

Wirkung der Exsudate mykorrhizierter
Tomatenpflanzen auf das Migrationsverhalten von
Meloidogyne incognita

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Christiane von den Berg
geboren am 26.03.1981 in Wernigerode/Harz

2009

Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Henning von Alten

Referent: Prof. Dr. Hans-Michael Poehling

Korreferent: Prof. Dr. Richard A. Sikora

Tag der Promotion: 09.12.2009

Diese Arbeit wurde im Rahmen des FOR 431 von der DFG gefördert

Für meine Familie

Abstract

Investigation of the attraction behaviour of *Meloidogyne incognita* towards the exudates of mycorrhizal tomato plants using selected biotests

Feeding on more than 2000 host plant species, root knot nematodes (RKN) of the genus *Meloidogyne* rank among the most important phytopathogenic nematode species. Investigations have revealed that arbuscular mycorrhiza (AM) reduces the infestation of the host plant with RKN. However, it has not yet been clarified, if this can be ascribed solely to the induction of defense mechanisms or if a changed attraction of the host plant, due to modified exudation pattern of the mycorrhizal root plays a critical role, too.

Consequently, the scope of this thesis was to investigate the repulsive effect of mycorrhizal *Solanum lycopersicum* towards *M. incognita* using the AM-isolates *Glomus etunicatum* and *G. intraradices*. Moreover, it was evaluated how a combined application of *G. intraradices* and the bacterial strains *Acinetobacter baumannii* and *Cellulomonas turbata* changes the attraction of the host plant towards RKN. In addition, different pair-choice assays (olfactometer, sand-block and agar pair-choice assay) were assessed with regard to their suitability for the performance of attraction experiments with *M. incognita* *in vivo* and *in vitro*. Finally, the exudate composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants has been analysed via UPLC.

The results of the olfactometer pair-choice assay confirmed previously made findings: non-mycorrhizal tomato-roots are more attractive to *M. incognita* than mycorrhizal ones. Additionally, in the course of the investigations carried out this effect was found to include different cultivars. Furthermore, it can not only be observed directly adjacent to the root but also in a distance of a few centimeters. Modifications of the setup revealed, that the cause for this changed attraction is one or several water soluble, low-molecular and not-gaseous, weakly repellent substances. The combination of AM with the bacterial strains mentioned above did not lead to an increased repulsion of the nematodes. The reduction in the attraction that was observed *in vivo* ought to be reproduced *in vitro*. For this purpose percolates, diffusates and exudates of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants were introduced into sand-block and agar setups. It became apparent, that the agar-setup was suitable for the reproduction of the results obtained *in vivo*. The sand-block, however, was not apt for this purpose since the establishment of a natural gradient was not possible in this setup. The percolates and diffusates of mycorrhizal plants did not develop repellency on agar either. A possible explanation is the metabolisation of the repulsive substances by soil microorganisms in the unsterile samples. A partial hydroponic culture of mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato plants was developed, allowing for direct, but non-destructive sampling of exudates from the close proximity of the roots. The exudates of *G. intraradices* hereby obtained caused repulsion of *M. incognita* on agar. A reduction of the diffusion area strengthened this effect.

Via UPLC six different substances showing a high concentration were detected as exudate components and their molecular masses, molecular formulas and number of double bonds were determined. It was confirmed, that the exudate compositions of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants differ and the possible role of these substances is discussed. The results of this thesis show that mycorrhization does not cause the composition of strongly repellent substances. Nevertheless, according to a wide range of publications the mycorrhizal isolates used here lead to a reduced gall formation by *M. incognita* on the host plant. Hence, reduced host suitability is not necessarily linked to a notable reduction in attractiveness to the nematode.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, arbuscular mycorrhiza, attraction bioassays, root exudates

Kurzfassung

Untersuchung des Attraktionsverhaltens von *Meloidogyne incognita* gegenüber den Exsudaten mykorrhizierter Tomaten mittels ausgewählter Biotests

Wurzelgallennematoden der Gattung *Meloidogyne* zählen mit mehr als 2000 Wirtspflanzenarten weltweit zu den bedeutendsten phytopathogenen Nematoden. Untersuchungen zeigten, dass arbuskuläre Mykorrhiza (AM) den Befall der Wirtspflanze mit Wurzelgallennematoden reduziert. Es ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob dies ausschließlich auf die Induktion von Abwehrreaktionen oder auch eine Attraktivitätsveränderung durch die nachweislich veränderte Exsudation mykorrhizierter Pflanzen zurückzuführen ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der repulsive Effekt arbuskulärer Mykorrhiza an *Solanum lycopersicum* gegenüber *M. incognita* anhand der AM-Isolate *Glomus intraradices* und *G. etunicatum* untersucht. Darüber hinaus wurde evaluiert, wie die kombinierte Applikation von *G. intraradices* und den Bakterienstämmen *Acinetobacter baumannii* bzw. *Cellulomonas turbata* die Attraktivität der Wirtspflanze verändert. Zudem wurden verschiedene Pair-Choice Assays (Olfaktometer, Sand-Block und Agar Pair-Choice Assay) auf ihre Eignung zur Durchführung entsprechender Attraktionstests von *M. incognita* *in vivo* und *in vitro* evaluiert. Die Zusammensetzung der Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen wurde mittels UPLC analysiert.

Der Olfaktometer Pair-Choice Assay bestätigte vorherige Untersuchungen: mykorrhizafreie *S. lycopersicum* sind attraktiver für *M. incognita* als mykorrhizierte. Zudem konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass dieser Effekt sortenübergreifend und auch in mehreren Zentimetern Entfernung von der Wurzel wirksam ist. Weiterhin wurde mittels Setup-Variationen nachgewiesen, dass die Ursache für diese Wirkung eine oder mehrere wasserlösliche, niedermolekulare und nicht gasförmige, schwach repellative Substanzen sind. Die Kombination der o.g. Bakterienstämme führte nicht zu einer verstärkten Abstoßung der Nematoden.

Die *in vivo* beobachtete Attraktionsreduktion sollte unter *in vitro*-Bedingungen reproduziert werden. Hierzu wurden Perkolate, Diffusate und Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen in Sand Block- und Agar-Setups eingebracht. Es zeigte sich, dass sich der Sand-Block Assay im Gegensatz zum Agar Pair-Choice Assay grundsätzlich nicht für die Reproduktion dieser Ergebnisse eignete, da eine natürliche Gradientenbildung in diesem Setup nicht gegeben war. Perkolate und Diffusate mykorrhizierter Pflanzen entfalteten auch auf Agar keine repellative Wirkung. Die Ursache hierfür kann die Metabolisierung der repellativen Substanzen durch Bodenorganismen in diesen nicht-sterilen Proben sein. Es wurde eine teil-hydroponische Kultur mykorrhizierter und mykorrhizafreier Tomatenpflanzen entwickelt, die eine direkte, aber nicht-destruktive Entnahme der Exsudate aus unmittelbarer Wurzelnähe erlaubte. Die so gewonnenen Exsudate von *G. intraradices* zeigten auf Agar eine repellative Wirkung gegenüber *M. incognita*. Eine Reduktion der Diffusionsfläche auf Agar verstärkte diesen Effekt.

Mittels UPLC wurden insgesamt sechs verschiedene, hoch konzentrierte Substanzen in den Exsudaten analysiert und ihre molekulare Masse, Summenformel und Anzahl der Doppelbindungen ermittelt. Es wurde bestätigt, dass sich die Zusammensetzung der Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen unterscheidet. Die mögliche Rolle dieser Substanzen in den verschiedenen Setups wird diskutiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Mykorrhizierung nicht die Bildung eines starken Repellents bedingt. Dennoch führen die verwendeten Mykorrhiza-Isolate laut zahlreicher Veröffentlichungen zu einer verminderten Gallbildung von *M. incognita*. Folglich ist eine verminderte Wirtseignung durch Mykorrhizierung nicht zwingend mit einer deutlichen Attraktionsreduktion gekoppelt.

Schlagerworte: *Meloidogyne incognita*, arbuskuläre Mykorrhiza, Attraktions-Bioassays, Wurzelexsudate

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	12
1.1. Biologische Pflanzenschutzmittel	13
1.2. Relevante Nutz- und Schadorganismen der Rhizosphäre	14
1.2.1. Pflanzenwachstumsfördernde Rhizosphärenbakterien	15
1.2.2. Arbuskuläre Mykorrhizapilze	18
1.2.3. <i>Meloidogyne incognita</i>	20
1.2.4. Zielsetzung	25
2. Material & Methoden	26
2.1. Versuchsorganismen	26
2.2. Pflanzen	27
2.2.1. Anzucht und Kultur der Pflanzen im Gewächshaus	27
2.2.2. Ernte	27
2.3. Rhizosphärenbakterien: Selektion, Inokulation und Quantifizierung der Bodenpopulation	27
2.4. Arbuskuläre Mykorrhizapilze	28
2.4.1. Vermehrung von AMP-Inokulum	28
2.4.2. Quantifizierung der Mykorrhizierung	29
2.5. Nematoden	29
2.5.1. Inokulumgewinnung	29
2.5.2. Auswertung der Migration in Sand	30
2.5.3. Auswertung der Migration auf Agar	31
2.6. Exsudatgewinnung	31
2.6.1. Perkolations	32
2.6.2. Teil-hydroponische Kultur	32
2.6.3. Solid-Phase-Extraction	33
2.6.4. UPLC	33
2.7. Statistische Auswertung	34
3. Untersuchung der Attraktionswirkung mykorrhizierter Pflanzen gegenüber <i>M. incognita</i>	35
3.1. Migrationsuntersuchungen mittels Olfaktometer	35
3.1.1. Material und Methoden	36
3.1.1.1. Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes	36
3.1.1.2. Beteiligung volatiler Substanzen	37
3.1.1.3. Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung	38

3.1.1.4.	Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien	39
3.1.1.5.	Statistische Auswertung	40
3.1.2.	Ergebnisse	40
3.1.2.1.	Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes	40
3.1.2.2.	Wirkung volatiler Substanzen	44
3.1.2.3.	Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung	45
3.1.2.4.	Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien	48
3.1.2.5.	Zusammenfassende Betrachtung	51
3.2.	Migrationsuntersuchungen mittels Sand-Block	51
3.2.1.	Material und Methoden	52
3.2.1.1.	Verifizierung des Biotests	52
3.2.1.2.	Wirkung von wurzelfreiem Substrat (nicht-)mykorrhizierter Pflanzen auf <i>M. incognita</i>	53
3.2.1.3.	Wirkung von Diffusaten in Sand	54
3.2.1.4.	Wirkung von Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur	55
3.2.1.5.	Statistische Analyse	55
3.2.2.	Ergebnisse	56
3.2.2.1.	Verifizierung der Funktionalität des Setups	56
3.2.2.2.	Wirkung von Diffusaten und Exsudaten im Sand-Block	56
3.2.2.3.	Zusammenfassende Betrachtung	58
3.3.	Migrationsuntersuchungen auf Agar	58
3.3.1.	Material & Methoden	59
3.3.1.1.	Gewinnung der Perkolate	59
3.3.1.2.	Präparation der Perkolate	59
3.3.1.3.	Attraktionswirkung von Perkolaten	60
3.3.1.4.	Modifikation von Versuchsaufbau, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode	61
3.3.1.5.	Statistische Auswertung	63
3.3.2.	Ergebnisse	63
3.3.2.1.	Attraktionswirkung von Perkolaten	63
3.3.2.2.	Modifikation von Versuchsaufbau, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode	70
3.4.	Ergebnisse der Exsudatanalyse mittels UPLC	76
4.	Diskussion	80
4.1.	Migrationsuntersuchungen mittels Olfaktometer	81
4.1.1.	Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes	83
4.1.2.	Wirkung volatiler Substanzen	85
4.1.3.	Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung	86
4.1.4.	Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien	89

4.2. Biochemische Analyse von Exsudatbestandteilen mittels UPLC	93
4.3. Migrationsuntersuchungen mittels Sand-Block	97
4.3.1. Verifizierung der Funktionalität des Setups	97
4.3.2. Wirkung von Diffusaten und Exsudaten im Sand-Block	98
4.4. Migrationsuntersuchungen auf Agar	100
4.4.1. Attraktionswirkung von Perkolaten	100
4.4.2. Modifikation von Setup, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode	103
4.5. Abschließende Bewertung der durchgeführten Pair-Choice-Assays	105
5. Zusammenfassung	109
6. Ausblick	113
Literaturverzeichnis	114
A. Lebenslauf	132
B. Danksagung	133
C. Eidesstattliche Erklärung	134

Tabellenverzeichnis

2.1. Details zur Gradientenetablierung der UPLC-Analyse	34
3.1. Biomassedaten von <i>S. lycopersicum</i> 'KK2'	41
3.2. Wurzelarchitektur von <i>S. lycopersicum</i> 'KK2'	41
3.3. Biomassedaten von <i>S. lycopersicum</i> 'FM TT'	42
3.4. Wurzelarchitektur von <i>S. lycopersicum</i> 'FM TT'	42
3.5. Biomassedaten der Evaluation der Beteiligung volatiler Substanzen	44
3.6. Biomassedaten der Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung	47
3.7. Biomassedaten der Evaluation der kombinierten Attraktionswirkung von AMP und PGPR	48
3.8. Migration im Sand-Block in Richtung Wirtspflanze	56
3.9. Migration im Sand-Block-Assay mit wurzelfreiem Substrat	57
3.10. Migration im Sand-Block-Assay mit diffusathaltigem Quarzsand	57
3.11. Migration im Sand-Block-Assay mit Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur	58
3.12. Migration auf Agar, Testmaterial: unbehandeltes Perkolat	64
3.13. Migration auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat	65
3.14. Migration auf Agar, Testmaterial: 2-fach aufkonzentriertes Perkolat	66
3.15. Migration auf Agar, Testmaterial: Kondenswasser gefriergetrockneter Per- kolate	68
3.16. Migration auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat in Mehrfachappli- kation I	69
3.17. Migration auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat in Mehrfachappli- kation II	69
3.18. Migration auf Agar, Testsubstanz: NaCl	71
3.19. Migration auf Agar-Streifen, Testsubstanz: NaCl	71
3.20. Migration auf Agar-Streifen, Testsubstanz: Glucose	73
3.21. Migration auf Agar-Streifen, Testsubstanz: Ribose	73
3.22. Migration auf Agar-Streifen, Testsubstanz: Zitronensäure	74
3.23. Migration auf Agar-Streifen, Testmaterial: Exsudate aus teil-hydroponischer Kultur	75
3.24. Zusammenfassung der UPLC-Analyse	76
4.1. Exsudatbestandteile	95
4.2. Vergleich der Exsudatzusammensetzung mykorrhizierter und mykorrhhi- zafreier <i>S. lycopersicum</i>	96

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schematische Darstellung der Wurzelregionm nach Brimecombe <i>et al.</i> (2007)	15
3.1. Aufbau des Olfaktometer-Setups	37
3.2. Olfaktometer-Setup zur Evaluation der Beteiligung volatiler Substanzen	38
3.3. Olfaktometer-Setup zur Differenzierung zwischen Repellent- und Attractant-Wirkung	39
3.4. Orientierung von <i>M. incognita</i> im Olfaktometer in Richtung (nicht-)mykorrhizierter <i>S. lycopersicum</i> 'KK2'	43
3.5. Orientierung von <i>M. incognita</i> im Olfaktometer in Richtung (nicht-)mykorrhizierter <i>S. lycopersicum</i> 'FMTT'	43
3.6. Beteiligung volatiler Substanzen im Olfaktometer-Setup	45
3.7. Ergebnisse der Differenzierung zwischen Repellent- und Attractant-Wirkung	47
3.8. Besiedlungsdichte des Substrates mit <i>C. turbata</i> bzw. <i>A. baumannii</i>	49
3.9. Attraktion von <i>M. incognita</i> bei Applikation von AMP und PGPR	50
3.10. Setup zur Verifizierung des Sand-Block-Assays	53
3.11. Sand-Block-Assay zur Untersuchung der Diffusatwirkung	54
3.12. Setup zur Untersuchung von Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur	55
3.13. Erfassung der Ausbreitung von <i>M. incognita</i> auf Agar nach Bilgrami <i>et al.</i> (1985)	60
3.14. Skala für die Erfassung der Nematoden-Verteilung, nach Diez und Dusenbery (1989)	62
3.15. Minimierte Testarena auf Agar zur Verbesserung des Diffusionsgradienten	62
3.16. Ausschnitt der UPLC-Analyse	77

Abkürzungsverzeichnis

AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
AMP	arbuskuläre Mykorrhizapilz(e)
bdH ₂ O	Aqua bidestillata
cfu	colonies forming units - koloniebildende Einheiten
dH ₂ O	<i>Aqua demineralisata</i>
<i>G.e.</i> 36	<i>Glomus etunicatum</i> 36
<i>G.i.</i> 510	<i>Glomus intraradices</i> 510
J2	<i>Meloidogyne incognita</i> im zweiten Larvenstadium
-myk	mykorrhizafrei
+myk	mykorrhiziert
<i>M.i.</i>	<i>M. incognita</i>
PGPR	plant-growth promoting rhizobacteria - das Pflanzenwachstum fördernde Rhizosphärenbakterien
PPN	pflanzenparasitäre Nematoden
PR	„pathogenesis-related“ - mit Abwehrreaktionen assoziiert
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Plural)
UPLC	Ultra performance liquid chromatography - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

1. Einleitung

„Man kann sagen, dass der Mensch mehr über die unendlichen Weiten des Weltraums weiß als über die Vorgänge in den 60 cm Boden direkt unterhalb der Erdoberfläche“ stellte der Pflanzenphysiologe Richard Zobel (1991) fest. Der Boden wird von zahlreichen Organismen bevölkert und bildet die Grundlage für ein vielschichtiges und äußerst wichtiges Ökosystem, dessen Studium jedoch durch die von Natur aus undurchsichtige Struktur des Bodens erschwert wird.

Die komplexen Wechselwirkungen der Pflanze mit Symbionten, Schaderregern und Rhizosphäre entscheiden über Förderung oder Reduktion des Pflanzenwachstums und sind daher ausschlaggebend für den wirtschaftlich so wichtigen Ertrag der Pflanze.

Die Schutzwirkung der Symbiose zwischen Pflanzen und arbuskulären Mykorrhizapilzen (AMP) gegenüber bodenbürtigen Schaderregern wurde vielfach untersucht und diskutiert, die Untersuchungsergebnisse sind jedoch nicht einheitlich.

Beispielsweise verzögert und reduziert *Glomus etunicatum* die Symptome der Verticillium-Welke an Aubergine, während *G. fasciculatum* keinen Einfluss auf den von *Thielaviopsis basicola* an Zitrusgewächsen verursachten Schaden hat (Davis 1980; Matsubara et al. 1995). *G. macrocarpum* var. *geosporum* fördert hingegen die Entwicklung von *Phytophthora* an Sojabohnen (Ross 1972). Die Entwicklung von Nematoden der Gattung *Meloidogyne* ist an mykorrhizierten Pflanzen, u.a. Tomate, Gurke und Baumwolle, meist schlechter als an mykorrhizafreien (zusammengefasst von Schönbeck 1979).

Die Interaktion im Pathosystem ist also von den einzelnen Komponenten abhängig, in den meisten Fällen bewirkt Mykorrhiza jedoch eine Reduktion bodenbürtiger Pflanzenkrankheiten (Bagyaraj 1984; Dehne 1982; Schönbeck 1979).

1.1. Biologische Pflanzenschutzmittel

Aufgrund zunehmender Verbote synthetischer Pflanzenschutzwirkstoffe zugunsten von Umwelt und Verbrauchergesundheit, sowie bedingt durch das zunehmende Interesse der Konsumenten an biologisch angebauten Nahrungsmitteln gewinnt der biologische Pflanzenschutz ständig an Bedeutung (Oka *et al.* 2000a; Nations 2006).

Biologischer Pflanzenschutz wird definiert als die „Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten mittels eines natürlichen biologischen Prozesses oder dem Produkt eines natürlichen biologischen Prozesses“ (Wilson 1997). Eine Reihe natürlich vorkommender Substanzen und Organismen bewirkt eine Reduktion des Schaderreger-Befalls bei Pflanzen. Im Hinblick auf bodenbürtige Schaderreger sind das z.B. antagonistisch wirkende Bakterien und Mykorrhizapilze.

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Schutzwirkung arbuskulärer Mykorrhiza (AM) an Tomate gegenüber dem Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita*. Masadeh (2005) beobachtete eine verringerte Attraktivität mykorrhizierter Tomaten gegenüber Wurzelgallennematoden. Zudem wiesen sowohl Reimann und Sikora (2003) als auch Masadeh (2005) eine reduzierte Infektion von *Solanum lycopersicum* mit *M. incognita* nach, wenn die Pflanzen zuvor mit *Acinetobacter baumannii* bzw. *Cellulomonas turbata* inokuliert wurden.

Aufbauend auf o.g. Arbeiten wurde die abstoßende Wirkung arbuskulärer Mykorrhiza auf *M. incognita* anhand der von Masadeh (2005) verwendeten Arten *G. intraradices* und *G. etunicatum* untersucht. Weiterhin sollte eine kombinierte Anwendung von *G. in-*

traradices und den Rhizosphärenbakterien *A. baumannii* und *C. turbata* zeigen, inwiefern diese Bakterienstämme die Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen gegenüber *M. incognita* verändern. Als Wirtspflanze wurde *S. lycopersicum* ausgewählt.

1.2. Relevante Nutz- und Schadorganismen der Rhizosphäre

Der Boden ist nicht nur die oberste Verwitterungsschicht der Lithosphäre – er beherbergt auch ein hoch komplexes Ökosystem, charakterisiert von den dynamischen Interaktionen zwischen Pflanzenwurzeln, Tieren und mikrobiellen Prozessen (Copley 2000).

Der Teil des Bodens, welcher der Wirkung und dem Einfluss von Pflanzenwurzeln unterliegt, gilt als Rhizosphäre (Lynch 1994). In diesem Bodenbereich fördern oder hemmen Wurzelexsudate (von der Wurzel abgegebene Stoffe) die Aktivitäten und Ausbreitung mikrobieller Populationen. Auch die Mucilage (eine Glycoproteinschicht, welche von Pflanzen und Bakterien abgesondert wird) auf der Wurzelepidermis bildet ein sehr günstiges Habitat (Rhizoplane) für zahlreiche Pilze und Bakterien. Zudem wurden die Begriffe der Endorhizosphäre, welche die Zellschichten der Wurzel umfasst, und der Ektorhizosphäre, also des Bereiches um die Wurzel herum, definiert (Brimecombe *et al.* 2007, Abb. 1.1). Gemäß Curl und Truelove (1986) können die Interaktionen in der Rhizosphäre in drei verschiedene, aber miteinander in Beziehung stehende, Bereiche unterteilt werden:

1. den Einfluss von Wurzeln auf Boden-Mikroorganismen,
2. den Einfluss der Rhizosphärenbakterien auf das Pflanzenwachstum,
3. und den Einfluss der Rhizosphäre auf bodenbürtige Schaderreger.

Wurzel und Rhizosphäre beeinflussen einander gegenseitig. Die Pflanze gibt u.a. Aminosäuren, organische Säuren, Zucker, Phenole, verschiedene sekundäre Metaboliten, Proteine, CO₂ und andere gasförmige Substanzen ab (Vivanco *et al.* 2002). Die Mikroflora und -fauna metabolisiert die vorhandenen Stoffe. Diese Metabolite wiederum beeinflus-

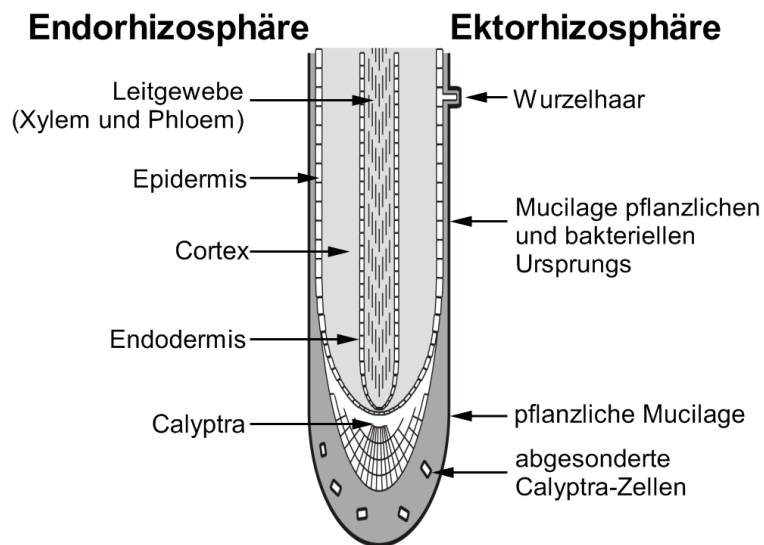


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung der Wurzelregion und der zu Endo- und Ektorhizosphäre gehörenden Bereiche, nach Brimecombe *et al.* (2007), leicht modifiziert

sen Wachstum und Morphologie der Wurzel, die Bildung von Wurzelhaaren, sowie die Aufnahme und Translokation von Nährstoffen in den Spross (Bowen und Rovira 1961; Williamson und Jones 1973; Rovira 1991).

Menge und Zusammensetzung der von der Pflanze abgegebenen Stoffe variieren bei verschiedenen Pflanzenspezies, Sorten und Altersstufen (Bowen und Rovira 1991; Duineveld *et al.* 1998; Lynch und Whipps 1990). Folglich verändern sich im Laufe der pflanzlichen Entwicklung die Zusammensetzung und Dichte der Mikroflora, die diese Substanzen metabolisiert (Bowen und Rovira 1991). Wurzelexsudate und die mikrobiellen Interaktionen an der Grenzfläche von Wurzel und Boden können Schädlingspopulationen, Keimung von Verbreitungseinheiten und Wirtsanfälligkeit beeinflussen (Curl und Truelove 1986).

1.2.1. Pflanzenwachstumsfördernde Rhizosphärenbakterien

Die Bakterien der Rhizosphäre, der Rhizoplane und der Ekto- und Endorhizosphäre synthetisieren sowohl Vitamine als auch Toxine, Ethylen, CO₂, und andere Gase mikrobiellen

Ursprungs, welche das Pflanzenwachstum beeinflussen können (Curl und Truelove 1986). Zu der Mikroflora, welche einen positiven Einfluss auf das Pflanzenwachstum hat, gehören vor allem Bakterien (PGPR - plant growth promoting rhizobacteria), sowie endo- und ektotrophe Mykorrhizapilze (Whipps 2001).

Der förderliche Effekt der PGPR basiert auf zwei Funktionsweisen: Sie begünstigen zum einen direkt das Wachstum, dienen aber zum anderen auch der biologischen Bekämpfung von Schaderregern und fördern das Pflanzenwachstum damit indirekt (Kloepper 1994; Kapulnik und Okon 2002). Dieser förderliche Einfluss kann durch folgende Mechanismen bedingt sein:

1. Die Fixierung von Stickstoff bewirkt eine bessere Nährstoffversorgung der Pflanze (Compant *et al.* 2005).
2. Die Konkurrenz um Eisen und kohlenstoffhaltige Verbindungen: In der eisenarmen Rhizoplane produzieren PGPR Siderophore, um Eisen zu binden, wobei bakterielle Siderophore eine höhere Eisenaffinität haben als pilzliche. So wird pathogenen Pilzen eine wichtige Entwicklungsgrundlage entzogen (O'Sullivan und O'Gara 1992; Loper und Henkels 1999; Compant *et al.* 2005). Zudem ist die unmittelbare Umgebung der Wurzel reich an kohlenstoffhaltigen Wurzelexsudaten, was zu einem Wettbewerb der Organismen in der Rhizosphäre führt. PGPR können diese Bereiche mittels Chemotaxis und Flagellen gezielt besiedeln und diese ökologische Nische folglich für Schaderreger unzugänglich machen (de Weger *et al.* 1987; Turnbull *et al.* 2001; Compant *et al.* 2005).
3. Die Produktion von Pflanzenwachstumsregulatoren: Einige PGPR produzieren u.a. Auxine, Cytokinine, Gibberelline, Ethylen und Abscisinsäure, fördern somit z.B. das Wurzelwachstum und verbessern damit die Nährstoff- und Wasseraufnahme (Kapulnik und Okon 2002).
4. Antibiosis: Verschiedene von PGPR produzierte Antibiotika wurden bislang iden-

- tifiziert, unter anderem Amphisin, Phenazin, Tensin und Blausäure (Thomashow *et al.* 1990; Nielsen *et al.* 2002; Nielsen und Sorensen 2003; de Souza *et al.* 2003). Einige Bakterienstämme sekretieren lytische Enzyme, wie Zellwand-Hydrolasen, Chitinase und β -1,3-Glucanase (Fridlender *et al.* 1993; Frankowski *et al.* 2001; Chernin und Chet 2002). Diese Stoffe können eine Inhibierung oder Zerstörung des Schaderregers bewirken.
5. Störung der Virulenz: Einige PGPR detoxifizieren und degradieren Virulenzfaktoren, also Stoffe, die Schaderregern den Befall des Wirtes ermöglichen. Umgekehrt können Schaderreger jedoch ebenso die von PGPR produzierten Antibiotika zersetzen und das Wachstum der Nutzorganismen unterdrücken (Duffy *et al.* 2003; Schouten *et al.* 2004).
 6. Induktion systemischer Resistenz: Diese bewirkt eine Verstärkung der pflanzlichen Abwehr und verändert Physiologie und Metabolismus des Wirtes durch eine intensivierte Bildung von Pflanzenabwehrstoffen bei der Infektion mit einem Schaderreger und/oder dem Auftreten von abiotischem Stress (Ramamoorthy *et al.* 2001; Nowak und Shulaev 2003). Eine Infektion bewirkt die Bildung struktureller Barrieren (z.B. verdickte Zellwandpapillen durch Kallose-Auflagerung) und die Akkumulation phenolischer Verbindungen am Ort des Pathogen-Befalls (Benhamou *et al.* 1996; M'piga *et al.* 1997; Benhamou *et al.* 1998). Zudem kann die Synthese von PR-Proteinen (pathogenesis-related) induziert werden. Diese sind säurestabil und zeigen nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Proteinasen (Elstner *et al.* 1996). Hierbei handelt es sich z.B. um Chitinasen, Peroxidasen oder β -1,3-Glucanasen (Maurhofer *et al.* 1994; Elstner *et al.* 1996; M'piga *et al.* 1997; Park und Kloepper 2000; Ramamoorthy *et al.* 2001). Einige PGPR induzieren keine PR-Proteine, steigern aber die Akkumulation von Peroxidase, Phenylalanin-Ammonium-Lyase, Phytoalexinen, Polyphenol-Oxidase und/oder Chalcon-Synthase (Chen *et al.* 2000; Ongena *et al.* 2000; Ramamoorthy *et al.* 2001).

