

**Eine Strategie zur biologischen Kontrolle von
Pflanzenkrankheiten durch den Einsatz natürlicher, nicht-
pathogener mikrobieller Antagonisten am Modellsystem
Malus domestica (Apfel) / *Venturia inaequalis*
(Apfelschorferreger) / *Pseudomonas fluorescens* Bk3
(mikrobieller Antagonist)**

**Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer**

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

**Dipl. Biol. Anna-Sophia Kürkcüoglu
geboren am 5. Februar 1970 in Großburgwedel**

2006

Referent: PD. Dr. Achim Gau

Korreferentin: Prof. Dr. Iris Szankowski

Tag der Promotion: 19.06.2006

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Potenzial des bakteriellen nicht-pathogenen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* Bk3 als biologisches Pflanzenschutzmittel gegenüber dem pilzlichen Erreger des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*), der weltweit schwere Schäden im Erwerbsobstbau hervorruft, zu untersuchen. Wenn das antagonistische Wirkprinzip genau verstanden ist, könnte es auf andere Pathosysteme übertragbar sein und helfen, den häufigen Einsatz an Pestiziden in der Landwirtschaft, aber auch im Zierpflanzenbau zu reduzieren. *P. fluorescens* Bk3 ist ein nicht-pathogenes Bakterium, welches aus der Phyllosphäre von einer *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Pflanze isoliert wurde. Aufgrund der Arbeiten von FISS (2001) wurde *P. fluorescens* Bk3 als mikrobieller Antagonist ausgewählt, welcher im *dual-culture* Test und auf Apfelsämlingen im Gewächshaus eine deutliche Hemmwirkung gegen das Pathogen *V. inaequalis* erzielen konnte. Da sowohl die Pflanzen als auch die Pathogene und Antagonisten im Freiland völlig anderen Bedingungen ausgesetzt sind als im Gewächshaus oder im Labor, ist fraglich, ob die Antagonisten im Freiland die gleiche Hemmwirkung gegen *V. inaequalis* erzielen können. Deshalb wurde *P. fluorescens* Bk3 in einem Freilandversuch als biologisches Pflanzenschutzmittel gegenüber dem Apfelschorferreger über den Zeitraum von zwei Jahren getestet.

In den molekularbiologischen Untersuchungen zu den antagonistischen Wirkmechanismen wurde vor allem die Reaktion des apfelschorfsuszeptiblen Kultivars Holsteiner Cox auf die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 analysiert.

Nach der Inokulation des nicht-pathogenen Bakteriums *P. fluorescens* Bk3 auf die Blattober- und -unterseite steriler, genetisch identischer *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Pflanzen, konnten im Apoplasten der Pflanze pathogenesis-related proteins (PR-Proteine) nachgewiesen werden. Diese wurden als Chitinase, β -1,3-Glukanase oder Thaumatin-ähnliches Protein und Hevein-ähnliches Protein PR-4b durch ESI-Q-ToF-Massenspektrometrie identifiziert. Außerdem wurde die Suppression des nicht-spezifischen Lipid Transfer Proteins (nsLTP) beobachtet. Diese Proteinexpression bzw. Suppression ähnelt den Reaktionen von *M. domestica* cv. Elstar nach einer Infektion mit dem Pathogen *V. inaequalis*, bei der im Apoplasten die gleichen Proteine induziert werden (GAU et al. 2004a). Auf Transkriptebene wurden nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 mittels Suppressions Subtraktions Hybridisierung eine Reihe von Transkripten heraufreguliert, die für typische PR-Proteine und Proteine mit einer mehr allgemeinen Rolle in der Pflanzenabwehr kodieren. Hierzu gehören Ribonuklease-

ähnliches Protein PR-10b, Endochitinase, ADP-Ribosylierungsfaktor sowie ein Schlüsselenzym im Ethylen-Biosyntheseweg. Besonders auffallend war auch die relativ hohe Anzahl von Transkripten für Proteine mit einer Funktion bei der Reduzierung von oxidativem Stress oder Stress im Allgemeinen. Dazu gehören eine manganabhängige Superoxid-Dismutase, ein Thioredoxin-ähnliches Protein und mehrere Heat Shock Proteine.

Somit kann geschlossen werden, dass der nicht-pathogene Bakterienstamm *P. fluorescens* Bk3 eine Reihe von Transkripten heraufreguliert, die sonst durch Pathogene hochreguliert werden, und so die Pflanze auf einen bevorstehenden Pathogenbefall vorbereiten kann.

Ob die Veränderung der Genexpression in der Pflanze zu einer erhöhten Resistenz gegen *V. inaequalis* führt, wurde in einem Freilandversuch über zwei Vegetationsperioden untersucht. Die Freilanduntersuchungen unterlagen noch Schwankungen. Die höchsten Wirkungsgrade konnten auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit 84 % erzielt werden, wobei die Wirkung von *P. fluorescens* Bk3 wahrscheinlich auf zwei Faktoren beruht:

1. Auf der direkten Hemmung von *V. inaequalis* durch *P. fluorescens* Bk3 (FISS 2001, SINGH et al. 2004).
2. Auf einer induzierten Resistenz in *M. domestica* durch die Applikation des bakteriellen Antagonisten.

Unter den gewählten Bedingungen ist deutlich geworden, dass *P. fluorescens* BK3 die Apfelschorfsymptome im Freiland reduzieren kann.

Schlagwörter: Apfelschorf, induzierte Resistenz (IR), biologische Kontrolle

Abstract

The purpose of this work is to analyse the potential of the non-pathogenic bacterial antagonist *Pseudomonas fluorescens* Bk3 as a biological control-agent against the fungus *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, that causes a severe decline in apple fruit production. The major goal of the investigations is to understand the antagonistic mechanisms. This knowledge could be transferred to other crop plants and could reduce the frequent treatment of plants with pesticides in agriculture. *P. fluorescens* Bk3 is a non-pathogenic bacterium, that was isolated from the phyllosphere of a *M. domestica* cv. Holsteiner Cox tree. As a result of further studies of FISS (2001), *P. fluorescens* Bk3 was chosen as microbial antagonist, because it shows a strong inhibitory effect against the pathogen *V. inaequalis* in dual-culture tests as well as on apple seedlings in the greenhouse. The pathogen, the antagonist and also the apple trees are exposed completely to other environmental conditions in the field. Therefore it is not clear if the antagonist reaches the same strong inhibitory effect. For this reason *P. fluorescens* Bk3 was tested as biological control-agent against *V. inaequalis* over a period of two years under field conditions.

For understanding the antagonistic mechanisms, the reaction of the apple scab susceptible cultivar Holsteiner Cox was tested to the application of *P. fluorescens* Bk3. After the inoculation of the non pathogenic bacterium *P. fluorescens* Bk3 to the upper and lower leaf surface of steril genetically identical *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* cultures, an accumulation of pathogenesis related proteins in the apoplast could be detected. They were identified as chitinase, β -1,3-glucanase or thaumatin-like protein by ESI-Q-ToF mass spectrometry. Furthermore the suppression of the nonspecific lipid transfer proteins (nsLTP) could be observed. This protein expression or suppression of *M. domestica* cv. Holsteiner Cox corresponds well to the reaction of *M. domestica* cv. Elstar after infection by the fungus *V. inaequalis* (GAU et al. 2004a).

On transcript level using Suppression Subtraction Hybridisation procedure, several transcripts which are typically for PR-proteins and proteins which are involved in the general defense response of plants could be found up-regulated, e.g. ribonuclease-like protein PR-10b, endochitinase, ADP-ribosylation factor and the key enzyme of ethylene biosynthesis. The high number of transcripts which encode proteins and have a function in reducing oxidative stress or stress in general, was especially remarkable, e.g. manganese superoxide dismutase, thioredoxin-like protein and several heat shock proteins.

Thus we can conclude, that the non-pathogenic bacterium strain *P. fluorescens* Bk3 induces the up-regulation of transcripts, which are also up-regulated after a pathogen infection. The induction of the plant defense mechanism can prepare the host plant to a possible pending pathogen attack.

Whether the changes in the gene expression is responsible for an elevated resistance against *V. inaequalis*, a field experiment over the period of two years has been performed. The field experiment shows variations in the results. The strongest reduction of apple scab symptoms could be obtained with 84 % on *M. domestica* cv. Holsteiner Cox. The effect of the suppression of apple scab symptoms by *P. fluorescens* Bk3 is probably based on two factors. Firstly, the direct suppression of *V. inaequalis* by *P. fluorescens* Bk3 (FISS 2001, SINGH et al. 2004), and secondly, the induction of resistance mechanisms in *M. domestica* by the application of the bacterial antagonist. However, the non-pathogenic bacterial antagonist *P. fluorescens* Bk3 has the capacity to reduce apple scab symptoms in the field.

Keywords: apple scab, induced resistance (IR), biological control

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Der Apfelbaum <i>Malus domestica</i> und der Apfelschorferreger	
<i>Venturia inaequalis</i> (Cke.) Wint.	1
1.2 Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen	4
1.3 Biologische Kontrolle von Pflanzenkrankheiten.....	9
1.4 Der Epiphyt <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3.....	11
1.5 Ziele der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Molekulare Analysen zur Wechselwirkung zwischen Antagonist und	
Wirtspflanze	14
2.1.1 Der Epiphyt <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3	14
2.1.1.1 Herkunft des epiphytischen Bakteriums	14
2.1.1.2 Anzucht von <i>P. fluorescens</i> Bk3 für <i>in vitro</i> Experimente....	14
2.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 mit	
der Thoma-Zählkammer	15
2.1.2 Sterile <i>in vitro</i> -Kulturen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	16
2.1.2.1 Kultivierung und Vermehrung von <i>M. domestica</i> cv.	
Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Kulturen	16
2.1.2.2 Bewurzelung von <i>M. domestica</i> cv.	
Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Kulturen	17
2.1.2.3 Inokulation mit <i>P. fluorescens</i> Bk3	18
2.1.2.4 Ernte der mit <i>P. fluorescens</i> Bk3 inokulierten <i>in vitro</i>	
Kulturen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	18
2.1.3 Blattabdrücke von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	18
2.1.4 Reisolation von <i>P. fluorescens</i> Bk3 von <i>M. domestica</i>	
cv. Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Kulturen	19
2.1.5 Isolierung der Apoplastenflüssigkeit	19

2.1.6	Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung der Apoplastenflüssigkeit mit dem Bradford-Proteintest.....	20
2.1.7	SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricin).....	21
2.1.7.1	Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricin)	21
2.1.7.2	SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricin)	21
2.1.7.3	Coomassie-colloidal Färbung von Proteingelen	23
2.1.8	Spaltung und Sequenzierung von Proteinen.....	24
2.1.9	Immunodetektion (Western blot) mittels ECL-Methode.....	24
2.1.10	RNA Isolierung aus <i>in vitro</i> Kulturen von <i>M. domestica</i>	25
2.1.10.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	25
2.1.10.2	Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA	25
2.1.10.3	Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA	26
2.1.10.4	Detektion von RNA im Agarosegel	26
2.1.10.5	DNase Behandlung der Gesamt-RNA	27
2.1.11	Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA	27
2.1.12	Semiquantitative RT-PCR	28
2.1.13	Agarosegelelektrophorese für DNA.....	29
2.1.13.1	Färbung und Detektion der DNA im Agarosegel	30
2.1.14	Suppressions Subtraktions Hybridisierung (SSH).....	30
2.1.14.1	Konstruktion einer suppressiven subtraktiven Hybridisationsbibliothek (SSH)	30
2.1.14.2	Klonierung der Fragmente und Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.1.14.3	Blau-Weiß-Selektion.....	31
2.1.14.4	Überprüfung der klonierten Fragmente mittels PCR	32
2.1.15	Reverse Northern Blot Analysen	33
2.1.15.1	Reverse Northern Blot Analyse mit cDNA aus der SSH	33
2.1.15.2	Reverse Northern Blot Analyse mit cDNA aus neu inokuliertem Pflanzenmaterial	35
2.1.16	Sequenzierung und Charakterisierung der Fragmente aus der SSH.....	36
2.1.17	Real time PCR (q-PCR)	36
2.2	Freilandversuch	40
2.2.1	Der Epiphyt <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3	40

2.2.1.1	Herkunft des epiphytischen Bakteriums	40
2.2.1.2	Anzucht von <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3 für <i>in vivo</i> Versuche	40
2.2.2	<i>Venturia inaequalis</i>	40
2.2.2.1	Herkunft des <i>Venturia inaequalis</i> Isolates	40
2.2.2.2	Herstellung neuer Myzelplatten	41
2.2.2.3	Konidiengewinnung aus Myzel von <i>V. inaequalis</i>	41
2.2.2.4	Ernte ungekeimter Konidien	41
2.2.2.5	Konzentrationsbestimmung und Anfärbung	42
2.2.2.6	Bestimmung der Keimungsrate von <i>V. inaequalis</i>	43
2.2.3	Aufbau der Versuchsanlage im Freiland	44
2.2.4	Behandlung der Freilandpflanzen mit Konidien und Antagonisten.....	47
2.2.5	Bonitierung	47
2.2.6	Statistische Auswertung der Bonituren im Freiland.....	48
2.2.7	Erfassung von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung zwischen Antagonist und Wirtspflanze	49
3.1.1	Blattabdrücke der <i>in vitro</i> Kulturen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	49
3.1.2	Reisolation von <i>P. fluorescens</i> Bk3 aus der Phyllosphere von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	50
3.1.3	Analyse der Apoplastenflüssigkeit von <i>M. domestica</i> <i>in vitro</i> Kulturen.	50
3.1.4	Veränderungen in der Proteinzusammensetzung im Apoplasten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach der Applikation von <i>P. fluorescens</i> Bk3	51
3.1.5	Western Blot.....	54
3.1.6	Semiquantitative RT-PCR	55
3.1.7	Erfassung induzierter Gene nach der Inokulation von <i>P. fluorescens</i> Bk3 in die Phyllosphere von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox mittels Suppressions Subtraktions Hybridisierung (SSH)	57
3.1.8	Real-Time PCR (q-PCR).....	64

3.2 Freilandversuch	67
3.2.1 Witterungsverlauf in den Vegetationsperioden 2003 und 2004.....	67
3.2.2 Bonitur von <i>M. domestica</i> cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox in den Jahren 2003 und 2004	68
3.2.2.1 Bonitur der Elstar Pflanzen im Jahre 2003	68
3.2.2.2 Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen im Jahre 2003.....	74
3.2.2.3 Bonitur der Elstar Pflanzen im Jahre 2004	77
3.2.2.4 Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen im Jahre 2004.....	84
3.2.3 Apfelschorfbefallsverlauf von <i>M. domestica</i> cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox in den Jahren 2003 und 2004	90
3.2.3.1 Apfelschorfbefallsverlauf Elstar im Jahre 2003 und 2004 ...	90
3.2.3.2 Apfelschorfbefallsverlauf Holsteiner Cox im Jahre 2003 und 2004.....	92
4 Diskussion	94
4.1 Molekularbiologische Untersuchungen	95
4.1.1 PR-Proteine in <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	95
4.1.1.1 Nachweis von PR-Proteinen in der intrazellulären Waschflüssigkeit (IWF) des apfelschorfsuszeptiblen Kultivars <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach der Applikation des nicht-pathogenen Bakteriumstammes <i>P. fluorescens</i> Bk3	95
4.1.2 Nachweis von PR-Transkripten in <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Applikation des nicht-pathogenen Bakteriumstammes <i>P. fluorescens</i> Bk3	98
4.1.2.1 RT-PCR	98
4.1.2.2 Differenzielles Screening der Transkripte von Blättern des apfelschorfsuszeptiblen Kultivars <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox vor und nach Applikation des nicht-pathogenen Bakteriumstammes <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3	99
4.2 Biologische Kontrolle von <i>V. inaequalis</i>	104
4.2.1 Das Potenzial von <i>P. fluorescens</i> Bk3 zur biologischen Kontrolle von <i>V. inaequalis</i>	106

4.3	Ausblick.....	112
5	Literaturverzeichnis	114
6	Anhang	131
6.1	Tabelle aller EST-Klone aus der SSH nach Nummern sortiert.....	132
6.2	Witterungsverlauf der gesamten Vegetationsperioden im Jahre 2003 und 2004.....	135
6.3	Originaldaten der Bonituren im Jahre 2003 und 2004 von <i>M. domestica</i> cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Lebenszyklus von <i>V. inaequalis</i> , dem Erreger des Apfelschorfs.	3
Abb. 1.2:	Übersicht der möglichen Signaltransduktionswege der Pflanze, welche in die Pathogenabwehr involviert sind.	8
Abb. 1.3:	Die Kontrolle von <i>V. inaequalis</i> ohne Pestizide.....	10
Abb. 1.4:	Dreiecksbeziehung zwischen Antagonist, Pathogen und Pflanze.....	12
Abb. 2.1:	Netzteilung der Zählkammer nach Thoma.	15
Abb. 2.2:	Sterile bewurzelte ca. 4 Wochen alte <i>in vitro</i> Kulturen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	17
Abb. 2.3:	Seebblue™ Plus 2 Pre-Stained Standard.....	23
Abb. 2.4:	Ungekeimte Konidien von <i>V. inaequalis</i> angefärbt mit Fluoresceindiacetat.	42
Abb. 2.5:	Gekeimte Konidien von <i>V. inaequalis</i> angefärbt mit Fluoresceindiacetat.	43
Abb. 2.6:	Eine Parzelle der Versuchsanlage mit <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox Apfelbäumen im Freiland.....	44
Abb. 2.7:	Konzeption der Versuchsanlage im Freiland auf dem Gelände der Universität Hannover.....	46
Abb. 3.1:	Blattabdrücke steriler <i>in vitro</i> Kulturen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox auf LB-Agar im Vergleich zu Blattabdrücken von <i>M.</i> <i>domestica</i> cv. Holsteiner Cox Gewächshauspflanzen.	49
Abb. 3.2:	SDS-PAGE mit Apoplastenflüssigkeit von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	52
Abb. 3.3:	Immunologische Detektion mittels ECL-Methode drei ausgewählter PR-Proteine in der Apoplastenflüssigkeit von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.	54
Abb. 3.4:	Semiquantitative Detektion ausgewählter PR Gene mittels RT- PCR.....	55
Abb. 3.5:	Quantifizierung der RT-PCR.	56

Abb. 3.6:	Prinzip der Suppressions Subtraktions Hybridisierung (nach DIASCHENKO et. al. 1996).	57
Abb. 3.7:	1,2 % Agarosegel zur Überprüfung der Insertion in den pGem-T Vektor.....	58
Abb. 3.8:	Dot Blot Hybridisierung von PCR-Produkten der induzierten Gene einer <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Kultur nach Inokulation von <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	59
Abb. 3.9:	Klassifizierung der induzierten Gene nach der Applikation von <i>P. fluorescens</i> Bk3 in die Phyllosphäre von sterilen genetisch identischen <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Pflanzen.....	62
Abb. 3.10:	Dot Blot Hybridisierung von PCR - Produkten der induzierten Gene einer <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox <i>in vitro</i> Kultur nach der Applikation von <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	63
Abb. 3.11:	Signalverlauf während der Real-Time PCR.	64
Abb. 3.12:	relative Expression, gemessen mit der Real-Time PCR mit Primern gegen ausgewählte Gene, die nach der Applikation von <i>P. fluorescens</i> Bk3 induziert werden.	66
Abb. 3.13:	Witterungsverlauf vom 15.05.03 bis zur ersten Bonitur am 26.06.03.	68
Abb. 3.14 :	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 26.06.03 in [%].	69
Abb. 3.15:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 09.07.03 in [%].	71
Abb. 3.16:	Witterungsverlauf vom 01.09.03 bis zur dritten Bonitur am 18.09.03.	72
Abb. 3.17:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 18.09.03 in [%].	73
Abb. 3.18:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 26.06.03 in [%].....	74
Abb. 3.19:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 09.07.03 in [%].....	75
Abb. 3.20:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 18.09.03 in [%].....	76
Abb. 3.21:	Witterungsverlauf vom 01.04.04 bis zur ersten Bonitur am 20.04.04.	77
Abb. 3.22:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 20.04.04 in [%].	78
Abb. 3.23:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 08.06.04 in [%].	79
Abb. 3.24:	Witterungsverlauf vom 23.06.04 bis zur Bonitur am 08.07.04.	80
Abb. 3.25:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 08.07.04 in [%].	81
Abb. 3.26:	Witterungsverlauf vom 28.07.04 bis zur Bonitur am 08.07.04.	81
Abb. 3.27:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 12.08.04 in [%].	82
Abb. 3.28:	Witterungsverlauf vom 01.09.04 bis zur letzten Bonitur am 17.09.04.....	83
Abb. 3.29:	Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 17.09.04 in [%].	84

Abb. 3.30:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 20.04.04 in [%].....	85
Abb. 3.31:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 08.06.04 in [%].....	86
Abb. 3.32:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 08.07.04 in [%].....	87
Abb. 3.33:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 12.08.04 in [%].....	88
Abb. 3.34:	Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 17.09.04 in [%].....	89
Abb. 3.35:	Apfelschorfbefallsverlauf von <i>M. domestica</i> cv. Elstar über die gesamte Vegetationsperiode 2003.	90
Abb. 3.36:	Apfelschorfbefallsverlauf von <i>M. domestica</i> cv. Elstar über die gesamte Vegetationsperiode 2004.	90
Abb. 3.37:	Apfelschorfbefallsverlauf von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox über die gesamte Vegetationsperiode 2003.....	92
Abb. 3.38:	Apfelschorfbefallsverlauf von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox über die gesamte Vegetationsperiode 2004.....	92
Abb. 4.1:	Signalverlauf während der PCR von Chitinase und Thaumatin- ähnlichem Protein.	104
Abb. 4.2:	Die ersten sich gerade entwickelnde Blätter von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox zum ersten Inokulationstermin am 31. März 2004 in der Versuchsanlage (Universität Hannover, Institut für Botanik,/ Herrenhäuser-strasse 2).	110
Abb. 6.1:	Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Universität Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 15.05.03-02.08.03.....	135
Abb. 6.2:	Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Universität Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 02.08.03-21.09.03.....	135
Abb. 6.3:	Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Universität Hannover Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2 für den Zeitraum vom 10.03.04.-05.07.04.....	136
Abb. 6.4:	Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Universität Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 05.07.04-20.09.04.....	136

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Apfelproduktion in den Ländern mit der höchsten Apfelproduktion in der EU-25 und weltweit.....	1
Tab. 1.2:	Einteilung der PR-Proteine in 14 Familien nach Buchanan (2000).....	6
Tab. 2.1:	Zusammensetzung für den ersten Schritt der cDNA – Synthese.....	28
Tab. 2.2:	RT-Mix mit einem Volumen von 10 µl.	28
Tab. 2.3:	Annealingtemperaturen und Primersequenzen für die RT-PCR.	29
Tab. 2.4:	Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR.	29
Tab. 2.5:	Ligation des PCR Produkts aus der Substraktion mit dem PGem T-easy Vector 5Zf (+) für die Transformation.	31
Tab. 2.6:	PCR-Ansatz zur Amplifizierung der transformierten Bakterienkolonien.....	32
Tab. 2.7:	Amplifizierung der transformierten Bakterienkolonien mittels PCR.....	33
Tab. 2.8:	PCR-Ansatz zur radioaktiven Markierung der cDNA.	34
Tab. 2.9:	Amplifizierung der radioaktiv markierten Sonden für den Reverse Northern Dot Blot mittels PCR.	34
Tab. 2.10:	Reaktionsgemisch für die Real-Time PCR.....	37
Tab. 2.11:	Bedingungen für die Real Time PCR.	37
Tab. 2.12:	Primersequenzen für die Real time PCR.	38
Tab. 2.13:	Verschiedene Behandlungen von <i>M. domestica</i> im Freilandversuch in den Jahren 2003 und 2004.	45
Tab. 3.1:	ESI Q-ToF Massenspektrometrie von Peptidfragmenten und Identifikation durch Homologiesuche in Datenbanken.....	53
Tab. 3.2:	Identifikation der EST Klone vom apfelschorfsuszeptiblen Kultivar Holsteiner Cox nach Applikation des nicht pathogenen Bakterienstammes <i>P. fluorescens</i> BK3.....	60-61
Tab. 3.3:	Relative Expressionsunterschiede einer unbehandelten Kontrollpflanze und einer mit <i>P. fluorescens</i> Bk3 behandelten Pflanze.....	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.4:	Wirkungsgrade (Abbott) von <i>P. fluorescens</i> Bk3 gegen Apfelschorfsymptome auf <i>M. domestica</i> cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003 und 2004.	93
Tab. 4.1:	Gruppenzugehörigkeit der 51 individuellen Klone der SSH-Analyse	100
Tab. 4.2:	Wirkungsgrade (Abbott) von <i>P. fluorescens</i> Bk3 gegen Apfelschorfsymptome auf <i>M. domestica</i> cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003 und 2004.	111
Tab. 6.1:	Alle EST-Klone aus der SSH nach Nummern sortiert.	131
Tab. 6.2:	Originaldaten der Bonituren von <i>M. domestica</i> cv. Elstar im Jahre 2003.	137
Tab. 6.3:	Originaldaten der Bonituren von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003.	137
Tab. 6.4:	Originaldaten der Bonituren von <i>M. domestica</i> cv. Elstar im Jahre 2004.	137
Tab. 6.5:	Originaldaten der Bonituren von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox im Jahre 2004.	137

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
al	andere
APS	Ammoniumpersulfat
B	Bacillus
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BLAST	Basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	Charge coupled device
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Cfu	colonie forming units
cv.	Kultivar
d	Tag
DA	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	<i>Escherischia</i>
ECL	enhanced- chemi-luminescens
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI Q-ToF	Electron spray ionisation quadrupole time of flight
EST	expressed sequence tag
EU	Europa
evtl	eventuell
FAO	Food and agriculture organisation
h	Stunde
HR	Hypersensitive Reaktion
HSC	Heat shock Cognate
IR	induzierte Resistenz
IWF	interstitielle Waschflüssigkeit

Abkürzungsverzeichnis

JA	Jasmonat
k	Kilogramm
Kap	Kapitel
lat.	lateinisch
LB	Lauri Bertani
mRNA	messenger RNA
MeJa	Methyljasmonat
MeSa	Methylsalicylat
mind	mindestens
Mio	Million
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	National Center of Biological Information
OD	Optische Dichte
P	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol Chloroform Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-chain-reaction
PR	pathogenesis-related
rel	relativ
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
SA	Salicylsäure
SAR	systemic-acquired-resistance
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSH	Suppressive Subtraktive Hybridisation
t	Tonne
Tab	Tabelle
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNE	Puffer aus Tris, NaCl, EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	<i>Venturia</i>
v/v	Volume per Volume / Volumenanteil pro Volumen

Abkürzungsverzeichnis

g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
&	und
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Der Apfelbaum (*Malus domestica*) und der Apfelschorf- erreger *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.

Der Apfelbaum ist schon sehr lange bekannt. Der berühmte Feldherr der Antike, Alexander der Große, der mit den Griechen gegen Persien kämpfte, brachte von seinen Feldzügen aus Kleinasien verschiedene Obstsorten mit, darunter auch den Apfelbaum. Über die Römer kam der Kulturapfel *Malus x domestica* (BORKH.) nach Deutschland. Bis dahin gab es in unseren Breiten nur den Wildapfel, auch Holzapfel genannt *Malus sylvestris* (MILL.) (ROTHMALER 1996). Heute gibt es über 20 000 Apfelsorten in der Welt (OBSTMUSEUM Köln/Porz).

Tab. 1.1: Apfelproduktion in den Ländern mit der höchsten Apfelproduktion in der EU-25 und weltweit (in 1.000 t).

Land	2001	2002	2003	2004	2005
Polen	2484	2168	2428	2522	2200
Italien	2172	2171	1851	1995	2145
Frankreich	1938	1966	1728	1708	1778
Deutschland	922	763	818	945	915
Spanien	806	646	680	553	671
Niederlande	475	370	405	435	380
Belgien	337	349	319	356	325
Portugal	240	295	280	260	270
Europa gesamt	10954	10187	9928	10345	10074
Weltweit	57688	57688	58981	63205	63488

Quelle: Eurofel Datenbank, Brüssel; <http://www.obst-vom-bodensee.de> & Fao 2005

Jedes Jahr wird dem Erwerbsapfelanbau weltweit schwerer Schaden durch verschiedene Phytopathogene zugefügt (MACHARDY 1996). Die weltweit wirtschaftlich bedeutensten durch Mikroorganismen verursachten Krankheiten an *M. domestica* sind der Mehltau, verursacht durch *Podosphaera leucotricha*, der Feuerbrand, verursacht durch *Erwinia amylovora*, und die wirtschaftlich schwerwiegendste Obstkrankeheit, der Apfelschorf,

verursacht durch *Venturia inaequalis* (BIGGS 1990). Der Pilz *V. inaequalis* gehört zu den Ascomyceten, und die Gattung *Venturia* umfasst eine Reihe von phytopathogenen Erregern, die alle Schorfkrankheiten hervorrufen, z.B. Apfelschorf (*V. inaequalis*), der Birnenschorf (*V. pirina*) und der Kirschschorf (*V. cerasi*) (AGRIOS 1997).

Die wissenschaftliche Artnamenbezeichnung des Apfelschorferregers *inaequalis* geht auf die charakteristische unterschiedliche Größenausbildung der zweizelligen Ascosporen zurück. Seine Lebensweise ist in der asexuellen Phase während der Vegetationsperiode parasitisch (Konidien) und in der sexuellen Phase im Winter saprophytisch (GUPTA 1992). Der Pilz ist demnach hemibiotroph. Schwarze runde Perithezien (Hauptfruchtform), welche die Asci mit den zweizelligen Ascosporen (sexuell gebildete Pilzsporen) enthalten, überwintern im Falllaub und sind für die Primärinfektionen im Frühjahr verantwortlich (MOOSHERR & KENNEL 1995).

Bei Niederschlägen zu Beginn der Vegetationsperiode werden sie ausgestoßen und auf Blätter und Früchte anemochor verbreitet. Je nach Witterungsbedingungen können die Ascosporen keimen, in das Gewebe eindringen und Infektionen hervorrufen. Für die Infektion bilden sie ein Apressorium aus und penetrieren die Kutikula mechanisch und enzymatisch mittels Cutinasen und Esterasen (KOELLER 1991). Das Myzel wächst zwischen Kutikula und Epidermiszellen in lebendem Gewebe subkutikulär. Für die späteren Sekundärinfektionen sind die Konidien verantwortlich, die mit den Konidiophoren des zuvor subkutikulär gewachsene Myzels wieder an die Oberfläche gelangen (Abb. 1.1) (AGRIOS 1997).

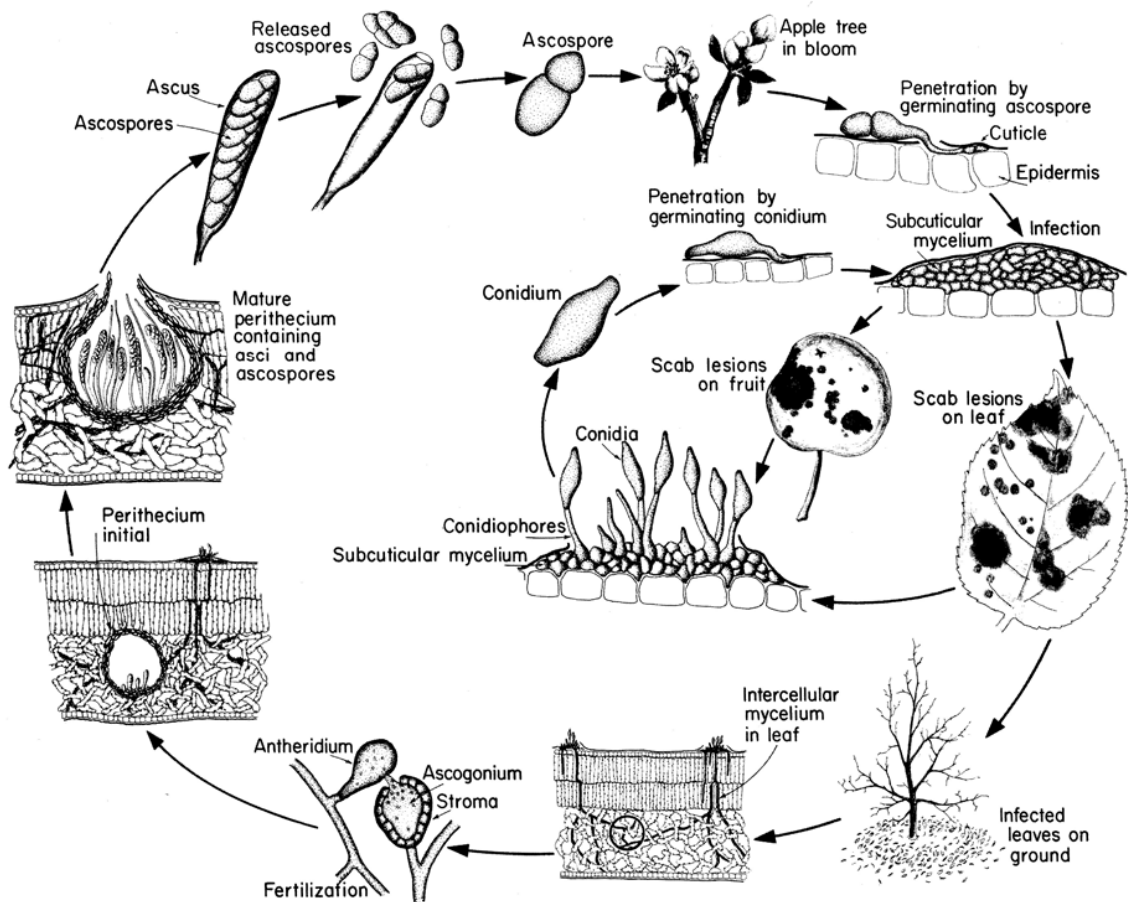


Abb. 1.1: Lebenszyklus von *V. inaequalis*, dem Erreger des Apfelschorfs. Die Primärinfektion findet im Frühjahr durch Ascosporen statt. Durch Konidien kommt es im Sommer zu mehreren Sekundärinfektionen. Im gefallenem Laub findet die Überwinterung und Ausbildung der Pseudothecien statt. Nach AGRIOS (1997).

Zur Keimung der Ascosporen bzw. der Konidien, durch Ausbildung eines Apressoriums, welches die Kutikula penetriert, ist eine Blattnässezeit von mindestens 6 h bei einer Temperatur von 18°C notwendig. Abweichungen von der optimalen Temperatur führen zu einer verzögerten Konidienkeimung. Erstmals wurde dieser Zusammenhang zwischen Ascosporen- bzw. Konidienkeimung, Temperatur und Blattnässezeiten von MILLS (1944) gezeigt und später von MACHARDY und GADOURY (1989) zusammengefasst.

1.2 Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen

Solche im vorhergehenden Abschnitt geschilderten komplizierten, aber doch höchst effektiven Mechanismen zur Infektion von Pflanzen mit Pathogenen, haben sich über Millionen von Jahren entwickelt. Im Gegenzug haben auch die Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen gegen die Pathogene ausgebildet. Dabei handelt es sich entweder um konstitutive oder induzierbare Abwehrmechanismen (PRELL 1996, HAMMOND-KOSACK & JONES 1996, SOMSSICH & HAHLBROCK 1998). Die konstitutiven Abwehrmechanismen stehen jederzeit zur Verfügung und beinhalten z.B. die Ausbildung physikalischer Barrieren, die von den Pathogenen schwer zu überwinden sind. Bei Nichtüberwinden der konstitutiven Abwehrmechanismen kommt es zu keiner Infektion, was als Basis- oder Nichtwirtsresistenz bezeichnet wird (PRELL 1996, BUCHANAN et al. 2000). Für ein Pathogen stellt die Kutikula der Pflanze (*lat. cutis*, Haut) die erste solcher Barrieren dar (RIDE 1983). Sie besitzt durch ihre Polymermatrix aus Cutin eine stark hydrophobe Oberflächenstruktur, und die relativ harte Wachsschicht ist nur schwer zu besiedeln oder zu permeieren. Die Pathogene haben Mechanismen entwickelt, diese Schwierigkeiten zu überwinden, z.B. die Ausscheidung bestimmter Enzyme wie Cutinasen und Esterasen, um die Kutikula zu durchdringen (PURDY & KOLATTUKUDY 1975). Der erste Kontakt zu der Pflanze ist also entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg einer Infektion. Durch Hemmung der Cutinaseaktivität auf der Oberfläche von Apfelblättern mit dem Cutinaseinhibitor Cycloheximide ist *V. inaequalis* nicht mehr in der Lage, ein subkutikuläres Myzel auszubilden (KOELLER et al. 1991), da die erste physikalische Barriere in Form der Kutikula nicht mehr permeiert werden kann.

Im Gegensatz zu den konstitutiven Abwehrmechanismen müssen die induzierten Abwehrmechanismen in der Pflanze aktiviert werden. Voraussetzung dafür ist die Erkennung des Pathogens durch die Pflanze, bei der exogene und endogene Signalmoleküle eine Rolle spielen, die als Elicitoren bezeichnet werden (EBEL & SCHEEL 1997). Exogene Elicitoren können Oberflächenstrukturen oder sekretierte Substanzen der pathogenen Organismen oder endogene Faktoren der Pflanze sein (EBEL & MITHÖFER 1998).

Die aktive Abwehr der Pflanze kann man in eine schnelle (1) und eine etwas später eintretende Abwehrmaßnahme (2) einteilen.

1. Hypersensitive Reaktion (lokal, oxidativer Burst)

2. Induzierte Resistenz (IR)

a) lokal (Bildung von Phytoalexinen, PR-Proteinen (pathogenesis-related proteins), Zellwandverstärkung durch Callose, Papillenbildung, Verdickung der Kutikula)

b) systemisch (Bildung von PR-Proteinen)

1. Hypersensitive Reaktion (HR): Die schnellste induzierbare Reaktion der Pflanze auf ein Pathogen ist die hypersensitive Reaktion (HR), die bei vielen Pathogeninteraktionen auftritt (DANGL et al. 1996, HEATH 2000). Sie tritt nur an der Kontaktstelle mit dem Pathogen ein und resultiert in einem programmierten Zelltod der penetrierten sowie der in der Nähe befindlichen Gewebezellen, sodass das Pathogen an seiner Ausbreitung behindert wird (GOODMAN & NOVACKY 1994).

2. Induzierte Resistenz (IR): Ausgelöst durch die HR, aber auch unabhängig davon nur vom Pathogen induziert, gibt es eine etwas langsamer eintretende Abwehrreaktion, die induzierte Resistenz (IR) (PRELL 1996). Die IR führt bei Pathogeninfektion einerseits zu einer lokalen Reaktion, andererseits über eine Signaltransduktionskette zu einer schwachen Veränderung in der Genexpression auch in uninfizierten Pflanzenteilen, was als systemic-acquired-resistance (SAR) bezeichnet wird (WARD et al. 1991, RYALS et al. 1996, BAKER et al. 1997, HEIL & BOSTOCK 2002). Die lokal ausgeprägte Resistenz ist an der infektiösen Stelle durch Zellwandverstärkung, Bildung von Phytoalexinen und PR-Proteinen charakterisiert (PRELL 1996). Die Phytoalexine sind niedermolekulare antimikrobiell wirkenden Substanzen (SHIRAISHI et al. 1994), welche die Resistenz gegen Pathogene erhöhen können (HELDT 1996).

Die PR-Proteine sind Proteine, die bei verschiedenartigem abiotischem oder biotischem Stress neugebildet werden (ASSELIN 1993). Sie können anhand ihrer Eigenschaften in verschiedene Familien eingeteilt werden. Die Einteilung der PR-Proteine ist nach BUCHANAN (2000) in 14 Familien zusammengefasst (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Einteilung der PR-Proteine in 14 Familien nach VAN LOON & VAN STRIEN (1999), BUCHANAN (2000).

Familie	Typische Vertreter	Eigenschaften	Referenz
PR-1	Tabak PR-1a	Antifungal	Antoniw et al., 1980
PR-2	Tabak PR-2	β -1,3-Glukanase	Antoniw et al., 1980
PR-3	Tabak P, Q	chitinase Typ I,II, IV,V,VI,VII	Van Loon, 1982
PR-4	Tabak 'R'	Chitinase Typ I,II	Van Loon, 1982
PR-5	Tabak S	Thaumatococcus-ähnlich	Van Loon, 1982
PR-6	Tomate Inhibitor I	Proteinaseinhibitor	Green and Ryan, 1972
PR-7	Tomate P ₆₉	Endoproteinase	Vera and Conejero, 1988
PR-8	Cucumber Chitinase	Chitinase Typ III	Métraux et al., 1988
PR-9	Tabak 'lignin-forming peroxidase'	Peroxidase	Lagrimini et al., 1987
PR-10	Parsley 'PR1'	Ribonuclease-ähnlich	Somssich et al., 1986
PR-11	Tabak 'class V' Chitinase	Chitinase, Typ I	Melchers et al., 1994
PR-12	Rettich Rs-AFP3	Defensin	Terras et al., 1992
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	Epple et al., 1995
PR-14	Gerste LTP4	Lipid-transfer Protein	García-Olmedo et al., 1995

Aus vielen Untersuchungen geht hervor, dass die Expression von PR-Proteinen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen führt (MUTHUKRISHNAN et al. 2001, TON 2002). Das Phänomen der IR macht man sich heutzutage in der biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten zunutze (STIERL 1999). Die PR-Proteine kommen vorwiegend extrazellulär im Apoplasten vor (HOEGEN 1998). Der Apoplast ist der nichtplasmatische Raum außerhalb der Zellmembran, der für sich in der Pflanze ein Kontinuum bildet (STRASBURGER 1991). Er hat neben dem Wasser-Ionen- und Proteintransport (HOSON 1998, SAKURAI 1998, SATTELMACHER 2001) auch eine zentrale Rolle in der Pathogenabwehr (DANI et al. 2005) und enthält mehr als 200 Proteine (ROBERTSON et al. 1997). Das erste Kompartiment, mit dem ein Pathogen in Kontakt kommt, wenn es die erste Barriere, die Kutikula, überwunden hat, ist der Apoplast. Die im Apoplasten gebildeten PR-Proteine, die teilweise hydrolytische Eigenschaften besitzen, können die

Ausbreitung eingedrungener Pathogene zumindest teilweise einschränken. Die Bildung von PR-Proteinen nach einer Pathogeninfektion wurde mehrfach an verschiedenen Pflanzengattungen und Pathogenen wie z.B. an *M. domestica* nach der Infektion mit *V. inaequalis* (GAU et al. 2004a), an *Vitis vinifera* nach der Infektion mit *Botrytis cinerea* (RENAULT et al. 2000), an *Pyrus communis* nach der Infektion mit *Venturia nashicola* (FAIZE et al. 2004) und an *Saccharum officinarum* nach der Infektion mit *Colletotrichum falcatum* (VISWANATHAN et al. 2005) nachgewiesen. Die Induktion von PR-Proteinen kann aber auch durch eine Reihe von anderen äußeren Faktoren ausgelöst werden, z.B. durch UV B Strahlung (FUJIBE 2000), Verwundung (BREDERODE et al. 1991) oder durch die Zugabe von Elicitoren wie Salycilsäure (SA) (BABU 2003), Ethylen und Methyljasmonat (MeJA) auf Weinblätter (REPKA et al. 2004).

Die SAR ist charakterisiert durch die schnelle Akkumulation von SA (MALAMY et al. 1990, METRAUX et al. 1990), welche als endogener Elicitor mit der Bildung von PR-Proteinen korreliert (YALPANI et al. 1993, GAFFNEY et al. 1993, DELANEY et al. 1994, BOL et al. 1996, PRELL 1996, PIETERSE et al. 2001). Die Umwandlung des Signals von SA in die Transkription von PR-Proteinen ist reguliert durch den Schlüsselregulator NPR1 (*non-expressor of pathogenesis related genes1*), wobei SA den Redoxstatus beeinflusst und so die Bindung zu bestimmten Transkriptionsfaktoren aus der TGA-Familie reguliert, die wiederum SA abhängige Elemente in den Promotoren der PR-Gene aktivieren (PIETERSE 2004).

Neben SA als Elicitoren zur Akkumulation von PR-Proteinen sind auch Jasmonsäure (JA) oder Methyljasmonat (MeJA) und Ethylen bekannt, die eine wichtige Rolle in der basalen und induzierten Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen spielen (TON et al. 2002).

Dabei kann jede dieser Substanzen andere PR-Proteine induzieren (MENARD et al. 2004), z.B. über MeJA β -1,3-Glukanase, PR-3b und Chitinase und über den MeSA-Induktionsweg PR-2b und PR-3a (DING 2002). WANG et al. 1999 fand für PR-10 eine JA abhängige und eine JA unabhängige Expression in Lilien. Über den Ethylensignaltransduktionsweg werden PR-10, PR-1b und PR-5 in Reis induziert (AGRAWAL et al. 2001). Trotz der Vielzahl der Experimente sind die Abhängigkeiten in diesem komplizierten Signaltransduktions-Netzwerk noch nicht vollständig geklärt. BUCHANAN (2000) gibt einen guten Überblick über die möglichen Signaltransduktionswege (Abb 1.2).

