

Iris MATSCHL, Bakk. rer. nat.

Molekulares Monitoring von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 und *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB bei Zuckerrüben

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

der Studienrichtung Molekulare Mikrobiologie

an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Technische Universität Graz



unter der Betreuung von

Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. Gabriele Berg

Institut für Umweltbiotechnologie

Technische Universität Graz

veröffentlicht im September 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Bedanken, die während der gesamten Arbeit über stets an meiner Seite standen und somit einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Masterarbeit beigetragen haben.

Mein spezieller Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Gabriele Berg, die mir es erst ermöglichte diese Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und für jegliche wissenschaftliche Beratung, die ich von ihr erhalten habe.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Christin Zachow und Dr. Henry Müller für die dynamische wissenschaftliche Unterstützung im Laufe meiner gesamten praktischen Arbeit bedanken sowie der fachkenntlichen Beratung bei der Interpretation meiner Ergebnisse.

Ein großes Dankeschön widme ich auch der gesamten Arbeitsgruppe für die außergewöhnlich herzliche Zusammenarbeit, wobei ich mich speziell an die aufopfernde Hilfe bei meiner Probenahme sowie Probenaufarbeitung in Ottmaring zurückerinnere.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben und mir bei all meinen Entscheidungen die notwendige Unterstützung gegeben haben und beim Erreichen meiner Ziele entscheidend mitgeholfen haben.

Abstract

Due to the enormous demand for sugar and the development of biotechnological processes, the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) gained in the last decades in Europe an industrial importance. *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB, a soil-borne plant pathogen, which can lead to root- and plant corruption is considered to be particularly aggressive towards sugar beets and is therefore the main problem in beet cultivation. It is responsible for high economic yield losses in sugar production. In order to decimate the yield losses in the most environmentally friendly way, this work was devoted to the investigation and the effectiveness of biological control strains (Biological Control Agents, BCAs). The main focus of interest was on the antagonist *Pseudomonas poae* RE* 1-1-14, which colonizes plants to promote growth and health of plants.

In laboratory studies, rhizosphere- and soil samples of a *Rhizoctonia*-susceptible (BERETTA) and a tolerant (JENNA KWS) cultivar of sugar beet were analyzed and evaluated with different molecular biological methods. Results of the Single Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis of the bacterial 16S rRNA gene region of bacteria and quantitative PCRs with strain-specific probes gave an impression of the influence of artificially enriched microorganisms on a natural system and the change of the concentration of *Rhizoctonia solani* and *Pseudomonas poae* over time. Further, field trials allowed a direct comparison with other cultivars and testing the efficiency of the antagonist.

Zusammenfassung

Aufgrund des enormen Zuckerbedarfs und der Weiterentwicklung biotechnologischer Prozesse gewann die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) in den letzten Jahrzehnten europaweit an industriellem Stellenwert. *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB, ein bodenbürtiges Pflanzenpathogen, welches zur Wurzel- und Jungpflanzenfäule führen kann, gilt als besonders aggressiv gegenüber Zuckerrüben und ist somit Hauptproblem im Rübenanbau und verantwortlich für hohe wirtschaftliche Ertragsverluste in der Zuckerrübenproduktion. Um die Ertragseinbußen auf möglichst umweltfreundliche Weise zu dezimieren, widmete sich diese Arbeit der Untersuchung und der Effizienz biologischer Kontrollstämme (Biological Control Agents, BCAs). Das Hauptaugenmerk richtete sich hierbei auf den Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14, der bereits in vorangegangenen Arbeiten seine Wirksamkeit, Pflanzen zu besiedeln und durch verschiedene Mechanismen das Wachstum und die Gesundheit von Pflanzen zu fördern, unter Beweis stellte.

Zu den Untersuchungen im Labor wurden Rhizosphärenproben zweier Zuckerrübenkultivare als auch Bodenproben mittels unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden analysiert. Die Ergebnisse der Single Strand Conformation Polymorphism Elektrophorese der 16S rRNA Genregion von Bakterien sowie der quantitativen PCR vermittelten einen Eindruck über die Einflussnahme künstlich angereicherter Mikroorganismen auf ein natürliches System als auch die Abundanzveränderung von *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB und *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 im Laufe der Zeit. Desweiteren erlaubten Feldversuche im direkten Vergleich mit anderen Behandlungen die Effizienz des Antagonisten auf den Prüfstand zu legen.

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Beta vulgaris</i> L.	1
1.2 Phytopathogene.....	1
1.2.1 <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.....	1
1.3 Alternative Methoden zum Pflanzenschutz in der Landwirtschaft	4
1.3.1 Pflanzenassoziierte Mikroorganismen	4
1.3.2 Biological Control Agents (BCAs).....	5
1.4 Aufgabenstellung	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Übersicht	8
2.2 Herstellernachweis	9
2.3 Zusammensetzungen der Nährmedien	9
2.4 Probenahme	10
2.4.1 Extraktion der DNA.....	11
2.5 Kultivierungsabhängige Analyse der Mikroorganismen	11
2.5.1 Kultivierung von <i>Rhizoctonia solani</i> auf Agarplatten	12
2.5.2 Identifizierung von <i>Rhizoctonia solani</i>	12
2.5.3 BOX-PCR	14
2.6 Kultivierungsunabhängige Analyse von Mikroorganismen	15
2.6.1 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	15
2.6.2 Quantitative Real-Time PCR	24
2.7 <i>Ad Planta</i> -Versuche	30
2.7.1 Monitoring von <i>Pseudomonas poae</i> RE*1-1-14 in KWS-Saatgut	31
2.7.2 Monitoring von <i>Pseudomonas poae</i> RE*1-1-14 in sterilen Keimtaschen	31
2.7.3 Monitoring von <i>Pseudomonas poae</i> RE*1-1-14 in unsteriler Erde.....	32
2.8 Direkte Arbeiten am Feld	32
2.8.1 Zählung	33

Inhaltsverzeichnis

2.8.2 Bonitur	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Ergebnisse der Kultivierungsabhängige Analyse von Mikroorganismen.....	35
3.1.1 Genotypische Identifizierung des Pilz-Isolates vom Feld mittels BOX-PCR.....	35
3.2 Ergebnisse der Kultivierungsunabhängigen Analyse der Mikroorganismen.....	36
3.2.1 Analyse der mikrobiellen Biodiversität mittels SSCP.....	36
3.2.2 Analyse von <i>Pseudomonas poae</i> RE*1-1-14 mittels SSCP.....	44
3.2.3 Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR.....	46
3.3 Feldarbeiten.....	54
3.3.1 Ergebnisse der Zählungen.....	55
3.3.2 Ergebnisse der Bonituren.....	56
4. Diskussion	59
4.1 Kultivierungsabhängige Analyse zur eindeutigen Identifizierung von <i>Rhizoctonia solani</i> AG2-2IIIB	59
4.2 Kultivierungsunabhängige Analyse der mikrobiellen Biodiversität sowie der Konzentrationsbestimmung zweier Mikroorganismen.....	59
4.2.1 SSCP-Analysen.....	59
4.2.2 Abundanzbestimmung von <i>Pseudomonas poae</i> und <i>Rhizoctonia solani</i> mittels qPCR	61
4.2.3 Felddaten zur Vergleichsmöglichkeit von behandelten und unbehandelten Kultivaren.....	63
5. Literaturverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BCA	Biological Control Agent
deion.	deionisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'' -triphosphate
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	double-stranded
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
g	Erdbeschleunigung
et al.	et alteri (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
KWS	Kommerzielle Saatgut AG mit Hauptsitz in Einbeck (Deutschland) (http://www.kws.de)
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Potato Dextrose Agar
PPS	Protein Precipitation Solution
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RI	<i>Rhizoctonia solani</i> -Befallsindexe
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
Std.	Standart
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Amminomethan
ZMF	Zentrum für medizinische Grundlagenforschung

1. Einleitung

1.1 *Beta vulgaris* L.

Die allgemeine Zuckerrübe oder auch deren lateinische Bezeichnung *Beta vulgaris* L. gehört zur Familie der *Chenopodiaceae* und ist eine krautartige, zweikeimblättrige Pflanze. Der Mittelmeerraum gilt als Herkunftsgebiet dieser Pflanzenspezies, jedoch wurde sie bereits vor geraumer Zeit auch in temperierten Gegenden kultiviert (Chapman & Hall, 1993).

Zuckerrüben wurden ursprünglich vor allem zur Produktion von Zucker angebaut. Aufgrund der stetigen Weiterentwicklung von biotechnologischen Prozessen gewannen diese Rüben auch als Energiepflanze einen enormen Aufschwung in ihrem Anbau. Diese Kulturpflanze besitzt einen zweijährigen Lebenszyklus, wirtschaftlich gesehen ist jedoch nur das erste Jahr für die Zuckerproduktion von Bedeutung, wenn die Pflanzen eine relevante Saccharose-Konzentration von über 18 % aufweisen (Trebbi & McGrath, 2004).

1.2 Phytopathogene

Die größten Probleme im Zuckerrüben-Anbau werden von im Boden lebenden Phytopathogenen verursacht. Diese führen auch zu hohen wirtschaftlichen Ertragsverlusten in der Zuckerrübenproduktion (Chapman & Hall, 1993). *Aphanomyces cochlioides* Dreschler und *Pythium ultimum* Trow sind nur zwei Beispiele von bodenbürtigen Pflanzenpathogenen, die zur Wurzel- und Jungpflanzenfäule führen können. Als besonders aggressiv gegenüber Zuckerrüben gilt hierbei *Rhizoctonia solani* (Büttner et al., 2003).

1.2.1 *Rhizoctonia solani* Kühn

Rhizoctonia solani (Telemorphe *Thanatephorus cucumeris* [Frank] Donk) ist ein weltweit verbreiteter Pilz und verantwortlich für zahlreiche Schäden an Kulturpflanzen (Sneh et al., 1996). Mit seinem breiten Wirtsspektrum ist er in der Lage das Wachstum in den Feldern zahlreicher Pflanzenspezies zu befallen. Die durch ihn hervorgerufene Wurzelfäule erscheint

an vereinzelt Nutzpflanzen, welche von leichten Schäden bis hin zum Tod der Pflanze führen. Dieses Phytopathogen kommt jedoch auch in „gesunden“ Regionen vor. Jeder Boden birgt das Potenzial, Krankheiten zu unterdrücken. Man vermutet, dass befallenen Wirtspflanzen durch Ausscheidungen von Wurzel-Exsudaten bestimmte Nährstoffe bereitstellen und dadurch mikrobielle Gemeinschaften fördern. Eine vorangegangene Erkrankung verhindert sozusagen eine zukünftige pathogene Aktivität des Pilzes (Anees et al., 2010; Hyakumachi & Ui, 1982; Weller et al., 2002). Es scheint also so, als dürfte es einen bestimmten Schwellenwert des Inokulums geben, wobei jene Werte, die sich darunter befinden, keine offensichtlichen Symptome von Erkrankungen der Pflanzen zur Folge haben. Wird dieser Schwellenwert jedoch überschritten, ist das Phytopathogen dazu befähigt, in die Wurzeln der Wirtspflanze einzudringen. Neben abiotischen Faktoren, wie z.B. der Bodenstruktur und der Feuchtigkeit, besitzen auch mehrere biotische Faktoren einen Einfluss auf das Verhalten von *Rhizoctonia solani* (Gubbins et al., 2000; Schneider et al., 2001). Jedoch konnte in den letzten Jahren eine erhöhte Toleranz gegenüber diesem Pathogen auch mittels speziellen Sortenzüchtungen erzielt werden. Die Zuckerrübensorte JENNA KWS (KWS SAAT AG, Einbeck, Deutschland) beispielsweise verspricht aufgrund ihres hohen Resistenzniveau gegenüber *Rhizoctonia solani* vor allem in stark befallenen Gebieten bestens für den Anbau geeignet zu sein (<http://www.kws.de>).

Während der parasitären Phase plagt das primäre Inokulum die Wirtspflanze, als nächstes können zwei Strategien beim sekundären Inokulum innerhalb der Wurzel der Pflanze erfolgen. Die erste Möglichkeit liegt im lokalen Anstieg des Inokulums durch Autoinfektion der Wirtspflanze selbst. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Übertragung und anknüpfenden Infektion der benachbarten Pflanzen (Harris et al., 2003).

Als besonders aggressiv gilt *Rhizoctonia solani* auch gegenüber Zuckerrüben. Dieser Pilz ist zudem in der Lage, abhängig von der Anastomose Gruppe (AG) des Stammes als auch vom Zeitpunkt der Infektion, unterschiedliche Erkrankungen hervorzurufen. Während AG4 für die frühe Zuckerrübenfäule verantwortlich ist, verursacht AG2-2IIIB die späte Wurzelfäule und führt zu Ernteverlusten zu einem späteren Zeitpunkt des Pflanzenentwicklungsstadiums. Durch seine ausgesprochen hohe Aggressivität, wie in der Abbildung 1 zu sehen ist, einer hohen Toleranz gegenüber extremen Temperaturunterschieden, sowie einer niedrigen Sensibilität von Fungiziden, wird die Bekämpfung dieses Pathogens maßgeblich erschwert. Selbst unter widrigsten Umweltbedingungen ist dieses Pflanzenpathogen dazu befähigt, als

Sklerotium mehrere Jahre im Boden zu überleben. Bislang bestand noch keine zuverlässige Möglichkeit, die späte Wurzelfäule, welche durch *R. solani* AG2-2IIIB an Zuckerrüben zu hohen Ertragsverlusten führt, zu kontrollieren (Büttner et al. 2003; Tilcher 2002).



Abb. 1: Darstellung einer erkrankten Zuckerrübe an *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB zur dritten Probenahme in Ottmaring.

Grunddessen stellte sich *Rhizoctonia solani* in den vergangenen Jahren zunehmend als bevorzugtes Zielpathogen bei biologischen Kontrolluntersuchungen ein (Zachow et al., 2010). Es konnten Strategien entwickelt werden, um Biocontrol Agents (BCAs) mittels eines hierarchischen Screening Verfahrens gegen *Rhizoctonia* heraus zu selektionieren (Faltin et al., 2004; Zachow, Dissertation 2008) und einer gleichzeitigen Beurteilung derer Biokontrollleistung (Grosch et al., 2005a; Grosch et al., 2006).

1.3 Alternative Methoden zum Pflanzenschutz in der Landwirtschaft

Trotz der Verfügbarkeit einiger Breitband-Fungizide stellt sich die Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* als äußerst schwierig dar (Tilcher, 2002). Zudem sind gängige Produktionsmethoden in der Agrarindustrie wie z. B. der unsachgemäße Gebrauch von chemischen Pestiziden und Kunstdünger für eine Reihe von Umwelt- und Gesundheitsproblemen verantwortlich (Gunnell et al., 2007; Leach & Mumford, 2008). Im Allgemeinen wird der Ruf nach umweltverträglicheren Strategien in der Landwirtschaft immer lauter. Die Pflanzenbiotechnologie trägt zu einer Entwicklung zahlreicher neuer Sorten von Kulturpflanzen bei. Ziel hierbei sind Züchtungen von Sorten mit verbesserter Krankheitsresistenz, erhöhter Trocken- und Salztoleranz sowie höheren Ernährungswerten. Bedauerlicherweise wurden Pflanzen-Mikroben Interaktionen viel zu lange ignoriert, obwohl Pflanzenassoziierte Mikroorganismen eine wichtige ökologische Rolle sowohl bei Pflanzen als auch Böden einnehmen (Smith et al., 1999). Dies inkludiert positive Effekte wie etwa beim Wachstum und der Gesundheit von Pflanzen, eine Erhöhung der Stresstoleranz, Unterstützung von Krankheitsresistenzen und einer Begünstigung der Nährstoffaufnahme sowie der Artenvielfalt (Lugtenberg et al., 2002; Morrissey et al., 2004).

1.3.1 Pflanzenassoziierte Mikroorganismen

Bereits seit über 150 Jahren weisen Forschungsarbeiten mehrfach darauf hin, dass Bakterien und Pilze ein vertrautes Zusammenspiel bzw. Wechselwirkung mit deren Wirtspflanze besitzen und in der Lage sind, sowohl Pflanzenwachstum zu fördern als auch Pflanzenpathogene zu unterdrücken (Whipps, 2001; Thakore, 2006; Ehlers, 2006). Die Unterstützung des Pflanzenwachstums basiert auf einer verbesserten Nährstoffaufnahme sowie hormoneller Stimulation. Unterschiedliche Mechanismen sind an der Suppression von Pflanzenpathogenen beteiligt, welche indirekt mit dem Pflanzenwachstum gekoppelt sind. Mitglieder der Gattung *Azospirillum* und *Rhizobium* sind bereits gut untersuchte Modellorganismen zur Förderung des Pflanzenwachstums. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, und *Streptomyces* und die der pilzlichen Gattungen zugehörigen *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, und *Trichoderma* sind Beispiele zur Einflussnahme auf die Gesundheit von Pflanzen. Basierend auf der Erkenntnis von sogenannten Pflanzen-Mikroben

Interaktionen, besteht eventuell auch die Möglichkeit der Entwicklung eines mikrobiellen Impfstoffes für die agrarwirtschaftliche Biotechnologie. Abhängig von der Wirkungsweise der einzelnen Mikroorganismen könnten spezielle Produkte als biologischer Dünger, Pflanzenstärkungsmittel, Phyto-Stimulatoren und Biopestizide eingesetzt werden. Summa summarum kann man festhalten, dass die Verwendung von Mikroorganismen und Förderung von vorteilhaften Pflanzen-Mikroben Interaktionen vielversprechende Aussichten und vor allem umweltfreundlichere Strategien zur konventionellen Agrarwirtschaft bieten (Berg, 2009).

1.3.2 Biological Control Agents (BCAs)

Biological Control Agents (BCAs) eröffnen eine vollkommen andere Möglichkeit der Kontrolle von Pflanzenpathogenen auf eine umweltschonendere Art und Weise als es chemisch-synthetisierte Pestizide und Kunstdünger je in der Lage wären. Zudem besitzen sie mehrere Vorteile: Sie stellen ein geringeres Risiko für die Umwelt und den Menschen dar, besitzen eine gezieltere Aktivität, sind bereits in sehr geringen Konzentrationen effizient, vermehren sich eigenständig, werden jedoch durch die Wirtspflanze als auch durch die standortheimische mikrobielle Population kontrolliert, sind schneller abbaubar als herkömmliche Pestizide, es besteht eine geringere Gefahr einer Resistenz-Entwicklung und sie können in konventionellen Schädlingsbekämpfung-Systemen eingegliedert werden (Berg, 2009). Trotz der Summe an Vorteilen sind dennoch einige von ihnen in der Lage, im Menschen Krankheiten hervorzurufen. Um die Verwendung möglicher Humanpathogene im biologischen Pflanzenschutz zu vermeiden ist es unerlässlich, das Risiko jedes potentiellen BCA zu evaluieren und einzustufen. Zu den Auswahlverfahren zählen mehrere Kriterien, welche eine schnelle und sichere Evaluierung erlauben: (1) kein Wachstum bei 37°C, (2) nach Identifizierung z. B. durch Sequenzierung Bestimmung der Risikogruppen (<http://www.dsmz.de>) und (3) die Austestung eventueller toxischer Effekte mittels Pathogenitäts-Assays wie dem des *Caenorhabditis elegans*-Assay (Berg, 2009; Zachow et al. 2009b).

1.3.2.1 *Pseudomonas poae* RE*1-1-14

Unter dem speziell entwickelten Screening-Verfahren für Mikroorganismen, welche möglicherweise als Biological Control Agents in Frage kommen könnten (Faltin et al., 2004) befanden sich u.a. *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12 (Lottmann et al. 1999), *Serratia plymuthica* 3Re4-18 (Berg et al. 2005) und *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 (Zachow, Dissertation 2008). Alle drei Mikroorganismen präsentierten sich als BCAs bei Feldversuchen äußerst erfolgreich und zeigten einen positiven Einfluss sowohl auf das Wachstum als auch auf den Gesundheitszustand der Pflanzen. Vor allem *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 ist dazu im Stande, sich am Wurzelsystem auszubreiten und verschiedene Bereiche der Haupt- und Lateralwurzelsysteme zu besiedeln. Die höchste Abundanz von Bakterien konnte jedoch in den oberen Bereichen der Wurzel nachgewiesen werden (Zachow et al., 2010).

1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft von Zuckerrüben beziehungsweise der näheren Umgebung im Feld mittels Bodenproben. Zu diesem Zweck fand ein Vergleich der isolierten Mikroorganismen der Rhizosphäre von Zuckerrüben zu drei verschiedenen Entwicklungsstadien an zwei unterschiedlichen Standorten in Deutschland statt. Hierbei lag der Schwerpunkt im Vergleich der Profile zweier Zuckerrübensorten JENNA KWS und BERETTA einmal mit und einmal ohne Mikroorganismen, sowie dem mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Boden und dem natürlichen, nicht inokulierten Boden als Kontrolle. In weiterer Folge konnte mit Hilfe des Computerprogramms GelCompar® II die Einflussnahme der eingebrachten Antagonisten in eine natürliche Gemeinschaft näher untersucht werden.

Die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgte hierbei mittels kultivierungsunabhängiger Methoden wie der Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysen der 16S rRNA.

Desweiteren eröffnete die quantitative real time PCR (q-PCR) eine Möglichkeit der Quantifizierung des zuvor beschriebenen Phytopathogens *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB als auch des dazu speziell in den Saatgutpillen von Zuckerrüben eingebrachten Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14.