Die drei letztgenannten Faktoren sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse, da sie der biologischen Bekämpfung bodenbürtiger Pathogene dienen, während die drei erstgenannten das pflanzliche Wachstum fördern.

1.2.2. Arbuskuläre Mykorrhizapilze

Man unterscheidet zwischen den zwei großen Gruppen der Ektomykorrhiza und Endomykorrhiza. Letztere wird wiederum unterteilt in arbuskuläre, erikoide, monotropoide und orchidoide Mykorrhiza (Smith und Read 2008). Arbuskuläre Mykorrhizapilze sind ubiquitäre Boden-Mikroorganismen, die eine Symbiose mit den Wurzeln von Pflanzen eingehen (Smith und Read 2008). Ihr Myzel wächst von den besiedelten Apoplasten der Wurzel ausgehend in die Rhizosphäre (Curl und Truelove 1986). Im Inneren der Wurzelzelle bilden sie Strukturen aus, die den Transfer von Kohlenstoff in Form pflanzlicher Photosynthese-Assimilate zum Pilz ermöglichen. Sie sind in der Lage ca. 80% aller terrestrischen Blütenpflanzen zu besiedeln, inklusive vieler landwirtschaftlich bedeutender Kulturpflanzen (Harrier und Watson 2004).

Die wichtigsten Einflussgrößen der Rhizosphäre auf die Mykorrhiza sind Wurzelexsudate und die Interaktion mit anderen Organismen. Sie fördern oder hemmen die Symbiose-Etablierung (Curl und Truelove 1986). Häufig ist die mykorrhizierte Pflanze weniger anfällig gegenüber bodenbürtigen Schaderregern (z.B. Dehne 1982; Bagyaraj 1984; Smith 1987; Sharma *et al.* 1992). Dieser, als „Bioprotection“ bekannten, Eigenschaft liegen laut Harrier und Watson (2004) mehrere Ursachen zugrunde:

1. Eine Steigerung des Pflanzenwachstums: die Symbiose mit AMP gewährleistet eine verbesserte Versorgung mit P, aber auch Ca, sowie Fe, Cu, Mn, Zn und anderen Mikronährstoffen. Dies bewirkt ein verstärktes Spross- und Wurzelwachstum und damit eine erhöhte Absorptionskapazität für Wasser und Nährstoffe und möglicherweise eine bessere Kompensation pathogenbedingter Schädigungen (Clark und Zeto 2000; Harrier und Watson 2004).

2. Eine veränderte Anfälligkeit der Pflanze: Die Symbiose bewirkt eine stärkere Verzweigung und veränderte Lebensdauer mykorrhizierter Wurzeln was die Anfälligkeit der Pflanze beeinflussen kann (Hooker *et al.* 1995; Hodge *et al.* 2000).
3. Arbuskuläre Mykorrhizapilze, bodenbürtige Pathogene und pflanzenparasitäre Nematoden konkurrieren um Besiedlungs- und Infektionsorte, da sie das gleiche Gewebe, nicht jedoch dieselbe Zelle besiedeln (Dehne 1982). In und nahe bei mykorrhizierten Zellen wurde ein reduzierter Befall mit Pathogenen und eine Hemmung ihrer Ausbreitung nachgewiesen (Davies und Menge 1980; Cordier *et al.* 1996).
4. Die lokal veränderte Histologie von Wurzelzellen: Durch eine Besiedlung mit AMP wird der pflanzliche Phenolmetabolismus verstärkt (Morandi 1996). Dies bewirkt eine stärkere Zellwand-Lignifizierung, was eine Penetration der Zellen erschwert und so zur „Bioprotection“ beitragen kann (Dehne und Schönbeck 1979).
5. Konkurrenz um Photosynthese-Assimilate: AMP beanspruchen 4 - 20% der pflanzlichen Assimilate (Smith und Read 2008). Möglicherweise spielt die Konkurrenz um Nährstoffe des Wirtes eine wichtige Rolle in der Interaktion mit obligat biotrophen Schadorganismen, wie z.B. endoparasitären Nematoden oder Mehltäupilzen (Smith 1988; Azcón-Aguilar und Barea 1996; Gernns *et al.* 2001).
6. Beeinflussung des Edaphons (Gesamtheit der Bodenorganismen): Die Zusammensetzung von Rhizosphäre und Rhizoplane unterscheidet sich bei mykorrhizierten und mykorrhizafreien Pflanzen (Marschner *et al.* 2001). Grad und Charakteristik der Veränderung sind unter anderem abhängig von AM-Isolat und Wirtspflanze. Sie werden auf eine Veränderung der Wurzelrespiration, sowie die Zusammensetzung und Menge der Wurzelexsudate zurückgeführt. Die Mykorrhizosphäre (der Bereich, der von Mykorrhiza-Hyphen und Pflanzenwurzeln beeinflusst wird) hat ebenfalls einen Einfluss auf die Bodenpopulationen. Die dortige Mikroflora unterscheidet sich von der der Rhizosphäre (Andrade *et al.* 1998). Die Begünstigung

beziehungsweise Benachteiligung bestimmter Bakterienpopulationen durch die Inokulation mit AMP kann eine Bekämpfung von Pflanzenpathogenen ermöglichen (Harrier und Watson 2004).

7. Veränderung der Wurzelexsudat-Zusammensetzung: Die Mykorrhizierung bewirkt eine starke Veränderung der Assimilat-Verteilung in Spross und Wurzel und erhöht die Respiration (Harrier und Watson 2004). Außerdem, und teilweise dadurch bedingt, ändert sich die Zusammensetzung und Menge der abgegebenen Wurzelexsudate, was die Chemotaxis von Schaderregern in Richtung Wurzel beeinflussen kann (Graham *et al.* 1981; Marschner *et al.* 1997).
8. Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen: Die Symbiose beeinflusst die pflanzliche Genexpression - die Pflanze produziert Substanzen, die an Abwehrreaktionen beteiligt sind, z.B. Phytoalexine, Phenole, Peroxidasen und Chitinasen (Cordier *et al.* 1996; Morandi 1996; Pozo *et al.* 1998, 2002). Die Resistenz wird sowohl lokal als auch systemisch induziert (Cordier *et al.* 1996; Pozo *et al.* 2002). Diese Prä-Aktivierung der Abwehrreaktionen ermöglicht eine schnellere Antwort auf Infektion durch einen Schaderreger (Slezack *et al.* 2000).

Von den oben genannten Mechanismen, welche zum biologischen Schutz der Pflanze durch PGPR und AMP beitragen, sind Antagonismus und Antibiose, die Degradierung von Virulenzfaktoren, die Veränderung der Wurzelexsudat-Zusammensetzung und die Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen im Rahmen der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse und werden eingehender untersucht beziehungsweise diskutiert.

1.2.3. *Meloidogyne incognita*

M. incognita zählt zur Gattung der wirtschaftlich wichtigsten Vertreter sedentärer endoparasitärer Wurzelgallennematoden und hat ein Wirtspflanzenspektrum von mehr als 2000 Pflanzenarten, darunter unter anderem Tomate, Gurke, Tabak, Salat und diverse

Zierpflanzen (Sasser 1966; Jung und Wyss 1999). Hauptverbreitungsgebiete von *M. incognita* sind die südliche USA, Mittel- u. Südamerika, Afrika, Australien, Indien, Indonesien, Japan und Italien (Decker 1969).

Die Pflanzen werden von Tieren im zweiten Larvenstadium (J2) befallen, welche die Streckungszone der Wurzel penetrieren (Dropkin 1980). Dort werden sie sedentär und induzieren die Bildung mehrkerniger Riesenzellen, von denen sie sich ernähren. Das umgebende Gewebe hypertrophiert und es kommt zur Bildung der charakteristischen Wurzelgallen (Decker 1969). Nach zwei bis drei Wochen erfolgen im Abstand weniger Tage die zweite, dritte und vierte Häutung. Anschließend sind die Männchen mobil, fadenförmig und verlassen das Wirtsgewebe. Die Weibchen hingegen sind weiterhin sedentär, birnenförmig angeschwollen und produzieren 500-1000 Eier, welche sie in einer gelatinösen Matrix an der Wurzeloberfläche ablegen (de Guiran und Ritter 1979). Die erste Häutung der Jungtiere findet im Ei statt, der Schlupf erfolgt spontan, kann aber durch die Anwesenheit von Wurzelexsudaten stimuliert werden (Viglierchio und Lownsbery 1960; Gaur *et al.* 2000). Die J2 orientieren sich an Stimuli, welche von der Wurzel ausgehen, migrieren zur Wirtswurzel und befallen sie erneut (Dropkin 1980). Es herrscht Unklarheit über die Natur spezifischer Stimuli. Viele organische und anorganische Stoffe werden von Pflanzenwurzeln abgegeben und bilden im Substrat Gradienten. Wie wichtig chemische und elektrische Stimuli zur Orientierung der Tiere in Richtung der Wirtspflanze sind, ist nicht vollständig geklärt (Robinson und Perry 2006). Dass Chemorezeption bei der Orientierung eine Rolle spielt wurde von Perry (1996) nachgewiesen. Als wichtigster attraktiver Stoff (Attractant) wird CO₂ angesehen (Karssen und Moens 2006). Die Attraktivität von Wurzelexsudaten ist wirtsspezifisch und nur in wenigen Fällen ist bekannt, welches Kairomon eine Attraktion verursacht (Griffin und Waite 1971; Rühm *et al.* 2003; Spiegel *et al.* 2003)

Durch die von *Meloidogyne* spp. induzierte Hypertrophierung des Gewebes im Bereich der Wurzelgallen wird der Wassertransport beeinträchtigt und das Wurzelwachstum gestört

(Hallmann *et al.* 2007). Zusätzlich entziehen die Tiere dem Wirt Assimilate, wodurch sich das source-sink-Verhältnis zu Ungunsten der Pflanze ändert. Auch die Photosynthese nimmt ab (Loveys und Bird 1973; Wallace 1974; Melakeberhan und Ferris 1989). Zudem steigt durch die Gewebeschädigung die Anfälligkeit gegenüber einem Sekundärbefall durch bakterielle und pilzliche Pathogene (Decker 1969; Powell 1971; van Gundy *et al.* 1977; Deberdt *et al.* 1999).

Die biologische Bekämpfung von *M. incognita* im Speziellen und pflanzenparasitären Nematoden (PPN) im Allgemeinen durch Fruchtwechsel ist aufgrund des breiten Wirtspflanzenspektrums schwierig. Folgende Ansätze werden verfolgt: Fruchtwechsel mit Spargel, Mais, Tagetes, Zwiebeln oder Knoblauch reduzieren die Populationen von Wurzelgallennematoden, Erdnuß, Erdbeere und Kaffee sind gegenüber *M. incognita* resistent (Sasser 1966; Guerena 2006). Auch der Einsatz von Schwarzbrache, resistenten Pflanzen, Solarisation und Biofumigation führt zur Populations-Reduktion von PPN. Unter letztgenannter Methode versteht man die Einarbeitung glucosinolathaltiger Pflanzen in den Boden - die Spaltprodukte der Glucosinolate wirken nematizid (Guerena 2006; Nico *et al.* 2003; Bello *et al.* 2008; Hallmann *et al.* 2008).

Eine regelmäßige Einbringung organischen Materials in den Boden unterstützt das natürliche Bodenökosystem und fördert damit die Bodenstruktur und -fertilität, beeinflusst die Resistenz der Pflanzen positiv, führt zur Freisetzung von nematotoxischen Substanzen und erhöht sowohl das Vorkommen pilzlicher und bakterieller Antagonisten als auch anderer nematizider Substanzen (Oka 2002; Akhtar und Alam 1993; Akhtar und Malik 2000). Auch ätherische Öle, z.B. von Neem, Kümmel, Fenchel, Grüner Minze und Oregano wirken nematizid (Akhtar 1998; Oka *et al.* 2000b).

Präparate mit bakteriellen Antagonisten enthalten z.B. *Pasteuria penetrans* oder *Burkholderia cepacia*, pilzliche Antagonisten sind z.B. *Trichoderma harzianum*, *Verticillium chlamydosporum*, *Paecilomyces lilacinus* oder *Myrothecium verrucaria*. Auch die Resis-

tenz induzierenden arbuskulären Mykorrhizapilze wie *Glomus* spp. können zur biologischen Bekämpfung von *Meloidogyne* spp. eingesetzt werden (Kellam und Schenck 1980; Suresh *et al.* 1985; Jaizme-Vega *et al.* 2004; Guerena 2006).

Die Schutzwirkung von AM ist stets von der Zusammensetzung des Pathosystems abhängig (Roncadori und Hussey 1977; Hussey und Roncadori 1982; Dehne 1982). So hatte *Gigaspora margarita* an Tomate weder einen fördernden, noch hemmenden Einfluss auf die Population von *M. incognita*, während *G. macrocarpus* an Sojabohne die Populationsentwicklung von *M. incognita* sogar förderte (Hussey und Roncadori 1982). Bei Calvet *et al.* (2001) konnten nativ im Boden vorhandene AMP die Besiedlung mit Nematoden nicht so stark reduzieren wie zusätzlich mit einem Komplex aus drei AMP-Isolaten inokulierte Pflanzen. Jedoch kann Mykorrhiza der Gattung *Glomus* an Tomate auch zu einer reduzierten Gallenbildung durch Nematoden der Gattung *Meloidogyne* führen (Sikora 1978; Bagyaraj *et al.* 1979; Cooper und Grandisons 1986; Talavera *et al.* 2001; Masadeh 2005). Als Ursache hierfür wurde eine schlechtere Entwicklung sedentärer endoparasitärer Nematoden in einer mykorrhizierten Pflanze und eine Reduktion der Population im Boden angegeben (Suresh *et al.* 1985; Smith 1987; Elsen *et al.* 2001; Talavera *et al.* 2001; Jaizme-Vega *et al.* 2004). Als Maß für die Wirksamkeit eines Mykorrhiza-Isolates gegen *Meloidogyne* spp. wird häufig die Gallenanzahl an den Wurzeln angegeben. Aus diesem Parameter lässt sich keine Erklärung für die Reduktion des Befalls ableiten. Diese kann entweder in einer schlechteren Entwicklung der Tiere in der Pflanze oder in einer verschlechterten Wirtsfindung begründet sein. Es besteht daher dringender Klärungsbedarf über die Veränderung der Attraktivität der Wurzel durch Mykorrhizierung.

Durch die Symbiose mit AM-Pilzen verändert sich die Exsudation der Pflanze, es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Anlockung bzw. Attraktivität über längere Distanz vermindert und dies zur Reduktion des Pathogenbefalls führt bzw. beiträgt

(Sikora 1978; Graham *et al.* 1981; Hussey und Roncadori 1982; Sood 2003; Harrier und Watson 2004). Nematoden orientieren sich u.a. an Wurzelexsudaten, um Wirtspflanzen zu lokalisieren (Lownsbery und Viglierchio 1961; Zuckerman und Jansson 1984; Dusenbery 1987b). Wenn die Pflanze Endophyten beherbergt, kann sich ihre Attraktivität verändern (Masadeh 2005; Dababat und Sikora 2007). Es stellt sich die Frage, ob die Wirtsattraktivität auch über eine größere Distanz, z.B. über mehrere Zentimeter von der Wurzel entfernt, beeinflusst ist, oder nur in unmittelbarer Nähe. In der Vergangenheit wurde in verschiedenen Bioassays *in vitro* eine Abstoßung bzw. Anziehung von Nematoden über eine Distanz von mehreren Zentimetern erreicht. Diese Tests wurden in Sand und auf Agar, mit lebenden Pflanzen, Wurzelexsudaten und einzelnen Substanzen durchgeführt (z.B. Viglierchio 1961; Castro *et al.* 1989; Diez und Dusenbery 1989; Rühm 2000; Dababat und Sikora 2007).

Untersuchungen zur Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen liegen kaum vor, jedoch weisen die vorhandenen Ergebnisse auf eine Präferenz mykorrhizafreier Pflanzen bzw. Wurzelregionen durch *M. incognita in vivo* hin (Sikora 1978; Masadeh 2005). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit die Mykorrhizierung von Pflanzen sich schon vor dem Befall mit *M. incognita* auf die Wirtsfindung von Nematoden auswirkt.

Wurden Pflanzen mit PGPR inokuliert, verminderte sich in einigen Fällen sowohl die Gallenbildung als auch die Populationsdichte im Boden (Oostendorp und Sikora 1990; Reimann und Sikora 2003; Siddiqui 2004; Siddiqui *et al.* 2007). Reimann und Sikora (2003) wiesen nach, dass von AMP-Sporen isolierte Bakterienstämme von *Acinetobacter baumannii* und *Cellulomonas turbata* den *M. incognita*-Befall an Tomaten signifikant minderten. Auf diese Veröffentlichung aufbauend erzielte Masadeh (2005) mit einer Kombination von AMP und den von Reimann und Sikora (2003) verwendeten Isolaten eine signifikante Reduktion der Gallenbildung durch *M. incognita* im Vergleich zur Kontroll-

variante und zu Einzelinokulationen. In der vorliegenden Literatur wurden bisher primär die Auswirkungen auf Gallenbildung oder Schlupfrate untersucht, kaum jedoch die Veränderung der Wirtsattraktivität. Es ist daher bislang unklar, ob die verstärkte Reduktion der Gallenbildung bei einer Kombination von AMP und PGPR auch auf eine Attraktivitätsveränderung zurückgeht.

Zudem stellt sich die Frage, welcher Biotest geeignet ist, die *in vivo* gewonnenen Ergebnisse *in vitro* zu reproduzieren und so durch eine Vereinfachung des Testsystems mehr Informationen über die ursächlichen Substanzen zu gewinnen. Da es verschiedene Assays mit spezifischen Vor- und Nachteilen gibt, sollte geklärt werden, welches Testsystem sich im vorliegenden Fall anbietet und inwieweit das Ergebnis von der Methodik abhängt (Spence *et al.* 2008).

1.2.4. Zielsetzung

Es soll geklärt werden, ob eine verminderte Attraktivität der Wurzeln auf *M. incognita* die Ursache für die Schutzfunktion der untersuchten AMP ist. Die Zusammensetzung der Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen soll untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine oder mehrere Substanzen zu ziehen, die das Migrationsverhalten der Nematoden *in vitro* und *in vivo* verändern. Hierbei soll zudem die Auswirkung der Methodik auf das Ergebnis evaluiert werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob und wie eine Kombination von AMP mit Rhizosphärenbakterien die Wirtsattraktivität gegenüber *M. incognita* verändert.

2. Material & Methoden

2.1. Versuchsorganismen

Wirtspflanze

Solanum lycopersicum der Sorten

'King Kong II' („KK2“, Known-You Seed Co., Ltd. Thailand) und

'Fresh Market Tropical Tomato 260' („FM TT“, AVRDC, Shanhua, Taiwan)

Arbuskuläre Mykorrhizapilze

Glomus etunicatum 36 („*G.e.* 36“, Dr. H. Baltruschat, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Glomus intraradices 510 („*G.i.* 510“, Sammlung des Instituts für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Leibniz Universität Hannover)

Rhizosphärenbakterien

Cellulomonas turbata SR1 und *Acinetobacter baumannii* SR6 (Prof. Dr. R. Sikora, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Pathogen

Meloidogyne incognita Rasse 3 (Dr. J. Hallmann, Julius-Kühn-Institut, Münster)

2.2. Pflanzen

2.2.1. Anzucht und Kultur der Pflanzen im Gewächshaus

S. lycopersicum 'King Kong II' und 'Fresh Market Tropical Tomato 260' wurden 3 Wochen lang in Aussaatschalen auf Einheitserde angezogen (Fruhstorfer Erde Typ P, Fa. Flormaris, Deutschland), danach einzeln in eine 3:1-Mischung aus sterilem Quarzsand und Einheitserde getopft ($V=1,6$ L) und gegebenenfalls mit 10% (v/v) AMP inokuliert. Die Pflanzen wurden adäquat gewässert und wöchentlich mit je 40 ml Wuxal Top N (N P K 12-4-6, Aglukon Ltd., Düsseldorf, Deutschland) gedüngt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte bei einer Belichtungsdauer von 16 h pro Tag (10.600 Lux) bei 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40%.

2.2.2. Ernte

Die Sprosse wurden 1 cm über dem Substrat abgetrennt und die Wurzeln ausgewaschen. Es wurden das Frischgewicht von Spross und Wurzel, sowie das Spross-Trockengewicht bestimmt. Für Experimente, bei denen die Wurzelarchitektur analysiert wurde, wurden die Wurzeln so intakt wie möglich mittels WinRHIZO 2003b Pro (Regent Instruments Inc., Kanada) gescannt und Gesamtwurzellänge, Verzweigungen und die Anzahl der Wurzelspitzen pro Pflanze analysiert.

2.3. Rhizosphärenbakterien: Selektion, Inokulation und Quantifizierung der Bodenpopulation

Die verwendeten Isolate waren rifampicin- und streptomycinresistente Mutanten des Wildtyps und wurden auf antibiotikahaltigem Boullion-Agar (10 g/L Fleischextrakt, 10 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 18 g/L Agar, je 100 ppm Streptomycin und Rifampicin) selektiert. Diese Resistenz ermöglichte die Reisolation aus dem Boden und die Überwachung der Populationsentwicklung.

Zur Inokulation der Pflanzen wurden die Isolate 48 h bei 28°C auf o.g. Boullion-Agar angezogen und dann jeweils eine Einzelkolonie in 100 ml CASO-Boullion (30 g/L, Fluka, Deutschland) auf einem Rotationsschüttler 20 h bei 100 rpm und 28°C unter Lichtausschluß inkubiert. Vor Zugabe der Bakterienstämme wurden dem Medium jeweils 100 µl/L Antibiotika zugesetzt. Die Suspensionen wurden auf eine optische Dichte von 2 (650 nm) eingestellt, mittels Zentrifugation aufkonzentriert (5500 rpm, 20 min, 10°C), zweimal in $\frac{1}{4}$ Ringer-Lösung (Merck, Deutschland) resuspendiert und gewaschen.

Die Inokulation der Pflanzen mit den Bakterien erfolgte 14 Tage (*C. turbata*: $9,2 \times 10^5$ cfu/ml (cfu = koloniebildende Einheiten), *A. baumannii*: 5×10^7 cfu/ml) und 30 Tage (*C. turbata*: $2,6 \times 10^4$ cfu/ml, *A. baumannii*: $4,6 \times 10^6$ cfu/ml) nach Inokulation mit *G.i.* 510. Die Pflanzen wurden durch Aufpipettieren von 5 ml Bakterien-Suspension rund um die Sprossbasis inokuliert.

Die Population von *A. baumannii* und *C. turbata* im Substrat wurde zum Zeitpunkt der Inokulation der Versuchseinheiten mit *M. incognita* ermittelt. Jeweils drei Pflanzen pro Behandlung wurden zufällig beprobt: Substrat wurde mittels eines Korkbohrers entnommen, suspendiert (1:10) und mit sterilem *Aqua demineralisata* (dH₂O) Verdünnungsreihen angefertigt. Diese Verdünnungen wurden auf Antibiotika-haltigem (je 100 ppm Rifampicin und Streptomycin) Boullion-Agar ausgestrichen, 48 h bei 28°C inkubiert, die cfu/g Substrat (Trockengewicht) ermittelt und mit der Nematoden-Migration in Relation gesetzt.

2.4. Arbuskuläre Mykorrhizapilze

2.4.1. Vermehrung von AMP-Inokulum

Die Isolate wurden gemäß Dehne und Backhaus (1986) unter Gewächshausbedingungen 12 Wochen lang an *Tagetes erecta* 'Hohe Mischung' (Fa. Kiepenkerl) auf Blähton (LamstedtDan 1-5 mm, Fa. Fibo ExClay, Deutschland) vermehrt.

2.4.2. Quantifizierung der Mykorrhizierung

Die ausgewaschenen Wurzeln wurden in 3% KOH (w/v) über Nacht geklärt und dann mit einem Gemisch aus 2% schwarzer Tinte (Pelikan Co., Hannover) und 5% Essig (w/v) angefärbt (Vierheilig *et al.* 1998, modifiziert). Pro Probe wurden je 20 2 cm-Stücke mikroskopisch auf Mykorrhizierung hin untersucht und die Mykorrhizierungsfrequenz in Prozent besiedelter Wurzelstücke gemäß folgender Formel determiniert:

$$\text{Mykorrhizierungsfrequenz} = \left(\frac{\text{Zahl mykorrhizierter Wurzelstücke}}{20} \right) \times 100$$

2.5. Nematoden

Die Quelle des Nematoden-Inokulums war eine Population von *Meloidogyne incognita*, kultiviert an *S. lycopersicum* 'FMTT' in einem Sand-Einheitserde-Gemisch (3:1 v/v). Die Inokulation neuer Pflanzen erfolgte durch Angießen mit einer definierten Menge J2 in Leitungswasser, die Anzahl der jeweiligen Tiere pro Experiment ist an entsprechender Stelle angegeben.

2.5.1. Inokulumgewinnung

Tomatenpflanzen wurden mit *M. incognita* inokuliert und 6 - 8 Wochen später genutzt, um Eier zu gewinnen. In Anlehnung an Hussey und Barker (1973) wurden die stark vergallten Wurzeln vorsichtig ausgewaschen, in 1-2 cm lange Stücke geschnitten und für 3 min in 1,5%iger Chlornlösung (DanChlorix, Fa. Henkel, Deutschland) kräftig geschüttelt, um die Eier aus der gelatinösen Matrix der an der Wurzel haftenden Eimassen zu befreien. Die Eier wurden durch eine Siebkombination von 53 µm und 20 µm von den Pflanzenresten separiert und dabei mehrfach gewaschen, um Chlorrückstände von den Eiern zu entfernen. Die auf dem 20 µm-Sieb verbleibenden Eier wurden in Leitungswasser gesammelt und für 3 - 10 Tage mit Druckluft bei 24°C belüftet, um den Schlupf

von *M. incognita* im zweiten Larvenstadium zu induzieren. Versuchsreihen ergaben keine Unterschiede im Attraktionsverhalten 3 und 10 Tage alter J2. Die aktiven Larven wurden mittels Oostenbrink-Filter-Methode selektiert (Oostenbrink 1960) und auf die gewünschte Individuendichte aufkonzentriert.

2.5.2. Auswertung der Migration in Sand

In zwei verschiedenen Assays wurde die Attraktion und Migration von *M. incognita* in Sand evaluiert: im Olfaktometer-Assay (S. 36) und im Sand-Block-Assay (S. 52). Um zu bestimmen, wie die Verteilung der Tiere in den jeweiligen Versuchs-Arenen (Olfaktometer-Verbindungsstück bzw. Sand Block) war, wurden die sandhaltigen Kompartimente je einer Arena in gleich große Abschnitte unterteilt und die Nematoden ausgewaschen und ausgezählt. Drei Methoden wurden angewandt:

1. Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Rückgewinnung der Tiere nach Sikora und Schuster (2000): der Sand wurde jeweils drei Mal in Leitungswasser aufgeschwemmt und durch eine Siebkombination von 150, 50, 30 und 10 μm separiert, aufkonzentriert und Aliquots der Lösung mikroskopisch auf die enthaltene Anzahl an J2 untersucht. Die Rückgewinnungsrate der Tiere betrug ca. 10%. Da dieses Verfahren in allen Schritten sehr zeit- und arbeitsaufwendig war und sich die Auswertung eines einzelnen Experiments über mehrere Monate erstreckte, wurde das Rückgewinnungsverfahren vereinfacht:
2. Die Nematoden wurden mittels der Oostenbrink-Filter-Methode Oostenbrink (1960) zurückgewonnen, die gewonnene Lösung auf 1 ml eingengt und ausgezählt. Diese Methode reduzierte den Arbeitsaufwand, der Geräteaufwand war dagegen erheblich und die Rückgewinnungsrate lag ebenfalls bei lediglich 10%.
3. Eine weitere Vereinfachung der Methodik führte zu einer starken Verbesserung der Auswertung: Die Sand-Proben wurden in einem Schraubgefäß mit einer definierten

Menge Wasser versetzt und 20 sek kräftig geschüttelt. Der Großteil der im Sand enthaltenen J2 befand sich nun im Überstand, von welchem unmittelbar nach dem Schütteln zwei 1 ml-Aliquots pro Probe entnommen, ausgezählt und durch Verrechnung mit dem hinzu gegebenen H₂O-Volumen als Gesamtmenge zurückgewonnener J2 pro Probe dokumentiert wurden (pers. Mitteilung M. Selim, AG Sikora, Universität Bonn). Sowohl der Verlust von Tieren, als auch der Arbeits- und Zeitaufwand konnte so auf ein Minimum gesenkt und die Rückgewinnungsrate auf 50 - 70 % gesteigert werden.