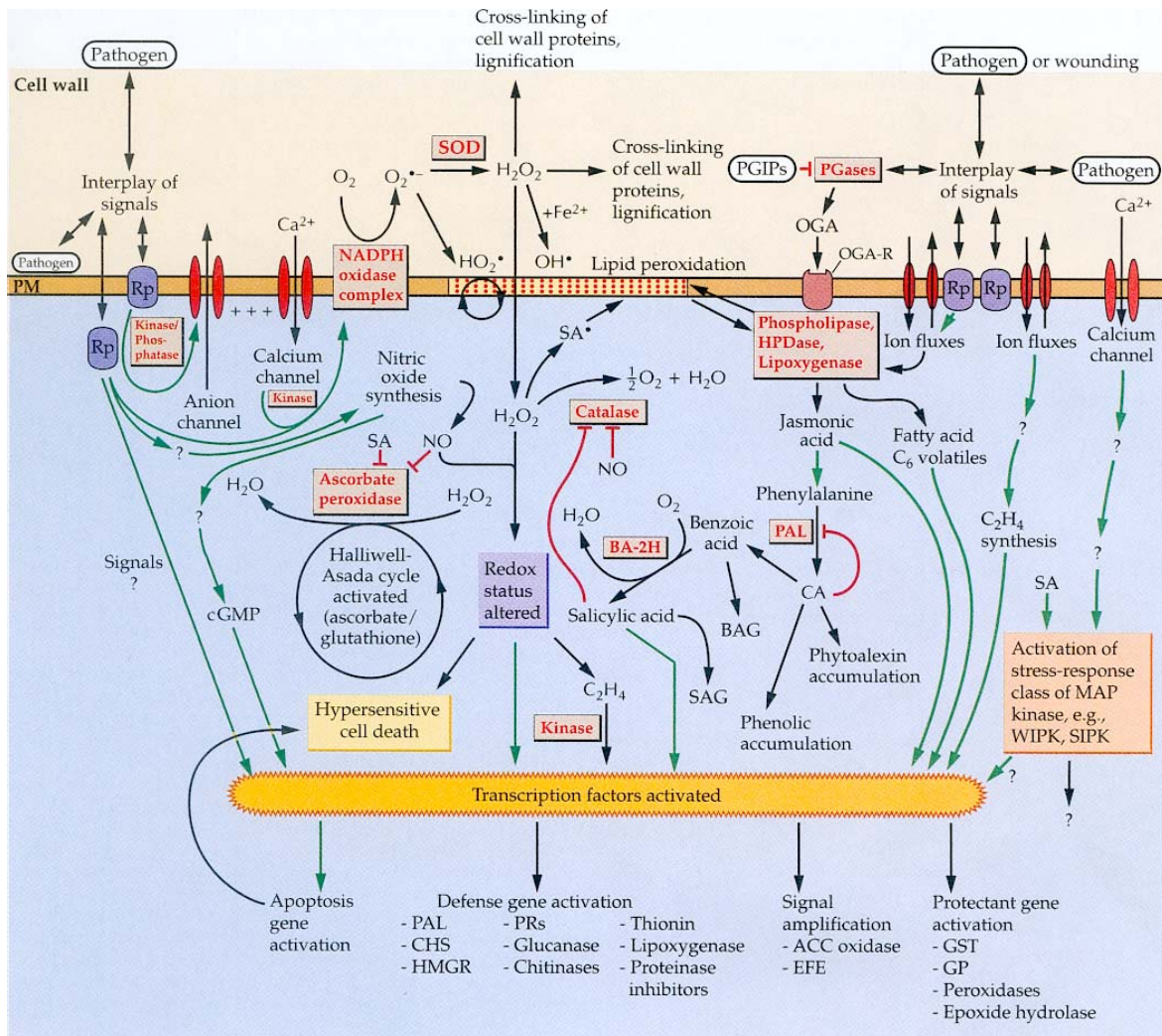


Abb. 1.2: Übersicht der möglichen Signaltransduktionswege der Pflanze, welche in die Pathogenabwehr involviert sind (entnommen aus BUCHANAN 2000).

Die Vielzahl der Experimente hat gezeigt, dass Elicitoren nicht nur direkt die Induktion von PR-Genen auslösen, sondern über ein Netzwerk auch andere Gene und Wege induzieren.

1.3 Biologische Kontrolle von Pflanzenkrankheiten

Die biologische Kontrolle von Pflanzenkrankheiten ist eine Strategie zur Bekämpfung derer Erreger ohne chemische Pestizide. Jedes Jahr werden 1500 neue Pestizide vorgestellt, und 70.000 verschiedene, potentiell gefährliche Pestizide sind schon auf dem Weltmarkt erhältlich (FAO 2001). Ein Teil dieser Pestizide wird im Erwerbsapfelanbau zur Bekämpfung von *V. inaequalis* eingesetzt, z.B. Antracol WG (Kontaktmittel), Malvin WG (Kontaktfungizid) oder Funguran (Kupferspritzmittel/Kontaktfungizid) (LFP 2006). Nach einer erfolgreichen Primärinfektion durch Ascosporen im Frühjahr sind bis zu 15 Fungizidspritzungen pro Vegetationsperiode nötig, um die Ernteaufträge durch *V. inaequalis* in wirtschaftlich vertretbaren Grenzen halten zu können (MOOSHERR 1990). Die wirtschaftliche Schadschwelle ist der Punkt zwischen Schadens- und Regulierungskosten, bei dem sich der Aufwand für die Regulierung und die zu erwartenden Kosten für den Ernteauftrag gerade entsprechen (BLE 2003).

Durch den hohen Einsatz an Fungiziden im Apfelanbau entstehen eine Reihe von ökonomischen und ökologischen Problemen wie aufwendige und teure Entsorgungen der Restfungizide durch die Obstbauern, Rückstände der Fungizide in den Früchten und im Grundwasser, die Zerstörung der natürlichen Mikroflora der Bäume und die schnell gebildeten Resistenzen gegen herkömmliche Fungizide in den Pathogenen. Um die Schädigung der Pestizide in Grenzen zu halten, müssen neue wirksame Strategien zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten entwickelt werden. Die biologische Kontrolle gewinnt dadurch immer mehr an Bedeutung. Zahlreiche Studien belegen das immer größer werdende Interesse an der biologischen Kontrolle verschiedenster Pathogene mittels natürlicher Antagonisten oder ungiftiger abiotischer Elicitoren, welche als Resistenzaktivatoren fungieren können. Dabei ist das Spektrum der zu bekämpfenden Pathogene sowie das der Antagonisten nicht auf Mikroorganismen beschränkt, sondern erstreckt sich von Viren bis hin zu tierischen Pathogenen und Antagonisten (RAMAMOORTHY et al. 2001, WIETHOFF 2005).

Das Prinzip der Kontrolle von *V. inaequalis* ohne Pestizide beruht auf zwei verschiedenen Mechanismen, erstens auf der Kontrolle durch mechanische Pflegemaßnahmen in der Obstanlage und zweitens auf der Kontrolle der Pathogene durch Antagonisten (KOLLAR 2003), die ihrerseits auf zwei verschiedenen Wirkmechanismen basiert (Abb. 1.3).

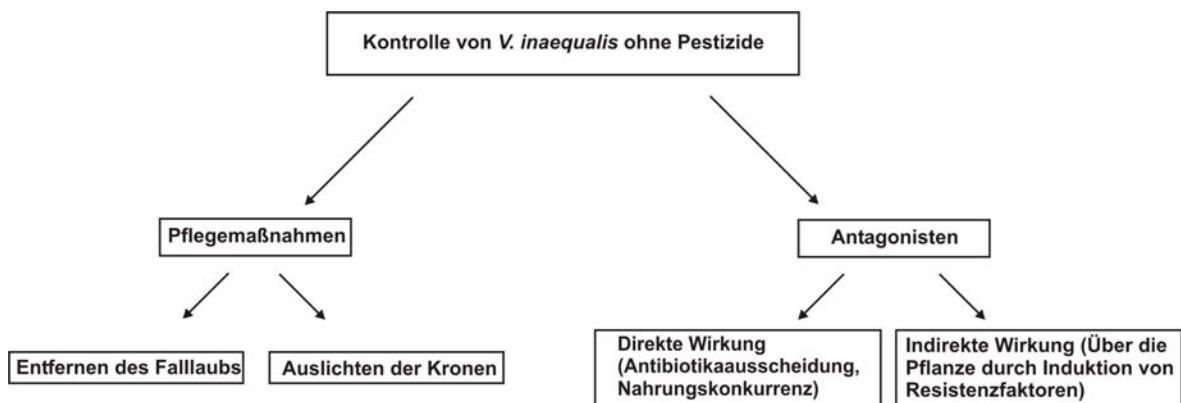


Abb. 1.3: Die Kontrolle von *V. inaequalis* ohne Pestizide.

Zur Kontrolle von *V. inaequalis* im Apfelanbau durch mechanische Pflegemaßnahmen gehört das Auslichten der Kronen, um die Bäume besser zu durchlüften, wodurch sie schneller abtrocknen. Für *V. inaequalis* stehen dann kürzere Blattnässezeiten zur Verfügung, was eine Infektion erschwert. Eine weitere Pflegemaßnahme zur Kontrolle von Apfelschorf ist das Entfernen des Falllaubs aus der Obstanlage, da sich im toten Blattmaterial das Myzel durch das gesamte Blatt ausbreitet und dort die Perithezien mit den Ascosporen bildet, welche die Primärinfektionen im Frühjahr hervorrufen.

Einerseits können die Antagonisten das Pathogen direkt hemmen, andererseits können sie indirekt durch Induktion bestimmter Resistenzmechanismen, z.B. durch die Expression von PR-Proteinen in der Wirtspflanze, auf ein Pathogen wirken, was für Rhizobakterien an verschiedenen Pathosystemen schon gezeigt wurde, (VAN LOON et al. 1998, DUIJFF 1998, HAMMERSCHMIDT 1999, GOZZO 2003).

Zur Bekämpfung des Apfelschorfs wurden schon früh Studien mit mikrobiellen Antagonisten durchgeführt, z.B. von CINQ-MARS (1949), der erstmals Mikroorganismen von Apfelblättern isolierte und den Einfluss der Kulturfiltrate auf das Myzelwachstum von *V. inaequalis* untersuchte. Das Prinzip der biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten mittels mikrobieller Antagonisten wurde schon sehr früh beschrieben, z.B. von RISBETH (1963), der die antagonistische Wirkung von *Phanerochaete gigantea* (Riesentrüffel) gegen *Heterobasidion annosum* (gemeiner Wurzelschwamm, Rotfäule an Coniferen) nutzte. WASSERMANN (1969) untersuchte das antagonistische Potenzial von 74 Mikroorganismenisolaten gegen Apfelschorf. Die stärksten Hemmeffekte auf das Myzelwachstum zeigten *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Nocardia asteroides* und *Torula* sp.. Mit dem steigenden Umweltbewusstsein der Bevölkerung gerade in den letzten Jahren gewann die biologische Kontrolle von

Pflanzenkrankheiten als Alternative zu chemischen Pestiziden wieder mehr Bedeutung. Heutzutage sind 13 Pflanzenstärkungsmittel auf mikrobieller Basis zugelassen z.B. die Pilze *Tichoderma* spp. und *Pythium oligandrum* und bei den Bakterien *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas* ssp. (BLE 2004).

1.4 Der Epiphyt *Pseudomonas fluorescens* Bk3

Die Namensgebung von *Pseudomonas fluorescens* erfolgte schon sehr früh und geht auf Migula (1895) zurück (DSMZ). *P. fluorescens* Bk3 ist ein epiphytisch lebendes Bakterium, welches aus der Phyllosphere einer *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox Pflanze isoliert wurde (Kap. 2.1.1.1) und antagonistische Wirkung gegen *V. inaequalis* besitzt (FISS 2001, SINGH et al. 2004).

Die Phyllosphere von Pflanzen ist für epiphytisch lebende Mikroorganismen ein schwer zu besiedelnder Lebensraum, trotzdem findet man in ihr eine Vielzahl von Organismen (BURR et al. 1996; KUTSCHERYAVA et al. 1999). Die Konzentration von Mikroorganismen in der Phyllosphere von Weizen wurde von MOON et al. (1980) mit Standardmethoden der Elektronenmikroskopie auf 10^6 - 10^8 Mikroorganismen/g Frischgewicht bestimmt.

Das Nährstoffangebot in der Phyllosphere ist als limitierender Faktor für die Besiedlung zu betrachten (MERCIER & LINDOW 2000; LEVEAU & LINDOW 2001). WILSON & LINDOW zeigten 1994 den Überlebenskampf von verschiedenen Bakterienstämmen um verschiedene Nährstoffe in der Phyllosphere von Bohnen. Dabei konkurrierte *P. fluorescens* mit *P. syringae* um Kohlenstoffquellen, wobei andere Bakterienstämme mit *P. syringae* um Ressourcen wie organische Säuren, Aminosäuren und Kohlenhydrate konkurrierten. Von SCHREIBER et al. (2005) wurden für sechs epiphytisch lebende Bakterienstämmen, darunter *Pseudomonas aeruginosa*, an isolierten Kutikeln von Efeu und einer Prunus-Art eine um 50 % erhöhte Wasserpermeabilität der Kutikeln gezeigt, was die Nährstoffaufnahme für gelöste Substanzen aus der Pflanze ermöglicht. *P. fluorescens* Bk3 ist sogar in der Lage, mehr als 46 verschiedene Proteine durch eine isolierte Apfelkutikula hindurchzuschleusen und Nährstoffe aus dem darunter liegenden Medium aufzunehmen, ohne die Kutikula zu verletzen (SINGH et al. 2004). Von GAU et al. (2002) konnte die Etablierung und Ausbreitung auf der Pflanze von *P. fluorescens* BK3 auf *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mittels Biolumineszenzmessungen über 9 Tage verfolgt werden. Die Phyllosphere von Pflanzen ist zwar dicht von einer epiphytischen Mikroflora besiedelt, aber die ökologische Rolle der meisten Epiphyten ist

noch weitestgehend ungeklärt (ABANDA-NKPWATT 2006). Auch die antagonistischen Wirkmechanismen von Mikroorganismen in der Phyllosphere sind bis heute kaum verstanden (Boland & KUYKENDALL 1997, BARBOSA 1998, ELAD 2001).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mehr über den antagonistischen Wirkmechanismus von auf der Wirtspflanze epiphytisch lebenden Mikroorganismen gegen Phytopathogene zu erfahren und das Potenzial von *P. fluorescens* Bk3 als biologisches Pflanzenschutzmittel gegen *V. inaequalis* in einem Feldversuch zu ermitteln. In der trilateralen Beziehung zwischen Pathogen, Wirtspflanze und Antagonist in dem Pathosystem *M. domestica* und *V. inaequalis* mit dem Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 ist die Hemmwirkung auf das Myzelwachstum des Pathogens durch *P. fluorescens* Bk3 im *dual-culture* Test schon gezeigt worden (FISS 2001, SINGH et al. 2004). Die Interaktion von *M. domestica* mit dem Pathogen *V. inaequalis* ist von GAU et al. (2004a) beschrieben worden. Die Reaktion von *M. domestica* auf die Applikation des nicht-pathogenen Mikroorganismus *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphere ist jedoch noch nicht beschrieben worden. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf diesem Thema (Abb. 1.3).

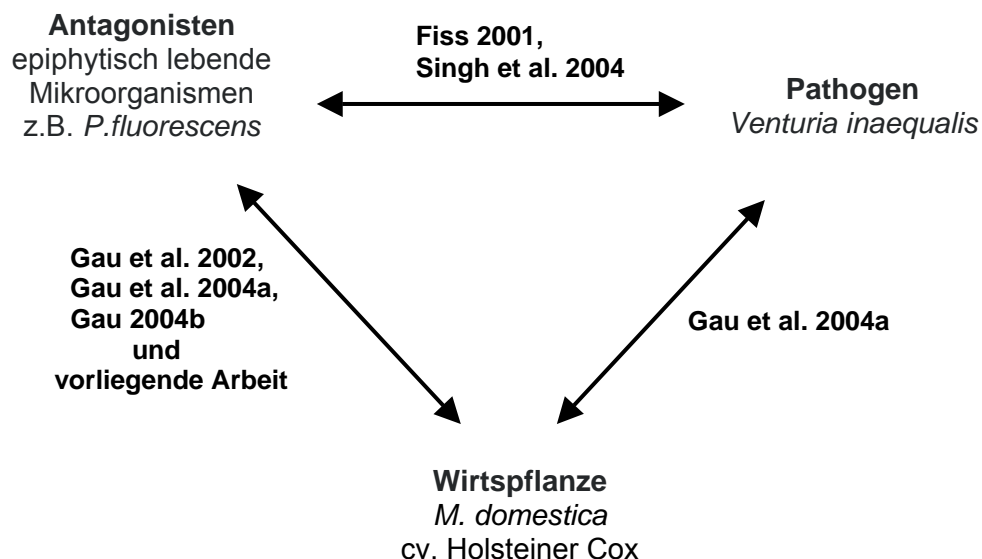


Abb. 1.4: Dreiecksbeziehung zwischen Antagonist, Pathogen und Pflanze.

Aus Publikationen über nicht-pathogene Rhizobakterien ist bekannt, dass sie der Pflanze eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen vermitteln können (MAURHOFER et al. 1994). Als Marker für die induzierte Resistenz werden die vorwiegend extrazellulär vorkommenden PR-Proteine herangezogen (HOEGEN 1998). Aus diesem Grunde wurde zunächst in den hier beschriebenen Experimenten die Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox vor und nach der Applikation des nicht-pathogenen Bakterienstammes *P. fluorescens* Bk3 analysiert.

Für eine umfassendere Analyse der induzierten Gene in *M. domestica* nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 wurde eine Suppression-Subtraktion-Hybridisierungs (SSH)-Analyse durchgeführt. Das Potenzial von *P. fluorescens* Bk3 als biologisches Pflanzenschutzmittel gegen *V. inaequalis* wurde in einem Freilandversuch mit insgesamt 90 Apfelbäumen der Sorte Holsteiner Cox und Elstar getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Molekulare Analysen zur Wechselwirkung zwischen Antagonist und Wirtspflanze

2.1.1 Der Epiphyt *Pseudomonas fluorescens* Bk3

2.1.1.1 Herkunft des epiphytischen Bakteriums

Der Epiphyt *Pseudomonas fluorescens* Bk3 stammt aus einer Obstanlage aus dem Niederelbischen Obstbaugebiet (Altes Land, Hechthausen), die zum Zeitpunkt der Sammlung mehr als 13 Jahre ohne Fungizideinsatz bewirtschaftet worden ist, weshalb man davon ausgehen kann, dass die natürliche Mikroflora der Bäume und die natürliche Zusammensetzung der Mikroorganismen auf der Blattoberfläche weitestgehend intakt war. Die Isolation des Epiphyten erfolgte, im Rahmen einer Diplomarbeit von M. Fiss 1995, von der Oberseite schorfunifizierter Blätter eines Holsteiner Cox Kultivars. Aus *in vitro* und *in planta* Versuchen (Fiss 2001) geht hervor, dass der Stamm *P. fluorescens* Bk3 sowohl *in vitro*, auf Petrischalen (*dual-culture* Test), als auch an Apfelsämlingen eine gute Hemmwirkung auf die Keimung von *V. inaequalis* besitzt. Der Stamm *P. fluorescens* Bk3 wurde uns freundlicherweise von Prof. G. Auling aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2 Anzucht von *P. fluorescens* Bk3 für *in vitro* Experimente

Zur Anzucht für *in vitro* Experimente wurden die epiphytischen Bakterien aus Dauerkulturen (Schrägröhrchen) mit einer Impföse entnommen und in Reagenzgläser mit 10 ml LB-Medium (DUCHEFA GMBH) überführt und über Nacht bei 27°C mit 150 U/min geschüttelt. Anschließend wurde die Konzentration von *P. fluorescens* Bk3 am Mikroskop mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt (Kap. 2.1.1.3).

LB-Medium: 20 g / l, pH 7,2

2.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von *P. fluorescens* Bk3 mit der Thoma-Zählkammer

Die Konzentration von *P. fluorescens* Bk3 wurde am Mikroskop (ZEISS GMBH) mit einer Thoma-Zählkammer (BRAND GMBH) bestimmt.

Um dabei die optimale Zellzahl zum Auszählen in der Thoma-Kammer zu erhalten, wurden 25 µl einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 in 975 µl H₂O verdünnt, (Verdünnungsfaktor = 40) und 100 µl der Suspension unter das eingeschliffene Deckgläschen der Thomakammer pipettiert.

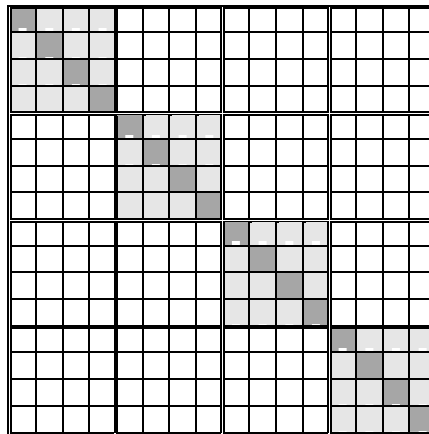


Abb. 2.1: Netzteilung der Zählkammer nach Thoma. Hellgrau markiert sind jeweils Großquadrate. Dunkelgrau markiert sind jeweils die ausgezählten 16 Kleinquadrate.

Die weitere Vorgehensweise richtete sich nach folgendem Berechnungssystem:

Pro Großquadrat werden 4 Kleinquadrate in der Diagonalen ausgezählt, d.h. insgesamt werden 16 Kleinquadrate in der Diagonalen gezählt (Abb. 2.1).

Das Volumen eines Kleinquadrates unter dem Deckgläschen berechnet sich wie folgt:

Ein Kleinquadrat hat eine Seitenlänge von 0,05 mm und die Thoma-Kammer hat eine Schichtdicke von 0,1 mm.

$$\text{Volumen}_{\text{Kleinquadrat}} = \text{Höhe} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe}$$

$$\text{Volumen}_{\text{Kleinquadrat}} = 0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$$

$$\text{Volumen}_{\text{Kleinquadrat}} = 0,00025 \text{ mm}^3$$

Danach berechnet man den Mittelwert aus den 16 gezählten Kleinquadraten:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl aus 16 Kleinquadraten}}{16}$$

Diese Anzahl von Zellen befindet sich also im Mittel in einem Kleinquadrat, d.h. in einem Volumen von $0,00025 \text{ mm}^3$. Um die Zellzahl pro ml bzw. pro μl zu berechnen, muss der Mittelwert der Anzahl Zellen in einem Kleinquadrat mit dem Kammerfaktor multipliziert werden.

$$\text{Kammerfaktor} = \frac{1000 \text{ mm}^3}{0,00025 \text{ mm}^3}$$

$$\text{Kammerfaktor} = 4 \times 10^6$$

Der Kammerfaktor bei einer Bezugsgröße von 1ml beträgt 4×10^6 , da $1\text{ml} = 1000 \text{ mm}^3$.

Der Kammerfaktor bei einer Bezugsgröße von $1\mu\text{l}$ beträgt 4×10^3

Formel zur Berechnung der Zellzahl / ml:

$$\frac{\text{Mittelwert der Zellzahl eines Kleinquadrates}}{\text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{Zellen / ml}$$

Auf diese Weise konnte die Konzentration von *P. fluorescens* Bk3 auf die gewünscht Konzentration eingestellt werden.

2.1.2 Sterile *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

2.1.2.1 Kultivierung und Vermehrung von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kulturen

Die benötigten sterilen *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox wurden freundlicherweise von Prof. Dr. I. Szankowski aus dem Institut für Gemüse- und Obstbau

der Universität Hannover zur Verfügung gestellt und wie bei SZANKOWSKI (2002) und GAU et al. (2002) beschrieben kultiviert. Die Apfelpflanzen wurden steril in Magenta-Tanks auf C1-Medium ca. 4 Wochen bei 24°C und einem Licht/Dunkel Rhythmus von jeweils 12 Stunden in der Klimakammer angezogen und über Sprosskulturen vermehrt. Die Magenta-Tanks gewährleiten bei geschlossenem Deckel eine hohe Luftfeuchtigkeit (95 % -100 %) in der Umgebung der Sprosskulturen (Szankowski 2002, Szankowski et al. 2003).

C1-Medium (SZANKOWSKI 2002): Murashige und Skoog Salze und Vitamine (MURASHIGE & SKOOG 1962), 3% Saccharose, 0,1 g / l Myo-Inositol, 4,4 µM BAP, 0,5 µM IBA, 0,8 % Plant Agar, pH - Wert 5,8

2.1.2.2 Bewurzelung von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox in vitro Kulturen

Nach 4 Wochen wurden die nun ca. 4 cm großen Pflanzen auf Bewurzelungsmedium (B2) umgesetzt und bei 24°C und einem Licht/Dunkel Rhythmus von jeweils 12 Stunden in der Klimakammer kultiviert und bewurzelt. Nach 3-6 Wochen konnten die Pflanzen als bewurzelt bewertet werden.



Abb. 2.2: Sterile, bewurzelte, ca. 4 Wochen alte *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox.

Bewurzelungsmedium B2 (Szankowski 2002): Murashige und Skoog Salze und Vitamine (MURASHIGE & SKOOG 1962), 3% Saccharose, 1,5 µM IBA, 0,7 % Plant Agar, pH-Wert 5,8

2.1.2.3 Inokulation steriler *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit *Pseudomonas fluorescens* Bk3

Für die Inokulation der *in vitro* Kulturen wurde die Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 (Kap. 2.1.1.2) 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration der Bakteriensuspension auf 2 x 10⁹ Zellen/ml eingestellt (Kap. 2.1.1.3). Davon wurde 1 ml auf fünf im selben Tank befindlichen, 4 Wochen alten, bewurzelten *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit einem Zerstäuber auf die Ober- und Unterseite der Blätter aufgebracht. Die Bedingungen in der Klimakammer für die weitere Kultivierung der inokulierten *in vitro* Kulturen sind die gleichen wie bei der Vermehrung (Kap. 2.1.2.1 und Bewurzelung (Kap. 2.1.2.2), nämlich eine gleichbleibende Temperatur von 24°C und ein Licht / Dunkel Rhythmus von jeweils 12 Stunden. 1 d, 2 d und 5 d nach der Applikation fand die Ernte der inokulierten Blätter statt (Kap. 2.1.2.4).

2.1.2.4 Ernte der mit *P. fluorescens* Bk3 inokulierten *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Ernte von Apfelblättern zur RNA-Isolierung: Nach 1, 2 und 5 d wurden die Blätter mit einer Pinzette kurz unter dem Blatt an der Petiole abgeknipst, in Aluminiumfolie verpackt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blätter können bis zu mehreren Monaten bei -70°C gelagert werden.

Ernte von Apfelblättern zur Isolierung von Apoplastenflüssigkeit: Nach 1 d, 2 d und 5 d wurden die Blätter mit einer Pinzette kurz unter dem Blatt an der Petiole abgeknipst und entweder sofort für die folgende Infiltration mit 1xPBS-Puffer zur Isolierung der Apoplastenflüssigkeit eingesetzt (Kap. 2.1.5) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 gelagert.

2.1.3 Blattabdrücke von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte, wie z.B. die Induktion von PR-Proteinen bei den *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox durch die

Applikation von *P. fluorescens* Bk3 hervorgerufen worden ist, wurden Blattabdrücke der sterilen Pflanzen im Vergleich zu Gewächshauspflanzen angefertigt. Dazu wurde die Blattober- und Unterseite einer sterilen *in vitro* Kultur und einer Gewächshauspflanze auf Petrischalen mit LB-Agar (DUCHEFA GMBH) gedrückt und 48 h bei 27°C inkubiert.

LB-Agar: 30 g / l, pH 7,2

2.1.4 Reisolation von *P. fluorescens* BK3 von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kulturen

Die bewurzelten (Kap. 2.1.2.2), sterilen, genetisch identischen *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox wurden, wie in Kap. 2.1.2.3 beschrieben mit 1 ml *P. fluorescens* Bk3 mit einer Konzentration von 2×10^9 Zellen/ml inokuliert. Nach der Inokulation wurden die *in vitro* Kulturen für 24 h in der Klimakammer bei 24°C und einem hell/dunkel Rhythmus von 12 h kultiviert. Nach Ablauf der 24 h wurden die Blätter geerntet (Kap. 2.1.2.4), allerdings nach der Ernte nicht in flüssigen Stickstoff eingefroren, sondern in ein Sarstedt-Röhrchen mit 20 ml ddH₂O überführt und mit der Hand stark geschüttelt, um die Bakterien von der Blattoberfläche abzulösen. Um zu testen, ob die Pflanzen vor der Inokulation steril waren, wurde ein Kontrollblattabdruck von einem Blatt einer nicht inokulierten *in vitro* Kultur auf einer LB-Agarplatte (DUCHEFA GMBH) angefertigt (Abb. 3.1). Die Schüttelsuspension wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausplattiert und 24 h bei 27°C inkubiert. Nach 24 h wurden die Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt und die Cfu/ml berechnet.

LB-Agar: 30 g / l, pH 7,2

2.1.5 Isolierung der Apoplastenflüssigkeit

Die Apoplastenflüssigkeit wurde nach einer modifizierten Methode von GAU et al. (2004) gewonnen. Der Apoplast bildet in der Pflanze ein Kontinuum außerhalb der Plasmamembran und ist ein System von Interzellularen, welches als Speicher-, Transport- und Reaktionsraum dient. Um die im Apoplasten gelösten Proteine zu isolieren, wurden die

Blätter an der Petiole abgeschnitten, in einer Plastikbox mit 1 x PBS-Puffer bedeckt und mit einem Drahtnetz beschwert.

Danach wurden die Blattproben 5 min im Exikator bei einem Ölpumpenvakuum infiltriert. Der Puffer dringt in die Interzellularen ein und vermischt sich mit der Apoplastenflüssigkeit. Anschließend werden die Blätter zwischen zwei Folien, mit der Orientierung des Blattstiels zum Boden, eingerollt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, um die überschüssige Flüssigkeit vom Infiltrieren durch Zentrifugation (5 min bei 100 x g) zu entfernen. Die überschüssige Flüssigkeit kann nun aus dem Zentrifugenbecher pipettiert werden, und das Apoplastenflüssigkeit-Puffergemisch mit den darin gelösten Substanzen wird anschließend mit 700 x g aus den Interzellularen zentrifugiert. Die so gewonnene Apoplastenflüssigkeit kann bei -20°C gelagert werden.

10 x PBS-Puffer Stammlösung: 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 111 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 17,6 mM KH₂PO₄

2.1.6 Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung der Apoplastenflüssigkeit mit dem Bradford-Proteintest

Die Konzentration der in der Apoplastenflüssigkeit gelösten Proteine wurde mit dem Bradford - Proteintest (BRADFORD 1976) bestimmt. Grundlegend für diese Bestimmung ist die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250, in saurer Lösung sein Absorptionsmaximum im Falle einer Proteinbindung von 465 nm auf 595 nm zu verschieben.

Für die photometrische Bestimmung des Proteingehalts wurden 20 µl Probe (Apoplastenflüssigkeit) mit 80 µl 1 x PBS-Puffer und 1 ml Bradford Reagenz gemischt, und nach 5 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Extinktion am Photometer bei 595 nm gegen 100 µl 1 x PBS-Puffer mit 1 ml Bradford Reagenz gemessen.

Zur Ermittlung des Proteingehalts aus der Extinktion wurde eine Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard (0,1 µg-50 µg BSA) unter gleichen Bedingungen erstellt.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde auf der Eichgeraden abgelesen.

Bradford Reagenz 1l: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) in 50 ml 96% Ethanol lösen und 100 ml 85% Phosphorsäure (H₃PO₄) zugeben, danach mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen und mittels Nutsche / Wasserstrahlpumpe die Schwebstoffe abfiltrieren.

10 x PBS-Puffer Stammlösung: 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 111 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 17,6 mM KH₂PO₄

2.1.7 SDS- Gelelektrophorese (Tris-Tricin)

2.1.7.1 Vorbereitung der Proteinproben für die SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricin)

Die Apoplastenflüssigkeit mit einem Proteingehalt von 15 µg wurde in einer Speed-Vacuum-Univapo 100 H eingengt, danach in 10 µl H₂O gelöst und mit 10 µl 2 x Probenpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden dann 5 Min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und danach auf ein Tris-Tricin Gel aufgetragen.

Probenpuffer (2x): 124 mM Tris pH 6,8, 20 % Glycerin, 10 % 2-Mercaptoethanol, 10 SDS, 0,02 % Serva Blue G

2.1.7.2 SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricin)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mithilfe von Tricin statt Glycin als Folge-Ion wurde erstmals von SCHÄGGER & JAGOW (1987) beschrieben. Der Einsatz von Tricin bei der Elektrophorese gewährleistet im Allgemeinen eine bessere Auflösung bei der Trennung kleinerer Proteine (5-20 kDa).

Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel 12 % mit einem Volumen von 15,8 ml

- 5 ml Gelpuffer 3 x (1,5 M Tris / HCl pH 8,45, 5,2 mM % SDS)
- 4,5 ml 40 % Acrylamid, 1,6 % N,N'-Methylenbisacrylamid
- 2 ml 87 % Glycerin
- 4,25 ml H₂O
- 7,5 µl TEMED
- 75 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat

Sammelgel 3 % mit einem Volumen von 5,8 ml

- 1,6 ml Gelpuffer 3 x (3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % SDS)
- 0,65 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
- 3,5 ml H₂O
- 4 µl TEMED
- 40 µl 10 %iges Ammoniumperoxodisulfat

Im Unterschied zur Elektrophorese mit Glycin nach LAEMMLI (1970), werden bei der Elektrophorese mit Tricin nach Schägger Kathoden- und Anodenpuffer unterschiedlicher Zusammensetzung benutzt.

Anodenpuffer: 200 mM Tris / HCl - Puffer, pH 8,9

Kathodenpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 3,5 mM SDS, pH 8,25

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proteinproben wurde die Elektrophorese gestartet. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt. Zur anschließenden Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet, nachdem die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte. Als Marker wurden 3 µl Seebblue™ Plus 2 Pre-Stained Standard (NOVEX), (Abb: 2.3) aufgetragen.

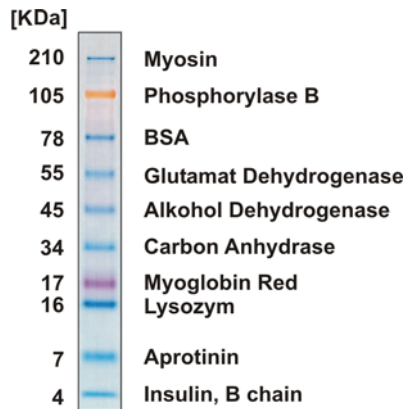


Abb. 2.3: Seeblue™ Plus 2 Pre-Stained Standard.

2.1.7.3 Coomassie-kolloidal Färbung von Proteingelen

Die Coomassie-kolloidal Färbung von Proteingelen ist etwa doppelt so sensitiv wie die sonst übliche Wasser / Methanol / Essigsäure-Methode und wurde von NEUHOFF et al. (1988) zum ersten Mal beschrieben.

Durch die kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an die Proteine und nur wenig an die Gelmatrix. Die Proteine im Gel wurden für eine Stunde mit der Fixierlösung fixiert. Die Färbung der Proteine erfolgte über Nacht in einer 80 % (v / v) Färbelösung + 20 % (v / v) Methanol. Die Färbelösung wurde vor ihrem Einsatz mindestens 4 h geschüttelt. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Wasser. Wahlweise kann auch mit 20 %-igem Methanol entfärbt werden, was sich allerdings bei einer anschließenden Massenspektrometrie störend auswirken kann.

Fixierlösung: 40 % Methanol + 10 % Essigsäure

Färbelösung: 98 % (v / v) Lösung A + 2 % (v / v) Lösung B

Lösung A 1l: 2 % (w / v) *ortho*-Phosphorsäure (20g viskos), 10 % (w / v) Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄

Lösung B: 5 % (w / v) Coomassie - Brillant - Blue (CBB) - G250, H₂O

2.1.8 Spaltung und Sequenzierung von Proteinen

Die zu identifizierenden Proteinbanden wurden nach einer Coomassie - kolloidal Färbung (Kap. 2.1.7.3) nach einer Methode von JENSEN et al. (1998) aus dem Tris-Tricin Gel ausgeschnitten und mit Trypsin enzymatisch gespalten. Die *de-novo* Sequenzierung erfolgte mit einem quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-ToF2 Micromass, Waters, Manchester, United Kingdom) mit der Positiv-Ion Methode. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Markus Piotrowski (Universität Bochum, Deutschland) durchgeführt. Die Aminosäuresequenzen wurden durch Homologiesuche mit dem Programm PeptideSearch (EMBL, Heidelberg, Deutschland) identifiziert (Tab. 3.1).

2.1.9 Immunodetektion (Western Blot) mittels ECL-Methode (enhanced chemi-luminescence)

Der Immunoblot wurde nach einer Methode von TOBWIN et al. (1979) auf einer Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (SCHLEICHER UND SCHÜLL GMBH) durchgeführt.

Die Blots wurden mit 5% Magermilch 1 h geblockt, um die unspezifischen Bindungsstellen abzudecken, und danach mit Antikörpern aus Kaninchen gegen die PR-Proteine Thaumatin-ähnliches Protein, Chitinase und β-1,3-Glukanase in einer Verdünnung von 1:2000 Verdünnung in Magermilch über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. M. Legrand IBMP, Strasbourg, Frankreich zur Verfügung gestellt.

Die Membranen wurden 1 h mit anti-Kaninchen-IgG (Peroxidase gekoppelt, Verdünnung 1:20000, SIGMA) inkubiert. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wird die Membran ca. 10 s mit ECL-Lösung I und II behandelt und die Chemilumineszenz mit einer Quantix CCD - Camera (PHOTOMETRICS, KODAK KAF 1401E CHIP) verbunden mit einem Schneider/ Kreuznach Xenon 0.95 / 25 mm Objektiv mit der Lightview32 software (PHOTOMETRICS) aufgenommen.

ECL-Lösung I: 100 mM Tris / HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,5 mM p -Cumarsäure

ECL-Lösung II: 100 mM Tris / HCl pH 8,5; 5,4 mM H₂O₂

2.1.10 RNA-Isolierung aus *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

2.1.10.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit einigen Modifikationen nach der Methode von MENHAJ et al. (1999) isoliert. Die Blätter der sterilen *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Pflanzen wurden 24 h nach der Inokulation mit *P. fluorescens* Bk3 (Kap. 2.1.2.3) geerntet (Kap. 2.1.2.4) und in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert. Aus insgesamt 5 Pflanzen eines Tanks wurden 0,3 g fein gemörsertes Blattmaterial mit 0,75 ml Lysis Puffer und 0,75 ml PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH 4,5) 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend, um die Phasentrennung zu beschleunigen, 20 min mit 14000 x g zentrifugiert. Das Phenol und das Chloroform haben denaturierende Wirkung auf Proteine, welche dann in der Interphase ausfallen und aus dem Extrakt entfernt werden können. Das PCI wird auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt, um auftretende Kontaminationen von DNA zu lösen, so dass ein zusätzlicher Reinigungseffekt auftritt. Der Überstand wurde mit 0,75 ml PCI versetzt, 20 min bei RT geschüttelt und 20 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,75 Vol 8 M LiCl versetzt und über Nacht bei 4°C gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 14000 x g bei 4°C wurde das Pellet in 500 µl kaltem ddH₂O aufgenommen, mit 50 µl 3 M Na - Acetat pH 5,2 und 500 µl 96 % Ethanol (-20°C) versetzt, für 1 h bei -20°C gefällt, 20 min bei 14000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 70 % ETOH (-20°C) gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation von 20 min mit 14000 x g wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst. Die gelösten RNA - Proben wurden bei -70°C gelagert werden.

Lysis-Puffer: 100 mM Tris-Cl pH 8,0; 600 mM NaCl; 20 mM EDTA; 4 % SDS

PCI (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol): 25:24:1 pH 4,5

2.1.10.2 Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt RNA

Photometrisch: Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. (OD_{260} von 1 \approx 40 µg/ml RNA). 2 µl RNA-Probe wurden mit 98 µl ddH₂O gemischt und in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm bei 260 nm gegen ddH₂O gemessen.

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 / 1000 = x \mu\text{g RNA} / \mu\text{l}$$

Die Reinheit der RNA wird anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ermittelt. Ein Wert von 2 zeigt an, dass die isolierte RNA wenig oder gar nicht mit Proteinen verunreinigt ist. Besteht die isolierte RNA aus über 50 % Proteinverunreinigung erhält man Verhältniszahlen $_{260 \text{ nm} / 280 \text{ nm}}$ von 1,5 und niedriger.

Agarosegelelektrophorese: Die Konzentration der gelösten RNA-Proben wurde auf einem denaturierenden RNA-Agarosegel überprüft (Kap. 2.1.10.3) und bei Konzentrationsunterschieden aufgrund von Ungenauigkeiten des Photometers ggf. nachkorrigiert.

2.1.10.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese für RNA

Probenvorbereitung: 1 μl RNA-Probe wurde mit 9 μl Northern-Mix gemischt, kurz anzentrifugiert und im Wasserbad bei 65°C für 15 min inkubiert.

Denaturierendes RNA – Agarosegel 100 ml: 1,5 g Agarose wurden mit 86,5 ml autoklaviertem ddH₂O in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 10 ml 10 x MOPS und 3,4 ml 37 % ige Formaldehyd dazugegeben. Als Gelpuffer in der Laufkammer wurde 1 x MOPS verwendet.

Northern-Mix: 5 ml Lsg. 1 + 1 ml Lsg. 2 + 40 μl Ethidiumbromid (5mg / ml)

Lsg. 1: 1 x MOPS (pH 7, 6), 5 % Formaldehyd, 50 % Formamid

Lsg. 2: 0,25 % BPB, 0,25 % Xylene -Cyanol, 50 % Glycerin, 1mM EDTA pH 8,0

10 x MOPS: 0,2 M MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA. Lösung auf pH 7 einstellen und autoklavieren oder sterilfiltrieren (Lösung wird nach dem Autoklavieren gelb)

2.1.10.4 Detektion von RNA im Agarosegelen

Da im Northern-Mix schon der Farbstoff Ethidiumbromid zum Färben von Nukleinsäuren enthalten ist, konnte die RNA im Gel sofort mit UV -Licht detektiert werden.

2.1.10.5 DNase Behandlung der Gesamt-RNA

1 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer (FERMENTAS), einer 1 U RNase-freier Desoxyribonuclease I, FERMENTAS) und 1 U RNase-Inhibitor (FERMENTAS) gemischt und mit DEPC behandeltem ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA wurde das Reaktionsgemisch zum Stoppen der Enzymreaktion 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Ohne die Zugabe von chelatbildenden Reagenzien würde die RNA beim Erhitzen hydrolisieren.

DEPC – ddH₂O: 0,1 % DEPC bei 37°C über Nacht unter leichtem schütteln inkubieren und danach autoklavieren.

2.1.11 Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus vier verschiedenen behandelten Varianten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Pflanzen isoliert (Kap. 2.1.10.1). Die so erhaltene Gesamt-RNA wurde, wie in Kap. 2.1.10.5 beschrieben, mit DNase behandelt und danach in einer Zweischnitt-RT-Reaktion in cDNA („copy DNA“) umgeschrieben. Ein an das charakteristische PolyA-Ende von eukaryontischer mRNA bindender Poly-dT₂₃-Primer dient dabei als unspezifischer Primer für die reverse Transkriptase. Nach Zugabe von dNTPS erfolgt der erste Schritt der Erststrangsynthese bei 70°C, nämlich die Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA (Tab. 2.1). Nach Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase erfolgt der zweite Schritt (RT-Reaktion) der cDNA - Synthese. Die Erst-Strang cDNA (first-strand cDNA) dient als Matritze für die nachfolgende PCR zur Amplifizierung bestimmter cDNA Fragmente. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man durch die Poly-dT₂₃-Primer nur die mRNA in cDNA umschreibt, was bedeutet, dass man indirekt die mRNA als Ausgangspunkt für die PCR einsetzen kann. Durch die DNase-Behandlung kann die Amplifizierung von genomischer DNA ausgeschlossen werden, so dass man eine Momentaufnahme von den Vorgängen in der Pflanze zu bestimmten Zeitpunkten auf Transkriptebene erstellen kann.

Tab. 2.1: Zusammensetzung für den ersten Schritt der cDNA-Synthese.

Komponente	Volumen/Konzentration
DNTP-Mix	1 μ l (10mM) (Desoxinucleotid – Mix aus ATP, DTP, CTP, GTP; 2,5 mM pro Nucleotid)
Oligo(dt) ₂₃ (Poly-dt-Primer)	1 μ l (10 pmol)
Gesamt-RNA	1 μ g
ddH ₂ O	x μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

Das Gemisch wurde 10 min im Wasserbad bei 70°C denaturiert und danach auf Eis auf 10°C abgekühlt. Durch die Zugabe von 10 μ l des folgenden RT-Mixes leitet man den zweiten Schritt der cDNA -Synthese (RT-Reaktion) ein (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: RT-Mix mit einem Volumen von 10 μ l.

Komponente	Volumen/Konzentration
Puffer 5 x (FERMENTAS)	2 μ l
RNAse Inhibitor (FERMENTAS)	0,5 μ l (1 U)
<i>Moloney Murine Leukemia</i> virus reverse Transkriptase (FERMENTAS)	1 μ l (200 U)
ddH ₂ O	x μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 42°C (Herstellerangabe für das Enzym beachten) inkubiert. 1-2 μ l der so gewonnenen first-strand DNA wurden bei der semiquantitativen RT-PCR und der Real-Time PCR als Template eingesetzt.

2.1.12 Semiquantitative RT-PCR

1 μ l der cDNA (Kap. 2.1.11) von verschiedenen behandelten *M. domestica* Pflanzen wurde mit 1 U *Taq* Polymerase (SIGMA) in Anwesenheit von 200 μ M dNTPs und 1 μ M Primern gegen verschiedenen PR-Proteine (Tab. 2.3) amplifiziert. Die Auswahl der zu amplifizierende PR-Gene erfolgte auf der Grundlage der Ergebnisse über die

Neusynthese von PR-Proteinen im Apoplasten nach der Inokulation des nicht-pathogenen Bakteriums *P. fluorescens* Bk3 auf die Blätter von *M. domestica* (Kap. 3.1.4, Abb. 3.2).