Unabhängig von den analytischen Untersuchungen im Labor gehörten Zählungen und Bonituren der Pflanzen vor Ort zum letzten Aufgabenbereich dieser Arbeit. Neben den Zuckerrübenpflanzen, welche auch im Labor analysiert wurden, wurden bei Zählung und Bonitur noch weitere Behandlungen berücksichtigt.

Diese Kombination aus unterschiedlichen Methoden sollte es ermöglichen, einen tieferen Einblick in das natürliche Wechselspiel zwischen Wirtspflanze, Pflanzenpathogen und des dazugehörigen Antagonisten zu gewähren sowie zum weiteren Verständnis beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Die nachfolgende Übersicht (Abb. 2) stellt den Verlauf der durchgeführten Experimente dar.

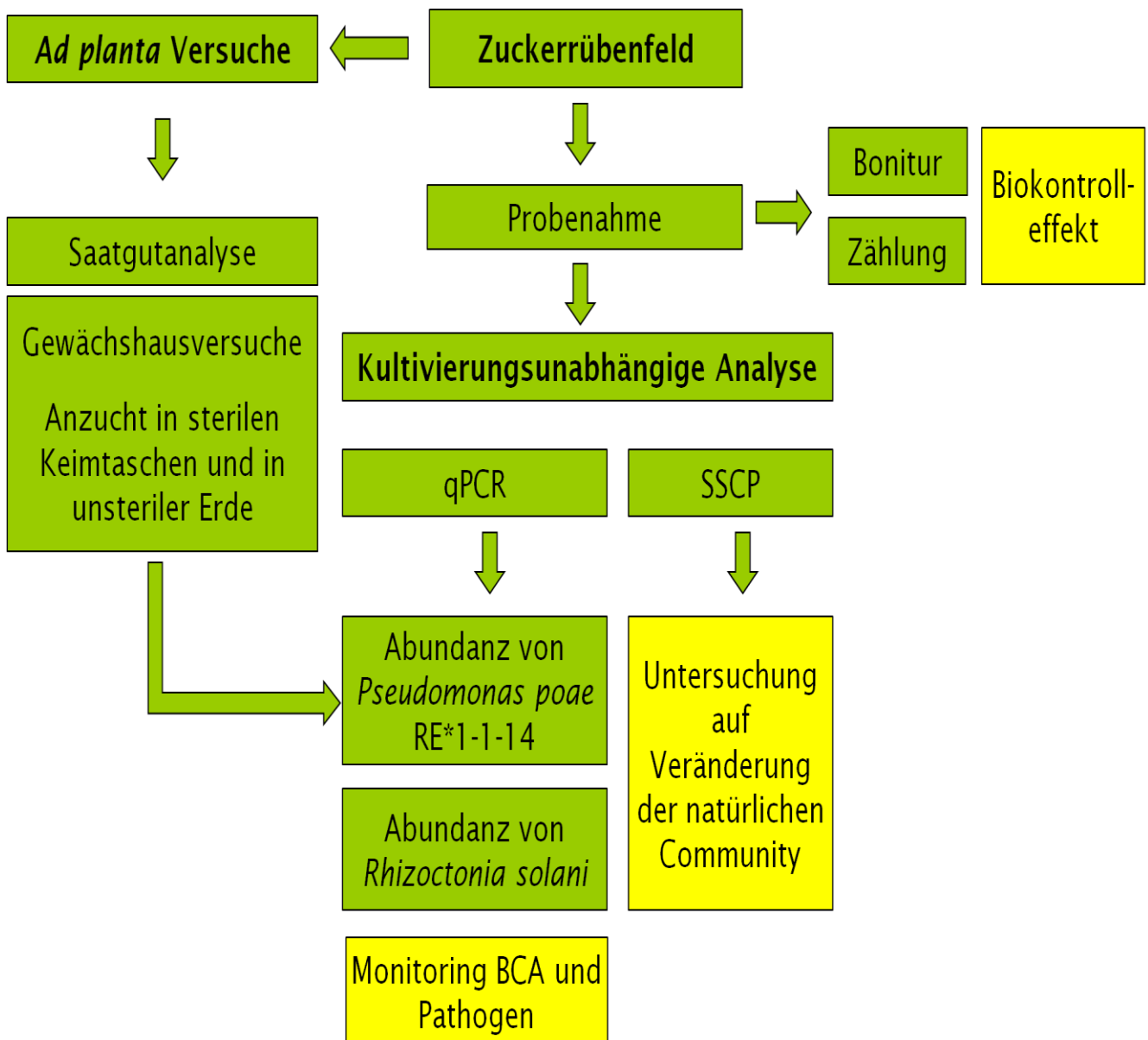


Abb. 2: Verlauf der durchgeführten Experimente

2.2 Herstellernachweis

Alle verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Applied Biosystems (Foster City, USA), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Lofer, Österreich), Lactan (Graz, Österreich), Merck (Darmstadt, Deutschland), MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland), SIFIN (Berlin, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Qiagen (Wien, Österreich), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.3 Zusammensetzungen der Nährmedien

Alle verwendeten Medien wurden – wenn nicht anders angegeben – mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Nährmedien:

PDA-Agar: (1 L)

26,5 g Kartoffelextrakt-Glukose-Bouillon (Roth)
15 g Agar
auf einen Liter mit deion. Wasser auffüllen

Pilzkonservierungsmedium:

120 mL Glycerin
40 mL 50 % Glukose
20 mL 20 % Pepton
20 mL 10 % Hefeextrakt
alle Lösungen extra autoklavieren

R2A-Agar: (1 L)

18,1 g R2A Fertigmedium (Roth)
Zugabe von Nystatin nach dem Autoklavieren: 50 mg/L
auf einen Liter mit deion. Wasser auffüllen

S.O.C.-Medium:

- 2 % Pepton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 10 mM Natriumchlorid
- 10 mM Magnesiumchlorid
- 2,5 mM Kaliumchlorid
- 10 mM Magnesiumsulfat
- 10 mM Natriumchlorid
- 20 mM Glucose

2.4 Probenahme

Die Probenahme von Zuckerrüben erstreckte sich über drei Pflanzenwachstumsperioden, welche zu den entsprechenden Wachstumsstadien der Pflanzen erfolgte: 1) bei Jungpflanzen, 2) bei Zuckerrüben bei denen 90 % der Blätter den Boden bedeckten, und 3) bei Rüben, welche kurz vor der Ernte standen. Zudem wurden noch zusätzlich zwei Bodenproben genommen. Es wurden zwei unterschiedliche Standorte gewählt, die sich beide in Deutschland (Ottmaring und Göttingen) befinden, um die Ergebnisse der einzelnen Proben von beiden Standorten unabhängig voneinander vergleichen zu können. Desweiteren wurden 4 Wiederholungen (I-IV) pro Sorte (BERETTA, JENNA KWS) bzw. Boden analysiert (Probenbezeichnung siehe Tab. 1).

Tab. 1: Probenbezeichnung der Zuckerrüben bzw. Böden und deren Zuordnung

Probenbezeichnung	Kultivare bzw. Bodenproben
J-CO	JENNA KWS-Kontrolle
J-MO	JENNA KWS-mit Mikroorganismen
B-CO	BERETTA-Kontrolle
B-MO	BERETTA-mit Mikroorganismen
ni J-CO	JENNA KWS-Kontrolle auf nicht inokulierten Boden
ni J-MO	JENNA KWS-mit Mikroorganismen auf nicht inokulierten Boden
ni B-CO	BERETTA-Kontrolle auf nicht inokulierten Boden
ni B-MO	BERETTA-mit Mikroorganismen auf nicht inokulierten Boden
S-R.s.	Boden mit <i>Rhizoctonia solani</i> inokuliert
S-CO	nicht mit <i>Rhizoctonia solani</i> inokulierter Boden bzw. natürlicher Boden

Probenaufarbeitung

Rhizosphäre & Bodenproben:

Um Mikroorganismen aus der Rhizosphäre und dem Boden zu isolieren, wurde unter semisterilen Bedingungen möglichst viel des vorhandenen Wurzel- bzw. Bodenmaterials verwendet. Aufgrund der geringen Größe der Jungpflanzen am Anfang der Wachstumsperiode wurde zu Beginn um ca. die Hälfte weniger Probenmaterial eingewogen als bei den folgenden Probenahmen. Diese Schwankung des aufbereiteten Materials wurde jedoch bei den Berechnungen im Ergebnisteil berücksichtigt, um auch alle Proben von einem gemeinsamen Ausgangswert analysieren zu können. Bei den folgenden Probenahmen wurden 20 g Wurzel- bzw. Bodenmaterial in 50 ml Röhren eingewogen, zusätzlich 50 ml sterile 0,85 % NaCl-Lösung hinzugegeben und mittels Bagmixer 3 min homogenisiert. Als nächstes wurden 2 mL der Suspension entnommen, für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei -70 °C eingefroren.

2.4.1 Extraktion der DNA

Die DNA-Isolierung erfolgte zum größten Teil nach dem Hersteller-Protokoll von Fast DNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich), allerdings mit einigen Veränderungen:

- Das gesamte abzentrifugierte Pellet wurde mit 980 µL anstatt der vorgeschriebenen 978 µL Natrium Phosphate-Puffer in das Schraubgefäß transferiert und mit 120 µL MT-Puffer versetzt.
- Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.
- Nachdem die DNA an die Binding Matrix Suspension gebunden hatte, wurden anstatt 500 µL, 600 µL der oberen Flüssigkeit vorsichtig dekantiert.

2.5 Kultivierungsabhängige Analyse der Mikroorganismen

Da keine universelle Methode zur Analyse von Mikroorganismen existiert, werden meist verschiedene Techniken miteinander kombiniert, um strukturelle und funktionelle Parameter

zu erfassen. Allgemein betrachtet, unterscheidet man zwischen kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden. Kultivierungsabhängige Analysen haben jedoch den Nachteil, dass nur ein sehr geringer Anteil an Mikroorganismen kultiviert werden kann (Staley und Konopka, 1985).

Zu den kultivierungsabhängigen Analysen zählt u.a. die Anreicherung auf Selektivmedien. Die Unterscheidung der Einzelisolate erfolgte anschließend durch molekulare Fingerprints.

2.5.1 Kultivierung von *Rhizoctonia solani* auf Agarplatten

Um sicher zu gehen, dass die in weiterer Folge benötigte Eichreihe für die Real-Time PCR (siehe Kapitel 2.6.2.2) auch tatsächlich mit jenem *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB erstellt wurde, mit dem die beiden Versuchsfelder in Ottmaring und Göttingen inokuliert wurden, führten wir einen Vergleich mittels BOX-PCR durch. Hierfür wurden zu Beginn aus den offensichtlich mit *Rhizoctonia solani* befallenen Zuckerrüben größere Pflanzenstücke herausgeschnitten, oberflächensterilisiert (in 4 %igem Natriumhypochlorid, 10 min, 3 mal mit sterilem A. dest. waschen) und zunächst auf H₂O-Agarplatten ausgelegt. Dem H₂O-Agar wurden zusätzlich mehrere Antibiotika hinzugegeben, um die Vermehrung von Bakterien zu verhindern. Mit Heranwachsen des Pilzes konnten schließlich einzelne Hyphen für ein optimales Wachstum auf PDA-Platten übersetzt werden.

Selektivplatten:

H₂O-Platten: 1 L: ein Liter Leitungswasser, 15 g Agar

Nach dem Autoklavieren:

Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin.

2.5.2 Identifizierung von *Rhizoctonia solani*

Zur Identifizierung des Pflanzenpathogens musste zuerst dessen DNA isoliert werden. Anschließend wurde eine BOX-PCR durchgeführt, um einen Vergleich jenes *Rhizoctonia solani* Isolates, mit welchem die beiden Versuchsfelder inokuliert wurden und jenem Pilz ziehen zu können, der aus kranken Rüben direkt vom Feld isoliert wurde.

Isolierung chromosomaler DNA aus *Rhizoctonia solani*:

Um den isolierten Pilz bestimmen zu können, wurde dessen DNA nach folgendem Protokoll (wurde ebenfalls bei der DNA-Isolierung von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 eingesetzt) isoliert:

1. 500 µL DNA-Lyse-Puffer wurden in ein 2 mL Schraubgefäß mit Glasperlen (200 mg: Durchmesser 0,15 – 0,21 mm, 200 mg: Durchmesser 0,25 – 0,50 mm, 2 Stück: Durchmesser 1,7 – 2,0 mm) pipettiert
2. Hinzugabe der Pilzhyphen in den Puffer durch eine Impföse
3. Aufschließen des Zellmaterials mittels Fast Prep[®] Instrument 6,5 m/s für 15 sec und anschließender Inkubation bei 65 °C
4. 500 µL Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) wurden hinzugegeben, kurz gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
5. Überführung der oberen Phase in ein frisches Eppi
6. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 500 µL Chloroform / Isoamylalkohol (24:1). Die Lösung wurde anschließend kurz gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
7. Überführung der oberen Phase in ein frisches Eppi
8. 1 mL Präzipitations-Puffer wurden hinzugegeben, gut gemischt und eine Stunde lang bei RT inkubiert
9. Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm
10. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µL 1,2 M NaCl resuspendiert
11. Hinzugabe von 500 µL Chloroform / Isoamylalkohol (24:1), die Lösung wurde kurz gevortext und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert
12. Die obere Phase wurde in ein neues, beschriftetes Eppi überführt
13. 210 µL kalten Isopropanol zugeben, vorsichtig mischen und anschließend über Nacht bei -21 °C einfrieren
14. Am nächsten Tag wurde das Eppi 15 min bei RT stehen gelassen und anschließend für 20 min, 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert
15. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 200 µL 80 %igen EtOH (-20 °C) aufgenommen
16. Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 13.000 rpm

17. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet

18. Schließlich wurde das Pellet in 50 µL deion. Wasser gelöst und bei -21 °C gelagert

2.5.3 BOX-PCR

Zur Amplifikation der repetitiven BOX-Sequenzen wurde der Primer BOX A1 (Tab. 2) verwendet:

BOX-Elemente sind repetitive hochpolymorphe Sequenzelemente in Genomen und unterscheiden sich daher in ihrer Länge und ihrer Sequenz. Bei der BOX-PCR wird nur ein Primer verwendet, der an einen solchen Repeat bindet. Bei Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel ergeben sich bei dieser Fingerprint-Methode charakteristische artspezifische Muster.

Reaktionsansatz für BOX-PCR:

Taq-&GO™ [5 ×]	3,0 µL
Primer BOX A1 [10 pmol/µL]	1,5 µL
PCR-Wasser (Roth)	9,5 µL
DNA-Template	1,0 µL

Gesamtvolumen 15 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 6 min

94 °C 1 min

53 °C 1 min

65 °C 8 min 35 ×

65 °C 16 min

15 °C end

Agarosegelelektrophorese

Auf das 1,5 %ige Gel (20 × 20 cm) in 0,5 x TBE-Puffer wurden 12 µL jedes PCR-Ansatzes mit 2 µl Loading Dye [6 ×] aufgetragen. Die Laufzeit des BOX-Gels betrug 4 h bei 90 V.

Konservierung von *Rhizoctonia solani*:

Für die Konservierung des Pilzes wurde 1 mL Pilzkonservierungsmittel in ein 2 mL Reaktionsgefäß und zusätzlich noch einige mit dem Pilz bewachsenen Agarblöcke hinzugegeben und bei -70 °C gelagert.

2.6 Kultivierungsunabhängige Analyse von Mikroorganismen

Wie bereits zuvor erwähnt besteht ein Hauptproblem der kultivierungsabhängigen Methode darin, dass nur ein geringer Anteil aller Mikroorganismen kultivierbar ist. Aus diesem Grund lag das Hauptaugenmerk bei dieser Arbeit auf kultivierungsunabhängigen Methoden, wie dem Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) und der quantitativen Real-Time PCR (q-PCR).

2.6.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion (oder die geläufige Kurzform PCR) wird zur Amplifizierung von einem kurzen, genau definierten DNA-Abschnitt eingesetzt. Die wichtigsten Komponenten hierfür sind neben dem Template eine thermostabile DNA-Polymerase und spezifisch bindende Primer. Die Polymerase kopiert die DNA-Sequenz des Templates (Original-DNA) ausgehend von einem Primer. Um den zu replizierenden Bereich von beiden Seiten zu begrenzen, werden 2 Primer (forward und reverse) benötigt. Diese bestimmen auf beiden DNA-Strängen den Startpunkt für die Polymerase (Saiki et al., 1988).

Alle PCR-Ansätze wurden stets auf Eis zusammen pipettiert.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden jeweils 3 µL der Ansätze mit Loading Dye [6 ×] auf einem 0,8 bis 1,2 %igen Agarosegel, abhängig von der jeweiligen Produktlänge, in 1 ×

TAE-Puffer aufgetrennt (Laufzeit ca. 30 - 40 min bei 90 V). Die Färbung des Gels erfolgte für ca. 20 - 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad [0,01 %] und wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

2.6.1.2 Molekularbiologische Untersuchungen der Bakteriengemeinschaften mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Mit Hilfe der SSCP-Analyse können sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Mikroorganismen untersucht und verglichen werden. Hierfür werden DNA-Moleküle gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenzen verwendet, die durch eine PCR amplifiziert werden. Bei Bakterien werden kleine Abschnitte der hoch konservierten rRNA-Gene amplifiziert, wobei einer der beiden Primer am 5' Ende phosphoryliert sein muss. Der phosphorylierte Strang des resultierenden PCR-Produkts wird mit Hilfe einer Lambda-Exonuklease abgebaut. Anschließend erfolgt eine Denaturierung des verbleibenden Einzelstranges durch Hitze und Formamid. Durch Faltung des komplementären Stranges bilden sich sequenzspezifische Sekundärstrukturen die unterschiedliche Laufweiten im nicht denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese-Nachweis zeigen (Tebbe et al., 2001; Rochelle, 2001).

Desweiteren können Primer gewählt werden, welche spezifisch für eine spezielle Organismengruppe sind. Dadurch kann eine Selektion der mittels SSCP-Analyse erfassten Mikroorganismen erreicht werden.

Zum Vergleich der Profile beider Zuckerrübensorten JENNA KWS und BERETTA einmal mit und einmal ohne Mikroorganismen, sowie dem mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Boden und dem natürlichen Boden, wurden Dendrogramme mit dem Computerprogramm GelCompar[®] II erstellt. Anhand dieser Dendrogramme konnte man die Einflussnahme der eingebrachten Antagonisten in eine natürliche Gemeinschaft näher untersuchen.

2.6.1.3 SSCP-PCR

Für die partielle Amplifikation der 16S rDNA wurden folgende Primer verwendet (siehe Tab. 3):

Gesamte Bakterien-Community:

Um die 16S rDNA einer bakteriellen Gemeinschaft zu erhalten, wurde eine sogenannte „nested“ PCR (verschachtelte PCR) durchgeführt. Dabei wird das Produkt der ersten PCR als Template in eine zweite Reaktion eingesetzt, wobei das zweite Amplifikat einen kürzeren Abschnitt des ersten Produkts darstellt. Mit diesem Verfahren kann die Sensitivität einer PCR erhöht werden, so dass auch kleine Mengen an Template-DNA eine befriedigende Ausbeute an Produkt liefern.

Um einen kurzen hochkonservierten Abschnitt der bakteriellen 16S rDNA zu amplifizieren, wurden in der PCR die universellen eubakteriellen Primer Unibac-II-515f und Unibac-II-927r^P eingesetzt (siehe Tab. 3). Das Unibac-Fragment ist 413 bp lang.

Reaktionsansatz für Unibac-PCR (1. PCR):

Taq-&GO TM [5 ×]	2,0 µL
Primer 27f [10 pmol/µL]	0,1 µL
Primer 1492r [10 pmol/µL]	0,1 µL
PCR-Wasser	6,8 µL
DNA-Template	1,0 µL

Gesamtvolumen 10 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 5 min

95 °C 30 s

54 °C 30 s

72 °C 90 s 30 ×

72 °C 5 min

15 °C end

Bei jenen Proben, bei denen am 0,8 %igen Agarosegel kein Produkt zu erkennen war, wurde das Amplifikat unverdünnt in die nachfolgende PCR eingesetzt. War eine Bande sichtbar, wurde das PCR-Produkt je nach Stärke der Bande 1:10 – bzw. 1:100 – verdünnt und in die 2. PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz für Unibac-PCR (2. PCR):

Taq-&GO™ [5 ×]	12,0 µL
Primer Unibac-II-515f [10 pmol/µL]	0,6 µL
Primer Unibac-II-927r ^P [10 pmol/µL]	0,6 µL
PCR-Wasser	40,8 µL
DNA-Template	6,0 µL

Gesamtvolumen 60 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 5 min

95 °C 20 s

60 °C 15 s

72 °C 30 s 32 ×

72 °C 10 min

15 °C end

Anschließend erfolgte eine weitere Kontrolle der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.

Pseudomonas poae - spezifische PCR:

Mit Hilfe der „nested“ PCR Methode findet eine enorme Erhöhung der Spezifität einer Reaktion statt. Dies wurde bei *Pseudomonas poae* ausgenutzt, indem die 1. PCR *Pseudomonas*-spezifisch war. Hierfür wurden die Primer 580 forw und 580 rev verwendet. Um einen Abschnitt des Amplifikats der 1. PCR zu vermehren, wurden in der 2. PCR die beiden Primer 580 forw und RTQ 580 r^P aus Tabelle 3 eingesetzt (Pirker 2005)

Reaktionsansatz für *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 - spezifische PCR (1. PCR):

Taq-&GO™ [5 ×]	3,0 µL
Primer 580 forw [10 pmol/µL]	0,6 µL
Primer 580 rev [10 pmol/µL]	0,6 µL
PCR-Wasser	10,1 µL
DNA-Template	0,7 µL

Gesamtvolumen 15 µL

Temperaturprogramm:

94 °C 2 min

94 °C 30 s

66 °C 30 s

72 °C 15 s 35 ×

72 °C 7 min

15 °C end

Je nach Stärke der erhaltenen Bande am Kontrollgel wurde das PCR-Produkt erneut entweder unverdünnt oder in einer 1:10 – bzw. 1:100 - Verdünnung in die 2. PCR eingesetzt.