Welche Methode bei den Einzel-Experimenten angewandt wurde, ist jeweils angegeben.

2.5.3. Auswertung der Migration auf Agar

Die Verteilung der Tiere wurde bei 35-facher Vergrößerung mittels Binokular bestimmt. Es wurden stets nur die Tiere registriert, die den Applikationspunkt verlassen hatten und sich somit gezielt in eine Richtung bewegten. Während im ersten Teil des Versuchskomplexes noch die Anzahl der Tiere pro Abschnitt erfasst wurde (Abb. 3.13), diente im zweiten Teil eine Skala zur Erfassung der Ausbreitung der Gesamtheit applizierter J2 (Abb. 3.14) . Beide Methoden sind im entsprechenden Versuchskomplex näher erläutert.

2.6. Exsudatgewinnung

Ein Ziel hier durchgeführten Untersuchungen war es, die *in vivo* von Masadeh (2005) beobachtete geminderte Attraktivität mykorrhizierter Tomatenpflanzen *in vitro* zu reproduzieren und die Substanz zu charakterisieren, welche diesen Effekt verursachte. Hierfür wurden die von Pflanzenwurzeln produzierten Substanzen auf unterschiedlichem Wege gewonnen, aufkonzentriert und analysiert. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird der Einfachheit halber von einer einzigen Substanz gesprochen, welche einen Effekt verursacht. Es wird dabei impliziert, dass es sich auch um ein Substanzgemisch handeln kann.

2.6.1. Perkolation

Drei Wochen alte Tomatenpflanzen wurden in 1,6 L-Töpfe in ein Substrat aus sterilem Quarzsand und Einheitserde (3:1; v/v) mit 10% (v/v) Mykorrhiza-Inokulum gesetzt, Kontrollen enthielten kein Inokulum. Die Symbiose-Etablierung erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen, danach wurden die Pflanzen bis zur Sättigung gegossen und 48 h später die im Substrat enthaltenen Exsudate mittels Perkolation mit dH₂O ausgewaschen. Pro Topf wurden 100 ml Perkolat gewonnen und die Proben von fünf Pflanzen vereinigt und verwendet bzw. unter Lichtausschluß bei 5°C gelagert.

2.6.2. Teil-hydroponische Kultur

In Vorversuchen zeigte sich, dass eine Mykorrhizierung der Pflanzen in rein hydroponischer Kultur unter den gegebenen Bedingungen nicht erfolgte. Daher wurden eine Woche alte Tomatensämlinge in 1,6 L-Töpfe mit sterilem Quarzsand und 10% (v/v) Blähton (steril bzw. mit *G. etunicatum* oder *G. intraradices*) gepflanzt und unter Gewächshausbedingungen wöchentlich mit je 40 ml Hewitt-Lösung mit um 90% reduzierter P-Komponente gedüngt (Hewitt 1952). Die modifizierte Nährstoffzusammensetzung der Lösung war wie folgt: 5 ml Mikronährstofflösung (46 mM H₃BO₃; 14 mM EDTA-Fe(III)-Na-Salz; 9 mM MnCl₂ x 4 H₂O; 0,76 mM ZnSO₄ x 7 H₂O; 0,32 mM CuSO₄ x 5 H₂O; 82 µM NaMoO₄ x 2 H₂O); 50 ml 1 M KNO₃; 50 ml 0,5 M CaNO₃; 20 ml 0,5 M MgSO₄ x 7 H₂O und 10 ml 93 mM NaH₂PO₄ x H₂O pro Liter dH₂O. Die durch die reduzierte P-Gabe forcierte Symbiose-Etablierung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen, danach wurden die Wurzeln vorsichtig ausgewaschen, zur Regeneration der Verwundungen eine Woche in Nährlösung (s.u.) und dann 48 h in dH₂O gesetzt, bevor die in der Lösung befindlichen Substanzen aufkonzentriert bzw. auf ihre Attraktivität getestet wurden. Die wässrigen Medien wurden täglich 30 min belüftet, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Wurzeln zu gewährleisten.

Die Zusammensetzung der Nährlösung basierte auf Knops „Makro-“ und Hoaglands „Mikronährstofflösung a“ (Urbach *et al.* 1983), die Modifizierung erfolgte nach Dugassa *et al.* (1995): Zunächst wurden die Stammlösungen aus einer 20-fach konzentrierten Makro- und einer 18-fach konzentrierten Mikronährstofflösung hergestellt. Durch Lösen von 12,05 g Triplex II (EDTA, Merck) in 1 N NaOH, welche 13,45 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthielt, wurde eine Eisenchelate-Stammlösung hergestellt. Diese wurde mit dH_2O auf 500 ml aufgefüllt. Über Nacht wurde Sauerstoff in die Lösung eingeleitet, um die Bildung von Eisenkomplexen zu erleichtern. Die verwendete Nährlösung setzte sich aus Makronährstoffen (Verdünnung: 1:40), Mikronährstoffen und Eisenchelate (Verdünnung jeweils: 1:1000), gelöst in Leitungswasser, zusammen und wies einen pH von 7 - 7,2 auf.

2.6.3. Solid-Phase-Extraction

Zur Analyse der über die Wurzeln sezernierten Stoffe mittels UPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wurden die Exsudate von Pflanzen aus teil-hydroponischer Kultur nach 48 h in 250 ml bidestilliertem Wasser (bdH_2O) mittels Solid-Phase-Extraction aufkonzentriert. 6 ml-C18 Hydra-Kartuschen (Chromabond[®], Fa. Macherey-Nagel, Deutschland) wurden zunächst mit je 6 ml Methanol und 6 ml bdH_2O konditioniert, dann mit je 100 ml Exsudat befüllt und anschließend getrocknet. Die Elution erfolgte mit 2 x 1 ml Acetonitril.

2.6.4. UPLC

Die Eluate von je drei Proben einer Variante wurden vereinigt und ihre Zusammensetzung mittels UPLC-MS analysiert. Die UPLC wurde mit dem „Acquity[®]“-UPLC-System (Fa. Waters Corp., USA) mit einer stationären Phase von 1,7 μm und 2,1 x 50 mm (Acquity[®] UPLC-BEH C18), einer mobilen Phase aus Methanol/Wasser mit jeweils 0,1% Ameisensäure (Fa. Sigma-Aldrich, USA) und einem Injektionsvolumen von 5 μl durchgeführt. Details zur Gradientenzeit finden sich in Tab. 2.1. Die zugehörigen

Summenformeln und Anzahl der Doppelbindungen wurden mithilfe der Geräte-Software anhand der ermittelten Substanz-Eigenschaften, z.B. Retentionszeit und molekulare Masse, errechnet. Um Substanzen zu bestimmen, welche mit den Berechnungen übereinstimmende Summenformeln und Doppelbindungen aufweisen, wurden die Datenbanken „<http://www.chemspider.com>“, „<http://metlin.scripps.edu>“ und „<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>“ genutzt (Sana *et al.* 2008; Bolton *et al.* 2008).

Tab. 2.1.: Details zur Gradientenetablierung der UPLC-Analyse

Zeit [min]	H ₂ O : CH ₃ OH [%]
Initial	95 : 5
2,50	5 : 95
6,50	5 : 95
6,60	95 : 5
20,00	95 : 5

2.7. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit R 2.7.1 realisiert (R 2005). Je nach Fragestellung wurden verschiedene Tests zur Ermittlung der Signifikanzen durchgeführt: Die Überprüfung der Häufigkeitsverteilung von Nematoden erfolgte mithilfe der Odd's Ratio. Der Vergleich der Nematoden-Verteilung durch Kategorisierung, wie unter 3.3 erfolgt, wurde mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt und der multiple Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei Varianten, welcher bei der Erhebung der Biomasse und cfu nötig ist, wurde anhand des generalisierten linearen Modells des Tukey-Tests durchgeführt. Statistische Signifikanzen liegen vor, wenn $p \leq 0,05$ ist. Details zur jeweils verwendeten statistischen Methode sind an entsprechender Stelle angegeben.

3. Untersuchung der Attraktionswirkung mykorrhizierter Pflanzen gegenüber *M. incognita*

3.1. Migrationsuntersuchungen mittels Olfaktometer

Um Wanderung und Attraktion von *M. incognita* unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus zu untersuchen, wurde mit dem Versuchsaufbau von Masadeh (2005) ein Pair-Choice-Assay durchgeführt. Hierbei wurden mykorrhizierte und mykorrhizafreie Tomatenpflanzen einander gegenübergestellt und mit einer Sandbrücke verbunden. In diese konnten Exsudate diffundieren und die Orientierung dort applizierter J2 beeinflussen. Ziele dieses Experiment-Komplexes waren:

1. herauszufinden, ob der von Masadeh (2005) an *S. lycopersicum* 'King Kong II' beobachtete Effekt reproduziert und auf eine andere Sorte übertragen werden kann,
2. zu evaluieren, ob flüchtige Exsudatkomponenten für die beobachteten Effekte verantwortlich sind,
3. festzustellen, ob der die Meidung mykorrhizierter Pflanzen durch *M. incognita* durch ein Repellent, welches bei der Symbiose gebildet wurde, oder ein aufgrund der Symbiose fehlendes Attractant zurückzuführen ist und
4. zu untersuchen, wie eine Kombination von *G. intraradices* mit ausgewählten antagonistischen Rhizosphärenbakterien die Attraktion von *M. incognita* beeinflusst.

3.1.1. Material und Methoden

Die Pflanzen wurden wie unter 2.2 beschrieben angezogen, mit *G. etunicatum* 36 und *G. intraradices* 510 inokuliert und nach einer Symbiose-Etablierungsphase von 4 Wochen in Olfaktometer umgesetzt. Jedes Olfaktometer bestand aus zwei Töpfen ($V=1,6$ L), die mit einem Plastikrohr verbunden waren, welches aus vier Segmenten à 5 cm bestand (siehe Abb. 3.1). Jedes Segment war mit sterilem, angefeuchtetem, gewaschenem Quarzsand gefüllt. Drei Tage vor der Inokulation mit *M. incognita* wurden die Pflanzen in das Olfaktometer getopft, in der Regel wurde je eine mykorrhizierte einer nicht-mykorrhizierten Pflanze gegenübergestellt. Eine Ausnahme hiervon bildete das zur Differenzierung zwischen Repellent- und Attractant-Wirkung durchgeführte Experiment. Näheres ist an entsprechender Stelle erläutert. Die Nematoden-Inokulation erfolgte über eine Öffnung in der Mitte des sandgefüllten Verbindungsstückes. Nach einer Migrationsdauer von 24 h wurde der Versuch beendet, Frisch- und Trockengewicht der Sprosse, Frischgewicht der Wurzeln und die Verteilung der J2 in den Olfaktometern evaluiert.

3.1.1.1. Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes

Zum Nachweis der sortenübergreifend verminderten Attraktivität mykorrhizierter Tomaten gegenüber *M. incognita* wurden *S. lycopersicum* der Sorten 'KK2' und 'FMTT' in das Olfaktometer (Abb. 3.1) gesetzt. Die Inokulumdichte pro Olfaktometer betrug ca. 1200 Tiere in je 2 ml H₂O und die Migrationsdauer 24 h. Die Rückgewinnung der Tiere erfolgte nach Sikora und Schuster (2000).

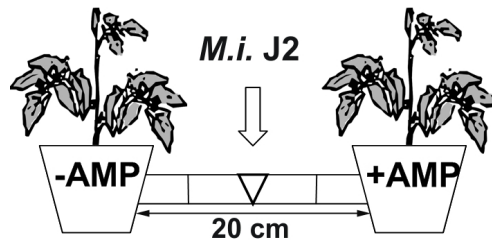


Abb. 3.1.: Aufbau des Olfaktometer-Setups. **AMF** = arbuskuläre Mykorrhiza, **M.i. J2** = Larvenstadium 2 von *M. incognita*.

3.1.1.2. Beteiligung volatiler Substanzen

Nachdem die Meidung mykorrhizierter Pflanzen durch *M. incognita* sortenübergreifend an *S. lycopersicum* 'KK2' und 'FMTT' nachgewiesen werden konnte, wurden die Experimente mit der Sorte 'FMTT' fortgesetzt.

Es wurde überprüft, ob die verminderte Attraktivität mykorrhizierter Tomaten auf eine gasförmige Substanz zurückzuführen ist. Daher wurde im Verbindungsstück zwischen dem Sand des Olfaktometers und dem Substrat ein 1,5 cm langer Hohlraum integriert (Abb. 3.2). Dieser war an beiden Enden mit grobmaschiger Gaze verschlossen. Zusätzlich wurde die dem Quarzsand zugewandte Seite zwei Wochen vor Beginn des Experimentes mit einer wasserdichten Barriere (Pattex[®] Hot Sticks transparent, Fa. Henkel, Deutschland) versehen (Abb. 3.2). Damit keine im Material der Versuchsanordnung enthaltenen Lösungsmittel die Anlockung beeinflussten, wurde das Setup zwei Wochen vor Durchführung des Experimentes angefertigt. So wurde gewährleistet, dass nur gasförmige Substanzen aus dem Substrat in den Quarzsand gelangten und die Orientierung der Tiere nicht durch Lösungsmitteldämpfe gestört wurde. Die Verweildauer der Pflanzen im Olfaktometer vor Zugabe von *M. incognita* betrug vier Tage. Die Inokulumdichte pro Olfaktometer betrug ca. 1200 Tiere in je 2 ml H₂O und die Migrationsdauer 24 h. Die Rückgewinnung der Tiere erfolgte nach Sikora und Schuster (2000).

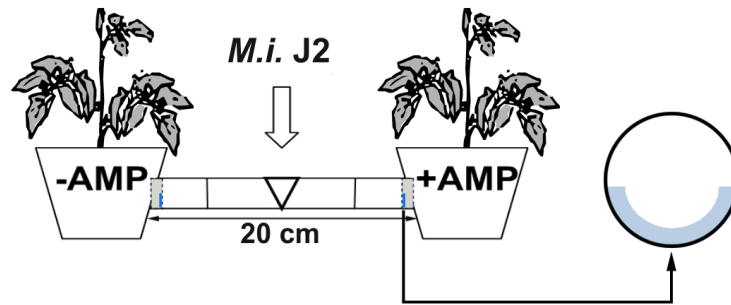


Abb. 3.2.: Beidseitige Präparation eines Hohlraumes (1,5 cm) zwischen Substrat und Olfaktometer-Sand (graue Schraffur) mit Gaze (gestrichelte Linien) zum Ausschluss flüssiger Substanzen, blaue Linie und Schraffur = Sickerwasserbarriere an der Topf-abgewandten Seite (im Querschnitt und frontal abgebildet), *M.i. J2* = Larvenstadium 2 von *M. incognita*, **AMP** = Arbuskuläre Mykorrhizapilze.

3.1.1.3. Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung

Die verminderte Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen kann sowohl durch ein neu gebildetes Repellent, als auch ein aufgrund der Symbiose fehlendes Attractant bedingt sein. Um zu klären, welche dieser beiden Ursachen bei Mykorrhizierung mit *G.e. 36* bzw. *G.i. 510* zutrifft, wurde folgendes Setup gewählt: Zeitgleich mit dem Topfen der Pflanzen wurden Töpfe mit Substrat gefüllt und ohne Pflanze unter Gewächshausbedingungen feucht gehalten. Im Olfaktometer-Setup wurde dann je ein Substrat-Topf mit einem bepflanzt Topf (mit/ohne Mykorrhiza) verbunden (Abb. 3.3). Als Kontrolle dienten Olfaktometer mit pflanzenfreiem Substrat auf beiden Seiten. Die Inokulumdichte pro Olfaktometer betrug ca. 1200 Tiere in je 2 ml H₂O und die Migrationsdauer 24 h. Die Rückgewinnung der Tiere erfolgte durch Versetzen des Olfaktometersandes mit einer definierten Menge H₂O und mikroskopischer Auswertung von Aliquots des Überstandes nach 20 Sekunden kräftigen Schüttelns der Proben.

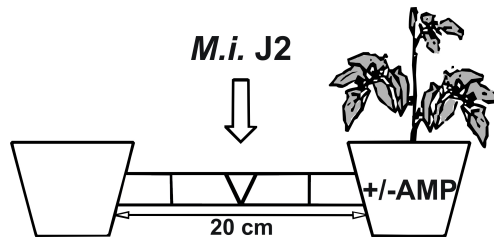


Abb. 3.3.: Versuchsaufbau zur Untersuchung der anziehenden/abstoßenden Wirkung mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen im Olfaktometer-Setup. *M.i. J2* = Larvenstadium 2 von *M. incognita*, +/-AMP = Pflanze ist mykorrhiziert bzw. mykorrhizafrei.

3.1.1.4. Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien

Auch Rhizosphärenbakterien können als biologische Pflanzenschutzmittel gegen phytopathogene Nematoden eingesetzt werden (Oostendorp und Sikora 1990; Siddiqui und Mahmood 2001; Siddiqui *et al.* 2007). Masadeh (2005) wies eine verminderte Wurzelgalienbildung durch *M. incognita* nach, wenn die Pflanzen zuvor mit *Cellulomonas turbata* und *Acinetobacter baumannii* inokuliert worden waren. Ob diese Schutzwirkung ebenfalls auf einer verminderten Attraktion der Tiere oder aber einer verminderten Anfälligkeit der Pflanze beruht, sollte im Rahmen des vorliegenden Versuchskomplexes ebenso geprüft werden wie die Veränderung der Attraktivität durch kombinierte Inokulation der Pflanze mit *G.i.* 510 und jeweils einem der o.g. Bakterienstämme.

Die Pflanzen wurden wie unter 2.2 beschrieben angezogen und sowohl 14 als auch 30 Tage nach der Inokulation mit *G.i.* 510 mit *C. turbata* bzw. *A. baumannii* inokuliert. Nach einer Symbiose-Etablierungsphase von 4 Wochen, und damit zwei Wochen nach der ersten Inokulation mit den Bakterienisolaten, wurden die Pflanzen in Olfaktometer (siehe Abschnitt 3.1.1 und Abb. 3.1) transferiert, die Besiedlungsdichte von *C. turbata* und *A. baumannii* quantifiziert (siehe Abschnitt 2.3) und *M. incognita* nach einer Diffusionszeit von 48 h mit einer Inokulumdichte von 2000 J2/2 ml H₂O in die Mitte der Verbindungsstücke appliziert. In den Versuchseinheiten wurde mit n=8 je eine inokulier-

te Pflanze (Varianten: (I) *G.i.* 510, (II) *C. turbata*, (III) *A. baumannii*, (IV) *G.i.* 510 + *C. turbata*, (V) *G.i.* 510 + *A. baumannii*) einer nicht-inokulierten gegenüber angeordnet. Der Versuch wurde 24 h nach Inokulation mit *M. incognita* beendet, Frisch- und Trockengewicht der Sprosse, Frischgewicht der Wurzeln und die Verteilung der J2 in den sandgefüllten Verbindungsstücken der Olfaktometer evaluiert.

3.1.1.5. Statistische Auswertung

Die Signifikanzbestimmung der Biomasse-Werte und der cfu erfolgte in R 2.7.1 mit dem generalisierten linearen Modell des Tukey-Tests mittels des Paketes multcomp (R 2005). Die statistische Auswertung der Pair-Choice-Assays erfolgte über Bestimmung der Odd's-Ratio mit Hilfe des Paketes mmcp. Stets wurde die Menge an Tieren der beiden Seiten einer Variante gegeneinander getestet. Biomasse bzw. Verteilung der Tiere unterschieden sich signifikant, wenn $p \leq 0,05$.

3.1.2. Ergebnisse

3.1.2.1. Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes

Nachdem Masadeh (2005) eine signifikant geringere Attraktion von *M. incognita* zu *G.e.* 36 bzw. *G.i.* 510 mykorrhizierten *S. lycopersicum* 'KK2' beobachtete, diente das in den Abbildungen 3.4 und 3.5 dargestellte Experiment der Untersuchung des sortenübergreifenden Migrationseffektes.

Die genannten Grafiken veranschaulichen das Migrationsverhalten der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer-Setup an den Tomatensorten *S. lycopersicum* 'KK2' und 'FMTT'. Die Migration erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden und eine Distanz von jeweils 10 cm ab dem Applikationspunkt. Die Wahl dieser Zeitspanne sollte verhindern, dass Tiere über das Olfaktometer hinaus in die Töpfe abwandern und so das Ergebnis verfälschen. Dargestellt wird die Verteilung der durch Auswaschen des Sandes zurückgewonnenen Tiere. Es wird deutlich, dass bei beiden Sorten eine signifikant geringere

gere Migration der Larven zu den mykorrhizierten Pflanzen hin auftritt.

Darüber hinaus wurden Biomasse und Wurzelarchitektur der Pflanzen untersucht, um festzustellen, ob sich Unterschiede zwischen mykorrhizierten und mykorrhizafreien Pflanzen zeigen: Die Tabelle 3.1 zeigt, dass die Sprosse der mykorrhizierten *S. lycopersicum* 'KK2' gegenüber der Kontrolle ein signifikant höheres Gewicht aufwiesen. Diese Wirkung tritt bei der Sorte FMTT nicht mehr auf (Tab. 3.3). Wurzellänge, -verzweigungen und -spitzen mykorrhizafreier und mykorrhizierter Pflanzen unterschieden sich bei beiden Sorten nicht signifikant voneinander (Tab. 3.2 und 3.4).

Tab. 3.1.: Biomassedaten von *S. lycopersicum* 'KK2' ± Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, **FG** = Frischgewicht, **TG** = Trockengewicht, **MF** = Mykorrhizierung in % mykorrhizierter Wurzelstücke. n = 7, mit unterschiedlichen Buchstaben versehene Angaben unterscheiden sich signifikant voneinander gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzel	Spross			
	FG [g]	FG [g]		TG [g]	MF [%]
-myk	6,04 ± 0,45	22,25 ± 2,10	a	2,15 ± 0,22	a
<i>G.e.</i> 36	7,80 ± 0,79	31,58 ± 1,58	bc	3,50 ± 0,23	bc
<i>G.i.</i> 510	8,88 ± 0,99	29,65 ± 1,38	c	3,43 ± 0,36	c

Tab. 3.2.: Wurzelarchitektur von *S. lycopersicum* 'KK2': Angabe der durchschnittlichen Wurzellänge, Anzahl an Verzweigungen und Wurzelspitzen pro Variante ± Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510. n = 7, keine signifikanten Unterschiede gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzellänge [cm]	Verzweigungen	Wurzelspitzen
-myk	14047,8 ± 333,2	21233,6 ± 3324,4	10868,6 ± 1651,0
<i>G.e.</i> 36	32161,3 ± 317,2	32161,3 ± 5399,5	13934,6 ± 2317,5
<i>G.i.</i> 510	3915,3 ± 250,2	17503,4 ± 2489,9	9113,7 ± 624,7

Tab. 3.3.: Biomassedaten von *S. lycopersicum* 'FMTT' \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, **FG** = Frischgewicht, **TG** = Trockengewicht, **MF** = Mykorrhizierung in % mykorrhizierter Wurzelstücke. n = 7, mit unterschiedlichen Buchstaben versehene Angaben unterscheiden sich signifikant voneinander gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzel		Spross		MF [%]
	FG [g]		FG [g]	TG [g]	
-myk	10,52 \pm 0,89		38,21 \pm 1,29 ab	3,89 \pm 0,25	
G.e. 36	10,39 \pm 0,55		41,63 \pm 1,27 a	4,44 \pm 0,30	47,9
G.i. 510	10,54 \pm 0,96		37,48 \pm 0,66 b	4,08 \pm 0,15	38,6

Tab. 3.4.: Wurzelarchitektur von *S. lycopersicum* 'FMTT': Angabe der durchschnittlichen Wurzellänge, Anzahl an Verzweigungen und Wurzelspitzen pro Variante \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510. n = 7, keine signifikanten Unterschiede gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzellänge [cm]	Verzweigungen	Wurzelspitzen
-myk	31837,5 \pm 830,8	59507,9 \pm 4262,9	35664,1 \pm 3545,3
G.e. 36	59483,9 \pm 529,0	59483,9 \pm 3437,2	35574,7 \pm 2997,5
G.i. 510	8823,5 \pm 633,1	66222,6 \pm 3701,9	26908,3 \pm 1738,5

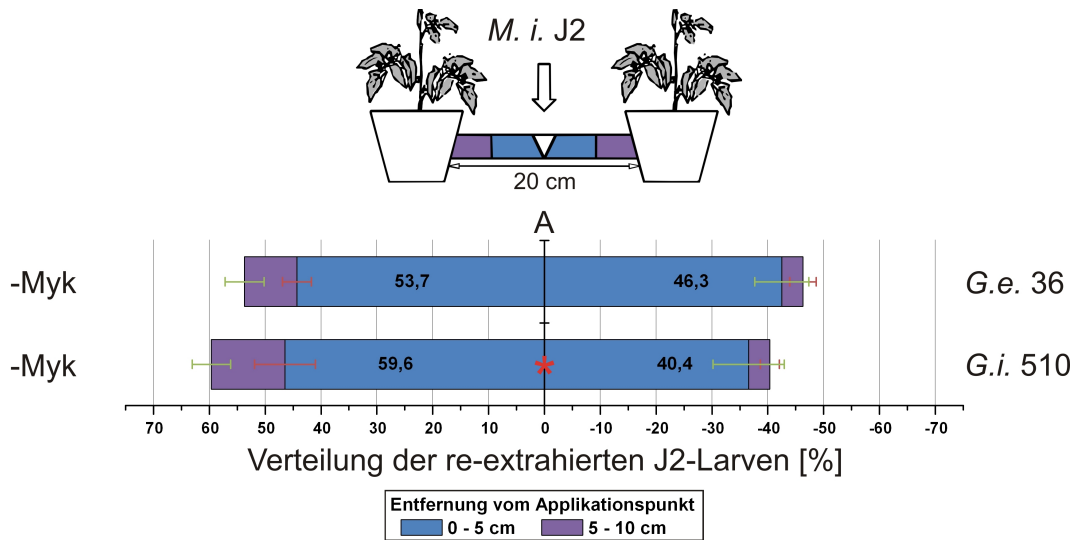


Abb. 3.4.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer in Richtung (nicht-)mykorrhizierter *S. lycopersicum* 'KK2'. Darstellung der Nematodenverteilung links und rechts des Applikationspunktes (A), angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler des jeweiligen Olfaktometer-Kompartimentes. *M.i. J2* = zweites Larvenstadium von *M. incognita*, *-myk* = mykorrhizafreie Pflanze, *G.e. 36* = *G. etunicatum* 36, *G.i. 510* = *G. intraradices* 510. n = 7, mit * markierte Varianten weisen signifikante Unterschiede gemäß Odd's Ratio ($p \leq 0,05$) auf.

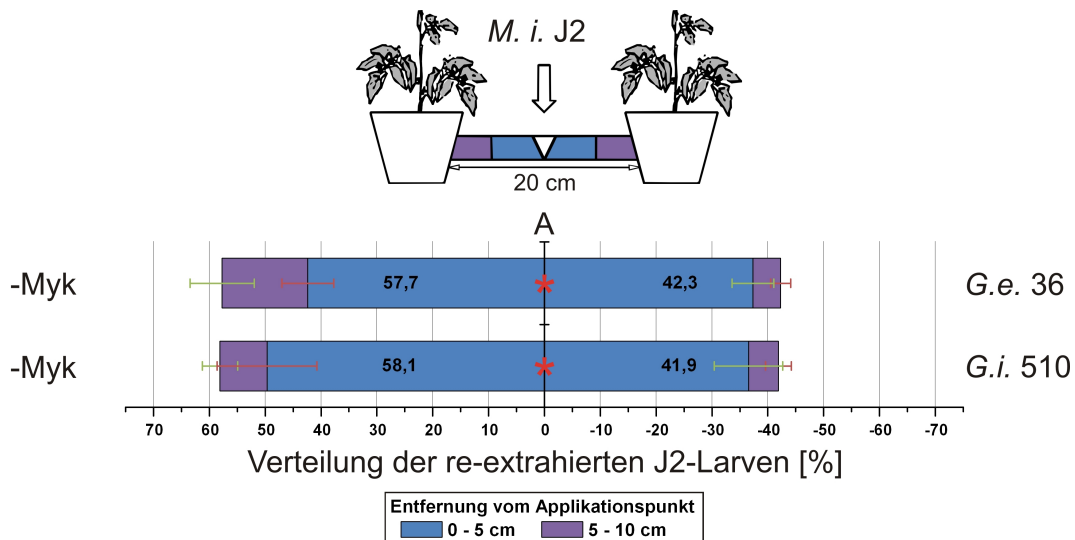


Abb. 3.5.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer in Richtung (nicht-)mykorrhizierter *S. lycopersicum* 'FMTT'. Darstellung der Nematodenverteilung links und rechts des Applikationspunktes (A), angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler des jeweiligen Olfaktometer-Kompartimentes. *M.i. J2* = zweites Larvenstadium von *M. incognita*, *-myk* = mykorrhizafreie Pflanze, *G.e. 36* = *G. etunicatum* 36, *G.i. 510* = *G. intraradices* 510. n = 7, mit * markierte Varianten weisen signifikante Unterschiede gemäß Odd's Ratio ($p \leq 0,05$) auf.

3.1.2.2. Wirkung volatiler Substanzen

Da CO₂ als wichtiges Attractant für phytopathogene Nematoden gilt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die verminderte Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen auf diesen oder einen anderen gasförmigen Stoff zurückzuführen ist (Bowen und Rovira 1991; Robinson und Perry 2006). Die in Abb. 3.6 dargestellten Ergebnisse zeigen keine signifikanten Attraktionsveränderungen.

