oben beschriebenen Kultur. Die mit AMP inokulierten Varianten hatten eine gleich niedrige Mykorrhizierungsrate. Es wiesen nur Varianten, die mit dem *Fol* inokuliert wurden, Infektionen auf. Die *Fol*-Variante zeigte eine Befallshäufigkeit von 55%, die AMP+*Fol* von 50%. Die geringe Mykorrhizierung reduzierte die Infektionsrate nicht. Alle Pflanzen waren zum Erntezeitpunkt vital (Tab. 3).

Tabelle 3: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Tomate (TB);

Behandlungen	**AMP Kolonisierungsgrad in %[1]**	**Befallshäufigkeit Fusarium oxysporum in %[2]**	**Sterblichkeitsrate in %[2]**
Kontrolle	0,00 a	0 a	0 a
Fol	0,00 a	55 b	0 a
Fob	0,00 a	0 a	0 a
AMF	1,07 ± 0,26 b	0 a	0 a
AMF + *Fol*	1,07 ± 0,46 b	50 b	0 a
AMF + *Fob*	1,00 ± 0,00 b	0 a	0 a

[1]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (ANOVA); [2]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (Chi Quadrat Test)

4.1.2. Basilikum

Dualkultur Basilikum - Basilikum

Die mit *Glomus mosseae* inokulierten Varianten zeigten bezüglich der Mykorrhizierung keine signifikanten Unterschiede. Es waren nur bei den Varianten, die mit dem *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* inokuliert wurden, Infektionen auszumachen. Die *Fob*-Variante zeigte eine Befallshäufigkeit von 95%, die AMP+*Fob* von 65%. Daraus ließ sich schließen, dass der Mykorrhizapilz einen positiven Effekt auf die Pflanzenvitalität hatte. Die Sterblichkeitsrate war ebenfalls signifikant reduziert worden (Tab. 4).

Tabelle 4: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Basilikum (BB);

Behandlungen	AMP Kolonisierungsgrad in %[1]	Befallshäufigkeit Fusarium oxysporum in %[2]	Sterblichkeitsrate in %[2]
Kontrolle	0,00 a	0 a	0 a
Fol	0,00 a	0 a	0 a
Fob	0,00 a	95 b	90 b
AMF	2,27 ± 1,44 b	0 a	0 a
AMF + *Fol*	3,47 ± 1,68 b	0 a	0 a
AMF + *Fob*	3,92 ± 2,61 b	65 c	61,7 c

[1]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (ANOVA); [2]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (Chi Quadrat Test)

Dualkultur Tomate - Basilikum

Die Fusarien-Behandlungen führten zu einer unterschiedlichen Entwicklung der Mykorrhiza. Bei der AMP+*Fol*-Variante war das Wachstum gegenüber der AMP+*Fob*-Variante gehemmt worden. Ähnlich wie bei der Dualkultur BB konnte hier ein Trend zur Verringerung der Befallshäufigkeit und der Sterblichkeitsrate durch AMP beobachtet werden. Eine signifikante Reduzierung war jedoch nicht festgestellt worden (Tab. 5).

Tabelle 5: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Basilikum (TB);

Behandlungen	**AMP Kolonisierungsgrad in %[1]**	**Befallshäufigkeit Fusarium oxysporum in %[2]**	**Sterblichkeitsrate in %[2]**
Kontrolle	0,00 a	0 a	0 a
Fol	0,00 a	0 a	0 a
Fob	0,00 a	96,7 b	90 b
AMF	2,53 ± 1,55 bc	0 a	0 a
AMF + *Fol*	2,36 ± 0,50 b	0 a	0 a
AMF + *Fob*	4,08 ± 2,19 c	76,7 b	73,3 b

[1]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (ANOVA); [2]unterschiedliche Buchstaben repräsentieren signifikante Unterschiede (Chi Quadrat Test)

4.2. Biomasseproduktion

4.2.1. Tomate

Dualkultur Tomate - Tomate

Die Wurzeltrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 12).

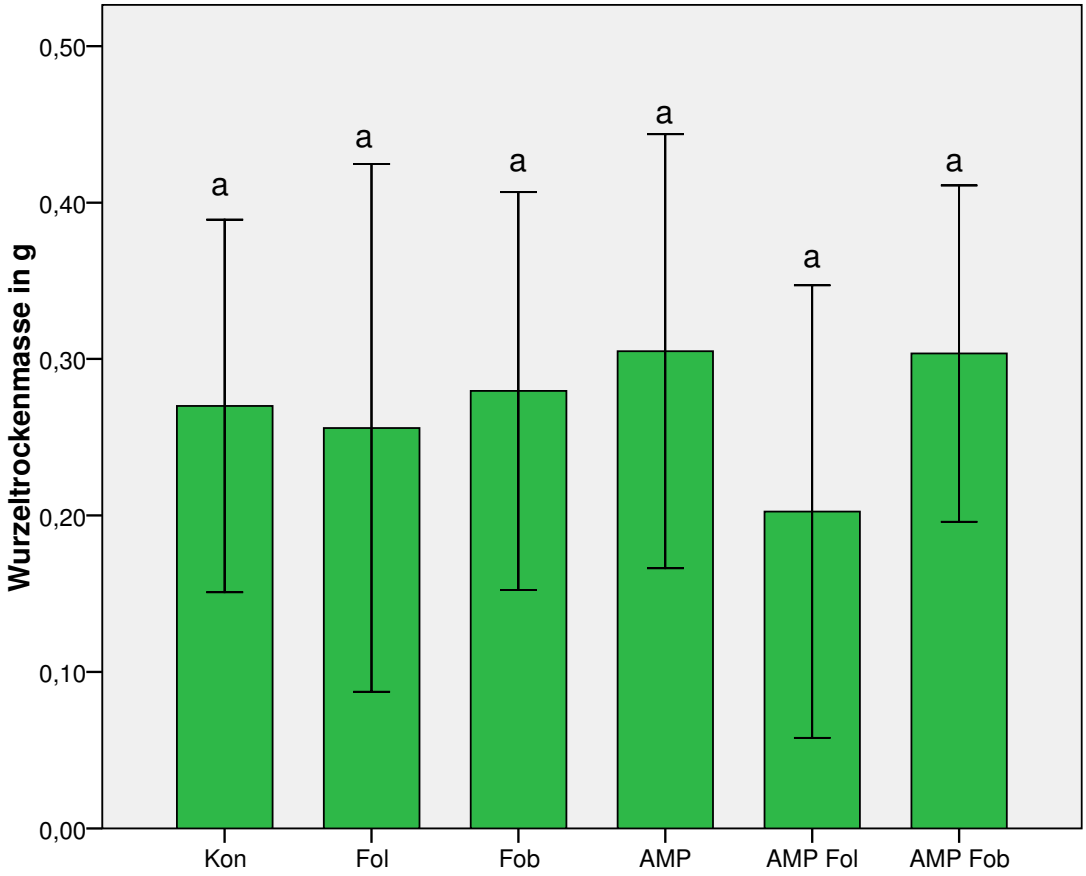

Abbildung 12: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT), (ANOVA, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die Sprosstrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 13).

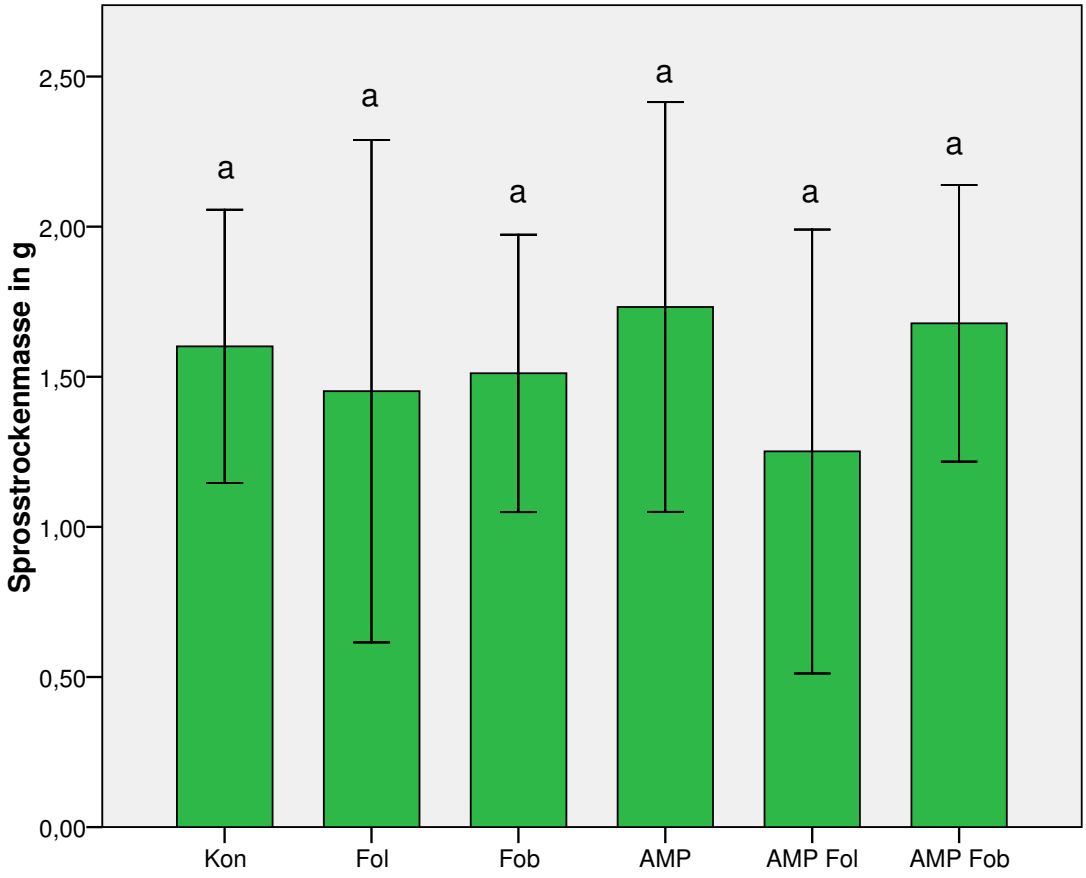

Abbildung 13: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT), (Kruskall Wallis Test, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Dualkultur Tomate - Basilikum

Die Wurzeltrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 14).