Reaktionsansatz für Unibac-PCR (2. PCR):

Taq-&GO™ [5 ×]	12,0 µL
Primer 580 forw [10 pmol/µL]	2,4 µL
Primer RTQ 580 rev ^P [10 pmol/µL]	2,4 µL
PCR-Wasser	37,2 µL
DNA-Template	6,0 µL

Gesamtvolumen 60 µL

Temperaturprogramm:

94 °C 2 min

94 °C 30 s

66 °C 30 s

72 °C 15 s 21 ×

72 °C 7 min

15 °C end

2.6.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden vor dem Einzelstrang-Verdau für die SSCP-Analyse mit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) laut Hersteller-Protokoll gereinigt. Es wurde in 36 µL Elutionspuffer eluiert und die gereinigten PCR-Produkte bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.6.1.5 Verdau mittels Lambda-Exonuklease

Die Verdauung des am 5'-Ende phosphorylierten Einzelstranges wurde mit der Lambda-Exonuklease (New England Biolabs) durchgeführt. Es wurde eine Reaktionslösung mit 2,4 µL Lambda-Exonuklease (12 U) und 3,6 µL 10x Lambda Exonuklease Reaktionspuffer pro 30 µL - Ansatz hergestellt. 6 µL Reaktionslösung wurden schließlich zu jedem 30 µL - Ansatz hinzugegeben. Der Einzelstrangverdau erfolgte durch die Inkubation von 1 h bei 37 °C.

2.6.1.6 Denaturierung und Faltung des Einzelstranges

Zur Denaturierung wurden den verdauten Proben jeweils 30 µL Ladepuffer zugesetzt.

Der Ladepuffer wurde angesetzt mit:

- 950 µL Formamid (95 %)
- 5 µL Bromphenolblau-Lösung (0,025 %)
- 4 µL 2,5 mM NaOH-Lösung (10 mM)
- 41 µL Aqua dest.

Die Proben wurden exakt für 2 min bei 95 °C erhitzt. Zur Einzelstrangfaltung wurden die Proben anschließend sofort für mindestens 5 min auf Eis gestellt.

2.6.1.7 Herstellung des Polyacrylamidgels

Bevor das Polyacrylamidgel hergestellt wurde, wurden Grund- und Abdeckplatte der Gießvorrichtung gründlich mit Wasser und Ethanol [70 %] gereinigt. Die Trägerfolie wurde mit einigen Tropfen Aqua dest. auf der Abdeckplatte adhärirt, dabei wurden Luftblasen sorgfältig ausgestrichen. Zwischen Abdeckplatte mit Trägerfolie und Grundplatte, worauf die Spacer und Slots angebracht sind, wurde eine Silikondichtung gelegt und die Platten mit Metall-Klammern aneinander befestigt (siehe Abb. 3).

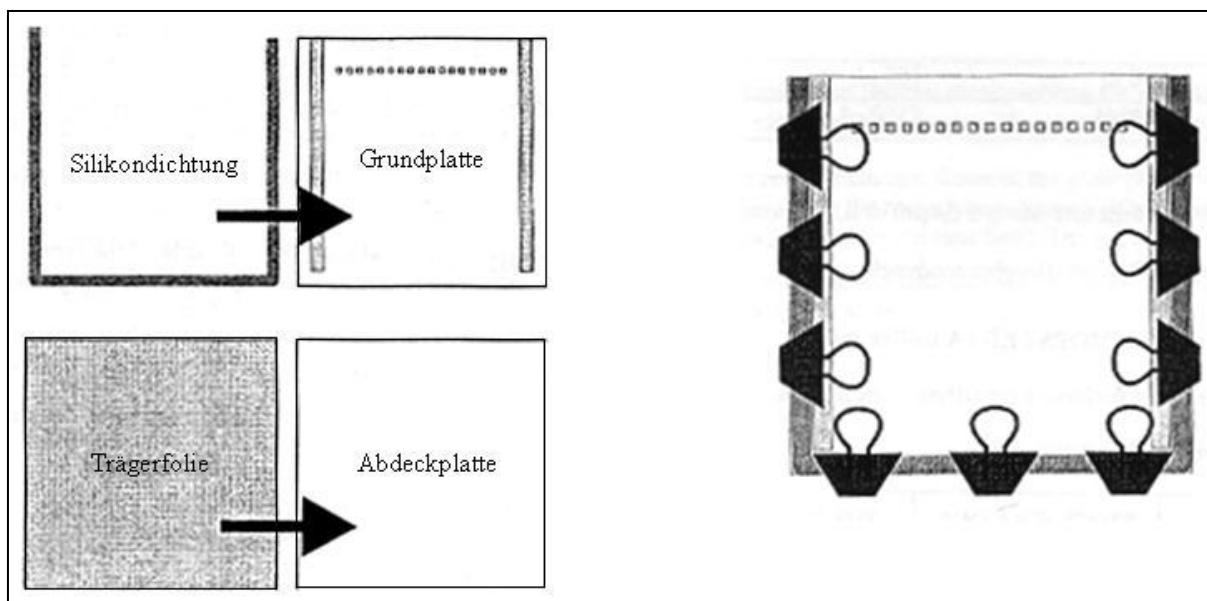


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Gießvorrichtung. Links: Vorbereitung der Grund- und Abdeckplatte. Rechts: fertige Gießvorrichtung.

Der Vernetzungsgrad des Gels und die Laufzeit wurden je nach der zu auftrennenden Größe des DNA-Fragments gewählt (siehe Tab. 4). Zur Auftrennung der bakteriellen Unibac-Fragmente (413 bp) mit unterschiedlicher Sekundärstruktur wurden 8 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Für *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 spezifische Fragmente (155 bp) wurde ein 9,5 %ige Gel eingesetzt (siehe Tab 2.). Die Laufzeit der 8 %igen Gele beträgt 26 h, jenes der 9,5 %igen Gele 7,5 h.

Tab. 2: Konzentration und Mengenangaben der SSCP-Gellösungen

Konzentration	8 %	9,5 %
Deion. Wasser	21,4 mL	19,7 mL
2 × MDE-Lösung	18,2 mL	21,6 mL
5 × TBE-Buffer	12,1 mL	10,4 mL
TEMED	24,3 µL	27,5 µL
10 % APS	243 µL	275 µL

2.6.1.8 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die Pufferkammern wurden mit je 500 mL 1x TBE Puffer befüllt
2. Längsfaltung der 2 Cellulosemembranen und Sättigung mit dem Puffer aus den Kammern
3. Das Gel wurde anschließend von den Platten vorsichtig gelöst und auf die Teflonplatte mit der Trägerfolie nach unten gelegt
4. Die Cellulosemembranen wurde mit der gefalteten Seite auf die Gelenden gelegt (oben knapp über den Slots, unten bis an die Abdeckfolie) und leicht angedrückt
5. Vorlauf: 10 min, 400 V, 50 mA, 20 °C
6. Schließlich wurden 12 µL pro Probe sowie links und rechts je 3 µL kb Gene Ruler™ DNA Ladder auftragen
7. Programm: 400 V, 50 mA, 26 °C, je nach Fragmentgröße, 413 bp, 26 h und 155 bp, 7,5 h

2.6.1.9 Silberfärbung

Um die Banden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen wurde das Gel noch einer Färbung unterzogen.

Fixierung:	300 ml Essigsäurelösung [10 %]	30 min
Waschen:	3 × 5 min mit je etwa 300 ml Aqua dest.	15 min
Silberfärbung:	300 ml Silbernitratlösung [0,1 %] (frisch angesetzt)	
	+ 1,5 ml Formaldehyd [37 w/v %] (Schale abgedunkelt)	30 min
Waschen:	unter fließendem Aqua dest. abspülen	10 s
Entwickeln:	500 ml NaOH-Lösung [3 %]	
	+ 2 ml Formaldehyd [37 w/v %] (Schale abgedunkelt)	
	erst mit 200 ml kurz spülen, dann mit restlicher Lösung entwickeln bis Banden erscheinen	
Stoppen:	300 ml Essigsäurelösung [10 %]	30 min
Konservieren:	300 ml Ethanol [10 %] + Glycerol [13 %]	30 min

Vor dem Konservierungsschritt wurde mit einem Flachbettscanner mit Durchlichtfunktion noch ein Bild des Gels angefertigt, welches später zur graphischen Auswertung herangezogen wurde.

Auswertung der SSCP-Gele mittels GelCompar[®] II

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms GelCompar[®] II (Applied Maths). Dabei wurden aus den Ähnlichkeiten der einzelnen Gelbahnen Dendrogramme erstellt, wobei folgende Einstellungen verwendet wurden:

Dendrogram type: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)

Similarity coefficient: Band based: Pearson correlation

Position tolerances: Optimization: 0 %

Position tolerance: 1 %

2.6.1.10 DNA-Isolation aus den Gelbanden zur Identifizierung von Mikroorganismen

Die ausgewählten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem konservierten Gel ausgeschnitten und jeweils in 150 µl Crush & Soak Puffer versetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 Tage bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Danach wurden die Gelausschnitte für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand, worin sich nun die DNA befand, wurde in ein frisches Eppi transferiert und mit dem doppelten Volumen an Ethanol [70 %] versetzt. Diese Ansätze wurden für mindestens 1 h bei -20 °C eingefroren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde abgehoben und die erhaltenen DNA-Pellets unter der Clean-Bench getrocknet. Die isolierte DNA wurde in 50 µl TrisHCl [10 mM] pH 8,5 resuspendiert. Die so extrahierte DNA wurde direkt als Template in die nachfolgende PCR eingesetzt.

Crush & Soak Puffer

Magnesiumacetat	2,12 g/L
Ammoniumacetat	38,6 g/L
EDTA pH 8	0,37 g/L
SDS [20 %]	5,0 ml/L

2.6.1.11 Sequenzierung ausgewählter Banden

Vorbereitung für die Sequenzierung:

Um die isolierte DNA aus den ausgeschnittenen SSCP-Gelbanden zu vermehren wurde mit der extrahierten DNA eine PCR durchgeführt. Dabei wurde erneut ein 60 µL Ansatz unter denselben Bedingungen, analog der Unibac-PCR, welche vor der SSCP-Analyse durchgeführt wurde (siehe 2.6.1.3), gestartet. Allerdings wurden anstatt 6 µL nun 15 µL der DNA-Lösung eingesetzt. Zur Kontrolle der PCR wurden erneut 3 µL des PCR-Produkts auf ein Gel aufgetragen. Bei erfolgreicher PCR wurde das verbleibende PCR-Produkt mit Wizard[®] SV Gel und PCR Clean-Up System laut Hersteller-Protokoll gereinigt und die DNA-Konzentration mittels NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die Proben sowohl an das ZMF (Zentrum für medizinische Grundlagenforschung) der medizinischen Universität Graz als auch an LGC-Genomics geschickt. Durch Vergleiche der erhaltenen Sequenzbereiche mit der Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) konnten die Bakterien größtenteils identifiziert werden. Hierfür wurde blastn (megablast) gegen Nucleotide collection (nr / nt) verwendet.

2.6.2 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (q-PCR) verschafft eine Möglichkeit spezifische DNA-Fragmente, auch wenn diese nur in sehr geringen Konzentrationen in einer Probe vorhanden sind, zu quantifizieren. Diese Methode beruht auf dem gleichen Prinzip wie eine herkömmliche PCR. Die Quantifizierung erfolgt jedoch durch den Zusatz eines fluoreszierenden Mediums, welcher während der PCR vermessen wird. Neben den üblichen Komponenten eines PCR-Ansatzes wird noch eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonde hinzugegeben, welche während des PCR-Laufs vermessen wird. Das fluoreszierende Signal ist direkt proportional zur Anzahl des generierten PCR-Produkts (Applied Biosystems, 2003).

2.6.2.1 Vorversuche - Auswahl der Polymerase

Da man sowohl *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 als auch *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB in den Feldproben nachzuweisen versuchte, mussten jeweils für beide Organismen eigene PCR-Bedingungen, sprich eine andere Polymerase als auch ein eigenes Temperaturprogramm, verwendet werden.

Für *Pseudomonas poae* bot sich laut Piker (2005) speziell die Real-time PCR mit einer TaqMan Sonde für Umweltisolate an, da eine 100 bis 1000 mal höhere Sensitivität als bei einer konventionelle PCR besteht. Bei den durchgeführten Real-Time Versuchen wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix (TaqMan®) von Applied Biosystems, der in 2 × Konzentration geliefert wird, verwendet. Die hierfür benötigten Primer bzw. Sonde (siehe Tab. 5) wurden bereits von Heidemarie Piker (2008) konstruiert und ausgetestet. Für die Experimente wurden folgende Ansätze verwendet.

Reaktionsansatz für *Pseudomonas poae*-spezifische Real-Time PCR:

TaqMan® [2 ×]	5,0 µL
Primer RTQ 580 forw [10 pmol/µL]	0,5 µL
Primer RTQ 580 rev [10 pmol/µL]	0,5 µL
Sonde RTQ [10 pmol/µL]	0,4 µL
PCR-Wasser	2,6 µL
DNA-Template	0,7 µL

Gesamtvolumen 10 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 10 min

95 °C 15 s

60 °C 60 s 45 ×

Bei *Rhizoctonia solani* wurde die PCR nach dem Ansatz von Anees et al. (2009) unter Verwendung der *Rhizoctonia solani* spezifischen Primer (siehe Tab. 5) durchgeführt mittels Kapa Fast Sybr (Peqlab, Erlangen, Deutschland). Dieses System beruht auf der Verwendung des SYBR® Green I Reagenz.

Reaktionsansatz für *Rhizoctonia solani*-spezifische Real-Time PCR:

Kapa Fast Sybr [2 ×]	5,0 µL
Primer G6-F2 [10 pmol/µL]	0,5 µL
Primer G6-R2 [10 pmol/µL]	0,5 µL
PCR-Wasser	1,0 µL
DNA-Template	3,0 µL

Gesamtvolumen 10 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 15 min

95 °C 15 s

60 °C 30 s

72 °C 30 s 35 ×

2.6.2.2 Erstellung einer Eichreihe

Um die benötigte Eichreihe für eine Real-Time PCR herstellen zu können, wurde sowohl von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 als auch bei *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB die genomische DNA aus dem Bakterium bzw. Pilz isoliert (siehe Durchführung Kapitel 2.5.2). Das Fragment, welches mit Hilfe der entsprechenden Primer in einer PCR amplifiziert wurde, konnte anschließend in den Vektor pGEM-T easy kloniert und mit den beiden Primern usp und rsp reamplifiziert werden. Bei *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 wurden noch 3,6 µl durch DNase verdaute DNA hinzugefügt (siehe Herstellerprotokoll DNase Kit von Sigma), jedoch nur bei jenen Real-Time PCR-Läufen der Feldproben, um mögliche Störsignale ausschließen zu können.

Klonierung:

Die Klonierung erfolgte mit dem Kit pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector System von Promega. Zuvor wurde sowohl für *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 als auch für *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB eine spezifische PCR durchgeführt, um das jeweilige gewünschte Fragment zu erhalten (verwendete Primer siehe Tab.5).

Reaktionsansatz für *Pseudomonas poae*-spezifische PCR:

Taq-&GO™ [5 ×]	5 µL
Primer 580 bp forw [10 pmol/µL]	1 µL
Primer 580 bp rev [10 pmol/µL]	1 µL
PCR-Wasser (Roth)	17 µL
DNA-Template	1 µL

Gesamtvolumen 25 µL

Temperaturprogramm:

94 °C 2 min

94 °C 30 s

58 °C 30 s

72 °C 30 s 35 ×

72 °C 7 min

15 °C end

Reaktionsansatz für *Rhizoctonia solani*-spezifische PCR:

Taq-&GO™ [5 ×]	5,0 µL
Primer G6-F [10 pmol/µL]	0,3 µL
Primer G6-R2 [10 pmol/µL]	0,3 µL
PCR-Wasser	17,0 µL
DNA-Template	2,5 µL

Gesamtvolumen 25 µL

Temperaturprogramm:

95 °C 5 min

95 °C 30 s

60 °C 30 s

72 °C 30 s 30 x

72 °C 10 min

15 °C end

Nach erfolgter Überprüfung des Fragments auf einem Agarosegel wurde das PCR-Produkt mittels Wizard[®] SV Gel und PCR Clean-Up System aufgereinigt und die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop vermessen. Die anschließende Ligation erfolgte nach dem Protokoll vom pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector System, jedoch mit einer Änderung: die benötigte Konzentration des PCR-Produktes für die Ligation wurde verdoppelt.

Die Transformation erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Der Ligationsansatz wurde zu 60 µL chemisch kompetenter Zellsuspension DH5αTM (InvitrogenTM) hinzupipettiert (auf Eis auftauen) und vorsichtig mit der Spitze gemischt
2. Inkubation auf Eis für 30 min
3. Hitzeschock: 20 s bei 42 °C
4. Abkühlung für 2 min ebenfalls auf Eis
5. Hinzugabe von 950 µL S.O.C-Medium
6. Inkubation von 1 h bei 37 °C und 230 rpm
7. Schließlich wurden 100 µL der Suspension auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert

Selektivplatten:

LB-Platten: 1 L: 25 g LB, 15 g Agar

Nach dem Autoklavieren:

Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin und anschließender Ausplattierung von 50 µL X-Gal Stocklösung (20 mg/mL in N,N-Dimethylformid) auf jeder Platte.

Durch eine Blau-Weiß Färbung der voraussichtlich positiven Kolonien erfolgte eine Selektion der Transformanten. Ob jedoch auch tatsächlich das gewünschte Insert im Plasmid vorhanden war, konnte nur mit Hilfe einer PCR mit den Primern *usp* und *rsp* (siehe Tab. 6) sowie einer anschließenden Gelelektrophorese bestätigt werden. Der Nachweis des jeweiligen Fragments von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 als auch *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB in *Escherichia coli* erfolgte nach folgendem Protokoll:

Material und Methoden

1. Je vier weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher abgepickt und in 50 μL deion. Wasser resuspendiert
2. Zusätzlich wurde der Zahnstocher noch auf Selektivmedium ausgestrichen
3. Die Zellen wurden für 5 min bei 98 °C aufgeköcht und anschließend bei 13.000 rpm für 5 min und 4 °C zentrifugiert
4. Überstand in ein neues Eppendorfgefäß
5. Kontroll-PCR:

Reaktionsansatz für Kontroll-PCR:

Taq-&GO™ [5]	5 μL
Primer usp [10 pmol/ μL]	1 μL
Primer rsp [10 pmol/ μL]	1 μL
PCR-Wasser	13 μL
DNA-Lösung	5 μL

Gesamtvolumen 25 μL

Temperaturprogramm:

95 °C 5 min

95 °C 20 s

54 °C 15 s

72 °C 30 s 32 ×

72 °C 10 min

15 °C end

Anschließend erfolgte eine Überprüfung der PCR auf einem 0,8 %igem Agarosegel bzw. Aufreinigung der PCR-Produkte und späterer Sequenzierung beider Fragmente.

Tab. 3: Sämtliche Primer für BOX-, SSCP- und qPCR

Primer	Primer-Sequenz	Organismen	Referenz
BOX-A1	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'		Martin et al., 1992
Unibac-II-515f	5'-GTG CCA GCA GCC GC-3'	Eubakterien	Lieber et al., 2002
Unibac-II-927r ^P	5'-CCC GTC AAT TYM TTT GAG TT-3'	Eubakterien	Lieber et al., 2002
580 bp forw	5'-GCG GGA TTG CCG TGA GAT-3'	RE*1-1-14	Piker, 2008
580 bp rev	5'-CGC ACT GTT TCG GAC CAT TAG-3'	RE*1-1-14	Pirker, 2008
RTQ 580 forw	5'-GACCTGCTGGCCTGACACA-3'	RE*1-1-14	Pirker, 2008
RTQ 580 rev	5'-GACCATTAGCGATGACCAAGTTG-3'	RE*1-1-14	Piker, 2008
RTQ 580 rev ^P	5'-GACCATTAGCGATGACCAAGTTG-3'	RE*1-1-14	Piker, 2008
G6-F2	5'-AGGTTGTAGCTGGCTCCATTAG-3'	AG2-2IIIB	Anees et al., 2009
G6-R2	5'-GTAGGGGTCCCAATCATTCA-3'	AG2-2IIIB	Anees et al., 2009
usp	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'		Pirker, 2008
rsp	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'		Pirker, 2008
Sonde			
RTQ	5'-TTGTGGGAGCAAGCCCCTCCC-3'		Piker, 2008

Real-Time PCR Eichreihe:

Für die jeweilige Eichreihe von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 und *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB wurde zum Abschluss noch eine Verdünnungsreihe der klonierten Fragmente hergestellt.

2.7 Ad Planta-Versuche

Um das entwickelte Real-Time PCR-System auch unter realen Bedingungen testen zu können, wurde neben den zu untersuchenden Feldproben noch eine Analyse des Saatguts als auch des aufgekeimten Saatguts durchgeführt. Die heranwachsenden Keimlinge wurden zum Vergleich sowohl unter sterilen Bedingungen in Keimtaschen als auch in unsteriler Erde herangezüchtet.