Tab. 3.5.: Pflanzliche Biomassedaten \pm Standardfehler bei der Evaluation beteiligter volatiler Substanzen. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, **FG** = Frischgewicht, **TG** = Trockengewicht, **MF** = Mykorrhizierung in % mykorrhizierter Wurzelstücke. n = 7, mit unterschiedlichen Buchstaben versehene Angaben unterscheiden sich signifikant voneinander gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzel	Spross			
	FG [g]	FG [g]	TG [g]	MF [%]	
-myk	22,70 \pm 2,10	30,38 \pm 2,58	a	5,28 \pm 0,56	a
<i>G.e.</i> 36	22,31 \pm 0,98	38,84 \pm 1,56	b	7,41 \pm 0,38	b
<i>G.i.</i> 510	22,11 \pm 1,62	33,17 \pm 0,98	ab	6,14 \pm 0,20	ab

Das Sprossgewicht der Varianten -myk und *G.e.* 36 weist signifikante Unterschiede auf (siehe Tab. 3.5), es gibt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen -myk und *G.i.* 510, wie in Tab. 3.1 beschrieben.

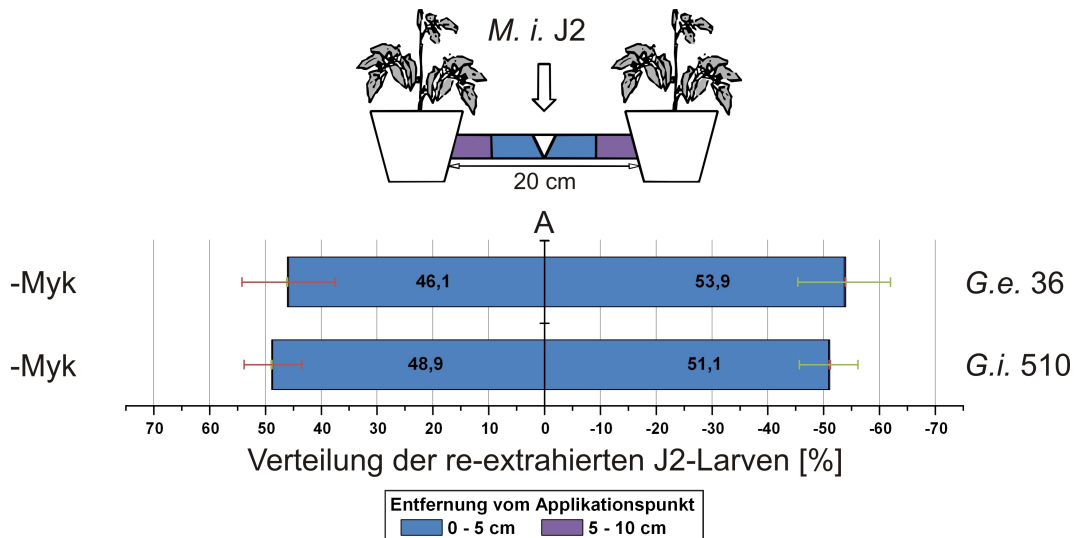


Abb. 3.6.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer in Richtung (nicht-) mykorrhizierter *S. lycopersicum* 'FMTT' entlang gasförmiger Gradienten. Darstellung der Nematodenverteilung links und rechts des Applikationspunktes (A), angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler des jeweiligen Olfaktometer-Kompartimentes. *M.i. J2* = zweites Larvenstadium von *M. incognita*, *-myk* = mykorrhizafreie Pflanze, *G.e. 36* = *G. etunicatum* 36, *G.i. 510* = *G. intraradices* 510. $n = 7$, keine signifikanten Unterschiede gemäß Odd's Ratio ($p \leq 0,05$).

3.1.2.3. Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung

Abb. 3.3 veranschaulicht die Herangehensweise zur Untersuchung der Ursache für die geringere Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen. In dieser Versuchsanordnung werden be-pflanzte und unbepflanzte Töpfe einander gegenübergestellt. Das leere Substrat simuliert pflanzenfreies aber nährstoffhaltiges Habitat. Die Pflanze selbst ist, je nach Behandlung, mehr oder weniger attraktiv: Wenn Mykorrhizierung die Bildung eines abstoßenden Stoffes bewirkt, sollten die Tiere in Richtung Substrat abwandern. Wandern sie in Richtung mykorrhizierter Pflanze, kann davon ausgegangen werden, dass das Repellent entweder so schwach ist, dass die Attraktivität anderer Exsudatbestandteile überwiegt, oder dass es sich nicht um ein Repellent, sondern um ein fehlendes Attractant handelt, welches aufgrund der Mykorrhizierung nicht mehr oder reduziert in das Substrat abgegeben wird. Abstoßung und Anziehung der Exsudate in der Summe ihrer Einzelbestandteile kann über

das Olfaktometer-Setup untersucht werden. Um jedoch die abstoßende und anziehende Wirkung der einzelnen Exsudat-Bestandteile aufzuschlüsseln bedarf es einer Fraktionierung mit anschließender separater Testung der einzelnen Fraktionen.

Um zu beurteilen, wie die Verteilung der Tiere bei gleichen Stimuli auf beiden Seiten ist, wurden in der Kontroll-Variante zwei substratgefüllte Töpfe einander gegenübergestellt. Weiterhin wurden jeweils mykorrhizafreie und mit *G.e.* 36 bzw. *G.i.* 510 mykorrhizierte Pflanzen einem Substrat-Topf gegenübergestellt. Abb. 3.7 zeigt, dass nicht-mykorrhizierte Pflanzen attraktiv auf *M. incognita* wirken, während *G.i.* 510 eine leichte Abstoßung der Tiere bewirkt. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Seiten des Olfaktometers bei dieser Variante genauso groß wie bei der Kontrolle, der Standardfehler ist jedoch noch höher als der der Kontrolle. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen diesen Varianten kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob es sich hier tatsächlich um die Wirkung eines Repellents handelt. Es fällt zudem auf, dass die Wirkungen der Varianten *G.e.* 36 und *G.i.* 510 unterschiedlich sind. Die Biomassedaten weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten auf (Tab. 3.6).

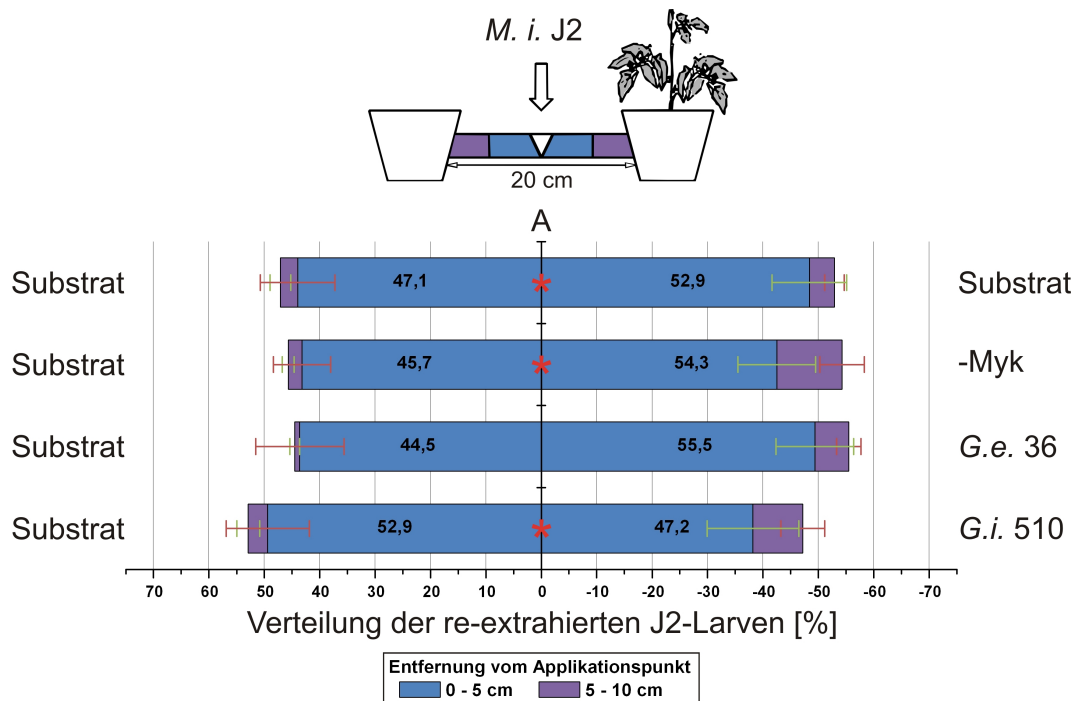


Abb. 3.7.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer in Richtung Substrat bzw. (nicht-)mykorrhizierter *S. lycopersicum* 'FMTT'. Darstellung der Nematodenverteilung links und rechts des Applikationspunktes (A), angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler des jeweiligen Olfaktometer-Kompartimentes. *M.i. J2* = zweites Larvenstadium von *M. incognita*, **Substrat** = Topf enthält keine Pflanze, **-myk** = mykorrhizafreie Pflanze, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510. Pflanzenfreie Kontrolle: n = 5, andere Varianten: n=7, mit * markierte Varianten weisen signifikante Unterschiede gemäß Odd's Ratio ($p \leq 0,05$) auf.

Tab. 3.6.: Biomassedaten der einzelnen Varianten bei der Differenzierung von Attractant- und Repellent-Wirkung \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafreie Pflanze, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, **FG** = Frischgewicht, **TG** = Trockengewicht, **MF** = Mykorrhizierung in % mykorrhizierter Wurzelstücke. n = 7, keine signifikanten Unterschiede gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzel		Spross	
	FG [g]	FG [g]	TG [g]	MF [%]
-myk	18,3 \pm 0,8	55,3 \pm 1,2	10,6 \pm 0,3	
G.e. 36	19,9 \pm 1,7	58,6 \pm 1,5	10,8 \pm 0,4	56,4
G.i. 510	16,8 \pm 1,0	58,1 \pm 1,1	10,6 \pm 0,3	57,9

3.1.2.4. Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien

Aus Tab. 3.7 wird ersichtlich, dass das Spross-Frischgewicht der nicht-inokulierten Pflanzen niedriger war als das der inokulierten. Die dual inokulierten Pflanzen wiesen im Durchschnitt das höchste Spross-Frischgewicht auf. Diese, z.T. signifikanten, Unterschiede sind auf den Wassergehalt der Pflanzen zurückzuführen, da die Spross-Trockengewichte der einzelnen Varianten keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Tab. 3.7.: Biomassedaten \pm Standardfehler bei der Untersuchung der kombinierten Attraktionswirkung von AMP und PGPR. Varianten: Pflanzen nicht (**Kontrolle**) bzw. mit den Bakterienstämmen *C. turbata*, *A. baumannii* und/oder *G. intraradices* 510 (**G.i. 510**) inokuliert, **FG** = Frischgewicht, **TG** = Trockengewicht, **MF** = Mykorrhizierung in % mykorrhizierter Wurzelstücke. n = 8, mit Buchstaben versehene Angaben unterscheiden sich signifikant voneinander gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	Wurzel		Sproß	
	FG [g]	FG [g]	TG [g]	MF [%]
-inok	13,69 \pm 0,24	48,92 \pm 1,68 a	4,30 \pm 0,10	
<i>C. turbata</i>	19,31 \pm 1,73	53,14 \pm 1,88	4,75 \pm 0,26	
<i>A. baumannii</i>	17,00 \pm 0,74	53,56 \pm 2,24 b	5,08 \pm 0,27	
<i>G.i.</i> 510	14,97 \pm 1,60	55,68 \pm 1,55	4,64 \pm 0,24	20
<i>G.i.</i> 510+ <i>C. turbata</i>	16,27 \pm 0,99	56,61 \pm 0,97 b	4,92 \pm 0,16	21,9
<i>G.i.</i> 510+ <i>A. baumannii</i>	16,17 \pm 0,60	57,13 \pm 1,26	5,33 \pm 0,25	16,9

Zudem zeigt Abb. 3.8, dass die Mykorrhizierung keinen Einfluss auf die Populationen der applizierten Rhizosphärenbakterien hatte. *A. baumannii* etablierte sich besser im Substrat als *C. turbata*, die Mengen der cfu unterschieden sich signifikant voneinander.

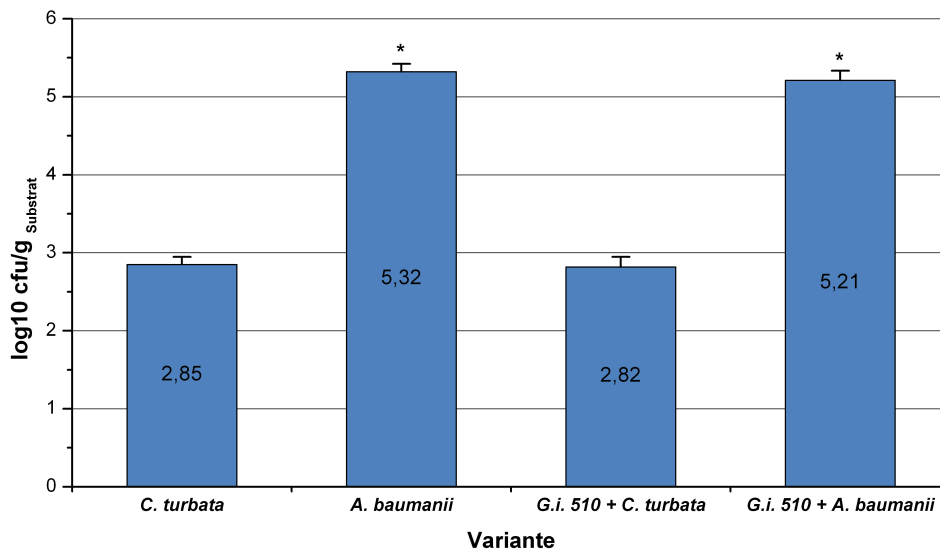


Abb. 3.8.: Besiedlungsdichte des Substrates der jeweiligen Varianten mit *C. turbata* bzw. *A. baumannii* zum Zeitpunkt der Inokulation mit *M. incognita* in log10 der cfu (colonies forming units). **G.i. 510** = *G. intraradices* 510. Mit * versehene Säulen unterscheiden sich signifikant von den nicht markierten gemäß Tukey-Test ($p=0.05$)

Abb. 3.9 stellt das Migrationsverhalten von *M. incognita* gegenüber *A. baumannii*, *C. turbata* und *G. intraradices* in verschiedenen Kombinationen dar. Im Olfaktometer wurde je eine nicht mit Bakterien oder AMP inokulierte Pflanze einer inokulierten gegenübergestellt (Varianten: siehe S. 40). Während die Untersuchung der Wirkung von *G.i. 510*, *C. turbata* und *A. baumannii* den Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Attraktivität der inokulierten Wirtspflanze veranschaulicht, zeigen die Varianten *G.i. 510 + C. turbata* und *G.i. 510 + A. baumannii*, wie sich die Kombination dieser Organismen auf die Attraktivität der Wirtspflanze auswirkt. Die Wirkungen können synergistisch, additiv, subtraktiv und indifferent sein.

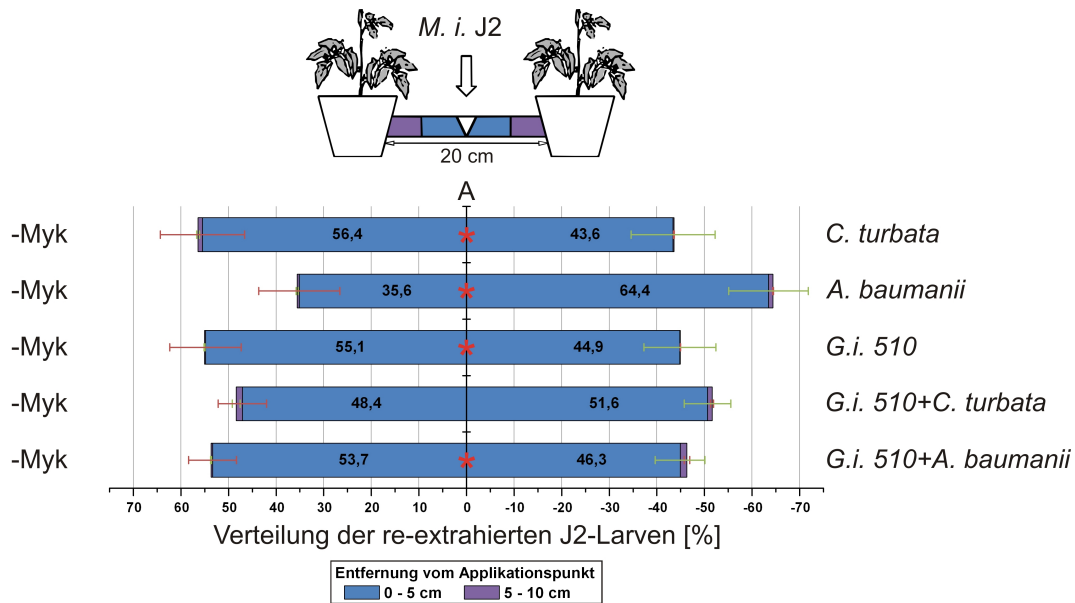


Abb. 3.9.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Olfaktometer zu (nicht-) mykorrhizierten, und/oder mit PGPR (*A. baumannii*, bzw. *C. turbata*) inokulierten *S. lycopersicum*. Darstellung der Nematodenverteilung links und rechts des Applikationspunktes (A), angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler des jeweiligen Olfaktometer-Kompartimentes. *M.i. J2* = zweites Larvenstadium von *M. incognita*, **-myk** = mykorrhizafreie Pflanze, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510. $n = 7$, mit * markierte Varianten weisen signifikante Migrations-Unterschiede gemäß Odd's Ratio ($p \leq 0,05$) auf.

Der Attraktionstest zeigte, dass mit *A. baumannii* inokulierte Pflanzen signifikant attraktiver wirkten als die Kontrollpflanzen, während *C. turbata* und *G.i. 510* signifikant abstoßend wirkten. Die Kombination von Bakterienstamm und AMP schwächte den jeweiligen Effekt ab: so war die Variante *C. turbata* + *G.i. 510* schwach attraktiv (47 : 52 %), während die einzelnen Isolate eine deutlichere Abstoßung von ca. 55 : 45 % zeigten. Die von *A. baumannii* hervorgerufene signifikante Attraktivität wurde durch die Kombination mit dem AMP umgekehrt und zu einem signifikant abstoßenden Effekt verändert.

3.1.2.5. Zusammenfassende Betrachtung

Es konnte gezeigt werden, dass Minderung der Wirtsattraktivität gegenüber *M. incognita* durch Mykorrhizierung sortenübergreifend ist. Die für die Attraktivitätsminderung mykorrhizierter Pflanzen verantwortliche Substanz ist wasserlöslich, niedermolekular, nicht gasförmig und auf eine Distanz von mehreren Zentimetern wirksam. Ob sie generell auf die Bildung eines Repellents oder das Fehlen eines Attractants zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Das Ergebnis weist allerdings auf isolatspezifische Ursachen für den Effekt hin: *G.i.* 510 bewirkt offensichtlich die Bildung eines Repellents, während bei *G.e.* 36 unklar ist, ob ein schwaches Repellent gebildet wird oder die Abgabe eines Attractants vermindert bzw. unterbunden wird. Weiterhin zeigt sich, dass die Kombination von AMP mit den gewählten Bakterienisolaten keinen synergistischen Effekt im Sinne einer verstärkten Abstoßung bedingt. Die mit *A. baumannii* und *C. turbata* in Einzelinokulation erzielten Ergebnisse werden durch Interaktion mit AMP abgeschwächt, verändert und umgekehrt.

3.2. Migrationsuntersuchungen mittels Sand-Block

Es konnte gezeigt werden, dass eine differenzierte Attraktion von *M. incognita* zu mykorrhizierten und mykorrhizafreien Pflanzen möglich ist. Der verwendete Versuchsaufbau (siehe 3.1) lässt den Rückschluss zu, dass die Tiere über eine große Strecke (mindestens 10 cm Entfernung von der Wurzel) die Zusammensetzung von Wurzelexsudaten wahrnehmen können. Im weiteren Verlauf der durchgeführten Experimente sollte die *in vivo* beobachtete Wirkung mykorrhizierter Pflanzen *in vitro* reproduziert werden.

Der Sand-Block-Assay erlaubt den Test von Exsudaten in einem vereinfachten System, welches sowohl die natürliche Fortbewegung der Tiere ebenso gewährleistet, als auch das kontrollierte Einbringen von Testmaterial und eine unkomplizierte Rückgewinnung der Tiere.

Ziele dieses Experiment-Komplexes waren:

1. das gewählte System auf seine Funktionalität hin zu überprüfen,
2. zu evaluieren, ob der Effekt in Abwesenheit der Wirtspflanze und nur über Wurzelexsudate erzielt werden kann und
3. zu untersuchen, wie sich die kontinuierliche Applikation frisch entnommener Exsudate im Gegensatz zur einmaligen Einbringung der Exsudate auf das Ergebnis auswirkt.

3.2.1. Material und Methoden

Das Migrationsverhalten von *M. incognita*-Larven in Richtung der Exsudate mykorrhizierter- bzw. mykorrhizafreier Pflanzen wurde im Labor mittels eines Pair-Choice-Assays in sterilem Quarzsand untersucht. Die Gefäße bestanden aus Plexiglas (2 x 10 x 2 cm, H x B x T), zusammengefügt mit inertem Plexiglaskleber. (Acrifix[®] 106, Degussa, Deutschland)

3.2.1.1. Verifizierung des Biotests

Da phytopathogene Nematoden generell in Richtung Pflanzenwurzel migrieren, sollte der folgende, an Viglierchio (1961) angelehnte, Biotest zeigen, ob die Tiere in dem künstlichen System in der Lage sind, Wirtspflanzen zu lokalisieren und in ihre Richtung zu migrieren.

Hierfür wurden die Versuchseinheiten mit je 60 g sterilem Quarzsand und 10% (w/v) sterilem H₂O befüllt. An eine Stirnseite wurde ein 7 Tage alter Tomatensämling gesetzt und 48 h unter Gewächshausbedingungen gehalten, um die Bildung von Exsudaten zu gewährleisten. Danach wurden je 2500 Tiere in 500 µl H₂O mittig appliziert. Nach einer Migrationszeit von 48 h wurde der Sand geviertelt und die Pflanzen entfernt. Die Rückgewinnung der Tiere erfolgte durch Versetzen des Sandes mit einer definierten Menge

H₂O und Auswertung von Aliquots des Überstandes nach 20 sek. kräftigen Schüttelns der Proben.

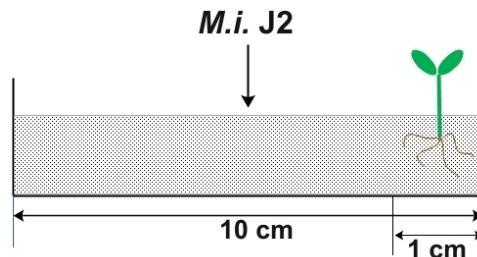


Abb. 3.10.: Setup zur Verifizierung des Sand-Block-Assays mittels eines Tomatenkeimlings.
M.i. J2 = Larvenstadium 2 von *M. incognita*, graue Schraffur = Quarzsand.

3.2.1.2. Wirkung von wurzelfreiem Substrat (nicht-)mykorrhizierter Pflanzen auf *M. incognita*

Um zu prüfen, wo eine möglicherweise abstoßende Substanz lokalisiert ist und ob sich diese auch in Abwesenheit der Exsudat produzierenden Pflanze nachweisen lässt, wurde zunächst Substrat in der unmittelbaren Nähe der Wurzeln auf seine Wirkung auf *M. incognita* hin untersucht. Hierfür wurde Substrat mithilfe eines Korkbohrers aus jeweils 5 Töpfen der Varianten *G.e.* 36, *G.i.* 510 und -myk entnommen. Die Proben je einer Variante wurden vereinigt, gemischt, die Wurzeln entfernt und je 5 g des Gemisches mit 1,5 ml H₂O in Gazebehälter (1,5 x 1,5 x 1,5 cm) an die Stirnseiten der Blöcke gegeben (siehe Abb. 3.11). 450 Nematoden in 100 µl H₂O pro Sand-Block wurden mittig in 42 g sterilen Quarzsand mit 10% (w/v) sterilem H₂O appliziert. Die Gazebehälter wurden 24 h nach der Aufbringung der Tiere entfernt, der verbleibende Sand mittig geteilt, die Tiere mittels Oostenbrink-Filter-Methode zurückgewonnen, auf 1 ml H₂O eingengt und ausgezählt.

3.2.1.3. Wirkung von Diffusaten in Sand

Bei der Durchführung von Versuchen im Olfaktometer (siehe 3.1.1) kann davon ausgegangen werden, dass von der Pflanze produzierte Stoffe in den Quarzsand des Verbindungsstückes diffundieren und dort die Orientierung von J2-Larven beeinflussen. Ob diese Wirkung auch eintritt, wenn die Pflanze keine frischen Exsudate mehr bildet, wurde anhand der folgenden Versuchsanordnung getestet: im Vorfeld des Versuches wurden Pflanzen der Varianten: *G.e.* 36, *G.i.* 510 und -myk in Olfaktometer-Töpfe umgesetzt, deren erste 5 cm des Verbindungsstückes mit angefeuchtetem sterilem Quarzsand gefüllt waren. Nach einer Diffusionszeit von 50 h wurde der Sand von 4 mykorrhizafreien und je 2 mykorrhizierten Proben entnommen, die Proben je einer Variante vereinigt und je 5 g des Gemisches mit 1,5 ml H₂O in Gazebehälter (1,5 x 1,5 x 1,5 cm) an die Stirnseiten der Blöcke gegeben (siehe Abb. 3.11). Pro Sand-Block wurden ca. 350 J2 in 100 µl Wasser mittig in 40 g Sand mit 10% (w/v) sterilem H₂O appliziert. Nach 24 h wurden die Gazebehälter entfernt, der verbleibende Sand mittig geteilt und die Tiere, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, zurückgewonnen und ausgezählt.

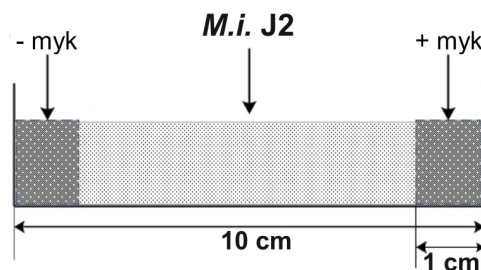


Abb. 3.11.: Sand-Block-Assay zur Untersuchung der Diffusatwirkung. Die Testmaterialien stammten entweder beidseitig von mykorrhizafreien (-myk) Pflanzen (Kontrolle), oder Exsudate mykorrhizierter (+myk) und mykorrhizafreier Pflanzen wurden gegenübergestellt. Dunkel schraffierte Bereiche zeigen Sand- bzw. Substrat-gefüllte Gazebehälter, hell schraffierte das Migrationsmedium Quarzsand. *M.i. J2* = Larvenstadium 2 von *M. incognita*.

3.2.1.4. Wirkung von Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur

Untersuchungen mit Sand oder Diffusaten als Testmaterial haben den Nachteil, dass stets mindestens 30 min zwischen Proben-Entnahme und Applikation der Tiere verstreichen. Bis zur Beendigung der Experimente können die den Effekt verursachenden Substanzen bereits abgebaut oder zerfallen sein. Dieses Problem sollte in folgender Versuchsanordnung umgangen werden: Pflanzen wurden in teil-hydroponischer Kultur (siehe 2.6.2) angezogen (Varianten: *G.e.* 36, *G.i.* 510, -myk), 48 h in abgedunkelten Behältern mit je 1 L dH₂O belassen und Sand-Blöcke mit 60 g sterilem Quarzsand und 10% (w/v) H₂O vorbereitet. Die Pflanzen wurden jeweils 3x geschwenkt, die Exsudate in dH₂O in direkter Nähe der Wurzel entnommen und 48 h lang im 2 h-Rhythmus an die Stirnseiten der Blöcke pipettiert: 1 x 1 ml und 3 x 100 µl um den Diffusatfluß zu initiieren, dann jeweils 50 µl, um eine zu hohe Substratfeuchtigkeit im System zu vermeiden (Abb. 3.12).

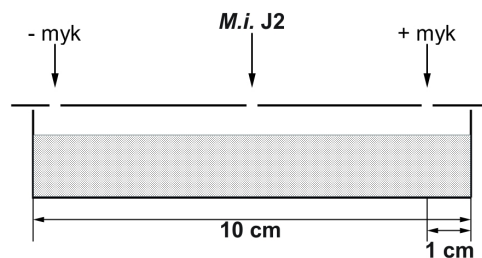


Abb. 3.12.: Sand-Block-Assay zur Untersuchung der Wirkung von Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur. Das Testmaterial stammte entweder beidseitig von mykorrhizafreien Pflanzen (Kontrolle), oder Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen wurden gegenübergestellt. Die Abdeckung diente der einheitlichen und punktgenauen wiederholten Applikation der Proben. **-myk** = mykorrhizafrei, **+myk** = mykorrhiziert, **M.i. J2** = Larvenstadium 2 von *M. incognita*.

3.2.1.5. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung des Pair-Choice-Assays erfolgte in R 2.7.1 über Bestimmung der Odd's-Ratio mit Hilfe des Paketes mmcp (R 2005). Stets wurde die Menge an Tieren der beiden Seiten einer Variante gegeneinander getestet. Die Verteilung der Tiere unterschied sich signifikant, wenn $p \leq 0,05$.

3.2.2. Ergebnisse

Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen *in vitro* auf ihre Attraktionswirkung gegenüber *M. incognita* zu untersuchen, wurde in diesem Versuchsabschnitt auf lebende Pflanzen verzichtet und das System vereinfacht. Wurzelexsudate wurden in unterschiedlicher Form in das System eingebracht und mykorrhizierte mykorrhizafreien Exsudaten gegenübergestellt.