Tab. 2.3: Annealingtemperaturen und Primersequenzen für die RT-PCR.

Primer	Annealingtemperatur	Primersequenz
Thaumatococcus-ähnliches Protein	52°C	fwd(5' atg tcg atg atg aag agc ca 3') rev(5' tta tgg gca gaa agt aat gac g 3')
β-1,3-Glukanase	48°C	fwd(5' tat gca ctt ttc aca gct cc 3') rev(5' caa tgt ttc tca agc tct gg 3')
Chitinase	50°C	fwd(5' atg gct tca aag tcc aca gc 3') rev(5' cta gac atc att ctt gat 3')
Elongationsfaktor1a (endogene Kontrolle)	50°C	fwd(5' caa tgt gag agg tgt ggc aat c 3') rev(5' gga gtg aag cag atg atc tgt g 3')

Die verschiedenen Proben wurden unter folgenden Bedingungen im PCR Cycler (PCR-Express, HYBAID) amplifiziert (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Bedingungen für die semiquantitative RT-PCR.

Vorgang	Zeit und Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3 min bei 94°C	1
Denaturierung	0,5 min bei 94°C	} 35
Annealing	1 min bei x°C, (x = primerspezifisch Tab. 2.3)	
Elongation	1,5 min bei 72°C	
Final Elongation	3 min bei 72°C	1

Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 1 % Agarosegel DNA-Gel überprüft. (Kap. 2.1.13)

2.1.13 Agarosegelelektrophorese für DNA

Die Agarose (SeaKem® LE Agarose, BIOZYM) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Die DNA-Proben wurden mit Loading Buffer 1:1 (v/v) beschwert. Die Trennung der DNA erfolgte je nach Gelgröße bei verschiedenen Spannungen, wobei

bei kleineren Gelen (Größe 10 cm x 37 cm x 1cm) eine Spannung von 80 V für 1 h und bei großen Gelen (17 cm x 25 cm x1 cm) eine Spannung von 120 V für die Dauer von 1,5 h angelegt wurde.

10 x TAE-Puffer: 400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA (mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen)

Loading Buffer 1 ml: 980 µl 15 % Glycerin, 20 µl TAE-Puffer 50x, 2mg Bromphenolblau.

2.1.13.1 Färbung und Detektion der DNA im Agarosegele

Die Färbung der DNA-Agarosegele erfolgte in einem Ethidiumbromidbad für 20 min. und die Detektion der DNA mit UV Licht.

2.1.14 Suppressions Subtraktions Hybridisierung (SSH)

Im Rahmen der Suppressions Subtraktions Hybridisierung von 2 cDNA-Populationen wurden differentiell exprimierte Gene angereichert und charakterisiert. Mit dieser Methode wurden in der vorwärts Subtraktion die hochregulierten Gene in einer mit Antagonisten behandelten Pflanze gegenüber einer Kontrollpflanze erfasst. Die cDNA, welche differentielle Gene enthält, wurde als „Tester“ bezeichnet (mit *P. fluorescens* Bk3 behandelte Pflanze) und die Subtraktor- cDNA als „Driver“ (Kontrolle). In diesem Fall soll die Reaktion der Pflanze auf einen nicht-pathogenen Antagonisten getestet werden.

2.1.14.1 Konstruktion einer Suppressions Subtraktions Hybridisationsbibliothek (SSH)

Die cDNA-Bibliothek wurde mit dem cDNA-Subtraction Kit (CLONTECH) nach den Herstellerangaben hergestellt. Die dafür benötigte cDNA von der „Driver“-Population (Kontrolle) und der „Tester“-Population (24 h nach der Inokulation mit *P. fluorescens* BK3) wurde mit dem SMART cDNA Synthesis Kit (CLONTECH) hergestellt.

2.1.14.2 Klonierung der Fragmente und Transformation von *E. coli*

Die unterschiedlich exprimierten Fragmente wurden nach der Substraktion mit einem pGem T-easy Vector 5Zf (+) (PROMEGA) ligiert.

Tab. 2.5: Ligation des PCR Produkts aus der Substraktion mit dem PGem T- easy Vector 5Zf (+) für die Transformation.

Komponente	Volumen
Ligationspuffer	5 µl
PGem T-easy Vector 5Zf (+)	1 µl
Insert (aus der Substraktion)	3 µl
T4 – DNA - Ligase	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ligationsansatz wurde bei 4 ° C über Nacht inkubiert.

Das Ligationsprodukt wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *E. coli* XL-1 blue (STRATAGENE) transformiert.

Durch eine blau/weiß Selektion (Kap. 2.14.3) wurden die positiven Transformanden selektiert. Insgesamt wurden 157 EST-Klone ausgewählt.

2.1.14.3 Blau - Weiß - Selektion

Manche der zur Klonierung verwendeten Vektoren können für eine Blau-Weiß-Selektion verwendet werden, da bei ihnen die Multiple Cloning Site innerhalb einer LacZ-Region liegt. Bakterienkolonien, bei denen das LacZ-Gen durch die Insertion des DNA-Fragments unterbrochen ist, bleiben nach der Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während solche ohne Insertion Galaktosidase - Aktivität besitzen und sich blau färben.

Je 50 µl IPTG (100mM) und X-Gal (4%) werden auf die Selektionsplatten mit LB-Agar mit dem benötigten Antibiotikum pipettiert und mit einem Glasspatel direkt vor dem Ausplattieren der zu selektierenden Bakterien ausgestrichen. Die blaue Färbung der Kolonien wird bei kurzer Lagerung der Platten im Kühlschrank intensiver.

IPTG: 100mM

X-Gal: 4 %

2.1.14.4 Überprüfung der klonierten Fragmente mittels PCR

Die durch blau/weiß Selektion (Kap. 2.14.3) als erfolgreich transformierten selektierten Plasmide wurden mittels PCR-Cycler (HYBAID) amplifiziert.

Der PCR-Ansatz (25 µl) für die Überprüfung einer Kolonie und die Primersequenzen sind in Tab. 2.6 angegeben, und die Bedingungen für die Amplifizierung kann Tab. 2.7 entnommen werden.

Tab. 2.6: PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Inserts der transformierten Bakterienkolonien.

Komponente	Volumen/Konzentration
dNTP-Mix	0,5 µl (10mM) (Desoxinucleotid – Mix aus ATP, DTP, CTP, GTP; 2,5 mM pro Nucleotid)
10 x Taq - Polymerase Puffer	2,5 µl
Taq Polymerase (Sigma, München)	1 µl (1 U)
Primer T7 forward	2 µl (20 pmol) 5`-gta aaa cga cgg cca g-3`)
M13 reverse Primer	2 µl (20 pmol) 5`-aac agc tat gac cat g-3`)
Transformierte Kolonie von <i>E. coli</i> XL-1 blue	1 Zahnstocherspitze
ddH ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 2.7: Amplifizierung der *Inserts* der transformierten Bakterienkolonien mittels PCR.

Vorgang	Zeit und Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3 min bei 94°C	1
Denaturierung	0,5 min bei 94°C	} 35
Annealing	0,5 min bei 45° C	
Elongation	1 min bei 72°C	
Final Elongation	3 min bei 72°C	1

Die amplifizierten Fragmente wurden auf einem 1,2 % Agarosegel (Kap. 2.1.13) überprüft (Abb. 3.7).

2.1.15 Reverse Northern Blot Analysen

2.1.15.1 Reverse Northern Blot Analyse mit cDNA aus der SSH

Die benötigte ³²P-markierte cDNA des Testers und des Drivers für die Sonde wurde mit dem Smart Kit (CLONTECH) aus der Erst-Strang cDNA (Kap. 2.1.11) die auch für die Supressions Substraktions Hybridisierung eingesetzt wurde, mittels PCR synthetisiert. Der PCR-Ansatz für die Herstellung der Sonden ist in Tab. 2.8 und die Bedingungen für die Amplifizierung mittels PCR in Tab 2.9 dargestellt.

Tab. 2.8: PCR-Ansatz zur radioaktiven Markierung der cDNA.

Komponente	Volumen/Konzentration
Polymerase (SMART cDNA Synthesis Kit; Clontech, Palo Alto, CA, USA)	2 µl
5'PCR Primer II A (SMART cDNA Synthesis Kit (CLONTECH))	2 µl (10 µM)
5'PCR Primer II A (SMART cDNA Synthesis Kit (CLONTECH))	2 µl (10 µM)
Erst-Strang cDNA (Kap. 2.1.11)	2 µl
dNTPs	2µl (10 µM von dATP, dTTP und dGTP und 0,05 µM dCTP)
(α - ³² P) dCTP	5 µl (Aktivität > 3.000 Ci/mol, 10 µC/µl)
ddH ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tab. 2.9: Amplifizierung der radioaktiv markierten Sonden für den Reverse Northern Dot Blot mittels PCR.

Vorgang	Zeit und Temperatur	Zyklen
Denaturierung	1 min / 94°C	1
Denaturierung	15 s / 95°C	} 20
Annealing	30 s / 65°C	
Elongation	6 min / 68°C	

Um störende, überschüssige freie Nukleotide zu entfernen, ist die radioaktiv markierte cDNA über Sephadex G50 Säulen gereinigt worden. Dafür wurde 1 ml Sephadex G50 in TE-Puffer in einem Eppendorf-Gefäß 5 min. bei 4000 x zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 100 µl TNE-Puffer gewaschen. Der radioaktiv markierte cDNA-Ansatz konnte nun 5 min. bei 4000 x g über die Säule von freien Nucleotiden gereinigt werden. Die so gereinigte radioaktiv markierte Sonde wurde danach für die Hybridisierung mit den in der SSH gefundenen unterschiedlich exprimierten Fragmenten, die zuvor auf eine Nylonmembran geblottet wurden, eingesetzt. Zum Blotten auf die Nylonmembran wurde jeweils 1 µl der differentiell exprimierten und in *E. coli* amplifizierten cDNA Fragmente (Kap. 2.1.14.4) auf zwei Nylonmembranen transferiert (Dot Blot Gibco-System) und 5 min

mit UV-Licht fixiert (SAMBROOK et al. 1989). Anschließend wurden die Nylonmembranen 2 h mit Prähybridisierungspuffer bei 60°C vorinkubiert, um unspezifische Bindungstellen abzudecken. Der Hybridisierungspuffer, welcher die radioaktiv markierte Sonde enthält, wird zusammen mit der Membran bei 60°C über Nacht inkubiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Membranen zwei mal 15 min bei Raumtemperatur mit 2 x SSC, 0,2 % SDS und zwei mal 15 min bei 60°C mit 1 x SSC, 0,2 % SDS gewaschen. Die Hybridisierung wurde mit einer Phosphorimager-Platte (RAYTEST Isotopenmeßgeräte) detektiert (Abb. 3.8) und mit dem Programm TINA Software Version 2.0 (RAYTEST) quantifiziert. Die nur mit der markierten Tester cDNA hybridisierten Fragmente oder die Fragmente, die auf dieser Membran ein höheres Signal aussandten als auf der Driver – Membran, wurden zum Sequenzieren geschickt (Kap. 2.1.16).

Prähybridisierungspuffer: 20 x Denhardt; 5 x SSPE, 0,2 % SDS, 0,2 mg / ml Heringssperm)

100 x Denhardt: 2 % PVP 10, 2 % BSA (steril filtrieren), 2 % Ficoll 400

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0

20 x SSPE: 3,6 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7,4

Hybridisierungspuffer: Prähybridisierungspuffer + radioaktiv markierte Sonde

TNE-Puffer: 10 mM Tris-Cl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA

2.1.15.2 Reverse Northern Dot Blot Analyse mit cDNA aus neu inokuliertem Pflanzenmaterial

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA (Kap. 2.1.10) und der DNase-Behandlung (Kap. 2.1.10.5) wurde die cDNA wie in Kap. 2.1.11 beschrieben hergestellt. Die Nylonmembranen wurden, wie unter 2.1.15.1 beschrieben, vorbereitet und hybridisiert. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem DecaLabel[™] DNA Labeling Kit (FERMENTAS) nach den Herstellerangaben.

Lösungen: siehe Kap. 2.1.15.1

2.1.16 Sequenzierung und Charakterisierung der Fragmente aus der SSH

Die EST-Klone wurden mit dem M13 forward Primer von INNOVATION TECHNOLOGY TRANSFER (Universität Bielefeld, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit bestehenden Daten aus der NCBI-Datenbank über die BLAST-Algorithmen (BlastN und BlastX verglichen (Tab. 3.2).

2.1.17 Real time PCR (qPCR)

Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf der Markierung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Für diese Methode verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, welcher die Eigenschaft hat, unspezifisch in Doppelstrang - DNA zu interkalieren. Dies führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Ausgangsmaterial für den Vergleich verschieden stark exprimierter Gene zwischen einer Kontrollpflanze und einer mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanze war die Gesamt-RNA aus den Blättern von *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox Pflanzen (Kap. 2.1.10). Die differentiell exprimierten Gene zwischen einer Kontrolle und einer mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanze aus der SSH-Analyse (Tab 3.2) und die differentiell synthetisierten Proteine aus der Apoplastenflüssigkeit (Kap. 3.1.4) dienten als Ausgangspunkt für die Auswahl der zu analysierende Gene.

Die Expression elf ausgewählter Gene (Tab. 2.12) wurde mittels Real-Time-PCR in einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (APPLIED BIOSYSTEMS) in einer two-step Reaktion mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) analysiert. Die cDNA wurde wie in Kap. 2.1.11 beschrieben aus DNase-behandelter Gesamt-RNA hergestellt (Kap. 2.1.10.1 und 2.1.10.5).

Das in den Herstellerangaben vorgegebene Probenvolumen wurde von 50 µl auf 25 µl reduziert, sodass sich das Reaktionsgemisch aus folgenden Komponenten zusammensetzte (Tab. 2.10).

Tab. 2.10: Reaktionsgemisch für die Real-Time PCR.

Komponente	Volumen/Konzentration
Primer forward	1 µl (10 pmol) siehe Tab.2.12
Primer reverse	1 µl (10 pmol) siehe Tab.2.12
2 x QuantiTect SYBR Green PCR - Master - Mix	12,5 µl
cDNA	1µl (30 ng)
ddH ₂ O	9 µl
Gesamtvolumen	25 µl

2 x QuantiTect SYBR Green PCR – Master – Mix: HotStar® DNA-Polymerase, Puffer, dNTP-Mix mit dUTP, SYBR Green I, ROX und 5mM MgCl₂ Mix

Tab. 2.11: Bedingungen für die Real-Time PCR.

Vorgang	Zeit und Temperatur	Zyklen
PCR Aktivierungsschritt für die HotStar® DNA Polymerase	15 min / 95 ° C	1
Denaturierung	15 s / 94 ° C	} 35
Annealing	30 s / 50 ° C	
Elongation	30 s / 72 ° C	

Tab. 2.12: Primersequenzen für die Real time PCR.

Primer	Annealing- temperatur	Größe des PCR – Fragments	Primersequenz (20 Basen)
Proteasome Subunit Alpha Type 4	50°C	324 bp	fwd (5'-gac att ata cca gcc act gc-3') rev (5'-gga tac aag aac aca cct gc-3')
Avr9/Cf - 9 rapidly elicited Protein 284	50°C	178 bp	fwd (5'-aag aca gca cga caa tca cc-3') rev (5'-tag atg aag ttg cga gga gg-3')
Ribonuclease- ähnliches Protein PR10b	50°C	280 bps	fwd (5'-cct gct agg ttg ttc aat gc-3') rev (5'-ctc ttg atg aca gaa ccg ct-3')
Heat Shock Protein 90	50°C	207 bp	fwd (5'-gat tcg aga gct tga c tg ac-3') rev (5'-taa cat cag cac cag cag ac-3')
Transmembrane CLPTM1 family	50°C	159 bps	fwd (5'-ggc agg tac ttc gct tcc aa-3') rev (5'-aag ttc acg ttc act gcc ga-3')
Glutathion-S - transferase	50°C	478 bps,	fwd (5'-cag gta caa ggc gag tga tt-3') rev (5'-gga atg tgg tga aga tca gc-3')
β-Actin	50°C	238 bps	fwd (5'-tgg tga ggc tct att cca ac-3') rev (5'-tgg cat ata ctc tgg agg ct-3')
Germin-ähnliches protein	50°C	262 bps,	fwd (5'-tcc tcc tct cct cct cca at-3') rev (5'-atg act cca cca aca gcc ag-3')
β -1,3-Glukanase	50°C	320 bps,	fwd (5'-tat gca ctt ttc aca gct cc-3') rev (5'-caa tgt ttc tca agc tct gg-3')
Thaumatococcus-ähnliches protein	50°C	780 bps	fwd (5'-atg tcg atg atg aag agc ca-3') rev (5'-tta tgg gca gaa agt aat gac g- 3')
Endochitinase class III	50°C	650 bps	fwd (5'-atg gct tca aag tcc aca gc-3') rev (5'-cta gac atc att ctt gat-3')
ADP-Ribosylations Faktor	50°C	280 bps	fwd (5'-gag tgg agg cca agc tta tc-3') rev (5'-aga aca tca gct tca ccg tc-3')

Zur Überprüfung von Pipettierfehlern wurde von jedem Ansatz eine Wiederholung mitamplifiziert. Zur Berechnung der relativen Fluoreszenz diente der Mittelwert der beiden Ansätze.

Formel zur Berechnung der relativen Fluoreszenz nach der $\delta - \delta - Ct$ – Methode (PFAFFL 2001):

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Behandlung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

Der Rel. Expressionsunterschied zwischen einer Behandelten Probe und einer Kontrolle (Ratio) normalisiert zum Referenzgen berechnet sich wie folgt :

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

2.2 Freilandversuch

2.2.1 Der Epiphyt *Pseudomonas fluorescens* Bk3

2.2.1.1 Herkunft des epiphytischen Bakteriums

siehe Kap. 2.1.1.1

2.2.1.2 Anzucht von *Pseudomonas fluorescens* Bk3 für *in vivo* Versuche

Das epiphytische Bakterium wurde aus Dauerkulturen (Schrägröhrchen) mit einer Impföse entnommen und in Reagenzgläser mit 10 ml LB-Medium (DUCHEFA GMBH) überführt und über Nacht bei 27°C mit 150 U/min geschüttelt. 5 ml der Übernachtskultur wurden in einen 2 l Schikanekolben mit 500 ml LB -Medium überführt und wiederum über Nacht bei 27°C mit 100 U/min geschüttelt. Nach der Abzentrifugation des LB-Mediums (15 min bei 5000 x g) wurde das Bakterienpellet mit Leitungswasser aufgefüllt und die Konzentration mit der Thoma-Kammer wie unter 2.1.1.3 beschrieben bestimmt. Die Bakteriensuspension wurde bis zur gewünschten Konzentration von 2×10^9 Zellen/ml mit Leitungswasser verdünnt und danach im Freiland auf die Versuchspflanzen gebracht.

LB- Medium: 20g /l mit einem pH-Wert 7,2

2.2.2 *Venturia inaequalis*

2.2.2.1 Herkunft des *Venturia inaequalis* Isolates

Das für diese Arbeit verwendete Isolat V15 von *V. inaequalis* wurde von Dr. Katja Schulze (Institut für Gemüse- und Obstbau der Universität Hannover) aus Schorf läsionen einer *Malus domestica* cv. Elstar Pflanze gewonnen (SCHULZE 2005) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.2.2 Herstellung neuer Myzelplatten

Aus einer ca. 4 Wochen alten Myzelium-Platte wurden mit einem Korkbohrer (\varnothing 0,5 cm) vier Myzelium-Plaques ausgestochen und auf eine Petrischale ohne Cellophanmembran mit potato-dextrose-agar (PDA, DUCHEFA GMBH) gelegt, die Schalen mit Parafilm verschlossen und in einer Klimakammer bei 20 ° C und einem hell/dunkel Rhythmus von 12 Stunden kultiviert. Nach 4 Wochen konnten aus dem gewachsenen Myzel Konidien wie in 2.2.2.3 beschrieben kultiviert werden. Die Herstellung neuer Myzeliumplatten sollte ca. alle 6-8 Wochen erfolgen.

PDA: 39 g / l, pH 5,6

2.2.2.3 Konidiengewinnung aus Myzel von *V. inaequalis*

Die Konidien wurden nach einer Methode von PARKER et al. (1995) gewonnen. Zunächst wurden Cellophanmembranen (PÜTZ GMBH) mit einem Durchmesser von 8 cm über Nacht in ddH₂O eingeweicht und danach autoklaviert. Die autoklavierten Membranen wurden mit einer Pinzette mittig auf Petrischalen mit PDA (DUCHEFA GMBH) gelegt. Aus ca. 4 - 6 Wochen alten Myzelplatten (2.2.2.2) wurden mit einem Korkbohrer (\varnothing 1 cm) 4 Myzeliumplaques entnommen und in einem Sarstedtröhrchen (50ml) in 20 ml sterilem ddH₂O mit einem Ultra-Turrax T25 (JANKE & KUNKEL GMBH) 1 min lang zerkleinert. Mit einer 1000 μ l Pipette mit abgeschnittener Spitze wurden 750 μ l der Myzelsuspension auf die PDA - Platten mit Cellophanmembran pipettiert und die Schalen mit Parafilm verschlossen, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Die Kultivierung der Konidien erfolgte in einer Klimakammer bei 20 ° C und einem hell / dunkel Rhythmus von 12 Stunden. Nach ca. 5 - 7 Tagen konnten die bis dahin ungekeimten Konidien geerntet werden (2.2.2.4).

PDA: 39 g / l, pH-Wert 5,6

2.2.2.4 Ernte ungekeimter Konidien

Die Cellophanmembran einer 5-7 Tage alten Konidienplatte wurde mit einer Pinzette in ein Sarstedtröhrchen (50ml) mit 20 ml sterilem ddH₂O überführt und 5 min mit der Hand

sehr kräftig geschüttelt, um die Konidien von der Cellophanmembran abzulösen. Die großen Myzelstücke wurden durch einen Miracloth Gazefilter mit einer Mindestporengröße von 75 µm und einer maximalen Porengröße von 125 µm abfiltriert. Von den gewonnenen Konidien wurde die Konzentration wie in Kap. 2.2.2.5 beschrieben und die Keimungsrate, wie in Kap. 2.2.2.6 beschrieben, bestimmt.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung und Anfärbung von *V. inaequalis*

Die Konzentrationsbestimmung der Konidien erfolgte nach der Färbung mit Fluoresceindiacetat am Fluoreszenzmikroskop (ZEISS GMBH). Der Farbstoff Fluoresceindiacetat dient zur Vitalfärbung von Pilzzellen (Drawert 1960). Fluoresceindiacetat wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und im Zellinneren in Fluorescein und Essigsäure gespalten. Unter Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich zwischen 450-490 nm (Blauanregung) erscheinen lebende Zellen grün. Dazu wurden vier Tropfen (10 µl/Tropfen) der Konidien suspension auf einen Objektträger gegeben und mit 5 µl Fluoresceindiacetatlösung (FDA) gemischt, die gefärbten Konidien mit blauem Licht (450-490 nm) angeregt (Abb. 2.4), ausgezählt und die Konzentration pro µl berechnet.

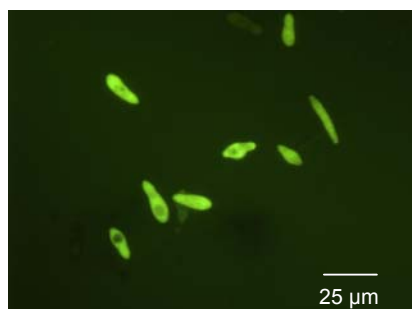


Abb. 2.4: Ungekeimte Konidien von *V. inaequalis*, angefärbt mit Fluoresceindiacetat. Lebende Zellen erscheinen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 450 nm-490 nm (Blauanregung) grün. Vergrößerung: 40 x.

Fluoresceindiacetatlösung (FDA): 10 µl FDA-Stammlösung + 300 µl 130 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4)

FDA - Stammlösung: 5 mg FDA, 1ml Aceton, kühl und dunkel lagern

2.2.2.6 Bestimmung der Keimungsrate von *V. inaequalis*

Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden 4 Tropfen Konidiensuspension mit einem Volumen von 5 µl pro Tropfen auf einen Objektträger mit 2 %igem Wasseragar pipettiert, der Objektträger in einer Petrischale neben ein nasses Filterpapier gelegt und die Schalen mit Parafilm geschlossen, um eine hohe Feuchtigkeit zu gewährleisten. Die Schalen wurden 24 h bei 19°C und einem hell / dunkel Rhythmus von 12 h inkubiert.

Nach 24 h wurden die Konidien, wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, angefärbt (Abb. 2.5) und die gekeimten und ungekeimten Konidien in Relation zueinander gesetzt, wobei die Konidien als gekeimt bewertet wurden, bei denen ein Keimschlauch sichtbar war. Die Angabe der Keimungsrate erfolgte in %.

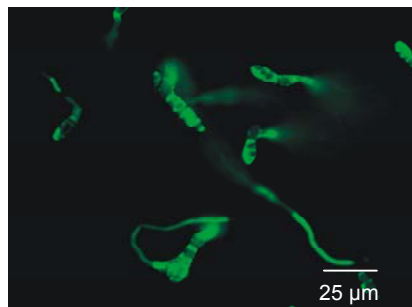


Abb. 2.5 : Gekeimte Konidien von *V. inaequalis*, angefärbt mit Fluoresceindiacetat. Lebende Zellen erscheinen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 450nm-490nm (Blauanregung) grün. Vergrößerung: 40 x.

2.2.3 Aufbau der Versuchsanlage im Freiland

Die Versuchsanlage setzte sich zusammen aus insgesamt 90 Apfelbäumen (*Malus x domestica*) mit 60 Apfelbäumen der Sorte Holsteiner Cox und 30 Apfelbäumen der Sorte Elstar.

Die Bäume wurden jeweils in Fünfergruppen gepflanzt und durch geeignete Trennpflanzen (*Cannabis sativa*; Sorte: Epsilon 68) parzelliert, so dass man den Einfluss von außen auf die dicht nebeneinander stehenden, verschieden behandelten Pflanzen als gering einstufen kann (Abb. 2.6).

Die einzelnen Bäume wurden wie unter 2.1.2.1 und 2.1.2.2 beschrieben aus sterilem, genetisch identischem Pflanzenmaterial in der Klimakammer bewurzelt und nach ca. 4 Wochen Bewurzelungszeit im Gewächshaus an die Umwelt adaptiert und in Töpfen vorgezogen. Die Pflanzen waren bei der Pflanzung ins Freiland im Mai 2003 zwischen 1 und 3 Jahre alt und ca. 40-50 cm groß. Die Bäume wurden, wie in Tab 2.13 beschrieben, behandelt.

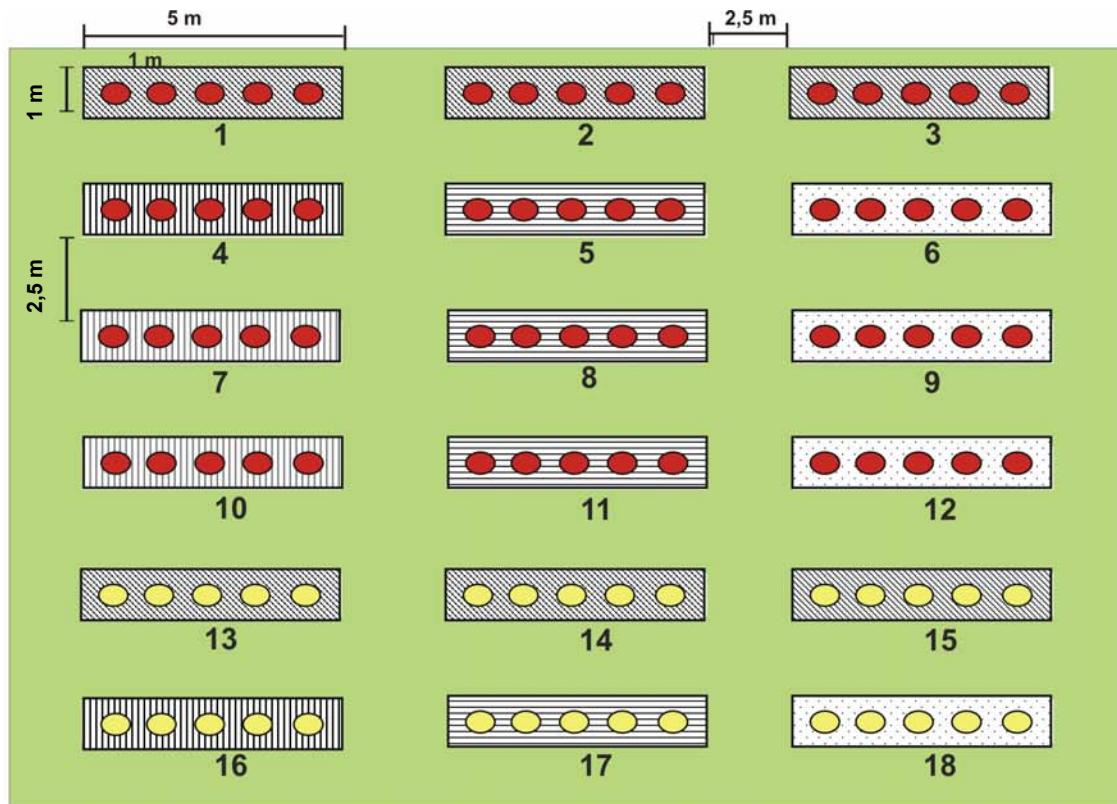


Abb. 2.6: Eine Parzelle der Versuchsanlage mit *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Apfelbäumen zur Überprüfung der Wirksamkeit von Antagonisten gegen Apfelschorf im Freiland ca. 1 ½ Jahre nach der Auspflanzung der Bäume.

Tab. 2.13: Verschiedene Behandlungen von *M. domestica* im Freilandversuch in den Jahren 2003 und 2004.

Parzellennummer	Anzahl Bäume	Sorte	Art der Behandlung
1	5	Holsteiner Cox	Unbehandelte Kontrolle
2	15	Holsteiner Cox	Künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i>
3	15	Holsteiner Cox	Applikation des Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3
4,7,10	15	Holsteiner Cox	Präventive Behandlung mit dem Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 24 h vor der künstlichen Infektion mit <i>V. inaequalis</i>
5,8,11	15	Holsteiner Cox	Applikation des Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 und künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i> zum gleichen Zeitpunkt
6,9,12	15	Holsteiner Cox	Kurative Behandlung mit dem Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 24 h nach der künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i>
13	5	Elstar	Unbehandelte Kontrolle
14	5	Elstar	Künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i>
15	5	Elstar	Applikation des Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3
16	5	Elstar	Präventive Behandlung mit dem Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 24 h vor der künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i>
17	5	Elstar	Applikation des Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 und künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i> zum gleichen Zeitpunkt
18	5	Elstar	Kurative Behandlung mit dem Antagonisten <i>P. fluorescens</i> Bk3 24 h nach der künstliche Infektion mit <i>V. inaequalis</i>

Die Anordnung der Pflanzen in der Versuchsanlage im Freiland ist Abb. 2.7 zu entnehmen.



Legende zur Konzeption der Versuchsanlage im Freiland

- Parzelle 1: unbehandelte Kontrolle
- Parzelle 2: *P. fluorescens* Bk3
- Parzelle 3: *V. inaequalis*
- Parzelle 4: *P. fluorescens* Bk3 (präventiv)
- Parzelle 5: *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* (gleichzeitig)
- Parzelle 6: *P. fluorescens* Bk3 (kurativ)
- Parzelle 7: *P. fluorescens* Bk3 (präventiv)
- Parzelle 8: *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig
- Parzelle 9: *P. fluorescens* Bk3 (kurativ)
- Parzelle 10: *P. fluorescens* Bk3 (präventiv)
- Parzelle 11: *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* (gleichzeitig)
- Parzelle 12: *P. fluorescens* Bk3 (kurativ)
- Parzelle 13: unbehandelte Kontrolle
- Parzelle 14: *P. fluorescens* Bk3
- Parzelle 15: *V. inaequalis*
- Parzelle 16: *P. fluorescens* Bk3 (präventiv)
- Parzelle 17: *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* (gleichzeitig)
- Parzelle 18: *P. fluorescens* Bk3 (kurativ)

● *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox (Parzelle 1 – 12)

● *Malus domestica* cv. Elstar (Parzelle 13 - 18)

▨ Kontrollen

▨ *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig

▨ *P. fluorescens* Bk3 (präventiv)

▨ *P. fluorescens* Bk3 (kurativ)

Abb. 2.7: Konzeption der Versuchsanlage im Freiland auf dem Gelände der Universität Hannover in der Herrenhäuserstr. 2, auf dem Gelände des Instituts für Botanik.

2.2.4 Behandlung der Freilandpflanzen mit Konidien und Antagonisten

Die Anzucht der Konidien erfolgte wie unter 2.1.3 beschrieben. Die Anzucht der Antagonisten erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Die Applikation der Mikroorganismen erfolgte mit einem Drucksprüngerät der Marke Gloria (1l) (GLORIA WERKE) auf die Blattober- und -unterseite der Pflanzen. Die Pflanzen wurden mit 2×10^9 Antagonisten/ml bzw. 1×10^4 Konidien/ml inokuliert, sodass die gesamte Blattober- und -unterseite mit der Bakteriensuspension bzw. der Konidien suspension benetzt war. Die Keimungsrate der Konidien auf 2 % -igem Wasseragar (2.2.2.6) lag in allen Fällen zwischen 90 % - 96 %. Die Apfelbäume wurden präventiv (24-48 h), simultan und kurativ (24-48 h) zur Infektion mit *V. inaequalis* mit dem Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 behandelt (Tab. 2.13). Die Behandlungstermine wurden witterungsbedingt festgelegt (KOLLAR 2003).

2.2.5 Bonitierung

Bei der Bonitierung wurden die mit Apfelschorf befallenen und die unbefallenen Blätter einer Versuchspflanze ins Verhältnis gesetzt und so der Grad der Infektion in % ermittelt. Um sicherzustellen, dass es sich bei den bonitierten Symptomen um Apfelschorf handelte wurden die befallenen Blätter stichprobenartig am Binokular (ZEISS GMBH) überprüft. Ein Blatt wurde als befallen bewertet, sobald es sichtbare Symptome aufwies. Im Jahre 2003 konnten noch alle Blätter eines Baumes bonitiert werden. Im Jahre 2004 wurde aufgrund des starken Wachstums der Holsteiner Cox Bäume, nur ein repräsentativer Trieb ausgezählt und bonitiert. Der Wirkungsgrad des Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 gegen den Apfelschorfbefall wurde nach der Formel von Abbott (EPPO-RICHTLINIE 1/232 (1) 2005) berechnet.

Formel nach Abbott zur Berechnung des Wirkungsgrades:

$WG = \frac{(x - y)}{x} * 100$	<p>WG = Wirkungsgrad x = Befallsstärke y = Befallsreduktion</p>
--------------------------------	---

2.2.6 Statistische Auswertung der Bonituren im Freiland

Die statistische Auswertung in Bezug auf signifikante Unterschiede innerhalb der verschiedenen Versuchsvarianten erfolgte mit der Statistiksoftware SAS Release 8 (SAS INSTITUTE) mithilfe des Tukey - Tests ($p < 0,05$). Die Parzellen 10, 11 und 12 wurden nicht in die Statistik miteinbezogen, da eine Konidienkonzentration von 10^5 Konidien/ml bei diesen Bäumen nicht an jedem Inokulationstermin gegeben war.

2.2.7 Erfassung von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit im Freilandversuch

Die Temperatur und die rel. Luftfeuchtigkeit während des Freilandversuches wurden mit einem Datenlogger (TESTOR 175 TESTO GMBH & CO) automatisch in Einstundenintervallen erfasst.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung zwischen Antagonist und Wirtspflanze

3.1.1 Blattabdrücke der *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Für die Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung zwischen dem Antagonisten und der Wirtspflanze wurden sterile, genetisch identische *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox eingesetzt, um die Beeinflussung durch biotische Faktoren wie z.B. Pathogene oder andere Mikroorganismen, die normalerweise die Phyllosphäre besiedeln, auszuschließen. Die Abdrücke einer sterilen *in vitro* Kultur von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox auf LB-Agarplatten ergaben, dass die Phyllosphäre der *in vitro* Kulturen im Gegensatz zu Gewächshauspflanzen nicht von Mikroorganismen besiedelt waren (Abb. 3.1)



Abdruck von der Blattober- und -unterseite steriler *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox.

Abdruck der Blattoberseite von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (Gewächshauspflanzen).

Abdruck der Blattunterseite von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (Gewächshauspflanzen).

Abb. 3.1: Blattabdrücke steriler *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox auf LB-Agar im Vergleich zu Blattabdrücken von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Gewächshauspflanzen.

3.1.2 Reisolation von *P. fluorescens* Bk3 aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kulturen

Um sicherzustellen, dass *P. fluorescens* Bk3 sich auf der Blattoberfläche der *M. domestica in vitro* Pflanzen etablieren konnte, wurde der Mikroorganismus sofort und 24 h nach der Applikation von der Blattoberfläche durch Schüttelsuspensionen von der Blattoberfläche reisoliert (Kap. 2.1.4).

Wie schon von GAU et al. (2002) mit *P. fluorescens* Bk3 Tn::gfp_{lux} gezeigt wurde, sind diese in der Lage, sich über einen längeren Zeitraum auf der Blattoberfläche von *M. domestica* zu etablieren und auf der gesamten Pflanze zu verteilen. Nach 24 h Inkubation bei 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von nahezu 100 % konnte *P. fluorescens* Bk3 mit 2×10^{10} Cfu/g Blattmaterial in einer höheren Konzentration von der Blattoberfläche reisoliert werden, als aus der sofort nach der Applikation hergestellten Schüttelsuspension von der 1×10^9 Cfu/g Blattmaterial reisoliert werden konnten. *P. fluorescens* Bk3 ist also in der Lage, sich in der Phyllosphäre der sterilen *in vitro* Kulturen zu vermehren.

3.1.3 Analyse der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kulturen

In der Dreiecksbeziehung Pathogen/Mikroorganismus/Wirtspflanze können die Antagonisten einerseits direkt gegen das Pathogen wirken (FISS 2001) aber auch die pflanzeneigene Abwehr aktivieren, wie es z.B. für *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in der Rhizosphäre an Tabakpflanzen von MAURHOFER et al. (1994) gezeigt wurde. Die Reaktion der Pflanze auf biotischen und abiotischen Stress besteht in der Synthetisierung von Abwehrproteinen (*pathogenesis related proteins*, PR-Proteine), die nach GAU et al. (2004a) nach der Infektion mit dem Pathogen *V. inaequalis* im Apoplasten der apfelschorfsuszeptiblen Pflanze *M. domestica* cv. Elstar nachgewiesen wurden. An die Zellwand angrenzend, im apoplastidären Raum, befindet sich die Apoplastenflüssigkeit, in der gelöste Proteine vorliegen. Die Proteinzusammensetzung kann sich durch verschiedene äußere Faktoren wie UV-Licht, Verwundung, aber auch durch Pathogene verändern (HOSON 1998, REP et al. 2002, GAU et al. 2004a). Aus Untersuchungen von GAU et al. (2004a) ist bekannt, dass PR-Proteine wie z.B. Thaumatin-ähnliches Protein, β -1,3-Glukanase, PR-1 Protein, putative Cystein Protease und Osmotin-ähnliches Protein in dem apfelschorfresistenten Kultivar Remo konstitutiv exprimiert werden, was vermuten lässt,

dass die ständige Anwesenheit der PR-Proteine zu der Resistenz gegenüber *V. inaequalis* in dem cv. Remo beiträgt. Durch äußere Faktoren können PR-Proteine im Zuge der systemic acquired resistance (SAR) induziert werden. Eine Eigenschaft der PR-Proteine ist, dass sie extrazellulär vorkommen, also liegt es nahe, dass sich die Zusammensetzung der Apoplastenflüssigkeit bei Abwehrreaktionen verändert und sie dort nachgewiesen werden können. In diesem Experiment soll untersucht werden, ob die Applikation des nicht pathogenen Bakteriums *P. fluorescens* Bk3 einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung des Apoplasten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox hat.

3.1.4 Veränderung in der Proteinzusammensetzung im Apoplasten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3

Nach der Applikation von 2×10^9 Zellen des nicht pathogenen Bakteriums *P. fluorescens* Bk3 auf die Blätter von fünf im selben Tank befindlichen *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Pflanzen kann man eine Veränderung der Proteinzusammensetzung des Apoplasten beobachten, was mittels einer SDS-PAGE (Abb. 3.2) mit anschließender Sequenzierung (Tab. 3.1) und eines Immunoblots mit Antikörpern gegen ausgewählte Proteine nachgewiesen wurde (Abb. 3.3). Dafür wurden die Proteine der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox vor und nach der Inokulation des nicht pathogenen Bakterium *P. fluorescens* Bk3 mit der modifizierten Infiltrationsmethode von HOGUE & ASSELIN 1987 gewonnen (Kap. 2.1.5) und mittels einer SDS-PAGE verglichen. Die Inokulation und Ernte der sterilen genetisch identischen *in vitro* Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox erfolgte, wie in Kap. 2.1.2.3 und Kap. 2.1.2.4 beschrieben. Nach der Inokulation des nicht-pathogenen Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 wurde nach 1d, 2d und 5d die Apoplastenflüssigkeit aus den Blättern isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer Tris-Tricin Gelelektrophorese (Kap. 2.1.7). Die aufgetrennten Proteine wurden mit einer Coomassie-kolloidal Färbung (Kap. 2.1.7.3) gefärbt. Die Analyse der Proteinzusammensetzung auf dem Gel zeigte im Vergleich zur Kontrolle nach 1d, 2d und 5d eine deutliche Veränderung in einem Bereich der molekularen Massen zwischen 9 und 45 kDa (Abb. 3.2).

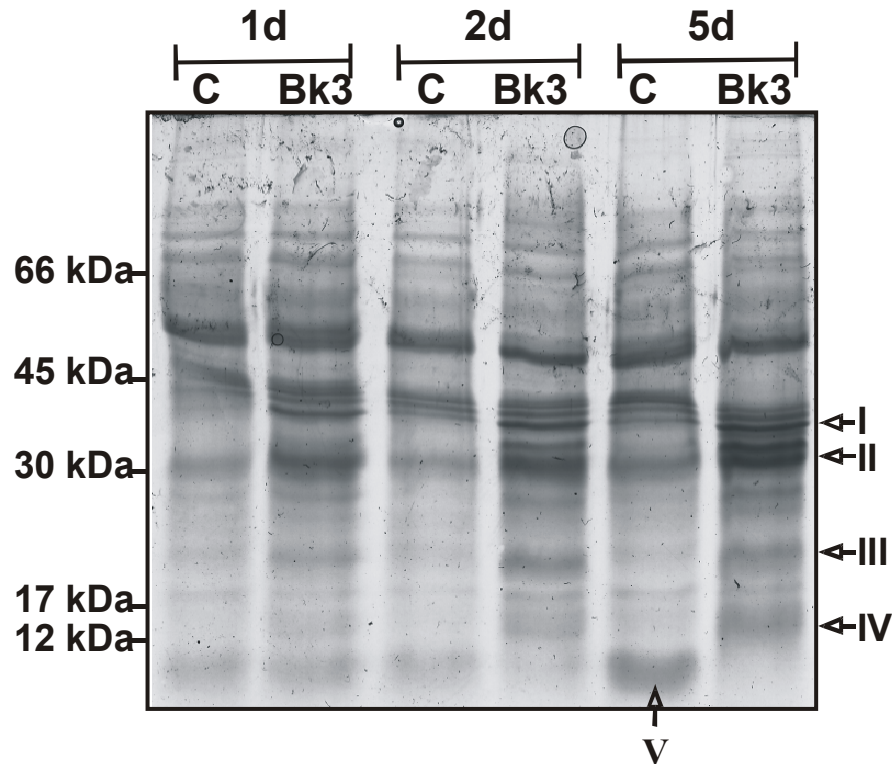


Abb. 3.2: SDS-PAGE mit Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox von Kontrollpflanzen (C) und von Pflanzen nach der Inokulation von dem nicht pathogenen Bakterium *P. fluorescens* Bk3. Die Proteinkonzentration beträgt 15 µg pro Spur. Die mit I, II, III, IV und V gekennzeichneten Banden wurden mit ESI Q-ToF Massenspektrometrie identifiziert.

Die zusätzlich auftretenden Banden (I, II, III, IV) und die abnehmende Bande (V) traten im Bereich von 9-45 kDa auf und wurden aus dem Gel herausgeschnitten, mit Trypsin gespalten, mittels Q-ToF Massenspektrometrie identifiziert und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mit dem Programm PeptideSearch (EMBL) mit vorhandenen Daten verglichen. Die Ergebnisse der Homologiesuche sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Bande I konnte als β -1,3-Glukanase, Bande II als Thaumatin-ähnliches Protein oder als eine Endochitinase, Bande III als Ribonuclease-ähnliches Protein PR-10b, Bande IV als Hevein-ähnliches Protein PR-4b und Bande V als nichtspezifisches Lipid Transfer Protein (nsLTP) identifiziert werden. Die hoch- bzw. herunterregulierten Proteine gehören alle zur Klasse der PR-Proteine.

Tab. 3. 1: ESI Q-ToF Massenspektrometrie von Peptidfragmenten und Identifikation durch Homologiesuche in Datenbanken.* oxidierte Aminosäurereste, Großbuchstaben bedeuten eine hohe Zuverlässigkeit in der Bestimmung der abgeleiteten Aminosäure, Kleinbuchstaben bedeuten, dass die zu bestimmende Sequenz die größte Ähnlichkeit zu dieser Aminosäure hat.