2.7.1 Monitoring von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in KWS-Saatgut

Für den Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in dem verkapselten Saatgut wurde zuerst die Kapsel aufgelöst und in weiterer Folge daraus die DNA isolieren. Hierbei wurden bestimmtes Saatgut von Zuckerrüben ausgewählt und die daraus isolierte DNA für die Real-Time PCR herangezogen. Aus deren Ergebnissen konnte schließlich die Konzentration an *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in dem jeweiligen Saatgut errechnet werden.

Durchführung:

1. Von den ausgewählten Samen wurden jeweils 25 Stück in 25 mL 0,05 % Natrium-Citrat und 0,1 % Pepton für 2 Stunden auf den Schüttler gegeben
2. Je 2 mL der Suspension wurden in ein 2 mL Eppi pipettiert und für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert
3. Der Überstand wurde dekantiert und weitere 2 mL der Suspension in dasselbe Eppendorfgefäß pipettiert
4. Erneute Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C
5. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -70 °C eingefroren
6. DNA-Extraktion siehe Kapitel 2.4.1

Um den Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 eventuell auch mittels einer kultivierungsabhängigen Methode, der BOX-PCR (siehe Kapitel 2.5.), nachweisen zu können, wurden 100 µl der unverdünnten Suspension auf R2A-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert (weitere Vorgehensweise siehe Kapitel 2.5.2).

2.7.2 Monitoring von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in sterilen Keimtaschen

Zur Feststellung, ob und wenn ja, inwiefern sich die Abundanzen von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 zwischen Samen und Keimlingen unterscheiden, wurde noch zusätzlich ein Versuch mit Hilfe steriler Keimtaschen durchgeführt.

Durchführung:

Je Saatgutvariante wurden zwei autoklavierte Keimtaschen mit je sieben Pillen unter sterilen Bedingungen angesetzt und 30 mL autoklaviertes Leitungswasser hinzugegeben. Nach zwei Wochen Wachstum unter definierten Gewächshausbedingungen wurden die Mikroorganismen aus der Rhizosphäre isoliert und in weiterer Folge eine DNA-Extraktion durchgeführt (siehe Kapitel 2.4 bzw. 2.4.1).

2.7.3 Monitoring von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in unsteriler Erde

Da die Sämlinge in den Keimtaschen unter sterilen Bedingungen heranwuchsen, stellte sich noch die Frage, ob mittels Real-Time PCR ein Unterschied in den Abundanz in den sterilen und unsterilen Bedingungen, wie sie schlussendlich auch bei den Feldproben gegeben sind, zu bemerken war.

Durchführung:

Je Saatgutvariante wurden sieben Pillen 2 cm tief in unsteriler Erde eingesetzt. Das Anzuchtmedium bestand aus Erde, Quarzsand und Perlit in einem Mischungsverhältnis von 3:1:1. Nach fünfzehn Tagen Wachstum wurden die Mikroorganismen abermals aus der Rhizosphäre isoliert und in weiterer Folge eine DNA-Extraktion durchgeführt (siehe Kapitel 2.4 bzw. 2.4.1).

2.8 Direkte Arbeiten am Feld

Zu einem weiteren Teilaspekt dieser Arbeit gehörten u.a. auch direkte Feldarbeiten vor Ort. Hierfür fanden in regelmäßigen Abständen von ca. einem Monat über die ganze Wachstumsperiode hinweg Begutachtungen der Zuckerrüben in Ottmaring (Deutschland) statt. Neben den drei Probenahmen fanden zudem noch Zählungen und Bonituren der Pflanzen statt. Während es sich bei jenen Proben (siehe Auflistung im Kapitel 2.4), welche im Labor weiter analysiert wurden, nur um einen Teil der am Feld untersuchten Zuckerrübenpflanzen handelte, wurden bei Zählung und Bonitur auch weitere Kultivare in jeweils vier Wiederholungen mit eingebunden. Bei diesen Kultivaren handelte es sich um die gleichen Varianten wie bei den analysierten Pflanzen, mit dem Unterschied, dass diese noch zusätzlich einer Behandlung unterzogen wurden. Und zwar zum einen mit Fungizid, mit

Spritzung und schließlich noch mit einer Kombination aus Fungizid und Spritzung (Kurzbezeichnungen siehe Tab. 4). Dies hatte den Zweck, dass man die unbehandelten Varianten (Kontrolle) gegenüber den behandelten Kultivaren in ihrem Wachstum und ihrer Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani* vergleichen konnten.

Tab. 4: Kurzbezeichnung der Behandlungen

Probenbezeichnung	Behandlung
F	Fungizid
FS	Fungizid & Spritzung
CO	Kontrollen
S	Spritzung

2.8.1 Zählung

Insgesamt wurden fünf Zählungen in monatlichen Abständen durchgeführt. Die erste Zählung begann bei Jungpflanzen und endete kurz vor der Ernte der Zuckerrüben. Jede Parzelle bestand aus neun Reihen zu jeweils ca. dreißig Pflanzen. Für die Zählung wurden drei Reihen jeder Parzelle durchgezählt und auf die restlichen Parzellen hochgerechnet.

2.8.2 Bonitur

Während der Pflanzenentwicklung wurde der Biokontrolleffekt der eingebrachten Antagonisten durch die Bestimmung des *Rhizoctonia solani*-Befallsindex (RI) und die Anzahl der gesunden Rüben bewertet. Dies erfolgte mittels der sogenannten Bonitur. Bei einer Bonitur wird jede Zuckerrübe einzeln begutachtet und ihrem Gesundheitszustand nach beurteilt. Die Pflanzen, welche die Wertnote „1“ erhalten, gelten als vollkommen gesund, die mit der Wertnote „9“ als tot. Die „Boniturnoten“ ergeben sich aus dem prozentuellen Befall von *Rhizoctonia solani*, welcher durch eine schwärzliche Färbung leicht zu erkennen ist (Schema der „Boniturnotenverteilung“ siehe Abb. 4).

Ab dem Rübenalter von drei Monaten fand jeweils monatlich bis kurz vor der Ernte eine Bonitur der Zuckerrüben statt. Insgesamt wurden vier Bonitierungen durchgeführt.

Bei der letzten Bonitur, welche im Herbst stattfand, wurden sämtliche Zuckerrüben einer Parzelle geerntet. Anhand der großen Anzahl an Rüben und deren Größe wurde eine sogenannte Tellerbonitur durchgeführt. Hierbei wurden die Zuckerrüben vor der Untersuchung maschinell gewaschen und kamen anschließend via Fließband auf eine überdimensionale Platte. Auf diesen „Teller“ fand schlussendlich die Begutachtung und Wiegung der geernteten Zuckerrüben statt.

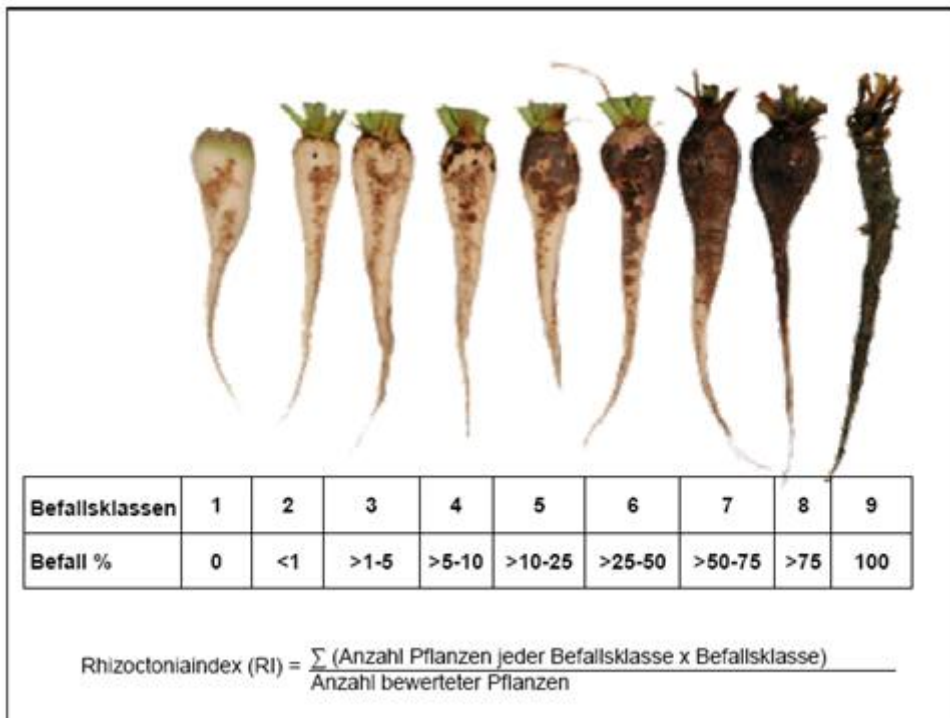


Abb. 4: Boniturschema von *Rhizoctonia solani* bei Zuckerrüben (Büttner et al., 2004).

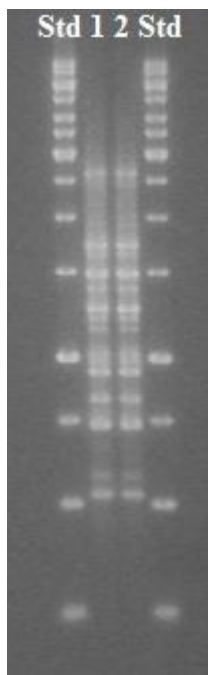
3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Kultivierungsabhängige Analyse von Mikroorganismen

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Pilz-Isolat auch tatsächlich um jenen *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB Stamm handelt, mit dem die beiden Versuchsfelder in Ottmaring und Göttingen inokuliert wurden, wurde dieser einer BOX-PCR unterzogen.

3.1.1 Genotypische Identifizierung des Pilz-Isolates vom Feld mittels BOX-PCR

Mittels BOX-PCR und der anschließenden Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel, ist eine Differenzierung bis auf Stammebene eines Organismus möglich.



Anhand des identischen Bandenmusters (siehe Abb. 5) konnte der Pilz, der direkt aus erkrankten Zuckerrüben isoliert wurde, eindeutig als *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB, mit welchem beide Zuckerrüben-Felder inokuliert wurden, identifiziert werden.

Abb. 5: BOX-Elektrophoresegel zum Vergleich des Pilz-Isolates (1) mit *R.solani* AG2-2IIIB (2); Std: 1 kb DNA Ladder

3.2 Ergebnisse der Kultivierungsunabhängigen Analyse der Mikroorganismen

3.2.1 Analyse der mikrobiellen Biodiversität mittels SSCP

Zur Analyse der bakteriellen Biodiversität der Rhizosphäre von Zuckerrüben sowie des Bodens aus den beiden Versuchsfeldern Ottmaring und Göttingen wurde ein Bereich der hoch konservierten 16S rDNA herangezogen. Um die Ähnlichkeiten der mikrobiellen Profile innerhalb der Wiederholungen der einzelnen Kultivare und eine eventuelle Veränderung im Laufe der Vegetationsperiode (3 Probenahmen) feststellen zu können, wurden alle erhaltenen SSCP-Gelbilder mittels der Computer-Software GelCompar[®] II analysiert und zum Vergleich Dendrogramme erstellt.

3.2.1.1 Untersuchung auf Veränderung der natürlichen Community

Zur Untersuchung der gesamten bakteriellen Community der untersuchten Mikrohabitate von Zuckerrüben und des Bodens wurde das unspezifische eubakterielle Unibac-Fragment amplifiziert. Es wurden für alle sechs durchgeführten Probenahmen (Tab. 5 & Abb. 6) SSCP-Gele angefertigt, jeweils drei in Ottmaring und Göttingen. Als Stellvertreter dieser Gele wurden die drei Gele in den Abbildung 7, 8 und 9 analysiert.

Tab. 5: Probenahmezeitpunkte der Zuckerrüben.

Probenahme	Monat	BBCH-Codierung nach Meier et al., 1993	
		Code	Beschreibung
1.	Mitte Mai	15	fünf Laubblätter entfaltet
2.	Mitte Juni	35	35 % der Pflanzen benachbarter Reihen berühren sich
3.	Anfang/Mitte Oktober	49	Rübenkörper hat erntefähige Größe erreicht



Abb. 6: Zuckerrübenstadien zu 3 verschiedenen Zeitpunkten. a) erste Probenahme Mitte Mai; b) zweite Probenahme Mitte Juni; c) dritte Probenahme Anfang Oktober

Ergebnisse

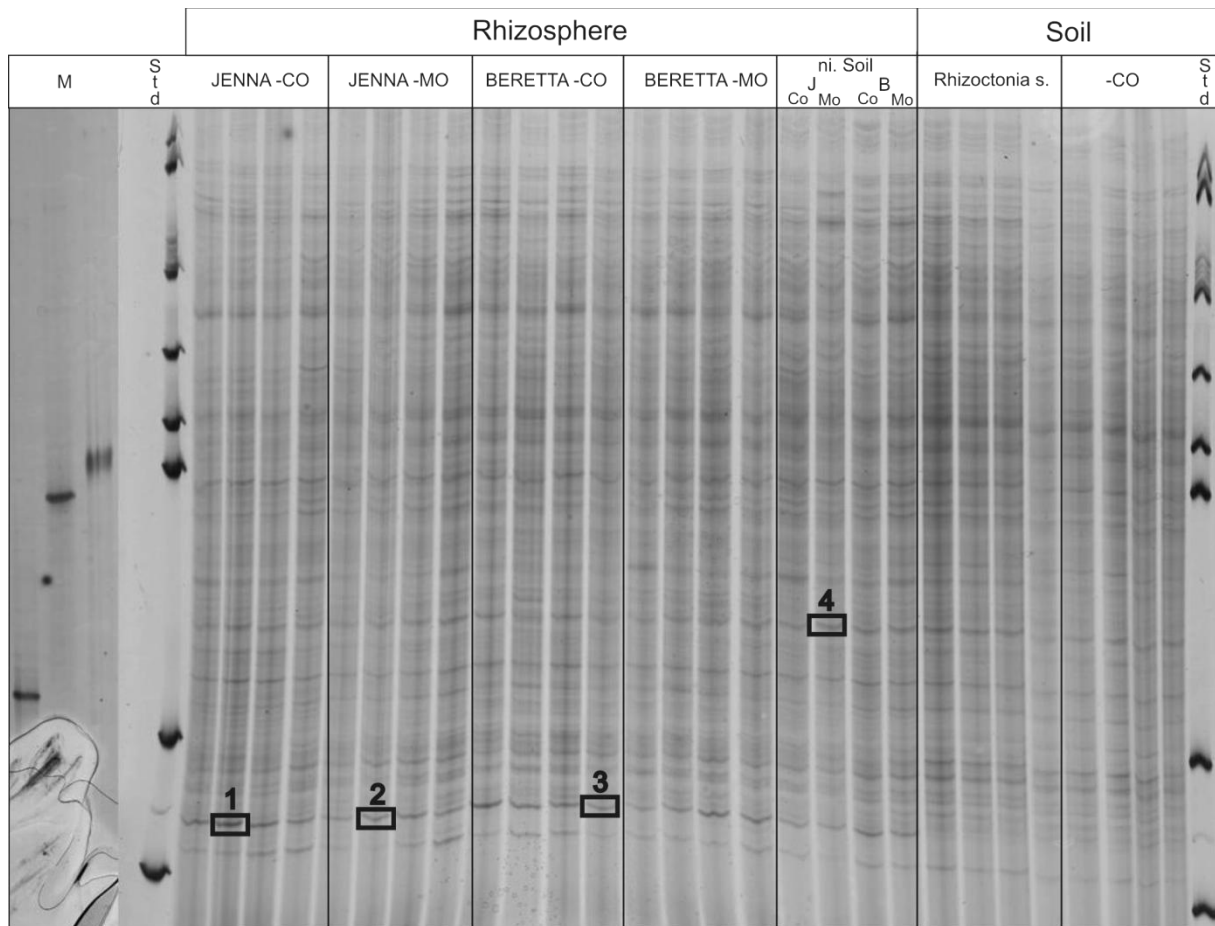


Abb. 7: Gesamte Bakterien-Community der Rhizosphäre von Zuckerrüben sowie des nichtdurchwurzelten Bodens der ersten Probenahme aus Ottmaring. Die eingekreisten Banden wurden ausgeschnitten, sequenziert und über eine BLAST Analyse identifiziert (siehe Tab. 6).

8 %iges Polyacrylamidgel; Std.: 1 kb DNA Ladder; B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; M: Marker; MO: Mikroorganismen

Die Biodiversität von Bakterien der ersten Probenahme aus Ottmaring, welche sich im Bereich der Wurzeln von Zuckerrüben und des Bodens befinden sind im SSCP-Gel in der Abbildung 7 dargestellt. Die Ähnlichkeit innerhalb der einzelnen Kultivare ist aufgrund des einheitlichen Bandenmusters deutlich zu erkennen. Als Marker wurden neben dem Haupt-Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 noch zwei weitere Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12 und *Serratia plymuthica* 3RE-4-18, welche ebenfalls in die Saattpillen eingebracht wurden, auf das Gel aufgetragen. Anhand deren Höhenposition im Gel bestand die Aussicht auf einen Hinweis zur Detektion der drei Antagonisten in den untersuchten Proben. Da in der jeweiligen Höhe jedoch keine Bande ausfindig gemacht werden konnte, wurden mehrere dominant erscheinende Banden ausgeschnitten und zum Zweck der Identifizierung sequenziert (Tab. 6).

Ergebnisse

Die Fingerprints der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre bzw. dem Boden kurz vor der Ernte wiesen Vergleichbarkeiten denen der ersten Probenahme auf (Abb. 8). Die hohe Biodiversität an Bakterien und die Ähnlichkeit der Kultivare zueinander ist vergleichbar mit dem Muster junger Pflanzen. Der einzige ersichtliche Unterschied war in den Bodenproben zu finden. Im Unterschied zur ersten Probenahme war ein deutlicher Rhizosphäreneffekt zu erkennen, d.h. das vermehrt dominante Banden in der Rhizosphäre auftraten.

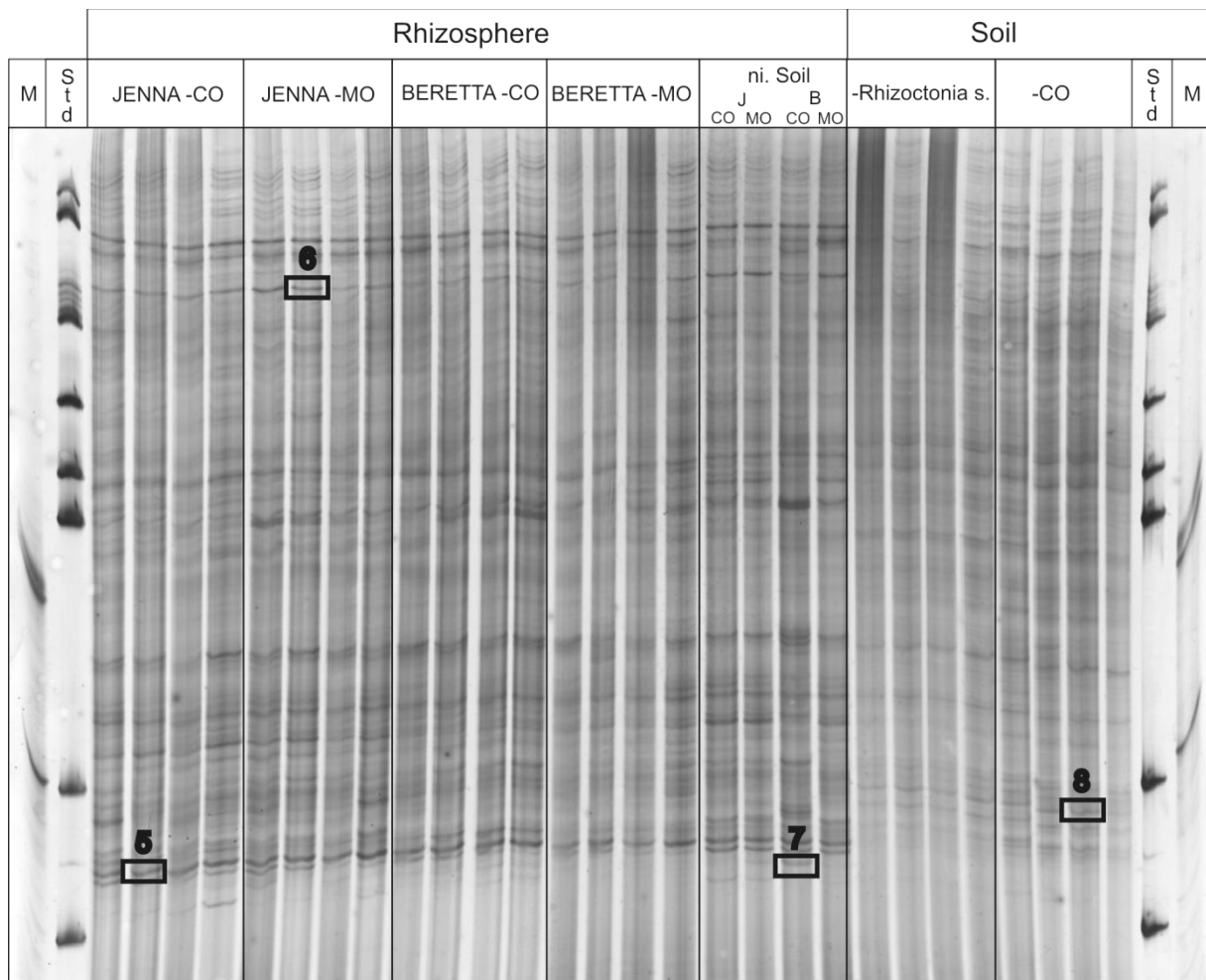


Abb. 8: Gesamte Bakterien-Community der Rhizosphäre von Zuckerrüben sowie des nichtdurchwurzelten Bodens der dritten Probenahme aus Ottmaring. Die eingekreisten Banden wurden ausgeschnitten, sequenziert und über eine BLAST Analyse identifiziert (siehe Tab. 6).