3.2.2.1. Verifizierung der Funktionalität des Setups

Die Verifizierung der Versuchsanordnung mithilfe von einwöchigen Tomatenkeimlingen zeigt, dass die Nematoden in der Lage sind, in diesem System zur Wirtspflanze zu finden (Tab. 3.8).

Tab. 3.8.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Sand-Block-Assay in Richtung Wirtspflanze. Nematodenverteilung in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler. **-Pflanze** = Seite ohne Wirtspflanze, **+Pflanze** = Seite mit Wirtspflanze. n = 10, Attraktion zur Pflanze signifikant gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Wiederholung	-Pflanze	+Pflanze
I	44,6 \pm 4,0 a	55,4 \pm 4,0 b
II	34,8 \pm 4,5 a	65,2 \pm 4,5 b

3.2.2.2. Wirkung von Diffusaten und Exsudaten im Sand-Block

Exsudathaltiges Substrat beider AMP-Varianten wirkten im Sand Block attraktiver als die mykorrhizafreie Kontrolle, wobei *G.i.* 510 mit einer Mykorrhizierungsfrequenz von 95% eine unerwartet starke Attraktion verursachten (Tab. 3.9). Die im Olfaktometer beobachteten abstoßenden Eigenschaften mykorrhizierter Pflanzen können über Substrat, welches in den Sand-Block eingebracht wurde, demnach nicht reproduziert werden. Da die Tiere in der Lage sind, sich im offensichtlich exsudathaltigen Sand des Olfaktometers zu orientieren, wurde nach dem obigen Ergebnis überprüft, wie sich diffusathaltiger Sand im Sand-Block auf die Orientierung der Tiere auswirkt. Zwar ist keine deutliche Attrak-

tivität der -myk-Proben festzustellen, doch auch die Abstoßung ist äußerst gering (Tab. 3.10). Selbst mit Exsudaten, die direkt aus unmittelbarer Wurzelnähe konstant appliziert wurden, ist der im Olfaktometer beobachtete Effekt nicht reproduzierbar (Tab. 3.11).

Tab. 3.9.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Sand-Block-Assay, Testmaterial: wurzelfreies Substrat. Darstellung der Nematodenverteilung, angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, MF = Mykorrhizierungsfrequenz. n=5, Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	-myk	Testmaterial 2	MF [%]
-myk / -myk	49,3 \pm 12,3	50,7 \pm 12,3	
-myk / <i>G.e.</i> 36	46,5 \pm 5,3	53,5 \pm 5,3	45
-myk / <i>G.i.</i> 510	25,9 \pm 6,0 a	74,1 \pm 6,0 b	95

Tab. 3.10.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Sand-Block-Assay. Testmaterial: Wurzeldiffusat-haltiger Quarzsand eines Olfaktometer-Teilstückes. Darstellung der Nematodenverteilung, angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, MF = Mykorrhizierungsfrequenz. n=5, keine signifikanten Unterschiede gemäß Tukey-Test ($p \leq 0,05$).

Variante	-myk	Testmaterial 2	MF [%]
-myk / -myk	52,2 \pm 8,0	47,8 \pm 8,0	
-myk / <i>G.e.</i> 36	50,1 \pm 4,8	49,9 \pm 4,8	80
-myk / <i>G.i.</i> 510	51,7 \pm 8,6	48,3 \pm 8,6	90

Tab. 3.11.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Sand-Block-Assay, abgebildet sind die Ergebnisse zweier Versuchsdurchläufe. Testmaterial: Wurzelexsudate aus teilhydroponischer Kultur. Darstellung der Nematodenverteilung, angegeben in % der re-extrahierten Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510, **MF** = Mykorrhizierungsfrequenz. n = 5, Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	-myk		Testmaterial 2	MF [%]
-myk / -myk	47,3 \pm 7,0		52,7 \pm 7,0	
-myk / G.e. 36	40,3 \pm 5,9	a	59,7 \pm 5,9	b 90
-myk / G.i. 510	39,9 \pm 6,7	a	60,1 \pm 6,7	b 72,5
-myk / -myk	45,2 \pm 9,8		54,8 \pm 9,8	
-myk / G.e. 36	51,6 \pm 3,2		48,4 \pm 3,2	92,5
-myk / G.i. 510	49,6 \pm 10,7		50,4 \pm 10,7	80

3.2.2.3. Zusammenfassende Betrachtung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Sand-Block-Assay zwar grundsätzlich eine Orientierung der Tiere zum Wirt hin ermöglicht, die Übertragung der unter 3.1 *in vivo* beobachtete Abstoßung durch Mykorrhizierung jedoch nicht möglich ist. *In vitro* und auch unter Nutzung direkt entnommener und applizierter Exsudate waren die Tiere entweder gleichmäßig verteilt oder orientierten sich in Richtung der Exsudate mykorrhizierter Pflanzen.

3.3. Migrationsuntersuchungen auf Agar

Die unter 3.1 und 3.2 verwendeten Setups gewährleisteten eine natürliche Fortbewegung der Tiere zwischen Bodenpartikeln. Arbeitsaufwand und Auswertung sind jedoch sehr material- und zeitintensiv. Diese Versuchsanordnungen erlauben daher keine umfassende Untersuchung und Charakterisierung von Exsudaten in angemessenem Maßstab. Daher wurde in einem stark vereinfachten System ein weiterer Versuchskomplex durchgeführt.

Agar-gefüllte Petrischalen wurden an gegenüberliegenden Seiten mit Testlösungen versehen und *M. incognita*-Larven mittig aufgetragen. Nach mehreren Stunden Migrationsdauer wurde a) die Verteilung der Tiere mittels Binokular erfasst und b) bewertet, ob verschiedene Stoffe und Stoffgemische attraktiv oder abstoßend wirken.

Ziele dieses Experiment-Komplexes waren:

1. das System auf seine Funktionalität hin zu testen und gegebenenfalls zu optimieren,
2. herauszufinden, welche Migrationsreaktionen Exsudatbestandteile bei den Tieren hervorrufen,
3. zu untersuchen, ob gewonnene Perkolate und Exsudate *in vitro* einen Einfluss auf die Orientierung der Tiere haben, welche der Reaktion *in vivo* entspricht.

3.3.1. Material & Methoden

3.3.1.1. Gewinnung der Perkolate

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte wie unter 2.2 angegeben. Die Symbiose-Etablierung umfasste einen Zeitraum von 6 Wochen, um eine starke Mykorrhizierung und damit eine vergleichsweise hohe Konzentration an symbiontisch bedingten Exsudatkomponenten zu gewährleisten. Danach wurden die Pflanzen bis zur Sättigung gegossen und die im Substrat enthaltenen Exsudate 48 h später mittels Perkolation mit dH₂O ausgewaschen. Pro Topf wurden 100 ml gewonnen und die Proben von fünf Pflanzen je Variante (*G.e.* 36, *G.i.* 510, -myk) vereinigt, gegebenenfalls behandelt (s.u.) und bei 5°C gelagert.

3.3.1.2. Präparation der Perkolate

Die Exsudate wurden sowohl als nicht-sterile Perkolate unmittelbar nach der Gewinnung getestet, als auch sterilfiltriert (Membranfilter, 0,2 µm Porengröße, Fa. Sartorius, Deutschland) und mittels Gefriertrocknung entwässert und aufkonzentriert.

3.3.1.3. Attraktionswirkung von Perkolaten

Aus 2 ml 0,75% Wasseragar in Petrischalen ($\varnothing=5,5$ cm) wurden auf gegenüberliegenden Seiten Löcher ($\varnothing=0,5$ cm) gestanzt bzw. Agarblöcke ($\varnothing=0,5$ cm) aufgelegt und mit je 20 μ l der Testlösung versehen. Ein mit 400 μ l sterilem dH₂O befeuchtetes Filterpapier im Deckel der Petrischalen gewährleistete eine gleichmäßige Luftfeuchtigkeit. Die Dauer der Gradientenetablierung betrug i.d.R. 2 h vor Zugabe der J2, die Migrationszeit der Larven in der Regel ca. 5 h bei 22°C unter Lichtausschluß. 100 - 250 Tiere wurden in 5 μ l H₂O mittig aufgetragen. Links und rechts eines Mittelstreifens von 0,5 cm wurde die Petrischale in Längs-Sektionen von 1 cm Breite unterteilt und die Anzahl der Tiere pro Sektion unter dem Binokular bestimmt. Zusammenfassend wurde die prozentuale Verteilung der Tiere in den beiden Hälften der Petrischale wiedergegeben.

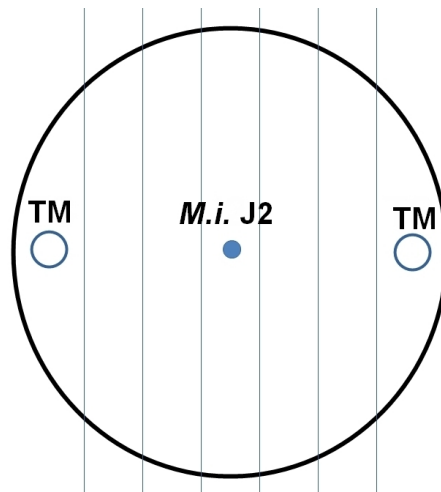


Abb. 3.13.: Versuchsaufbau zur Erfassung der Ausbreitung von *M. incognita* auf Agar, angelehnt an Bilgrami *et al.* (1985). **TM** = Testmaterial, **M.i. J2** = Larvenstadium 2 von *M. incognita*

3.3.1.4. Modifikation von Versuchsaufbau, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode

Das Auszählen der Tiere mittels Binokular ist so zeitintensiv, dass nur eine begrenzte Anzahl an Wiederholungen in einem vertretbaren Zeitrahmen möglich ist. Daher wurde in dieser letzten Versuchsreihe zur Exsudatprüfung die Verteilung der Tiere anhand einer Skala und nicht mehr durch Auszählen erfasst (Diez und Dusenbery 1989): Die Skala wurde mittig unter der Petrischale platziert und unterteilte die Testarena in 0,5 cm breite nummerierte Kategorien (siehe Abb. 3.14). In der Mitte der 1 cm breiten Zone 0 wurden ca. 200 Tiere appliziert. Bewegten sie sich in Richtung der Testlösung, galt diese als attraktiv, bei einer Bewegung von der Testlösung weg als abstoßend. Es wurde die Ausdehnung der Nematoden-Verteilung bonitiert. Dies ermöglichte eine schnelle Auswertung, eine deutliche Steigerung der Fallzahl und erhöhte damit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

Da aufgebrachte Substanzen in der runden Petrischale nach allen Seiten diffundieren, wurden Petrischalen mit 4 ml 0,75%igem Agar befüllt, welcher nach dem Aushärten bis auf einen mittigen 1 cm breiten Streifen wieder entfernt wurde (siehe Abb. 3.15). An den Stirnseiten des Streifens wurden Agarblöcke ($\varnothing = 0,5$ cm) als Applikationsort für die Testlösungen positioniert. Da bekannt ist, dass NaCl eine stark abstoßende Wirkung auf Nematoden hat, diente dieses in verschiedenen Konzentrationen dazu, die Wahrnehmung der J2 in diesem artifiziellen System anhand der o.g. Skala zu prüfen (Diez und Dusenbery 1989). Nach Überprüfung der Funktionalität des Testsystems wurden verschiedene Standardsubstanzen, welche auch in Wurzelexsudaten enthalten sind, auf ihre Wirkung auf *M. incognita* untersucht. Im Abstand von 2 h wurden zweimal jeweils 20 μ l der Testlösung in verschiedenen Konzentrationen appliziert und 30 min nach der ersten Applikation wurden ca. 200 J2 in 5 μ l dH₂O aufgebracht. Die Migrationsdauer betrug 24 h bei 22°C unter Lichtausschluss.

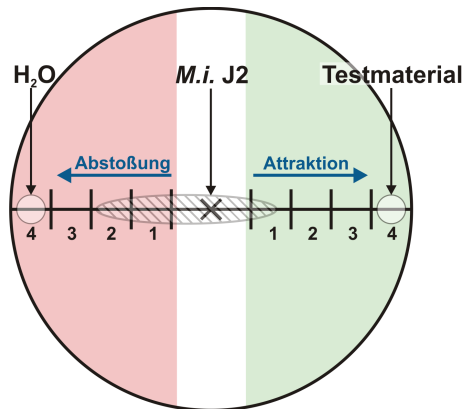


Abb. 3.14.: Skala für die Erfassung der Nematoden-Verteilung zur Ermittlung der abstoßenden bzw. attraktiven Wirkung von Testlösungen. *M.i. J2* = Larvenstadium 2 von *M. incognita*, weiße Zone = indifferentes Larven-Verhalten, schraffiertes Oval = Gesamt-Verteilung der Nematoden.

Ebenso wurden frisch entnommene Exsudate aus teil-hydroponischer Kultur auf ihre Wirkung hin untersucht. Hier wurden in einem Zeitraum von 25 h einmal 20 μl und dann im 2 h-Rhythmus je 5 μl der Testlösungen gegeneinander aufgetragen. Das Auftragen der Tiere erfolgte 1 h nach der ersten Applikation der Substanzen. Das Experiment wurde 24 h nach Aufbringen der J2 beendet und mittels Binokular bei 32-facher Vergrößerung ausgewertet.

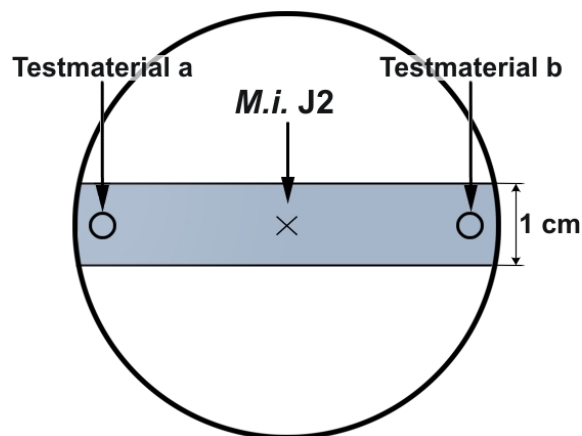


Abb. 3.15.: Auf 1 cm Agar-Breite minimierte Testarena zur Verbesserung des Diffusionsgradienten. *M.i. J2* = Larvenstadium 2 von *M. incognita*.

3.3.1.5. Statistische Auswertung

Wurde die Nematoden-Verteilung durch das Auszählen der Tiere bestimmt, wurden signifikante Unterschiede mithilfe des Paketes `mmcp` über die `Odd's Ratio` in R 2.7.1 ermittelt (R 2005). Hierbei wurde wie üblich die Menge an Tieren der beiden Seiten einer Variante gegeneinander getestet. Wenn die Verteilung der Tiere anhand o.g. Skala ermittelt wurde, erfolgte die statistische Auswertung anhand eines nicht-parametrischen Konfidenzintervalls für den Quotienten der erreichten Skalenwerte links und rechts des Applikationspunktes mittels Hodges-Lehmann-Schätzer und wurde mit dem Paket `pairwiseCI` in R umgesetzt (Hothorn und Munzel 2002). Zur Signifikanzbestimmung wurde ein zweifaktorieller Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt.

3.3.2. Ergebnisse

Nachdem ermittelt wurde, dass die für eine verminderte Attraktion verantwortliche Substanz wasserlöslich und nicht gasförmig ist, sollten mit einem stark vereinfachten Testsystem weitere Merkmale ermittelt werden. Ein Auswaschen der wirksamen Substanz war also grundsätzlich möglich. Daher wurde zunächst mit Perkolaten, später mit Exsudaten aus teil-hydroponischer Kultur gearbeitet, welche vor der Applikation auf verschiedene Weise präpariert wurden. Weiterhin wurde getestet, ob sich Effizienz und Aussagekraft des Tests durch Variation des Setups steigern lassen und welche Wirkung Substanzen, die regulär in Exsudaten vorkommen, in isolierter Form auf *M. incognita* haben.

3.3.2.1. Attraktionswirkung von Perkolaten

Um die *in vivo* beobachteten Ergebnisse *in vitro* zu reproduzieren wurde ein weiteres Biotest-System ausgewählt. Vorteil des gewählten Setups war, dass kein Verlust applizierter Tiere stattfand. Zudem konnte der zeitliche Aufwand der Auswertung im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchsanordnungen stark reduziert werden, was mehr Testdurchläufe ermöglichte.

Beobachtungen zeigten, dass den Tieren eine Fortbewegung auf Agar möglich war. Die Konzentration dieses Mediums wurde so gewählt, dass die Tiere nicht in den Agar abwanderten, wo ihnen eine weitere Fortbewegung nicht möglich, eine Wanderung im Feuchtigkeitfilm auf der Oberfläche aber möglich war: Die ersten mittig platzierten Tiere hatten stets nach ca. 1 h den Rand der Petrischale ($\varnothing = 5,5$ cm) erreicht. Um die visuelle Auswertung der Platten in einem vertretbaren Zeitrahmen zu halten und so eine einheitliche Behandlung der Varianten zu gewährleisten war die Gesamtmenge an auswertbaren Petrischalen pro Versuchsdurchlauf begrenzt. Anzahl der Wiederholungen pro Variante musste folglich bei einer Steigerung der Varianten reduziert werden. Aus diesem Grund musste eine vergleichsweise geringe Fallzahl von $n=3$ (Testsubstanzen: H_2O , -myk, *G.e.* 36, *G.i.* 510) bzw. $n=7$ (Testsubstanzen: -myk, *G.e.* 36, *G.i.* 510) gewählt werden.

Tab. 3.12.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: unbehandeltes Perkolat. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier Testdurchläufe. Nematodenverteilung in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. Testreihe mit H_2O -Varianten: $n=3$, Testreihe ohne H_2O -Varianten: $n=7$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]	
	linke Seite	rechte Seite
-myk / -myk	29,0 \pm 12,1	71,0 \pm 12,1
-myk / <i>G.e.</i> 36	57,4 \pm 6,6	42,6 \pm 6,6
-myk / <i>G.i.</i> 510	54,5 \pm 7,2	45,5 \pm 7,2
H_2O / -myk	50,6 \pm 2,6	49,4 \pm 2,6
H_2O / <i>G.e.</i> 36	53,2 \pm 5,9	46,8 \pm 5,9
H_2O / <i>G.i.</i> 510	74,2 \pm 0,6	25,8 \pm 0,6
H_2O / H_2O	56,5 \pm 13,9	43,5 \pm 13,9
-myk / -myk	56,4 \pm 3,7	43,6 \pm 3,66
-myk / <i>G.e.</i> 36	43,0 \pm 3,5	57,0 \pm 3,48
-myk / <i>G.i.</i> 510	52,0 \pm 1,8	48,0 \pm 1,77

Die Überprüfung der Wirkung der unbehandelten Perkolate, welche ca. 60 min vor Applikation gewonnen wurden, erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Attraktivität

von Wasser, -myk und *G.e.* 36 bzw. *G.i.* 510 (Tab. 3.12). Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen bei den Kontrollen (-myk/-myk und H₂O/H₂O). Die Ergebnisse der Wiederholung dieses Versuchs mit einer Reduktion der Varianten zur Erhöhung der Fallzahl (n = 7) ist im unteren Teil der Tabelle abgebildet. Sie erbrachte eine ausgewogene Ausbreitung innerhalb der Kontrollen, jedoch keine abstoßende Wirkung der Perkolate mykorrhizierter Pflanzen. Allerdings entfaltete *G.e.* 36 eine attraktive Wirkung, wie sie auch schon im Sand-Block-Assay beobachtet wurde.

Tab. 3.13.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat. Abgebildet sind die Ergebnisse von drei Testdurchläufen. Nematodenverteilung in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. Testreihe mit H₂O-Varianten: n=3, Testreihe ohne H₂O-Varianten: n = 7. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]			
	linke Seite		rechte Seite	
-my / -myk	35,8 \pm 9,9	a	64,2 \pm 9,9	b
-myk / <i>G.e.</i> 36	36,3 \pm 24,5	a	63,7 \pm 24,5	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	47,4 \pm 7,7		52,6 \pm 7,7	
H ₂ O / -myk	70,2 \pm 5,3	a	29,8 \pm 5,3	b
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	53,1 \pm 11,0		46,9 \pm 11,0	
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	52,4 \pm 10,0		47,6 \pm 10,0	
H ₂ O / H ₂ O	54,1 \pm 16,4		45,9 \pm 16,4	
-myk / -myk	48,4 \pm 3,7		51,6 \pm 3,7	
-myk / <i>G.e.</i> 36	47,9 \pm 3,4		52,1 \pm 3,4	
-myk / <i>G.i.</i> 510	48,7 \pm 4,8		51,3 \pm 4,8	
-myk / -myk	50,8 \pm 1,2		49,2 \pm 1,2	
-myk / <i>G.e.</i> 36	44,5 \pm 4,2	a	55,5 \pm 4,2	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	44,1 \pm 4,7	a	55,9 \pm 4,7	b

Es war erforderlich, auszuschließen, dass Mikroorganismen oder ihre Metaboliten die Wirkung der frisch gewonnenen Perkolate beeinflussen. Die von Natur aus unsterilen Perkolate wurden daher direkt nach der Gewinnung sterilfiltriert und dann auf ihre Wirkung

hin getestet. So sollte ausgeschlossen werden, dass die mit der Perkolation ausgewaschenen Mikorroorganismen einzelne, möglicherweise auf *M. incognita* abstoßend wirkende, Perkolatbestandteile metabolisierten (Tab. 3.13). Die Tabelle zeigt, dass auch die sterilen Perkolate der mit *G.e.* 36 mykorrhizierten Pflanzen attraktiv auf die J2 wirkten. Die Verteilungsschwankung in der Kontrolle „-myk/-myk“ ist jedoch sogar noch höher als die von *G.e.* 36. Wurden H₂O und die gewonnenen Perkolate einander gegenübergestellt, war Wasser stets attraktiver. Auch durch Wiederholung dieses Versuchs, dargestellt im mittleren und unteren Abschnitt der Tab. 3.13, konnte keine Übertragbarkeit der *in vivo*-Ergebnisse erzielt werden.

Tab. 3.14.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: 2-fach aufkonzentriertes Perkolat. Abgebildet sind die Ergebnisse von zwei Testdurchläufen. Nematodenverteilung angegeben in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. Testreihe mit H₂O-Varianten: n=3, Testreihe ohne H₂O-Varianten: n = 7. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]			
	linke Seite		rechte Seite	
-myk / -myk	56,5 \pm 3,6	a	43,5 \pm 3,6	b
-myk / <i>G.e.</i> 36	55,0 \pm 7,5		45,0 \pm 7,5	
-myk / <i>G.i.</i> 510	42,9 \pm 14,9		57,1 \pm 14,9	
H ₂ O / -myk	79,9 \pm 5,7	a	20,1 \pm 5,7	b
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	68,9 \pm 9,6	a	31,1 \pm 9,6	b
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	59,7 \pm 5,0	a	40,3 \pm 5,0	b
H ₂ O / H ₂ O	54,7 \pm 9,7		45,3 \pm 9,7	
-myk / -myk	44,3 \pm 12,8		55,7 \pm 12,8	
-myk / <i>G.e.</i> 36	55,0 \pm 4,2	a	45,0 \pm 4,2	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	35,8 \pm 5,1	a	64,2 \pm 5,1	b
H ₂ O / -myk	73,1 \pm 1,1	a	26,9 \pm 1,1	b
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	73,4 \pm 1,7	a	26,6 \pm 1,7	b
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	66,3 \pm 5,2	a	33,7 \pm 5,2	b
H ₂ O / H ₂ O	46,2 \pm 1,6		53,8 \pm 1,6	

Da sich die Frage stellte, ob die Substanzen in einer zu niedrigen Konzentration vorliegen, wurden die Perkolate einer Gefriertrocknung unterzogen, in dH₂O bis zur doppelten Ausgangskonzentration resuspendiert und in die Testarena appliziert. Tab. 3.14 zeigt, dass die Perkolate in Kombination mit H₂O stets eine abstoßende Wirkung hatten, welche aber bei der Gegenüberstellung der Perkolate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen abgeschwächt (-myk/*G.e.* 36), nivelliert oder sogar umgekehrt wurde (-myk/*G.i.* 510). Das aus der Gefriertrocknung gewonnene Kondenswasser wurde ebenfalls auf seine Wirkung getestet, da es kurzkettige Alkohole enthalten kann (pers. Mitteilung Prof. Dr. G. Dräger, Leibniz-Universität Hannover). Während die Kontrollen eine verhältnismäßig stabile Gleichverteilung der Tiere aufweisen, schwankt die Wirkung von *G.e.* 36 und *G.i.* 510 zu -myk zwischen abstoßend, attraktiv und indifferent (Tab. 3.15). Werden AMP-Varianten gegen Wasser getestet, sind sie in drei von vier Fällen attraktiver als dieses.

Tab. 3.15.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: Kondenswasser gefriergetrockneter Perkolate. Abgebildet sind die Ergebnisse von vier Testdurchläufen. Nematodenverteilung angegeben in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. Testreihe mit H₂O-Varianten: n = 3, Testreihe ohne H₂O-Varianten: n=7. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]		
	linke Seite	rechte Seite	
-myk / -myk	50,5 \pm 3,6	49,5 \pm 3,6	
-myk / <i>G.e.</i> 36	60,6 \pm 4,9	39,4 \pm 4,9	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	71,0 \pm 6,1	29,0 \pm 6,1	b
H ₂ O / -myk	56,1 \pm 5,6	43,9 \pm 5,6	b
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	47,8 \pm 8,2	52,2 \pm 8,2	
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	41,4 \pm 7,8	58,6 \pm 7,8	b
H ₂ O / H ₂ O	52,6 \pm 10,4	47,4 \pm 10,4	
-myk / -myk	51,5 \pm 2,5	48,5 \pm 2,5	
-myk / <i>G.e.</i> 36	25,2 \pm 2,3	74,8 \pm 2,3	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	36,9 \pm 4,9	63,1 \pm 4,9	b
H ₂ O / -myk	57,1 \pm 12,2	42,9 \pm 12,2	b
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	42,0 \pm 1,5	58,0 \pm 1,5	b
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	42,2 \pm 6,0	57,8 \pm 6,0	b
H ₂ O / H ₂ O	47,7 \pm 1,5	52,3 \pm 1,5	
-myk / -myk	51,6 \pm 10,1	48,4 \pm 10,1	
-myk / <i>G.e.</i> 36	40,7 \pm 4,7	59,3 \pm 4,7	b
-myk / <i>G.i.</i> 510	50,5 \pm 3,3	49,5 \pm 3,3	
H ₂ O / -myk	53,4 \pm 5,8	46,6 \pm 5,8	
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	45,2 \pm 6,3	54,8 \pm 6,3	
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	35,7 \pm 5,2	64,3 \pm 5,2	b
H ₂ O / H ₂ O	50,1 \pm 2,8	49,9 \pm 2,8	
-myk / -myk	50,9 \pm 2,2	49,1 \pm 2,2	
-myk / <i>G.e.</i> 36	45,3 \pm 2,6	54,7 \pm 2,6	
-myk / <i>G.i.</i> 510	25,6 \pm 3,4	74,4 \pm 3,4	b
H ₂ O / -myk	44,6 \pm 3,9	55,4 \pm 3,9	
H ₂ O / <i>G.e.</i> 36	51,2 \pm 8,4	48,8 \pm 8,4	
H ₂ O / <i>G.i.</i> 510	64,0 \pm 4,9	36,0 \pm 4,9	b
H ₂ O / H ₂ O	59,0 \pm 2,5	41,0 \pm 2,5	b

Da die Vermutung nahe liegt, dass der durch Applikation und Diffusion von 20 μ l Testsubstanz entstandene Gradient nicht stark genug ist, und bei den Tieren eine Reaktion

auszulösen, wurde auch die mehrfache Applikation von Perkolaten auf ihre Wirkung hin getestet. In einem 20-stündigen Experiment erbrachte ein Aufbringen der Substanzen im Abstand von 20, 19 und 1 (Tab. 3.16) bzw. 3 Stunden (Tab. 3.17) vor Auszählungsbeginn keine konstanten Ergebnisse und keinen starken Abstoßungseffekt der Perkolate.

Tab. 3.16.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat in Mehrfachapplikation (20, 19, 1 h vor J2-Applikation). Nematodenverteilung angegeben in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. n=7, Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Tukey-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]	
	-myk	Testsubstanz 2
-myk / -myk	43,3 \pm 11,3	56,7 \pm 11,3
-myk / <i>G.e.</i> 36	55,6 \pm 6,2	44,4 \pm 6,2
-myk / <i>G.i.</i> 510	51,9 \pm 3,5	48,1 \pm 3,5

Tab. 3.17.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf Agar, Testmaterial: sterilfiltriertes Perkolat in Mehrfachapplikation (20, 19, 3 h vor J2-Applikation). Nematodenverteilung angegeben in % der Gesamtmenge migrierter Tiere \pm Standardfehler. **-myk** = Perkolate mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Perkolat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Perkolat von *G. intraradices* 510. n=7, Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a,b) gemäß Tukey-Test wenn $p \leq 0,05$.