Bande	Rel.Masse [Da]	La-dung	Masse [Da]	abgeleitete Aminosäuresequenz	Sequenzähnlichkeit [Position Sequenz Position]	mögliche Funktion	Organismus	Accession nummer
I	439,6	3+	1315,8	TYNSN(I/L)(I/L)QHVK	1 TYNSNLIQHVK 13 TYNSNLIQHVK 65 TYNSNLIQHVK 75	β-1,3-Glukanase	<i>Malus domestica</i>	Q8RVM2 ^b
I	759,5	2+	1516,9	(I/L)YEPNEAT(I/L)QA(I/L)R	2 LYEPNEATLQAILR 16 LY+PN A LQALR 1 LYDPNQAALQALR 13	β-1,3-Glukanase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Q9S9H7 ^b
II	722,7	2+	1443,5	AS(Q/K)SVDAPSPWGR	1 ASKSVDAPSPWGR 15 AS SVDAPSPWGR 62 ASRSVDAPSPWGR 75	Thaumat-in-ähnliches Protein	<i>Malus domestica</i>	JC7201 ^c
II	548,2	2+	1094,4	YGGVM(I/L)WNR	1 YGGVMLLWNR 10 YGGVMLWNR 273 YGGVMLWNR 281	Basische Endochitinase	<i>Nicotiana tabacum</i>	P29061 ^a
II	534,7	2+	1067,4	YGGVM(I/L)WSR	1 YGGVMLWSR 10 YGGVMLWSR 192 YGGVMLWSR 200	Endochitinase Klasse III	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Q9LUX6 ^b
II	509,7	2+	1017,4	SGF(I/L)PAD((AL)/(VS))K	1 SGFIPADALVS 12 SGFIPADAL S 249 SGFIPADALTS 259	saure Endochitinase	<i>Beta vulgaris</i>	P36910 ^a
III	827,3	2+	1652,5	YSV(I/L)EGDA(I/L)SET(I/L)EK	1 YSVIEGDAISETIEK 18 YSVIEGDAISETIEK 84 YSVIEGDAISETIEK 98	Ribonuclease-ähnlich-es PR-10b	<i>Malus domestica</i>	Q941P8 ^b
III	641,7	2+	1281,4	GDVE(I/L)(K/Q)EEHVK	1 GDVEILQEEHVK 13 GDVEIKEEHVK 124 GDVEIKEEHVK 134	Ribonuclease-ähnlich-es Protein PR-10b	<i>Malus domestica</i>	Q941P8 ^b
IV	738,7	2+	1475,5	AVSAYc*ATWDADK	1 AVSAYCATWDADK 14 AVSAYCATWDADK 51 AVSAYCATWDADK 63	Hevein -ähnliches Protein PR-4b	<i>Oryza sativa</i>	AAR0834 ^b
V	925,9	2+	1849,7	(n(i/l))AGS(I/L)SGVNPNNAAAG(I/L)PGK	3 LAGSISGVNPNNAAGLPGK 23 L GSISGVNPNNAAG LPGK 54 LSGSISGVNPNNAAGLPGK 72	Nichtspezifisches Lipid Transfer Protein	<i>Malus domestica</i>	Q9M5X7 ^a
V	598,2	2+	1194,4	(I/L)STSTNC*ATVK	3 STSTNCATVK 13 STSTNCATVK 106 STSTNCATVK 115	Nichtspezifisches Lipid Transfer Protein	<i>Malus domestica</i>	Q9M5X7 ^a

^a Swiss prot accession number, ^b Embl accession number, ^c Pironly accession number.

3.1.5 Western Blot

Mittels der vorangegangenen Tris-Tricin Gelelektrophorese (Abb. 3.2) konnten aus der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* Holsteiner Cox nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 mehrere zusätzlich synthetisierte Proteine identifiziert werden (Tab. 3.1). Mit Antikörpern gegen drei der so identifizierten Proteine konnte mit einem Western Blot (Immunoblot) die Neusynthese von Thaumatin-ähnlichem Protein, β -1,3-Glukanase und Chitinase in den mit den Antagonisten inokulierten *in vitro* Kulturen in einer höheren Konzentration als in den nur mit Wasser besprühten Kontrollpflanzen nachgewiesen werden.

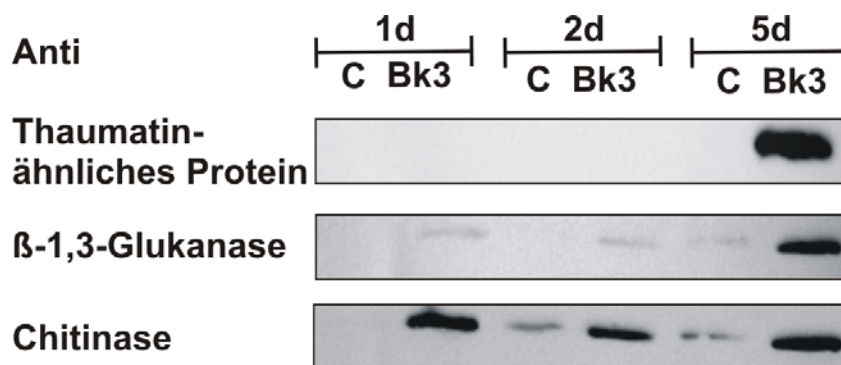


Abb. 3.3: Immunologische Detektion mittels ECL-Methode dreier ausgewählter PR-Proteine in der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox 24 h nach der Inokulation von *P. fluorescens* Bk3. Die Konzentration beträgt 10 μ g Protein pro Spur. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Thaumatin-ähnliches Protein (Verdünnung 1:2000), anti- β -1,3-Glukanase (Verdünnung 1:2000) und anti-Chitinase (Verdünnung 1:2000).

Thaumatin-ähnliches Protein und β -1,3-Glukanase konnten in den Kontrollen und nach einem und drei Tagen Inkubation mit dem Antagonisten nicht, bzw. nur sehr schwach detektiert werden, wohingegen Chitinase schon nach 1d und 2d sehr gut nachweisbar war. Nach 5d stieg die Proteinmenge in den mit *P. fluorescens* Bk3 inokulierten Pflanzen stark an. Alle drei, aufgrund der Ergebnisse der ESI-Q-ToF Sequenzierung der zusätzlichen Banden des TrisTricin Gels ausgewählten PR-Proteine, konnten nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit dem Western Blot nachgewiesen werden.

3.1.6 Semiquantitative RT-PCR

Aufgrund der erzielten Ergebnisse auf Proteinebene hinsichtlich der Neusynthese von PR-Proteinen nach der Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 sollte die Neusynthese von PR-Proteinen auf Transkriptebene mittels einer RT-PCR gezeigt werden. Aus der Gesamt-RNA einer mit ddH₂O behandelten Kontrolle und einer mit *P. fluorescens* Bk inokulierten Pflanze wurde nach einer DNase Behandlung cDNA synthetisiert (Kap 2.1.11) und die gewünschten Fragmente mittels PCR amplifiziert.

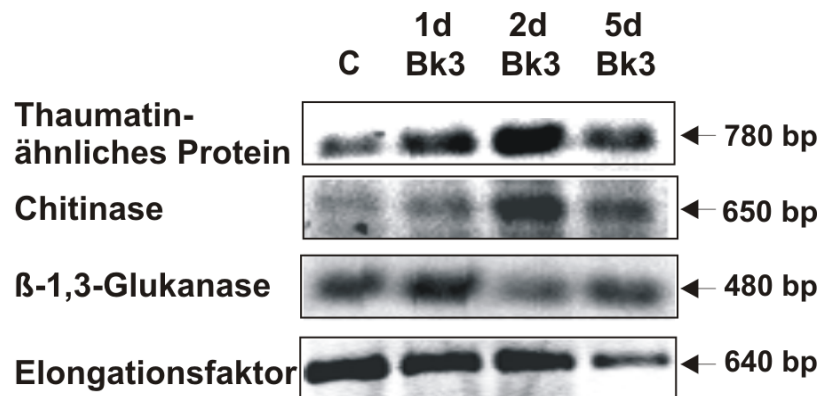


Abb. 3.4: Semiquantitative Detektion ausgewählter PR-Gene mittels RT-PCR. Für die RT-PCR wurde 1 µg Gesamt-RNA aus Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox eingesetzt, die mit *P. fluorescens* Bk3 1, 2 und 5 d inokuliert wurden. **C:** Inokulation mit H₂O für 5 d; **1d Bk3:** 1 d nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3; **2 d Bk3:** 2 d nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3; **5 d Bk3:** 5 d nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3.

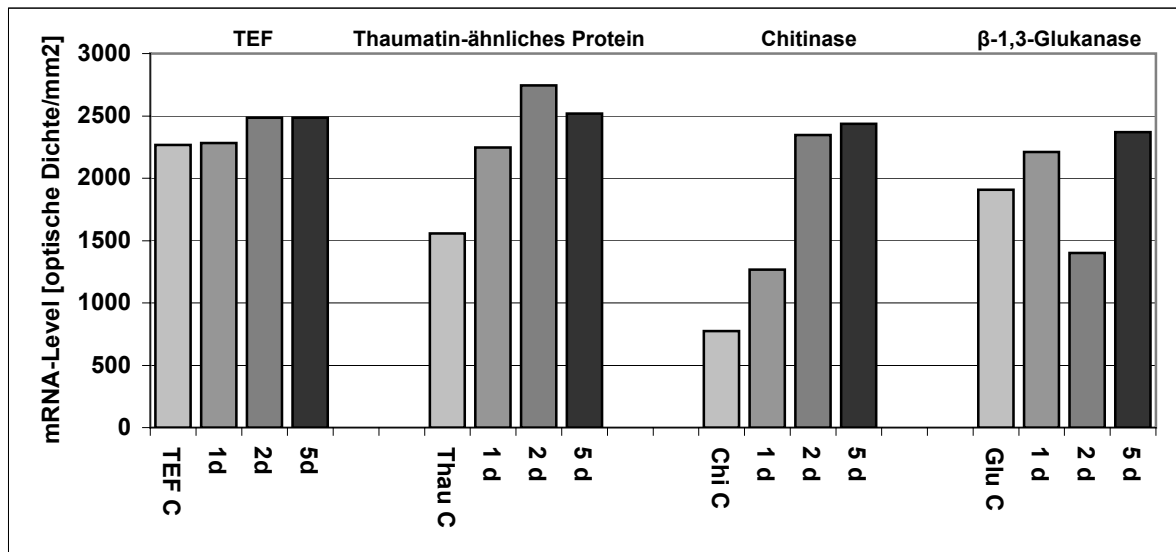


Abb. 3.5 Quantifizierung der RT-PCR. Die optischen Dichten/mm² der Banden aus der RT-PCR (Abb.3.4) wurden mittels TINA 2.0 Software ermittelt. **C:** mit H₂O behandelte Kontrollpflanzen, **1d:** 24h nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3, **2d:** 48h nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3, **5d:** 120h nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3, **TEF:** Elongationsfaktor Standard, **Thau:** Thaumatin-ähnliches Protein, **Chi:** Chitinase, **Glu:** β-1,3-Glukanase. Der Standard TEF5d wurde an die optische Dichte des Standards TEF2d angeglichen und die anderen Proben (5d) dementsprechend dem Standard angeglichen.

Auf Transkriptebene (Abb. 3.4 und Abb. 3.5) zeigten Thaumatin und Chitinase und β-1-3 Glukanase einen Anstieg nach einem Tag, zwei Tagen und fünf Tagen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der mRNA-Level von Thaumatin-ähnlichem Protein senkte sich am fünften Tag geringfügig ab. Chitinase zeigte einen kontinuierlichen Anstieg während der gesamten 5 Tage. Die Transkriptmenge von β-1,3-Glukanase stieg am ersten und am fünften Tag an. Am zweiten Tag konnte allerdings eine niedrigere Transkriptmenge als in der Kontrolle ermittelt werden. Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg in der Expression von PR-Genen nach der Inokulation von dem nicht pathogenen Bakterium *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox über einen Zeitraum von 5 Tagen.

3.1.7 Erfassung der induzierten Gene nach der Inokulation von *P. fluorescens* in die Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mittels Suppressions Subtraktions Hybridisierung (SSH)

Wie in Kap. 3.1.4 beschrieben verändert sich die Zusammensetzung der PR-Proteine im Apoplasten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3. Um eine umfassendere Aufklärung über die Reaktion von *M. domestica* auf die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 zu erhalten, kann man die induzierten Gene zwischen zwei sterilen, genetisch identischen Populationen nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 mit der Suppressions Subtraktions Hybridisierung (DIATCHENKO et al. 1999) erfassen. Dazu wurde, wie in Kap. 2.1.10.1 beschrieben, die Gesamt-RNA aus den Blättern der zu vergleichenden Pflanzen isoliert und die entsprechende cDNA-Bibliothek, wie in Kap. 2.1.14.1 beschrieben, erstellt.

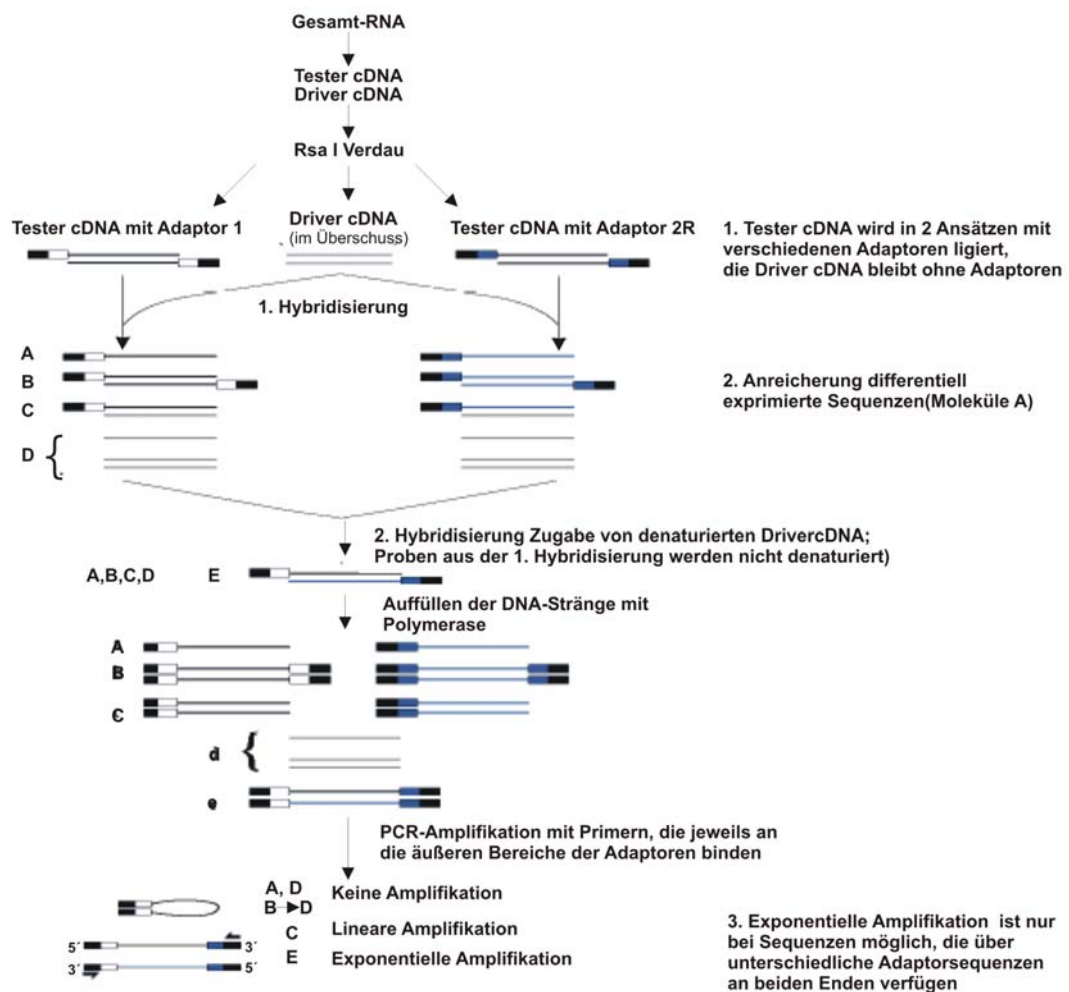


Abb. 3.6: Prinzip der Suppressions Subtraktions Hybridisierung (nach DIATCHENKO et. al. 1996).

In der ersten Hybridisierung werden die adaptorligierten Tester-cDNA-Fragmente mit überschüssiger Driver-cDNA hybridisiert. Dabei wurden die Tester-Fragmente gebunden, welche auch in der Driver-Population vorkommen. Nur Tester-Fragmente, die keine oder zu wenig komplementäre Sequenzen im überschüssigen Driver fanden, blieben einzelsträngig. Diese Fragmente wurden dann in der zweiten Hybridisierung zu Konstrukten hybridisiert, die zwei verschiedene Adapter an ihren Enden trugen. Diese waren in den nachfolgenden PCR-Reaktionen die einzigen, die amplifiziert werden konnten. Die unterschiedlich exprimierten Fragmente wurden in einen pGem-T Vektor kloniert (Kap. 2.1.14.2). Die Insertion der cDNA in den Vektor wurde durch eine PCR mit den Primern T 7 und M 13 überprüft (Kap. 2.1.16), (Abb. 3.5).

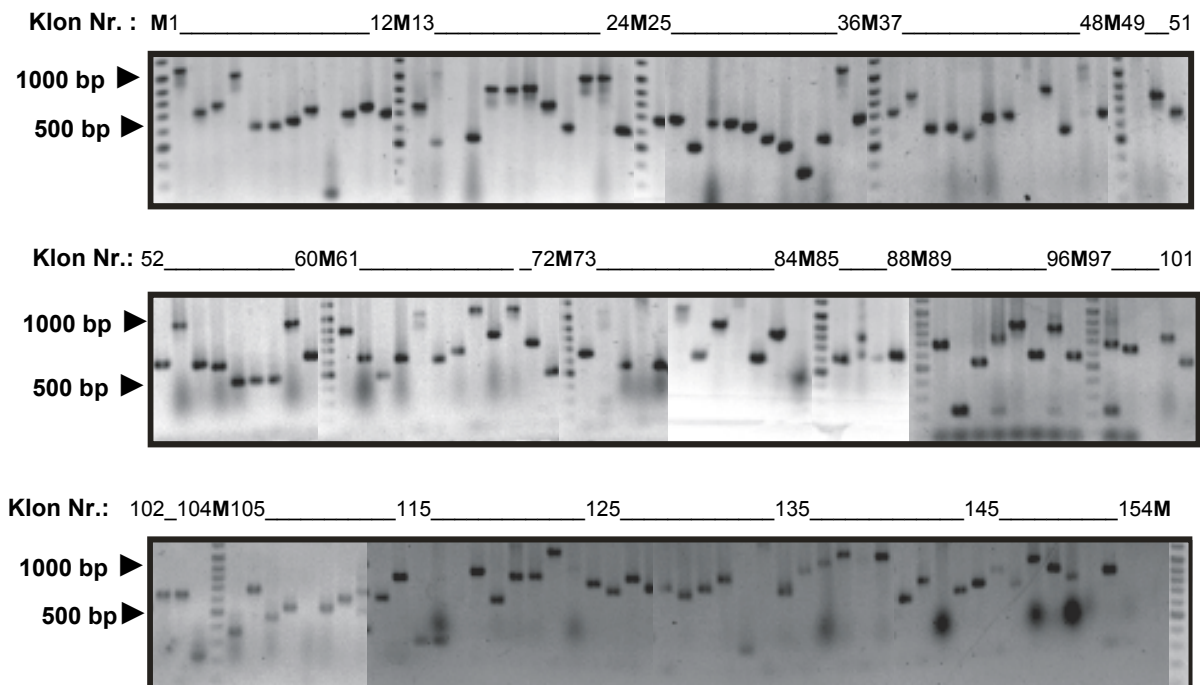


Abb. 3.7: 1,2 % Agarosegel zur Überprüfung der Insertion in den pGem-T Vektor. Marker: 3 μ l Gene Ruler DNA Ladder Mix (FERMENTAS) pro Spur. Vom PCR-Produkt (amplifiziert mit den Primern T7 und M13) wurden 5 μ l pro Spur in aufsteigender Reihenfolge von Klon Nr. 1-153 aufgetragen. Klon Nr. 154-157 ergaben keine sichtbaren Banden auf dem Agarosegel und sind hier nicht mit aufgeführt.

Zum Nachweis von tatsächlich differentiell exprimierten Genen und zur Ermittlung von falsch positiv differentiellen Genen wurde ein Reverse Northern Blot mit der gleichen cDNA, die auch für die Suppressions Substraktion eingesetzt wurde, durchgeführt. Membran I hybridisierte mit der cDNA-Sonde aus den Kontrollpflanzen, also dem Driver, und Membran II mit der cDNA-Sonde aus den Pflanzen, welche mit dem Antagonisten behandelt wurden, also dem Tester. Nur ein Fragment auf der „Driver-Membran“ zeigte

ein höheres Signal als die Dots auf der Tester Membran. Die photostimulierte Lumineszens, die mit dem Programm TINA 2.0 auf beiden Membranen ermittelt wurde, zeigt deutlich höhere Signale auf der „Tester-Membran“. (Abb. 3.8). Die Fragmente, die nur mit der Tester-cDNA hybridisierten oder ein höheres Signal abgaben, wurden zum Sequenzieren (Kap. 2.1.16) ausgewählt. Die Ergebnisse der Homologiesuche in der NCBI-Datenbank mit Blastx und Blastn sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Gab es die gleiche Homologie von verschiedenen EST-Klonen, so ist in Tab 3.2 nur ein Klon aufgeführt. Die Nummern der EST-Klone mit gleichen Treffern sind dem Anhang zu entnehmen.

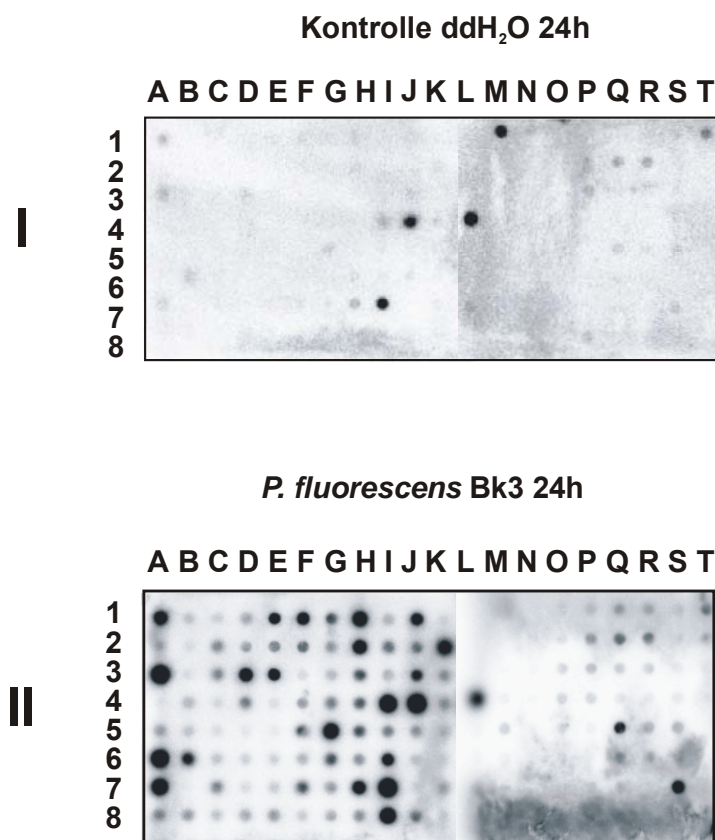


Abb. 3.8: *Dot Blot* Hybridisierung von PCR-Produkten (1µl) der induzierten Gene einer *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kultur nach Inokulation von *P. fluorescens* Bk3. **Sonde der Membran I:** mit P³² markierte cDNA aus Blättern einer unbehandelten Kontrolle (Driver). **Sonde der Membran II:** mit P³² markierte cDNA aus Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox geerntet 1 d nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3 (Tester). Die PCR – Produkte sind in Blot I und in Blot II in gleicher Weise aufgetragen. **Spur A:** PCR-Fragmente der EST-Klone 1-8; **Spur B:** EST-Klone 9-16; **Spur C:** EST-Klone 17-24; **Spur D:** EST-Klone 25-32; **Spur E:** EST-Klone 33-40; **Spur F:** EST -Klone 41-48; **Spur G:** EST-Klone. 49-56; **Spur H:** EST-Klone 57-64; **Spur I:** EST-Klone 65-72 **Spur J:** EST-Klone 73-80 **Spur K:** EST-Klone 81-88; **Spur L:** EST-Klone 89-96; **Spur M:** EST-Klone 97-104 **Spur N:** EST-Klone 105-112; **Spur O:** EST-Klone 113-120; **Spur P:** EST-Klone 121-128; **Spur Q:** EST-Klone 129-136; **Spur R:** EST-Klone 137-144; **Spur S:** EST-Klone 145-152; **Spur T:** EST-Klone 153-157.

Tab. 3.2: Identifikation der EST Klone vom apfelschorfsuszeptiblen Kultivar Holsteiner Cox nach Applikation des nicht pathogenen Bakterienstammes *P. fluorescens* BK3.

Klon Nr.	Accesssionnummer der EST-Klone	Anzahl identischer Klone	Accesionnummer homologer Sequenzen	Beste e-value (Blastx)	Herkunft der homologen Sequenzen	Mögliche Funktion
Pathogenesis-related proteins/ allgemeine Abwehr						
S4	DW015019	1	AAD3814	9e-06	<i>Prunus armeniaca</i>	Unbekannt
S14	CO960900	1	AAO25113	2e-46	<i>Malus domestica</i>	Major allergen Mal d 1
S16	CO960901	1	AAP73857	3e-52	<i>Oryza sativa</i>	ADP-Ribosylationsfaktor
S24	CO960932	1	NP_192788 BAD09760	1e-26	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa</i>	2OG-Fe(II) Oxygenase family protein Putative Flavonol Synthase
S44	CO960902	1	P52427	5e-79	<i>Spinacia oleracea</i>	Proteasome Subunit Alpha Type 4
S45	CO960903	1	AAP03883	2e-76	<i>Nicotiana tabacum</i>	Avr9/Cf-9 rapidly elicited Protein 284, Possible Phosphatase
S59	CO960937	2	BAC23044	1e-31	<i>Solanum tuberosum</i>	Cytochrome P450
S61	CO960904	1	BAA96445	3e-66	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Endochitinase Klasse III
S70	CO960905	1	AAP45314	3e-39	<i>Papaver somniferum</i>	S-Adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase
S72	CO960906	1	2103117A	4e-2	<i>Dactylis glomerata</i>	Allergen Dac g II
S82	CO960908	2	AAK13027	1e-33	<i>Malus domestica</i>	Ribonuclease-ähnliches PR-10b
Stress/oxidativer Stress						
S19	CO960909	2	O04011	9e-61	<i>Prunus persica</i>	Auxinbindendes Protein ABP20 precursor, Germin-ähnliches Protein
S17		1	CAD33257	1,3	<i>Crocus sativus</i>	Alternative Oxidase
S22	CO960910	1	P46423	1e-71	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Glutathion-S-transferase
S33	CO960911	1	CAD42938	2e-3	<i>Antrodia camphorata</i>	Manganabhängige Superoxid-Dismutase
S35	CO960912	2	AAN86274	3e-77	<i>Cucurbita maxima</i>	Non-cell-autonomous Heat Shock cognate Protein
S50	CO960913	1	AAN61003	1e-81	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Heat Shock Protein 90
S157	CO960914	1	P09189	7e-61	<i>Petunia x hybrida</i>	Heat Shock cognate 70 kDa protein
S64	CO960915	2	BAD17754	2e-08	<i>Oryza sativa</i>	Thioredoxin-ähnliches protein
Putative Rezeptoren /Signaltransduktion/Transkriptions Faktoren						
S1	DW015018	1	NP_703432	0,48	<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	ATP-abhängige RNA Helikase, putativ
S26	CO960916	1	NP_178306	2e-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Endomembranprotein 70
S34	CO960934	1	T52337	5e-41	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Phosphoprotein Phosphatase
S56	CO960917	1	NP_196467	4e-25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transmembran CLPTM1 family

Klon Nr.	Accesssionnummer der EST-Klone	Anzahl identischer Klone	Accesionnummer homologer Sequenzen	Beste e-value (Blastx)	Herkunft der homologen Sequenzen	Mögliche Funktion
S75	CO960918	1	T51098	6e-19	<i>Prunus armeniaca</i>	Hypothetisches Protein p85RF, Zink finger
S76	CO960907	3	Q9MB94	1e-48	<i>Prunus mume</i>	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat Oxidase
S80	CO960919	1	NP_563841	2e-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkription Faktor
Nukleinsäuremetabolismus						
S2	CO960920	1	BAD07817	3e-52	<i>Oryza sativa</i>	Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptid D3
S5	CO960921	3	NP_915424	1e-35	<i>Oryza sativa</i>	60S Ribosomal Protein L36
S18	CO960922	1	NP_565937	2e-27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pre-mRNA splicing Faktor PRP38
S25	CO960923	1	NP_198122	9e-31	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40S Ribosomal Protein S21
S29	CO960924	1	NP_180899	3e-04	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
S32	CO960933	1	AAQ15281	2e-53	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Elongation Faktor 1 alpha
S39	CO960925	2	Q9ZNS1	1e-27	<i>Avicennia marina</i>	40S Ribosomal Protein S7
S46	CO960926	1	NP_200911	1e-08	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNA-binding Protein
S51	CO960927	1	AAM63846	4e-52	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Small Nuclear Ribonucleoprotein
S60	CO960928	1	NP_195713	4e-35	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Histone H3.2
S63	CO960929	12	BAC75414	1e-37	<i>Oryza sativa</i>	Ribosomal Protein L32
S83	CO960930	1	AAK55780	5e-78	<i>Oryza sativa</i>	Putatives 40S Ribosomal Protein
S121	CO960931	37	AAR83884	1e-53	<i>Capsicum annuum</i>	Ribosomales ly200 Protein
Andere						
S31	DW015021	1	AAD20090	5e-48	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Putatives endosomales Protein
S68	DW015020	1	AAO13795	5e-16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Putative Sterol 4-Alpha-Methyl-Oxidase
S42	CO960935	1	AAK01938	2e-26	<i>Lupinus albus</i>	Phosphattransporter 1
S47	CO960936	1	P42896	6e-43	<i>Ricinus communis</i>	Enolase (2-Phosphoglycerate Dehydratase)
S54	DW015022	2	BAA83440	5e-04	<i>Anthoceros punctatus</i>	Photosystem I P700 Apoprotein A1
S67	CO960938	1	BAA34112	6e-44	<i>Daucus carota</i>	NADP spezifische Isocitrat Dehydrogenase
S73	CO960939	1	AAA50310	8e-73	<i>Prunus persica</i>	Light-harvesting Chlorophyll a/b-bindendes protein.
S81	CO960940	1	T00435	2e-03	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mitochondrial carrier Protein
S85	CO960941	1	T51183	3e-62	<i>Mimosa pudica</i>	Actin Isoform B
Hypothetical Proteine/Unbekannte Proteine						
S69	CO960942	1	NP_912350	5e-33	<i>Oryza sativa</i>	Unbekannte Function
S87	CO960943	2	NP_910689	2e-12	<i>Oryza sativa</i>	Hypothetisches Protein
S112		1				Beta-1,4-Endoglykanase 1 precursor

In der NCBI Datenbank wurden für folgende EST-Klone keine Homologien gefunden: S8 (CO960945*), S28 (CO960946*), S66 (CO960944*), S84 (CO960947*)

*GeneBank accession number.

Insgesamt zeigten die 116 sequenzierten Klone Homologien zu 51 verschiedenen Genen, die in sechs Klassen eingeteilt werden können (Abb. 3.9). Die %-Zahlen beziehen sich auf die auf die 51 individuellen Klone.

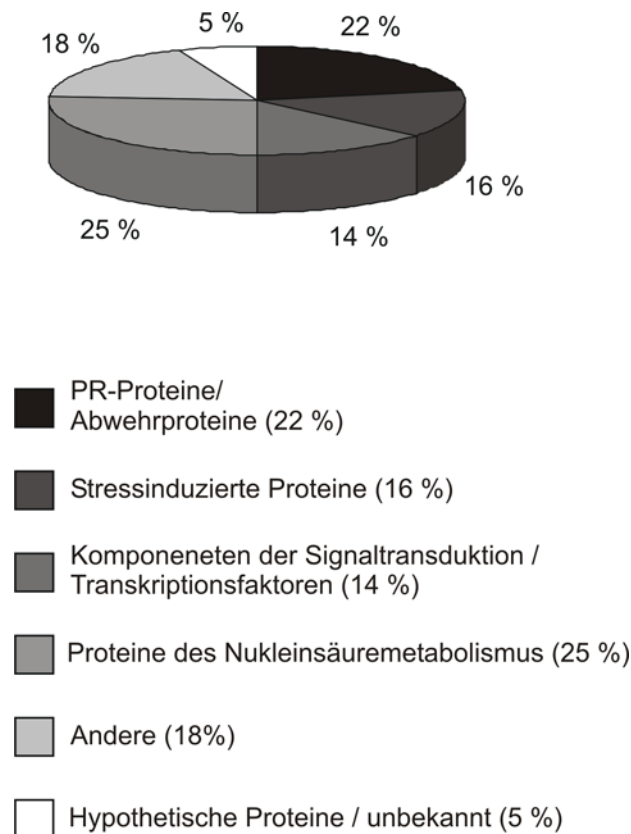


Abb. 3.9: Klassifizierung der induzierten Gene nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphäre von sterilen, genetisch identischen *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Pflanzen. Die Gesamtzahl beträgt 116 EST-Klone.

Wie schon auf Proteinebene beobachtet, findet nach der Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 auf die Blätter von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox ein Anstieg der Transkription von PR-Genen statt, aber nicht nur PR-Gene, sondern auch die Transkription von Genen, welche allgemein bei Abwehrreaktionen exprimiert werden, wie ADP-Ribosylationsfaktor (Proteintransport), Cytochrom P450 (Biosynthese- und Abbauprozesse), 2-Oxoglutarat-Fe(II)-Oxygenase oder Flavonol-Synthase (Pathogenabwehr), O-Methyltransferase (Zellwandverstärkung), Proteasome Untereinheit α -Type 4 (Proteindegradation), Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited Protein 284/putative Phosphatase. Auch stressinduzierte Proteine wie manganabhängige Superoxid Dismutase, Thioredoxin-ähnliches Protein, Gluthation-S-

Transferase, Germin-ähnliches Protein (antifungal) und drei verschiedene *Heat Shock* Proteine konnten identifiziert werden (Tab 3.2). Einige hochregulierte Gene zeigten Homologien zu bekannten Transkriptionsfaktoren und zu Genen, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, wie z.B. Zink-Finger Transkriptionsfaktor, Phosphoprotein Phosphatase und dem Schlüsselenzym in der Ethylenbiosynthese (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat Oxidase). Ein großer Teil der gefundenen hochregulierten Gene kodieren für Proteine, die mit dem Nukleinsäuremetabolismus korrelieren, was bedeutet, dass die Translationsmaschinerie in entscheidender Weise verändert wird.

Der *Dot Blot*, mit ausgewählten Genen aus verschiedenen der oben aufgeführten Klassen, wurde mit cDNA-Sonden aus Pflanzenmaterial, welches unabhängig von der Suppressions Substraktions Hybridisierung neu inokuliert war, hybridisiert. Auch mit dem neu inokulierten Pflanzenmaterial zeigte Membran II, also die „Tester-Membran“ deutlich höhere Signale als die „Driver-Membran“ (Membran I).

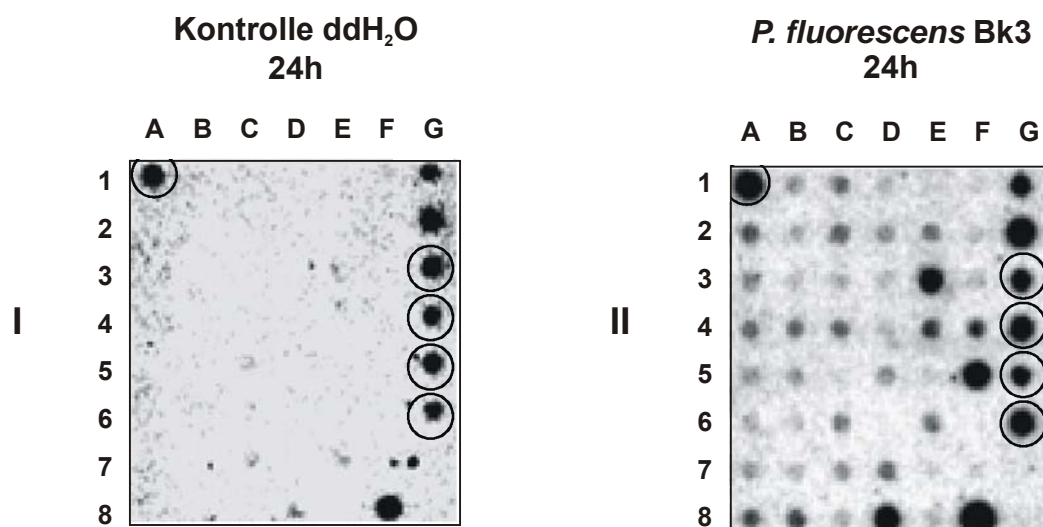


Abb. 3.10: *Dot Blot* Hybridisierung von PCR-Produkten der induzierten Gene einer *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kultur nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3. Die PCR-Fragmente stammen aus der SSH. Die cDNA-Sonden wurden aus neu inokuliertem Pflanzenmaterial, unabhängig von der zuvor durchgeführten SSH hergestellt. **Sonde der Membran I:** mit P^{32} gelabelte cDNA aus Blättern einer nur mit H_2O behandelten Kontrolle (Driver). **Sonde der Membran II:** mit P^{32} gelabelte cDNA aus Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox geerntet 1d nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3 (Tester). Die PCR-Produkte sind ausgewählte, differentiell exprimierte Gene aus der SSH und in Blot I und Blot II auf die gleiche Weise aufgetragen. **A1/G3-G6:** β -Actin als Kontrolle **A2-B3:** EST-Klone aus der Gruppe der PR Gene (14, 16, 44, 45, 59, 61, 70, 72, 82, 24); **B4-C2:** EST-Klone aus der Gruppe der stressinduzierten Proteine (19, 22, 33, 35, 50, 157, 64); **C3-C8:** EST-Klone aus der Gruppe der putativen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren (26, 34, 56, 75, 76, 80) **D1-E5:** EST-Klone aus der Gruppe des Nukleinsäuremetabolismus (2, 5, 18, 25, 29, 32, 39, 46, 51, 60, 63, 83, 121); **E6-F5:** EST-Klone aus der Gruppe „Andere“ (42, 47, 57, 73, 81, 85, 69, 87), **F6:** H_2O ; **F7:** PR1a; **F8:** β -Glukanase; **G1:** Chitinase; **G2:** Thaumatin

3.1.8 Real-Time PCR (qPCR)

Die Expression elf ausgewählter Gene wurde mittels einer Real-Time PCR analysiert. Während der Amplifikation wurden zwei interne Kontrollen mitgeführt: Zum ersten das „housekeeping Gene“ β -Actin (PFAFFL 2004), um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, zum zweiten Gesamt-RNA beider zu vergleichenden Varianten, um das Vorhandensein von störender genomischer DNA auszuschließen. Die Wahl der internen Kontrolle spielt eine wichtige Rolle, weil die Gesamtanalyse darauf basiert. Nach PFAFFL (2004) ist β -Actin ein geeignetes „housekeeping gene“, da dessen Expression weitestgehend unabhängig von äußeren Faktoren ist, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression von β -Actin in der Kontrolle und in den mit den Antagonisten behandelten Pflanzen gleich hohe Signale aussendet. Von jeder Variante wurden 2 Ansätze amplifiziert, von denen die Mittelwerte miteinander verglichen worden sind. In Abb. 3.11 ist der Amplifizierungsverlauf exemplarisch für β -Actin und β -1,3-Glukanase dargestellt.

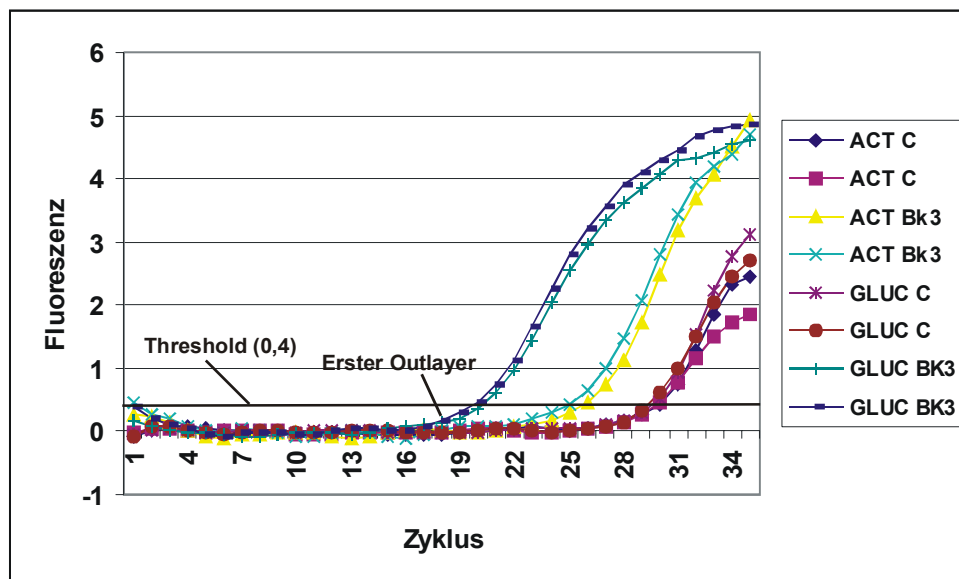


Abb. 3.11: Signalverlauf während der PCR. Exemplarisch sind hier β -Actin und β -1,3-Glukanase dargestellt.

Die relative Expression, d.h. die Differenz in der Expression zwischen Kontrolle und mit Antagonisten behandelten Pflanzen nach der Normalisierung der Expressionsergebnisse ist in Tab. 3.3 und Abb. 3.12 dargestellt. Da hier der relative Expressionsunterschied dargestellt werden soll, wurden negative Vorzeichen umgekehrt.

Tab 3.3: Relative Expressionsunterschiede einer unbehandelten Kontrollpflanze und einer mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanze (Probennahme 24h nach der Applikation des Antagonisten). Die Berechnung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode.

Gen	$\Delta\Delta CT$ -Wert
Proteasome Subunit Alpha type	50,05
Avr9/Cf-9 rapidly elicited Protein 284	30,79
β -1,3-Glukanase	30,12
ADP-Ribosylation factor	8,5
Ribonuclease-ähnliches PR-10b	6,4
Thaumatococcus	67 Mio
Endochitinase class III	6 Mio
Germin-ähnliches	11,9
Glutathione-S-transferase;	2,9
Heat Shock protein 90	1,07
Transmembrane CLPTM1 family	17,26

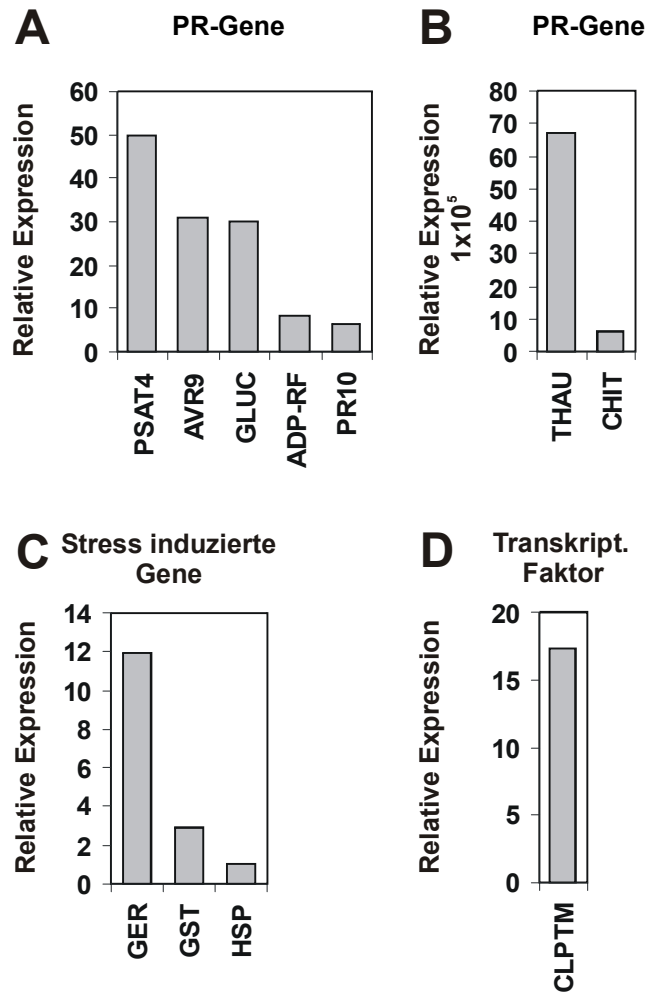


Abb. 3.12: relative Expression, gemessen mit der Real-Time PCR mit Primern gegen ausgewählte Gene, die nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 induziert werden. **A:** PR-Gene **PSAT4:** Proteasome Subunit Alpha Type 4; **AVR9** Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 284; **GLUC:** β -1,3-Glukanase; **ADP-RF:** ADP-Ribosylations Faktor; **PR10b:** Ribonuclease-ähnliches PR-10b; **B:** PR-Gene **THAU:** Thaumatin-ähnliches Protein **CHIT:** Endochitinase class III; **C:** stressinduzierte Gene **GER:** Germin-ähnliches Protein; **GST:** Glutathione-S-transferase; **HSP:** *Heat Shock* Protein 90; **D:** Transkriptionsfaktoren **CLPTM:** Transkriptionsfaktor

Freilandversuch

Zur Überprüfung der *in vitro* festgestellten antagonistischen Wirkung von *P. fluorescens* Bk3 gegen den Apfelschorferreger *V. inaequalis* wurde ein Freilandversuch mit den apfelschorfsuszeptiblen, wirtschaftlich relevanten Apfelsorten cv. Holsteiner Cox und cv. Elstar durchgeführt. Die Applikation des Antagonisten erfolgte je nach Witterungslage 24-36 h vor (präventive Maßnahme), simultan und 24-36 h nach (kurative Maßnahme) der Applikation mit *V. inaequalis*. Dazu wurden die Bäume wie in Kap. 2.2.4 beschrieben behandelt. Eine Parzelle blieb zur Messung des natürlichen Infektionsdrucks aus der Umgebung völlig unbehandelt.