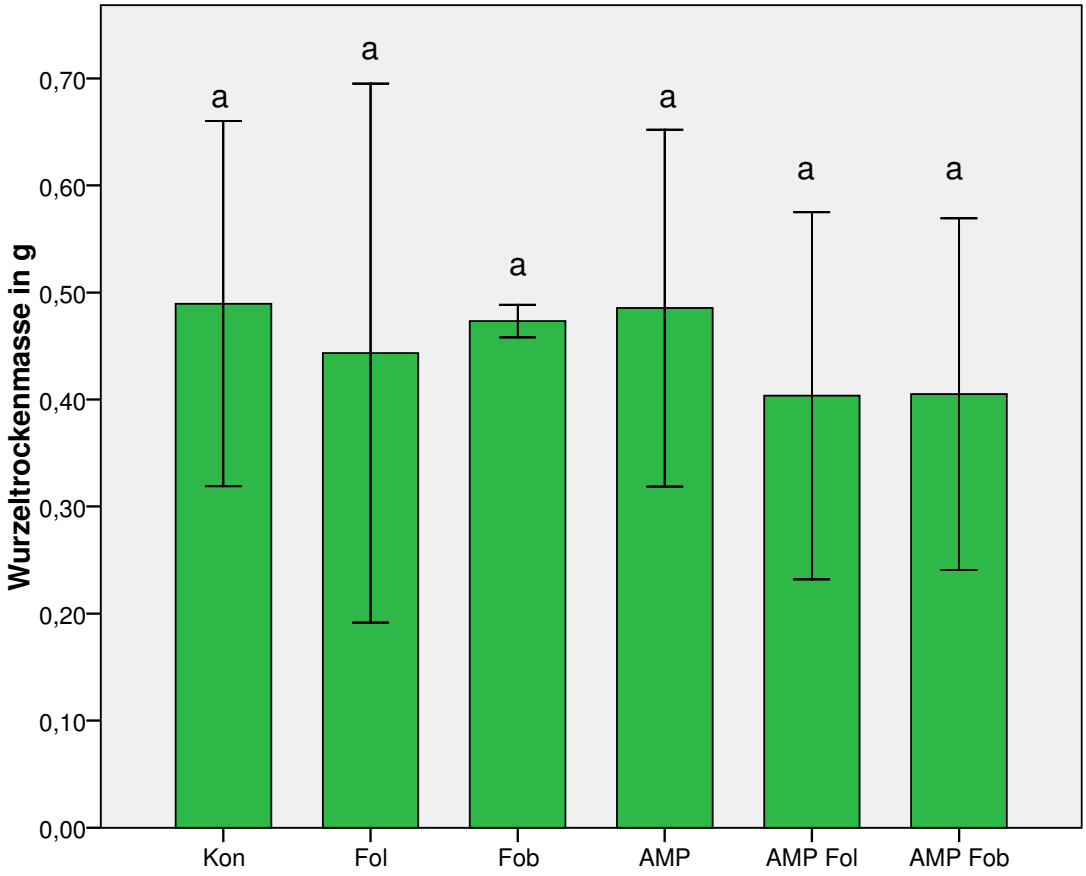

Abbildung 14: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsarianten bei Tomate (TB), (ANOVA, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die Sprosstrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 15).

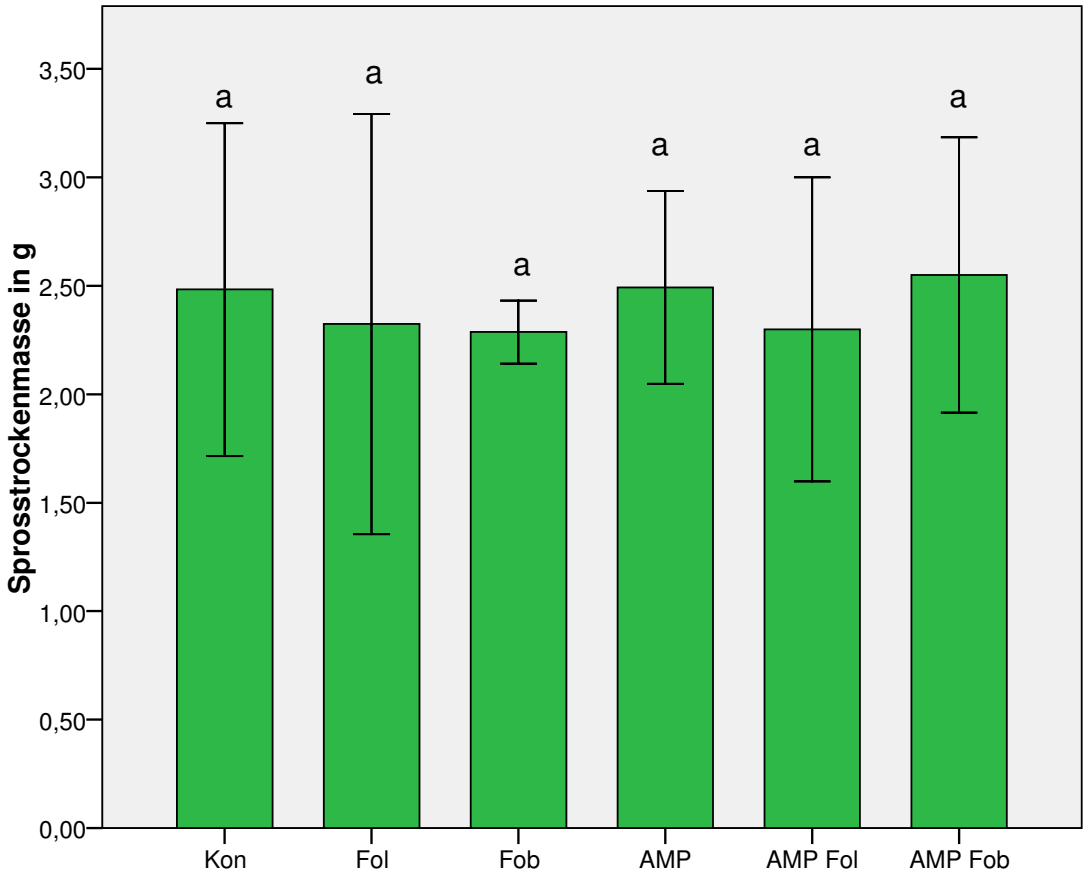

Abbildung 15: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB), (ANOVA, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

4.2.2. Basilikum

Dualkultur Basilikum - Basilikum

Die Pflanzen mit den höchsten Wurzeltrockenmassen waren bei AMP+*Fob*-Variante mit 0,18 g auszumachen, gefolgt von der *Fol*-Variante mit 0,16 g (Abb. 16). Das niedrigste Wurzelgewicht zeigte die *Fob*-Variante, welche sich signifikant von den Kon-, *Fol*-, AMP- und AMP+*Fob*-Behandlungen unterschied. Weiters unterschied sich die Trockenmasse der AMP+*Fol*-Pflanzen signifikant von deren der *Fol*- und AMP+*Fob*-Variante.

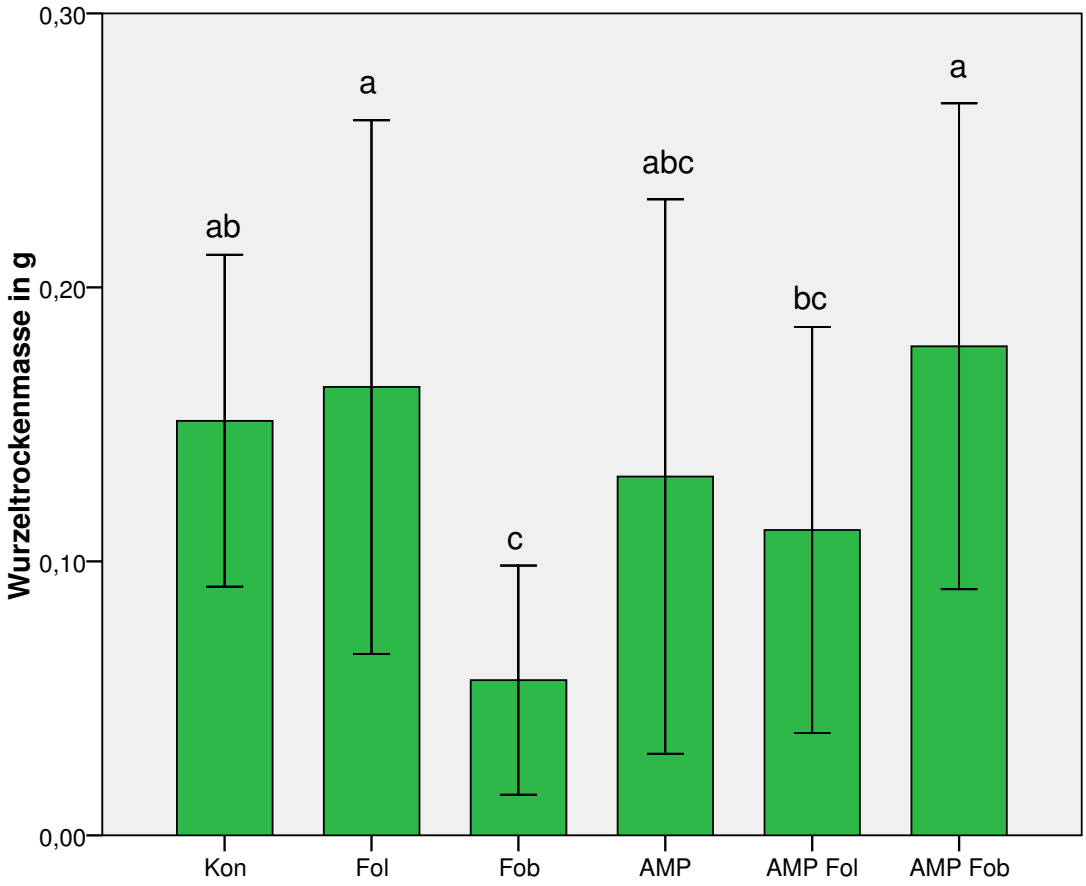

Abbildung 16: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB), (Mann Whitney U-Test, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die Sprosstrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 17).