Variante	Verteilung der Nematoden [%]	
	linke Seite	rechte Seite
-myk / -myk	49,03 \pm 3,1	50,97 \pm 3,1
-myk / <i>G.e.</i> 36	44,52 \pm 3,1 a	55,48 \pm 3,1 b
-myk / <i>G.i.</i> 510	43,18 \pm 4,8 a	56,82 \pm 4,8 b

Die Ergebnisse dieses Versuchskomplexes lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die *in vivo* beobachteten Effekte sind *in vitro* nicht reproduzierbar. Vielmehr wirken die Perkolate mykorrhizierter Pflanzen häufig attraktiv auf die J2. Ein starkes Repellent konnte unter

den getesteten Perkolat-Varianten nicht nachgewiesen werden. Können die Tiere zwischen H_2O und Perkolaten wählen, so wirkt Wasser attraktiver als die Substanzgemische bzw. die Perkolate teilweise sogar abstoßend. Wird allerdings in der Gefriertrocknung der Perkolate gewonnenes Kondenswasser verwendet, sind die Perkolate meist attraktiver als Wasser. Weder lassen sich in diesem Versuchsaufbau die im Olfaktometer-Assay gewonnenen Ergebnisse reproduzieren, noch treten in diesem System getätigte Beobachtungen konstant auf.

3.3.2.2. Modifikation von Versuchsaufbau, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode

Es stellte sich die Frage, ob die Tiere in der Lage sind, sich auf dem Agar zu orientieren. Zudem war unklar, ob eine Veränderung des Versuchsaufbaus zuverlässigere Ergebnisse erbringen würde. Eine Erhöhung der Wiederholungen war zwingend notwendig. Diez und Dusenbery (1989) standen vor dem gleichen Problem und entwickelten eine Skala, um nicht länger die Verteilung einzelner Nematoden, sondern die Ausbreitung der Gesamtheit applizierter Tiere zu erfassen. Diese Skala wurde übernommen und an das vorhandene Testsystem angepasst. Dann wurde zunächst NaCl in verschiedenen Konzentrationen auf seine Wirkung gegenüber *M. incognita* getestet, um sicherzustellen, dass eine Orientierung der Tiere im verwendeten Versuchsaufbau grundsätzlich möglich ist.

Die Testarena ist unter 3.14 abgebildet, die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Castro *et al.* (1989): Migrierten die Tiere in Richtung Testsubstanz, galt dies als Attraktion. Bewegten sie sich hingegen in Richtung des Wassers, wurde dies als Abstoßung durch die Testsubstanz gewertet. Folglich wurden die ermittelten Skalenwerte jeweils mit den Parametern R („repellativ“, Wanderung in Richtung H_2O) oder A („attraktiv“, Wanderung in Richtung Testmaterial) bezeichnet und der Quotient A/R gebildet, um das Verteilungsverhältnis zu verdeutlichen. Die Tabellen geben sowohl die Mittel der Skalenwerte links und rechts des Applikationspunktes wieder, als auch den Quotienten der Skalen-

werte beider Seiten (A/R-Quotient), Hodges-Lehman-Schätzer und zugehöriges Konfidenzintervall. Signifikante Wirkungen der applizierten Substanzen sind mit Buchstaben gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

Tab. 3.18.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay **auf Agar**, Testsubstanz: NaCl. Mittelwert (MW) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (A/R), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. Zwei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O		MW NaCl		A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
H ₂ O / 100 mM	3,9 \pm 0,2	a	3,6 \pm 0,3	b	0,8 \pm 0,0	0,77	0,60 - 1,00
H ₂ O / 10 mM	4,0 \pm 0,0		3,8 \pm 0,1		1,0 \pm 0,0	0,87	0,75 - 1,00
H ₂ O / 1 mM	4,0 \pm 0,0		4,0 \pm 0,0		1,0 \pm 0,0	0,00	1,00 - 1,00
H ₂ O / 1 M	4,0 \pm 0,0	a	1,1 \pm 0,2	b	0,3 \pm 0,0	0,35	0,25 - 0,50
H ₂ O / 100 mM	4,0 \pm 0,0		4,0 \pm 0,0		1,0 \pm 0,0	0,00	1,00 - 1,00
H ₂ O / 10 mM	3,6 \pm 0,2		4,0 \pm 0,0		1,1 \pm 0,1	1,16	1,00 - 1,33
H ₂ O / 1mM	2,2 \pm 0,5	a	4,0 \pm 0,0	b	2,3 \pm 0,4	1,63	1,00 - 4,00

Tab. 3.19.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf **1-cm-Agar-Streifen**, Testsubstanz: NaCl. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier Testdurchläufe. Mittelwert (MW) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (A/R), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. Zwei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O		MW NaCl		A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
H ₂ O / 100 mM	4,0 \pm 0,0	a	1,7 \pm 0,2	b	0,4 \pm 0,0	0,35	0,25 - 0,50
H ₂ O / 10 mM	3,8 \pm 0,1		3,3 \pm 0,2		0,9 \pm 0,1	0,87	0,75 - 1,00
H ₂ O / 1mM	3,9 \pm 0,1		4,0 \pm 0,0		1,0 \pm 0,0	1,16	1,00 - 1,33
H ₂ O / 1M	4,0 \pm 0,0	a	0,5 \pm 0,2	b	0,1 \pm 0,0	0,03	0,25 - 0,25
H ₂ O / 100 mM	4,0 \pm 0,0	a	0,8 \pm 0,2	b	0,2 \pm 0,1	0,35	0,25 - 0,50
H ₂ O / 10 mM	3,8 \pm 0,1		2,9 \pm 0,5		0,8 \pm 0,1	0,82	0,33 - 1,33
H ₂ O / 1mM	1,5 \pm 0,4	a	4,0 \pm 0,0	b	2,9 \pm 0,4	2,83	1,00 - 4,00

Der A/R-Quotient gibt konkreten Aufschluss über die Attraktivität der applizierten Testsubstanz: ist $A/R < 1$, ist die Testsubstanz, die gegen Wasser (bzw. -myk) getestet wurde, abstoßend, bei $A/R = 0$ indifferent und bei $A/R > 1$ attraktiv. Konfidenzintervalle (KI) geben den Bereich an, in welchem der A/R-Quotient mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 - \alpha$ (hier also: 95%) liegt und um welchen Wert der errechnete Mittelwert schwankt. Konfidenzintervalle haben weitere Interpretationsmöglichkeiten als die Ermittlung der Signifikanz: Schließt das KI die Zahl 1 ein, liegt keine Signifikanz vor. Je näher bei 1 die Grenzen des KI liegen, desto näher liegt der p-Wert an der Signifikanzgrenze. Zudem gilt: je enger das Konfidenzintervall, desto zuverlässiger ist der errechnete Mittelwert.

Tab. 3.18 gibt zwei Durchläufe dieses Attraktionsversuchs wieder, in dem verschiedene Konzentrationen des Salzes gegen H_2O getestet wurden. Angegeben sind die Ausbreitung der Tiere jeweils in Richtung der Applikationspunkte, der entsprechende Standardfehler und die Markierung signifikanter Unterschiede zwischen einander gegenübergestellten Testsubstanzen. Aus Tab. 3.18 geht hervor, dass Salz nur in hohen Konzentrationen (1 M und 100 mM) eine signifikant abstoßende Wirkung auf die Tiere hat und sich der Abstoßungseffekt bei geringeren Konzentrationen nivelliert.

Die Tiere sind also grundsätzlich in der Lage, in dem System Reize wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Es sind jedoch hohe Konzentrationen nötig, um eine Reaktion auszulösen. Die applizierten Stoffe diffundieren gleichmäßig in das umgebende Medium. Um die Diffusion auf eine Richtung, nämlich die Gerade, auf der Substanzen und Tiere appliziert werden, zu beschränken und somit auch ein stärkeres Konzentrationsgefälle zu erzeugen, wurde die Agarmenge reduziert. Das komplette Füllen der Agarschale und nachfolgende Entfernen des Mediums bis auf einen schmalen Mittelstreifen gewährleistete eine gleichmäßige Dicke des Mediums. Die Ergebnisse in Tab. 3.19 zeigen, dass die Sensitivität des Agar Pair-Choice-Assays deutlich erhöht werden konnte. Auch Konzentrationen von 10 mM NaCl bewirken eine Abstoßung der Tiere, während eine Konzentration von 1 mM, wie in Tab. 3.18 gezeigt, sogar signifikant attraktiver als Wasser sein kann.

Tab. 3.20.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf **1-cm-Agar-Streifen**, Testsubstanz: Glucose. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier Testdurchläufe. Mittelwert (**MW**) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (**A/R**), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. Zwei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O	MW Glucose	A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
H ₂ O / 1M	4,0 \pm 0,0	3,5 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,16	1,00 - 1,33
H ₂ O / 100 mM	3,8 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,87	0,75 - 1,33
H ₂ O / 10 mM	1,2 \pm 0,4	a 3,9 \pm 0,1	b 3,5 \pm 0,4	0,29	0,25 - 0,50
H ₂ O / 1M	2,8 \pm 0,5	4,0 \pm 0,0	1,6 \pm 0,2	0,71	0,50 - 1,00
H ₂ O / 100 mM	2,0 \pm 0,7	2,3 \pm 0,8	1,4 \pm 0,5	0,71	0,01 - ∞
H ₂ O / 10 mM	3,8 \pm 0,2	3,6 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1	1,00	0,75 - 1,50

Tab. 3.21.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice Assay auf **1-cm-Agar-Streifen**, Testsubstanz: Ribose. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier Testdurchläufe. Mittelwert (**MW**) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (**A/R**), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. Zwei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O	MW Ribose	A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
H ₂ O / 1M	3,2 \pm 0,5	2,7 \pm 0,6	1,3 \pm 0,4	0,87	0,01 - 1,33
H ₂ O / 100 mM	3,2 \pm 0,4	2,3 \pm 0,6	1,0 \pm 0,4	0,82	0,25 - 1,33
H ₂ O / 10 mM	2,4 \pm 0,4	2,7 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3	1,16	0,50 - 2,00
H ₂ O / 1M	2,5 \pm 0,4	a 4,0 \pm 0,0	b 2,2 \pm 0,4	1,41	1,00 - 4,00
H ₂ O / 100 mM	2,0 \pm 0,4	a 3,8 \pm 0,2	b 2,2 \pm 0,3	1,41	1,00 - 4,00
H ₂ O / 10 mM	1,7 \pm 0,4	a 3,7 \pm 0,3	b 2,7 \pm 0,5	2,83	1,00 - 4,00

Tab. 3.22.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice Assay auf **1-cm-Agar-Streifen**, Tests substanz: Zitronensäure. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier Testdurchläufe. Mittelwert (**MW**) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (**A/R**), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. Zwei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O	MW C ₆ H ₈ O ₇	A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
H ₂ O / 1M	1,5 \pm 0,4	1,9 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	0,82	0,33 - 1,50
H ₂ O / 100 mM	3,3 \pm 0,4	a 1,3 \pm 0,4	b 0,5 \pm 0,1	2,83	1,00 - 4,00
H ₂ O / 10 mM	2,6 \pm 0,4	a 1,0 \pm 0,4	b 0,8 \pm 0,2	1,23	0,50 - 3,00
H ₂ O / 1M	3,0 \pm 0,4	3,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2	0,94	0,67 - 1,33
H ₂ O / 100 mM	4,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,5	0,8 \pm 0,1	1,16	1,00 - 2,00
H ₂ O / 10 mM	4,0 \pm 0,0	3,7 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,41	1,00 - 2,00

Da dieses Testsystem sowohl eine höhere Wiederholungszahl ermöglichte, als auch eine erhöhte Sensitivität gewährleistete, wurde mit diesem Versuchsaufbau auch die Wirkung verschiedener, regulär in Exsudaten enthaltener Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (Tab. 3.20 und Tab. 3.21, sowie Tab. 3.22). Während Glucose keine konstant abstoßende oder anziehende Wirkung auf die Tiere ausübt, ist Ribose in geringer Konzentration (10 mM) in beiden Testdurchläufen deutlich attraktiv. Zitronensäure wirkt hingegen abstoßend. In 1 M-Konzentration sterben die Tiere allerdings ab, wenn sie sich auf den Applikationspunkt zubewegen und über Zone 1 (vgl. Abb. 3.14) hinaus migrieren. Eine Fluchtreaktion ist nicht möglich, daher ist 1 M Zitronensäure nur scheinbar ebenso attraktiv wie H₂O.

Tab. 3.23.: Orientierung der Larven von *M. incognita* im Pair-Choice-Assay auf **1-cm-Agar-Streifen**, Testmaterial: Exsudate aus teil-hydroponischer Kultur direkt entnommen, Applikation: 24 h im 2 h-Rhythmus. Abgebildet sind die Ergebnisse von drei Testdurchläufen. Mittelwert (**MW**) der Nematodenverteilung gemäß Skala (Abb. 3.14) \pm Standardfehler, Attractant-Repellent-Quotient (**A/R**), Konfidenzintervall (**Konf.Interv.**) mit Hodges-Lehmann-Schätzer. **-myk** = Exsudat mykorrhizafreier Pflanzen, **G.e. 36** = Exsudat von *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = Exsudat von *G. intraradices* 510. Drei Versuchsdurchläufe mit je $n = 20$. Migrationsunterschiede innerhalb einer Variante signifikant (a, b) gemäß Wilcoxon-Rangsummen-Test, wenn $p \leq 0,05$.

Variante	MW H ₂ O	MW THK	A/R	Schätzer	95% Konf.interv.
-myk / -myk	3,6 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,12	0,75 - 1,25
-myk / <i>G.e.</i> 36	3,5 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	0,87	0,75 - 1,33
-myk / <i>G.i.</i> 510	3,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	0,87	0,75 - 1,00
-myk / -myk	3,7 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	0,87	0,75 - 1,33
-myk / <i>G.e.</i> 36	4,0 \pm 0,0	3,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	0,87	0,75 - 1,33
-myk / <i>G.i.</i> 510	3,8 \pm 0,1	3,3 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,16	0,75 - 1,33
-myk / -myk	4,0 \pm 0,0	4,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	0,00	1,00 - 1,00
-myk / <i>G.e.</i> 36	3,8 \pm 0,2	3,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	0,87	0,75 - ∞
-myk / <i>G.i.</i> 510	4,0 \pm 0,0	3,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	0,87	0,75 - 1,33

Abschließend wurde in diesem System die Wirkung von Exsudaten getestet, welche direkt von Pflanzen aus teil-hydroponischer Kultur entnommen wurden (Tab. 3.23). Die durchschnittliche Mykorrhizierungsfrequenz der Varianten betrug 87,5% (*G. etunicatum* 36), bzw. 83,3% (*G. intraradices* 510). Die Kontrolle (-myk/-myk) wies stets eine gleichmäßige Verteilung der Tiere auf, *G.i.* 510 bedingte eine signifikante Abstoßung.

Die Ergebnisse des Versuchskomplexes lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Es konnte nachgewiesen werden, dass *M. incognita* in der Lage ist, Reize auf Agar wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Die Variation des Setups und der Evaluationsmethode erbrachte eine Sensitivierung des Systems, eine Erhöhung Wiederholungen und eine deutliche Reduktion des Standardfehlers. Die in den meisten Fällen geringe Ausdehnung der Konfidenzintervalle bestätigt die Zuverlässigkeit des Tests. Zudem zeigen die KI an, dass

der p-Wert auch bei nicht vorliegenden Signifikanzen in vielen Fällen nur wenig größer war als 0,05. Unter den evaluierten Standardsubstanzen kann Zitronensäure als abstoßend und Ribose in geringer Konzentration als attraktiv bewertet werden. Die abstoßende Wirkung der Exsudate von *G.i.* 510 *in vivo* konnte *in vitro* erstmalig reproduziert werden. Weitere Wiederholungen sind erforderlich, um die Ergebnisse abzusichern und die Aussagekraft des Assays weiter zu etablieren.

3.4. Ergebnisse der Exsudatanalyse mittels UPLC

Tab. 3.24.: Zusammenfassung der in hoher Konzentration auftretenden, mittels UPLC detektierten Substanzen in den Exsudaten (nicht-)mykorrhizierter Pflanzen, ihrer Eigenschaften und Summenformeln. **RZ** = Retentionszeit (dezimal), **ID** = Kennnummer, siehe Abb. 3.16, **DB** = Anzahl der Doppelbindungen, **-myk** = mykorrhizafrei, **G.e. 36** = *G. etunicatum* 36, **G.i. 510** = *G. intraradices* 510.

Variante	Molmasse ¹	RZ	ID	Intensität ²	DB	Summenformel
Alle						
-myk	162,10	1,9	1	427,55	} 0	C ₈ H ₁₈ O ₃
<i>G.e.</i> 36	162,10	1,9	1	614,56		
<i>G.i.</i> 510	162,10	1,9	1	426,40		
-myk	238,13	2,67	3	165,84	} 1	C ₈ H ₂₂ N ₄ O ₄
<i>G.e.</i> 36	238,13	2,68	3	371,28		
<i>G.i.</i> 510	238,13	2,67	3	288,54		
-myk	370,17	2,57	2	82,92	} 14	C ₂₄ H ₂₆ N ₄
<i>G.e.</i> 36	370,17	2,57	2	93,52		
<i>G.i.</i> 510	370,17	2,57	2	103,65		
-myk						
	226,16	1,29	4	60,36	3	C ₁₁ H ₂₂ N ₄ O
	452,28	1,73	5	152,02	5	C ₂₄ H ₄₄ N ₄ O ₄
	452,28	1,73	5	152,02	9	C ₂₉ H ₄₄ N ₂ O ₂
+myk						
<i>G.e.</i> 36	281,24	3,24	6	85,68	} 2	C ₁₇ H ₃₇ N ₃
<i>G.i.</i> 510	281,24	3,24	6	82,44		

¹In der Tabelle wurde das reale Gewicht der Verbindungen angegeben: Alle aufgeführten Substanzen waren bei der Detektion mit Na⁺ assoziiert, daher wurde von der gemessenen und in Abb. 3.16 angegebenen Molmasse der Wert 23 (das Gewicht des Adduktes) subtrahiert.

²Intensität = die Menge detektierter Ionen

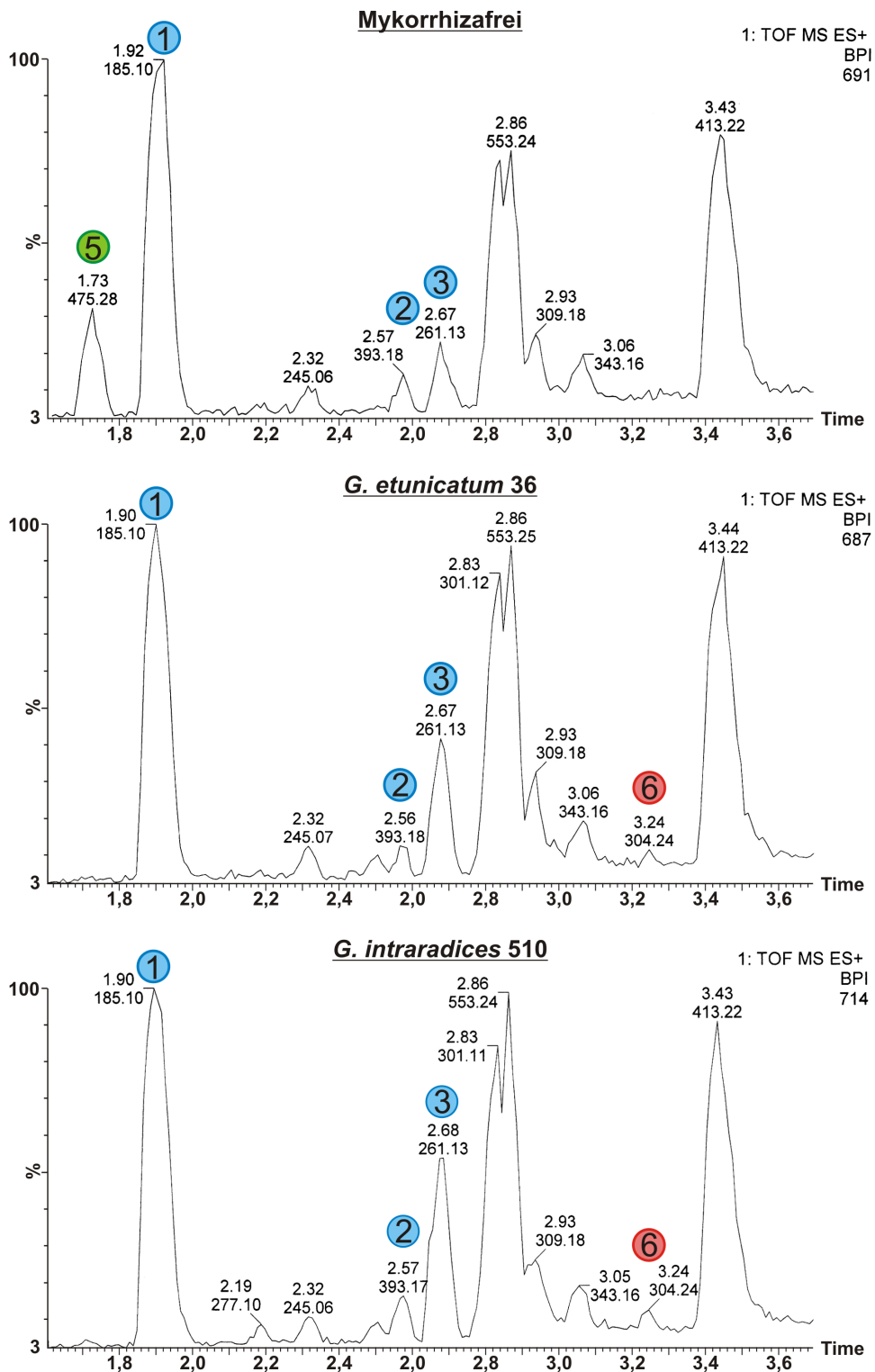


Abb. 3.16.: Ausschnitt der UPLC-Analyse, blaue Ziffern = Substanzen, die in allen Proben in hoher Konzentration auftraten, grüne Ziffern = Substanz nur in -myk-Exsudaten, rote Ziffern = Substanzen nur in +myk-Exsudaten enthalten. Substanz Nr. 4 nicht im angegebenen Zeitrahmen abgebildet

Die UPLC zeigte, dass sich die Exsudationsprofile der einzelnen Varianten voneinander unterscheiden (siehe Abb. 3.16). Es wurden die Summenformeln der Substanzen ermittelt, welche in hohen Konzentrationen, bzw. nur bei einzelnen Varianten auftraten. Die durchschnittliche Mykorrhizierungsfrequenz der Pflanzen lag bei 70% (*G. etunicatum* 36) bzw. 90% *G. intraradices* 510.

Verbindungen, die in allen Varianten in hoher Konzentration auftraten, sind in Abb. 3.16 mit blauen Kreisen markiert. Solche, die nur in den Exsudaten mykorrhizafreier Wurzeln auftraten haben grüne, und solche, die ausschließlich in mykorrhizierten Varianten registriert wurden, rote Markierungen. Die Nummerierungen stimmen mit den Angaben in 3.24 überein. Substanz Nr. 4 ist auf Abb. 3.16 nicht enthalten, da sie bereits vor dem angegebenen Zeitrahmen eluiert wurde, wie aus Tab. 3.24 ersichtlich wird. Die Tabelle verdeutlicht, dass einige Substanzen (Nr. 1-3) in allen Varianten auftreten, jedoch in unterschiedlich hohen Konzentrationen. Zwei stark polare Stoffe (kurze Retentionszeit) treten ausschließlich in -myk-Exsudaten auf (Nr. 4 und 5), und eine Substanz (Nr. 6) tritt nur in den Exsudaten mykorrhizierter Pflanzen auf. Bei einer UPLC werden alle Stoffe in Form von Ionen detektiert. Im vorliegenden Fall handelte es sich stets um Na^+ -Addukte. Da dieses Atom eine Molmasse von 23 hat, beträgt die Differenz zwischen detektierter und wahrer Masse der Verbindung stets 23. Während im Diagramm die detektierten Massen aufgeführt sind, finden sich in der Tabelle die tatsächlichen Massen der Verbindungen.

Die Molmasse keines der detektierten Stoffe stimmt mit einer der Agenzien überein, die bisher in Wurzelexsudaten nachgewiesen wurden (Tab. 4.1). Auch Datenbankrecherchen (siehe 2.6.4) ergaben keine Substanzen, die im Zusammenhang mit metabolischen Vorgängen stehen. Zwar erbrachte die Recherche Stoffe, die in Molmasse, Summenformel und Anzahl der Doppelbindungen mit den detektierten Substanzen übereinstimmen, hierbei handelte es sich jedoch um Lösungsmittel oder Zwischenprodukte bei der artifizialen Synthese von Substanzen, wie sie im Bereich der organischen Chemie Anwendung

finden. Es bedarf einer genaueren Analyse der detektierten Substanzen, um eindeutige Rückschlüsse über deren Identität und Strukturformel ziehen zu können. Da unter den gegebenen Bedingungen keine fundierten Aussagen über die Identität der Stoffe möglich sind, wird im Rahmen dieser Arbeit auf die Angabe hypothetischer Strukturformeln verzichtet.

4. Diskussion

Es ist bekannt, dass mykorrhizierte Pflanzen einen verminderten Pathogenbefall aufweisen (z.B. Schönbeck 1979; Bagyaraj 1984; Caron 1989). Auch der Befall durch sedentäre phytopathogene Nematoden kann durch AM deutlich vermindert werden. So wies Calvet *et al.* (2001) eine Reduktion des Befalls von *Prunus* durch *M. incognita* bei Mykorrhizierung der Pflanze mit *G. etunicatum* bzw. *G. intraradices* nach. Letzterer verminderte ebenfalls die Befallsstärke von *Radopholus similis* an *Daucus carota* (Elsen *et al.* 2001). Zur biologischen Bekämpfung von Wurzelgallennematoden zählen *G. intraradices*, *G. etunicatum*, *G. fasciculatum*, *G. mossae* und *Gigaspora margarita* zu den meistgenutzten AMP-Isolaten (Hussey und Roncadori 1982; Smith 1987; Hol und Cook 2005).

Im Lebenszyklus von *M. incognita* treten drei Stadien auf, in denen die Wirtspflanze den Fortbestand der Tiere maßgeblich beeinflusst und welche somit denkbare Eingriffsmöglichkeiten für die biologische Bekämpfung geben – den Larvenschlupf, die Wirtsfindung und die Etablierung der Wirt-Parasit-Beziehung: Wurzelexsudate können den Schlupf von PPN induzieren bzw. reduzieren (Griffin und Waite 1971; Nitao *et al.* 1999; Gaur *et al.* 2000), die Tiere orientieren sich entlang von Exsudatgradienten in Richtung der Wirtspflanze (Viglierchio 1961; Dusenbery 1987b; Robinson und Perry 2006), und die Kompatibilität von Wirtspflanze und Parasit entscheidet über das Ausmaß der Gallenbildung und damit den Fortbestand des Individuums (Dropkin und Nelson 1960; Decker 1969). Schwerpunkt vieler bislang durchgeführter Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung waren die Beeinflussung der Schlupfinduktion und der Etablierung der Wirt-

Parasit-Beziehung. Die Besiedlung einer Pflanze mit AMP bewirkt häufig eine schlechtere Entwicklung von PPN (u.a. Sikora 1978; Cooper und Grandisons 1986; Borowicz 2001 und Jaizme-Vega *et al.* 2004). Es liegen jedoch sehr wenige Studien vor, in denen die Wirtsfindung der Tiere als Ansatzpunkt zur biologischen Bekämpfung untersucht wurde. Daher konnte bisher nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass die Mykorrhizierung einer Pflanze mit einer Verminderung ihrer Attraktivität gegenüber *M. incognita* gekoppelt ist.

4.1. Migrationsuntersuchungen mittels Olfaktometer

Eine dieser Attraktionsstudien stammt von Masadeh (2005), welche eine verminderte Attraktivität mykorrhizierter *S. lycopersicum* 'King Kong 2' auf Larven von *M. incognita* nachwies. Auch Sikora (1978) beobachtete, dass die Larven dieser Spezies mykorrhizierte Wurzelregionen mieden. Die Exsudation der Wirtspflanze wird durch Mykorrhizierung verändert (Ratanayake *et al.* 1978; Sood 2003; Toljander *et al.* 2007). Dies geht laut Masadeh (2005) mit einer Reduktion der Wirtsattraktivität einher. Um diesen Effekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher zu untersuchen, wurde zunächst anhand des in o.g. Studie verwendeten Olfaktometer-Assays evaluiert, ob diese Wirkung sortenübergreifend ist. Weiterhin sollte aufgeklärt werden, ob die verringerte Attraktivität der mykorrhizierten Pflanze auf einen gasförmigen oder flüssigen Stoff zurückzuführen ist und ob die mykorrhizierte Pflanze aufgrund eines zusätzlich gebildeten Repellents oder eines fehlenden Attractants weniger attraktiv auf *M. incognita* wirkt.

Die Besiedlung mit arbuskulärer Mykorrhiza gewährleistet eine bessere Nährstoffversorgung der Pflanze. Die daraus resultierende Förderung des Wachstums ermöglicht eine Schadenskompensation und somit eine erhöhte Widerstandsfähigkeit mykorrhizierter Pflanzen gegenüber Schaderregern (Harrier und Watson 2004). Eine solche signifikante

Wachstumsförderung trat in dieser Versuchsreihe lediglich bei zwei von vier Experimenten auf. Auch Daft und El-Giahmi (1974); Bagyaraj *et al.* (1979); Caron *et al.* (1986); Diedhiou *et al.* (2003) und Masadeh (2005) verzeichneten unter Gewächshausbedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Biomasse mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen. Als Grund dafür gelten zum einen wachstumsbegünstigende Gewächshausbedingungen, welche ein schnelles Wachstum aller Pflanzen fördern (Masadeh 2005). Zum anderen wird das Wachstum der Pflanze durch den Topf begrenzt, da das Substratvolumen ein limitierender Wachstumsfaktor für Wurzel und Spross ist (Zhu *et al.* 2003). Die Pflanzen waren in den durchgeführten Experimenten bereits sieben Wochen alt und hatten das Substrat sowohl in mykorrhiziertem als auch mykorrhizafreiem Zustand vollständig durchwachsen. Eine Erhöhung der Topfgröße ermöglicht folglich eine gesteigerte Biomasse der mykorrhizierten Pflanzen, da sich durch Aufhebung der räumlichen Beschränkung die wachstumsfördernde Wirkung der AM entfalten kann. Weiterhin ist bekannt, dass diese Förderung stark von Wirtspflanze und Mykorrhiza-Isolat abhängt (Roncadori und Hussey 1977).