Für die Auswertung standen insgesamt 60 Apfelbäume der Sorte Holsteiner Cox und 30 Apfelbäume der Sorte Elstar zur Verfügung. Im Jahre 2003 wurden insgesamt drei Bonituren und im Jahr 2004 fünf Bonituren durchgeführt. Der Witterungsverlauf vom Zeitpunkt der Inokulation bis zum Zeitpunkt der jeweiligen Bonitur ist in den Kapiteln der jeweiligen Boniturtermine dargestellt. Die Standardabweichung innerhalb der einzelnen Parzellen ist in den Bonitordiagrammen über den Säulen abgebildet. Ob tatsächlich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Parzellen bestand, wurde mittels des Tukey-Tests mit dem Programm SAS 8.0 überprüft und in den jeweiligen Bonitordiagrammen dargestellt. Die Parzellen 10, 11 und 12 wurden nicht in die Statistik miteinbezogen, da eine Konidienkonzentration von 10^5 Konidien/ml bei diesen Bäumen nicht an jedem Inokulationstermin gegeben war.

3.2.1 Witterungsverlauf in den Vegetationsperioden 2003 und 2004

Die Witterungsdaten in der Obstanlage wurden in den Vegetationsperioden aufgenommen, damit Zusammenhänge zwischen Witterung und dem Auftreten oder dem Nichtauftreten von Apfelschorf besser interpretiert werden konnten. Der Witterungsverlauf gibt Aufschluss über die Bedingungen während und nach einer künstlichen Infektion mit *V. inaequalis*. Bei zu großen Abweichungen von der optimalen Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit kann es zur Verzögerung der Konidienkeimung kommen (MACHARDY 1996). Damit die Konidien trotzdem keimen können, ist in Fällen von Temperaturabweichungen vom Optimum eine längere Blattnässezeit vonnöten. Weiterhin kann durch die Aufzeichnung der Witterungsdaten überprüft werden, ob der Antagonist

die Möglichkeit hatte, sich nach der Sprühapplikation auf der Blattoberfläche zu etablieren.

V. inaequalis: Optimale Voraussetzung für eine Infektion mit *V. inaequalis* sind 18°C und eine sehr hohen Luftfeuchtigkeit oder eine Blattnässezeit von mind. 6 Stunden. Starker Regenfall kann jedoch zu einem Abwaschen der applizierten oder natürlich eingetragenen Konidien führen.

P. fluorescens Bk3: Optimale Bedingungen für eine Etablierung auf der Blattoberfläche sind Temperaturen von 27°C (Fiss 2001) und eine hohe Luftfeuchtigkeit. Aus Klimakammerversuchen ist bekannt, dass sich das Bakterium aber auch bei niedrigeren Temperaturen auf der Blattoberfläche etablieren kann (Kap. 3.1.2). Auch hier führt starker Regenfall zu einem Abwaschen der applizierten Mikroorganismen.

In den folgenden Abbildungen sind die Witterungsdaten in Bezug auf Temperatur und Luftfeuchtigkeit zwischen den jeweiligen Inokulations- und Boniturterminen dargestellt. Der Gesamtboniturverlauf in den Vegetationsperioden aus den Jahren 2003 und 2004 ist den Abb. 3.35-3.38 zu entnehmen.

3.2.2 Bonitur von *M. domestica* cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox in den Jahren 2003 und 2004

3.2.2.1 Bonitur der Elstar Pflanzen im Versuchsjahr 2003

Bonitur am 26.06.2003

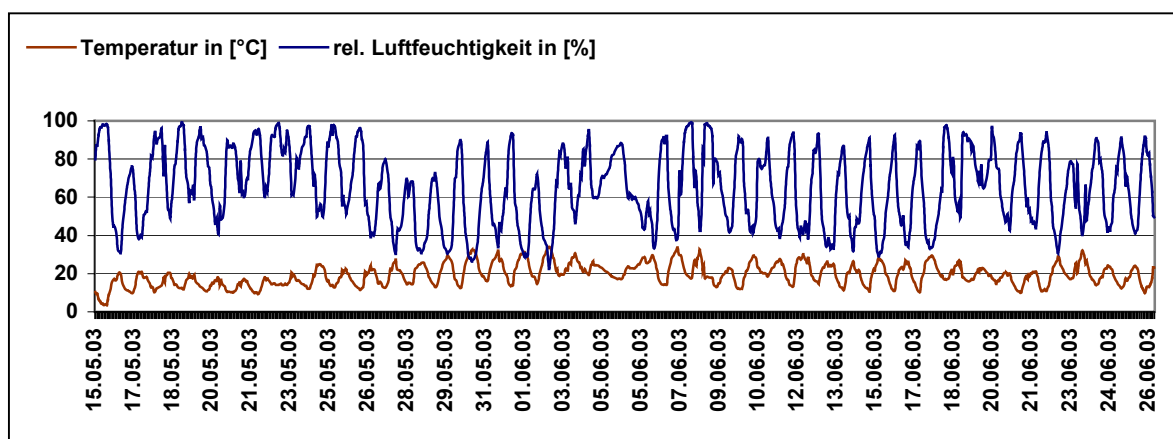


Abb. 3.13: Witterungsverlauf vom 15.05.03 bis zur ersten Bonitur am 26.06.03.

In der Zeit zwischen der Auspflanzung der Bäume am 15.05.03 und dem ersten Boniturtermin am 26.06.03 herrschten vor allem nachts immer wieder Temperaturen zwischen 15°C und 20°C bei einer relativ hohen Luftfeuchtigkeit, was eine Infektion mit *V. inaequalis* sehr wahrscheinlich machte. Der natürliche Sporeneintrag aus der Umgebung betrug zum Zeitpunkt der Bonitur bei den unbehandelten Kontrollpflanzen (P13) 35 % (Abb. 3.14).

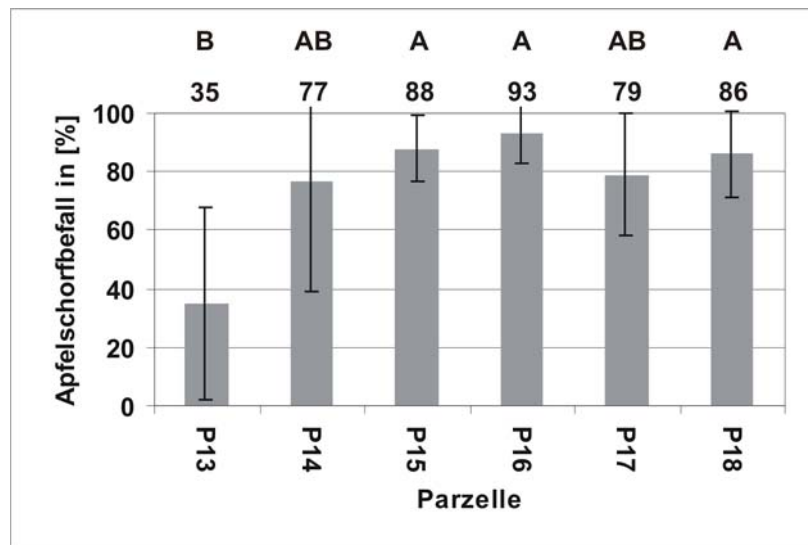


Abb. 3.14 : Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 26.06.03 in [%]. **P13**: unbehandelte Kontrolle, **P14**: *P. fluorescens* Bk3, **P15**: *V. inaequalis*, **P16**: *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17**: *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18**: *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben bedeuten**: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen; **Unterschiedliche Buchstaben bedeuten**: signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen; **Zwei unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Parzelle bedeuten**: keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben anderer Parzellen.

Die erste Bonitur der Elstar Pflanzen wurde am 26.06.03 durchgeführt, also ca. 6 Wochen nach der künstlichen Infektion mit *V. inaequalis* und der ersten Inokulation des Antagonisten. Bei Betrachtung des Witterungsverlaufes in der Zeit zwischen der Auspflanzung und der Bonitur ist ein Apfelschorfbefall an allen Bäumen sehr wahrscheinlich, dabei sollte die nur mit dem Antagonisten behandelte Variante keine höhere Befallsrate aufweisen als die unbehandelte Kontrolle, damit ein negativer Effekt durch die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 ausgeschlossen werden kann. Entgegen den Erwartungen zeigten die mit dem Antagonisten behandelten Bäume jedoch mit 77 % eine viel höheren Befallsrate als die unbehandelte Kontrolle mit 35 % was daran lag, dass die erste Inokulation und Infektion der Apfelbäume unter kontrollierten Bedingungen in der

Klimakammer bei 18°C und einer Luftfeuchtigkeit von nahezu 100 % stattfand, was schon nach 24-48h eine störende Mehltauinfektion an allen Bäumen hervorrief. Nach der 2-tägigen Inkubation in der Klimakammer wurden die Topfpflanzen in die Freilandanlage gepflanzt. Die gänzlich unbehandelten Kontrollpflanzen (P13) wurden nicht in der Klimakammer inkubiert und waren deswegen auch nicht durch den Mehltaubefall geschwächt. Das erklärt die niedrige Befallsrate der Kontrollpflanzen von 35 % bei der ersten Bonitur im Gegensatz zu den mit Mehltau befallenen Pflanzen, die den Adaptationstress schlechter bewältigen konnten und deswegen anfälliger für jegliche Art von Pathogenen waren.

Die nur mit *V. inaequalis* behandelten Pflanzen erreichten eine Infektionsrate von 88 %, was bedeutet, dass die künstliche Infektion erfolgreich war. Die apfelschorfsuszeptible Sorte Elstar zeigte insgesamt einen starken Befall nach der künstlichen Apfelschorfinfektion. In der statistischen Auswertung unter Berücksichtigung der Standardabweichung zeigten alle Parzellen bis auf die unbehandelte Kontrolle keine signifikanten Unterschiede. Erwähnenswert ist, dass die nur mit den Antagonisten behandelte Parzelle (P14) und die mit dem Pilz und dem Antagonisten gleichzeitig behandelte Parzelle (17) keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle aufwiesen, was bedeutet, dass der Antagonist in der Lage ist, die Apfelschorfsymptome zu reduzieren.

Bonitur am 09.07.2003

Für den Zeitraum bis zur zweiten Bonitur liegen keine Witterungsdaten vor.

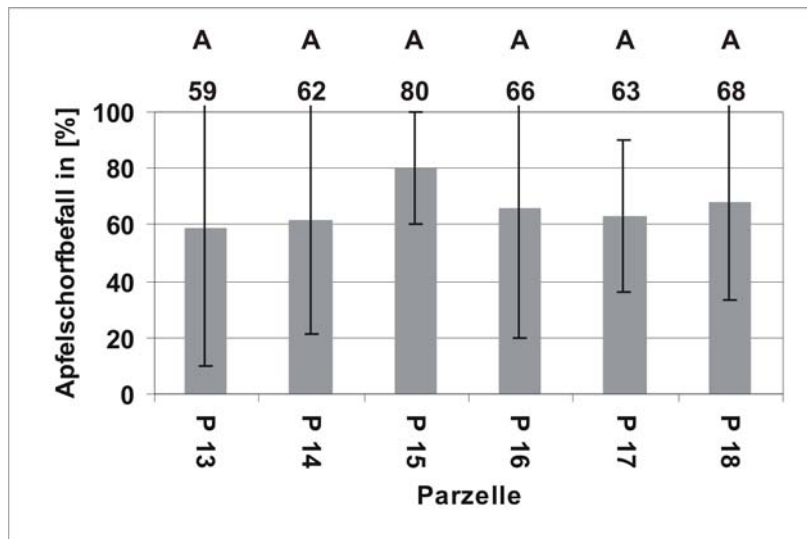


Abb. 3.15: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 09.07.03 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Betrachtet man die zweite Bonitur der Elstar Pflanzen, stellt man fest, dass nun auch die Kontrolle mit 59 % stark infiziert ist. Der natürliche Infektionsdruck von außen hat sich demnach erhöht. Die künstlich infizierten Pflanzen (P15) sind mit 80 % am stärksten infiziert. Die nur mit dem Antagonisten behandelten (P14), die präventiv (P16), die simultan (P17) und kurativ (P18) behandelten Bäumen liegen mit einer Befallsrate 62 % - 68 % alle etwa im gleichen Bereich. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Parzellen. Insgesamt lag die Infektionsrate im Bereich von 59 % - 80 % niedriger als in der vorherigen Bonitur, da nach der ersten Inokulation in der Klimakammer mit dem starken Mehltaubefall und dem zusätzlichen Adaptationsstress im Freiland auf eine erneute künstliche Infektion verzichtet worden ist, bis die Pflanzen wieder in der Lage waren, einen starken, künstlich hervorgerufenen Apfelschorfbefall zu verkraften.

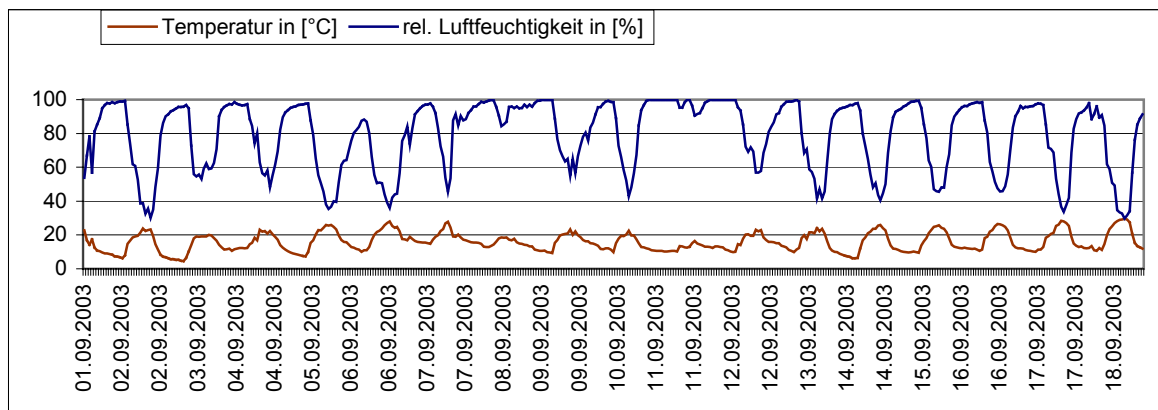
Bonitur am 18.09.2003

Abb 3.16: Witterungsverlauf vom 01.09.03 bis zur dritten Bonitur am 18.09.03.

In der Zeit zwischen der Inokulation am 01.09.03 und dem dritten Boniturtermin am 18.09.03 herrschten immer wieder Temperaturen zwischen 15°C und 20°C. Da diese Temperaturen in diesem Abschnitt der Vegetationsperiode hauptsächlich tagsüber erreicht wurden, ist die Luftfeuchtigkeit recht niedrig, was eine Infektion mit *V. inaequalis* erschwert. Da nachts jedoch die Luftfeuchtigkeit bis zu 100 % anstieg, reichten die daraus resultierenden Blattnässezeiten aus, um eine starke Apfelschorfinfektion hervorzurufen. Der natürliche Sporeneintrag aus der Umgebung betrug zum Zeitpunkt der Bonitur bei den nicht künstlich infizierten Kontrollpflanzen (P13) 73 % (Abb. 3.17).

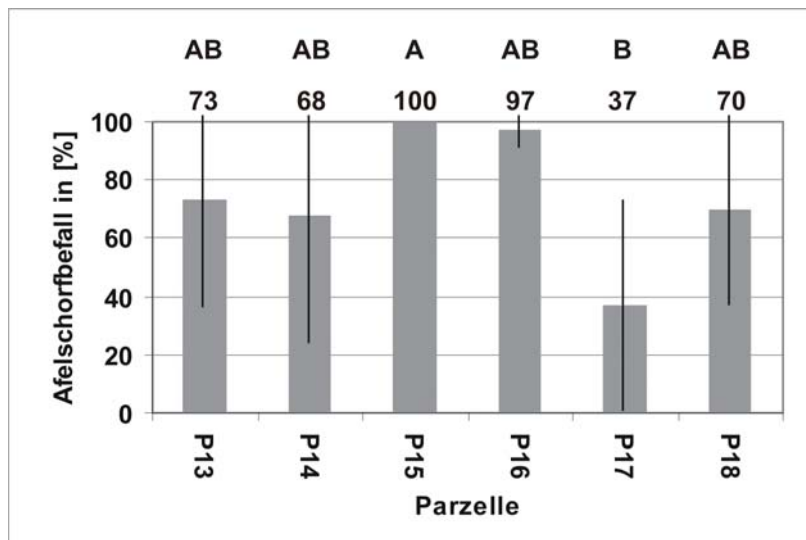


Abb. 3.17: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 18.09.03 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der dritten Bonitur am 18.09.03 der Sorte Elstar ist die Kontrolle mit 73 % wieder stark infiziert, was aufgrund der Witterungsdaten zu erwarten war. Durch die künstliche Infektion mit Konidien von *V. inaequalis* konnte in Parzelle 15 eine Befallsrate von 100 % erreicht werden, d.h. alle Blätter der künstlich infizierten Pflanzen wiesen mind. eine Apfelschorfläsion auf. Die Parzellen, die zusätzlich zu der künstlichen Infektion mit *V. inaequalis* gleichzeitig (P17) und kurativ (P18) mit dem Antagonisten behandelt wurden, wiesen mit 37 % - 97 % eine niedrigere Befallsrate auf, also kann die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 tatsächlich den Apfelschorfbefall reduzieren. Die niedrigste Infektionsrate mit 37 % konnte in der gleichzeitig mit dem Pathogen und dem Antagonisten behandelten Parzelle (P17) erreicht werden. Auch in der statistischen Auswertung zeigten die simultan behandelten Bäume signifikante Unterschied zu den nur mit *V. inaequalis* infizierten Pflanzen. Insgesamt war die Befallsrate in dieser Bonitur wieder höher als in der vorherigen Bonitur, da erstens wieder künstlich infiziert wurde und zweitens optimale Witterungsbedingungen für eine Infektion herrschten.

3.2.2.2 Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen im Versuchsjahr 2003

Die Witterungsverläufe zwischen den Inokulationsterminen und den Boniturterminen sind schon bei den Bonitordiagrammen der Elstar Pflanzen in Kap. 3.2.2.1 dargestellt und dort in Abb. 3.13 zu entnehmen.

Bonitur am 26.06.03

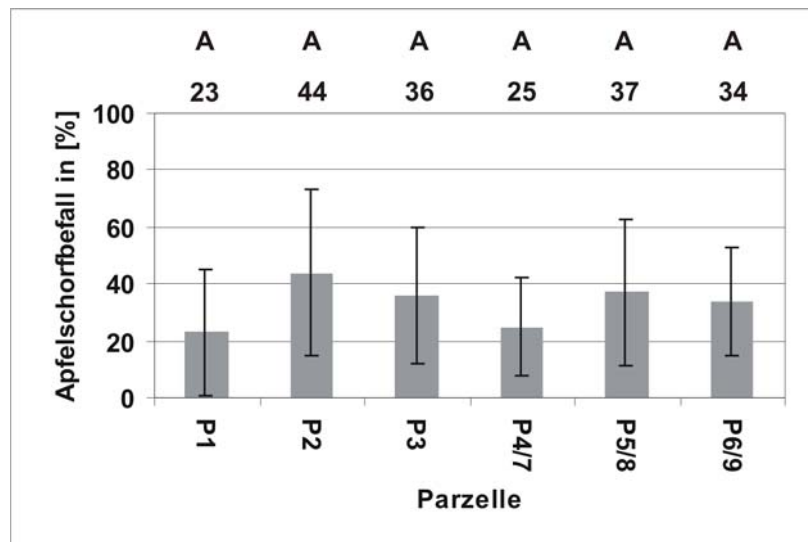


Abb. 3.18: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 26.06.03 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey – Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der ersten Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen am 26.06.03 sind die präventiv mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanzen (P4) mit 25 % und die unbehandelte Kontrolle mit 23 % (P1) am geringsten mit *V. inaequalis* infiziert. Die kurativ und gleichzeitig mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanzen weisen mit 37 % und 34 % eine vergleichbare Infektionsrate zu den nur mit *V. inaequalis* behandelten Pflanzen mit 36 % auf. Die statistische Auswertung mit dem Tukey-Test ergab in dieser Bonitur keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. Trotzdem waren die Bäume, die nur mit dem Antagonisten behandelt waren entgegen den Erwartungen am stärksten befallen. Da die Bäume der Sorte Holsteiner Cox genauso wie die Elstar Pflanzen in der Klimakammer infiziert und inokuliert waren, waren auch diese Bäume stark von Mehltau befallen und

gleichzeitig dem Adaptationsstress im Freiland ausgesetzt. Auch bei diesen Bäumen war es unumgänglich, zunächst von einer weiteren künstlichen Apfelschorfinfektion abzusehen, um den Bäumen eine Regenerationsphase zu ermöglichen. Trotzdem wurde am 09.07.03 eine weitere Bonitur durchgeführt, ohne vorher künstlich mit *V. inaequalis* infiziert zu haben (Abb. 3.19).

Bonitur am 09.07.03

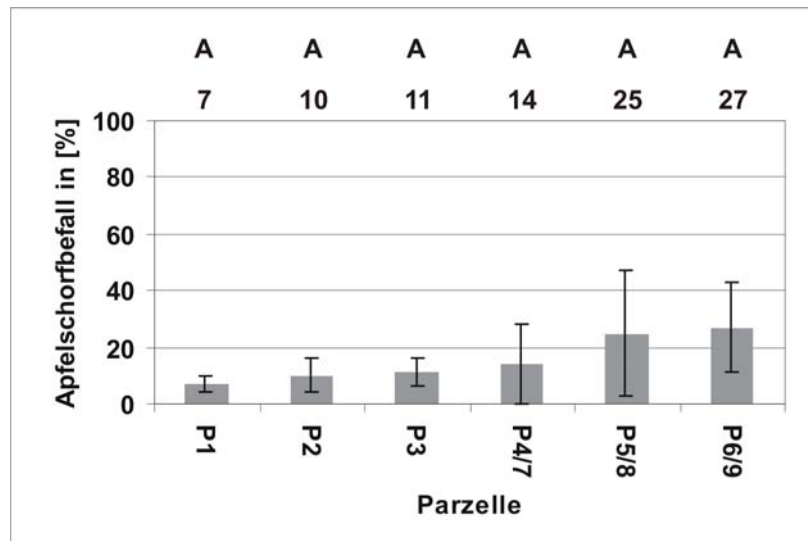


Abb. 3.19: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 09.07.03 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der zweiten Bonitur am 09.07.03 liegen alle Varianten etwa im gleichen Bereich. Die statistische Auswertung ergab im Tukey-Test in dieser Bonitur keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Parzellen, was dadurch zu erklären ist, dass nach der ersten Inokulation in der Klimakammer und der starken Mehltauinfektion an allen Bäumen auf eine zweite künstliche Infektion mit *V. inaequalis* verzichtet werden musste, um den Bäumen die sowieso schon belastende Adaptation an das Freiland zu ermöglichen. Der natürliche Sporeneintrag von außen betrug nur 7 %. Insgesamt liegt die Befallsrate bei den Holsteiner Cox Pflanzen mit 7 % - 27 % deutlich niedriger als bei der Sorte Elstar mit 59 % - 80 %.

Bonitur am 18.09.03

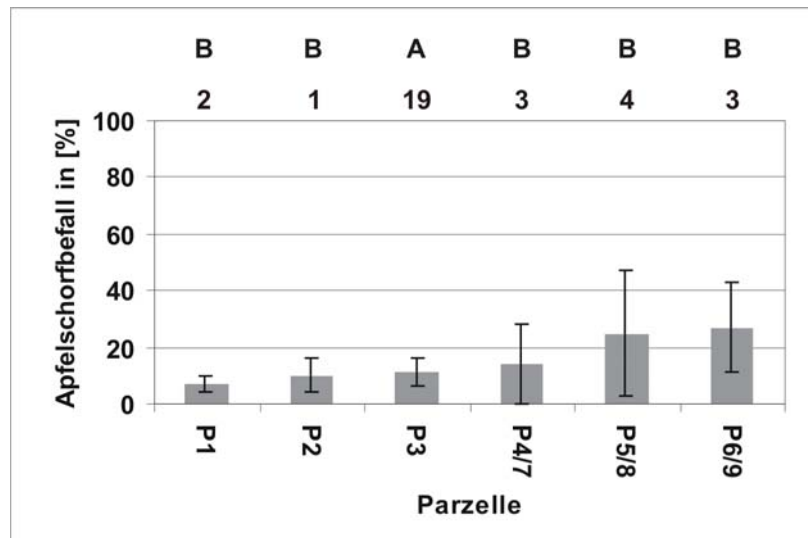


Abb.3.20: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 18.09.03 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8 :** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p > 0,05$). **Gleiche Buchstaben bedeuten:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben bedeuten:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen. **Zwei unterschiedliche Buchstaben bedeuten:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Die dritte Bonitur fand Mitte September ca. 3 Wochen nach einer erneuten künstlichen Infektion und Applikation von *P. fluorescens* Bk3 statt und ergab, dass die Parzellen, die künstlich mit *V. inaequalis* und mit dem Antagonisten (P4, P5, P6) in den verschiedenen Varianten behandelt wurden, keine statistischen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollbäumen zeigten. Die nur mit *V. inaequalis* behandelten Bäume hingegen wiesen mit 19 % die höchste Infektionsrate auf und waren signifikant unterschiedlich zu allen anderen Parzellen. Also war die künstliche Infektion erfolgreich und der Antagonist *P. fluorescens* Bk3 tatsächlich in der Lage, die Apfelschorfsymptome zu reduzieren.

3.2.2.3 Bonitur der Elstar Pflanzen im Versuchsjahr 2004

Bonitur am 20.04.04

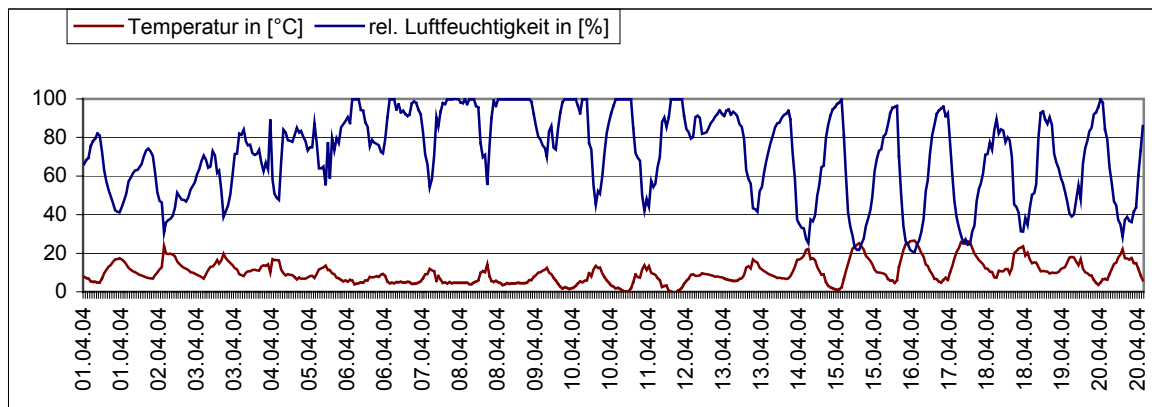


Abb 3.21: Witterungsverlauf vom 01.04.04 bis zur ersten Bonitur am 20.04.04.

Der erste sehr frühe Inokulationstermin am 01.04.04 wurde gewählt, um die Vegetationsperiode so gut wie möglich auszunutzen und die ersten sich gerade entwickelnden Blätter im jungen Stadium mit Apfelschorf infizieren zu können. Der Witterungsverlauf vom ersten Inokulationstermin bis zur ersten Bonitur ist gekennzeichnet durch Temperaturen, die vor allem tagsüber auf bis zu 20°C anstiegen. Die Luftfeuchtigkeit stieg nachts bis zu 100 % an. Insgesamt war es noch zu kalt für eine starke Apfelschorfinfektion, und es wurde nur mit einem schwachen Apfelschorfbefall gerechnet. Der natürliche Sporeneintrag von außen betrug nur 10 %.

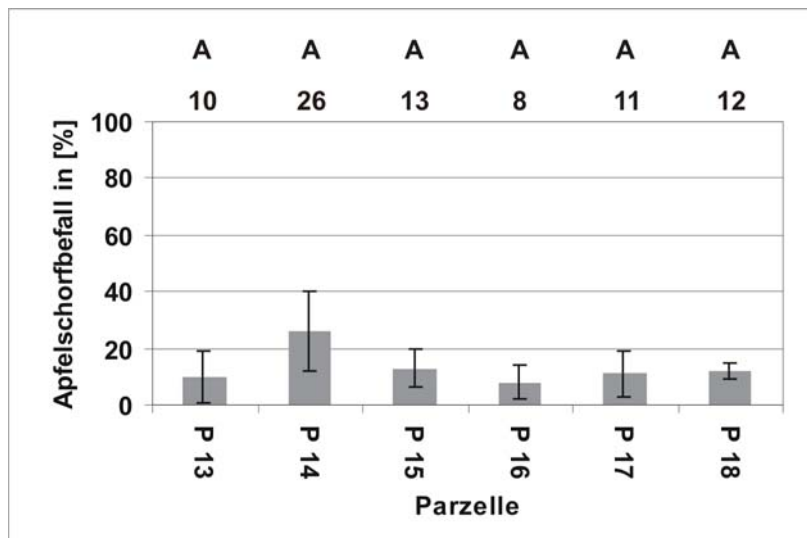


Abb. 3.22: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 20.04.04 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der ersten Bonitur der Elstar Pflanzen am 20.04.04 wiesen die nur mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanzen mit 26 % die meisten Symptome auf, zeigten im Tukey-Test aber keine signifikanten Unterschiede zu allen anderen Parzellen. Der natürliche Sporeneintrag infizierte die unbehandelten Kontrollpflanzen zu 10 %. Die Inokulation der Konidien und des Antagonisten fand in diesem Jahr zum ersten Mal am 1. April 2004, also sehr früh, statt. Die Temperaturen zu diesem Zeitpunkt lagen noch zwischen 0°C und 2°C, was eine erfolgreiche Infektion mit Konidien bzw. eine erfolgreiche Etablierung des Epiphyten zu diesem Zeitpunkt sehr unwahrscheinlich machte.

Bonitur am 08.06.04

Für diesen Zeitraum liegen keine Witterungsdaten vor. Inokulationstermin war der 25.05.04.

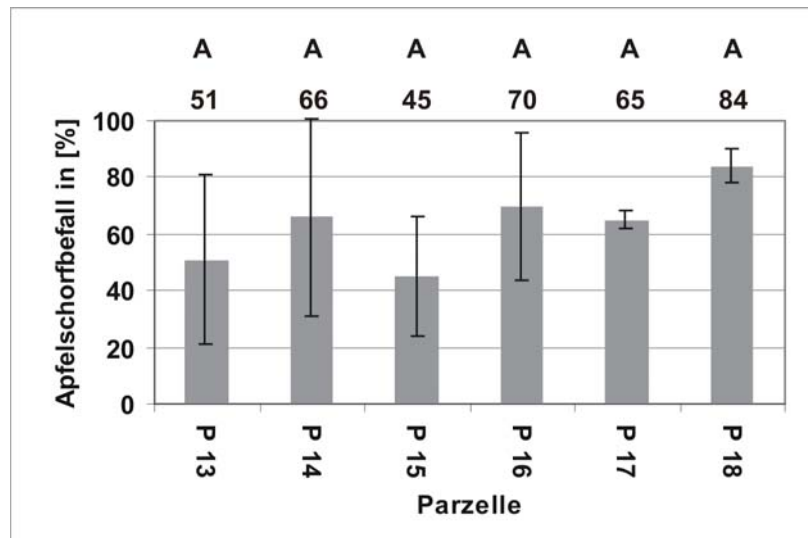
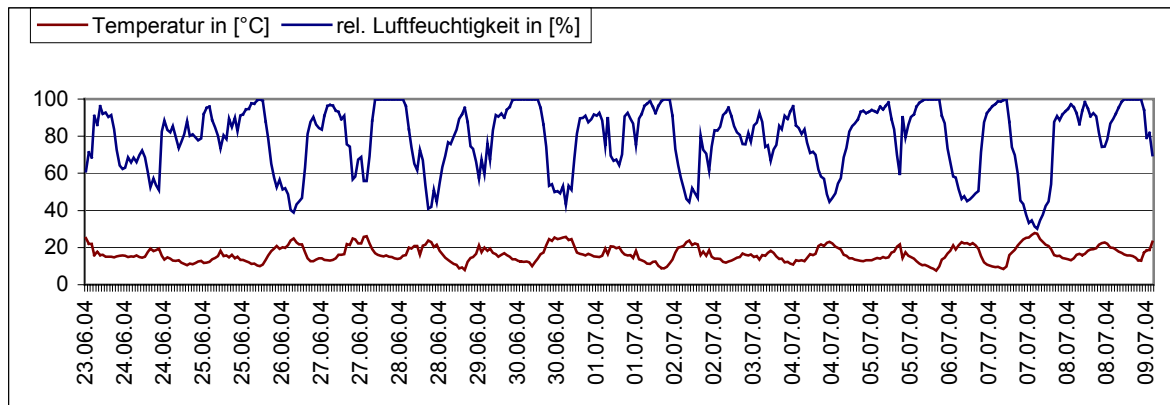


Abb. 3.23: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 08.06.04 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey – Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

In der zweiten Bonitur am 08.06.04 betrug der natürliche Sporeneintrag bei der unbehandelten Kontrolle 51 %. Obwohl die Mittelwerte im Bereich zwischen 45 % - 84 % schwanken, zeigen die Parzellen keine signifikanten Unterschiede zueinander. Insgesamt ist die Befallsrate zu der vorherigen Bonitur gestiegen. Der Befallsverlauf ist in Kap. (3.2.3.1) dargestellt.

Bonitur am 08.07.04**Abb 3.24:** Witterungsverlauf vom 23.06.04 bis zur Bonitur am 08.07.04.

Am 23.06.04 wurden die Bäume im Freiland erneut mit *V. inaequalis* infiziert und mit dem Antagonisten behandelt. Die hohe Luftfeuchtigkeit nachts geht einher mit optimalen Temperaturen für *V. inaequalis*, da tagsüber die Temperaturen jedoch rasch auf bis zu 27°C ansteigen ist die Blattnässezeit von 6 Stunden nicht immer gegeben. Insgesamt ist aber mit einer erfolgreichen Schorfinfektion zu rechnen gewesen. Der Sporeneintrag von außen infizierte 35 % der unbehandelten Kontrollpflanzen (Abb. 3.25).

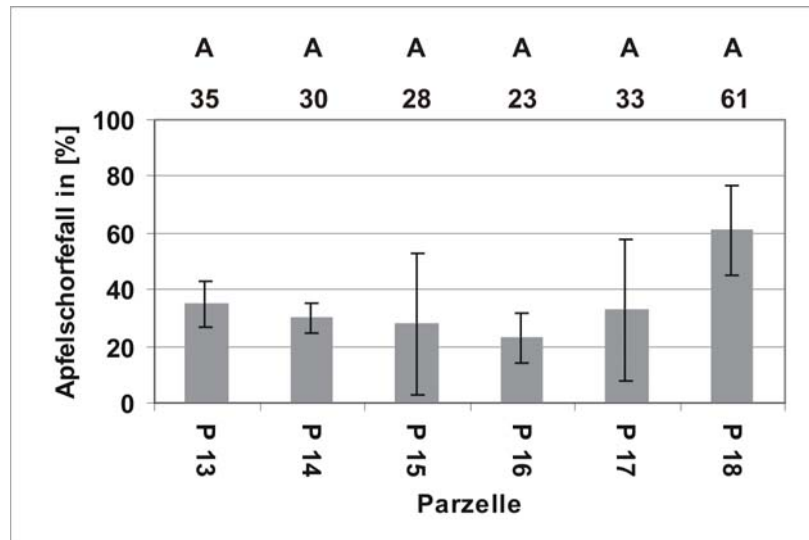


Abb. 3.25: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 08.07.04 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Wie in der vorherigen Bonitur gibt es auch hier relativ starke Schwankungen in den Mittelwerten der Befallsraten der einzelnen Parzellen. Die präventiv behandelten Pflanzen (P16) wiesen mit 23 % die niedrigste und die kurativ behandelten Pflanzen mit 61 % die höchste Befallsrate auf. Statistisch gab es zwischen allen Parzellen, aufgrund der hohen Standardabweichung, keine signifikanten Unterschiede.

Bonitur am 12.08.04

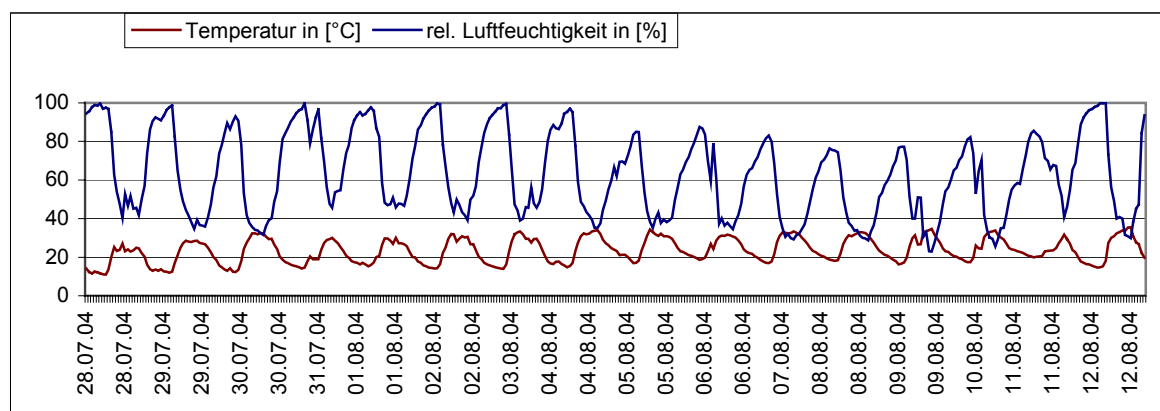


Abb 3.26: Witterungsverlauf vom 28.07.04 bis zur Bonitur am 08.07.04.

In diesem Abschnitt der Vegetationsperiode stiegen die Temperaturen tagsüber auf bis zu 36°C. Die Luftfeuchtigkeit sank tagsüber bis auf unter 40 %. Aufgrund der gegebenen Witterungsverhältnisse war mit keiner oder nur einer schwachen Apfelschorfinfektion zu rechnen. Der natürliche Sporeneintrag hat sich von 35 % auf 20 % erniedrigt.

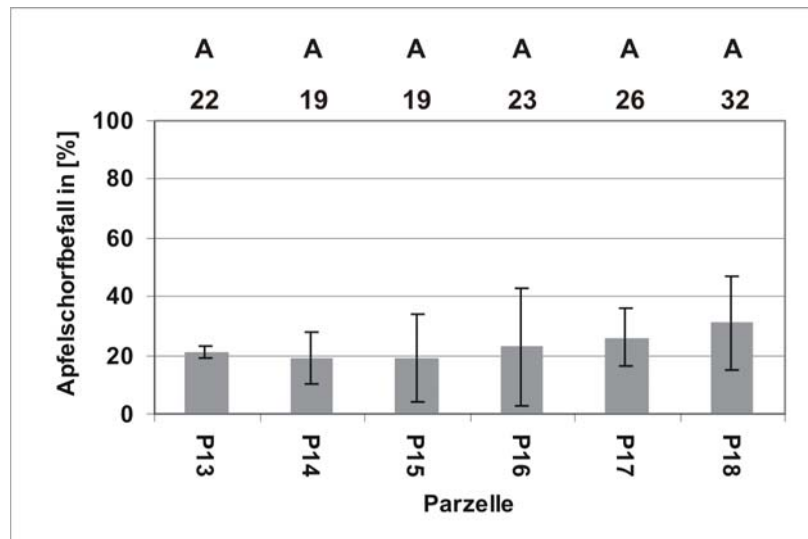


Abb. 3.27: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 12.08.04 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey – Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben bedeuten:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben bedeuten:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen. **Zwei unterschiedlichen Buchstaben bedeuten:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben in anderen Parzellen.

Aufgrund der Witterungsdaten war nur mit einer schwachen Neuinfektion zu rechnen. Bei dieser Bonitur ergaben sich zwischen den verschiedenen Behandlungen auch keinerlei signifikante Unterschiede.

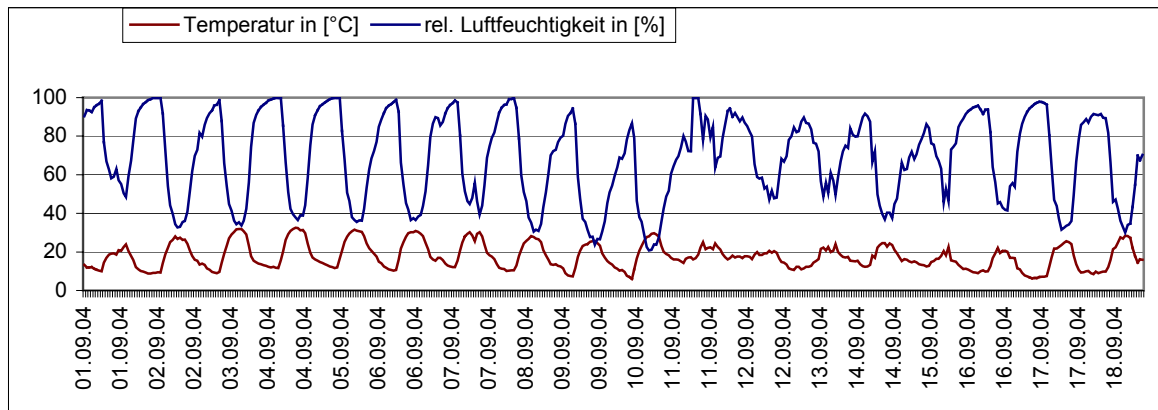
Bonitur am 17.09.04

Abb 3.28: Witterungsverlauf vom 01.09.04 bis zur letzten Bonitur am 17.09.04.

Der Witterungsverlauf in diesem Abschnitt der Vegetationsperiode ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Anstieg der relativen Luftfeuchtigkeit am 10.09.04. Die Temperaturen und Luftfeuchtigkeitswerte deuten auf optimale Bedingungen für *V. inaequalis* hin. Es war prinzipiell mit einer starken Infektion zu rechnen. Da allerdings in diesem Abschnitt der Vegetationsperiode weniger neue Blätter entwickelt werden als in der Hauptwachstumszeit im Frühjahr, standen weniger junge Blätter zur Infektion zur Verfügung. Der natürliche Infektionsdruck von außen erhöhte sich von 22 auf 24 % (Abb. 3.29).

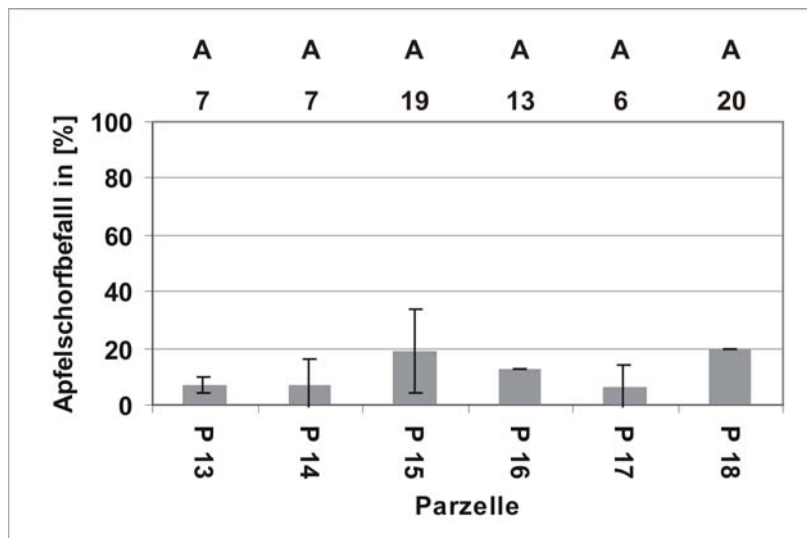


Abb. 3.29: Apfelschorfbefall der Elstar Pflanzen am 17.09.04 in [%]. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar.

Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p > 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Obwohl die Mittelwerte zwischen 6% Befall bei den präventiv behandelten Pflanzen und 20 % bei den kurativ behandelten Pflanzen schwankt, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Parzellen. Die Pflanzen wurden im Jahr 2003 nur einmal im Frühjahr künstlich infiziert, d.h. die Pflanzen konnten neue Blätter ausbilden, die nicht sofort infiziert werden konnten. Das erklärt die relativ niedrige Infektionsrate Des Kultivars Elstar am 17.09.03 am Ende der Vegetationsperiode.