8 %iges Polyacrylamidgel; Std.: 1 kb DNA Ladder; B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; M: Marker; MO: Mikroorganismen

Zum Vergleich der beiden angefertigten SSCP-Gele aus Ottmaring ist in Abbildung 9 ein SSCP-Gel der dritten Probenahme aus Göttingen zu sehen. Wie auch bei den vorangegangenen Proben in Ottmaring erschien mit Ausnahme des Rhizosphäreneffekts, der Banden-Verlauf im Gel zu den einzelnen Proben nahezu identisch. Desweiteren wurden auch

Ergebnisse

aus diesem Gel dominante Banden ausgeschnitten und mittels Sequenzierung identifiziert (Tab. 6).

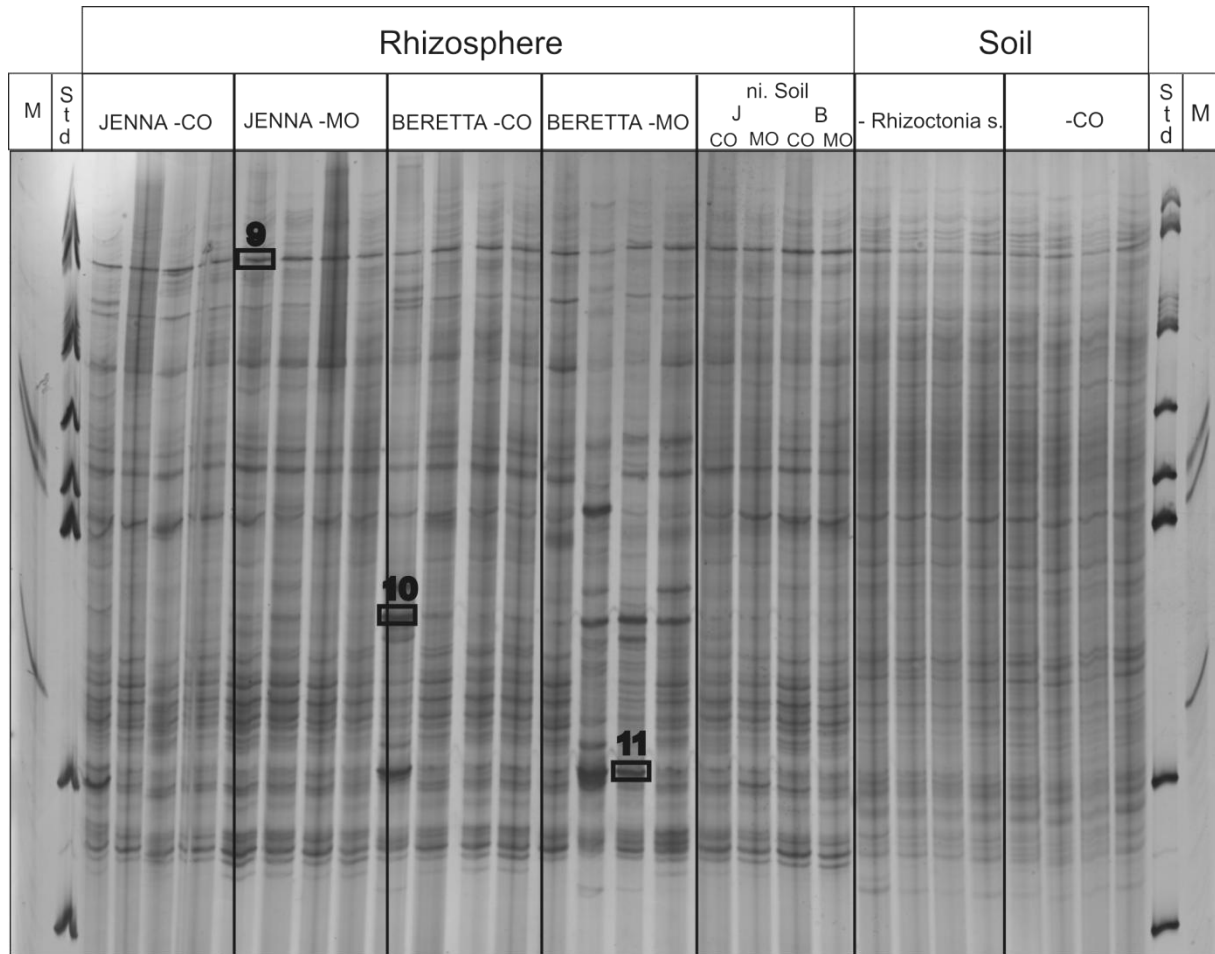


Abb. 9: Gesamte Bakterien-Community der Rhizosphäre von Zuckerrüben sowie des nichtdurchwurzeltten Bodens der dritten Probenahme aus Göttingen. Die eingekreisten Banden wurden ausgeschnitten, sequenziert und über eine BLAST Analyse identifiziert (siehe Tab. 6).

8 %iges Polyacrylamidgel; Std.: 1 kb DNA Ladder; B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; M: Marker; MO: Mikroorganismen

Ergebnisse

Tab. 6: Identifizierung der ausgeschnittenen Banden aus den SSCP-Gelen der Probenahmen.

Nr.	Organismus	Accession Number of the closest database match	Max. Identität	Taxonomische Gruppen
1	<i>Novosphingobium</i> sp.	D84626.2	94 %	α -Proteobacteria
2	<i>Novosphingobium</i> sp.	D84626.2	92 %	α -Proteobacteria
3	Marine bacterium	HM030990.2	84 %	
4	<i>Desulfococcus biacutus</i>	NR_025406.1	86 %	α -Proteobacteria
5	<i>Novosphingobium</i> sp.	D84626.2	93 %	α -Proteobacteria
6	<i>Variovorax paradoxus</i>	AB680784.1	96 %	β -Proteobacteria
7	<i>Novosphingobium lentum</i>	NR_042056.1	99 %	α -Proteobacteria
8	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	NR_041500.1	92 %	Sphingobacteria
9	<i>Variovorax boronicumulans</i>	NR_041588.1	97 %	β -Proteobacteria
10	<i>Gluconobacter cerinus</i>	JF794017.1	99 %	α -Proteobacteria
11	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	AB602804.1	99 %	Firmicutes

Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden aus den vorangegangenen SSCP-Gelen (Abb. 7, 8 und 9) ergab, dass es sich überwiegend um Mikroorganismen des Phylums Proteobacteria handelte.

Der ursprüngliche Zweck dieser Untersuchung war es, den Einfluss der künstlich angereicherten Antagonisten auf ihren Einfluss gegenüber der natürlichen Bakterien-Community hin zu untersuchen. Den Aufschluss darüber in wie fern die Antagonisten in ein natürliches System eingreifen und möglicherweise in der Lage sind, andere vorhandene Bakterienstämme zu verdrängen, lieferten die Dendrogramme.

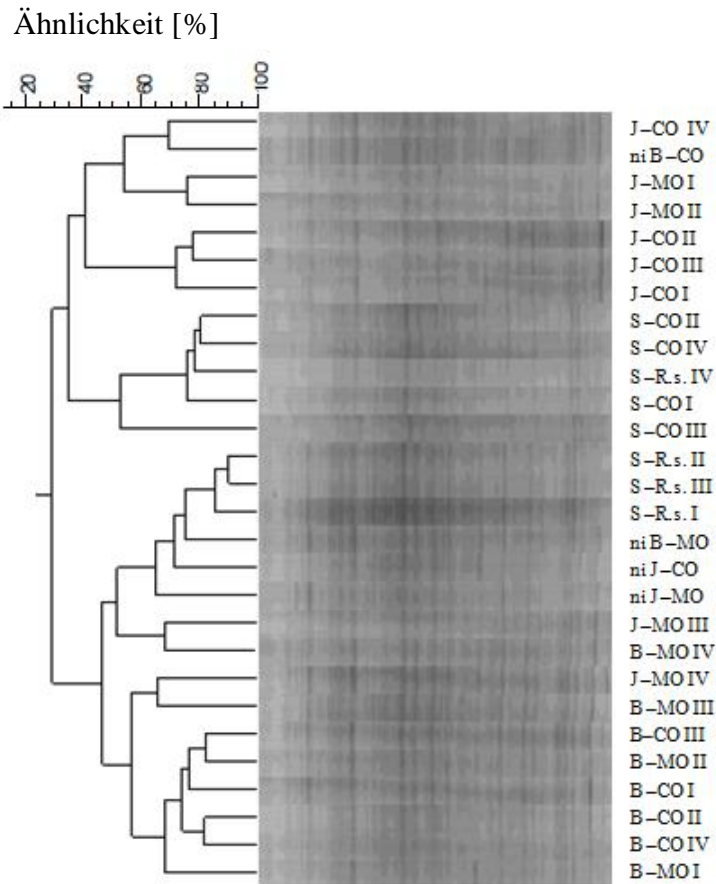


Abb. 10: Dendrogramm der gesamten bakteriellen Community aus Rhizosphäre und Boden der ersten Probenahme in Ottmaring.

B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; MO: Mikroorganismen; ni: nicht inokuliert; R.s.: *Rhizoctonia solani*; S: Boden; I-IV: 1-4 Wiederholung

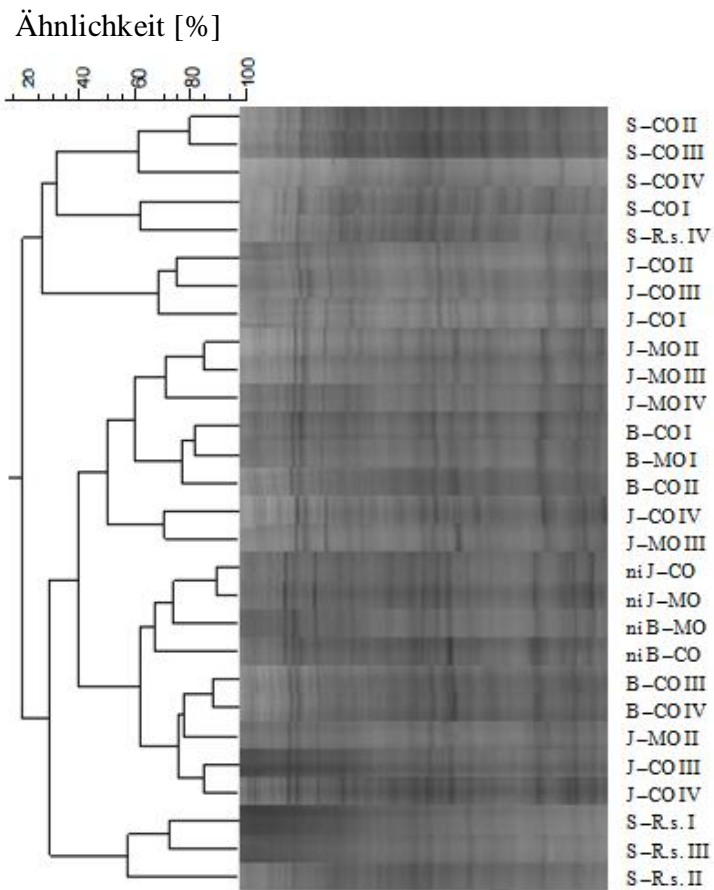


Abb. 11: Dendrogramm der gesamten bakteriellen Community aus Rhizosphäre und Boden der dritten Probenahme in Ottmaring.

B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; MO: Mikroorganismen; ni: nicht inokuliert; R.s.: *Rhizoctonia solani*; S: Boden; I-IV: 1-4 Wiederholung

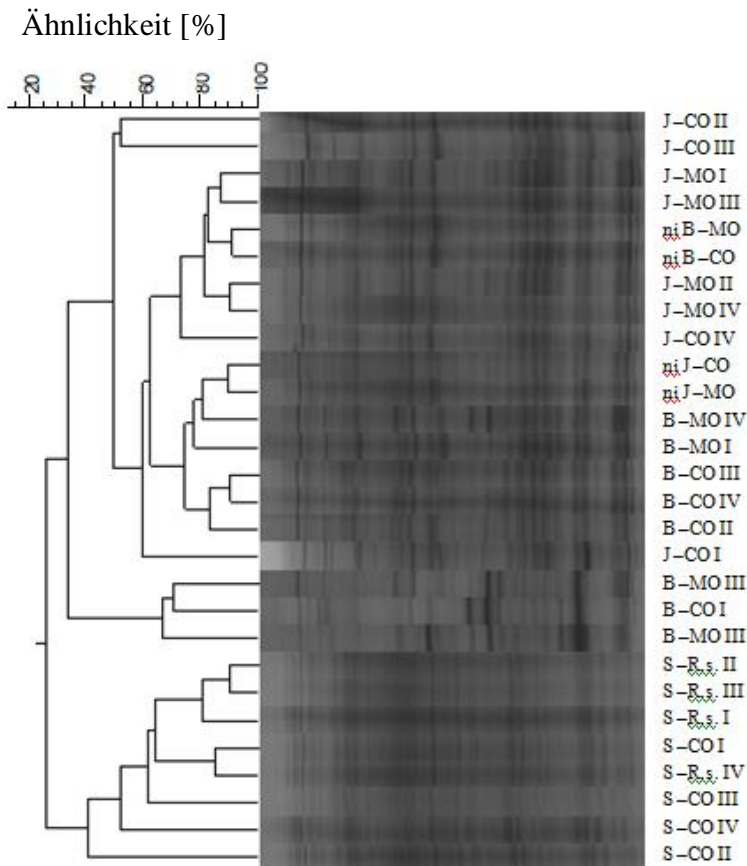


Abb. 12: Dendrogramm der gesamten bakteriellen Community aus Rhizosphäre und Boden der dritten Probenahme in Göttingen.

B: BERETTA; CO: Kontrolle; J: JENNA KWS; MO: Mikroorganismen; ni: nicht inokuliert; R.s.: *Rhizoctonia solani*; S: Boden; I-IV: 1-4 Wiederholung

Alle Dendrogramme (Abb. 10, 11 und 12) spiegeln zum größten Teil Gruppierungen der jeweiligen Sorte bzw. des Bodens wieder. Sowohl die Zuckerrübensorten BERETTA und JENNA KWS als auch beide Bodenproben bildeten, nach Analyse mit der Computer-Software GelCompar[®], eigene Clusters. Die Kernaussage dieser Ergebnisse liegt jedoch darin, dass sowohl die Kontrollen als auch mit Mikroorganismen inokulierte Varianten sich in einer gemeinsamen Gruppierung befanden und somit deren Einfluss auf die natürliche Bakterien-Community als vernachlässigbar angesehen werden konnte.

3.2.2 Analyse von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels SSCP

Im Gegensatz zur Analyse der bakteriellen Biodiversität von Feldproben beschränkte sich die nachfolgende Untersuchung mittels SSCP-Analyse auf den Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14. Mit Hilfe *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 -spezifischer Primer konnte ein

Ergebnisse

Fragment in der Größe von 155 bp, amplifiziert und in weiterer Folge auf ein SSCP-Gel aufgetragen werden.

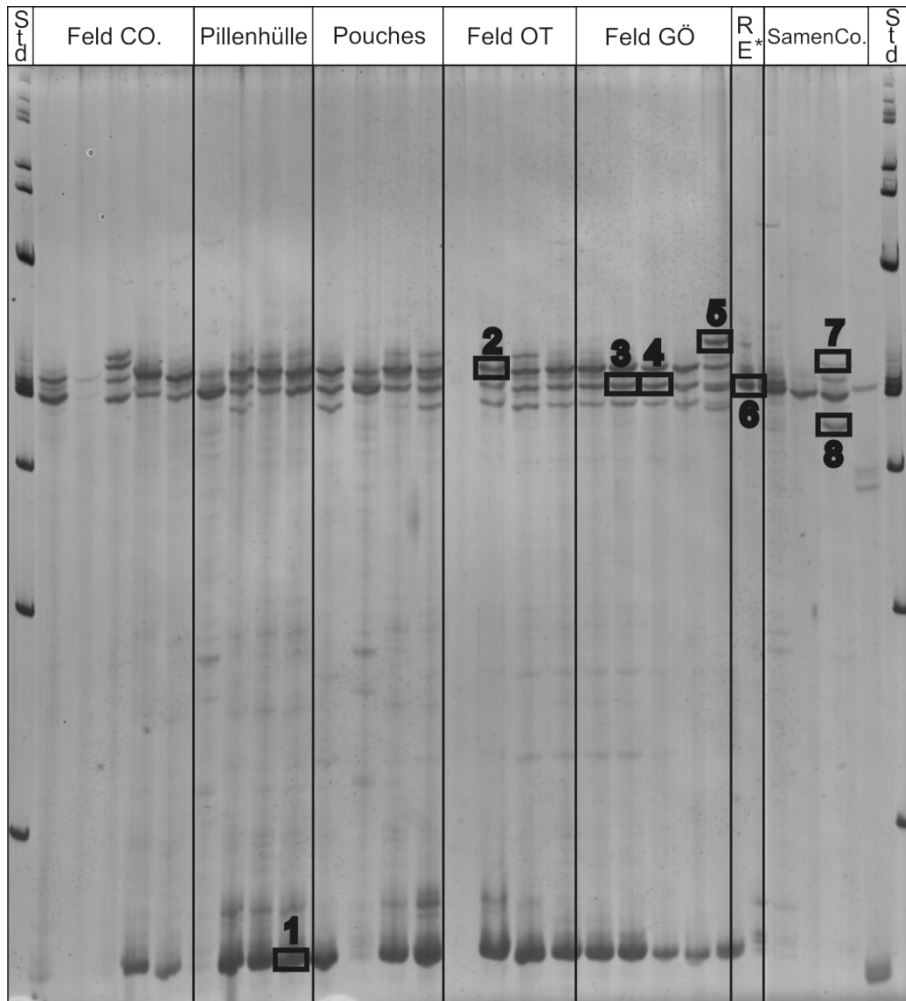


Abb. 13: *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 spezifisches Fragment. Die eingekreisten Banden wurden ausgeschnitten und sequenziert. 9,5 %iges Polyacrylamidgel; Std.: 1 kb DNA Ladder; CO: Kontrolle; GÖ: Göttingen; OT: Ottmaring

Bei dem in der Abbildung 13 zu sehenden SSCP-Gel wurden neben einer Positiv-Kontrolle noch weitere Proben aufgetragen. Die Bezeichnungen „Pouches“ und „Feld“ stehen hierbei für Rhizosphärenproben, während „Pillenhülle“ als Benennung gänzlicher Proben aus den verkapselten Samen basiert. Sowohl in den unbehandelten Kontrollen der Rhizosphärenproben vom Feld- als auch in den Samen-Kontrollen, wo keine Banden zu erwarten waren, waren mehrere Banden auf dem Gel deutlich zu sehen. Selbst in der Positiv-Kontrolle von RE*-1-1-14, wo ursprünglich eine Bande zu erwarten gewesen wäre, waren drei Banden zu erkennen. Um diesem überraschenden Ergebnis auf dem Grund zu gehen, wurden alle eingekreisten Banden ausgeschnitten und in weiterer Folge sequenziert (Tab. 7).

Ergebnisse

Tab. 7: Identifizierung der ausgeschnittenen Banden aus den SSCP-Gelen von *Pseudomonas poae*.

Nr.	Organismus	Accession Number	Max. Identität	Taxonomische Gruppen
1	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria
2	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria
3	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria
4	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria
5	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria
6	<i>Pseudomonas putida</i>	CP002870.1	82 %	γ -Proteobacteria

Anhand der Sequenzierungsergebnisse lieferten alle Banden mit *Pseudomonas putida* dasselbe Resultat.

3.2.3 Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR

Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die quantitative Nachweise von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 und *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB gerichtet war, wurden beide Organismen nach Erstellung der jeweiligen Eichgerade mittels quantitativer Real-Time PCR im Hinblick auf ihre Konzentration in den Proben analysiert. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode wurde bei allen Negativkontrollen, bei denen ein Signal auftrat, der Mittelwert errechnet und in Form einer roten Linie in den nachfolgenden Grafiken als Detektionslimit eingezeichnet. Für die Werte, die sich unterhalb dieser Linie befanden, konnte keine Garantie für eine korrekte Quantifizierung sichergestellt werden. Die Analyse wurde wenn nicht anders angegeben, mindestens zweimal wiederholt und der Mittelwert daraus angegeben. Desweiteren wurden zur Vereinfachung der errechneten Werte, sowie aus graphischen Gründen, alle Ergebnisse logarithmisch dargestellt.

3.2.3.1 Abundanz von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 im KWS-Saatgut

Für die Abundanz von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in der Pille musste aus der zuvor erstellten Eichgerade noch zusätzlich eine Geradengleichung ($y = - 3,446 \cdot x + 42,952$) erstellt werden. Mit Hilfe dieser Gleichung und der Berücksichtigung des tatsächlich enthaltenen „Pillenmaterials“ pro μl DNA, konnte mit der anschließenden Formel $\text{Zellzahl/Pille} = (C_t -$

Ergebnisse

Wert - 42,95) / - 3,446), die tatsächliche Zellzahl von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 pro Pille ermittelt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung von RE*1-1-14 aus dem verkapselten Saatgut wurden in der Abbildung 14 optisch dargestellt.