AM verändert die Wurzelarchitektur: Die Anzahl der Verzweigungen erhöht sich, was eine Erhöhung der Angriffsfläche für Pathogene bedingt (Harrier und Watson 2004; Gamalero *et al.* 2004). Wurzelspitzen und Kalyptra sind besonders attraktiv für Nematoden, daher führt eine Erhöhung der Anzahl an Verzweigungen zu einer Steigerung der Attraktivität (Zhao *et al.* 2000). Mittels Wurzellängenscanner wurden Erhebungen über Wurzellänge, Verzweigungen und Anzahl der Wurzelspitzen mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen durchgeführt, welche die Aussage o.g. Autoren jedoch nicht unterstützen. Gründe dafür können in der Handhabung der Wurzelsysteme liegen, welche mit sieben Wochen über Ausmaße verfügen, welche sich schwer vermessen lassen. Überlagerungen einzelner Wurzeln sind hierbei nicht auszuschließen. Sinnvolle Erhebungen über die Wurzelarchitektur von *S. lycopersicum* sind präferentiell mit bis zu vier Wochen alten

Pflanzen durchzuführen. Diese Erhebungen waren jedoch kein zentraler Bestandteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, weshalb die zuvor etablierte Anzucht-dauer von sieben Wochen nicht verändert wurde. Auch andere Autoren konnten keine signifikanten Veränderungen der Wurzelarchitektur feststellen: So bewirkte *G. mossae* laut Vigo *et al.* (2000) ebenso keine signifikante Veränderung der Wurzelarchitektur von *S. lycopersicum* wie *G. intraradices* an Zitrus (Graham und Egel 1988). Auch Forbes *et al.* (1996) konnte keine signifikanten Veränderungen des Wurzelsystems von *Plantago lanceolata* durch *G. intraradices* verzeichnen und wies darauf hin, dass dieser Effekt isolatabhängig sei. Er schlug als Ursache vor, dass sich die Reduktion des Wachstums durch die Verlagerung des source-sink-Verhältnisses während der Symbioseetablierung und die Förderung des Wachstums durch eine verbesserte Nährstoffversorgung ausgleichen.

4.1.1. Evaluation des sortenübergreifenden Migrationseffektes

Dass phytopathogene Nematoden in der Lage sind, Wirtspflanzen zu orten, zeigten Lownsbery und Viglierchio (1961); Viglierchio (1961) und Dusenbery (1987b). Die Gradienten der von Pflanzenwurzeln abgegebenen Stoffe ermöglichen eine Orientierung im Boden (Robinson und Perry 2006). Es ist bekannt, dass diese Orientierung auf kurze Distanz erfolgreich ist (Viglierchio 1961). Einige Stoffe jedoch wirken auch über eine große Entfernung attraktiv: CO₂, das am besten untersuchte Attractant, kann von *M. incognita* auch in einer Distanz von 2 m wahrgenommen werden (Dusenbery 1987a). Zudem legte Perry (1997) dar, dass viele der durch Exsudatabgabe entstandenen Gradienten generelle, unspezifische Attractants für die Anlockung über eine größere Entfernung darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *M. incognita* mykorrhizafreie Pflanzen gegenüber mykorrhizierten präferiert. Folglich sind die Reize bestimmter Exsudatkomponenten in diesem Versuchsaufbau auch ca. 10 cm entfernt von der Wirtspflanze stark genug, um eine Reaktion der Tiere hervorzurufen. Die Wirkung von Mykorrhiza-

Isolaten ist wirtsspezifisch und isolatabhängig (Zhu *et al.* 2003; Eason *et al.* 2001). Dennoch konnte eine sortenübergreifende Reduktion der Attraktivität nachgewiesen und damit die Ergebnisse von Masadeh (2005) bestätigt und erweitert werden.: *G.e.* 36 und *G.i.* 510 bewirken eine sortenübergreifende Reduktion der Attraktivität. Da bei der Verwendung der Sorte 'KK2' nur in Gegenwart von *G.i.* 510 signifikante Attraktivitätsunterschiede auftraten, bei 'FMTT' jedoch bei Verwendung beider Mykorrhiza-Isolate, wurden die weiteren Untersuchungen an letztgenannter Sorte durchgeführt.

Rawsthorne und Brodie (1987) wiesen anhand von Versuchen mit *Globodera rostochiensis* nach, dass die Diffusate von Kartoffelpflanzen ca. 70 cm in den Boden vordringen, bevor sie völlig abgebaut und ausgedünnt sind. Diese Erhebung erfolgte allerdings über einen Zeitraum von zwei bis acht Wochen, während die Diffusionszeit in den hier durchgeführten Experimenten bis zur Applikation der J2 lediglich 72 h betrug. Es ist daher eine wichtige Erkenntnis, dass selbst in so kurzer Zeit ein Gradient gebildet wird, der eine differenzierte Orientierung der Tiere ermöglicht.

Ionen, Sauerstoff, Wasser, Enzyme, Mucilage und ein mannigfaltiges Spektrum kohlenstoffhaltiger primärer und sekundärer Metaboliten werden von der Pflanze über die Wurzel in die Rhizosphäre abgegeben (Bertin *et al.* 2003; Uren 2001). Diese Exsudatbestandteile können in zwei Substanzklassen unterteilt werden: 1. niedermolekulare Stoffe: CO₂, Sauerstoff, Ionen, Aminosäuren, organische Säuren, Zucker, Phenole und andere Sekundärmetabolite, welche für eine große Zusammensetzungsdiversität der Exsudate verantwortlich sind. 2. hochmolekulare Stoffe: Mucilage (bestehend aus Polysacchariden) und Proteine. Die Zusammensetzung dieser Gruppe ist zwar weniger divers, es werden jedoch größere Mengen der einzelnen Bestandteile abgegeben (Bais *et al.* 2006).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatte die ursächliche Substanz nach einer Diffusionszeit von 72 h einen über mehrere Zentimeter

wirkenden Gradienten aufgebaut. Dieser war stark genug, um eine signifikante und reproduzierbare Wanderung in eine Richtung zu verursachen. Daher kann angenommen werden, dass dieser Stoff niedermolekular ist. Die komplexe Struktur eines Proteins wäre zu groß, um in der kurzen Zeit 10 cm und weiter zu diffundieren und eine Wirkung auf *M. incognita* auszuüben. Niedermolekulare Stoffe, welche auf phytopathogene Nematoden attraktiv wirken können, sind organische Säuren, Aminosäuren und Zucker, während verschiedene Salze, z.B. NaCl und Ammoniumsalze eine Abstoßung der Tiere bewirken (Diez und Dusenbery 1989; Le Saux und Quénehervé 2002; Robinson und Perry 2006).

Die Diffusionsfähigkeit der Exsudate ist in diesem Fall von zentraler Bedeutung. Spiegel *et al.* (2003) teilte die Exsudatkomponenten aufgrund ihrer Diffusionsfähigkeit in drei Gruppen ein: 1. gasförmig/flüchtig (z.B. CO₂ und O₂), 2. wasserlöslich und diffusionsfähig (Salze, organische und anorganische Säuren und ihre Derivate, Kohlenhydrate, Glycoproteine) und 3. nicht-diffusionsfähige Substanzen (Detritus und Mucilage).

Aus der Gruppe der wasserlöslichen und diffusionsfähigen Substanzen wirken laut Bird (1959) und Prot (1980) Hydroxyl- und andere Ionen, sowie einige lösliche Zucker attraktiv auf PPN. Da zudem normalerweise das einzige dem Wurzelsystem zugeführte Lösungsmittel Wasser ist, kann gemäß Perry (1996) davon ausgegangen werden, dass auf die Chemorezeption wirkende Stoffe im Allgemeinen und die hier gesuchte wirksame Substanz im Speziellen wasserlöslich ist.

4.1.2. Wirkung volatiler Substanzen

Der bekannteste niedermolekulare Stoff mit einer Wirkung auf Nematoden des Edaphons ist CO₂ (z.B. Dusenbery 1987a, Pline und Dusenbery 1987, Robinson und Perry 2006). Obwohl CO₂ auf Nematoden attraktiv wirkt und Mykorrhizierung die CO₂-Abgabe noch erhöht (Dugassa und Schönbeck 1995; Grimoldi *et al.* 2006), entfernt sich ein Großteil der von Masadeh (2005) und in der vorliegenden Arbeit untersuchten J2 von den mykorrhizierten Wurzeln. Das heißt zum einen, dass die -myk-Pflanze trotz dieses wich-

tigen Signals weniger attraktiv wirkt, zum anderen stellt sich die Frage, ob in diesem Fall ein gasförmiger Stoff für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde im Folgenden evaluiert, ob die ursächliche Substanz gasförmig ist.

Die Pflanzenwurzel gibt die Gase HCO_3^- , H^+ , OH^- , CO_2 und H_2 ab (zusammengefasst von Dakora und Phillips 2002). CO_2 ist in allen nicht-immobilisierenden Konzentrationen attraktiv für *M. incognita* und kann auch noch in sehr geringen Konzentrationen wahrgenommen werden (0,03%). Daher übersteigt die CO_2 -Konzentration in Boden und Atmosphäre stets den Rezeptions-Schwellenwert (Dusenbery 1987b). Die Produktion von CO_2 ist in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln gesteigert (Dugassa und Schönbeck 1995). Überprüft man die Wirkung gasförmiger Stoffe anhand des in Abb. 3.2 dargestellten Versuchsaufbaus, zeichnet sich aus der Ausbreitung der J2 eine Tendenz zur mykorrhizierten Wurzel ab, die jedoch nicht signifikant ist. Es zeigt sich, dass der abstoßende Stoff offensichtlich nicht gasförmig ist und die mykorrhizierten Wurzeln über die Luftlücke hinweg eine leichte Attraktion ausüben. Dies steht im Einklang mit den obigen Aussagen von Pline und Dusenbery (1987), Dugassa und Schönbeck (1995) und Robinson und Perry (2006) über eine gesteigerte CO_2 -Produktion in mykorrhizierten Wurzeln und die attraktive Wirkung dieses Gases auf PPN.

4.1.3. Differenzierung von Repellent- und Attractant-Wirkung

Die Mykorrhizierung verändert und verringert die Exsudation der Pflanze (Ratanayake *et al.* 1978; Graham *et al.* 1981; Azcón-Aguilar und Barea 1996; Sood 2003; Harrier und Watson 2004). Masadeh (2005) äußerte zwei Ursachen für die die Präferenz mykorrhizafreier Pflanzen durch *M. incognita*: Entweder bewirkt die Mykorrhizierung die Abgabe eines Repellents oder sie verringert bzw. stoppt die Abgabe eines Attractants. Da Wurzelexsudate aus mehreren Komponenten zusammengesetzt sind, können sie gleichzeitig sowohl abstoßend als auch attraktiv wirken, so dass die Summe der Wirkungen den Ef-

fekt bestimmt (Castro *et al.* 1989). Suresh *et al.* (1985) beobachtete, dass *G. fasciculatum* an Tomate keinen reduzierten Befall mit *M. incognita* bewirkt. Dieser Symbiont ruft demnach keine Abstoßung der Tiere hervor. Allerdings ist die Entwicklung von *M. incognita* in der Pflanze verschlechtert. Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass die Attraktivität einer Pflanze und ihre Wirtseignung nicht gekoppelt sein müssen (Spence *et al.* 2008).

Es gibt nur wenige Veröffentlichungen über die Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen auf wurzelpathogene Nematoden (Sikora 1978; Masadeh 2005). In vielen Fällen wurde eine verminderte Penetration mykorrhizierter Pflanzen durch Wurzelgallennematoden festgestellt (u.a. Sikora 1978; Sitaramaiah und Sikora 1982; Suresh *et al.* 1985; Smith *et al.* 1986; Zhang *et al.* 2009). Die Penetrationsrate kann in Relation zur Attraktivität stehen. Da mykorrhizierte Wurzelzellen jedoch auch eine veränderte Histologie aufweisen (lignifizierte Zellwände), kann dies gleichermaßen die Ursache für eine Verminderung der Penetrationsrate sein (Morandi 1996). In der Regel wird jedoch die Gallenanzahl als Maß für die Schutzwirkung von Mykorrhizapilzen oder Rhizosphärenbakterien gegenüber Wurzelgallennematoden gewählt. Das überwiegende Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass AM die Gallenanzahl signifikant reduziert, die Tiere sich in mykorrhizierten Pflanzen also schlechter entwickeln (z.B. Kellam und Schenck 1980; Cooper und Grandisons 1986; Borowicz 2001; Elsen *et al.* 2001; Talavera *et al.* 2001 und Jaizme-Vega *et al.* 2004). Folglich ist nicht eindeutig geklärt, ob Mykorrhiza durch die Veränderung der Exsudation die Attraktivität reduziert, und/oder ob die Entwicklung der Tiere *in planta* durch z.B. induzierte Resistenz oder Konkurrenz gehemmt ist.

Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AMP *G. etunicatum* und *G. intraradices* reduzieren laut Calvet *et al.* (2001) den Befall durch *Meloidogyne* an Pfirsich. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese Schutzwirkung für Tomate und erbringen zusätzlich den Nachweis, dass die verwendeten Isolate abstoßend auf

die Wurzelgallennematoden wirken.

Die Funktionsfähigkeit des Olfaktometer-Assays bestätigt sich durch die Tatsache, dass die Tiere bei einer Wahl zwischen zwei gleichen Pflanzen, wie in Abb. 3.3 dargestellt, recht gleichmäßig verteilt sind. Es traten signifikante Migrationsunterschiede in der pflanzenfreien Kontrollvariante, obwohl dort eine Gleichverteilung der Tiere zu erwarten war. Hierbei kann es sich um einen Versuchsfehler handeln, der durch eine unterschiedliche mikrobielle Besiedlung der einzelnen Töpfe verursacht wurde. Dieser Fehlerquelle kann durch Mischung des Substrates der pflanzenfreien Varianten entgegengewirkt werden. Um die Integrität der über die Wochen etablierten Bodenstruktur zu wahren, wurde jedoch im Vorfeld auf diese Maßnahme verzichtet.

Es zeigte sich weiterhin sich eine leichte Attraktion der Tiere hin zu -myk (45:55%), während *G.e.* 36 keine signifikante Abstoßung oder Anziehung der Tiere bewirkt. Aus dieser Beobachtung bei der Gegenüberstellung von pflanzenfreien und bepflanzen Töpfen (Abb. 3.3) lässt sich ableiten, dass die Tiere zum einen zwischen Pflanze und wirtspflanzenfreiem Substrat differenzieren und dass zum anderen die Wirkung der Exsudatbestandteile der Variante *G.e.* 36 in der Summe attraktiv ist. Hierfür gibt es zwei mögliche Ursachen: 1. bei der diese Wirkung verursachenden Substanz handelt es sich um ein schwaches Repellent, welches nicht stark genug ist, um die Wirtsattraktivität der mykorrhizierten Pflanze zu nivellieren. Die Attraktivität kann durch CO₂ bedingt sein, welches bei einer Mykorrhizierung gesteigert produziert wird. 2. Der in Abb. 3.5 visualisierte Effekt ist durch ein fehlendes Attractant bedingt. Da die Wurzel zahlreiche Gradienten ausbildet, sind die noch vorhandenen Gradienten noch stark genug, um die Tiere dennoch anzuziehen (Perry 1997; Robinson und Perry 2006).

Ist die Pflanze mit *G.i.* 510 mykorrhiziert zeigt sich hingegen eine signifikante Meidung der Wirtspflanze. Das kann darauf hindeuten, dass die Exsudate tatsächlich abstoßend sind. Es lässt sich jedoch nicht eindeutig ausschließen, dass auch diese Ungleichverteilung der Tiere auf natürliche Schwankungen (siehe Kontrolle Abb. 3.7) zurückzuführen

ist. Auch bei der Gegenüberstellung von pflanzenfreien und mykorrhizierten Varianten (Abb. 3.7) zeigt sich eine Repellentwirkung von *G.i.* 510, welche jedoch schwächer ist als in vorherigen Versuchen beobachtet (siehe Abb. 3.5). Ursache dafür kann sein, dass in erstgenanntem Versuchsaufbau die Attraktivität der mykorrhizafreien Pflanze entfällt, während im zweitgenannten Setup stets sowohl Attraktion von der mykorrhizafreien Pflanze als auch verminderte Attraktion auf der mykorrhizierten Seite in Kombination wirken. Dieser Versuchsteil zeigt, dass Stärke und Ursache des Effekts der mykorrhizierten Pflanzen isolatabhängig sind: Die Mykorrhizierung mit *G.e.* 36 bewirkt offenbar das Fehlen eines Attractants, während *G.i.* 510 möglicherweise die Abgabe eines Repellents bedingt.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchskomplexes lässt sich ableiten, dass die Substanz, welche die verminderte Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen im Pair-Choice-Assay bedingt, wasserlöslich, niedermolekular und nicht gasförmig ist. Ob die im Olfaktometer-Assay beobachtete verminderte Attraktivität mykorrhizierter Pflanzen durch ein neu gebildetes Repellent oder das Fehlen eines Attractants bedingt ist, konnte nicht eindeutig festgestellt werden, die Ergebnisse weisen jedoch auf isolatspezifische Unterschiede hin.

4.1.4. Attraktionswirkung von Mykorrhiza bei Kombination mit Rhizosphärenbakterien

Auch eine Kombination von *G.i.* 510, welcher die Attraktivität der Pflanze reduziert, und ausgewählten PGPR, welche die Entwicklung von *M. incognita* im Wirt hemmen, wurde im Olfaktometer auf die Veränderung der Wirtspflanzenattraktivität untersucht. Arbuskuläre Mykorrhiza und PGPR fördern die Vitalität der Pflanze mittels unterschiedlicher Mechanismen. Durch die Kombination der unterschiedlichen Mechanismen kann unter Umständen die Effizienz der biologischen Bekämpfung gesteigert werden. Dies böte eine umweltfreundliche Alternative zur Applikation von Nematiziden (Diedhiou *et al.* 2003).

Die Mykorrhizierung von Pflanzen kann die Gesamtmenge der aeroben Bakterien der Rhizosphäre steigern, vermindern oder nicht beeinflussen (Christensen und Jakobsen 1993; Waschkies *et al.* 1994; Edwards *et al.* 1998). Zudem beeinflusst die Besiedlung der Pflanze mit AM die Zusammensetzung der Rhizosphärenpopulationen direkt oder indirekt durch die Veränderung der Wurzelexsudation oder die Abgabe pilzlicher Exsudate. Dies führt zur Wachstumsförderung einiger Populationen und der Hemmung Anderer (Christensen und Jakobsen 1993). Die Bakterien der Rhizosphäre können umgekehrt die Mykorrhizierung der Pflanze fördern (Vosátka und Gryndler 1999). Dieser Sachverhalt wird als „Mycorrhizosphere effect“ bezeichnet (Linderman 1988). Die Analyse der cfu und Mykorrhizierungsfrequenz der inokulierten Bakterienstämme und AMP-Isolate weist nicht auf eine gegenseitige Förderung oder Hemmung hin. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Masadeh (2005), die mit den gleichen Isolaten arbeitete.

Die beiden in diesem Olfaktometer-Assay verwendeten Bakterienstämme wurden von der Oberfläche von AMP-Sporen isoliert und unterdrücken laut Reimann und Sikora (2003) die Infektion von *S. lycopersicum* mit *M. incognita*. Bakterien der Gattung *Acinetobacter* sind gram-negativ und strikt aerob. *A. baumannii* tritt in Boden und Wasser auf, gilt jedoch auch als Humanpathogen (Smith *et al.* 2007). Vertreter der Gattung *Cellulomonas* sind gram-positiv und aerob bzw. fakultativ anaerob. *C. turbata* (Basionym: *Oerskovia turbata*) gilt als Bodenbewohner und Humanpathogen, welches bakterielle Endocarditis verursacht (Reller *et al.* 1975).

Folgende Wirkungsmechanismen pflanzenwachstumsfördernder Bakterien können Ursache für die Schutzfunktion der ausgewählten Bakterienstämme sein:

1. Direkter Antagonismus: Verschiedene Stämme hemmen die Bodenpopulation von Wurzelgallennematoden (u.a. Oostendorp und Sikora 1990; Aalten *et al.* 1998; Siddiqui *et al.* 2007). Ein solcher Wirkmechanismus ist von *A. baumannii* und *C. tur-*

bata nicht bekannt bzw. untersucht. Im Pair-Choice-Assay entfalten sie keine starke repellative Wirkung. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein direkter Antagonismus ausgeschlossen werden.

2. Förderung der Mykorrhizierung: einige Bakterienstämme stimulieren die Mykorrhizierung (von Alten *et al.* 1993; Garbaye 1994; Gryndler und Vosátka 1996; Vosátka und Gryndler 1999). So steigerte *Bacillus mycooides* die Mykorrhizierung verschiedener Wirtspflanzen durch *G. intraradices*. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen keine Beeinflussung der Mykorrhizierung mit *G.i.* 510 bzw. der Populationsentwicklung beider Stämme. Folglich können die verwendeten Isolate nicht als mykorrhizierungsfördernd eingestuft werden.
3. Resistenzinduktion (van Loon *et al.* 1998): Da keine starke Abstoßung der Tiere auftrat, die Infektion mit *M. incognita* durch *A. baumannii* und *C. turbata* laut Reimann und Sikora (2003) jedoch unterdrückt wurde, kann gefolgert werden, dass es sich bei dem hier zugrunde liegende Mechanismus möglicherweise um die Induktion von Resistenz handelt.

Als Maß für Schutzwirkung biologischer Pflanzenschutzmittel gegenüber Wurzelgallenematoden hat sich der Gallindex und damit die Erfassung der Entwicklung der Tiere in der Wirtspflanze etabliert (Kellam und Schenck 1980; Habte *et al.* 1999; Calvet *et al.* 2001; Diedhiou *et al.* 2003; Jaizme-Vega *et al.* 2004). Über die Abstoßung von Nematoden durch Bakterien und/oder Mykorrhiza *in vivo* ist hingegen wenig bekannt. Da solche Effekte nicht auszuschließen sind und ein Eingriff im präinfektionellen Stadium wünschenswert ist, um eine Verletzung und damit Beeinträchtigung der Pflanze durch Sekundärinfektionen zu verhindern, besteht in diesem Forschungsbereich dringender Handlungsbedarf. Eine der wenigen Veröffentlichungen, die sich auf eine Abstoßung von Nematoden durch PGPR beziehen, stammt von Aalten *et al.* (1998). Diese registrierten *in vitro* eine Abstoßung von Wurzelgallenematoden durch *Pseudomonas*-Stämme, welche auch die Gallbil-

dung *in vivo* reduzieren (Siddiqui und Mahmood 2001).

Im Gegensatz zu Reimann und Sikora (2003) konnte Masadeh (2005) keine Infektionsminderung durch Einzelinokulation der Bakterien verzeichnen. Die applizierten Stämme bewirkten laut ihrer Studie in Einzelinokulation zwar keine Befallsreduktion, verstärkten bei Dualinokulation mit *G.i.* 510 jedoch die Wirkung der Mykorrhiza. In Kombination mit den o.g. Studien zeigen die hier erzielten Ergebnisse, dass die Befallsreduktion bei einer kombinierten Inokulation der verwendeten PGPR- und AM-Isolate auf einer Verstärkung der induzierten Resistenz, nicht jedoch einer verstärkten Abstoßung der Nematoden durch *G.i.* 510 beruhen kann. In Einzelinokulation bewirkte *A. baumannii* ebenfalls keine Abstoßung von *M. incognita*. Die repellative Wirkung von *C. turbata* bedarf aufgrund des hohen Standardfehlers weiterer Untersuchungen, bevor verbindliche Aussagen getroffen werden können. Mit *A. baumannii* inokulierte Varianten wirkten im Gegenteil signifikant attraktiv auf die Tiere, was sich jedoch bei einer Kombination mit *G.i.* 510 umkehrte. Da die Population von *A. baumannii* von *G. etunicatum* nicht beeinflusst wurde, kann diese veränderte Attraktivität nicht auf eine Änderung der Populationsdichte und eine daraus resultierende Änderung der Menge an Metaboliten dieser Stämme zurückgeführt werden.

Wie unter 4.3.2 weiter ausgeführt, sind Wurzelexsudate wichtige C-Quellen für die Rhizosphärenorganismen und einzelne Exsudat-Komponenten werden vermutlich schnell degradiert (Green 1971). Die Diffusate von mit *C. turbata* inokulierten Pflanzen wirken *in vivo* abstoßend auf *M. incognita*, während die der Variante *A. baumannii* eine Attraktion der Tiere bewirken. Das legt nahe, dass die beiden Bakterienstämme zum einen möglicherweise unterschiedliche C-Quellen als Substrat nutzen und zum anderen die Metaboliten dieser Bakterien-Isolate die Anlockung der Tiere beeinflussen. Die Zusammensetzung der Wurzelexsudate wird durch Mykorrhizierung verändert (Tab. 4.2, Sood 2003): es werden weniger reduzierende Zucker abgegeben und der Gehalt von Lysin, Prolin, Threonin sinkt auf Null (Graham *et al.* 1981; Sood 2003). Laut Stanier *et al.* (1966) kann *A. baumannii*

ein breites Spektrum an Substanzen metabolisieren. In Verbindung mit der Beobachtung, dass die Mykorrhizierung die Populationsdichte nicht negativ beeinflusst, bedeutet der Attraktivitätsverlust in Kombination mit *G.i.* 510 Folgendes: Durch die Mykorrhizierung entfällt eine C-Quelle, deren Spaltprodukte auf *M. incognita* attraktiv wirken. *A. baumannii* ist zudem in der Lage, den Mangel über eine andere Kohlenstoffquelle im Exsudat auszugleichen. Im Hinblick auf die Ergebnisse der UPLC kommen die Substanzen Nr. 4 (MM = 226,16) und Nr. 5 (MM = 451,18) hierfür in Frage, da sie nur in den Exsudaten mykorrhizafreier *S. lycopersicum* vorhanden sind. Um zu konkretisieren, welche C-Quelle dem Bakterium als Nahrung dient, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass *C. turbata* und *A. baumannii* sowohl in Einzel- als auch Dualinokulation mit *G. intraradices* auf lange Distanz keine stark abstoßende Wirkung entfalten. Der abstoßende Effekt von *G. intraradices* wird durch die duale Inokulation nicht verstärkt. Obwohl die Parasiten nicht prä-infektionell abgestoßen werden, ist eine kombinierte Inokulation dennoch sinnvoll, da die Hemmung der Entwicklung von *M. incognita* in der mykorrhizierten Wirtspflanze durch Inokulation mit *A. baumannii* bzw. *C. turbata* noch verstärkt wird (Reimann und Sikora 2003; Masadeh 2005).

4.2. Biochemische Analyse von Exsudatbestandteilen mittels UPLC

Im Olfaktometer-Assay zeigte sich eine verminderte Attraktivität von mit *G. etunicatum* 36 und *G. intraradices* 510 mykorrhizierten Tomatenpflanzen gegenüber *M. incognita*. Um die Ursache für diesen Effekt weitergehend zu charakterisieren, wurden die Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier mittels UPLC untersucht. Zwar erlauben auch die Ergebnisse der UPLC keine eindeutigen Rückschlüsse darauf, ob der symbiosebedingte Effekt generell durch ein neu gebildetes Repellent oder ein fehlendes Attractant ausgelöst wird, es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Exsudatzusammen-

setzung der einzelnen Varianten: Mykorrhizafreie Pflanzen sondern Stoffe ab, welche von mykorrhizierten nicht abgegeben werden und umgekehrt. Zudem gibt es Substanzen, welche zwar von allen drei Varianten abgegeben werden, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Die via UPLC detektierten Substanzen werden im Folgenden mit ihrer auf S. 76 angegebenen Kenn-Nummer und Molekularmasse (MM) bezeichnet. Wird der Effekt durch ein in mykorrhizierten Pflanzen fehlendes Attractant ausgelöst, können die Substanzen Nr. 4 (MM = 226,16) und/oder Nr. 5 (MM = 452,28) die Ursache sein. Wenn ein bei Mykorrhizierung produziertes Repellent dafür verantwortlich ist, kann die Substanz Nr. 6 (MM = 281,24) den Effekt bedingen. Auch der Stoff Nr. 3 (MM = 238,13) ist von Interesse: er tritt in allen Varianten auf, jedoch bei mykorrhizafreien Pflanzen in deutlich geringerer Menge. Ob diese Substanz abstoßend oder anziehend wirkt, wird in Verbindung mit den Biotest-Ergebnissen diskutiert.

Alle gemessenen Stoffe weisen eine relativ geringe Molekülgröße auf. Bislang detektierte Attractants verfügen über eine weitaus höhere Masse: die größte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfasste Substanz hat eine molekulare Masse von ca. 452, während Moltmann (1990) in Getreide-Exsudaten ein *Heterodera schachtii*-Kairomon mit 500-5000 kDa detektierte. Spiegel *et al.* (2003) wies in Zwiebel-Exsudat ein Kairomon von mehr als 700 kDa Größe nach. Es liegen kaum Kenntnisse über die Wirkung einzelner Exsudatkomponenten auf PPN vor. Bekannt ist lediglich, dass zahlreiche Gradienten (Aminosäuren, Ionen, pH, Zucker) um die Wurzel herum existieren und eine unspezifische Anlockung der Tiere bedingen. Perry (1997) und Robinson und Perry (2006) stellten fest, dass die Natur der Attractants jedoch weitestgehend unbekannt ist, zusammenfassend finden sich in der Literatur folgende Informationen über Nematoden-attraktive Faktoren:

- Kalyptrazellen, die auf kurze Distanz wirken (Zhao *et al.* 2000),
- Peptide (Moltmann 1990),
- eine Substanz mit der Masse von > 700 kDa (Spiegel *et al.* 2003),

- eine Fructose-ähnliche Substanz (Rühm *et al.* 2003),
- Saccharose für *M. naasi* (Balhadere und Evans 1994) und
- CO₂ (Pline und Dusenbery 1987).