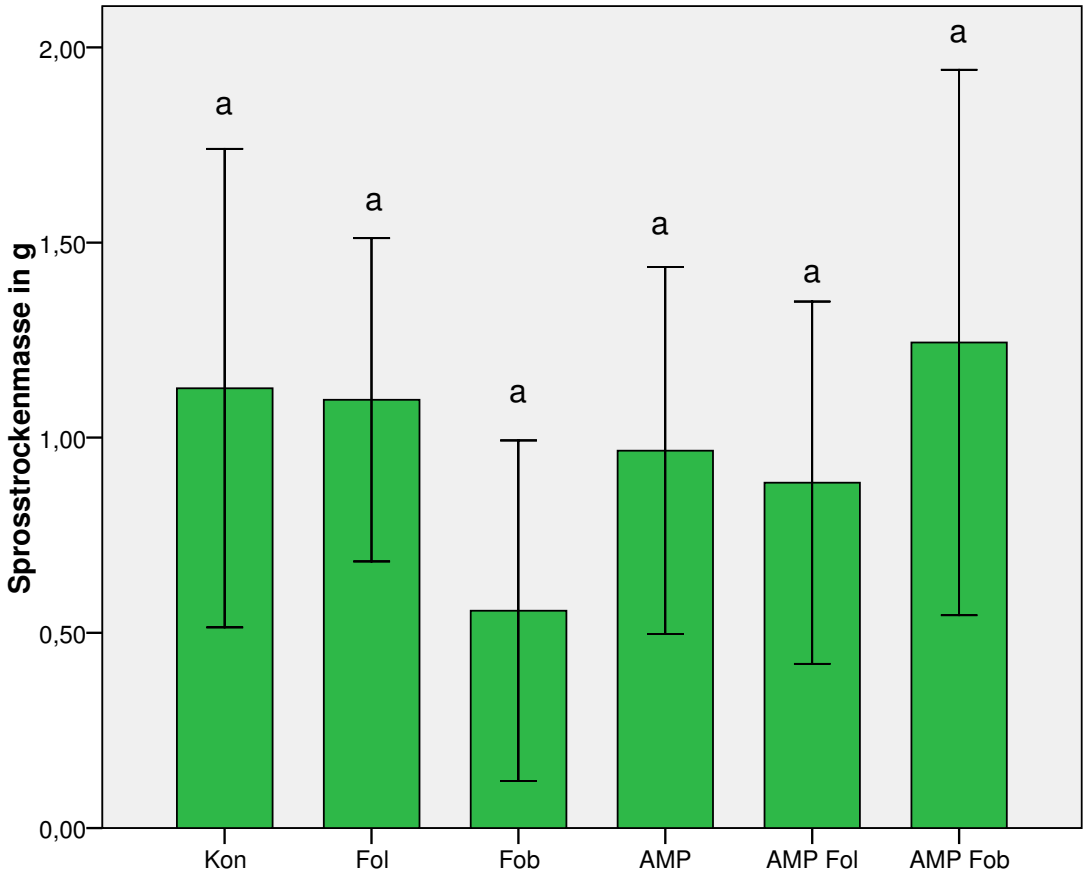

Abbildung 17: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB), (ANOVA, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Dualkultur Tomate - Basilikum

Die Wurzeltrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 18).

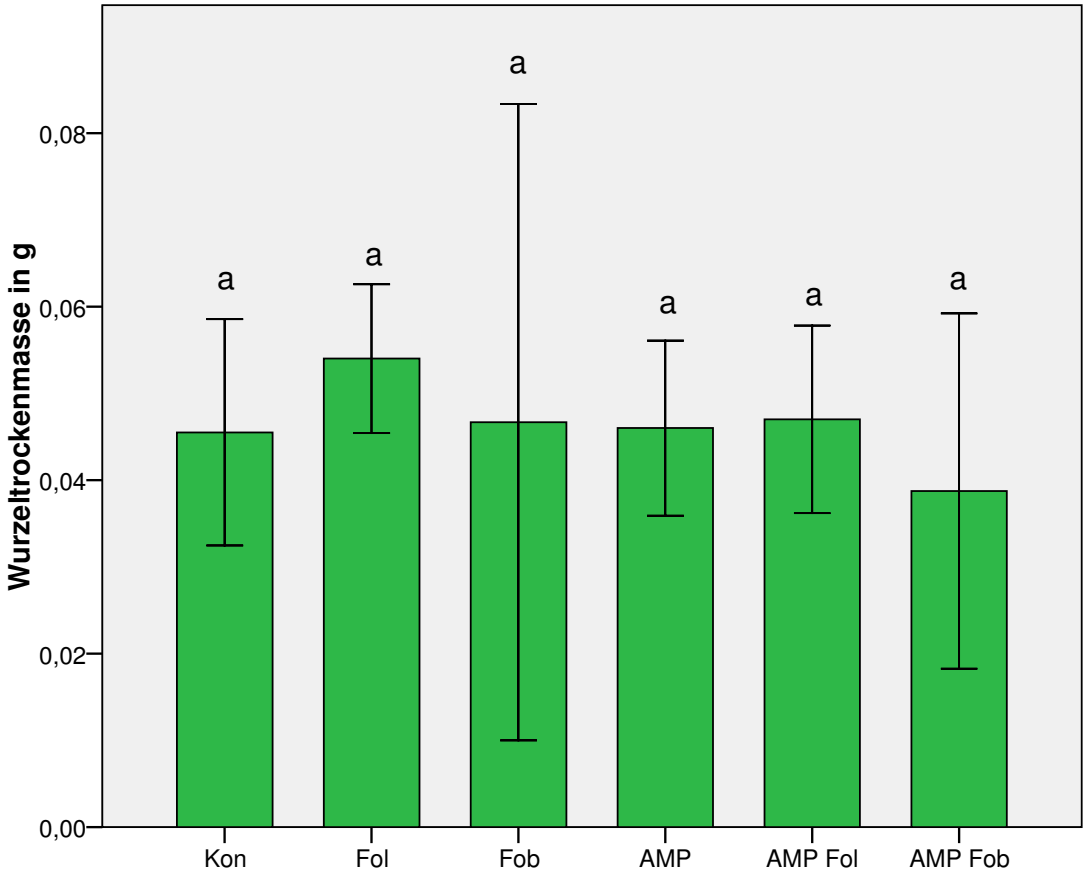

Abbildung 18: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB), (Kruskall Wallis-Test, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die Sprosstrockenmassen der Varianten unterschieden sich nicht signifikant untereinander (Abb. 19).

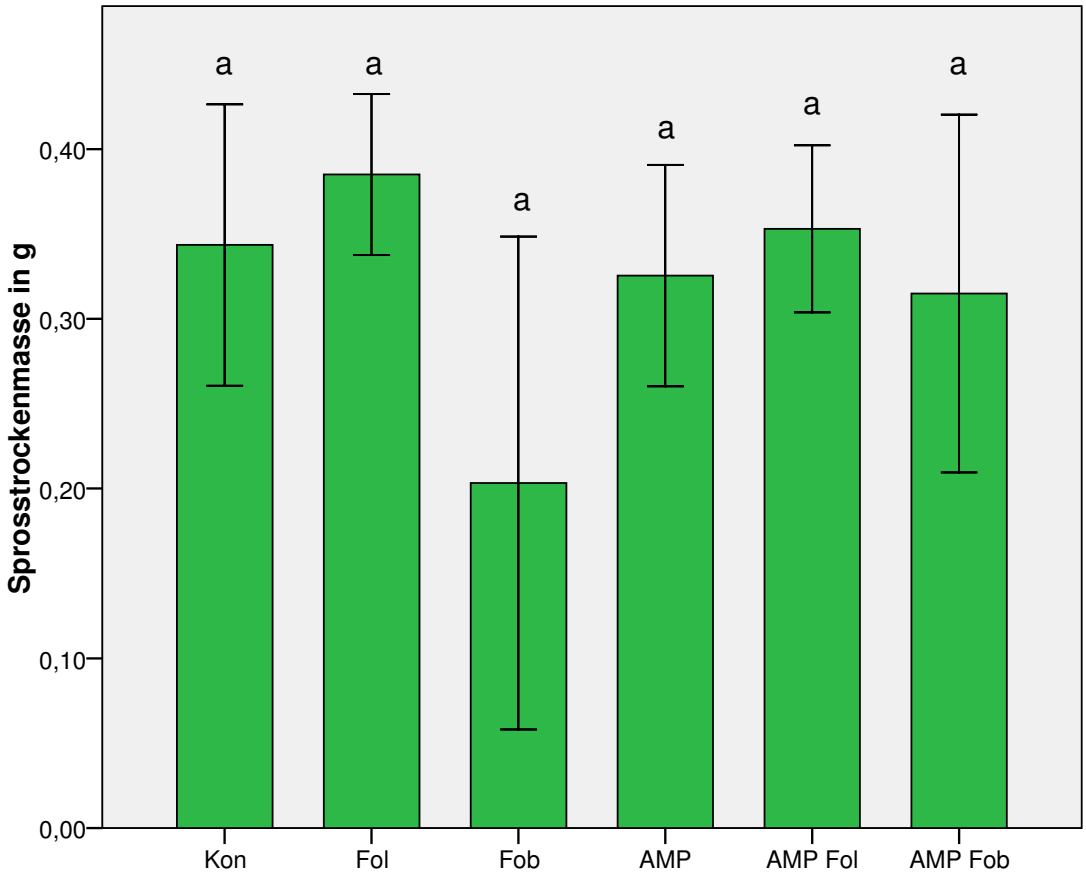

Abbildung 19: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB), (Kruskall Wallis-Test, α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

4.3. *Phenolische Inhaltsstoffe*

4.3.1. Tomate

Dualkultur Tomate - Tomate

Den höchsten Anteil an Phenolen wies die AMP-Variante auf mit einem Gehalt von 9,81 mg KS/g TM. Dieser Wert war signifikant unterschiedlich zu dem Phenolgehalt der AMP+Fol-Variante (8,51 mg KS/g TM) (Abb. 20). Die weiteren 4 Varianten unterschieden sich nicht signifikant von den vorher genannten.