3.2.2.4 Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen im Jahr 2004

Die Witterungsverläufe zwischen den Inokulations- und Boniturterminen sind schon bei den Elstar Pflanzen 2004 (Kap.3.2.2.3) dargestellt und dort zu entnehmen.

Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen am 20.04.04

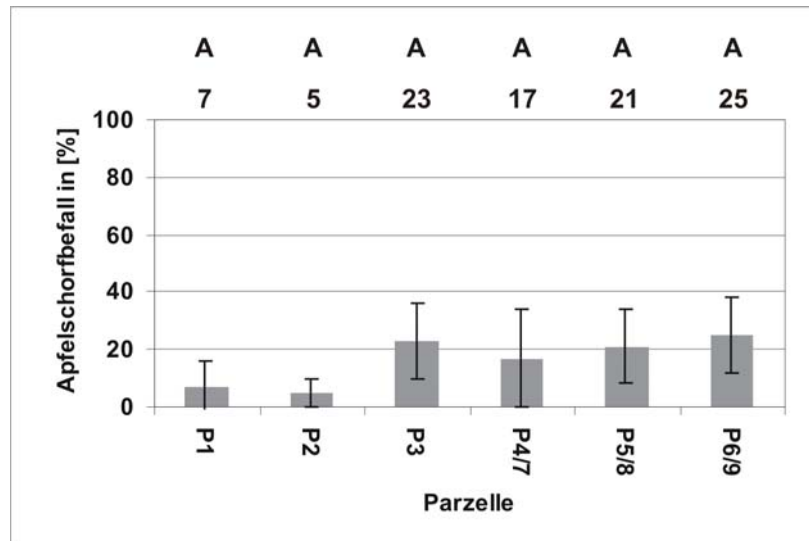


Abb.3.30: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 20.04.04 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der ersten Bonitur am 20.04.04 zeigen die Mittelwerte der künstlich infizierten Parzellen (P3, P4, P5, P6) mit 16 % - 25 % die Tendenz zu einer stärkeren Infektion als die unbehandelten Kontrollen (P1) mit 7 % und den nur mit Antagonisten behandelten Pflanzen (P2) mit 5 %. Statistisch jedoch ist noch kein signifikanter Unterschied zu belegen. Insgesamt wiesen die Holsteiner Cox Pflanzen an diesem frühen Termin aufgrund der schlechten Bedingungen für *V. inaequalis* eine niedrige Infektionsrate auf.

Bonitur der Holsteiner Cox Pflanzen am 08.06.04

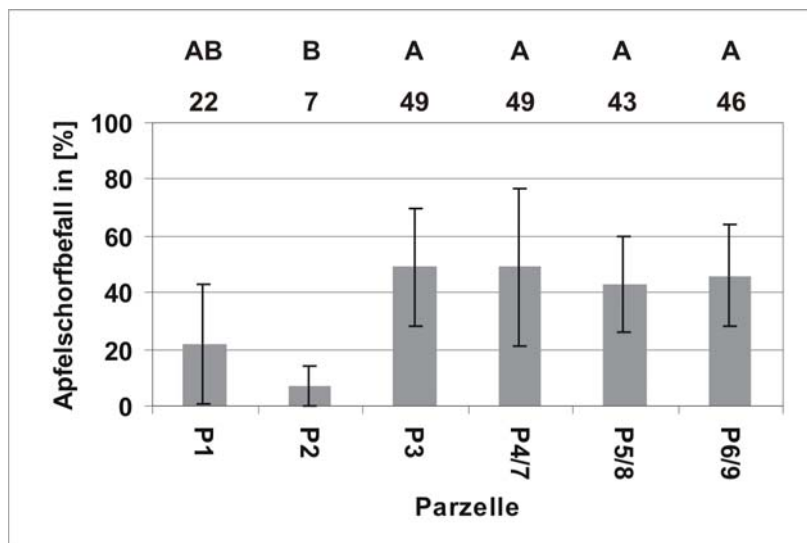


Abb. 3.31: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 08.06.04 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen. **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Auch bei der zweiten Bonitur am 08.06.04 zeigen die Mittelwerte der künstlich infizierten Parzellen (P3, P4, P5, P6) mit 43 % - 49 % die Tendenz zu einer stärkeren Infektion als die unbehandelten Kontrollen (P1) mit 22 % und den nur mit Antagonisten behandelten Pflanzen (P2) mit 7 %. Der natürliche Sporeneintrag hat sich von 7 % am ersten Boniturtermin auf 22 % am 09.07.04 also um 15 % erhöht. Bei den nur mit den Antagonisten behandelten Pflanzen erhöhte sich die Infektionsrate nur um 2 %. Statistisch ist ein signifikanter Unterschied zu belegen.

Bonitur am 08.07.04

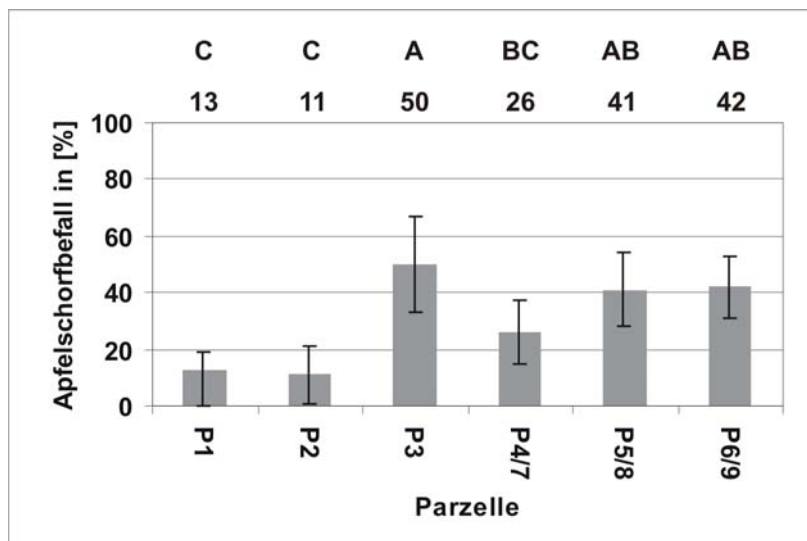


Abb. 3.32: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 08.07.04 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey-Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der dritten Bonitur am 08.07.04 zeigen die Mittelwerte der künstlich infizierten Parzellen (P3, P4, P5, P6) mit 26 % - 50 % die Tendenz zu einer stärkeren Infektion als die unbehandelten Kontrollen (P1) mit 13 % und den nur mit Antagonisten behandelten Pflanzen (P2) mit 11 %. Statistisch ist ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Parzellen ermittelt worden. Dabei sind die Kontrollparzelle und nur mit Antagonisten behandelte Bäume signifikant unterschiedlich zu allen anderen Varianten. Der natürliche Sporeneintrag hat sich von 22 % am vorhergehenden Boniturtermin auf 13 % erniedrigt, was durch die Ausbildung von neuen Blättern, die nicht alle infiziert werden konnten, zu erklären ist.

Bonitur am 12.08.04

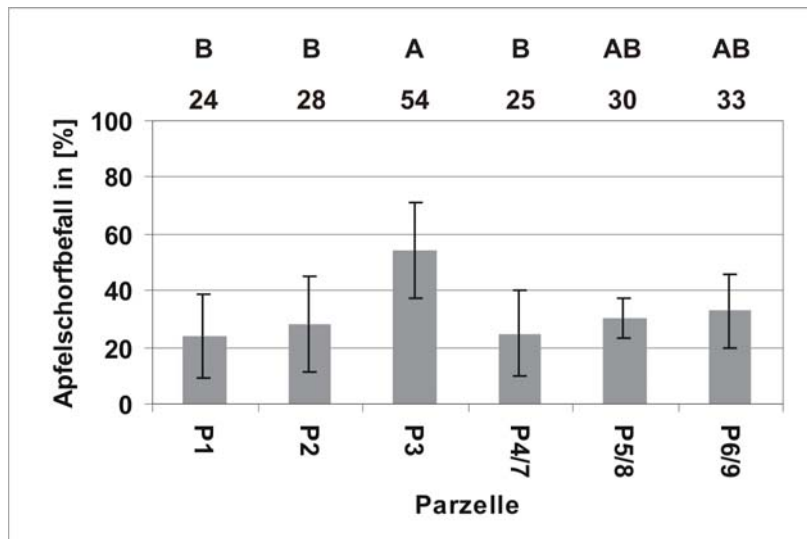


Abb. 3.33: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 12.08.04 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar.

Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey – Tests verglichen ($p < 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der vierten Bonitur wiesen die nur mit *V. inaequalis* behandelten Bäume mit 54 % die höchste Infektionsrate auf und waren signifikant unterschiedlich zu fast allen anderen Parzellen. Ähnlichkeiten bestanden nur zu den kurativ und zeitgleich behandelten, jedoch nicht zu den präventiv behandelten Bäumen. Das bedeutet, dass *P. fluorescens* Bk3 in der präventiv behandelten Variante die Apfelschorfsymptome reduzieren konnte. Der Wirkungsgrad des Antagonisten ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Bonitur am 17.09.04

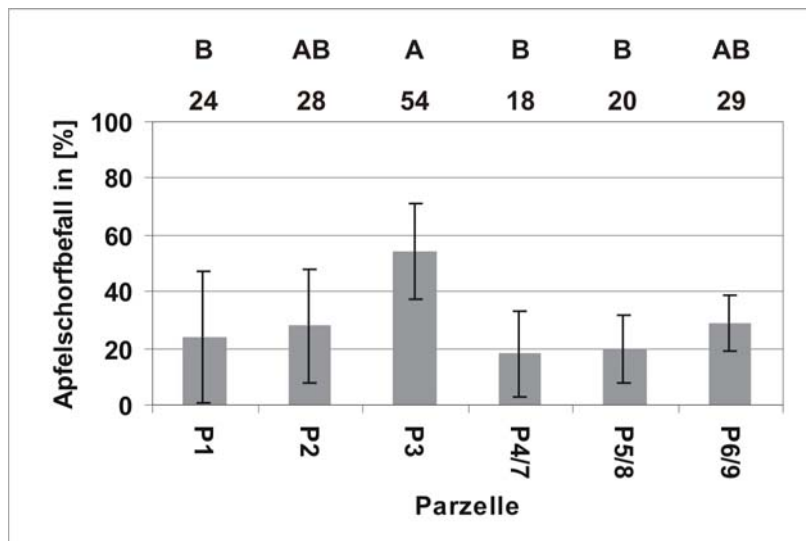


Abb. 3.34: Apfelschorfbefall der Holsteiner Cox Pflanzen am 17.09.04 in [%]. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ. Die Säulen stellen die Mittelwerte des Befallsgrades aller in einer Parzelle befindlichen Bäume mit Angabe der Standardabweichung dar.

Die Ergebnisse der Bonituren wurden mittels des Tukey – Tests verglichen ($p > 0,05$). **Gleiche Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parzellen. **Unterschiedliche Buchstaben:** signifikante Unterschiede zwischen den Parzellen **Parzellen mit zwei unterschiedlichen Buchstaben:** keine signifikanten Unterschiede zu beiden jeweils gleichen Buchstaben.

Bei der fünften Bonitur am 17.09.04 zeigen die Mittelwerte der künstlich infizierten Parzelle (P3) mit 54 % eine statistisch belegbar stärkere Infektion als die Parzellen (P1, P4, P5), die eine Befallsrate im Bereich von 18 % bis 24 % aufwiesen. Die nur mit Antagonisten behandelten Pflanzen (P2) mit 28 % und die kurativ behandelten Bäume mit 29 % zeigten zwar einen deutlich niedrigeren Mittelwert als die nur künstlich infizierten Pflanzen, statistisch jedoch weisen diese beiden Parzellen aufgrund ihrer hohen Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede zu den nur mit *V. inaequalis* behandelten Bäumen (P3) auf. Die signifikanten Unterschiede den künstlich infizierten Pflanzen zu den mit *P. fluorescens* Bk3 präventiv und gleichzeitig inokulierten Bäumen zeigt das Potenzial des Antagonisten die Apfelschorfsymptome im Freiland zu reduzieren.

3.2.3 Apfelschorfbefallsverlauf von *M. domestica* cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox in den Jahren 2003 und 2004

3.2.3.1 Apfelschorfbefallsverlauf cv. Elstar im Jahre 2003 und 2004

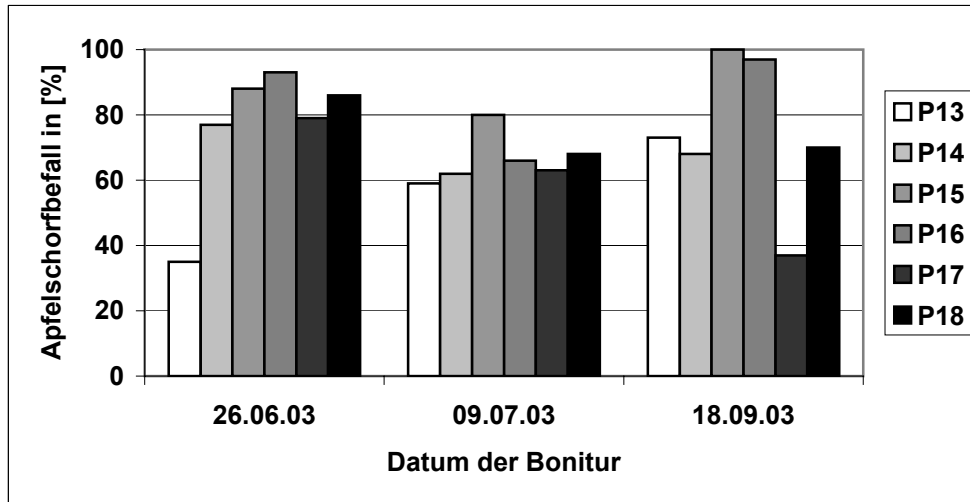


Abb. 3.35: Apfelschorfbefallsverlauf von *M. domestica* cv. Elstar über die gesamte Vegetationsperiode 2003. **Erste Bonitur:** 26.06.03. **Zweite Bonitur:** 09.07.03. **Dritte Bonitur:** 17.09.03 **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ.

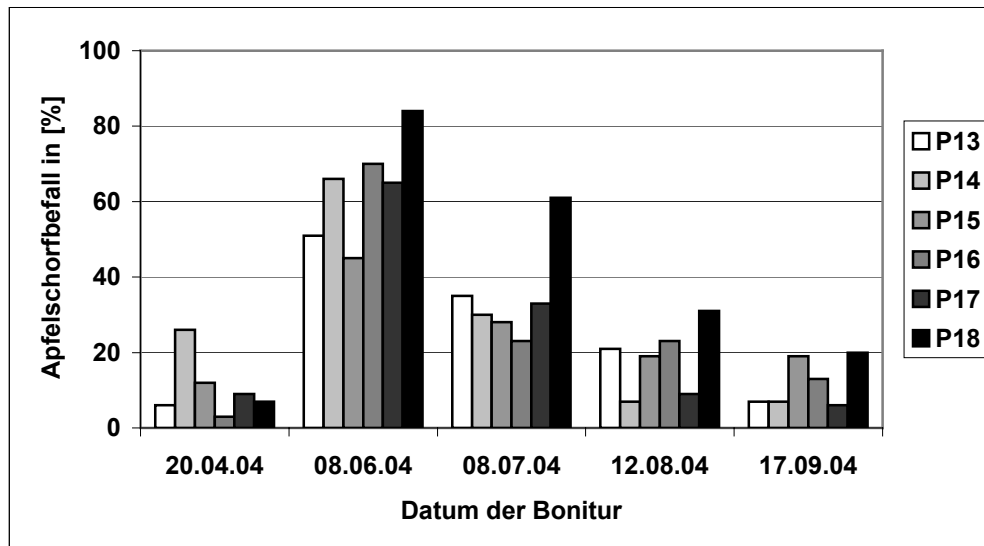


Abb. 3.36: Apfelschorfbefallsverlauf von *M. domestica* cv. Elstar über die gesamte Vegetationsperiode 2004. **Erste Bonitur:** 20.04.04. **Zweite Bonitur:** 08.06.04. **Dritte Bonitur:** 18.09.04. **Vierte Bonitur:** 12.08.04. **Fünfte Bonitur:** 17.09.04. **P13:** unbehandelte Kontrolle, **P14:** *P. fluorescens* Bk3, **P15:** *V. inaequalis*, **P16:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P17:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P18:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ.

Der Boniturverlauf beider Jahre ist gekennzeichnet durch ein Maximum der Befallsrate im Juni. Aus der Literatur ist bekannt, dass in diesem Abschnitt der Vegetationsperiode die Befallsraten am stärksten sind (MACHARDY 1996). Im Sommer sinkt die Befallsrate, um im Herbst bei optimaler Temperatur und Luftfeuchtigkeit für *V. inaequalis* wieder anzusteigen. Die hohen Befallsraten im Jahre 2003 hängen zusammen mit dem Adaptationsstress und der starken Mehltauinfektion, die zusätzlich zur künstlichen Apfelschorfinfektion zu bewältigen war. Die simultan behandelten Bäume zeigten am Ende der Vegetationsperiode den geringsten Apfelschorfbefall. Am Ende der Vegetationsperiode im Jahre 2004 zeigten die kurativ behandelte Variante und die nur künstlich infizierten Bäume die meisten Apfelschorfsymptome. Der Antagonist *P. fluorescens* konnte bei den präventiv und den simultan behandelten Bäumen die künstliche Infektion mit *V. inaequalis* unterdrücken.

3.2.3.2 Apfelschorfbefallsverlauf cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003 und 2004

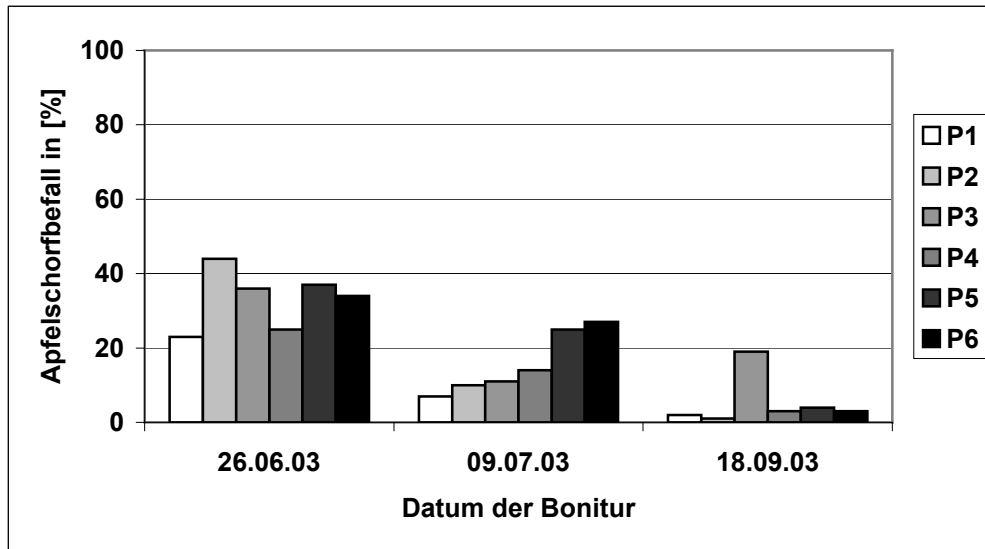


Abb. 3.37: Apfelschorfbefallsverlauf von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox über die gesamte Vegetationsperiode 2003. **Erste Bonitur:** 26.06.03. **Zweite Bonitur:** 09.07.03. **Dritte Bonitur:** 17.09.03. **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ.

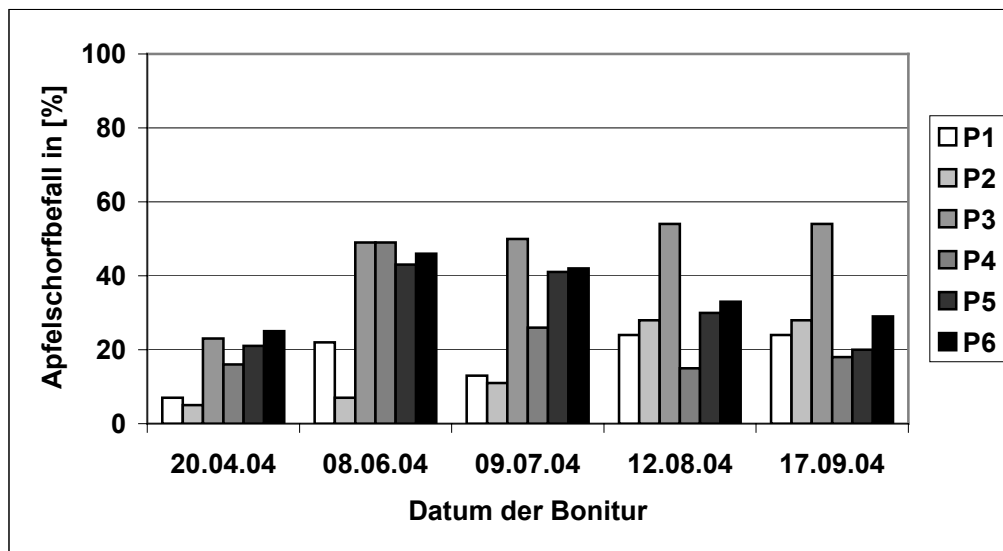


Abb. 3.38: Apfelschorfbefallsverlauf von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox über die gesamte Vegetationsperiode 2004. **Erste Bonitur:** 20.04.04. **Zweite Bonitur:** 08.06.04. **Dritte Bonitur:** 18.09.04. **Vierte Bonitur:** 12.08.04. **Fünfte Bonitur:** 17.09.04, **P1:** unbehandelte Kontrolle, **P2:** *P. fluorescens* Bk3, **P3:** *V. inaequalis*, **P4/P7:** *P. fluorescens* Bk3 präventiv, **P5/P8:** *P. fluorescens* Bk3 und *V. inaequalis* gleichzeitig, **P6/P9:** *P. fluorescens* Bk3 kurativ.

Wie zu erwarten fand die stärkste Infektion in beiden Jahren im Juni statt, da zu diesem Zeitpunkt optimale Witterungsbedingungen vorherrschen und viele junge Blätter vorhanden sind, die anfällig für Neuinfektionen sind. Im Herbst herrschen noch einmal optimale Bedingungen für eine starke Apfelschorfinfektion, allerdings wurde aus den in Kap. 3.2.2.1 angegebenen Gründen nur zweimal künstlich infiziert, so dass die Befallsrate trotz guter Witterungsbedingungen für den Pilz nicht mehr stark anstieg. Im Jahre 2004 wurde einmal im Monat über die gesamte Vegetationsperiode regelmäßig künstlich infiziert. Trotz guter Bedingungen für den Pilz im September ist die Befallsrate im Herbst deutlich gesunken, da die schnell und stark wachsenden Holsteiner Cox Pflanzen sehr viele neue Blätter entwickelt hatten, die zum Zeitpunkt der Infektion schon so alt waren, dass sie nicht mehr infiziert werden konnten. Die zusätzlich mit dem Antagonisten behandelten Pflanzen zeigten sehr viel niedrigere Befallsraten als die nur mit *V. inaequalis* behandelte Variante. Die Wirkungsgrade für die einzelnen Bonituren sind in Tab. 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Wirkungsgrade (Abbott) von *P. fluorescens* Bk3 gegen Apfelschorfsymptome auf *M. domestica* cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003

Datum der Bonitur	Elstar im Jahre 2003			Holsteiner Cox im Jahre 2003		
	präventiv	simultan	kurativ	präventiv	simultan	kurativ
26.06.03	0 %	10 %	2 %	31 %	0 %	6 %
09.07.03	18 %	21 %	15 %	0 %	0 %	0 %
18.09.03	3 %	63 %	30 %	84 %	79 %	84 %

Datum der Bonitur	Elstar im Jahre 2004			Holsteiner Cox im Jahre 2004		
	präventiv	simultan	kurativ	präventiv	simultan	kurativ
20.04.04	38 %	15 %	8 %	30 %	9 %	0 %
08.06.04	0 %	0 %	0 %	0 %	12 %	6 %
08.07.04	18 %	0 %	0 %	48 %	18 %	16 %
12.08.04	0 %	0 %	0 %	54 %	44 %	39 %
17.09.04	32 %	68 %	0 %	67 %	63 %	46 %

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die Wirkmechanismen von mikrobiellen Antagonisten in der Phyllosphäre von Pflanzen zu gewinnen, um diese dann zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten einsetzen zu können.

Voraussetzung für die Entwicklung und den Erfolg neuer Strategien zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten, ist die Kenntnis der Wirkungsweise, Eigenschaften und Zusammenhänge der beteiligten Komponenten. Bei der biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten mittels natürlicher Antagonisten gibt es drei Hauptkomponenten und mehrere untergeordnete Faktoren, die für den Erfolg verantwortlich sind.

Die drei Hauptkomponenten sind die Pflanze, der Antagonist und das Pathogen (Abb. 1.4). Diese drei beteiligten Elemente stehen in einem sehr komplexen Verhältnis zueinander und können untereinander in verschiedenen Kombinationen agieren (Abb. 1.4). Wie sich diese Interaktionen auswirken können ist wiederum abhängig von verschiedenen äußeren Faktoren wie Witterung oder anthropogenen Eingriffen. Als Modellsystem für die Untersuchungen dieser Wechselwirkungen wurde das Pathosystem Apfelbaum (*M. domestica*)/*V. inaequalis* mit dem mikrobiellen Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 herangezogen, wobei der Schwerpunkt im ersten Teil der Untersuchungen auf der Beziehung zwischen dem Antagonisten und der Wirtspflanze lag. Hingegen wurde im zweiten Teil das Pathogen mit in die Untersuchungen einbezogen und die Wirksamkeit des Antagonisten gegen *V. inaequalis* untersucht.

Im ersten Teil sollte mit molekularbiologischen Methoden die Auswirkung der Applikation von mikrobiellen Antagonisten in der Phyllosphäre auf Transkript- und Proteinebene untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Applikation dieser Mikroorganismen zur Neusynthese von Proteinen führt, die im Apoplasten transloziert werden. Weiterhin wurde mit Suppressions Subtraktions Hybridisierung eine umfassendere Analyse über die differentiell exprimierten Gene durchgeführt, welche durch die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 in *M. domestica* cv. Holsteiner Cox induziert wurden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit fand eine Untersuchung zum Potenzial von *P. fluorescens* Bk3 als biologisches Pflanzenschutzmittel gegen Apfelschorf an verschiedenen apfelschorfsuszeptiblen Kultivaren von *M. domestica*, im Freiland statt.

4.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Als Ausgangsmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen standen sterile *in vitro* Kulturen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zur Verfügung. Die Sterilität des Versuchsmaterials war sehr wichtig, damit Einflüsse durch andere biotische Faktoren als *P. fluorescens* Bk3 auf das Versuchssystem ausgeschlossen werden konnten. Dieses wurden mittels Blattabdrücken der Blattober- und -unterseiten nachgewiesen (Abb. 3.1).

4.1.1 PR-Proteine in *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

4.1.1.1 Nachweis von PR-Proteinen in der intrazellulären Waschflüssigkeit (IWF) des apfelschorfsuszeptiblen Kultivars *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach der Applikation des nicht-pathogenen Bakterienstammes *P. fluorescens* Bk3

Die Methode der Infiltrations-Zentrifugation ist ein etabliertes und häufig angewendetes Verfahren zur Isolierung von Proteinen aus dem Apoplasten (ROHRINGER et al. 1983, Hogue & Asselin 1987, HON et al. 1994, RAMANJULU et al. 1999, LOHAUS et al. 2001, ROGALLA & RÖMERHELD 2002, ZAMANI et al. 2003, GAU et al. 2004a). Von LOHAUS et al. (2001) wird für mehrere Pflanzenarten (*Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* und *Zea mays*) eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von ca. 700 x g empfohlen, was je nach Pflanzenart jedoch etwas variieren kann. Für *M. domestica* wurde von KOUTB (2003) mit dem ausschließlich cytosolisch vorkommenden Heat Shock Cognate Protein 70 (HSC 70) gezeigt, dass die ersten cytosolischen Kontaminationen erst zwischen 3000 und 7000 x g auftreten. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 700 x g gewählt, mit der die Höchstgrenze für cytosolische Verunreinigungen bei *M. domestica* weit unterschritten wurde.

Nach dem Besprühen von 5 im selben Tank befindlichen *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Pflanzen mit 2×10^9 Zellen des natürlichen Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 und Inkubation für fünf Tage zeigte die Analyse der IWF in der SDS-PAGE eine deutliche Veränderung der Proteinzusammensetzung in einem Bereich der molekularen Massen zwischen 15 und 45 kDa. Zusätzlich konnte die Abnahme einer niedermolekularen Proteinkomponente von 9 kDa beobachtet werden. Die nachfolgende Identifikation der

Proteinbanden in der ESI Q-ToF Massenspektrometrie ergab die erhöhte Expression von Chitinase oder Thaumatin-ähnlichem Protein, β -1,3-Glukanase, Hevein-ähnlichem (PR4) und Ribonuklease-ähnlichem Protein (PR10 b). Die niedermolekulare Bande wurde als nsLTP identifiziert. Der Immunoblot mit Antikörpern gegen Thaumatin-ähnliches Protein, Chitinase und β -1,3-Glukanase bestätigten die Akkumulation der PR-Proteine im Apoplasten nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk, wobei Chitinase nach einem Tag und das Thaumatin-ähnliche Protein sowie die β -1,3-Glukanase erst nach 5 Tagen nachgewiesen werden konnte. Die Chitinasen bilden die größte Klasse der PR-Proteine und umfassen PR-3, PR-4, PR-8 und PR-11 (Tab. 1.2). Die induzierten Chitinasen und β -1,3-Glukanasen kommen vorwiegend extrazellulär vor und wurden schon in verschiedenen Pflanzen beschrieben (BERNASCONI et al. 1987, LEGRAND et al. 1987, METRAUX et al. 1988, JEKEL et al. 1990). Die Hemmwirkung auf das Hyphenwachstum und damit die Unterdrückung der Ausbildung eines Myzels und die Hemmwirkung auf verschiedenen Phytopathogene *in vitro* sowie die mit der Induktion von Chitinase und β -1,3-Glukanase verbundene erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen konnte in mehreren Untersuchungen bestätigt werden. (SCHLUMBAUM et al. 1986, MAUCH et al. 1988, BROEKAERT et al. 1989, TOYODA et al. 1991, VAN PARIJS et al. 1991, ARLORIO et al. 1992, KUNZ et al. 1992, OPPENHEIM & CHET 1992, MELCHERS et al. 1994, DATTA 2001, FUNG et al. 2002, RAMAMOORTHY 2002, LIMON et al. 2004, WROBEL-KWIATKOWSKA et al. 2004, CHU & NG 2005, DUO-CHUAN et al. 2005, HOSTER et al. 2005, SAIKIA et al. 2005). Die identifizierten Banden I und II aus dem Tris-Tricin Gel (Abb. 3.2) zeigten ausschließlich Homologien zu Endochitinasen und Endoglukanasen, welche die Fähigkeit besitzen, Chitin bzw. Glukane zu hydrolysieren. Chitin ist ein unlösliches Biopolymer und kommt in allen hyphenbildenden Pilzen mit Ausnahme der Oomyceten in der Zellwand vor (MAYER 1997). Eine zweite in den meisten Pilzzellwänden enthaltene Substanz sind verschiedenen Glukane. Die Zellwand von *V. inaequalis* enthält 9 % Lipide, 28 % Hemizellulose, 13 % β -(y)-Zellulose, 2 % α -Zellulose, 7 % Chitin, 3 % Proteine, 27 % andere (JAWORSKI & WANG 1965). Auch sie enthält also einen Anteil an Chitin und einen großen Anteil an β -1,3-Glukanen in Form von Hemizellulose, die von β -1,3-Glukanasen hydrolysiert werden können (STRASBURGER 1991). Eine Hydrolyse der Hyphenzellwände und damit eine Hemmung des Myzelwachstums von *V. inaequalis* durch Chitinasen und β -1,3-Glukanasen liegt also im Bereich des Wahrscheinlichen und wurde von WOLTERS (2004) bestätigt. Auch BOLAR et al. (2001) zeigten an transgenen Apfelpflanzen, die konstitutiv einen erhöhten Level an Endochitinase exprimierten, eine gesteigerte Resistenz gegenüber *V. inaequalis*.

Das identifizierte Thaumatin-ähnliche Protein (PR-5) gehört ebenfalls zu den PR-Proteinen und wird ebenso wie Chitinase und β -1,3-Glukanase durch verschiedene Faktoren induziert, die für Chitinase und β -1,3-Glukanase schon angeführt wurden. Weiterhin besitzt das Thaumatin-ähnliche Protein ebenfalls antifungale Wirkung (HU & REDDY 1997, KOIWA et al. 1997, DATTA & MUTHUKRISHNAN 1999, HANSELLE et al. 2001, MONTEIRO et al. 2003). Manchen Proteinen der Klasse PR-5 wird auch eine leichte Glukanaseaktivität zugeschrieben (ZARAEIE et al. 2002, MENU-BOUAOUICHE et al. 2003), was ebenfalls auf eine antifungale Wirkung durch Hydrolyse der Hyphenspitzen hindeutet. In transgenen Pflanzen konnte eine Steigerung der Resistenz erreicht werden, wenn nicht nur ein PR-Protein, sondern Kombinationen von z.B. Endo- und Exochitinase (BOLAR et al. 2001) oder Chitinase und Thaumatin-ähnliches Protein zusammen exprimiert wurden (ZARAEIE et al. 2002, KALPANA et al. 2006). Die Kombination aus mehreren PR-Proteinen kann demnach die Resistenz steigern.

Die dritte Bande des Tris-Tricin Gels (Abb. 3.2) wurde anhand der Homologiesuche als PR-10b identifiziert. Die Funktion der PR-10 Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Für einige Proteine aus der PR10-Familie konnte Ribonucleaseaktivität nachgewiesen werden (SOMSSICH et al. 1986, BANTIGNIES et al. 2000, LIU et al. 2005). Man nimmt an, dass PR-10 Proteine in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen, da sie durch abiotische und biotische Faktoren (Pathogenabwehr, Verwundung, Elicitoren) induziert und akkumuliert werden sowie extrazellulär nachweisbar sind (BREDA et al. 1996, SIKORSKI et al. 1999, MCGEE et al. 2001, ZIADI et al. 2001, LIU et al. 2005, SRIVASTAVA et al. 2004). Die Induktion des PR10b im Apoplasten nach der Applikation des nicht-pathogenen Antagonisten in der vorliegenden Arbeit deutet auch auf eine Involvierung in den Mechanismus der induzierten Resistenz und damit auf eine Rolle in der Pathogenabwehr hin.

Die Bande V, welche nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 abnimmt, wurde als nichtspezifisches Lipid Transfer Protein (nsLTP) identifiziert. In der Literatur ist eine Suppression dieses Proteins nach erfolgter Infektion im Pathogensystem anderer Pflanzen beschrieben worden (Gerste cv. Bomi mit *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, GARCÍA-OLMEDO et al. 1995, *Lycopersicon esculentum* mit *Fusarium oxysporum*, REP et al. 2003, *M. domestica* cv. Elstar mit *Venturia inaequalis*, GAU et al. 2004, KOUTB 2006). Obwohl *P. fluorescens* Bk3, nicht pathogen ist, konnte in dieser Arbeit der gleiche Effekt beobachtet werden. Die Funktion des nsLTPs wird kontrovers

diskutiert. Neben antimikrobiellen Eigenschaften des nsLTPs (GARCÍA-OLMEDO et al. 1995, KADER 1996, GARCÍA-OLMEDO et al. 1998, WANG et al. 2004) wird auch eine Funktion als mobiles Signal im Langstreckentransport des Apoplasten vermutet (MALDONADO et al. 2002) sowie eine Funktion in der Pathogenerkennung und Steuerung der pflanzlichen Pathogenabwehr (BLEIN et al. 2002).

Die oben aufgeführten PR-Proteine Chitinase, β -1,3-Glukanase und Thaumatin-ähnliches Protein können aber nicht nur durch Pathogene, sondern auch durch eine Reihe von anderen Faktoren in der Pflanze induziert werden z.B. durch Verwundung, UV-Licht, Schwermetallbelastung, Salzstress und nicht pathogene Rhizobakterien (BEERHUES & KOMBRINK 1994, DIDIERJEAN et al. 1996, VAN LOON et al. 1998, DANI et al. 2005).

Mittels der Tris-Tricin Gelelektrophorese konnte der Nachweis erbracht werden, dass die gleichen PR-Proteine, die mit der induzierten Resistenz nach einer Pathogeninfektion und den schon mehrfach aufgeführten abiotischen und biotischen Faktoren korrelieren, auch durch die Applikation eines nicht pathogenen Antagonisten in die Phyllosphäre induziert werden können. Die Konsequenz, die sich daraus ergibt, ist eine mögliche erhöhte Resistenz gegenüber Phytopathogenen durch die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphäre von *M. domestica*. Bekräftigt wird diese Annahme dadurch, dass bei Untersuchungen des resistenten Kultivars Remo (DEGENHARDT et al. 2005) eine Reihe von konstitutiv exprimierten PR-Proteinen nachgewiesen wurde, welche auch nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 nachweisbar waren.

4.1.2 Nachweis von PR-Transkripten in *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Applikation des nicht-pathogenen Bakterienstammes *P. fluorescens* Bk3

4.1.2.1 RT-PCR

Die Transkriptionsanalysen mittels RT-PCR ergaben einen erhöhten Transkriptlevel aller drei überprüften PR-Gene (Chitinase, β -1,3-Glukanase, Thaumatin-ähnliches Protein) nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 in die Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox.

Als endogene Kontrolle wurde ein Elongationsfaktor aus *Medicago truncatula* eingesetzt, der konstitutiv exprimiert wird und im Pflanzenreich hochkonserviert ist (WULF et al. 2003). Die Primer für die nachzuweisenden PR-Gene wurden mit dem Hintergrund der Analysen

auf Translationsebene ausgewählt und bestätigten die vorhergehenden Ergebnisse des Tris-Tricin Gels und des Immunoblots. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen konnten für Thaumatin-ähnliches Protein, Chitinase und β -1,3-Glukanase erhöhte Transkriptlevel nachgewiesen werden, was in einer PR-Proteinakkumulation resultiert, die wiederum eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen vermitteln kann.

4.1.2.2 Differenzielles Screening der Transkripte von Blättern des apfelschorfsuszeptiblen Kultivars *M. domestica* cv. Holsteiner Cox vor und nach Applikation des nicht-pathogenen Bakteriumstammes *Pseudomonas fluorescens* Bk3

Zur Identifizierung der durch die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 induzierten Gene in *M. domestica* Holsteiner Cox wurde eine Differenzanalyse (Suppressions Subtraktions Hybridisierung, DIATCHENKO et al. 1996) zwischen einer unbehandelten Kontrolle und einer mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanze durchgeführt. Diese Methode ist ein differenzielles Screening auf der Basis von mRNA und ermöglicht vor allem die Identifizierung einer großen Anzahl auch unbekannter und nur schwach exprimierter Gene. Die Analyse resultierte in einer Subtraktionsbibliothek mit insgesamt 157 Klonen. Zur Selektion, der durch Amplifizierung normierter Gene, wurde ein Reverse-Northern Blot in Form eines Dot Blots durchgeführt. Als stärkste Spots erwiesen sich 1, 3, 6, 7, 68, 71, 72, 76, 78 (Tab. 6.1), wobei die Stärke der Spots jedoch nicht unbedingt eine Aussage über die Transkriptmenge erlaubt, da diese von der Transkriptstabilität und der Promotorstärke abhängt. Jedoch weisen die Unterschiede von der unbehandelten Kontrolle zu der mit dem Antagonisten behandelten Pflanze eindeutig auf ein differentes Expressionsmuster hin. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression wurden 116 cDNA-Fragmente zur Sequenzierung ausgewählt. Die Datenbankanalyse engte die 114 sequenzierten cDNA-Fragmente jedoch auf 51 individuelle Gene ein (Tab 3.2), die in sechs Klassen eingeteilt wurden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Gruppenzugehörigkeit der 51 individuellen Klone der SSH-Analyse

PR-Proteine	22 %
Stressinduzierte Proteine	14 %
Komponenten der Signaltransduktion/ Transkriptionsfaktoren	14 %
Proteine des Nukleinsäuremetabolismus	26 %
Andere	18 %
Unbekannte Funktion/keine Homologien	4 %

Auffällig ist der hohe Anteil an Genen, die am Nukleinsäuremetabolismus beteiligt sind. Die meisten identischen Klone aus dieser Gruppe wurden als 2 verschiedene ribosomale Proteine mit einer Anzahl von 37 (Ribosomal ly200 Protein) bzw. 12 (Ribosomal Protein L32) sequenziert. Als Ursache dafür ist die erhöhte Aktivität der Translationsmaschinerie in Betracht zu ziehen.

Wie zu erwarten, konnte auch in dem differentiellen Screening in Übereinstimmung mit den vorhergehenden Analysen (Abb. 3.2, 3.3 und 3.4) ein erhöhter Transkriptlevel an PR- und stressinduzierten Proteinen ermittelt werden. Allerdings befand sich darunter weder Thaumatin-ähnliches Protein noch β -1,3-Glukanase, wie es aufgrund der Versuche auf Proteinebene zu vermuten gewesen wäre. Übereinstimmungen mit den 4 gefundenen PR-Proteinen in der IWF ergaben sich nur in zwei Fällen, nämlich bei der Endochitinase Klasse III und dem Ribonuklease-ähnlichen Protein PR-10b. Dafür, dass nur zwei von vier Übereinstimmungen gefundenen wurden, können unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein. Es besteht die Möglichkeit, dass das differentielle Screening nicht allumfassend war, oder in der Tris-Tricin Gelelektrophorese wurden evtl. nicht alle Banden erfasst, da diese teilweise sehr dicht beieinander liegen und dadurch nicht als einzelne Bande charakterisiert werden können. Die Gene aus der Gruppe der PR-Gene und die der stressinduzierten Gene sind typische Vertreter des Phänomens der induzierten Resistenz. Das Auftreten nach Pathogeninfektion verweist auf eine Markerwirkung der genannten Gene für die induzierte Resistenz (HOEGEN 1998).

Die relativ hohe Anzahl (14 %) von Transkripten für Proteine mit einer Funktion bei der Reduzierung von oxidativem Stress oder Stress im Allgemeinen, wie die manganabhängige Superoxiddismutase (SOD), ein Thioredoxin-ähnliches Protein und mehrere Hitzeschock-Proteine oder die Glutathion-S-transferase (GST), weisen ebenso wie die PR-Proteine auf die Induktion einer aktiven Pathogenabwehr in der Pflanze hin. Eine Akkumulation der SODs wurde durch verschiedene Stimulationen, die schon im Zusammenhang mit der induzierten Resistenz genannt wurden, in mehreren Studien

beschrieben (DOKE et al. 1996, REJEB et al. 2004, JANISH & SCHEMPP 2004, ZHANG et al. 2005). Die Transkription des *SOD-Genes* ist ein weiterer Hinweis für die Ähnlichkeit zu den Mechanismen, die durch die schon mehrfach genannten biotischen oder abiotischen Faktoren eingeleitet werden und zu einer induzierten Resistenz führen. Die SOD katalysiert die Reaktion von Sauerstoffradikalen zu (O_2^-) zu Hydrogenperoxid (H_2O_2). H_2O_2 tritt lokal bei Papillenbildung und der Ausbildung der hypersensitiven Reaktion (HR) auf (Prell 1996). Die Funktion des H_2O_2 ist noch nicht vollständig geklärt. In hohen Konzentrationen kann es den programmierten Zelltod auslösen (LEVINE 1994). Weiterhin wird eine Funktion als Signalmolekül diskutiert (LANGEN et al. 1998). Es kann in hoher Konzentration eine direkte antimikrobielle Wirkung auf Pathogene haben (SUTHERLAND 1991). Der oxidative Burst kann in seiner schwächsten Form ohne sichtbare Symptome ablaufen (PRELL 1996).

Durch das Nichtzustandekommen eines Krankheitsbildes in der Pflanze werden die applizierten Mikroorganismen als nicht pathogen eingestuft, trotzdem rufen sie auf Transkriptionsebene die gleichen Mechanismen hervor wie ein Pathogen, allerdings ohne ein erkennbares Schadpotenzial für die beteiligte Wirtspflanze. Trotzdem kann diese Reaktion in einer erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen resultieren. Diesen Effekt macht man sich heutzutage in der biologischen Kontrolle von Phytopathogenen zunutze (STIERL 1999). Auch das verstärkt exprimierte Germin-ähnliche Protein deutet auf den eben beschriebenen Mechanismus hin. Der erhöhte Transkriptlevel von Genen aus der Familie der Germin-ähnlichen Proteine, induziert durch verschiedene Stresssituationen wie Pathogeninfektion oder Salzstress, aber auch durch Mycorrhiza, wurden auch mehrfach beschrieben (DOLL et al. 2003, PARK et al. 2004, JOHNK et al. 2005, DANI et al. 2005).

Erwähnenswert ist auch die heraufregulierte Expression der Gluthation-S-Transferase (GST). Die Gluthation-S-Transferasen sind vorwiegend cytoplasmatisch und kommen in geringer Konzentration konstitutiv in Pflanzen und Tieren vor (FLURY et al. 1992). Von FLURY et al. (1996) wurden die GSTs erstmals auch extrazellulär durch Stimulation mit TIBA (2,3,5-Trijodbenzoesäure) induziert. Ihr extrazelluläres Vorkommen deutet auf eine Involvierung in die Mechanismen der induzierten Resistenz hin.