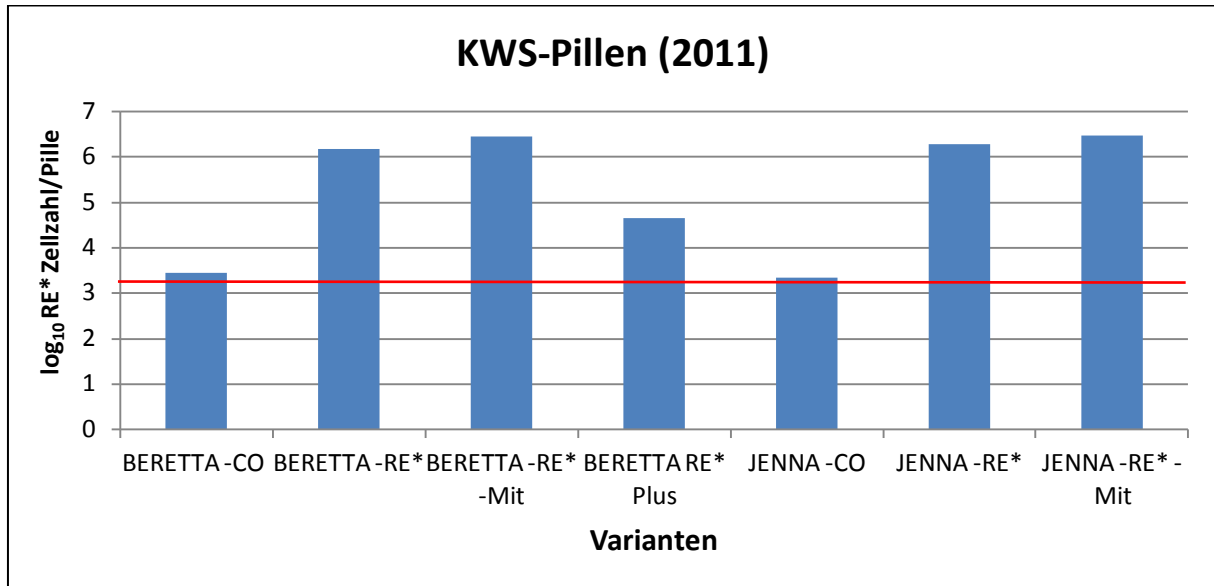


Abb. 14: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in KWS-Pillen aus dem Jahr 2011. CO: Kontrolle; Mit: Mitsui Trial

Die ursprünglich eingebrachte Menge von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 konnte in den Saatgut-Pillen wieder detektiert werden (Abb. 14). Aufgrund der Übereinstimmung mit der ursprünglich in den Pillen eingeführten Konzentration und den Ergebnissen der q-PCR von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 wurden bei diesem Versuch auf weitere Wiederholungen verzichtet.

3.2.3.2 Abundanz von *Pseudomonas poae* bei *ad planta*-Versuchen

Wie bereits im vorherigen Versuch beschrieben, konnte mittels einer zuvor erstellten Eichgerade, der daraus erstellten Geradengleichung ($y = -3,3394 \cdot x + 42,934$) und den C_t -Werten, welche direkt bei der q-PCR abzulesen waren, die Zellzahl ermittelt werden.

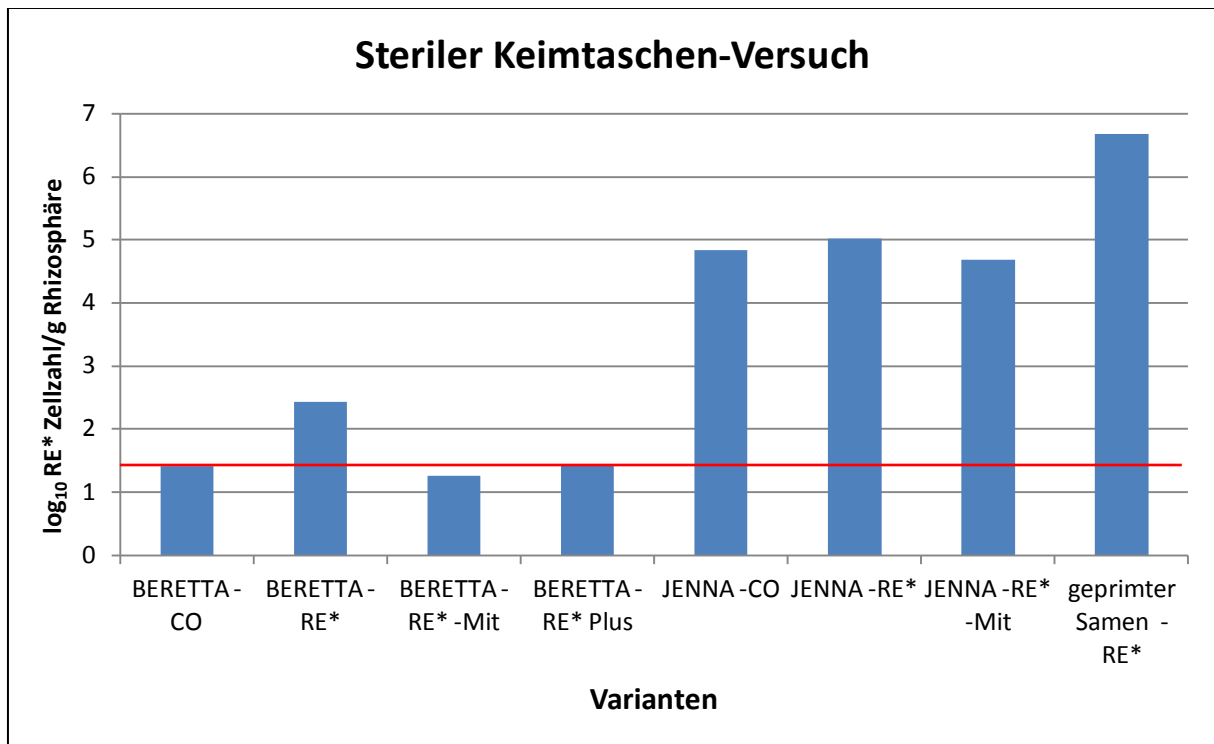


Abb. 15: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE* mittels qPCR aus Rhizosphärenproben zwei Wochen alter Zuckerrüben sterilen Keimtaschen.
CO: Kontrolle; Mit: Mitsui Trial

Sowohl für den sterilen Keimtaschen-Versuch als auch für den Topf-Versuch in unsteriler Erde wurden die gleichen Saatgut-Pillen verwendet, welche im Feld ausgedrillt wurden. Im Gegensatz des sterilen Keimtaschen-Versuchs, zeigten diese Ergebnisse jedoch keinerlei Deckung mit jenen Resultaten aus den Saatgut-Pillen (Abb. 14). Zusätzlich zu den gleichen Proben wurden bei dem Keimtaschen-Versuch noch mit RE*1-1-14 direkt geprimte Samen analysiert, welche auch mit Abstand die höchste Konzentration an *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 zeigten. Die Signale bei der Zuckerrübensorte JENNA KWS fielen mit einem Ergebnis von ca. log₁₀ 5 um ein Vielfaches höher aus als bei der Sorte BERETTA. Die Abundanz von RE*1-1-14 in den Saatgut-Pillen von BERETTA lagen, mit einer einzigen Ausnahme, immer unter dem Detektionslimit.

Der zweite *ad planta*-Versuch in unsteriler Erde (Abb.16) zeigte, ähnlich wie der Keimtaschen-Versuch, ebenfalls unterschiedliche Resultate zu den Ergebnissen der Saatgut-Pillen. Im Gegensatz zu den Keimtaschen war hier jedoch eine höhere Abundanz von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 bei BERETTA zu beobachten. Dennoch befanden sich alle Konzentrationsangaben im näheren Bereich des Detektionslimits, weshalb ihnen nicht allzu große Bedeutung beigemessen wurde.

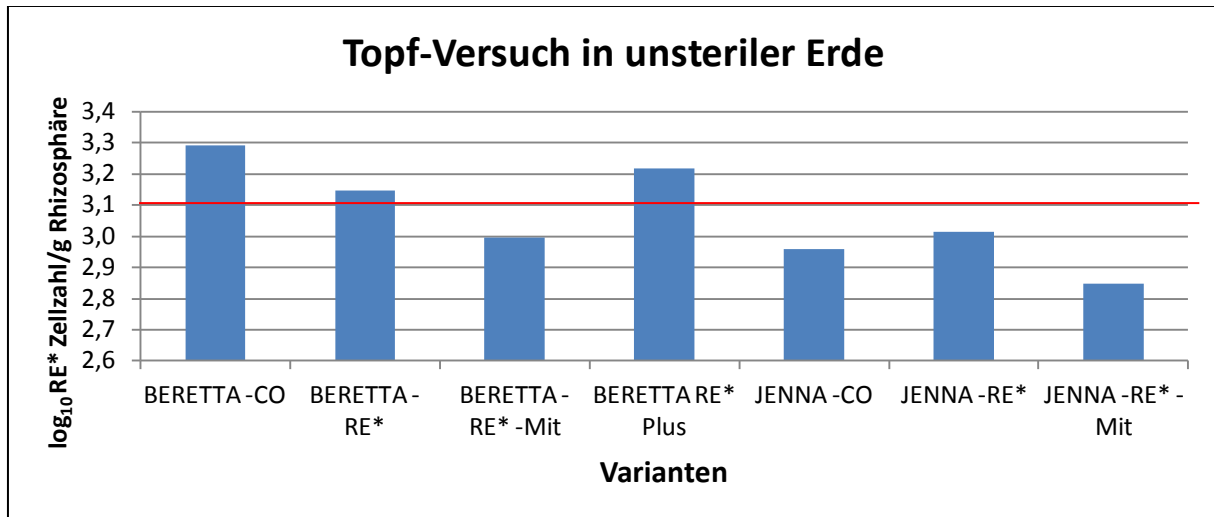


Abb. 16: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in unsteriler Erde.
CO: Kontrolle; Mit: Mitsui Trial

3.2.3.3 Abundanz von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in den Feldproben

Sämtliche Feldproben aus Ottmaring und Göttingen, der ersten bis dritten Probenahme, der Rhizosphäre einschließlich beider Bodenproben, wurden mittels qPCR in zwei Durchgängen vermessen und in den beiden folgenden Diagrammen zusammengefasst. Im Unterschied zu den vorangegangenen Auswertungen wurden zur Berechnung der Konzentration von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 die Geradengleichungen herangezogen, welche vom Gerät her selbst erstellt wurden.

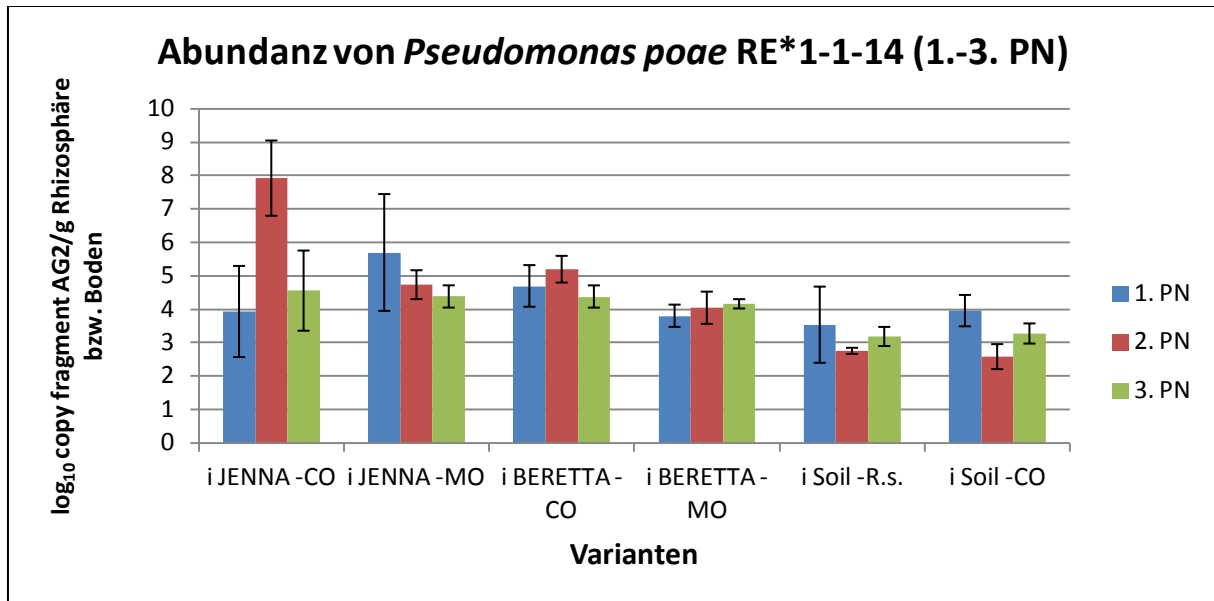


Abb. 17: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen auf inokulierten Boden aus Ottmaring. CO: Kontrolle; i: inokuliert; MO: Mikroorganismen; PN: Probenahme; R.s.: *Rhizoctonia solani*

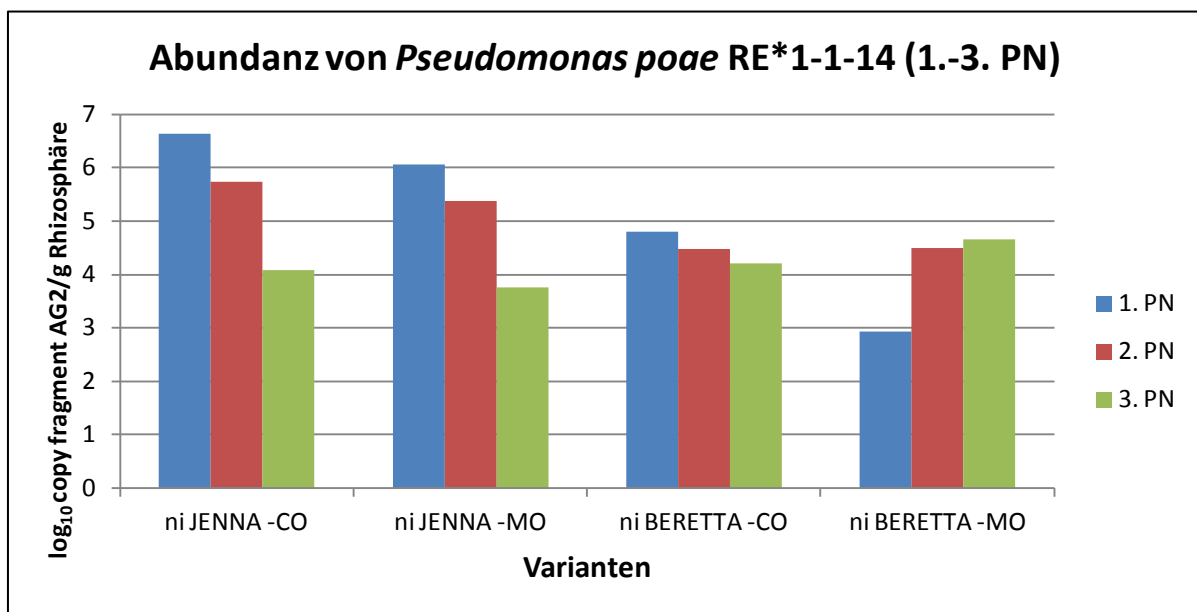


Abb. 18: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen auf nicht inokulierten Boden aus Ottmaring. CO: Kontrolle; MO: Mikroorganismen; ni: inokuliert; PN: Probenahme; fehlende Standardbalken aufgrund lediglich eines qPCR-Laufs

Bei der Analyse der Konzentration von RE*1-1-14 zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten der Zuckerrüben in Ottmaring und Göttingen variierte die Zellzahl von ca. $\log_{10} 2,5$ bis $\log_{10} 6,5$ (Abb. 17 & 18). Die Konzentrationsangaben von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 zeigten jedoch nicht das gewünschte Bild, welches man sich zu Beginn

Ergebnisse

erhofft hatte. Sowohl in den mit Mikroorganismen behandelten Varianten als auch bei den Kontrollen war kaum ein Unterschied der Abundanz von RE*1-1-14 zu verzeichnen. Zudem bestand anhand der graphischen Darstellungen kein linearer Zusammenhang bezüglich der kontinuierlichen Abnahme des Antagonisten im Laufe der Zeit. Aufgrund der relativ hohen Konzentration in beiden Bodenproben im Vergleich zu den verbleibenden Proben, war kein markanter Unterschied zu sehen. Bezüglich der beiden Varianten JENNA KWS und BERETTA war zudem ebenfalls ein Unterschied zu bemerken. Bei der Zuckerrübensorte JENNA KWS war die Abundanz des Antagonisten stets höher als bei BERETTA.

Im Vergleich zu den Analysen aus Ottmaring, zeigten die Ergebnisse (Abb. 19, 20) aus Göttingen Gemeinsamkeiten bezüglich der erhöhten Abundanz des Antagonisten bei JENNA KWS. Der Maximalwert von JENNA KWS betrug über $\log_{10} 5$ während der Minimalwert mit ca. $\log_{10} 3,7$ der Rhizosphärenproben noch deutlich über jenen Werten mit ca. $\log_{10} 3$ gegenüber den Bodenproben lag.

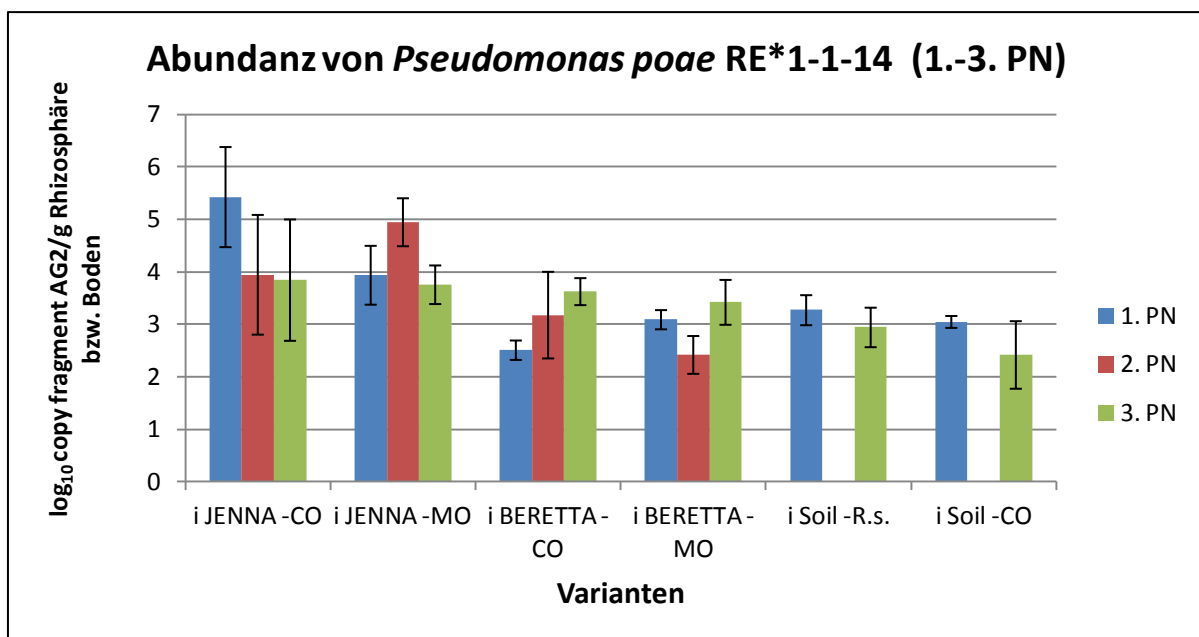


Abb. 19: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen auf inokulierten Boden aus Göttingen. CO: Kontrolle; i: inokuliert; MO: Mikroorganismen; PN: Probenahme; R.s.: *Rhizoctonia solani*; bezüglich der 2. Probenahme wurden keine Bodenproben genommen, weswegen auch keine DNA für die qPCR eingesetzt werden konnte.