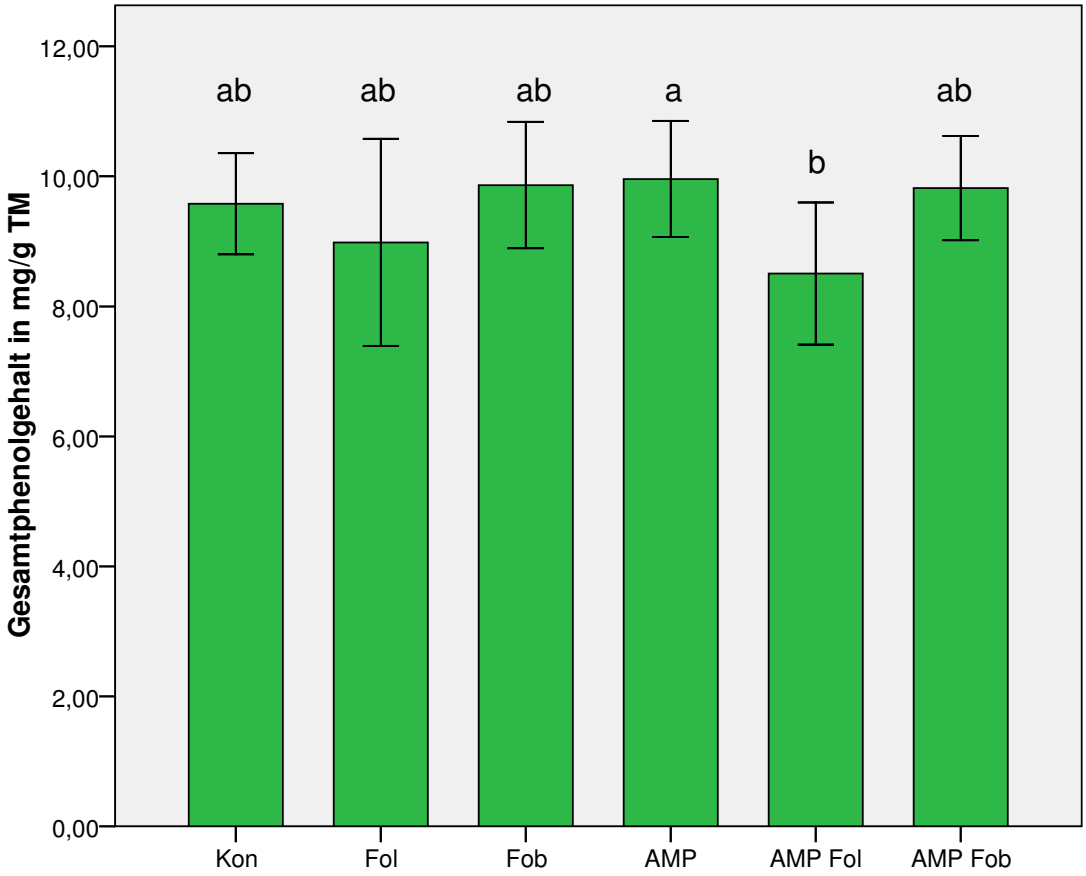

Abbildung 20: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT), unterschiedliche Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin, (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Tanningehalte in den Tomatenblättern gemessen werden (Abb. 21).

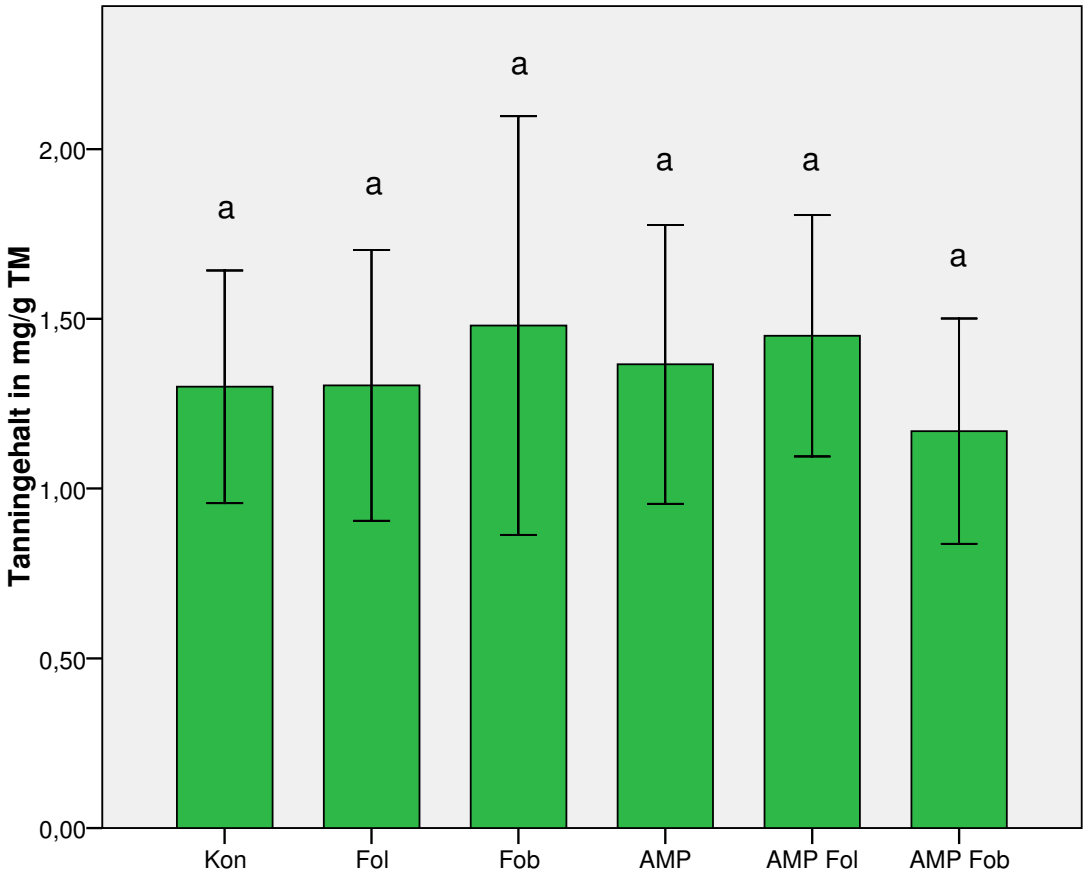

Abbildung 21: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Dualkultur Tomate - Basilikum

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Gesamtphenolgehalte in den Tomatenblättern gemessen werden (Abb. 22).

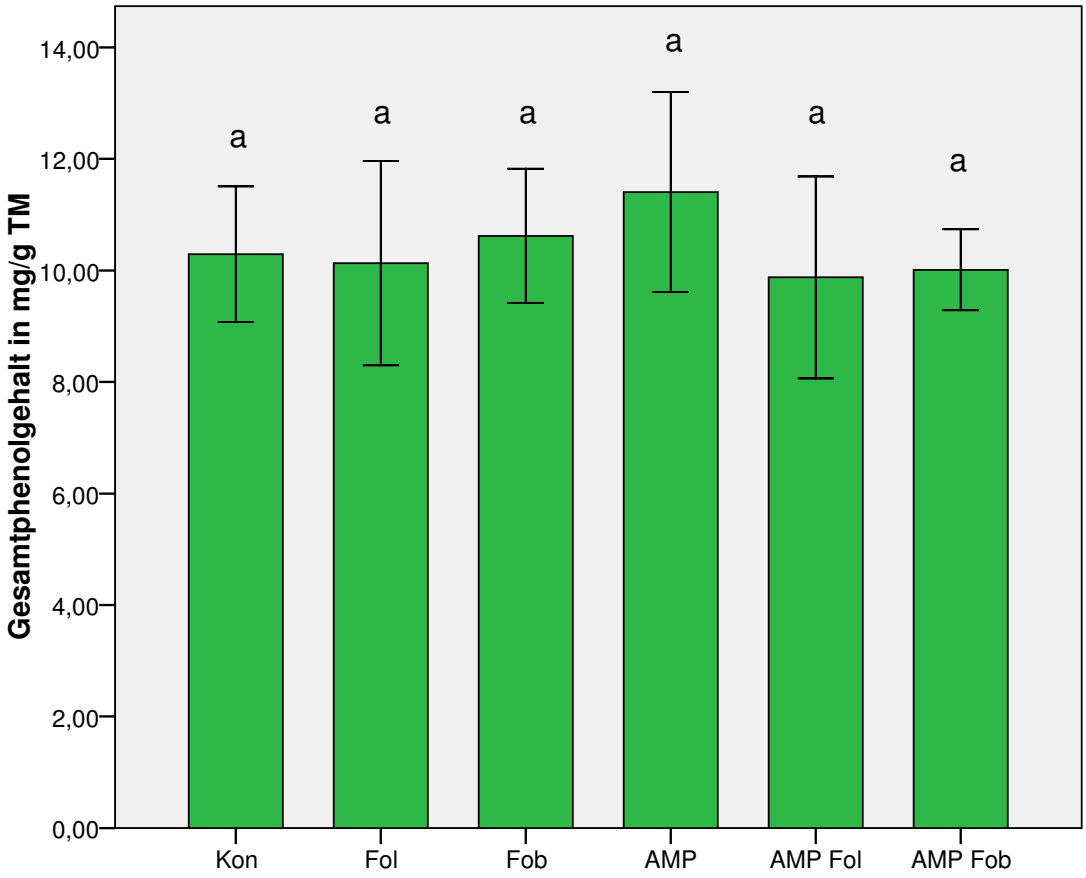

Abbildung 22: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Tanningehalte in den Tomatenblättern gemessen werden (Abb. 23).