Ein hochreguliertes Gen aus der Gruppe der PR-Gene ist das Gen für Major Allergen (Mal d1), welches aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu anderen PR-Genen in die Gruppe der *pathogenesis related proteins* eingeordnet wurde. Mal d1 ist das Hauptallergen in *M. domestica*, welches bei Patienten, die sensitiv auf Pollen von Bäumen

reagieren, Allergien auslösen kann. Es wird wegen seiner signifikanten Ähnlichkeit mit Bet v 1, dem Hauptallergen von Birkenpollen, zu den PR-Proteinen (PR-10) gezählt (BREITENEDER et al. 2000). Ebenfalls bekannt ist, dass Mal d 1 durch Pathogeninfektion und Stressfaktoren in jungen Blättern von *M. domestica* induziert werden kann (PÜHRINGER et al. 2000). BEUNING et al. (2004) beschrieb nach einer Infektion mit *V. inaequalis* in Blättern von *M. domestica* einen erhöhten Transkriptlevel von 8 verschiedenen Mal d1-Gen-Produkten. Der erhöhte Transkriptlevel des Mal d1 Gens nach der Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 unterstützt die These, dass die Applikation des nicht pathogenen Bakteriums *P. fluorescens* Bk3 dieselben Mechanismen der induzierten Resistenz auslösen kann wie eine Pathogeninfektion oder die schon mehrfach genannten biotischen und abiotischen Faktoren.

Weiterhin wurde in der Gruppe der allgemeinen Abwehrgene ein ADP-Ribosylierungsfaktor verstärkt exprimiert, welcher aus der Familie der GTP-bindenden Proteine, die am intrazellulären Proteintransport im Zusammenhang mit dem Golgi Apparat beteiligt sind, stammt. ADP-Ribosylierungsfaktor wurde auch von XIONG (2001) beim differentiellen Screening von Reisgenen nach einer Pathogeninfektion gefunden.

Von besonderem Interesse ist auch das Enzym 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat Oxidase (ACO). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) zu Ethylen, welches als Phytohormon einerseits in der Seneszenz eine Rolle spielt, aber andererseits auch vielfach als Elicitor für die Signaltransduktion nach Pathogeninfektion und verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren beschrieben ist. Eine Akkumulation von ACO wurde auch von COHN & MARTIN (2005) nach der Infektion mit dem Pathogen *P. syringae* spp. nach mechanischer Verletzung in Bambuspflanzen (BHOWMIK & MATSUI 2005) und nach einer *Fusarium* Infektion in der Kartoffel (ZANETTI et al. 2002) beschrieben. Vor dem Hintergrund der induzierten Resistenz und der damit verbundenen Signaltransduktionskaskade, die in der Ausbildung aktiver Abwehrmechanismen in der Pflanze resultiert, ist die erhöhte Transkriptmenge von ACO nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 eine weitere Bestätigung für die Induktion der induzierten Resistenz durch das Bakterium.

Weitere differentiell exprimierte Gene, welche die oben ausgeführten Vermutungen bestätigen, sind das Cytochrom P450 (Biosynthese- und Abbauprozesse), 2-Oxoglutarat-Fe(II)-Oxygenase oder Flavonol-Synthase (Pathogenabwehr), O-Methyltransferase (Zellwandverstärkung), Avr9/Cf-9 Rapidly Elicited Protein 284 / putative Phosphatase und Proteasome Untereinheit α -Type 4 (Proteindegradation).

Mit elf ausgewählten Primern aus verschiedenen Gruppen (PR-Proteine, stressinduzierte Proteine und Komponenten der Signaltransduktion/ Transkriptionsfaktoren; Tab. 4.1) wurde eine Real-time PCR (q-PCR) zur Überprüfung der unterschiedlich exprimierten Gene nach der Applikation von *P. fluorescens* Bk3 durchgeführt. Die Real-time-PCR-Methode wurde eigentlich zur Quantifizierung von DNA in der Medizin entwickelt, kann aber auch komparativ eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wird sie eingesetzt, um eine vergleichende Analyse durchzuführen. Hauptsächlich wurden Gene aus der Klasse der PR-Proteine und der stressinduzierten Gene für den Vergleich ausgesucht, da diese von besonderem Interesse sind (Proteasome subunit Alpha type 4, Avr9/Cf-9 rapidly elicited Protein 284, ADP-Ribosylations Faktor, Ribonuclease-ähnliches PR-10b, Endochitinase class III, Germin-ähnliches, Glutathione-S-transferase Heat Shock Protein 90, Transkriptionsfaktor aus der CLTPM1 Familie. Auch das Thaumatin-ähnliche Protein und die β -1,3-Glukanase wurde in diesem Rahmen analysiert, da sie auf Proteinebene gefunden wurden. Diese Methode basiert auf der Markierung der cDNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Für diese Methode verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, welcher die Eigenschaft hat, unspezifisch in Doppelstrang-DNA zu interkalieren. Dies führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals, wodurch eine Akkumulation der amplifizierten DNA schon in geringen Konzentrationen detektiert werden kann. Durch die Messung nach jedem PCR-Zyklus ist die Detektion des Anstiegs der cDNA gewährleistet, was diese Methode sehr sensitiv macht.

Für alle Gene wurde eine unterschiedliche Expression zwischen der Kontrolle und der mit dem Antagonisten behandelten Kontrolle gefunden (Tab. 3.3, Abb. 3.12). Den größten Unterschied wiesen die PR-Proteine Chitinase und Thaumatin-ähnliches Protein mit einer Differenz von 10^6 und 10^5 auf, da in den Kontrollpflanzen auch nach 35 Zyklen kein bzw. nur ein kleiner Anstieg in der rel. Fluoreszenz nachzuweisen war (Abb. 4.1). Im Vergleich dazu wiesen die anderen Gene einen Unterschied in der rel. Fluoreszenz im Bereich von 1-50 auf.

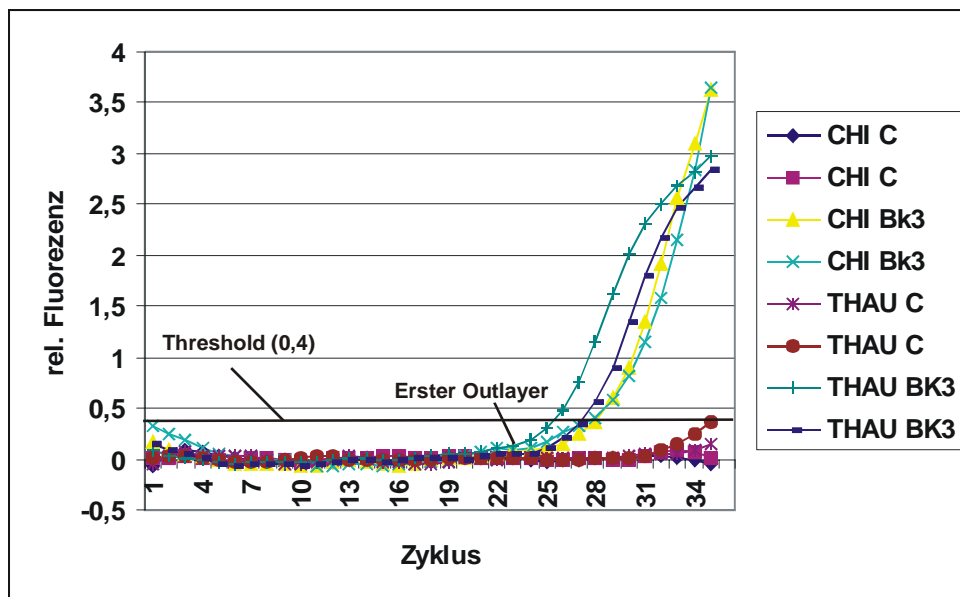


Abb. 4.1: Signalverlauf während der PCR. Exemplarisch sind hier die beiden PR-Proteine Chitinase und Thaumatin aufgeführt, da diese die größten Differenzen zwischen den Kontrollpflanzen und den mit *P. fluorescens* Bk3 behandelten Pflanzen aufwiesen. **CHI:** Chitinase, **THAU:** Thaumatin-ähnliches Protein, **C:** Kontrolle, **Bk3:** mit *P. fluorescens* Bk3 behandelte *M. domestica* cv. Holsteiner Cox *in vitro* Kulturen.

4.2 Biologische Kontrolle von *V. inaequalis*

Schon im 19. und 20. Jahrhundert verursachte der Pilz *V. inaequalis* enorme wirtschaftliche Schäden, was dazu veranlasste, sich intensiv mit der Erforschung der Biologie des Erregers der Ursachen und Bekämpfung des Apfelschorfs zu beschäftigen. Im Laufe der Zeit konnten verschiedene Ansätze zur Bekämpfung des Apfelschorfs entwickelt werden. Die chemisch-synthetischen Pestizide oder Kupferpräparate erzielen einen hohen Wirkungsgrad, bergen jedoch eine Reihe an Folgeproblemen wie aufwendige Entsorgungen, Resistenzen in den Pathogenen, Rückstände im Boden, im Grundwasser und in den Früchten, die zu gesundheitlichen Schädigungen des Konsumenten führen können (BLE 2003). In den letzten 30 Jahren stieg das ökologische Bewusstsein der Bevölkerung sprunghaft an, was dazu führte, dass verstärkt umweltschonendere Maßnahmen auch im integrierten Erwerbsobstbau ergriffen wurden. Schon vor der Entwicklung der heute zahlreich bekannten chemisch-synthetischen Fungizide gegen *V. inaequalis* kannte und nutzte man die Wirkung von anorganischen Fungiziden wie Calcium, Schwefel und Kupferpräparaten (BLE 2003). Bis jetzt werden im ökologischen Anbau Kupfer (bis 2002), Schwefelkalkpräparate und Gesteinsmehle

eingesetzt. Bis zum Jahre 2002 waren kupferhaltige Präparate für den ökologischen Apfelanbau zugelassen und stellten einen festen Bestandteil in der Bekämpfung, vor allem gegen *V. inaequalis* dar. Aufgrund der nicht unbedenklichen Auswirkungen von Kupferpräparaten auf den Naturhaushalt und der Toxizität gegen Mikroflora und -fauna (KLOSKOWSKI 1999; KULA 1999; SPANGENBERG 1999) ist die Anwendung von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln im ökologischen Landbau seit Dez. 2002 nicht mehr erlaubt (EU-VERORDNUNG 2092/91).

Eine präventive Methode gegen den Apfelschorf ist die Züchtung resistenter Sorten, wobei Resistenzgene aus verschiedenen Apfelwildsorten in wirtschaftlich bedeutende Sorten eingekreuzt werden. Die neuen resistenten Sorten aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Dresden/Pillnitz garantieren eine Fungizidreduzierung von bis zu 80 % (FISCHER & FISCHER 1999). Die am weitesten verbreitete Resistenz gegenüber *V. inaequalis*, vermittelt durch das V_r -Gen aus *M. floribunda*, ist bereits von *V. inaequalis* (Rasse 6 und 7) durchbrochen worden (PARISI et al. 1993, MACHARDY 1996, PEIL mündlich 2005). Die Durchbrechung der Resistenzen durch *V. inaequalis* ist sehr wahrscheinlich, da der Pilz jährlich eine sexuelle Rekombination durchläuft und deswegen eine schnelle Anpassungsfähigkeit besitzt. Weitere Probleme der Resistenzzüchtungen sind die lange Dauer bis zur Marktfähigkeit der neuen Sorte (bis zu 40 Jahren) und die danach evtl. geringe Akzeptanz beim Verbraucher (STEHR 2000, PEIL 2005). Daher stellt die Resistenzzüchtung keine alleinige Lösung zur Kontrolle von *V. inaequalis* dar.

Eine andere präventive Maßnahme zur Kontrolle des Apfelschorferregers ist die Anwendung gentechnischer Methoden. Durch den Gentransfer monogen kontrollierter Faktoren, wie z.B. der Stilbensynthese aus *Vitis vinifera*, welche die Bildung des Phytoalexins Resveratrol katalysiert, des PGIP-Gens (Polygalakturonase-inhibierende Proteine) aus *Actinidia deliciosa* oder verschiedener PR-Gene kann man das Repertoire der Abwehrmechanismen von *M. domestica* erweitern und damit die Pathogenabwehr positiv beeinflussen (SZANKOWSKI 2002, ANAND et al. 2003, SZANKOWSKI et al. 2003). Diese Methode stellt einen weiteren Ansatz zur Verbesserung der Pilzresistenz wirtschaftlich relevanter und vom Verbraucher akzeptierter auf dem Markt etablierter Apfelsorten dar. Allerdings ist auch hier die Akzeptanz des Verbrauchers generell im Hinblick auf gentechnisch veränderte Nahrungsmittel in Frage gestellt (STEHR 2000).

Vor diesem Hintergrund besteht der Bedarf an der Entwicklung einer weiteren Alternative zu dem übermäßigen Einsatz von chemischen Fungiziden im Erwerbsobstbau, die das Hauptthema dieser Arbeit darstellt, nämlich die biologische Kontrolle von *V. inaequalis* mittels natürlicher Antagonisten. An dieser Stelle sei jedoch bemerkt, dass diese Methode

keine der zuvor aufgeführten Ansätze überflüssig macht, sondern auch eine Kombination aus verschiedenen Ansätzen denkbar wäre. Die biologische Kontrolle von Pathogenen wurde für verschiedene Pathosysteme schon erfolgreich angewendet (RISBETH 1963, GRAVEL et al. 2005). In Deutschland sind heutzutage 13 Pflanzenstärkungsmittel auf mikrobieller Basis zugelassen z.B. die Pilze *Tichoderma* spp. und *Pythium oligandrum* und bei den Bakterien *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas* ssp. (BLE 2004).

4.2.1 Das Potenzial von *P. fluorescens* Bk3 zur biologischen Kontrolle von *V. inaequalis*

Das Verfahren zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten durch die Applikation natürlicher, epiphytisch lebender, nicht-pathogener antagonistischer Mikroorganismen stellt ein vielversprechendes Verfahren dar. Ein Ansatz ist die biologische Schorfbekämpfung mit Hilfe von mikrobiellen Antagonisten, die direkt oder indirekt hemmend auf *V. inaequalis* wirken (BURR et al. 1996, PHILION et al. 1997, OUIMET et al. 1997, FISS 2001). Die Kenntnis der Ökologie und Mikroflora in der Phyllosphäre ist die Voraussetzung für den Erfolg dieser Methode (ANDREWS 1990, HANDELSMANN & STABB 1996). Mit dem Einsatz antagonistischer Mikroorganismen bei der biologischen Bekämpfung in der Phyllosphäre wird versucht, die Zusammensetzung auf der Blattoberfläche zugunsten der gezielt eingesetzten Antagonisten zu verschieben (KINKEL et al. 1989). Voraussetzung dafür ist die Etablierung des Antagonisten auf der Blattoberfläche. Die Etablierung von Antagonisten in der Phyllosphäre wird allgemein als sehr schwierig eingestuft (CARISSE 2000). Von GAU et al. (2002) wurde für *P. fluorescens* Bk3 Tn::gflux gezeigt, dass dieser Stamm in der Lage ist, sich auf der Blattoberfläche von sterilen *M. domestica* zu etablieren und sich über die gesamte Pflanze auszubreiten. Dies war einer der Gründe warum der Stamm *P. fluorescens* Bk3 für die Feldversuche zur biologischen Kontrolle von *V. inaequalis* ausgewählt wurde. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen in der Phyllosphäre kann während der Vegetationsperiode stark variieren (THOMPSON et al. 1993, ERCOLANI 1991), da diese einer hohen Fluktuation bezüglich des Nährstoffangebots und physikalischer Eigenschaften unterliegen (LINDOW & BRANDL 2003). Die Konsequenz daraus ist, dass *P. fluorescens* Bk3 trotz erfolgreicher Etablierung durch verschiedene Umwelteinflüsse durchaus wieder verdrängt werden kann. Mehrmaliges Inokulieren mit dem Antagonisten während einer Vegetationsperiode

ist demnach notwendig, um das Vorhandensein zu den Infektionszeitpunkten sicherzustellen.

Die Zusammensetzung und die Eigenschaften des eigenständigen Lebensraumes Phyllosphäre wird ebenfalls stark durch Pestizide beeinflusst (ANDREWS & KENERLEY 1978), deswegen wurde in dieser Arbeit ein Antagonist eingesetzt, der aus einer seit dreizehn Jahren ökologisch geführten Obstanlage von einem intakten uninfizierten Blatt von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox stammt und von Prof. G. Auling aus dem Institut für Mikrobiologie in Hannover freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Für eine umfassende Interpretation der Versuchsergebnisse ist die Aufzeichnung und Analyse der Witterungsdaten während des Infektionsverlaufes sehr hilfreich. Statt der üblichen Schorfwarngeräte wie sie im Erwerbsobstbau eingesetzt werden, wurde ein Datenmessgerät direkt zwischen den Bäumen installiert. Der Datenlogger lieferte stündlich, genaue Angaben über die rel. Luftfeuchtigkeit und die Temperatur, sodass Aussagen über die Blattnässezeiten getroffen werden konnten. Die Aufnahme des Witterungsverlaufes direkt in der Versuchsanlage war notwendig, da die Witterungsdaten von den regulären Messstationen nicht auf alle Standorte übertragbar sind. Wichtige Auswahlkriterien für den pathogenen Pilz bei dem Einsatz zur biologischen Bekämpfung sind die Wirtsspezifität und die Virulenz des Erreger. Das in dieser Arbeit verwendete Isolat stammt aus einer durch *V. inaequalis* hervorgerrufenen Läsion eines Elstarkultivars und ist auf diesem demnach virulent. Die Virulenz für das Isolat 15 von *V. inaequalis* wurde auch gegenüber dem Kultivar Holsteiner Cox bestätigt (SZANKOWSKI 2002) und von Dr. Katja Schulze (Institut für Gemüse- und Obstbau Universität Hannover freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Virulenz konnte in dem, in dieser Arbeit durchgeführten, *in vivo*-Experiment auch auf dem Kultivar Holsteiner Cox bestätigt werden.

Der Versuchsaufbau des Feldversuches war in vier Kategorien geteilt:

1. unbehandelte Kontrolle (natürlicher Sporeneintrag von außen)
2. Nur *P. fluorescens* Bk3 (Wirkung des Antagonisten auf *M. domestica*)
3. Nur *V. inaequalis* (Effizienz der künstlichen Infektion)
4. *P. fluorescens* Bk3 + *V. inaequalis* (Wirkungsgrad der Antagonisten zur Befallsreduzierung)
 - 4a. Präventive Maßnahme
 - 4b. Gleichzeitige Inokulation mit *V. inaequalis*
 - 4c. Kurative Maßnahme

1. Unbehandelte Kontrolle: Die Infektionsraten des natürlichen Apfelschorfbefalls aus der Umgebung in der unbehandelten Kontrolle lagen für das apfelschorfsuzepthible Kultivar Elstar in jedem Jahr und in fast jeder Variante sehr viel höher als bei dem apfelschorfsuzepthiblen Kultivar Holsteiner Cox. Die Apfelsorte Elstar konnte an diesem Standort bezüglich des natürlichen Apfelschorfbefalls als sehr viel anfälliger eingestuft werden.

2. Nur *P. fluorescens* Bk3: Am Anfang der 2. Vegetationsperiode deutete das morphologische Erscheinungsbild der Versuchspflanzen auf keinen guten Gesundheitszustand hin. Die Pflanzen zeigten Symptome von Trockenstress, braunen Flecken und einen immensen Insektenbefall durch Blattläuse. Der Antagonist wurde in der ersten und am Anfang der zweiten Vegetationsperiode in LB-Medium im Labor angezogen und in LB-Medium auf die Freilandpflanzen ausgebracht. Da LB-Medium ein Vollmedium ist, kann sich *P. fluorescens* Bk3 optimal darin entwickeln. Nun ist es aber möglich, dass auch tierische Schädlinge das LB-Medium als Nahrungsquelle nutzen und dadurch die Pflanzen sehr stark von tierischen Schädlingen befallen waren.

Der allgemeine Zustand der Pflanzen besserte sich entscheidend zum Ende der 2. Vegetationsperiode, da ab der dritten künstlichen Inokulation die Antagonisten aus dem LB-Medium abzentrifugiert und in Wasser auf die Freilandpflanzen ausgebracht wurden. Trotz allem zeigten die Pflanzen, die mit dem Antagonisten behandelt waren, und auch die mit Antagonist und künstlich mit dem Pilz behandelten Pflanzen insgesamt weniger Apfelschorfsymptome als die nur künstlich infizierten Pflanzen.

3. Nur *V. inaequalis*: Entscheidend für die Bewertung der Wirkung von *P. fluorescens* Bk3 ist die Aufzeichnung des tatsächlichen Infektionsverlauf von *V. inaequalis*, damit die Leistungseffizienz der Antagonisten, im Vergleich zu der Befallsstärke, ohne die Antagonisten ermittelt werden kann. Deswegen wurde eine Parzelle nur mit *V. inaequalis* behandelt, um die tatsächliche Stärke der künstlichen Infektion zu ermitteln. Auf beiden Kultivaren in beiden Vegetationsperioden war die künstliche Infektion in den meisten Fällen erfolgreich.

4. *P. fluorescens* Bk3 + *V. inaequalis*: Die Antagonisten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Freilandpflanzen inokuliert.

- 4a. Präventive Maßnahmen (24 h -36 h vor der Inokulation mit *V. inaequalis*)
- 4b. Gleichzeitige Inokulation mit *V. inaequalis*
- 4c. Kurative Maßnahmen (24 h -36 h vor der Inokulation mit *V. inaequalis*).

Die Inokulation erfolgte durch eine Drucksprühapplikation mit einem Drucksprühgerät der Marke Gloria auf die Ober- und Unterseite der Blätter. Diese Maßnahme kann ein entscheidender Faktor für den Erfolg der biologischen Kontrolle von Apfelschorf mit *P. fluorescens* Bk3 sein, denn das Etablierungsverhalten von Mikroorganismen kann auf der Blattober- bzw. unterseite unterschiedlich verlaufen. GAU et al. (2002) gelang es, den Etablierungsverlauf von *P. fluorescens* BK3 Tn::gfp_{lux} auf Blattober- und -unterseite von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox über neun Tage mittels Biolumineszenzmessungen zu verfolgen. Die Etablierungsverläufe sind klar voneinander zu trennen. Auf der Blattoberseite konnte nach einem und zwei Tagen die Wanderung zum Spross dokumentiert werden, wobei nach drei Tagen die metabolische Aktivität nicht mehr nachweisbar war. Auf der Blattunterseite konnte hingegen auch noch nach 9 Tagen, metabolische Aktivität gemessen werden, nachdem *P. fluorescens* Bk3 Tn::gfp_{lux} sich auf der gesamten Pflanze ausgebreitet hat. Die Inokulation auf Ober- und Unterseite ist demnach sinnvoll, um die Etablierungschancen für *P. fluorescens* Bk3 im Feldversuch zu erhöhen.

Ein zweiter wichtiger Aspekt für die beidseitige Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 ist das unterschiedliche Verhalten von *V. inaequalis* auf Blattober- und -unterseite. LI & XU (2002) zeigten, dass junge Blätter von beiden Seiten infiziert werden konnten, wobei ältere Blätter, die bis zu vier Monaten alt waren, nur noch mit einem langsam wachsenden Myzel von der Unterseite infiziert werden konnten. Die bessere Etablierung von *P. fluorescens* Bk3 auf der Blattunterseite (GAU et al. 2002), sowie das Verhalten von *V. inaequalis* auf der Blattunterseite älterer Blätter (LI & XU 2002) unterstreicht die gute Wirkung des ausgewählten Antagonisten.

Allgemein bekannt ist, dass die Infektion von *V. inaequalis* vom Alter der Blätter abhängt, wobei junge Blätter besser infiziert werden können als alte Blätter (SCHWABE 1979, MACHARDY & JEGER 1983, MACHARDY 1996). Der Boniturverlauf der beiden Jahre 2003 und 2004 bestätigt dieses Infektionsverhalten von *V. inaequalis* (Abb. 3.35-3.38). Vor

diesem Hintergrund wurde in der zweiten Vegetationsperiode schon sehr früh mit der Applikation des Antagonisten und der Infektion mit *V. inaequalis* begonnen (Abb. 4.2).



Abb. 4.2: Die ersten sich gerade entwickelnde Blätter von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zum ersten Inokulationstermin am 31. März 2004 in der Versuchsanlage (Universität Hannover, Institut für Botanik, Herrenhäuserstrasse 2).

Auf den jungen Blättern ist die Zusammensetzung der Epiphyten noch sehr instabil (LINDOW & BRANDL 2003), was die Etablierungschancen von *P. fluorescens* Bk3 in diesem Stadium der Entwicklung durch künstliche Inokulation erhöht. Die zarten jungen Blätter sind noch sehr anfällig gegen *V. inaequalis*, was eine erfolgreiche künstliche Infektion wahrscheinlich macht. Dabei darf man jedoch nicht die Witterungsverhältnisse zum Zeitpunkt der künstlichen Infektion und der Applikation des Antagonisten vernachlässigen. Die gegen *V. inaequalis* präventiv und gleichzeitig zur Infektion durchgeführten Maßnahmen wirkten sich deutlich reduzierend auf den Schorfbefall aus.

Von SINGH et al. (2004) ist bekannt, dass bei gleichzeitiger Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 Tn::gflupx und *V. inaequalis* eine 50% Hemmung des Myzelwachstums auf PDA - Agarplatten erzielt werden kann. Bei gleichzeitiger Inokulation von *P. fluorescens* Bk3 Tn::gflupx und *V. inaequalis* auf isolierten Kutikula-Membranen, die mit verschiedenen Nährlösungen (LB-Medium, PDA-Medium) unterschichtet waren, konnte eine deutliche Zunahme der Bakterienzahl bei gleichzeitiger Abnahme der Konidienzahl beobachtet werden. Nach Abschluß des Experimentes wurden keine keimfähigen Konidien reisoliert.

Der gute Wirkungsgrad bei der Reduzierung des Apfelschorfbefalls in der gleichzeitigen und präventiven Variante beruht wahrscheinlich einerseits auf der direkten Wirkung zwischen Antagonist und Pilz und andererseits auf der induzierten Resistenz, die durch *P. fluorescens* Bk3 auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox hervorgerufen werden kann. Die Wirkungsgrade sind hier zur Verdeutlichung noch einmal aufgeführt (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Wirkungsgrade (Abbott) von *P. fluorescens* Bk3 gegen Apfelschorfsymptome auf *M. domestica* cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003 und 2004

Datum der Bonitur	Elstar im Jahre 2003			Holsteiner Cox im Jahre 2003		
	präventiv	simultan	kurativ	präventiv	simultan	kurativ
26.06.03	0 %	10 %	2 %	31 %	0 %	6 %
09.07.03	18 %	21 %	15 %	0 %	0 %	0 %
18.09.03	3 %	63 %	30 %	84 %	79 %	84 %

Datum der Bonitur	Elstar im Jahre 2004			Holsteiner Cox im Jahre 2004		
	präventiv	simultan	kurativ	präventiv	simultan	kurativ
20.04.04	38 %	15 %	8 %	30 %	9 %	0 %
08.06.04	0 %	0 %	0 %	0 %	12 %	6 %
08.07.04	18 %	0 %	0 %	48 %	18 %	16 %
12.08.04	0 %	0 %	0 %	54 %	44 %	39 %
17.09.04	32 %	68 %	0 %	67 %	63 %	46 %

Die Schwankungen innerhalb beider Vegetationsperioden zu den verschiedenen Terminen und den unterschiedlichen Sorten verdeutlichen die oft zu beobachtende Variabilität des Wirkungsgrades antagonistischer Mikroorganismen (KOCH 2000). Der höchste Wirkungsgrad konnte im Jahre 2003 bei der Bonitur am 18.09.03 mit 79-84% erzielt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die schnellwachsende Sorte Holsteiner Cox im Verhältnis mehr neue Blätter produziert als die langsamwachsende Sorte Elstar. Da die Blätter kontinuierlich über die gesamte Vegetationsperiode gebildet werden, bildet die Sorte Holsteiner Cox zwischen zwei künstlichen Infektionsterminen mehr Blätter aus als die Sorte Elstar, die zum nächsten Infektionstermin schon eine gewisse Altersresistenz besitzen. Die besten Resultate konnten in den präventiv und gleichzeitig zur künstlichen Infektion behandelten Pflanzen erreicht werden (Tab. 4.2).

Ähnliche Wirkungsgrade erzielte BLAESER et al. (2002) mit Pflanzenextrakten auf verschiedenen Pflanzenarten. Mit Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* konnte ein Wirkungsgrad von 77 % gegen *Phytophthora infestans* erreicht werden und mit einem Extrakt aus *Salvia officinalis* 73 %. FÖRSCHLER et al. (2003) erreichte mit Antioxidantien wie α -Tocopherol und Lecithin Wirkungsgrade gegen *V. inaequalis* von bis zu 90 %,

allerdings ließ die Wirkung nach 14 Tagen stark nach. Mit Netzschwefelbehandlungen erreichte KLOPP et al. (2001) Wirkungsgrade gegen Fruchtbefall mit *V. inaequalis* von 90 %. Der Blattschorfbefall konnte jedoch nur zu 73 % gehemmt werden. Mit *P. fluorescens* Bk3 wurde in dem Feldversuch der vorliegenden Arbeit an einem Boniturtermin die gleiche Wirkung gegen *V. inaequalis* erzielt. Die Anforderungen, die an einen mikrobiellen Antagonisten von REINECKE et al. (1991) gestellt werden, sind ein hoher Wirkungsgrad, leichte Kultivierbarkeit, eine einfache Handhabung und eine optimale Adaptation an das Habitat, die *P. fluorescens* Bk3 alle erfüllt. Allerdings ist die Wirkung noch sehr großen Schwankungen unterlegen, die eine Untersuchung über mehrere Vegetationsperioden in einer größer angelegten kommerziell geführten Apfelanlage erfordern.

4.3 Ausblick

Die Fluktuation über Jahrhunderte in dem Spektrum der Möglichkeiten bei der biologischen Kontrolle von *V. inaequalis*, die von Kupferpräparaten Ende des 19. Jhrds., die mittlerweile jedoch verboten sind, über mechanische Pflegemaßnahmen bis hin zu Resistenzzüchtungen und gentechnisch veränderter Pflanzen immer neue Erkenntnisse hervorbrachte zeigt, dass die Bekämpfung des Apfelschorfs eine langwierige und schwierige Aufgabe darstellt. Die dabei immer neu zutage tretende Aspekte, müssen berücksichtigt werden, um optimale Wirkungsergebnisse erzielen zu können. Deswegen ist eine Kombination der schon etablierten Methoden mit neuen Methoden sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial von *P. fluorescens* BK3 als biologisches Kontrollagenz gegen *V. inaequalis* (Apfelschorf) im Freiland getestet. Die Inokulation des Antagonisten bewirkte eine Reduzierung der Apfelschorfsymptome auf den Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox und cv. Elstar. Die Versuche unterlagen noch großen Schwankungen, da die Bäume im ersten Jahr der Untersuchung erst ausgepflanzt wurden und sich adaptieren mussten. Trotzdem wurden an manchen Boniturterminen hohe Wirkungsgrade erzielt. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, *P. fluorescens* Bk3 in kommerziell geführten Obstanlagen als biologisches Pflanzenstärkungsmittel gegen *V. inaequalis* zu testen, um die Wirksamkeit des Antagonisten auf schon etablierten Apfelbäumen zu untersuchen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zum Wirkmechanismus von *P. fluorescens* BK3 in der Phyllosphäre haben gezeigt, dass PR-Proteine neu synthetisiert sowie zahlreiche Transkripte, die für Gene der Pflanzenabwehr kodieren, induziert werden. Dies

deutet darauf hin, dass *P. fluorescens* Bk3 die Pflanzen auf einen bevorstehenden Pathogenangriff vorbereitet, was durch die Überprüfung der Wirksamkeit von *P. fluorescens* Bk3 gegen *V. inaequalis* im Freiland bestätigt wurde. Diese Untersuchungen sollen einen Modellcharakter besitzen und auf andere Wirt/Pathogen/Antagonisten Systeme übertragbar sein.

5 Literaturverzeichnis

- Abanda-Nkpwatt, D., Krimm, U., Coiner, H.A., Schreiber, L., Schwab, W. (2006)** Plant volatiles can minimize the growth suppression of epiphytic bacteria by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* in co-culture experiments. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 108-119
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Jwa, N-S. (2001)** Differential induction of three pathogenesis-related genes, *PR10*, *PR1b* and *PR5* by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Plant Physiology* **158**: 133-137
- Agrios, G.N., (1997)** Plant pathology. *Academic Press Ltd, San Diego, California, USA*
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H.N., Gill, B.S., Bockus, W.W., Muthukrishnan S. (2003)** Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1101-11
- Andrews, J.H., Kenerley, C.M. (1978)** The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 1058-1072
- Andrews, J.H. (1990)** Biological control in the phyllosphere: realistic goal or false hope? *Canadian Journal of Plant Pathology* **12**: 300-307
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., Van Loon, L.C. (1980).** Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *The Journal of General Virology* **47**: 79-87
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Bonfante, P. (1992)** Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β -1,3-glucanases. A morphological study. *Protoplasma* **171**: 34-43
- Asselin, A. (1993)** Plant enzymes with antimicrobial properties. *Phytoprotection* **74**: 3-18
- Babu, R. M., Sajeena, A., Samundeeswari, A. V., Sreedhar, A., Vidhyasekaran, P., Seetharaman, K., Reddy, M. S. (2003)** Induction of systemic resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by sali-cyclic acid in *Oryza sativa* (L.). *Journal of Plant Diseases and Protection* **110**: 419-431
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S. P. (1997)** Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**: 726-733
- Bantignies, B., Seguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P., Ibrahim, R. (2000)** Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Molecular Biology* **42**: 871-881
- Barbosa, P. (1998)** Conservation biological control. San Diego, Calif., Academic Press

- Beerhues, L., Kombrink, E. (1994)** Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- α -glucanase in potato. *Plant Molecular Biology* **24**: 353-367
- Bernasconi, P., Locher, R., Pilet, P.-E., Jolles, J., Jolles, P. (1987)** Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta* **915**: 254-260
- Beuning, L., Bowen, J., Persson, H., Barraclough, D., Bulley, S., MacRae, E. (2004)** Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus*. *Plant Molecular Biology* **55**: 369-388
- Bhowmik, P. K., Matsui, T. (2005)** Ethylene biosynthetic genes in 'Moso' bamboo shoot in response to wounding. *Postharvest Biology and Technology* **38**: 188-194
- Biggs, A.R. (1990)**. Apple scab. *Compendium of apple and pear disease*. Edited by A.L. Jones and H.S. Aldwinckle. APS Press, St. Paul, Minn. pp. 6–9
- Blaeser, P., Steiner, U., Dehne, H.-W. (2002)** Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. *Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL*, **97**
- BLE (2003)** Pflanzenschutz im ökologischen Obstbau – Grundlagen. D2 Pflanzenschutz. Informationsmaterialien über den ökologischen Landbau (Landwirtschaft einschließlich Wein-, Obst- und Gemüsebau), initiiert durch das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau www.oekolandbau.de
- BLE (2004)** <http://orgprints.org/4235/01/4235-02OE184-ble-lknrw-2004-pflanzenstaerkungsmittel.pdf>
- Blein, J. P., Coutos-Thévenot, P., Marion, D., Ponchet, M. (2002)** From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science* **7**: 293-296
- Bol, J. F., Buchel, A. S., Knoester, M., Baladin, T., Van Loon, L. C., Linthorst, H. J. M. (1996)** Regulation of the expression of plant defence genes. *Plant Growth Regulation* **18**: 87-91
- Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (1997)** Plant-microbe interactions and biological control. New York, Marcel Dekker Inc.
- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Harman G.E., Brown S.K., Aldwinckle H.S. (2001)** Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research* **10**: 533-543
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **7**: 248-254

- Breda, C., Sallaud, C., el-Turk, J., Buffard, D., de Kozak, I., Esnault, R., Kondorosi, A. (1996)** Defense reaction in *Medicago sativa*: a gene encoding a class 10 PR protein is expressed in vascular bundles. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**: 713-719
- Brederode, F. T., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F. (1991)** Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology* **17**: 1117-1125
- Breiteneder, H., Ebner, C. (2000)** Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**: 27-36
- Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H., Peumans, W.J. (1989)** A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* **245**: 1100-1102
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Russell, L.J. (2000)** Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American society of plant biology*
- Burr, T. J., Matteson, M. C., Smith, C. A., Corral-Garcia, M. R., Huang, T.-C. (1996)** Effectiveness of bacteria and yeasts from apple orchards as biological control agents of apple scab. *Biological Control* **6**: 151-157
- Carisse, O., Philion, V., Rolland, D., Bernier, J. (2000)** Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **90**: 31-37
- Chu K.T., Ng T.B. (2005)** Purification and characterization of a chitinase-like antifungal protein from black turtle bean with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages. *Biological Chemistry* **386**: 19-24
- Cinq-Mars, L. (1949)** Interactions between *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. and saprophytic fungi and bacteria inhabiting apple leaves. *Thesis. McGill University*. zit. nach Dr. Beate Golba (Dipl.-Biol.) Technische Universität München: Alternativen zum Einsatz von kupferhaltigen Präparaten im Apfelanbau
- Cohn, J.R., Martin, G.B. (2005)** *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **44**: 139-154
- Dangl, J. L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996)** Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Dani, V., Simon, W.J., Duranti, M., Croy, R.R. (2005)** Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*. **5**: 737-745
- Datta, S.K., Mutukrishnan, S. (1999)** Pathogenesis-related proteins in plants. *CRC Press LLC USA*
- Datta K., Tu J., Oliva N., Ona I., Velazhahan R., Mew T.W., Muthukrishnan S., Datta S.K. (2001)** Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of

infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science* 160: 405-414

- Degenhardt, J., Al-Masri, A.N., Kürkcüoğlu, S., Szankowski, I., Gau, A.E. (2005)** Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol Gen Genomics* 273: 326-335
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J. (1994)** A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. (1996)** Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 6025-6030
- Didierjean L., Frendo P., Nasser W., Genot G., Marivet J., Burkard G. (1996)** Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* 199: 1-8
- Ding, C.-K., Wang, Y. C., Gross, K. C., Smith, D. L. (2002)** Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895-901
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K. (1996)** The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - - a review. *Gene* 179: 45-51
- Doll, J., Hause, B., Demchenko, K., Pawlowski, K., Krajinski, F. (2003)** A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. *Plant and Cell Physiology* 44: 1208-1214.
- Drawert, H. (1960)** Fluorochromierungsstudien an lebenden und toten Pflanzenzellen mit Fluorescein. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 73:115-122
- DSMZ (2006):** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. <http://www.dsmz.de/strains/no006506.htm>
- Duijif, B. J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., Lemanceau, P. (1998)** Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47. *European Journal of Plant Pathologie* 104: 903-910
- Duo-Chuan, L.I., Chen, S., Jing, L.U. (2005)** Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159: 223-229
- Ebel, J., Scheel, D. (1997)** Signals in host-parasite interactions. *The Mycota V Part A, Plant Relationships* (G.C. Carroll, P. Tudzynski, eds.), 85-105

- Ebel, J., Mithofer, A. (1998)** Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348
- Elad, Y., Freeman, S., Monte, E. (eds) (2001)** Biocontrol agents: mode of action and interaction with other means of control. *IOBC/wprs Bulletin* **24**
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1995)** An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**: 813-820
- EPPO-Richtlinie PP 1/232 (1) (2005)** Blattläuse an Tabak. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig*
- Ercolani, G. L. (1991)** Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology* **1991**: 35–48
- EU-Verordnung 2092/91.** <http://www.soel.de/oekolandbau/richtlinien.html>
- Faize, M., Faize, L., Ishizaka, M., Ishii, H. (2004)** Expression of potential defense responses of Asian and European pears to infection with *Venturia nashicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**: 319-330
- FAO (2001)** Food and agriculture organization of the United Nations. Progress made towards reducing risks of pesticides and industrial chemicals in developing countries. *Press Release* **01/67**
- Fischer, M., Fischer, C. (1999)** Evaluation of *malus* species and cultivars at the Fruit Genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genetic Ressources and Crop Evolution* **46**: 235-241
- Fiss, M. (2001)** Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. *Dissertation Hannover*
- Flury, T., Wagner, E., Kreuz, K. (1996)** An inducible glutathione S-transferase in soybean hypocotyl is localized in the apoplast. *Journal of Plant Physiology* **112**: 1185-1190
- Förschler, A., Portz, C., Schmitz-Eiberger, M., Steiner, U., Noga, G. (2003)** Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien. *Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL*, **113**, 41 Seiten
- Fujibe, T., Watanabe, K., Nakajima, N., Ohashi, Y., Mitsuhara, I., Yamamoto, K. T., Takeuchi, Y. (2000)** Accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves irradiated with UV-B. *Journal of Plant Research* **113**: 387-394
- Fung, K. L., Zhao, K. J., He, Z. M., Chye, M. L. (2002)** Tobacco-expressed Brassica juncea chitinase BjCH1 shows antifungal activity in vitro. *Plant Molecular Biology* **50**: 283-294

- Gaffney, T., Friedrich, L., Yernooji, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, R., Kessmann, H., Ryals, J. (1993)** Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995)** The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**: 72-74
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P. (1998)** Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**: 479-491
- Gau, A.E., Dietrich, C., Kloppstech, K. (2002)** Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants. *Environmental Microbiology* **4**: 744-752
- Gau, A.E., Koutb, M., Piotrowski, M., Kloppstech, K. (2004a)** Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. *Elstar*) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 703-711
- Gau, A.E. (2004b)** Wechselwirkungen epiphytisch-lebender Mikroorganismen mit der Wirtspflanze *Malus domestica* und deren Einfluss auf das Pathogen *Venturia inaequalis*. *Habilitationsschrift Hannover*
- Goodman, R.N., Novacky, A.J. (1994)**. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. *APS Press. St. Paul, Minnesota*
- Gozzo, F. (2003)** Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4487-4503
- Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H., Tweddell, R.J. (2005)** Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. *Biocontrol Science* **50**: 771-786
- Green, T.R. and Ryan, C.A. (1972)** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777
- Gupka, G.K. (1992)** Apple scab (*Venturia inaequalis* Cke.) Wint.), p.1-3 (3). In: *Kumar, J., Plant diseases of international important fruit crops*, Prentice Hall, New Jersey
- Hammerschmidt, R. (1999)** Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 77-80
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996)** Resistance gene dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**: 1773-91
- Handelsman, J., Stabb, E.V. (1996)** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* **8**: 1855-1869
- Hanselle, T., Ichinoseb, Y., Barz, W. (2001)** Biochemical and molecular biological studies on infection (*Ascochyta rabiei*)-induced thaumatin-like proteins from chickpea plants (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Biosciences C* **56**: 1095-1107

- Heath, M.C. (2000)** Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**: 321-334
- Heil, M., Bostock R.M. (2002)** Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* **89**: 503-512
- Heldt, H.W. (1996)** Pflanzenbiochemie. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 3. Edition*
- Hoegen, E. (1998)** Veränderte Genexpression bei systemisch erworbener Resistenz in *Solanum tuberosum* L. *Dissertation Köln*
- Hogue, R., Asselin, A. (1987)** Detection of 10 additional pathogenesis-related (b) proteins in intercellular fluid extracts from stressed 'Xanthi-nc' tobacco leaf tissue. *Canadian Journal of Botany* **65**: 476-481
- Hon, W.C., Griffith, M., Chong, P., Yang, D. (1994)** Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* **104**: 971-980
- Hoson, T. (1998)** Apoplast as the site of response to environmental signals. *Journal of Plant Research* **111**: 167-177
- Hoster, F., Schmitz, J.E., Daniel, R. (2005)** Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 434-442
- Hu, X., Reddy, A.S. (1997)** Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology* **34**: 949-959
- Janisch, K., Schempp, H. (2004)** Evaluation of the oxidative burst in suspension cell culture of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bioscience [C]* **59**: 849-855
- Jaworski, E.G., Wang, L. C. (1965)** Gross cell wall composition of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **55**: 401-403
- Jensen, O.N., Wilm, M., Schevchenko, A., Mann, M. (1998)** Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-D gels. *2-D Proteome Analysis Protocols, Methods in Molecular Biology (Link, A.J. ed.)*. Humana Press, Inc. Totowa, N.J. **112**:513-530
- Johnk, N., Hietala, A.M., Fossdal, C.G., Collinge, D.B., Newman, M.A. (2005)** Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). *Tree Physiology* **25**: 1533-1543
- Kader, J.-C. (1996)** Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 627-654
- Kalpana, K., Maruthasalam, S., Rajesh, T., Poovannan, K., Kumar, K.K., Kokiladevi, E., Raja, J.A.J., Samiyappan, R. (2006)** Engineering sheath blight resistance in

elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. *Plant Science* **170**: 203-215