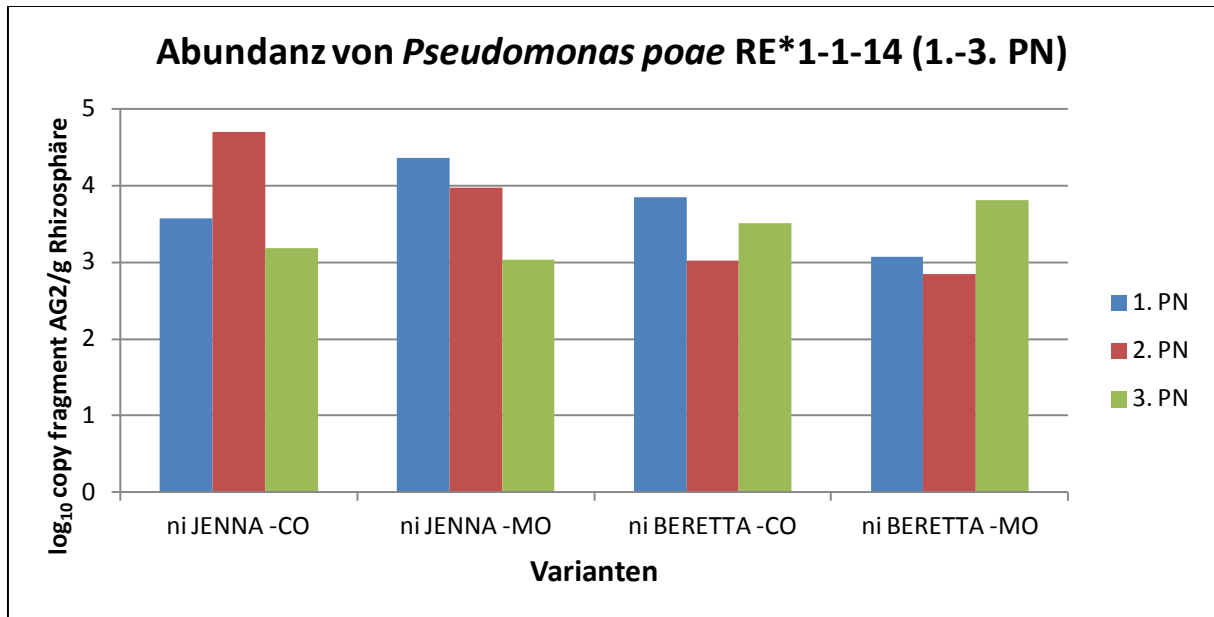


Abb. 20: Nachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen auf nicht inokulierten Boden aus Göttingen. CO: Kontrolle; MO: Mikroorganismen; ni: inokuliert; PN: Probenahme; fehlende Standardbalken aufgrund lediglich eines qPCR-Laufs

3.2.3.4 Abundanz von *Rhizoctonia solani* AG-2-2IIIB in den Feldproben

Neben der Abundanz von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 in den Feldproben zählte die Konzentrationsbestimmung des Pflanzenpathogens *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB zu den weiteren Zielen dieser Arbeit. Wie bereits bei der Auswertung zuvor wurden für die Auswertung der Daten die vorgefertigten Geradengleichungen der qPCR übernommen und alle drei Probenahmen anhand einer Grafik zusammengefasst.

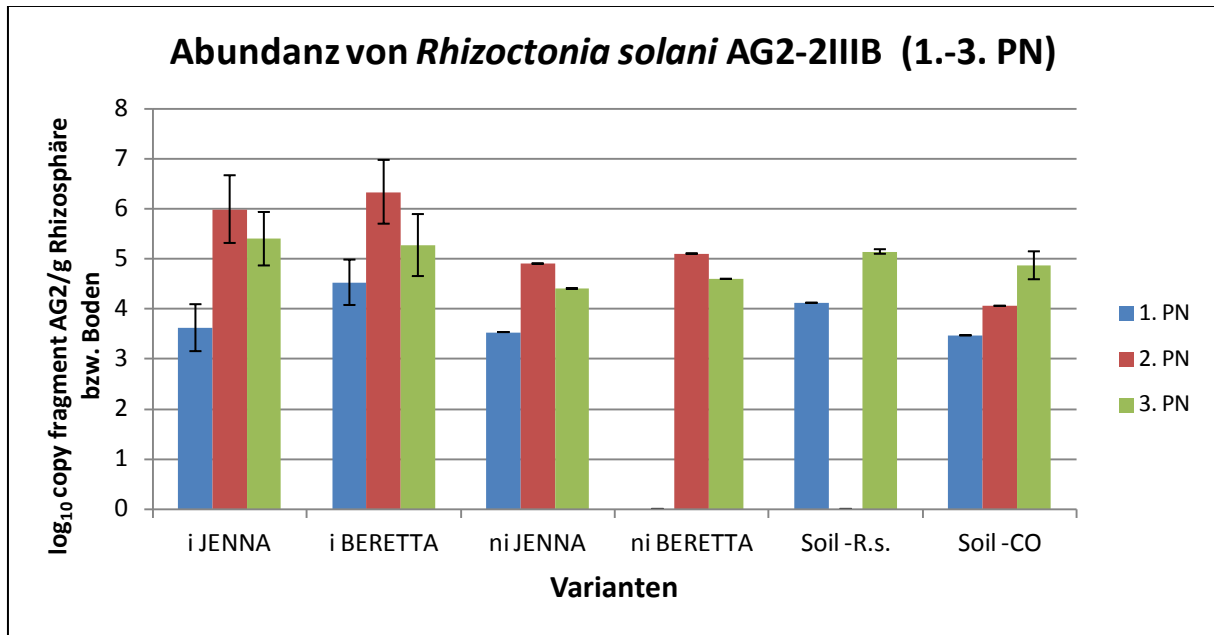


Abb. 21: Nachweis von *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen aus Ottmaring. CO: Kontrolle; i: inokuliert; ni: inokuliert; PN: Probenahme; R.s.: *Rhizoctonia solani*

Die Ergebnisse stellen jene Varianten gegenüber, welche zum einem auf inokulierten Boden und zum anderem auf natürlichen Boden heranwuchsen (Abb. 21). Ein Unterschied war bereits bei den beiden Bodenproben zu beobachten. In dem mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Boden mit dem höchsten Wert von ca. \log_{10} 6,2 waren stets höhere Konzentrationen des Pflanzenpathogens festzustellen als im nicht inokulierten Boden mit einem Konzentrationsniveau von \log_{10} 5,1. Als bemerkenswert ist noch zu erwähnen, dass die Abundanz im Vergleich zur ersten Probenahme im Laufe der Zeit zunahm. Im Hinblick der beiden Kultivare zeigte sich bei *Rhizoctonia solani* ein gegensätzliches Bild zu dem Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14. BERETTA wurde diesem Ergebnis nach häufiger von dem Pflanzenpathogen befallen als JENNA KWS.

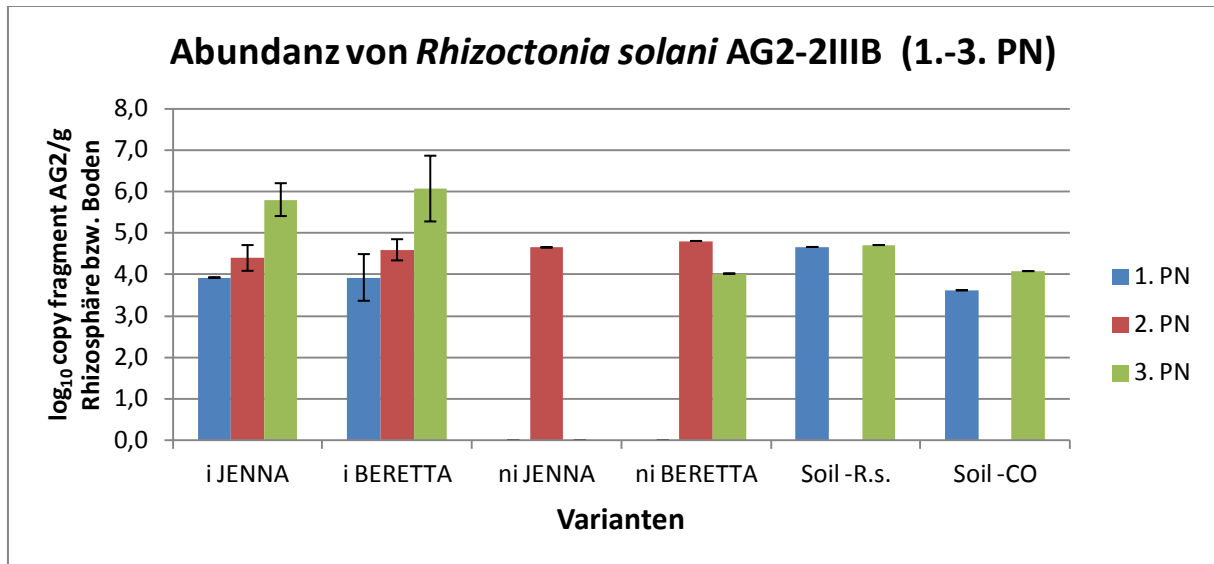


Abb. 22: Nachweis von *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB mittels qPCR in den Feldproben aller 3 Probenahmen aus Göttingen. CO: Kontrolle; i: inokuliert; ni: inokuliert ; PN: Probenahme; R.s.: *Rhizoctonia solani*

Bei der Gegenüberstellung der beiden Zuckerrübensorten JENNA KWS und BERETTA zeigten im Vergleich zu Ottmaring die Ergebnisse aus Göttingen (Abb. 22) nur einen geringen Unterschied der Abundanz von *Rhizoctonia solani*. Während bei Ottmaring deutlich zu erkennen war, dass BERETTA eine höhere Abundanz des Pflanzenpathogens besaß, ließ sich aus den Bilanzen von Göttingen zwischen JENNA KWS mit log₁₀ 5,8 und BERETTA mit log₁₀ 6 nur eine geringe Varianz erfassen. Aufgrund der fehlenden Signale der qPCR mehrerer Probenahmen war eine korrekte Auswertung aus dem Versuch von Göttingen nicht durchführbar.

3.3 Feldarbeiten

Abgesehen von den analytischen Untersuchungen der Proben im Labor gehörten Zählungen und Bonituren der Pflanzen vor Ort in Ottmaring zum letzten Aufgabenbereich dieser Arbeit. Neben den Zuckerrübenpflanzen, welche auch in weiterer Folge analysiert wurden, wurden bei Zählung und Bonitur noch weitere Behandlungen mit einbezogen (Kurzbezeichnungen siehe Tab. 4).

3.3.1 Ergebnisse der Zählungen

Die Ergebnisse der folgenden Abbildungen zeigen die Gegenüberstellung der Anzahl von Zuckerrüben zu Beginn der Zählungen bis einen Monat vor der Ernte der Rüben. Die Zählung, welche Mitte Mai stattfand, wurde kurz nach dem Vereinzeln der Pflanzen durchgeführt. Der Theorie nach müssten sämtliche Varianten ungefähr die gleiche Anzahl an Zuckerrüben auf einer Gesamtfläche von 30 m² besitzen. Da Feldarbeiten in der Praxis jedoch kaum zu 100 % exakt durchführbar sind, waren bereits zu Beginn Unterschiede in der Anzahl der Zuckerrüben. Durchschnittlich waren es in allen Varianten ca. 273 Rüben.

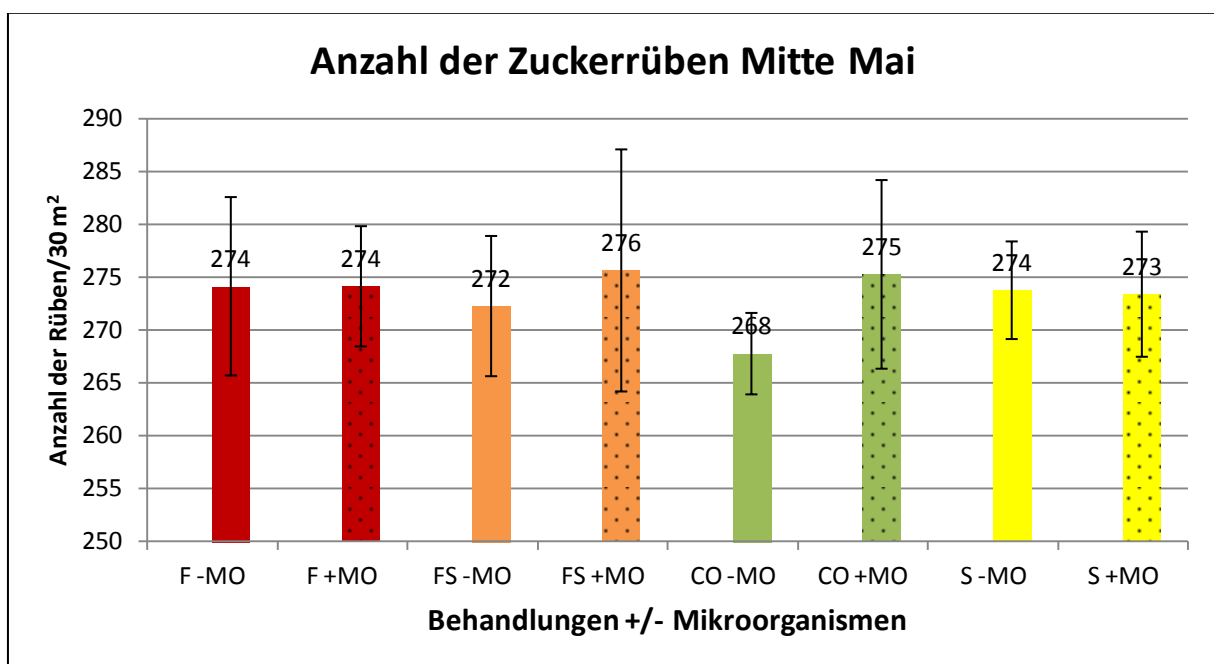


Abb. 23: Anzahl der Zuckerrüben aller vier Behandlungen auf inokulierten Boden einmal mit und einmal ohne Mikroorganismen zu Beginn der Wachstumsperiode. CO: Kontrolle; F: Fungizid; FS: Fungizid & Spritzung; MO: Mikroorganismen; S: Spritzung

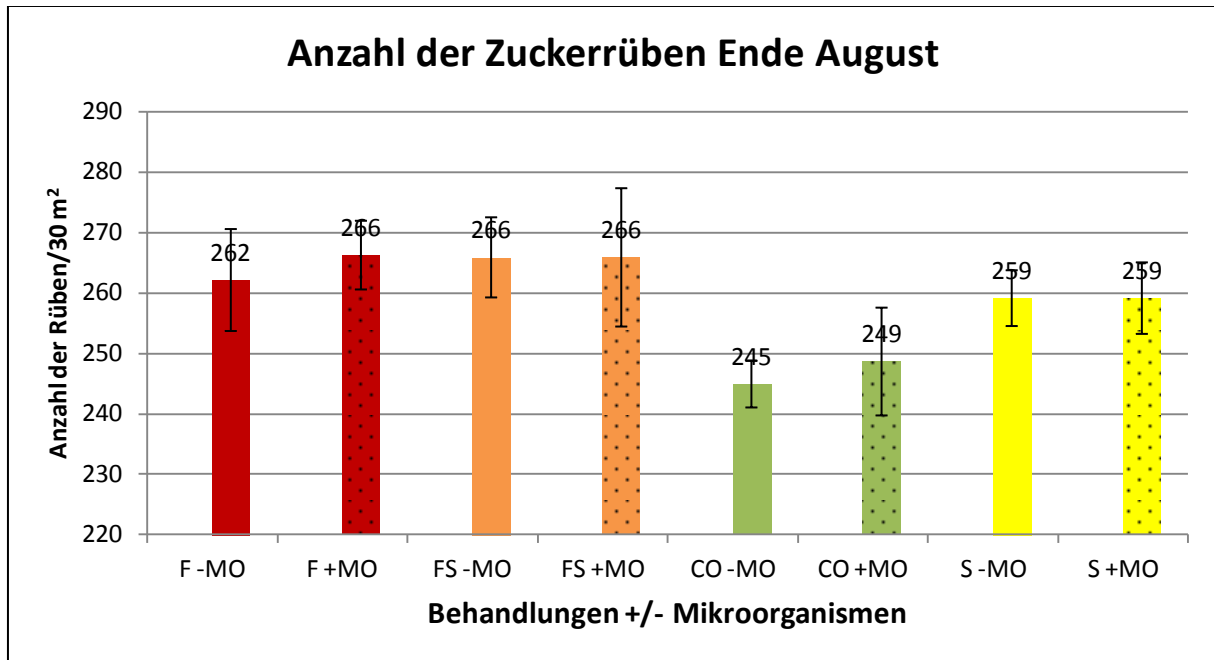


Abb. 24: Anzahl der Zuckerrüben aller vier Behandlungen auf inokulierten Boden einmal mit und einmal ohne Mikroorganismen einen Monat vor der Ernte. CO: Kontrolle; F: Fungizid; FS: Fungizid & Spritzung; MO: Mikroorganismen; S: Spritzung

Beide Zuckerrübensorten JENNA KWS und BERETTA wurden bei der Auswertung zusammengefasst und lediglich nach ihren Behandlungen unterschieden (Abb. 23 & 24). Anhand sämtlicher Daten der Zählungen Mitte Mai und Ende August und unter Berücksichtigung der Ausgangszahlen der Zuckerrüben Ende Mai stechen vor allem zwei Behandlungen hervor. Bei jener Variante, welche von Beginn an mit Fungizid behandelt wurde, und welche im späteren Verlauf noch zusätzlich einer Spritzung unterzogen wurde, lag der geringste Befall mit der gleichen Zuckerrübenanzahl von 266 bzw. 262 in einem Zeitrahmen von über drei Monaten vor. Eine zusätzliche Behandlung mit Mikroorganismen zu den Zuckerrüben, die mit Fungizid behandelt wurden, führte zu einem höheren Ertrag von ca. 1,5 %. Bei den zwei verbliebenden Varianten zeigte sich jedoch kein gravierender Unterschied in der Anzahl bei einer Behandlung mit oder ohne Mikroorganismen.

3.3.2 Ergebnisse der Bonituren

Der Biokontrolleffekt der eingebrachten Antagonisten konnte neben den Zählungen noch konkreter mittels der Bestimmung des sogenannten *Rhizoctonia solani*-Befallsindex (RI) bewertet werden. Dieser erfolgte anhand der Begutachtung jeder einzelnen Zuckerrübe auf ihren Gesundheitszustand hin. Die Daten der vergebenen Wertnoten eins bis neun

Ergebnisse

ermöglichten es, den prozentuellen Befall von *Rhizoctonia solani* in jeder Variante festzustellen.

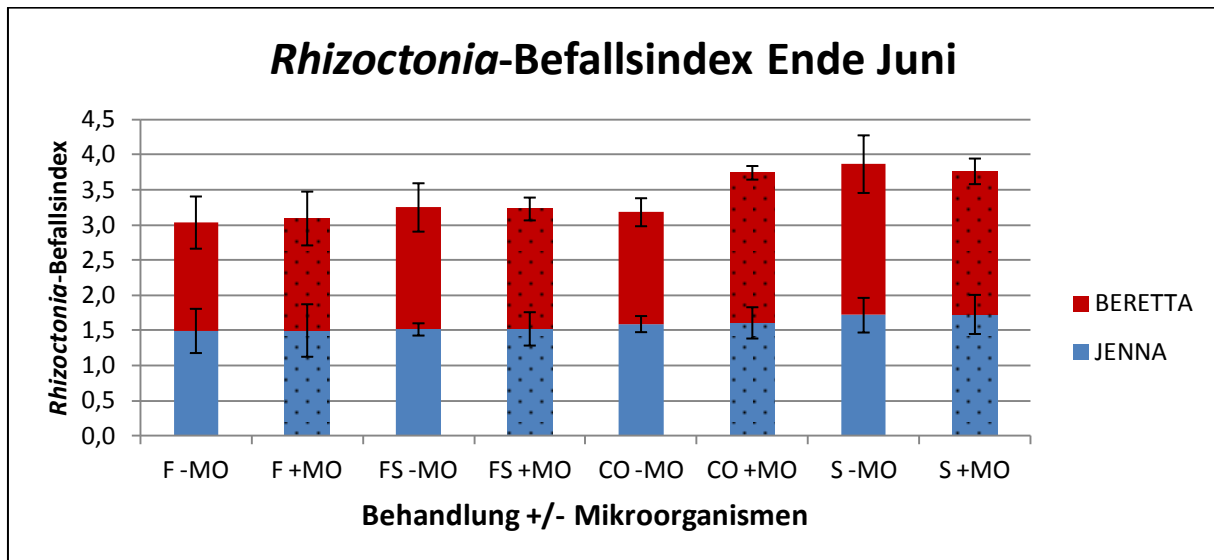


Abb. 25: *Rhizoctonia*-Befallsindex aller vier Behandlungen auf inokulierten Boden einmal mit (punktierte Flächen) und einmal ohne Mikroorganismen der ersten Bonitur. CO: Kontrolle; F: Fungizid; FS: Fungizid & Spritzung; MO: Mikroorganismen; S: Spritzung

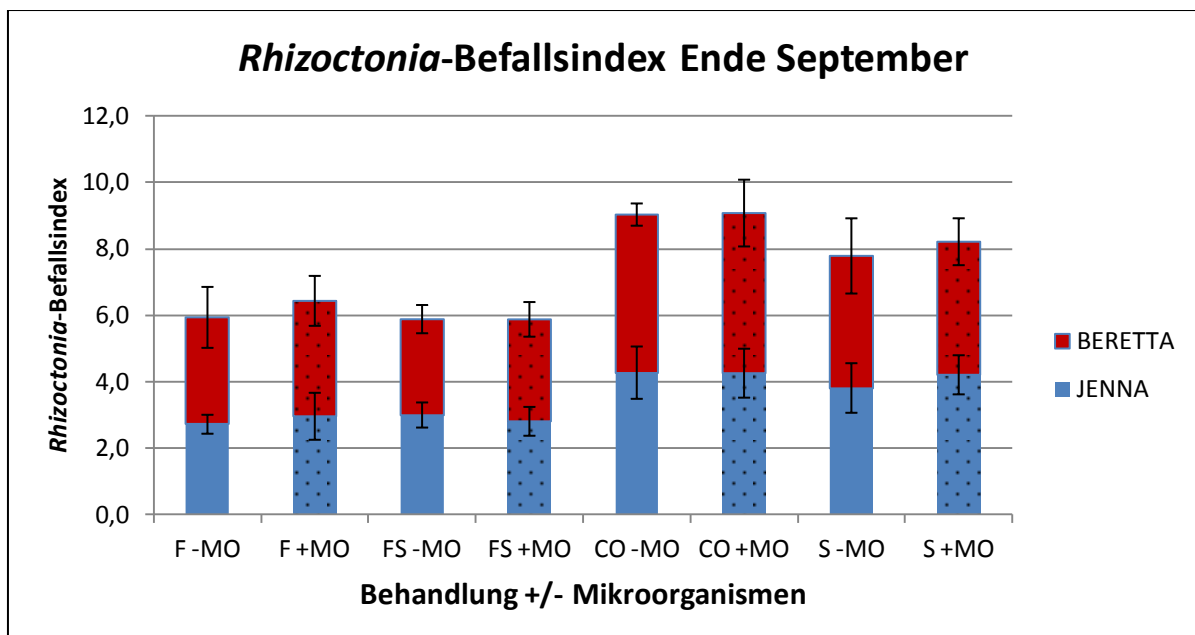


Abb. 26: *Rhizoctonia*-Befallsindex aller vier Behandlungen auf inokulierten Boden einmal mit (punktierte Flächen) und einmal ohne Mikroorganismen kurz vor der Ernte. CO: Kontrolle; F: Fungizid; FS: Fungizid & Spritzung; MO: Mikroorganismen; S: Spritzung

Anhand des *Rhizoctonia solani*-Befallsindexes ließ sich bereits zu Beginn mit dem niedrigsten Wert von 3 ein Vorteil des Einsatzes von Fungiziden erkennen. Das Maximum lag hierbei bei

Ergebnisse

ca. 3,8 bei der Variante, welche mit Spritzung behandelt wurde (Abb. 25). Die Daten der letzten Bonitur zeigten, dass jene Variante, welche mit Fungizid behandelt als auch einer Spritzung unterzogen wurde, den niedrigsten *Rhizoctonia*-Befallsindex bei einem Minimum von 5,8 besaß, wobei JENNA KWS mit Mikroorganismen geringfügig mit einem Wert von ca. 0,2 besser abschnitt. Für nur wenig Überraschung sorgte ein Maximum von ca. 9 bei den Kontrollen (Abb. 26).