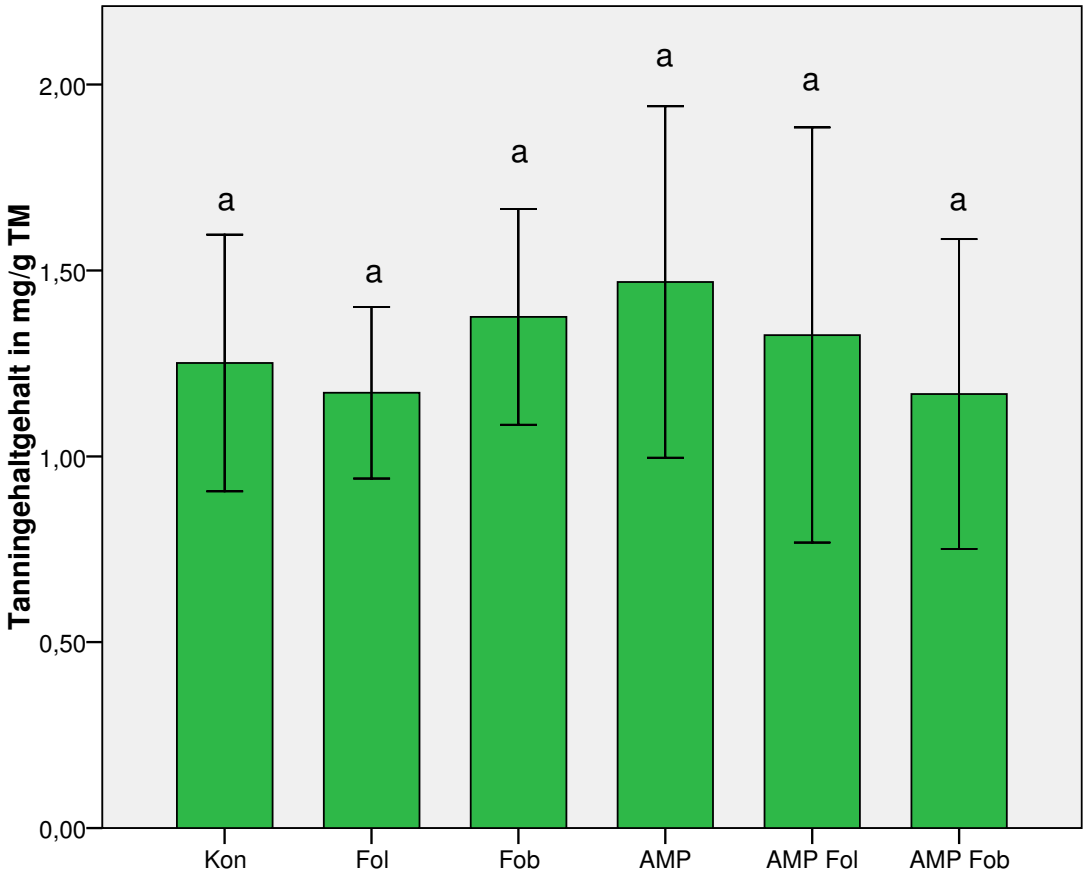

Abbildung 23: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

4.3.2. Basilikum

Wie schon im Kapitel Pflanzenvitalität erwähnt, kam es zu einer hohen Ausfallrate bei den mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* inokulierten Basilikumpflanzen. Aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Pflanzen konnten nicht genug Werte für eine statistisch abgesicherte Auswertung ermittelt werden. Die Ergebnisse der *Fob*-Behandlungen sind daher in der statistischen Auswertung der Kulturen BB und TB nicht berücksichtigt worden, sie erscheinen aber in den Diagrammen.

Dualkultur Basilikum - Basilikum

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Phenolgehalte in den Basilikumblättern gemessen werden (Abb. 24).

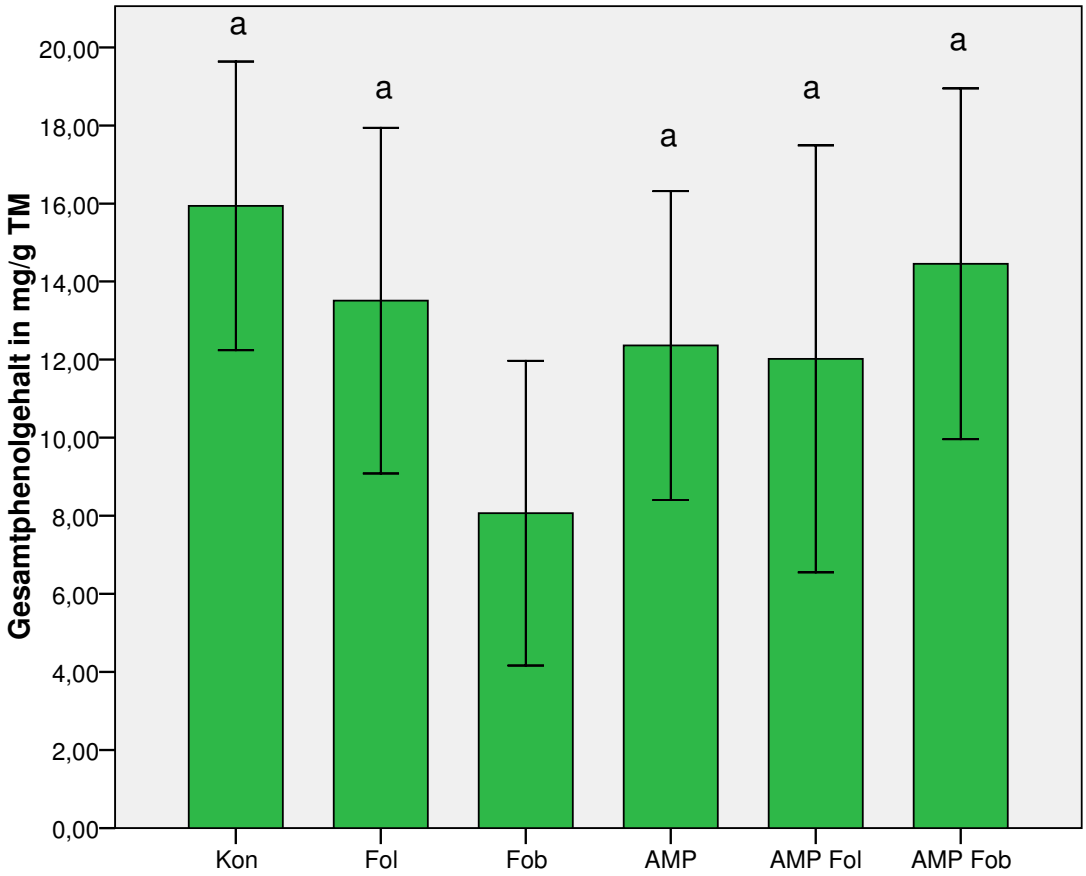

Abbildung 24: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Tanningehalte in den Basilikumblättern gemessen werden (Abb. 25).

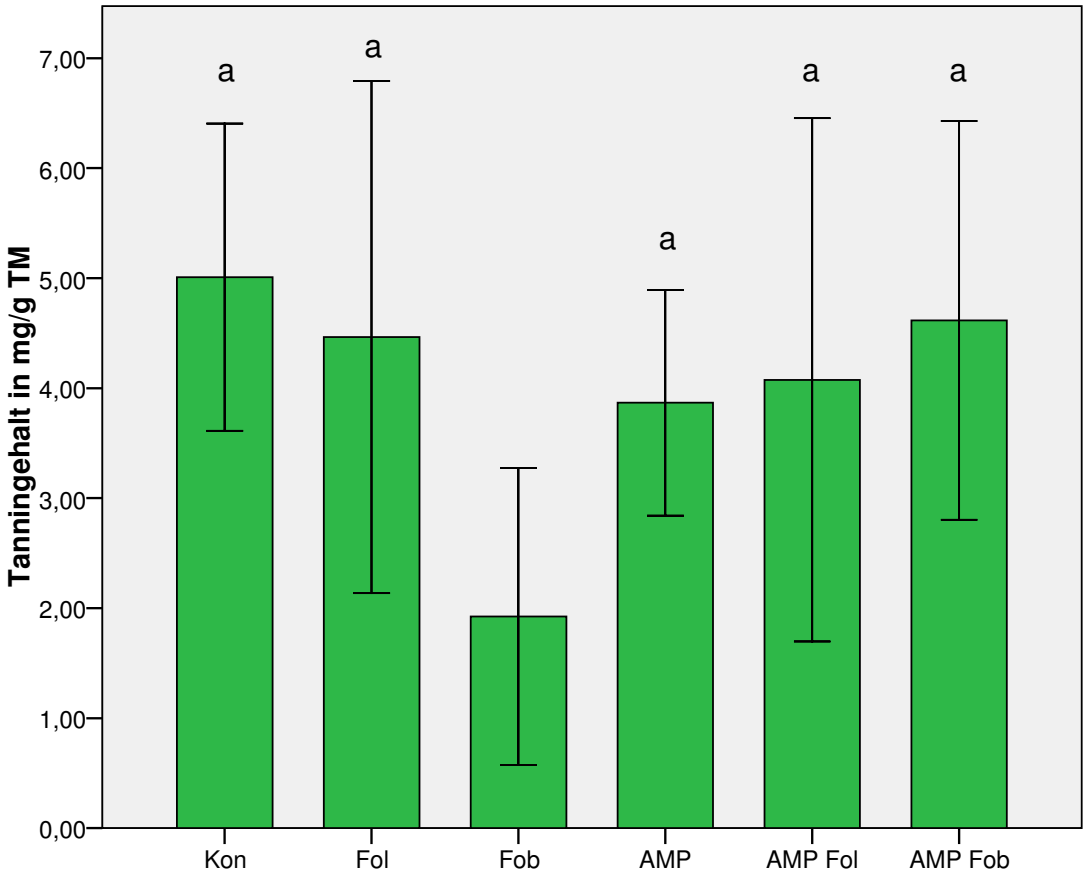

Abbildung 25: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Dualkultur Basilikum - Tomate

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Phenolgehalte in den Basilikumblättern gemessen werden (Abb. 26).