- Kinkel, L.L., Andrews, J.H., Nordheim, E.V. (1989b)** Microbial introduction to apple leaves: Influence of altered immigration on fungal community dynamics. *Microbial Ecology* **18**: 161-173
- Klopp, K., Kruse P., Maxin, P., Palm, G. (2001)** Netzschwefel als Multitalent zur Behandlung von Krankheiten und Schaderregern im ökologischen Kernobstanbau. Sulphur in research work on organic grown pome fruit.
- BLE (2004)** Geschäftsstelle Bundesprogramm ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung . Pflanzenstärkungsmittel für den Zierpflanzenbau / Bundesprogramm ökologischer Landbau. *Pflanzengesundheit* **155**
- Kloskowski, R. (1999)** Verbleib von Kupfer in Boden und Wasser nach Anwendung von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln. In: Pflanzenschutz im ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze. Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. **53**: 34-37
- Koch,E. (2000)** Mikrobielle Antagonisten von Pflanzenkrankheiten: Status, Probleme, zukünftige Entwicklung - Ergebnisse einer Tagung. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **52**: 209-21
- Koeller, W., Parker, D.M., Becker, C.M. (1991)** Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **81**: 1375-1379
- Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Oda, J., Yamada, Y., Sato, F. (1997)** Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. *Plant Cell Physiology* **38**: 783-791
- Kollar, A. (2003)** Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr. 02OE109, Laufzeit: 01.05.02 –31.12.03, *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau*
- Koutb, M. (2003)** Apoplastic analysis of apple leaves during infection with *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Institute of Botany, Department of Biology, University Hannover, Germany*
- Koutb, M. (2006)** Functional analyses on the non specific lipid transfer protein (nsLTP) of apple (*Malus domestica*). *Dissertation Hannover*
- Kucheryava, N., Fiss, M., Auling, G., Kroppenstedt, R.M. (1999)** Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple Scab. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 472-478
- Kula, C. (1999)** Auswirkungen von Kupfer auf die terrestrische Flora und Fauna. In: Pflanzenschutz im ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze. Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft **53**: 38-43
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M. Rothstein, S. (1987)** Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**: 7542-7546
- Langen, G., Hückelhoven, R., Besser, K., Schaffrath, U., Kogel, K.H. (1998)** Eine vorläufige Bewertung der reaktiven Sauerstoffspezies bei Abwehrreaktionen von Getreide gegenüber pilzlichen Pathogenen. *Gesunde Pflanzen* **50**: 196-201
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. (1987)** Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **84**: 6750–6754
- Leveau, J. H. J., Lindow, S. E. (2001)** Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 3446-3453
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A., Lamb, C. (1994)** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- LFP** Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart. Landratsamt Karlsruhe (Landwirtschaftsamt Bruchsal)
- Li, B. and Xu, X. (2002)** Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology* **150**: 687-691
- Limon, M. C., Chacon, M. R., Mejias, R., Delgado-Jarana, J., Rincon, A. M., Codon, A.C., Benitez, T. (2004)** Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 675-685
- Lindow, S.E., Brandl, M.T. (2003)** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1875-1883
- Liu, J.J., Ekramoddoullah, A.K., Piggott, N., Zamani, A. (2005)** Molecular cloning of a pathogen/wound-inducible PR10 promoter from *Pinus monticola* and characterization in transgenic. *Arabidopsis* plants. *Planta* **221**: 159-69
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., Muehling, K.H. (2001)** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* **111**: 457-465
- MacHardy, W.E., Jeger, M.J. (1983)** Integrated control measures for the management of primary apple scab, *Venturia-inaequalis* (Cke.) Wint. *Protective Ecology* **5**: 103–125
- MacHardy, W.E., Gadoury, D.M. (1989)** A revision of Mills's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology* **79**: 304-310
- MacHardy, W.E. (1996)** Apple scab: biology, epidemiology, and management. *APS Press St. Paul, Minn. USA*

- Malamy, J., Carr, J., Klessig, D.F., Raskin, I. (1990)** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K. (2002)** A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **6905**: 399-402
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. (1988)** Antifungal hydrolases in pea tissue II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **88**: 936-942
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.-P. (1994)** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139-146
- Mayer, C.A. (1997)** Eine mechanistische Analyse von Enzymen der Chitinolyse bei Pilzen unter Verwendung von Lysozym als dem Paradigma. *Dissertation Zürich*
- McGee, J.D., Hamer, J.E., Hodges, T.K. (2001)** Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 877-886
- Melchers, L.S., Apotheker, M., van der Knaap, J., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C., van den Elzen, P.J.M., Linthorst, H.J.M. (1994)** A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **5**: 469-480
- Menard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Yvin, J.C., Kauffmann, S. (2004)** Beta-1,3 glucan sulfate, but not beta-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **16**: 3020-3032
- Menhaj, A.R., Mishra, S.K., Bezhani, S., Klopstech, K. (1999)** Posttranscriptional control in the expression of the genes coding for high-light-regulated HL2 proteins. *Planta* **209**: 406-413
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, C., Peumans, W.J., Barre, A., Van Damme, E.J., Rouge, P. (2003)** A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* **85**: 123-131
- Mercier, J., Lindow, S.E. (2000)** Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 369-74
- Métraux, J.-P., Streit, L., Staub, Th. (1988)** A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**: 1-9
- Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990)** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1010

- Mills, W.D. (1944)** Efficient use of sulfur dusts and sprays during rain to control apple scab. *Cornell Extension Bulletin* **630**
- Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M.A., Teixeira, A.R., Ferreira, R.B. (2003)** Osmotin and Thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* **93**: 1505-1512
- Moon, N. J., Henk, W. G. (1980)** Progression of epiphytic microflora in wheat and alfalfa silages as observed by scanning electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **40**: 1122–1129
- Moosherr, W. 1990.** Untersuchungen zu superfiziellen Schorf und Knopfschorf (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.) beim Apfel. Ph.D. thesis. Universität Hohenheim
- Moosherr, W., Kennel, W. (1995)** Investigations on superficial apple scab on apple shoots. *Journal of Plant Diseases and Protection* **102**: 171
- Murashige, T., Skoog, F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473-497.
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N., Gill, B. S. (2001)** Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **64**: 93-114
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988)** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 256-262
- Obstmuseum, Gut Leidenhausen 51147 Köln (Porz)** <http://www.cologneweb.com/obst.htm>
- Oppenheim, A.B., Chet, I. (1992)** Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Trends in Biotechnology* **1011**: 392-394
- Ouimet, A., Carisse, O., Neumann, P. (1997)** Evaluation of fungal isolates for the inhibition of vegetative growth of *Venturia inaequalis*. *Canadian Journal of Botany* **75**: 626-631
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., Krüger, J. (1993)** A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* **83**: 533-537
- Park, C.J., An, J.M., Shin, Y.C., Kim, K.J., Lee, B.J., Paek, K.H. (2004)** Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* **219**: 797-806.
- Parker, D.M., Hilber, U.W., Bodmer, M., Smith, F.D., Yao, C., Koeller, W. (1995)** Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **85**: 87-91
- Peil, A., Hanke, V. (2005)** Apfelzüchtung in Deutschland - vom Samen zur Sorte. Forschungsreport **2/2005**, 10-13

- Pfaffl, M.W. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. (2004)** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**: 509-515
- Phillion, V., Carisse, O., Paulitz, T. (1997)** In vitro evaluation of fungal isolates for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 441-452
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C. (2001)** Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering-, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 51-61
- Pieterse, C.M., Van Loon, L.C. (2004)** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*: **7**: 456-64
- Prell, H.H. (1996)** Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. *Jena*
- Pühringer, H., Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B. Katinger, H., Laimer da Câmara Machado, M. (2000)** The promoter of an apple *Ypr 10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science* **152**: 35-50
- Purdy, R.E., Kolattukudy, P.E., (1975).** Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Properties of cutinase I, cutinase II, and a nonspecific esterase isolated from *Fusarium solani pisi*. *Biochemistry* **14**: 2832-2840
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R. (2001)** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20**: 1-11
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2002)** Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens Pf1* and *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. *Plant and Soil* **239**: 55-68
- Ramanjulu, S., Kaiser, W., Dietz, K.-J. (1999)** Salt and drought stress differentially affect the accumulation of extracellular proteins in barley. *Journal of Bioscience C* **54**: 337-347
- Reinecke, P., Andersch, W., Stenzel, K., Hartwig, J. (1991)** Probleme bei der Entwicklung mikrobieller Pflanzenschutzmittel am Beispiel von BIO 1020. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **43**: 98-100
- Rejeb, B.I., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J.L., Ammar, S., Bouzid, S., Ayadi, A. (2004)** Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. *Comptes Rendus Biologies* **327**: 679-686

- Renault, A. S., Deloire, A., Letinois, I., Kraeva, E., Tesniere, C., Ageorges, A., Redon, C., Bierre, J. (2000)** ss-1,3-Glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture* **51**: 81-87
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J. (2002)** Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Journal of Plant Physiology* **30**: 904-917
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C. (2003)** A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins *FEBS Letters* **534**: 82-86
- Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K. (2004)** Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia plantarum* **48**: 273-283
- Ride, J.P. (1983)** Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J.A., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 215-236.
- Rishbeth, J. (1963)** Stump protection against *Fomes annosus*. III. Inoculation with *Peniophora gigantea*. *Annals of Applied Biology* **52**: 63-77
- Robertson, D., Mitchell, G.P., Gilroy, J.S., Gerrish, C., Bolwell, G.P., Slabas, A.R. (1997)** Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns primary cell wall proteins from plants. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* **272**: 15841-15848
- Rogalla, H., Römheld, V. (2002)** Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell and Environment* **25**: 549-555
- Rohringer, R., Ebrahim-Nesbat, F., Wolf, G. (1983)** Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Oxford Journals, Journal of Experimental Botany* **34**: 1589-1605
- Rothmaler, W. (1996)** Exkursionsflora von Deutschland. Bd II, Jena
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996)** Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. **8**: 1809–1819
- Saikia, R., Singh, B.P., Kumar, R., Arora, D.K. (2005)** Detection of pathogenesis-related proteins—chitinase and *b*-1,3-glucanase in induced chickpea. *Current Science* **89**: 659-663
- Sakurai, N. (1998)** Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Research* **111**: 133-148
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (eds) (1989)** Molecular cloning: a laboratory Manual 2 nd edn. *Cold Spring Harbor, NY: cold Spring Harbor Laboratory*
- Sattelmacher, B. (2001)** The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* **149**: 167-192

- Schägger, H., van Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U., Boller, T. (1986)** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**: 365 - 367
- Schulze, K. (2005)** Entwicklung eines neuartigen *in vitro* Testsystems zur Überprüfung der Wirkungen von Fungiziden auf Konidienkeimung sowie Bildung von Appressorien und Penetrationshyphen bei *Venturia inaequalis*. *Dissertation Bonn*
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G., Kroppenstedt, R.M. (2005)** Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **166**: 58
- Schwabe, W.F.S. (1979)** Changes in scab susceptibility of apple leaves as influenced by age. *Phytophylactica* **11**: 53-56.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Saitoh, K., Kato, A., Toyoda, K., Yoshioka, H., Kim, H.M., Ichinose, Y., Tahara, M., Oku, H. (1994)**. Suppressors: Determinants of specificity produced by plant pathogens. *Plant and Cell Physiology* **35**: 1107-1119
- Sikorski, M.x.M., Biesiadka, J., Kasperska, A.E., Kopcinska, J., Lotocka, B., Golinowski, W.x.x., Legocki, A.B. (1999)** Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Science* **149**: 125-137
- Singh, P., Piotrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A. E. (2004)** Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Malus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environment Microbiology* **6**: 1149-1158
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K. (1986)** Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of sciences USA* **83**: 2427-2430
- Somssich, I., Hahlbrock, K. (1998)** Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* **3**: 86-90
- Spangenberg, R. (1999)** Prüfung der Auswirkungen von Kupfer auf die Wasserorganismen. In: Pflanzenschutz im ökologischen Landbau – Probleme und Lösungsansätze. Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft **53**: 44-54
- Srivastava, S., Fristensky, B., Kav, N.N. (2004)** Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under saline conditions. *Plant & Cell Physiology* **45**: 1320-1324
- Stehr, R. (2000)** Eignungsprüfung und Marktchancen neuer schorffresistenter Apfelsorten im Alten Land. *Dissertation Berlin*
- Stehr, R. (2001b)** Erfahrungen zu ausgewählten schorffresistenten Apfelsorten – Teil 2: Ergebnisse von Verbrauchertests und Befragungen auf Großhandelsebene. *Mitt. OVR* **56**: 226- 234

- Stierl, R. (1999)** Vergleichende Untersuchungen zur Wirkungsweise induzierter Resistenz. *Dissertation Bonn*
- Strasburger, E. (1991)** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen: 50 Tabellen / . - 33. Aufl.. - Stuttgart [u.a.] : Fischer
- Sutherland, M.W. (1991)** The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**: 79-93
- Szankowski, I. (2002)** Entwicklung und Analyse transgener Apfelpflanzen mit dem vst1-Gen aus *Vitis vinifera* L. und dem PGIP-Gen aus *Actinidia deliciosa*. *Dissertation Hannover*
- Szankowski, K. Briviba, J. Fleschhut, J. Schönherr, H.-J. Jacobsen and H. Kiesecker (2003)** Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP-gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Reports* **22**: 141-149.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H., De Bolle, M.F.C., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1992)** Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 15301-15309
- Thompson, I.P., Bailey, M.J., Fenlon, J.S., Fermor, T.R. Lilley, A.K., Lynch, J.M., McCormack, P.J., McQuilken, M.P., Purdy, K.J. (1993)** Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil* **150**:177-191
- Tobwin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**: 4350-4354
- Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. (2002)** Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *The American Phytopathological Society MPMI* **15**: 27–34
- Toyoda, H., Matsuda, Y., Yamaga, T., Ikeda, S., Morita, M., Tamai, T., Ouchi, S. (1991)** Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. *Plant Cell Reports* **10**: 217–220
- Van Loon, L.C. (1982)** Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. *In: Active Defense Mechanisms in Plants (R.K.S. Wood, ed.), pp. 247-273, Plenum Press, New York, USA*
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. (1998)** Systemic resistance induced by *Rhizosphere Bacteria*. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 453-484
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97

- Van Parijs, J., Broekaert, W.F., Goldstein, I.J., Peumans, W.J. (1991)** Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-262
- Vera, P., Conejero, V. (1988)** Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* **87**: 58-63
- Viswanathan, R., Malathi, P., Sundar, A. R., Aarthi, S., Premkumari, S. M., Padmanaban, P. (2005)** Differential induction of chitinases and thaumatin-like proteins in sugarcane in response to infection by *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease. *Journal of Plant Diseases and Protection* **112**: 417–425
- Wang, C.S., Huang, J.C., Hu, J.H. (1999)** Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Molecular Biology* **40**: 807-814
- Wang, S.Y., Wu, J.H., Ng, T.B., Ye, X.Y., Rao, P.F. (2004)** A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* **25** : 1235-1242
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahi-Goy, P., Metraux, J.P., Ryals, J.A. (1991)** Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3**: 1085–1094
- Wassermann, O. (1969)** Untersuchungen über den antibiotischen Einfluß von Bakterien und Pilzen auf das Wachstum von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *in vitro*. *Zentralblatt f. Bakteriologie* **123**, 30-55. zit. nach Dr. Beate Golba (Dipl.-Biol.) Technische Universität München, 2001: Alternativen zum Einsatz von kupferhaltigen Präparaten im Apfel-anbau
- Wiethoff, J. (2005)** Einsatz von Nützlingskombinationen gegen Blattläuse und Thripse im Gemüsebau unter Glas. *Dissertation Hannover*
- Wilson, M., Lindow, S.E. (1994)** Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4468-4477
- Wolters, A.H. (2004)** Isolation von Ascosporen des pflanzenpathogenen Pilzes *Venturia inaequalis* und Charakterisierung von Antikörperinteraktionen zur Entwicklung eines immunogravimetrischen Sensors. *Dissertation Aachen*
- Wrobel-Kwiatkowska, M., Lorenc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmianski, J., Kepczynska, E., Szopa, J. (2004)** Expression of β -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**: 245-256
- Wulf, A., Manthey, K., Doll, J., Perlick, A.M., Linke, B., Bekel, T., Meyer, F., Franken, P., Kuster, H., Krajinski, F. (2003)** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**: 306-314
- Xiong, L., Lee, M.-W., Qi, M., Yang, Y. (2001)** Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**: 685-692

- Yalpani, N., Shulaev, V., Raskin, I. (1993)** Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* **83**: 702-708
- Zamani, A., Sturrock, R., Ekramoddoullah, A. K., Wiseman, S. B., Griffith, M. (2003)** Endochitinase activity in the apoplastic fluid of *Phellinus weirii*-infected douglas-fir and its association with over wintering and antifreeze activity. *Forest Pathology* **33**: 299-316
- Zanetti, M. E., Terrile, M. C., Arce, D., Godoy, A.V., Segundo, B.S., Casalongue, C. (2002)** Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2455-2457
- Zareie, R., Melanson, D.L. Murphy, P.J. (2002)** Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **15**: 1031-1039
- Zhang, H., Jiang, Y., He, Z., Ma, M. (2005)** Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology* **162**: 977-984
- Ziadi, S., Poupard, P., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., Simoneau, P. (2001)** Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 33-44

6 Anhang

6.1 Alle EST-Klone aus der SSH nach Nummern sortiert

Tab. 6.1: Alle EST-Klone aus der SSH nach Nummern sortiert.

S1	ATP-dependent RNA helicase
S2	Nuclear ribonucleoprotein polypeptide D3
S3	Ribosomal ly200 protein
S4	Unknown
S5	60S Ribosomal protein L36
S6	60S Ribosomal protein L36
S7	Ribosomal ly200 protein
S8	no matching sequences
S9	nicht sequenziert
S10	nicht sequenziert
S11	nicht sequenziert
S12	photosystem I P700 apoprotein A1
S13	nicht sequenziert
S14	Major allergen Mal d 1
S15	nicht sequenziert
S16	ADP-ribosylation factor
S17	Alternative oxidase
S18	Pre-mRNA splicing factor PRP38
S19	Auxin-binding protein ABP20 precursor, Germin-like
S20	Ribosomal ly200 protein
S21	Ribosomal ly200 protein
S22	Glutathione S-transferase
S23	Auxin-binding protein ABP19a precursor.
S24	2OG-Fe(II) oxygenase family proteinputative flavonol synthase
S25	40S Ribosomal protein S21
S26	Endomembrane protein 70
S27	nicht sequenziert
S28	no matching sequences
S29	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
S30	Ribosomal ly200 protein
S31	putative endosomal protein
S32	Elongation factor 1 alpha
S33	Manganese superoxide dismutase
S34	Phosphoprotein phosphatase
S35	Non-cell-autonomous heat shock cognate protein
S36	nicht sequenziert
S37	nicht sequenziert
S38	nicht sequenziert
S39	40S Ribosomal protein S7
S40	40S Ribosomal protein S7

S41	nicht sequenziert
S42	Phosphate transporter 1
S43	nicht sequenziert
S44	Proteasome subunit alpha 1
S45	nicht sequenziert
S46	nicht sequenziert
S47	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)
S48	nicht sequenziert
S49	ribonuclease-like PR-10b
S50	Heat shock protein 90
S51	Small nuclear ribonucleoprotein
S52	60S Ribosomal protein L36
S53	nicht sequenziert
S54	photosystem I P700 apoprotein A1
S55	Thioredoxin-like protein
S56	Transmembrane CLPTM1 family
S57	cytochrome P450-related
S58	Non-cell-autonomous heat shock cognate protein
S59	Cytochrome P450
S60	Histone H3.2
S61	Endo-chitinase class III
S62	nicht sequenziert
S63	Ribosomal protein L32
S64	Thioredoxin-like protein
S65	nicht sequenziert
S66	no matching sequences
S67	NADP specific isocitrate dehydrogenase
S68	putative sterol 4-alpha-methyl-oxidase
S69	Unknown function
S70	S-adenosyl usw.
S71	1-aminocyclopropene-1-carboxyla
S72	Allergen Dac g II
S73	Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein.
S74	1-aminocyclopropane-1-carboxylate ox
S75	Hypothetical protein p85RF, zinc finger
S76	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
S77	nicht sequenziert
S78	nicht sequenziert
S79	Ribosomal ly200 protein
S80	Homeodomain Transcription factor
S81	Mitochondrial carrier protein
S82	Ribonuclease-like PR-10b
S83	Putative 40S ribosomal protein
S84	no matching sequences
S85	Actin isoform B
S86	Ribosomal ly200 protein
S87	Hypothetical protein
S88	Ribosomal ly200 protein
S89	Ribosomal ly200 protein

S90	nicht sequenziert
S91	nicht sequenziert
S92	nicht sequenziert
S93	nicht sequenziert
S94	hypothetical protein FG08598.1
S95	Ribosomal ly200 protein
S96	Ribosomal ly200 protein
S97	nicht sequenziert
S98	nicht sequenziert
S99	nicht sequenziert
S100	nicht sequenziert
S101	nicht sequenziert
S102	nicht sequenziert
S103	nicht sequenziert
S104	nicht sequenziert
S105	nicht sequenziert
S106	nicht sequenziert
S107	Ribosomal ly200 protein
S108	Ribosomal ly200 protein
S109	Ribosomal ly200 protein
S110	Ribosomal protein L32
S111	Ribosomal ly200 protein
S112	beta-1,4-endoglucanase 1 precursor
S113	Ribosomal ly200 protein
S114	Ribosomal ly200 protein
S115	Ribosomal protein L32
S116	Ribosomal protein L32
S117	Ribosomal ly200 protein
S118	Ribosomal protein L32
S119	Ribosomal ly200 protein
S120	nicht sequenziert
S121	Ribosomal ly200 protein
S122	Ribosomal ly200 protein
S123	Ribosomal ly200 protein
S124	Ribosomal protein L32
S125	nicht sequenziert
S126	Ribosomal ly200 protein
S127	nicht sequenziert
S128	Ribosomal protein L32
S129	Ribosomal ly200 protein
S130	Ribosomal ly200 protein
S131	Ribosomal protein L32
S132	Ribosomal ly200 protein
S133	Ribosomal protein L32
S134	Ribosomal ly200 protein
S135	Ribosomal ly200 protein
S136	Ribosomal ly200 protein
S137	nicht sequenziert
S138	Ribosomal ly200 protein

- S139 Ribosomal ly200 protein
- S140 Ribosomal protein L32
- S141 Ribosomal ly200 protein
- S142 Ribosomal ly200 protein
- S143 Ribosomal protein L32
- S144 Ribosomal ly200 protein
- S145 Ribosomal ly200 protein
- S146 Ribosomal ly200 protein
- S147 nicht sequenziert
- S148 Ribosomal protein L32
- S149 Ribosomal protein L32
- S150 Ribosomal ly200 protein
- S151 nicht sequenziert
- S152 nicht sequenziert
- S153 nicht sequenziert
- S154 Ribosomal ly200 protein
- S155 nicht sequenziert
- S156 nicht sequenziert
- S157 Heat shock cognate 70 kDa protein

6.2 Erfassung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Hannover Herrenhausen in der Vegetationsperiode 2003 und 2004

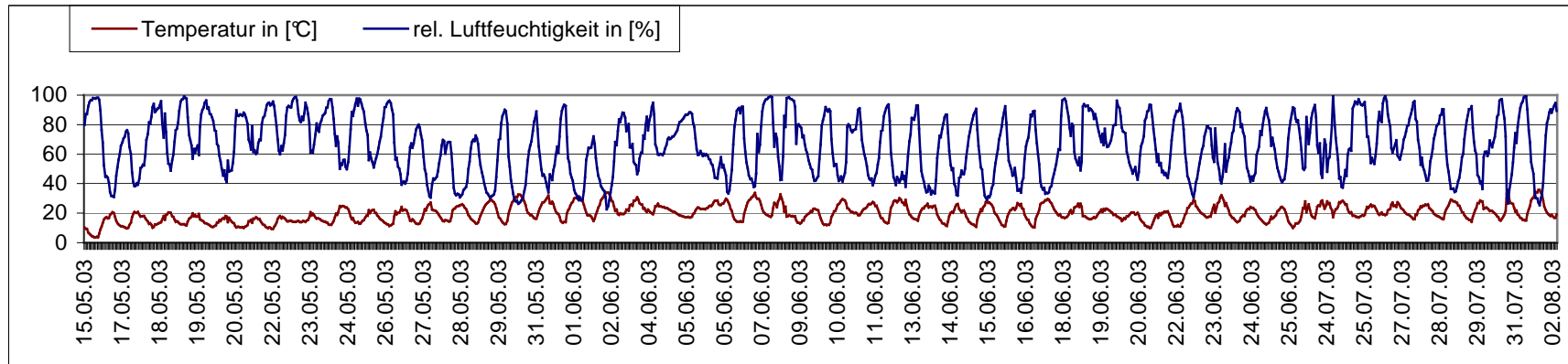


Abb. 6.1: Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 15.05.03-02.08.03.

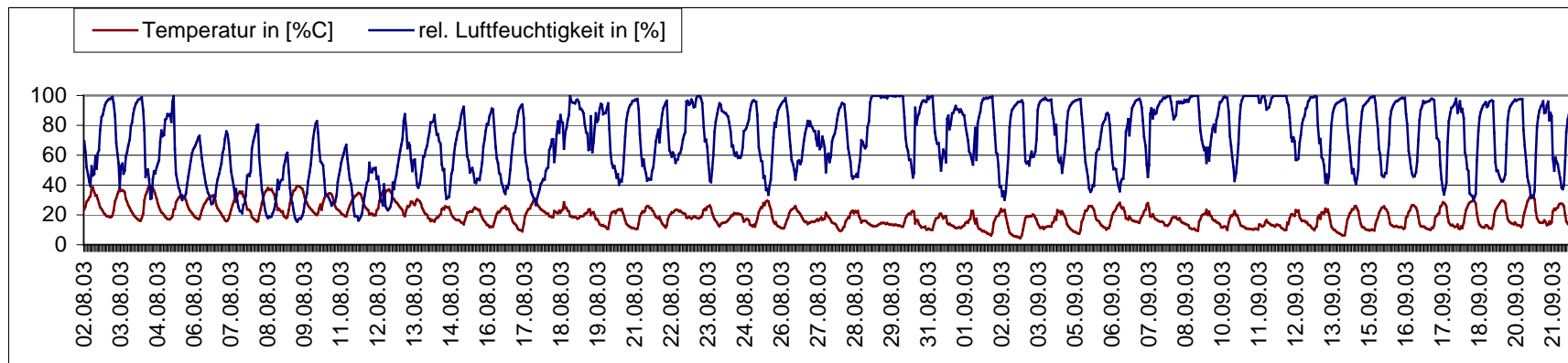


Abb. 6.2: Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 02.08.03-21.09.03.

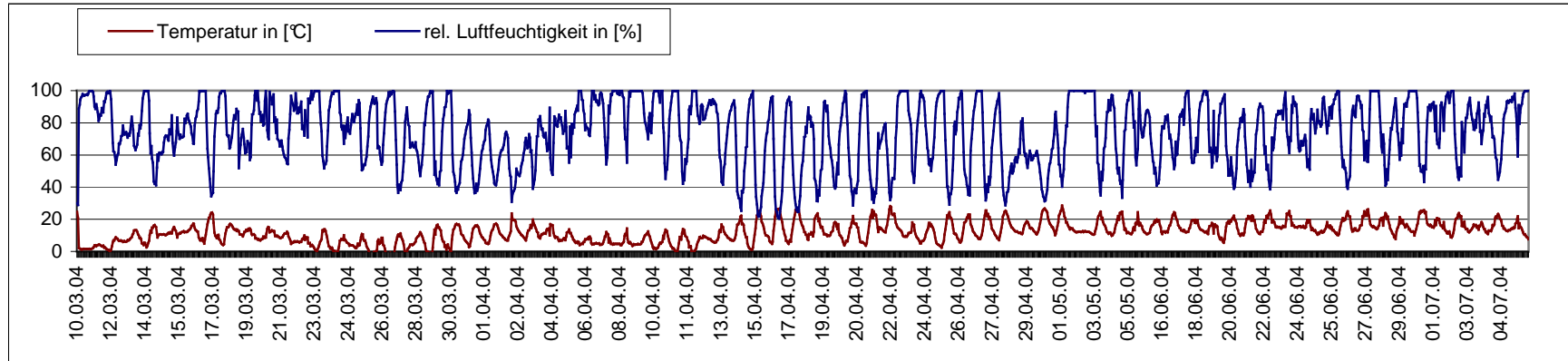


Abb. 6.3: Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 10.03.04.-05.07.04.

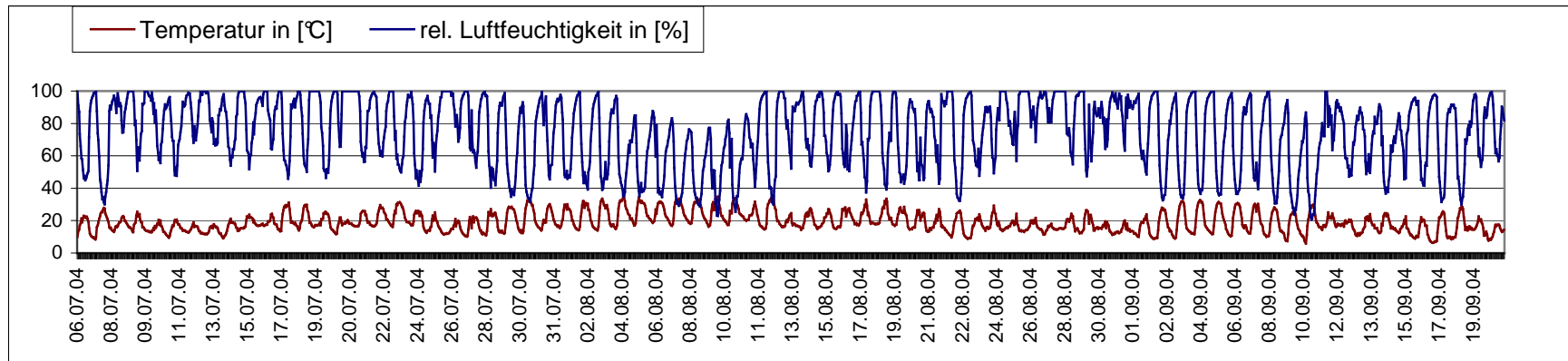


Abb. 6.4: Erfassung der Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit in der Versuchsanlage Hannover (Institut für Botanik, Herrenhäuserstr.2) für den Zeitraum vom 05.07.04-20.09.04.

6.3 Originaldaten der Bonituren von *M. domestica* cv. Elstar und cv. Holsteiner Cox zur Ermittlung des Wirkungsgrades von *P. fluorescens* Bk3 gegen *V. inaequalis* in den Vegetationsperioden 2003 und 2004

Tab. 6.2: Originaldaten der Bonituren von *M. domestica* cv. Elstar im Jahre 2003.

Parzelle	cv. Elstar 20.04.2003		cv. Elstar 09.07.02003		cv. Elstar 18.09.2003	
	Blattzahl gesamt am	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter
13a	43	6	68	2	30	13
13b	39	10	77	71	100	100
13c	44	11	52	48	100	100
13d	32	3	74	6	22	5
13e	29	29	41	41	17	17
14a	38	38	56	49	23	23
14b	55	6	64	8	30	4
14c	48	48	53	52	30	30
14d	59	45	64	14	26	7
14e	43	43	59	54	27	27
15a	45	33	48	27	100	100
15b	53	45	45	32	100	100
15c	25	21	62	44	100	100
15d	24	24	100	100	100	100
15e	27	27	100	100	100	100
16a	57	45	52	8	21	18
16b	45	45	100	100	100	100
16c	100	100	100	100	100	100
16d	32	32	30	5	100	100

16e	36	31	100	100	100	100
17a	100	100	39	29	15	6
17b	31	16	44	31	33	3
17c	100	100	38	30	10	10
17d	45	29	65	10	30	7
17e	23	18	33	25	27	4
18a	34	34	35	8	24	19
18b	23	20	20	8	11	3
18c	29	21	18	18	16	7
18d	36	36	21	16	100	100
18e	42	29	100	100	100	100

#: Keine Boniturdaten vorhanden, da entweder noch keine Blätter am Baum, oder durch Adaptationsprobleme nicht auswertbar. Wenn 0 Blätter befallen waren wurde ein 0 in beide Spalten eingesetzt. Wenn alle Blätter befallen waren (100 % Befall) wurde eine 100 in beide Spalten eingesetzt.

Tab. 6.3 Originaldaten der Bonituren von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox im Jahre 2003.

Parzelle	cv. Elstar 20.04.2003		cv. Elstar 09.07.2003		cv. Elstar 18.09.2003	
	Blattzahl gesamt am	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter
1a	19	7	20	2	7	0
1b	38	4	43	3	30	2
1c	26	3	37	1	0	0
1d	24	13	38	3	0	0
1e	20	0	31	2	38	1
2a	40	36	55	4	33	2
2b	21	8	25	4	0	0

2c	46	14	60	6	0	0
2d	27	3	43	1	0	0
2e	33	16	41	6	0	0
3a	24	12	40	7	35	4
3b	33	4	43	2	28	3
3c	28	17	45	5	22	5
3d	44	4	62	4	28	7
3e	26	13	46	6	12	3
4a	52	4	52	4	30	2
4b	23	7	32	3	25	1
4c	31	5	39	2	0	0
4d	20	13	30	10	28	1
4e	40	4	54	4	37	1
7a	40	9	39	7	32	3
7b	16	5	21	9	22	1
7c	25	7	0	0	0	0
7d	28	5	30	4	0	0
7e	#	#	40	2	0	0
5a	42	7	37	5	0	0
5b	37	10	30	6	0	0
5c	28	15	50	5	0	0
5d	23	6	45	3	0	0
5e	31	8	58	3	25	3
8a	36	13	51	9	0	0
8b	40	16	45	12	0	0
8c	38	4	33	5	33	3
8d	24	25	25	25	26	2
8e	31	9	53	19	28	3
6a	43	13	42	5	25	3
6b	32	16	46	8	22	1
6c	38	4	42	3	31	5

6d	36	25	36	9	33	3
6e	24	9	44	8	36	3
9a	26	7	74	21	22	0
9b	38	6	54	24	29	0
9c	22	11	34	19	0	0
9d	36	3	51	18	0	0
9e	11	4	55	16	0	0

#: Keine Boniturdaten vorhanden, da entweder noch keine Blätter am Baum, oder durch Adaptationsprobleme nicht auswertbar. Wenn 0 Blätter befallen waren wurde ein 0 in beide Spalten eingesetzt. Wenn alle Blätter befallen waren (100 % Befall) wurde eine 100 in beide Spalten eingesetzt. Die Parzellen 10-12 wurden nicht in die Statistik mit einbezogen, da diese immer zuletzt behandelt wurden und die Konzentration von 10^5 /ml Konidien und 2×10^9 Zellen/ml *P. fluorescens* Bk3 nicht mehr bei allen Bäumen gegeben war.

Tab. 6.4: Originaldaten der Bonituren von *M. domestica* cv. Elstar im Jahre 2004.

	cv. Elstar 20.04.2004		cv. Elstar 08.06.2004		cv. Elstar 08.07.2004		cv. Elstar 12.08.2004		cv. Elstar 17.09.2004	
Parzelle	Blattzahl gesamt am	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter
13a	30	4	20	6	20	11	45	9	41	2
13b	21	0	#	#	14	3	#	#	#	#
13c	#	#	#	#	25	5	#	#	#	#
13d	#	#	#	#	31	23	#	#	#	#
13e	40	7	22	9	50	43	35	8	45	4
14a	21	7	18	5	48	6	23	2	23	2
14b	20	9	20	7	60	55	18	0	18	0

14c	18	2	#	#	23	18	22	4	22	4
14d	21	5	60	21	25	25	25	0	25	0
14e	31	5	25	6	33	16	#	#	#	#
15a	16	3	8	3	22	7	20	7	20	7
15b	29	1	21	10	27	15	32	5	32	5
15c	24	4	10	0	35	9	33	2	33	2
15d	35	2	#	#	14	5	#	#	#	#
15e	14	2	#	#	30	23	#	#	#	#
16a	38	1	14	4	30	8	23	3	23	3
16b	#	#	11	3	49	44	13	6	#	#
16c	35	2	16	2	25	22	18	2	#	#
16d	42	2	#	#	35	24	#	#	#	#
16e	#	#	#	#	50	38	#	#	#	#
17a	22	5	22	8	37	23	30	2	30	2
17b	#	#	14	3	63	41	24	4	24	4
17c	28	4	40	27	26	16	37	0	37	0
17d	41	3	12	5	46	30	16	0	16	0
17e	#	#	17	0	37	26	23	5	#	#
18a	31	3	#	#	72	62	20	4	20	4
18b	20	2	#	#	62	55	7	3	#	#
18c	20	3	#	#	54	40	#	#	#	#
18d	#	#	11	8	42	34	#	#	#	#
18e	#	#	4	2	25	22	#	#	#	#

#: Keine Boniturdaten vorhanden, da entweder noch keine Blätter am Baum, oder durch Adaptationsprobleme nicht auswertbar. Wenn 0 Blätter befallen waren wurde ein 0 in beide Spalten eingesetzt. Wenn alle Blätter befallen waren (100 % Befall) wurde eine 100 in beide Spalten eingesetzt.

Tab. 7.5: Originaldaten der Bonituren von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox im Jahre 2004.

	cv. Holsteiner Cox 20.04.2004		cv. Holsteiner Cox 08.06.2004		cv. Holsteiner Cox 08.07.2004		cv. Holsteiner Cox 12.08.2004		cv. Holsteiner Cox 17.09.2004	
Parzelle	Blattzahl gesamt am	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter	Blattzahl gesamt	mit Apfelschorf befallenen Blätter
1a	1	0	21	11	67	7	26	4	20	2
1b	29	6	68	10	40	8	19	8	16	8
1c	27	2	34	12	12	1	25	4	17	2
1d	36	3	39	3	#	#	#	#	#	#
1e	1	0	7	0	#	#	#	#	#	#
2a	1	0	8	0	62	6	32	7	28	6
2b	1	0	4	0	43	4	19	9	16	8
2c	38	4	21	3	20	0	20	3	17	2
2d	10	1	49	5	4	1	#	#	#	#
2e	37	1	48	6	#	#	45	24	49	24
3a	30	2	45	17	49	31	23	16	21	15
3b	31	9	47	19	55	29	20	12	24	10
3c	17	7	61	53	63	42	30	18	28	20
3d	20	5	46	16	36	14	19	5	23	8
3e	27	4	45	21	55	15	#	#	#	#
4a	20	7	39	12	28	7	26	7	28	6
4b	8	1	30	7	45	14	19	9	21	11
4c	24	4	75	32	67	21	32	13	28	5
4d	9	4	52	12	53	18	32	11	29	8

4e	23	7	63	35	55	23	21	5	23	3
7a	0	0	5	4	42	11	27	8	27	3
7b	0	0	52	13	68	20	24	2	24	2
7c	0	0	1	1	42	8	20	3	20	3
7d	0	0	50	25	31	6	7	0	7	0
7e	10	3	54	31	9	0	36	7	7	1
5a	14	6	58	13	34	15	25	7	22	7
5b	12	2	42	16	40	16	22	5	23	4
5c	18	2	50	20	55	20	27	5	29	3
5d	14	1	47	8	27	10	22	5	23	6
5e	15	2	53	29	53	25	21	7	19	8
8a	17	3	70	55	40	19	20	8	20	0
8b	20	8	68	25	27	9	37	14	29	5
8c	14	3	48	21	53	10	23	7	25	3
8d	25	1	37	16	63	42	35	12	26	3
8e	16	5	63	32	#	#	33	10	23	7
6a	19	5	50	13	50	22	30	13	25	10
6b	20	4	60	32	64	25	24	10	26	7
6c	31	5	44	26	70	23	22	4	20	5
6d	26	3	62	21	64	39	31	5	27	8
6e	15	8	45	13	62	23	31	14	31	8
9a	8	2	70	25	64	17	33	6	33	5
9b	30	6	5	2	53	21	32	8	32	8
9c	17	7	8	3	48	25	20	11	20	11
9d	23	3	85	65	#	#	21	7	21	4
9e	20	5	52	38	#	#	29	11	29	8

#: Keine Boniturdaten vorhanden, da entweder noch keine Blätter am Baum, oder durch Adaptationsprobleme nicht auswertbar. Wenn 0 Blätter befallen waren wurde ein 0 in beide Spalten eingesetzt. Wenn alle Blätter befallen waren (100 % Befall) wurde eine 100 in beide Spalten eingesetzt. Die Parzellen 10-12 wurden nicht in die Statistik mit einbezogen, da diese immer zuletzt behandelt wurden und die Konzentration von 10^5 /ml Konidien und 2×10^9 Zellen/ml *P. fluorescens* Bk3 nicht mehr bei allen Bäumen gegeben war. #: Keine Boniturdaten vorhanden, da entweder noch keine Blätter am Baum, oder durch Adaptationsprobleme nicht auswertbar. Wenn 0 Blätter befallen waren wurde ein 0 in beide Spalten eingesetzt. Wenn alle Blätter befallen waren (100 % Befall) wurde eine 100 in beide Spalten eingesetzt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, 31.03.2006

Anna-Sophia Kürkcüoglu

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna-Sophia Kürkcüoglu
Geburtsdatum: 05.02.1970 in Großburgwedel
Familienstand: ledig
Kinder: Milan Gremmel, 26.04.1996
Anschrift: Pestalozzistr. 2,
31311 Uetze

Schule/Ausbildung

1990 Allgemeine Hochschulreife
1991 – 1993 Ausbildung zur chemisch - technischen Assistentin

Studium

1993 – 1996 Studium des Faches Biologie an der Friedrich - Alexander -
Universität Nürnberg - Erlangen bis zum Vordiplom
1996 Wechsel des Studienortes nach Braunschweig
1996 Ein Urlaubssemester (Geburt des Kindes, SS 1996)
1996 – 2001 Hauptstudium des Faches Biologie an der Carolo - Wilhelmina
Universität zu Braunschweig
2001 Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom
2001 – 2002 Lehramtstudium der Fächer Biologie und Chemie an der Universität
Hannover
2002 Stipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die
Dissertationsarbeit „Eine Strategie zur Minimierung des
Fungizideinsatzes im Erwerbsobstbau durch den Einsatz natürlicher
Antagonisten“
Mai 2006 Abschluss der Dissertationsarbeit
Juni 2006 Promotion

Liste eigener Publikationen und Kongressbeiträge

begutachtete Originalbeiträge

DEGENHARDT J., NASSER AL-MASRI A, **KÜRKCÜOĞLU S.**, SZANKOWSKI I, GAU A. E. (2005) Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol Gen Genomics* 273:326-335

KÜRKCÜOĞLU S., PIOTROWSKI M., GAU A. E. (2004) Up regulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of *Malus domestica* after application of a non-pathogenic bacterium. *Z. Naturforsch.* 59c: 843-848

eingereichte Originalbeiträge

KÜRKCÜOĞLU S., DEGENHARDT J., NASSER AL-MASRI A, GAU A. E. (2004) Characterization of differential expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. (*J. Exp. Bot.*, submitted)

Tagungsbeiträge

KÜRKCÜOĞLU S., PIOTROWSKI M., GAU A. E. (2004) Plant immunization by application of non-pathogenic bacteria to the plant phyllosphere. Botanikertagung 5 - 10 September 2004 in Braunschweig, Book of abstract:276

GAU A. E., **KÜRKCÜOĞLU S.**, SINGH P., PIOTROWSKI M., KLOPPSTECH K. (2004) Do microorganisms of the phyllosphere of apple trees induce the plant defence against the fungus *Venturia inaequalis*? Botanikertagung 5 - 10 September 2004 in Braunschweig, Book of abstract:269

KÜRKCÜOĞLU S., PIOTROWSKI M., GAU A. E. (2005) Biological control of apple scab by application of non-pathogenic microorganisms to the plant phyllosphere of *Malus domestica* Tagung des Arbeitskreises "Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten" Abstractband März 2005

KÜRKCÜOĞLU S., PIOTROWSKI M., GAU A. E. (2005) Induktion von PR-Proteinen durch Applikation von nicht -pathogenen Bakterien in der Phyllosphere von Apfelbäumen. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen 1-4 März 2005 in Dabringhausen. Book of Abstract: 15 Nr.75

KÜRKCÜOĞLU S., PIOTROWSKI M., DEGENHARDT J., NASSER AL-MASRI A., GAU. A. E. (2005) Biological control of plant diseases by application of natural, epiphytically living non-pathogenic antagonists to the plant phyllosphere. 1. Internationales Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases, 23 - 26 Oktober 2005 in Darmstadt (Germany), Reports from the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. Heft 128:36

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei PD. Dr. Achim Gau für die Überlassung des Themas, seine ständige Gesprächsbereitschaft und die Hilfe bei jeglicher Fragestellung zu allen praktischen und theoretischen Details dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Klaus Kloppstech, der mich in der Anfangszeit herzlich willkommen hieß und mich im wahrsten Sinne des Wortes tatkräftig bei der Anlage des Freilandversuches unterstützte.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bei Prof. Dr. Iris Szankowski (Juniorprofessorin) bedanke ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats und die freundliche Bereitstellung der *in vitro* Kulturen von *M. domestica*.

Mein herzlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe PD. Dr. Achim Gau, besonders Julia Lensing und Gabriele Kühne für die außerordentlich gute Pflege der *in vitro* Kulturen, Juliana Degenhardt und Robert Gutschke für die angenehmen und anregenden Diskussionen, Dr. Mostafa Koutb, Dr. Ines Rupprecht und Dr. Melanie Schröder für ihr herzliches Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft, gerade in der Anfangszeit.

Für die nette Unterstützung bei der anstrengenden Pflege der Freilandanlage möchte ich mich herzlich bei Yvonne Leye, Marion Klunker, Christiane Hausmann und Lutz Krüger bedanken.

Bei Herrn Spillebeen, Versuchsbetriebsleiter Herrenhausen/Ruthe, bedanke ich mich für die bereitwillige Leihgabe der Drillmaschine.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Auling bedanke ich mich für die Bereitstellung des Antagonisten *P. fluorescens* Bk3 und Dr. Katja Schulze für die Hilfe bei den Techniken, welche die Konidien betreffen.

Dr. Markus Piotrowski aus der Universität Bochum danke ich für die Sequenzierung der Proteine.

Dr. Nasser Al-Masri danke ich für die Hilfe bei der Homologiesuche der SSH-Klone.

Mein ganz besonderer persönlicher Dank gilt meinen Eltern Eleonore Kürkcüoglu und Serif Kürkcüoglu, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und ohne deren Vertrauen und immerwährende Hilfe es nicht zur Anfertigung dieser Arbeit gekommen wäre.

Jean Gutschalk und meinem Sohn Milan Gremmel danke ich für die unendliche Geduld und die ständige Motivation, die mir auf diesem Weg von ihnen zuteil wurde.