4. Diskussion

4.1 Kultivierungsabhängige Analyse zur eindeutigen Identifizierung von *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB

Mit Hilfe der BOX-PCR konnte sicher gestellt werden, dass es sich bei dem Pilz-Isolat aus Zuckerrüben, eindeutig um jenen *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB Stamm handelte, mit dem bereits vor der Pflanzung der Zuckerrüben beide Versuchsfelder inokuliert wurden. Der Sinn dieser Durchführung bestand in weiterer Folge in der Erstellung der Eichgerade des exakt gleichen *Rhizoctonia solani* Inokulats, welches auch auf den Feldern ausgebracht wurde und der Wiederfindung dessen als Ursache für erkrankte Zuckerrüben.

4.2 Kultivierungsunabhängige Analyse der mikrobiellen Biodiversität sowie der Konzentrationsbestimmung zweier Mikroorganismen

4.2.1 SSCP-Analysen

Um einen eventuellen Einfluss auf die mikrobielle Community durch die zusätzliche Einbringung von Antagonisten feststellen zu können, wurden von allen Probenahmen aus Ottmaring und Göttingen SSCP-Gele angefertigt und diese mit anschließender Software-Analyse ausgewertet. Vor allem zu einem späteren Verlauf des Wachstumsstadiums der Zuckerrüben, zeigte sich eine enorm hohe bakterielle Diversität im Bereich der Rhizosphäre.

Eine gute Nährstoffversorgung durch Wurzelausscheidungen und abgestorbene Wurzelteile stellen ideale Bedingungen für ein beliebtes Mikrohabitat für Bakterien und andere Organismen bereit. Die Förderung des Wachstums von Mikroorganismen im Wurzelbereich wird als sogenannter Rhizosphären-Effekt bezeichnet, wobei jene Bakterien, welche speziell das Wachstum der Pflanze fördern, als Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) bezeichnet werden (Dube, 2001; Sørensen, 1997).

Um einige Bakterien, welche sich im engen Umfeld der Rhizosphäre von Zuckerrüben befinden auch identifizieren zu können, wurden einzelne markante Banden aus dem SSCP-

Gel ausgewählt und schließlich sequenziert. *Novosphingobium* sp., *Variovorax paradoxus* und *Flavisolibacter ginsengisoli*, um nur einige Beispiele zu nennen, zählen zu typischen Bodenbewohnern, die auch zahlreich im Erdreich vertreten waren. Mittels dieser SSCP-Analyse konnte allerdings kein kultivierungsunabhängiger Nachweis der drei Antagonisten *Pseudomonas poae* RE*1-1-14, *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12 und *Serratia plymuthica* 3RE-4-18 erbracht werden, welche in die Saatpillen eingebracht wurden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass anstatt der lebenden Zellen lediglich nur mehr die DNA in den Saatgutpillen vorhanden war. Eine weitere Theorie wäre, dass bereits zu Beginn der Formulierung die Konzentration der eingebrachten Menge an Antagonisten zu gering war. Dies wäre auch die wahrscheinlichste Erklärung, da andernfalls zumindest bei der Ersten Probenahme ein Nachweis anhand einer Bande bei den Markern zu sehen gewesen wäre.

Jene Frage darüber, in wie fern Antagonisten in ein natürliches System eingreifen und möglicherweise in der Lage sind, andere Bakterienstämme zu verdrängen, konnte mit Hilfe der Dendrogramme geklärt werden. Die Zuckerrübensorten JENNA KWS und BERETTA als auch der Boden bildeten Großteils autonome Cluster. Die Kernaussage dieser Ergebnisse liegt jedoch darin, dass sowohl die Kontrollen als auch mit Mikroorganismen inokulierte Kultivare sich in einer gemeinsamen Gruppierung befinden und somit deren Einfluss auf die natürliche Community als vernachlässigbar angesehen werden konnte. Möglicherweise könnte dies jedoch auch aufgrund der zu geringen Menge an eingebrachten Organismen in den Saatgutpillen liegen.

Da bereits bei Vorversuchen mittels qPCR der Verdacht einer eventuellen Unspezifität der *Pseudomonas*-spezifischen Primer aufkam, wurde das abschließende SSCP-Gel speziell für eine weitere Untersuchung bezüglich der Stammspezifität der Primer von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 angefertigt. Aufgrund der geringen Größe des Fragments von *P. poae* RE*1-1-14 mit einer Länge von 155 bp, der niedrigen Hit-Quote von lediglich 82 % der ausgeschnittenen Banden und der Tatsache, dass es für *P. poae* in der Datenbank, im Vergleich zu anderen Bakterienstämmen, nur wenige Einträge gibt, stellte das Ergebnis mit *Pseudomonas putida* keine sonderlich große Überraschung dar. Anhand dieses Resultats und dem Auftreten mehrerer SSCP-Banden erhärteten sich allerdings die Befürchtungen einer Unspezifität. Mittlerweile ist es Gewissheit, dass die speziell kreierte Primer für *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 nicht spezifisch sind, sondern z.B. auch Bindesequenzen bei *Pseudomonas fluorescens* SBW25 zu finden sind.

4.2.2 Abundanzbestimmung von *Pseudomonas poae* und *Rhizoctonia solani* mittels qPCR

Trotz der frühen Befürchtungen einer gewissen Unspezifität der Primer bei *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 erfolgte vor allem eine makellose Quantifizierung dieses *Pseudomonas* Stammes bei der Analyse von Saatgutpillen. Die Ergebnisse der Real-Time PCR stimmten beinahe vollkommen mit jenen Konzentrationen überein, mit welchen *Pseudomonas poae* in den Pillen mit eingebracht wurde. Ließ man die gleichen Saatgut-Pillen jedoch zu kleinen Pflänzchen heranwachsen, zeigten sich bei den Untersuchungen der Rhizosphäre mittels qPCR deutlich abweichende Ergebnisse im Vergleich zu den Pillen. Dabei schien es keine Rolle zu spielen, ob der Versuch in sterilen Keimtaschen oder als Topfversuch in unsteriler Erde durchgeführt wurde. Während sich bei dem Topfversuch alle Konzentrationen im näheren Bereich des Detektionslimits bewegten, zeigte sich beim sterilen Keimtaschen-Versuch ein bei weitem interessanteres Ergebnis. Während die Signale bei BERETTA ebenfalls, bis auf eine Ausnahme, unter dem Detektionslimit lagen, fiel die Abundanz von *Pseudomonas poae* bei sämtlichen JENNA KWS Varianten um ein Vielfaches höher aus. Eine Unspezifität der Primer wäre in diesem Zusammenhang als Erklärung nicht ausreichend. Laut Literatur (Berg & Smalla, 2009; Mark et al., 2005) ist bekannt, dass in erster Linie Exsudate, welche von den Wurzeln einer Pflanze ausgeschieden werden, für die Kolonisierung spezifischer mikrobieller Stämme der Rhizosphäre verantwortlich sind und deren Überleben garantieren. Zudem sind unterschiedliche Pflanzenspezies sehr wohl auch in der Lage auf bestimmte mikrobielle Populationen in der Rhizosphäre zu selektieren.

Anhand der Ergebnisse aus den sterilen Keimtaschen muss man jedoch auch davon ausgehen, dass spezifisch mikrobielle Stämme bereits in den Saatgutpillen vorhanden sind.

Dieser Erklärungsansatz in Kombination mit einer Unspezifität der Primer wirft einen vollkommen anderen Blickwinkel auf die Resultate der qPCR. Dies wäre gleichzeitig ein plausibler Aufschluss darüber, weshalb sich die Ergebnisse im Kontrast der Analysen von Saatgutpillen und Rhizosphären-Proben grundlegend voneinander unterscheiden. Im Vergleich zum sterilen Keimtaschen-Versuch, wo lediglich die Zuckerrübenwurzel ohne Erdanhang zur Probenaufarbeitung entnommen werden konnte, war es beim Topfversuch nicht möglich, die Rhizosphäre ohne umliegende Erde aufzuarbeiten. Aufgrund möglicher inhibitorischer Effekte der Erde wäre in diesem Zusammenhang auch der niedrige Konzentrationsnachweis von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 zu erklären.

Anhand dieser Erkenntnisse stellte es auch keine sonderliche Verwunderung dar, dass es keinen offensichtlichen Zusammenhang der Abundanzbestimmung von *Pseudomonas poae* RE*1-1-14 bei Proben aus Ottmaring und Göttingen gab. Als einzige Gemeinsamkeit konnte stets eine höhere Abundanz des Antagonisten bei der Variante JENNA KWS nachgewiesen werden.

Erfolgreicher sieht es im Gegensatz bei der Quantifizierung von *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB aus. Hier lassen sich Ähnlichkeiten beider Versuchsfelder in Bezug auf die steigende Konzentration mit zunehmendem Wachstum der Zuckerrübenpflanzen erkennen. Dies wäre damit zu erklären, dass die Zuckerrübenpflanzen zu Beginn ihrer Wachstumsphase noch zu klein waren, um ausreichend Nahrung für das Pflanzenpathogen zu liefern. Erst mit zunehmender Größe der Pflanzen war der Saprophyt in der Lage sich zu etablieren und zu vermehren.

Anhand der qPCR-Ergebnisse beider Bodenproben ließ sich kein allzu großer Unterschied zwischen zusätzlich mit *Rhizoctonia solani* inokuliertem Boden und natürlichem Boden erkennen. Bereits im natürlichen Boden sind hohe Konzentrationen des Pilzes nachzuweisen, was darauf zurückzuführen war, dass die Böden in Bayern von vornherein mit AG2-2IIIB stark belastet waren. Jedoch zeigte sich diese „verhältnismäßig niedrige“ Differenz bei den Boniturdaten als ausschlaggebend dafür, ob dies zu einem häufigeren Befall des Phytopathogens an Zuckerrüben führt oder nicht.

Rhizoctonia solani kommt sehr wohl auch in „gesunden“ Regionen vor. Eine vorrangegangene Erkrankung mit dem Pathogen verhindert jedoch zukünftige Pathogene Aktivität. Bei *Trichoderma* Isolaten konnte z. B. nachgewiesen werden, dass diese bei erkrankten Feldern eine auffällig höhere antagonistische Wirkungsweise hatten, als bei den vorrangegangenen Jahren in gesunden Gebieten. Dies deutet darauf hin, dass AG2-2IIIB Veränderungen der genetischen als auch der physiologischen Struktur mikrobiologischer Gemeinschaften und Entwicklung von Antagonisten maßgeblich beeinflusst (Anees et al., 2010).

Es schien gerade zu einen bestimmten Schwellenwert zu geben. Unter diesem treten keine offensichtlichen Krankheitssymptome der Pflanzen auf. Wird der Schwellenwert jedoch überschritten, ist das Pflanzenpathogen dazu in der Lage, in die Wirtspflanze einzudringen und diese zu schädigen (Gubbins et al., 2000).

Zudem spielen noch sämtliche abiotischen und biotischen Faktoren für den Gesundheitszustand einer Pflanze eine wichtige Rolle und inwiefern Phytopathogene, sich bei

Schwächung einer Pflanze aufgrund äußerer Bedingungen, etablieren können. Dies ist auch mit ein Grund, warum eine Interpretation von Felddaten von lediglich einer Vegetationsperiode so schwierig ist. Ist genau jenes Jahr, in dem der Feldversuch stattfindet z.B. von extremen Wetterbedingungen gekennzeichnet, würden die Ergebnisse im darauffolgenden Jahr mit Sicherheit anders aussehen. Dies war auch in den Feldversuchen 2012 zu beobachten, wo die Applikationen sehr gut funktionierten und bei jenen Behandlungen mit Mikroorganismen ein besonders positiver Effekt in den Resultaten zu verzeichnen war als in jenem Jahr, aus dem die Daten dieser Masterarbeit bestehen.

4.2.3 Felddaten zur Vergleichsmöglichkeit von behandelten und unbehandelten Kultivaren

Um einen Vergleich der im Labor ausführlich untersuchten unbehandelten Kultivare (Kontrollen) auch unter realen Bedingungen zu testen, fanden zudem Feldversuche zur Gegenüberstellung mit behandelten Kultivaren statt. Nur mittels Zählungen und Bonitierung der Zuckerrüben direkt am Feld, konnte eine Gegenüberstellung in Wachstum und Resistenz beider Kultivare mit sämtlichen Behandlungen erfolgen. Der geringste Befallsindex an Rüben konnte vor allem an den beiden Varianten beobachtet werden, welche zum einen von Beginn an mit Fungizid behandelt wurden und zum zweiten im späteren Verlauf noch zusätzlich einer Spritzung unterzogen wurden.

Auch in Bezug auf den *Rhizoctonia solani*-Befallsindex (RI) zeigten diese beiden Behandlungen die höchste *Rhizoctonia solani*-Resistenz.

Fazit: Der zusätzliche Einsatz von Mikroorganismen im landwirtschaftlichen Anbau von Nutzpflanzen fungiert sehr wohl als natürlicher Pflanzenschutz und trägt ebenso zur Gesundheit der Pflanzen bis zum Erntefähigen Alter bei. Dies konnte vor allem im darauffolgenden Jahr eindrucksvoll bewiesen werden. Aufgrund der bereits zuvor erwähnten Problematik von Feldversuchen, werden jedoch noch weitere Langzeitstudien erforderlich sein, um auch das gesamte Potenzial von BCAs vollständig erfassen zu können.

5. Literaturverzeichnis

Anees M., Tronsmo A., Edel-Hermann V., Gautheron N., Faloya V., Steinberg C., (2010), *Biotic changes in relation to local decrease in soil conduciveness to disease caused by *Rhizoctonia solani**. Eur J Plant Pathol Eur J 126:29–41

Applied Biosystems: *Sequence Detection Systems – Chemistry Guide*. 2003 q-PCR

Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J., (2005) *Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi*. FEMS Microbiologie Ecology 51: 215-229

Berg G., (2009), *Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture*, Springer-Verlag

Berg G., Smalla K., (2009), *Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere*. FEMS Microbiol Ecol 68: 1-13.

Büttner G., Pfähler B., Petersen J., (2003) *Rhizoctonia root rot in Europe—incidence, economic importance and concept for integrated control*, 1st joint IIRB-ASSBT Congress, San Antonio 2003, 897–901

Cooke, DA, Scott, RK (Eds.), (1993), *The Sugar Beet Crop: Science Into practice*, Chapman and Hall, London, pp 37–66

Dube H. C., (2001), *Rhizobacteria in biological control and plant growth promotion*, J. of Mycol. Plant Pathol. 31, 9 – 21

Ehlers R.U., (2006), *Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz*, Schr.reihe Dtsch Phytomed Ges 8:17–31

Faltin F., Lottmann J., Grosch R. & Berg G., (2004), *Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn*. Can J Microbiol 50: 811–820.

Fyfe J. A. M., Lavender C J, Johnson P. D. R., Globan M., Sievers A., Azuolas J., Stinear T. P., (2007), *Development and Application of Two Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of *Mycobacterium ulcerans* in Clinical and Environmental Samples*. Applied and Environmental Microbiology 73(15): 4733-4740

Grosch R., Faltin F., Lottmann J., Kofoet A. & Berg G., (2005a), *Effectiveness of three antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato*. Can J Microbiol 51: 345–353.

Grosch R., Scherwinski K., Lottmann J. & Berg G., (2006), *Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community*. Mycol Res 110: 1464–1474.

Gubbins S., Gilligan C. A. & Kleczkowski A., (2000). *Population dynamics of plant-parasite interactions: thresholds for invasion*, Theoretical Population Biology, 57, 219–233.

Gunnell D., Eddleston M., Phillips MR., Konradsen F., (2007), *The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review*. BMC Public Health 21(7):357

Harris K., Young I. M., Gilligan C. A., Otten W. & Ritz K., (2003). *Effect of bulk density on the spatial organisation of the fungus Rhizoctonia solani in soil*. FEMS Microbiology Ecology, 44, 45–56.

Hyakumachi M., & Ui T., (1982). *Disease decline phenomenon of sugarbeet root rot*, Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 13, 445–454.

http://www.kws.de/aw/KWS/germany/Produkte/Zuckerruebe/Sorten_Sugarbeet/~dyqz/JENNA_KWS_8211_Setzt_gegen_Rhizoctonia_noch/?purpose=aaaaaaaaaadxcu

Leach A.W., Mumford J.D., (2008), *Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications*. Environ Pollut 151:139–47

Lieber A., Kiesel B., Babel W., (2002), *Microbial diversity analysis of soil by SSCP fingerprinting technique using TGGE Maxi System*, 13. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes, Hrsg. W. Merbach, B. W. Hütsch, J. Augustin, B. G. Teubner, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 61 – 65

Lottmann J., Heuer H., Smalla K., Berg G., (1999) *Influence of transgenic T4-lysozyme-producing plants on beneficial plant-associated bacteria*. FEMS Microbiol Ecol 29: 365–377.

Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., (2002), *Microbe–plant interactions: principles and mechanisms*. Antonie Van Leeuwenhoek 81:373–383

Mark G.L., Dow J.M., Kiely P.D., Higgins H., Haynes J., Baysse C., Abbas A., et al., (2005), *Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions*, Biomerit Research Centre, Department of Microbiology, National University of Ireland

Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., et al., (1992), *A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of Streptococcus pneumoniae*, Nucleic Acids Res. 20, 3479 – 3483

Morrissey J.P., Dow J.M., Mark L., (2004), *Are microbes at the root of a solution to world food production?*, EMBO Rep 5:922–926

Mülhardt C: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum q-PCR Akademischer Verlag 2003 4. Auflage

Rochelle P. A., (2001), *Environmental molecular biology: Protocols and Applications*, Horizon Scientific Press UK

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., (1988), *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, Science 239, 487 – 491

Schneider J. H. M., Kocks C. G. & Schilder M. T., (2001), *Possible mechanisms influencing the dynamics of rhizoctonia disease of tulips*. European Journal of Plant Pathology, 107, 723–738.

Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S & Dijst G., (1996), *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Sørensen J., (1997), *Modern Soil Microbiology: The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms*, Marcel Dekker Inc. New York, 21 – 45

Staley, J. T., and Konopka, A., (1985), *Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats*, Annual review of microbiology 39, 321-346.

Tebbe C. C., Schmalenberger A., Peters S., Schwieger F., (2001), *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications: Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis*, Horizon Scientific Press UK, 161 – 175

Thakore Y., (2006), *The biopesticide market for global agricultural use*, Ind Biotechnol 2:194–208

Tilcher R., (2002), *Integration of antagonistic bacteria in the process of pelleting sugar beet seed – results and problems*, Bulletin OILB-SROP 25: 53–56

Trebbi D., McGrath M., (2004), *Fluorometric sucrose evaluation for sugar beet*, J Agric Food Chem 52: 6862–6867

Weller D. M., Raaijmakers J. M., Gardener B. B. M. & Thomashow L. S., (2002), *Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens*, Annual Review of Phytopathology, 40, 309–348.

Whipps J., (2001), *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere*, J Exp Bot 52:487–511

Zachow C., (2008), *Microorganisms associated with sugar beet: Complex analyses and characterization of the antagonistic potential in biological control*, Dissertation

Zachow C., Pirker H., Westendorf C., Tilcher R., Berg G. (2009b), *Caenorhabditis elegans provides a valuable tool to evaluate the human pathogenic potential of bacterial biocontrol agents*, Eur J Plant Pathol, in press

Zachow C., Fatehi J., Cardinale M., Tilcher R. & Berg G., (2010), *Strain-specific colonisation pattern of Rhizoctonia antagonists in the root system of sugar beet*, FEMS Microbiology Ecology

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit bezeuge ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Zudem versichere ich, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, August 2012

Iris Matschl