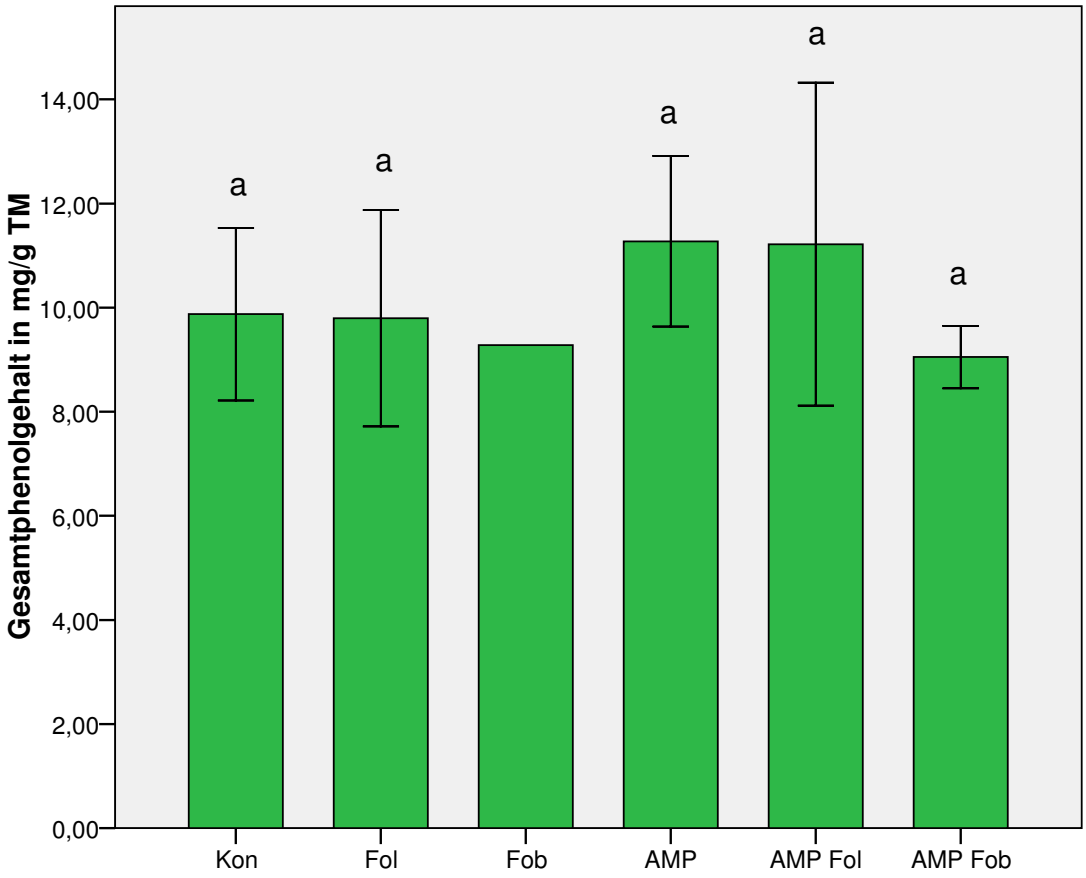

Abbildung 26: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

Zwischen den Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede der Tanningehalte in den Basilikumblättern gemessen werden (Abb. 27).

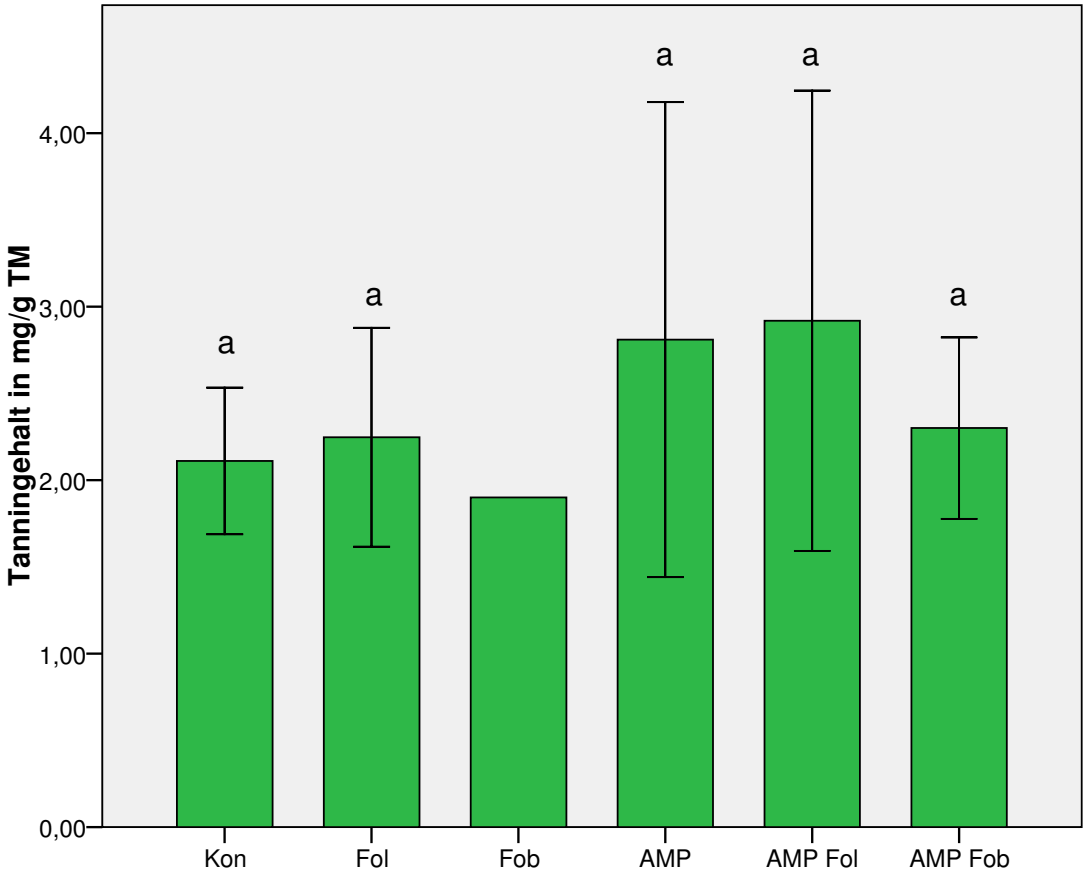

Abbildung 27: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB), (ANOVA; α = 0,05), (Mittelwert ± Standardabweichung)

4.4. Korrelation von Sprossmasse - Gesamtphenolgehalt

Bei den Pflanzen der Kulturkombination TT und BB konnte eine enge Korrelation zwischen Sprosstrockengewicht und Gesamtphenolgehalt beobachtet werden. Bei der Kombination Tomate/Basilikum blieb dieses Ergebnis aus (Tab. 6).

Tabelle 6: Korrelation Sprossmasse - Gesamtphenolgehalt

Kulturkombination	TT	BB	Tomate aus TB	Basilikum aus TB
Korrelationskoeffizient: Sprossmasse - Gesamtphenolgehalt	0,83	0,88	0,05	0,17

5. Diskussion

Mykorrhizapilze stellen eine direkte Verbindung zwischen Wirtspflanzen und Boden her und können dadurch die Nährstoff- und Wasseraufnahme erhöhen. Weiters dienen sie den Pflanzen auch bei der Pathogenabwehr (Cordier et al., 1998) (Pozo et al., 2002) (Xavier und Boyetchko, 2003). Azcon-Aguilar und Barea (1996) fassen folgende Mechanismen, die der Kontrolle von Pathogenen dienen könnten, zusammen: Konkurrenz um Photosyntheseprodukte, Konkurrenz um Kolonisierungsraum in der Wurzel, anatomische und morphologische Umgestaltung des Wurzelsystems und Aktivierung von Abwehrsystemen in der Pflanze.

In meiner Arbeit bestätigte sich diese biologische Schutzfunktion der Mykorrhizierung gegen Fusarium bei der Kulturkombination Basilikum/Basilikum (BB). Unter den mit *Fusarium oxysporum* f. sp. b*asilici (Fob)* infizierten Basilikumpflanzen zeigten jene, die ebenfalls mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz (AMP) *Glomus mosseae* mykorrhiziert wurden eine um 27 % niedrigere Sterblichkeitsrate. Die Infektionshäufigkeit, die durch Fob verursacht wurde, lag bei den mykorrhizierten Basilikumpflanzen (~3% Mykorrhizierungsgrad) wesentlich niedriger und konnte im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Basilikumpflanzen um 30% gesenkt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Mykorrhizierung von Basilikumpflanzen eine biologische Schutzfunktion gegen Fusarium aufweist. Ein ähnlicher Trend konnte bei Basilikum in der Kultur Tomate/Basilikum (TB) festgestellt werden. Die Infektionshäufigkeit und die Sterblichkeitsrate waren um 18% sowie 16% geringer bei der mit AMP behandelte Fob-Variante als gegenüber der reinen Fob-Variante. Die Unterschiede sind aber nicht signifikant unterschiedlich.

Bei den Pflanzen aus der Tomate/Tomate Kultur (TT) und Tomate/Basilikum Kultur (TB) zeigte die geringe Mykorrhizierung (1%) keine Auswirkungen auf den Infektionsgrad durch *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici (Fol)*.

Steinkellner (2011) zeigte bei Versuchen mit unterschiedlichen Tomatensorten, dass sich bei 7 von 10 Sorten der Einsatz von Mykorrhizapilzen nicht auf den Infektionsgrad durch *Fol* auswirkte. Auswirkungen auf den Infektionsgrad waren sortenspezifisch. Der Einfluss hing von den unterschiedlichen Genotypen ab. Außerdem könnten weitere Faktoren die Mykorrhizierung und den daraus

hervorgerufenen Schutzmechanismus beeinflussen, wie bei Vierheilig (2008) beobachtet wurde. Der Schutzeffekt gegen bodenbürtige Pathogene schien vor allem auch von biotischen Faktoren wie dem Genotyp des Mykorrhizapilzes und dem Mykorrhizierungsgrad abhängig zu sein.

Weites beobachtete Johnson (1997), dass bestimmte Bedingungen (Lichtstress, Düngerstress) zu einer Veränderung des Verhalten von Mykorrhizapilzen vom Symbionten zum Parasit führen können. Die Mykorrhizapilze entzogen der Pflanze mehr Kohlenstoffverbindungen als der Wirt durch den mittels zusätzlicher Nährstoffe angeregten Stoffwechsel wettmachen konnte. Ob biotischer Stress – wie durch Fusariumbefall verursacht – ebenfalls Auswirkungen auf die Mykorrhizaleistung und die Entwicklung der Pflanze nahmen kann, wird bei Johnson nicht eingegangen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte keine erhöhte Biomasseproduktion bei den AMP-Pflanzen im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen bei beiden Kulturen festgestellt werden. Dies könnte durch den niedrigen Mykorrhizierungsgrad (1-4%) erklärt werden. Garmendia (2012) beobachtete bei seiner Untersuchung, dass eine niedrige Mykorrhizierungsrate im Gegensatz zu einer hohen zu keiner Erhöhung der Biomasse der Pflanzen führte. Hingegen beschrieben zahlreichen andere Studien (Khaosaad et al., 2006), (Toussaint et al., 2008) eine positive Auswirkungen des AMP auf die Pflanzenmasse, bei diesen Untersuchungen war aber ein deutlich höherer Mykorrhizierungsgrad (40-50%) beobachtet worden, was bei dieser Arbeit nicht der Fall war. Weiters zeigte Steinkellner (2011) bei ihren Untersuchungen, dass bei verschiedene Sorten eine Mykorrhizierung der Wurzel nicht unbedingt mit einer Zunahme der Biomasse einhergehen muss. Auswirkungen auf die Biomasse waren sortenspezifisch. Der Einfluss hing - ähnlich wie oben beim Schutzeffekt erwähnt - von den unterschiedlichen Genotypen ab.

Fusariumbefall konnte bei den Tomatenpflanzen keine signifikant negativen Änderungen der Biomasse bewirken. Anders verhielt es sich bei Basilikum in der Dualkultur Basilikum/Basilikum. Hier wies die Variante AMP + Fob eine signifikant höhere Wurzelmasse als die reine Fob Variante auf. Hier zeigte sich der positive Einfluss des Mykorrhizapilzes, der sich auch wie weiter oben schon genannt auch auf die Sterblichkeitsrate auswirkte. Ein ähnlicher Trend konnte bei der Sprossmasse

beobachtet werden. Basilikumpflanzen aus der Kulturkombination Tomate/Basilikum wiesen keine Änderungen in der Biomasse auf.

Weiters war zu beobachten, dass Tomatenpflanzen in der Mischkultur mit Basilikum eine größere Biomasse erreicht hatten als in der reinen Tomatendualkultur, zugleich wiesen die Basilikumpflanzen in der Mischkultur kleinere Spross- und Wurzelmassen auf als in der Basilikumdualkultur. Obwohl die Basilikumsamen 1 Woche vor den Tomatensamen angezogen wurden und zum Pikiertermin daher älter waren, konnten sich die Tomatenpflanzen besser etablieren.

In Bezug auf den Gehalt von phenolischen Verbindungen konnte in meiner Arbeit nur vereinzelt Veränderung unter den Varianten festgestellt werden. Niedrige Werte des Gesamtphenolgehaltes wurden bei Varianten beobachtet, die mit Fusarium inokuliert worden sind. Darunter fallen Tomatenpflanzen aus der Kulturkombination TT, Basilikumpflanzen aus der Mischkultur TB und aus der Dualkultur BB die *Fob*-Variante. Bei Toussaint (2008) und Kranz (2009) konnten ähnliche Auswirkungen, die Reduzierung des Phenolgehalts durch Fusariumbefall, ausgemacht werden.

Bei der Kulturkombination TT war der Gesamtphenolgehalt AMP + *Fol*-Variante signifikant niedriger als die AMP-Variante, was wahrscheinlich durch den hohen Fusariumbefall (69%) verursacht worden war. Die *Fob*-Varianten der Basilikumkulturen wiesen niedrige Gesamtphenolgehalte auf. Es konnten aber nicht genug Werte (BB n=2, TB n=1) für eine statistisch abgesicherte Auswertung ermittelt werden, da aufgrund der Ausfallsrate nicht genug Pflanzenmaterial für eine umfassende chemische Analytik vorhanden war.

Bei den Pflanzen der Kulturkombination TT und BB konnte eine enge Korrelation zwischen Sprosstrockengewicht und Phenolgehalt beobachtet werden. Je höher die Sprossmasse, desto höher der Gesamtphenolgehalt, was auch Toussaint (2008) feststellen konnte. Bei der Kombination Tomate/Basilikum blieb dieses Ergebnis aus, anscheinend beeinflussten sich Tomate und Basilikum in Mischkultur gegenseitig in ihrer Entwicklung und dadurch die Biomasse und die Inhaltsstoffe.

Der Tanningehalt blieb trotz der unterschiedlichen Behandlungen bei den Tomatenkulturen sehr konstant. Bei den Basilikumkulturen ließ sich ein vergleichbares Ergebnis wie beim Gesamtphenolgehalt feststellen. Die mit *Fusarium*

inokulierten Pflanzen hatten einen niedrigen Tanningehalt. Signifikante Unterschiede konnten aber bei allen Kulturkombinationen nicht nachgewiesen werden.

Derzeit sind mir Arbeiten über eine durch biotischen Stress hervorgerufene Konzentrationsänderung des Tanningehalts nicht bekannt. Bialczyk (1998) konnte aber unter abiotischen Stressbedingungen - hervorgerufen durch Nadelstiche in den Tomatenblättern - eine Erhöhung des Tanningehalts zeigen.

Wie es zu einer Verringerung des Phenolgehalts kommen kann, wird folgend erklärt: Die Aktivierung der *Polyphenoloxidase* (PPO) könnte als ein möglicher den Phenolgehalt reduzierender Vorgang angesehen werden. Untersuchungen wiesen insbesondere auf die Bedeutung der PPO-Aktivität in der Nähe der Eindringungs- und Aufenthaltsorte von Pilzen hin. Durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schien die PPO besonders an der Abwehr von Pilzkrankheiten beteiligt zu sein. Die gestiegene Konzentration an ROS hatten Folin-Ciocalteu-Reagenz-reduzierende Stoffe (inklusive Phenole) oxidiert, wodurch diese ihre Fähigkeit zur Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz verloren haben (Huang et al., 2005). Die gleiche Reaktion der PPO-Aktivität konnten Mayer (2006) und Li (Li und Steffens, 2002) in Tomatenblättern auch durch eine bakterielle Infektion mit Pseudomonas nachweisen.

Eine weitere Erklärung für die Reduzierung des Phenolgehalts beschrieb Kuzniak (1999). In Tomatenblättern wurde nach einer Behandlung mit Fusarinsäure - hierbei handelt es sich um ein nicht-wirtspezifisches Toxin, welches von vielen pathogenen Fusariumstämmen ausgeschüttet wird - untersucht, ob sich die Bildung von ROS verändert. Die Anwendung der Fusarinsäure führte zu einer anhaltenden Bildung von Sauerstoffradikalen und somit zu einer Reduzierung von oxidierbaren Stoffe wie Phenole.

Welche Rolle dieser Ausschüttung an Sauerstoffradikale in der Pflanze einnimmt ist noch nicht geklärt. Ob ROS direkt auf das Pathogen oder die Wirtszellen (in der Form der bekannten Hypersensitiven Reaktion) einwirken, ist noch unklar (Torres et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Pflanzen sehr komplex sind. Die Ergebnisse können daher nur einen kleinen Einblick in die Interaktionen geben.

Wie im Kapitel 2.3.3 angeführt spielt sich eine Vielzahl an Vorgängen bei der Pathogenabwehr in der Pflanze ab. Im Versuch war zwar eine Veränderung der Blattinhaltsstoffe teilweise festzustellen, für eine präzisere Interpretation bedarf es jedoch noch zusätzlicher Abklärungen. Weitere Forschungsarbeit könnte auf eine spezifischere Analytik von Blattinhaltsstoffe fokussiert werden, in der einzelne Moleküle (Kaffeesäure, Rishitin) untersucht werden. Zudem könnten weiterführende Versuche auch eine Optimierung der Untersuchungsmethode zum Ziel haben. Auch eine Extraktion aus frischem Blattmaterial könnte gegenüber der Extraktion von getrocknetem Blattmaterial eine Verbesserung der Ergebnisse bewirken.

Weiters sind die gewonnen Daten unter dem Aspekt der Inokulums bedingten geringen Mykorrhizierungsrate der Versuchspflanzen zu sehen. Für eine genauere Bewertung empfehle ich weiterführende Versuche mit anderen Mykorrhizapilzen beziehungsweise Mischpräparat aus Mykorrhizapilzen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Zeigt die Kolonisierung von Tomaten- und Basilikumwurzeln mit *Glomus mosseae* bzw. die Infektion mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* Effekte in der Pflanzenvitalität?
- Wie wirkt sich die Kolonisierung der Wurzeln mit *Glomus mosseae* bzw. die Infektion mit *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* und *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* auf die Biomasse bei Tomate und Basilikum aus?
- Führen Mykorrhizierung und Fusariumbefall zu biochemischen Veränderungen (phenolische Verbindungen) bei Tomate und Basilikum?

Um folgende Fragestellungen anhand der Versuchspflanze Tomate und Basilikum in Co-Kultur zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit 18 verschiedenen Behandlungsvarianten angelegt.

Im Pflanzenalter von 12 Wochen wurde die Ernte der Basilikumpflanzen durchgeführt. Bei der Ernte wurden Infektionsrate, Sterblichkeitsrate und Frischgewicht von Spross und Wurzel erhoben. Der Mykorrhizierungsgrad und das Trockenmasse von Spross und Wurzel wurden im Laufe der Arbeiten bestimmt. Aus dem Pflanzentrockenmaterial wurden die Messung des Gesamtphenolgehaltes und des Tanningehaltes mittels eines abgeänderten Verfahrens nach der Methode von Folin-Ciocalteau durchgeführt.

Die geringere Sterblichkeitsrate und die verminderte Infektionsrate der mykorrhizierten *Fusarium*-Variante ließ auf eine positive Wirkung der Mykorrhizierung gegen *Fob* bei Basilikumpflanzen schließen, bei den Tomatenpflanzen konnte dies nicht festgestellt werden. Die Symbiose zwischen der Versuchspflanzen und dem AMP *Glomus mosseae* bewirkte keine verstärkte Biomasseproduktion, allein das *Fusarium* senkte diese. Laut den Analysen der Inhaltsstoffe der Blätter der verschiedenen Versuchsvarianten gab es keinen eindeutigen Hinweis auf eine vermehrte Produktion an phenolischen Verbindungen bei mykorrhizierten Pflanzen. Der Gesamtphenolgehalt und der Tanningehalt waren bei mykorrhizierten Pflanzen

im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen nicht signifikant verändert. Meine Studie ergab somit, dass sowohl Mykorrhizierung als auch Fusariumbefall der Basilikumpflanzen zu keinen eindeutige Unterschiede in der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe führen. Hingegen wiesen meine Untersuchungen darauf hin, dass die Mykorrhizierung der Basilikumpflanze einen gewissen Schutz vor dem Pathogen *Fob* bot.

Aufgrund der Resultate meines Versuches bin ich der Ansicht, dass in der Pflanzenproduktion der Einsatz von Mykorrhizapräparaten zukünftig eine Rolle spielen kann. Vorteile einer pflanzenbaulichen Nutzung von Mykorrhizasymbiosen können auf ökologischer Ebene gesehen werden. Eine erhöhte Pflanzenvitalität aufgrund der Mykorrhizierung kann zu einem verminderten Einsatz an Pflanzenschutzmitteln in der Landwirtschaft führen. In der Zukunft wird eine Verminderung des Einsatzes von Agrochemikalien in die Kulturlandschaft weiter in den Mittelpunkt der öffentlichen Interesse rücken, dabei soll dem Stellenwert der arbuskuläre Mykorrhiza als Komponente einer nachhaltigen Landwirtschaft eine höhere Beachtung geschenkt werden.

7. Verzeichnisse

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikrokonidien, Makrokonidien und Chlamydosporen von *Fusarium oxysporum* 4

Abbildung 2: Verbraung des Gefäßsystems bei Basilikum 4

Abbildung 3: Welkeerscheinung bei Basilikum 4

Abbildung 4: Unilaterale Gelbverfärbung des Blattes bei Tomate 5

Abbildung 5: Braune Verfärbungen an den Blättern bei Basilikum 5

Abbildung 6: Vesikeln, Arbuskeln und interradikale Hyphen der arbuskulären Mykorrhiza 9

Abbildung 7: Versuchspflanzen im Glashaus mit Beleuchtung 19

Abbildung 8: Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 21

Abbildung 9: Blaufärbung des Folin-Ciocalteu-Reagenz bei ansteigender Phenolkonzentration 22

Abbildung 10: Spektrophotometer 22

Abbildung 11: Kalibrationsgerade 23

Abbildung 12: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT) 30

Abbildung 13: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT) 31

Abbildung 14: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsarianten bei Tomate (TB) 32

Abbildung 15: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB) 33

Abbildung 16: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB) 34

Abbildung 17: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB) 35

Abbildung 18: Wurzeltrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB) 36

Abbildung 19: Sprosstrockenmasse der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB) 37

Abbildung 20: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT) 38

Abbildung 21: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TT) 39

Abbildung 22: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB) 40

Abbildung 23: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Tomate (TB), ... 41

Abbildung 24: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB) 43

Abbildung 25: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (BB) 44

Abbildung 26: Gesamtphenolgehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB) 45

Abbildung 27: Tanningehalt der verschiedenen Versuchsvarianten bei Basilikum (TB) 46

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kalibrationskurve 23

Tabelle 2: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Tomate (TT); 26

Tabelle 3: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Tomate (TB); 27

Tabelle 4: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Basilikum (BB); 28

Tabelle 5: Mykorrhizierungsgrad, Befallshäufigkeit und Sterblichkeitsrate der einzelnen Behandlungen bei Basilikum (TB); 29

Tabelle 6: Korrelation Sprossmasse - Gesamtphenolgehalt 47

7.3. Literaturverzeichnis

Agrios, G., 2004. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6, 457-464.

Barker, S.J., Tagu, D., Delp, G., 1998. Regulation of root und fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. Plant Physiologist 116**,** 1201-1207.

Bialczyk, J., Lechowski, Z., Libik, A., 1998. Modification of tannin concentration by abiotic factors in *Lycopersicon esculentum*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 105**,** 264-273.

Blancard, D., 1991. A colour atlas of tomato diseases. Wolfe Verlag, London.

Bonfante, P., Perotto, S., 1995. Strategies of abuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytologist 130**,** 3-21.

Börner, H., 2009. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Springer Verlag, Berlin.

Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi, S., Gianinazz-Pearson, V., 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to Phytoplitora parasitica induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant-Microbe Interactions 11, 1017-1028.

Dermoumi, H., 2008. Bestimmungsbuch für Pilze in der Medizin. Lehmanns Media, Berlin.

Fravel, D., Larkin, R., 2001. Reduction of *Fusarium* wilt of hydroponically grown basil by Fusarium oxysporum strain CS-20. Crop Protection 21**,** 539–543.

Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C., 2002. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157**,** 493 - 502.

Gamliel, A., Katan, T., Yunis, H., 1996. *Fusarium* wilt and crown rot of sweet basil: Involvment of soilbonre and airborne inoculum. Phytopathology 56**,** 56-62.

Garmendia, I., Mangas, V.J., 2012. Application of arbuscular Mycorrhizal fungi on the production of cut Flower Roses under commercial-like conditions. Spanish Journal of Agricultural Research 10, 166-174.

Giovanetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84**,** 489-500.

Huang, B., Ou, B., Prior, R., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Agricultural and Food Chemistry 53**,** 1841-1856.

Johnson, N., Graham, J., 1997. Functioning of mycorrhizal associtions along the mutualism-parasitism continuum. New Phytologist 135**,** 575-585.

Khaosaad, T., Vierheilig, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K., Novak, J., 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano. Mycorrhiza 16**,** 443-446.

Kranz, D., 2009. Veränderung der Inhaltsstoffe von Tomatenblättern nach Inokulation mit bodenbürtigen pathogenen Pilzen und ihren biologischen Gegenspielern. Institut für Pflanzenschutz, Universität für Bodenkultur, Wien.

Kuzniak, E., Patykowski, J., Urbanek, H., 1999. Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment. Journal of Phytopathology 147**,** 385-390.

Larkin, R., Fravel, D., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant disease 82**,** 1022-1028.

Li, L., Steffens, J., 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215**,** 239-247.

Mandeel, Q., Baker, R., 1991. Mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81**,** 462-469.

Matta, A., 1989. Induced resistance to *Fusarium* wilt diseases. Vascular wilt diseases of plants – basic studies and control. Springer Verlag, Berlin, 175–196.

Mayer, A., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going Places? Phytochemistry 67**,** 2318-2331.

Olivain, C., Alabouvette, C., 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. New Phytologist 141**,** 497-510.

Pharmacopoea, 1998. Allgemeine Methoden Kapitel 2.8.14. Pharmacopoea europaea.

Pozo, M., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J., Azcon-Aguilar, C., 2002. Localized versus systemic effect of abruscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. Journal of Experimental Botany 53**,** 525-534.

Remy, W., Taylor, T., 1994. 400-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. 91**,** 11841-11843.

Richter, G., 1996. Biochemie der Pflanze. Georg Thieme Verlag, New York.

Rimpler, H., 1990. Biogene Arzneistoffe. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Schössler, E., 1997. Allgemeine Phytopathologie. Georg Thieme Verlag, New York.

Schüßler, A., 2009. Struktur, Funktion und Ökologie der arbuskulären Mykorrhiza. Rundgespräche der Kommission für Ökologie. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 97-108.

Serrano, J., 2009. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Molecur Nutrients and Food Research 53**,** 310-329.

Simon, L., Lalonde, M., Bruns, T., 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. Applied and Environmental Microbiology 58**,** 291-295.

Singleton, V., 1999. Analysis of total phenols and other antioxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 152-178.

Smith, S., Read, D., 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Elsevier, Amsterdam.

Steinkellner, S., Hage-Ahmed, K., Garcia-Garrido, J., Illana, A., Ocampo, J., Vierheilig, H., 2011. A comparison of wild type, old and modern tomato cultivars in the interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mycorrhiza 3**,** 189-194.

Strack, D., 2001. Die arbuskuläre Mykorrhiza: Eine unterirdische Lebensgemeinschaft. Biologie unserer Zeit 31**,** 286-295.

Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiology 141**,** 373-378.

Toussaint, J., Kraml, M., Nell, M., 2008. Effect of *Glomus mosseae* on concentrations of rosmarinic and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*. Plant Pathology 57**,** 1109–1116.

Vierheilig, H., 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular - mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology 64**,** 5004-5007.

Vierheilig, H., Steinkellner, S., Khaosaad, T., Garcia-Garrido, J., 2008. The biocontrol effect of mycorrhization on soil-borne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects?, Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Springer-Verlag, Heidelberg, 307-320.

Xavier, L., Boyetchko, S., 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in plant disease control. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, 183-194.