Attraktiv auf *Meloidogyne* spp. wirken Glutaminsäure, Gibberellinsäure und reduzierende Stoffe, wie Natriumdithionit, Cystein und Ascorbinsäure (Bird 1959).

Tab. 4.1.: Von Pflanzenwurzeln freigesetzte organische Substanzen und zugehörige Molekularmassen (Rovira 1969; Krafczyk *et al.* 1984; Curl und Truelove 1986; Einhellig und Souza 1992; Basu *et al.* 1994; Fan *et al.* 1997; Uren 2001; Rühm *et al.* 2003). Molmassen wurden über PubChem ermittelt (Bolton *et al.* 2008).

Zucker und Polysaccharide: Arabinose (150,1), Fruktose (180,2), Galaktose (180,2), Glucose (180,2), Maltose (342,4), Mannose (180,2), Mucilage unterschiedlicher Zusammensetzungen, Oligosaccharide, Raffinose (504,4), Rhamnose (164,2), Ribose (150,1), Saccharose (342,3) und Xylose (150,1)

Aminosäuren: α-Alanin (89,1), β-Alanin (89,1), γ-Aminobuttersäure (103,1), Arginin (174,2), Asparagin (132,1), Asparaginsäure (133,1), Citrullin (175,19), Cystathionin (222,3), Cystein (121,2), Cystin (240,3), Deoxymugininsäure (304,3), 3-Epihydroxymugininsäure (336,3), Glutamin (146,2), Glutaminsäure (147,1), Glycin (75,1), Homoserin (119,1), Isoleucin (131,2), Leucin (131,2), Lysin (146,2), Methionin (149,2), Mugininsäure (320,3), Ornithin (132,2), Phenylalanin (165,2), Prolin (115,1), Serin (105,1), Threonin (119,1), Tryptophan (204,2), Tyrosin (181,2) und Valin (117,2)

Organische Säuren Aconit- (174,1), Äpfel- (134,1), Ascorbin- (176,1), Benzoe- (122,1), Butter- (88,1), p-Cumar- (164,2), Essig- (60,1), Kaffee- (180,2), Ferula- (194,2), Fumar- (116,1), Glutar- (132,1), Glycol- (76,1), Glyoxyl- (74,0), p-Hydroxybenzoe- (138,1), Malon- (104,6), Oxalessig- (132,1), Oxal- (90,0), Pentan- (102,1), Propan- (74,1), Succinyl- (118,1), Syringa- (198,2), Vanillin- (168,2), Wein- (150,1) und Zitronensäure (192,1)

Fettsäuren: Linol- (280,5), Linolen- (278,4), Palmitin- (256,4) und Stearinsäure (284,5)

Sterole: Campesterol (400,7), Cholesterol (386,7), Sitosterol (414,7) und Stigmasterol (412,7)

Wachstumsfaktoren: p-Aminobenzoesäure (137,1), Biotin (244,1), Cholin (104,2), N-Methyl-Nikotinsäure (137,1), Niacin (123,1), Pantothersäure (219,2), Pyroxidin (169,2), Riboflavin (376,4) und Thiamin (265,4)

Enzyme: Amylase, Invertase, Peroxidase, Phenolase, Phosphatasen, Polygalacturonase und Protease

Flavone und Nucleotide: Adenin (135,1), Cytidin (243,2), Flavanon (224,3), Guanin (151,1) und Uridin (224,2)

Sonstige: Auxin (175,2), Scopoletin (192,2), Blausäure (27,0), Glucoside, nicht identifizierte Ninhydrin-positive Substanzen, nicht identifizierte lösliche Proteine, reduzierende Substanzen, Ethanol (46,1), Polypeptide, Dihydrochinon (110,1) und Sorgoleon (357,5)

Die Literatur über die Exsudatzusammensetzung mykorrhizierter Pflanzen ist recht dürftig. In Tab. 4.1 findet sich eine umfassende Zusammenfassung der Exsudat-Zusammensetzung mykorrhizafreier Pflanzen. Ein quantitativer Vergleich der Exsudate mykorrhizi-

Tab. 4.2.: Gehalt an Aminosäuren, Zucker und organischen Säuren in den Exsudaten mykorrhizafreier und mit *G. fasciculatum* mykorrhizierter Tomatenpflanzen (Sood 2003).

Aminosäuren	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]		Zucker	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	
	+Myk	-Myk		+Myk	-Myk
Alanin	2,6	1	Fructose	16,9	10,7
Arginin	4,1	2,5	Glucose	53,7	42,8
Asparaginsäure	10,5	3,9	Saccharose	11	15,2
Cystein	3,8	0,2			
Glutaminsäure	6,8	0,7	Summe	81,6	68,7
Glycin	3,6	2,4			
Histidin	2,2	1,8			
Isoleucin	1,3	0,5			
Leucin	2	0,3			
Lysin	0	1,8	Org. Säuren	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	
Phenylalanin	1	1,2	Zitronensäure	+Myk	-Myk
Prolin	0	2,8	Fumarsäure	3,8	1
Serin	0	0,8	Äpfelsäure	2,5	2
Threonin	0	0,8	Bernsteinsäure	4,2	1,5
				2,9	1,2
Summe	37,9	20,7	Summe	13,4	5,7

zierter und mykorrhizafreier Tomaten findet sich bei Sood (2003) und ist in Tab. 4.2 wiedergegeben. Im Gegensatz zu den meisten Autoren wies Sood (2003) eine Erhöhung der Exsudation durch Mykorrhizapilze nach, dennoch ist dies die einzige vorliegende aktuelle Veröffentlichung, in der mehrere Substanzen im quantitativen Vergleich analysiert wurden.

Die Molmasse keiner der in den Tabellen 4.1 und 4.2 angegebenen Substanzen passt zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierten und vergleichend aufgeführten Stoffe (Tab. 3.24). Ein Grund dafür ist, dass die durchgeführte UPLC nur Moleküle mit einer $MM \geq 100$ registrierte, viele der von Sood (2003) aufgeführten Stoffe jedoch eine kleinere Molmasse als 100 aufweisen und damit unterhalb der UPLC-Detektionsgrenze lagen. Weiterhin ließen sich im gegebenen zeitlichen Rahmen nur Molekülmasse und Summenformeln der Substanzen ermitteln. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um spaltbare Verbindungen oder Bruchstücke größerer Moleküle handelt, die in die genannten Zucker und Säuren zerfallen können. Für genauere Aussagen bedarf es

einer differenzierteren Untersuchung der Exsudate.

4.3. Migrationsuntersuchungen mittels Sand-Block

Ein Großteil der Studien zum Attraktionsverhalten wurzelpathogener Nematoden wurde mittels *in vitro*-Assays durchgeführt (z.B. Dusenbery 1987a; Castro *et al.* 1989; Diez und Dusenbery 1989; Rühm *et al.* 2003; Wuyts *et al.* 2006). Häufig wurden einzelne Substanzen und Exsudatfraktionen auf ihre Wirkung hin getestet. Um die ursächliche Substanz näher zu charakterisieren, bedarf es eines Setups, welches das kontrollierte Einbringen von Substanzen ermöglicht. Der Versuchsaufbau verschiedener Biotests wurde übernommen, die Funktionalität für die gegebene Fragestellung überprüft und den spezifischen Gegebenheiten angepasst.

Der Sand-Block bietet den J2 ein Medium, in dem sie sich naturgemäß fortbewegen können. Die Kontraktion der Längsmuskulatur bedingt eine schlängelnde dorsoventrale Fortbewegung, welche erleichtert und beschleunigt wird, indem sich die Tiere von den Sedimentpartikeln abstoßen (Robinson und Perry 2006). Dieses Setup wurde gewählt, da die vorangegangenen Versuche (Kapitel 3.1) zeigten, dass eine Orientierung und Fortbewegung der Tiere in Sand möglich ist.

4.3.1. Verifizierung der Funktionalität des Setups

Das Setup ist angelehnt an Viglierchio (1961), Seid (1999) und Sikora und Schuster (2000). Die Funktionalität des Versuchsaufbaus konnte analog zu Lownsbery und Viglierchio (1961) und Viglierchio (1961) mittels Tomatenkeimlingen bestätigt werden. Es wurde also offenbar ein Gradient attraktiver Stoffe gebildet, der die Migration zur Wirtspflanze hin bedingte. Aufgrund seiner Konzeption eignet sich der Sand-Block-Assay primär für die Arbeit mit Sämlingen sowie zur Untersuchung der Interaktion mit Rhizosphä-

renbakterien und Perkolaten (Viglierchio 1961; Oostendorp und Sikora 1990; Seid 1999; Dababat und Sikora 2007). Im Sand-Block war jedoch eine Reproduktion des im Olfaktometer nachgewiesenen Effektes mithilfe von Perkolaten nicht möglich: Während die Mykorrhizierung *in vivo* eine Abstoßung verursachte, waren die entsprechenden Perkolate im Sand-Block-Assay attraktiv.

4.3.2. Wirkung von Diffusaten und Exsudaten im Sand-Block

Bei der Verwendung des Substrates mykorrhizafreier und mykorrhizierter Pflanzen im Sand-Block Assay wirkte das Substrat mykorrhizierter Pflanzen eher attraktiv auf *M. incognita*. Es stellt sich die Frage, warum diese *in vivo* abstoßenden Proben *in vitro* eine Attraktion bedingen.

Unterschiede im Exsudatgradienten können die Ursache für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in Olfaktometer und Sand Block sein: Naturbedingt ist die Konzentration von Exsudaten direkt an der Wurzel höher als im umgebenden Substrat und damit auch im Sand des Olfaktometers (Kuzyakov *et al.* 2003). Das Substrat für den Sand-Block-Assay stammte aus unmittelbarer Wurzelnähe. Dort ist die Menge attraktiver Stoffe aufgrund des natürlichen Konzentrationsgefälles entweder genauso hoch oder höher als im Sand des Olfaktometers. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels UPLC analysierten Substanzen entstammen ebenfalls der unmittelbaren Wurzelnähe und ihre Konzentration ist in den mykorrhizierten Varianten deutlich höher, als in den mykorrhizafreien. Bezieht man die Ergebnisse dieser UPLC in die Analyse der möglichen Stoffe ein, folgt daraus, dass die Substanz Nr. 3 (MM = 238,13) diese Attraktion verursacht haben kann.

Sand aus einem Olfaktometer-Teilstück war im Sand-Block-Assay indifferent. Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass für eine Abstoßung ein Gradient notwendig ist, welcher zwar prinzipiell *in vivo*, nicht aber in diesem *in vitro*-Versuch vorhanden war:

Green (1971) konstatierte, dass die meisten organischen Substanzen in wässriger Lösung vermutlich schnell von Mikroorganismen degradiert bzw. durch Adsorption oder Adsorption inaktiviert werden. Daraus folgt, dass der für die Orientierung erforderliche Gradient nur aufrecht erhalten werden kann, wenn die Sekretion andauert (Kühn 1959). Wurden, in Simulation der ständigen Sekretion, Exsudate aus direkter Wurzelnähe der teil-hydroponischen Kultur entnommen und sofort appliziert, waren die +myk-Varianten im ersten Durchlauf attraktiv, im zweiten indifferent. Auch dieses Ergebnis spricht für eine höhere Konzentration attraktiver Stoffe in Wurzelnähe. Zudem bedingt die regelmäßige Applikation dieser Testsubstanzen einen Flüssigkeitsstrom, in welchem die Tiere passiv abdriften. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich die natürliche Exsudatwirkung nicht voll entfaltet. Es zeigt sich, dass der Sand-Block Assay keine geeignete Etablierung eines Exsudatgradienten gewährleistet. Er eignet sich somit nicht für die *in vitro*-Reproduktion der *in vivo* beobachteten Attraktionsminderung mykorrhizierter Pflanzen.

Laut Green (1971) wird ein Großteil der von der Wurzel abgegebenen Exsudate rasch von Rhizosphärenorganismen metabolisiert oder durch Adsorption inaktiviert. Geht man davon aus, dass die unterschiedlichen Migrationsergebnisse *in vivo* und *in vitro* auf diesen Sachverhalt zurückzuführen sind, stellt sich die Frage, welche Substanzen präferentiell von Rhizosphärenorganismen metabolisiert werden und daher für die widersprüchlichen Ergebnisse der Versuche *in vivo* und *in vitro* in Frage kommen. Eine wichtige Kohlenstoffquelle für Rhizosphärenorganismen sind organische Säuren und wasserlösliche Aminosäuren (de Weert *et al.* 2002; Kamilova *et al.* 2006). Zucker und organische Säuren sind zudem Signalmoleküle und somit ebenso Substrat für Rhizosphärenbakterien. Als Signalmoleküle gelten: Fructose, Glucose und Saccharose, L-Malat, Citrat und Oxalsäure (Grayston *et al.* 1997). Laut Kamilova *et al.* (2006) ist Zitronensäure die wichtigste C-Quelle für *Pseudomonas fluorescens*, hinzu kommen Fumarsäure und Bernsteinsäure.

Auch die Aminosäuren L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, L-Isoleucin, L-Leucin und Tryptophan werden metabolisiert (de Weert *et al.* 2002; Kamilova *et al.* 2006). Keine der per UPLC gemessenen Molmassen stimmt mit denen der aufgeführten Stoffe überein und erlaubt eine weitere Determination potentieller Attractants bzw. Repellents.

Der Sand-Block Assay bot ein natürliches Migrationsumfeld, erforderte jedoch einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand bezüglich der Auswertung. Dies führte zu einer geringen Fallzahl und einer suboptimalen Reproduzierbarkeit. Zudem konnten die *in vivo* erbrachten Ergebnisse nicht reproduziert werden. Um mehr Aspekte der Exsudate zu evaluieren wurde daher ein Migrationsassay auf Agar gewählt.

4.4. Migrationsuntersuchungen auf Agar

Die Migrationsunterschiede im durchgeführten Olfaktometer-Assay bewegten sich maximal im Verhältnis von 60:40%. Folglich wurde eine Verstärkung des Effekts angestrebt, der durch Aufkonzentration der Perkolate erreicht werden sollte. Die Migrationsunterschiede im Olfaktometer-Assay von Dababat und Sikora (2007) waren mit 80:20% deutlicher: Mit nicht-pathogenem *Fusarium oxysporum* inokulierte Pflanzen wirkten stark repellativ auf *M. incognita*. Ein ähnlich starker Abstoßungseffekt mykorrhizierter Pflanzen ist nicht bekannt, es gibt jedoch Exsudatfraktionen mykorrhizafreier Pflanzen, die Repellentfunktion haben (Diez und Dusenbery 1989; Spiegel *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2000).

4.4.1. Attraktionswirkung von Perkolaten

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Assays entwickelt, um das Attraktionsverhalten von Nematoden auf Agar zu untersuchen (u.a. Bilgrami *et al.* 1985; Castro *et al.* 1989; Diez und Dusenbery 1989; Moltmann 1990; Rühm 2000; Wuyts *et al.* 2006). Es wur-

de zunächst das einfache Setup von Bilgrami *et al.* (1985) gewählt (Abb. 3.13), um die Wirkung der Exsudate zu untersuchen. Jedoch konnte der *in vivo* beobachtete Effekt zunächst auch mit diesem Setup mit verschiedenen Applikations- und Behandlungsvarianten nicht reproduziert werden. Signifikante Unterschiede waren nur in wenigen Fällen reproduzierbar und meist waren die Perkolate der mykorrhizierten Varianten, analog zum Sand-Block-Assay, attraktiver als die mykorrhizafreie.

Bei der Betrachtung der Nematoden auf Agar fällt auf, dass die Tiere entgegen ihrer natürlichen Fortbewegung seitlich auf dem Medium liegen. Robinson und Perry (2006) weisen darauf hin, dass aufgrund dieser unnatürlichen Lage der Tiere eine Orientierung auf Agar nicht zwangsläufig gegeben sein muss.

Es gibt zwei Typen von Orientierungsreaktionen bei Nematoden, welche kontrovers diskutiert werden: Kinesen und Taxien. Als Kinese wird die ungerichtete Bewegung in Richtung Nahrungsquelle bezeichnet, als Taxis eine gerichtete Orientierung. Die Reaktion von Nematoden in einem chemischen Gradienten wird als Taxis klassifiziert (Dusenbery 1983). Hierbei wird weiterhin zwischen Klinotaxis und Tropotaxis differenziert. Bei einer Klinotaxis wird die Intensität des Reizes in aufeinanderfolgenden Zeitintervallen durch Wendungen der vorderen Körperteile verglichen, während der Nematode bei einer Tropotaxis im Reizfeld reagiert und ein Erregungsgleichgewicht zwischen symmetrisch liegenden Rezeptoren beider Körperseiten herstellt (zusammengefasst von Rühm 2000). Bewegen sich die Nematoden auf dem Agar, befinden sie sich in der Seitenlage und beide für die Chemorezeption verantwortlichen Amphiden sind vertikal orientiert. Tab. 3.18 zeigt jedoch, dass die Tiere in der Lage sind, sich am Salzgradienten zu orientieren und die Bereiche hoher Konzentration zu meiden. Es liegt also keine Tropotaxis, sondern eine Klinotaxis vor. Auch Rühm (2000) gelangte aufgrund der Ergebnisse seines Agar-Bioassays zu diesem Schluss. Bargmann und Horvitz (1991) töteten die chemosensorischen Sensillen in einer der beiden Amphiden von *Caenorhabditis elegans* ab. Da er trotzdem in der Lage

war, sich zu orientieren, bewiesen sie so, dass Nematoden sich auf Agar mittels Klinotaxis orientieren können.

Die Funktionsweise der Klinotaxis kann mit dem sogenannten „Pirouette-model“ von Pierce-Shimomura *et al.* (1999) erklärt werden. Hierbei nutzen die Tiere ihr Kurzzeitgedächtnis der Attractant-Konzentration, um zu entscheiden, ob die momentane Richtung beibehalten oder wahllos geändert werden soll. Es zeigte sich, dass *C. elegans* nicht auf den absoluten Level des Attractants reagiert, sondern auf die Konzentrationsänderung über die Zeit. Bewegt sich das Tier entlang eines steigenden Gradienten, ändert es seltener die Richtung als entlang eines fallenden Attractant-Gradienten. Die Variation der Richtungsänderungen resultiert in langen Migrationsphasen in die richtige und kurzen in die falsche Richtung und folglich in der Summe zu einer zielgerichteten Bewegung (Pierce-Shimomura *et al.* 1999). Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten wurde ein Migrationszeitraum von 5 h gewählt und später auf 24 h ausgeweitet.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Orientierung der J2 in den verwendeten Setups auf Agar grundsätzlich möglich ist. Im Hinblick auf diese Tatsache kann die Ursache für die Ergebnis-Diskrepanz zwischen *in vivo* und *in vitro*-Versuchen in der Methodik der Exsudatgewinnung liegen. Der Vorteil der Perkolation ist ihr non-invasiver Charakter. Substanzgradienten werden jedoch völlig zerstört und müssten im Sand-Block neu etabliert werden. Zudem sind die gewonnenen Perkolate bzw. Exsudate in den Testmaterialien des Sand-Block-Assays nicht steril und die mit den Perkolaten ausgespülten Mikroorganismen nutzen die Exsudate weiterhin als C-Quelle. Es können demnach folgende Ereignisse eintreten:

1. Der Aufbau des natürlichen Gradienten findet *in vitro* nicht statt. Die Substanzen diffundieren je nach Größe unterschiedlich schnell in den Sand bzw. Agar mit den applizierten J2. Es bedarf allerdings einer lebenden Pflanze, um das zur Orientierung notwendige Konzentrationsgefälle aufrecht zu erhalten (Kühn 1959; Perry

- 1997).
2. Da die Attraktion durch die Attraktivität ihrer Einzelkomponenten bedingt ist, überwiegen in der unmittelbaren Nähe der mykorrhizierten Wurzeln möglicherweise die attraktiven Stoffe (Castro *et al.* 1989). Ein abstoßender Stoff wäre folglich niedermolekular und in der Lage schnell zu diffundieren, während die attraktiven Stoffe ein höheres Molekulargewicht aufweisen. Unter der Annahme, dass die ursächliche Substanz in der UPLC-Analyse erfasst ist, würde es sich bei der abstoßenden Substanz um Nr. 3 (MM = 238,13) und der attraktiven um Nr. 6 (MM = 280,24) handeln.
 3. Bis zur Sterilfiltration des Perkolates finden weiterhin Abbauprozesse statt. So kann die Substanz, welche die Attraktivität mykorrhizafreier bzw. den abstoßenden Charakter mykorrhizierter Pflanzen bedingt, bis zum Wirkungstest bereits zerfallen oder abgebaut sein.

4.4.2. Modifikation von Setup, Exsudatgewinnung und Evaluationsmethode

Appliziert man eine Substanz auf Agar, so diffundiert sie in alle Richtungen (Green 1971). Der auf Agar gebildete Gradient ist gegenüber dem in Sand gebildeten steiler und damit auch ohne kontinuierliche Exsudatproduktion wirkungsvoller, wird jedoch mit steigender Diffusionsfläche schwächer (Green 1971). Um die Sensitivität des Biotests auf Agar zu erhöhen, wurde der Versuchsaufbau daher modifiziert und an das Setup von Castro *et al.* (1989) angelehnt. Die Auswertungsmethodik wurde der Veröffentlichung von Diez und Dusenbery (1989) entlehnt und führte zu einer deutlichen Erhöhung der Fallzahl. Diese Modifikation erwies sich als sinnvoll und ermöglichte eine deutliche Sensitivitätssteigerung des Assays, wie ein Vergleich der Tabellen 3.18 und 3.19 belegt.

In *in vitro*-Assays wurden im Laufe der Jahre diverse Substanzen unabhängig von ihrem

Vorkommen in Exsudaten auf ihre Wirkung hin getestet (Riddle und Bird 1985; Castro *et al.* 1990; Le Saux und Quénéhervé 2002). Hierbei zeigte *M. incognita* Abstoßungsreaktionen gegenüber KCl, KNO₃, NaCl, NaNO₃ und insbesondere NH₄NO₃ (Le Saux und Quénéhervé 2002). Castro *et al.* (1989) verzeichnete zudem eine stark abstoßende Wirkung der Ionen K⁺, NH₄⁺, Cs⁺, NO₃⁻ und Cl⁻ auf *M. incognita*.

Die Beobachtungen von Diez und Dusenbery (1989) über eine stark abstoßende Wirkung von NaCl konnten bestätigt werden. Zudem meiden die Tiere hohe Konzentrationen von Substanzen aufgrund des osmotischen Drucks. Culotti und Russell (1978) wiesen nach, dass *C. elegans* sich in einigen Salzen und Zuckern entlang eines osmotischen Gradienten bewegt und hohe Konzentrationen meidet, jedoch ein Attraktionsverhalten gegenüber niedrigen NaCl-Konzentrationen zeigt. Die J2 im durchgeführten Biotest verhielten sich analog. Während Rühm (2000) im Biotest eine Attraktion von *Heterodera schachtii* gegenüber Glucose beobachtete, zeigte *M. incognita* keine Orientierung zu dem Zucker. Die Indifferenz gegenüber Ribose war jedoch bei beiden Arten analog.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Sand-Block-Assays bewirken konstant applizierte Exsudate auf 1 cm-Agarstreifen eine leichte Abstoßungsreaktion. Grund dafür ist das Medium, auf welches appliziert wurde: Während es in Sand durch die Applikation zu einem regelrechten Substanzfluss kommt, diffundieren die Substanzen in Agar gleichmäßiger und langsamer. Die Exsudate wurden zwar aus unmittelbarer Wurzelnähe entnommen, hochmolekulare Substanzen diffundieren jedoch in Agar deutlich langsamer als in Sand. Dies führte auf der kleinen Fläche der Testarena zu einem natürlicheren Gradienten als im Sandblock. Die regelmäßige Applikation ermöglichte folglich auf Agar die Etablierung eines Gradienten, während sie ihn in Sand eher zerstörte.

4.5. Abschließende Bewertung der durchgeführten Pair-Choice-Assays

Es liegen nur wenige Veröffentlichungen über die Untersuchung der Pflanzenattraktivität auf PPN mittels Olfaktometer vor (Tam 2005; Masadeh 2005; Dababat und Sikora 2007). Dieser Versuchsaufbau bietet eine elegante, nicht-invasive Möglichkeit zur Untersuchung der Attraktivität großer Wurzelsysteme *in vivo* im Pair-Choice-Assay. In der Regel wird ein anderer Ansatzpunkt als die Wirtsfindung zur Eignungsbewertung eines biologischen Pflanzenschutzmittels gewählt: die Reduktion der Eindringungs- oder Gallenzahl gilt als Maß für die Entwicklung der Tiere in Gegenwart des Antagonisten (u.a. Sikora 1978; Kellam und Schenck 1980; Calvet *et al.* 2001; Jaizme-Vega *et al.* 2004). Das gewählte System erwies sich als sehr zuverlässig, die Reproduktion der Ergebnisse war stets möglich. Dennoch gestaltete sich die Auswertung der Ergebnisse sehr arbeits- und zeitintensiv. Das Auszählen der Proben eines Versuches nahm selbst bei der geringen Fallzahl von sieben Versuchseinheiten pro Variante acht bis zwölf Wochen in Anspruch. Arbeitsaufwand und Varianzquellen konnten durch Vereinfachung der Rückgewinnungsmethode nach Sikora und Schuster (2000) deutlich minimiert und die Ausbeute an Tieren stark erhöht werden (siehe 2.5). Die Rückgewinnung der Tiere aus Sand durch Zugabe von Wasser, gründliches Mischen und sofortige Auswertung von Aliquots des Überstandes erwies sich als unbedingt empfehlenswert, da es die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich steigerte. Dennoch ist eine hohe Durchsatzrate bei diesem Assay in keinem Fall möglich, was sicherlich ein Grund für die seltene Verwendung dieser Methode in der Literatur ist.

Die Übertragung der *in vivo* gewonnenen Ergebnisse *in vitro* erwies sich als schwer realisierbar. Grund dafür ist die Notwendigkeit der Exsudat-Extraktion, während derer natürlich etablierte Gradienten verloren gehen. Die Nutzung von Perkolaten ist nicht empfehlenswert, da davon ausgegangen werden kann, dass wichtige Stoffe vor dem Ent-

fallen ihrer Wirkung im Biotest metabolisiert werden (Green 1971).

Der von Viglierchio (1961), Seid (1999) und Dababat und Sikora (2007) erfolgreich angewandte Sand-Block-Assay lieferte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Er gewährleistet zwar eine natürliche Fortbewegung der Tiere, die Ergebnis-Reproduktion scheitert jedoch offenbar an der Applikationsmethode und Diskrepanzen zwischen der Gradientenetablierung *in vivo* und *in vitro*. Diese Beobachtungen unterstützen im Vergleich mit den Ergebnissen von Dababat und Sikora (2007) die Annahme, dass die applizierten Exsudate keine stabile, stark wirksame Substanz enthalten. Die Gegenüberstellung der vorliegenden Ergebnisse mit denen von Viglierchio (1961), Seid (1999) und Dababat und Sikora (2007) zeigt, dass sich dieses Testsystem primär für Attraktionstests mit vitalen Sämlingen und Substanzgemische mit stark anziehenden bzw. abstoßenden Substanzen eignet.

Im Gegensatz zu der geringen Anzahl an Veröffentlichungen über die Attraktion von PPN *in vivo* und im Sand-Block, existiert eine große Bandbreite von Methoden, um die Wirkung von Substanzen auf die Nematodenverteilung *in vitro* auf Agar zu untersuchen. Die meisten dieser Verfahren beinhalten die Platzierung einer Stimulus-Quelle auf Agar und eine Diffusionszeit von 0 bis 36 h. Dann werden die Tiere, deren Reaktion untersucht werden soll, in einigen Zentimetern Entfernung appliziert und migrieren 1 - 48 h lang bevor ihre Verteilung erfasst wird. Nachteil ist jedoch, dass flüchtige oder instabile Stimuli in dieser Zeitspanne verloren gehen (Dusenbery 1983).

Die Gradientenetablierung auf Agar unterscheidet sich deutlich von der Etablierung eines Gradienten im Sand-Block-Assay (siehe S. 101 f.). Die applizierten Substanzen diffundieren langsam und abhängig von der Molekülgröße. Dass dieser Gradient den natürlichen Bedingungen näher kommt als der Sand-Block-Gradient, zeigt ein Vergleich der Ergebnisse: werden direkt aus teil-hydroponischer Kultur entnommene Substanzen appliziert,

zeigt sich auf Agar eine leichte Abstoßung der J2 durch die Exsudate mykorrhizierter Pflanzen, während der Sand-Block-Assay gegensätzliche Ergebnisse erbringt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Orientierung der Tiere auf Agar möglich ist und sich die Sensitivität des Tests durch Verringerung der Applikationsfläche in Anlehnung an Castro *et al.* (1989) und Diez und Dusenbery (1989) stark steigert. Je schmaler die Migrationsfläche ist, desto stärker ist der aufgebaute Gradient. Deshalb können auch Substanzen, die schwach oder gering konzentriert sind, ihre Wirkung entfalten.

Im Vergleich zu den vorhergehenden Biotests ist im Agar-Pair-Choice-Assay eine direkte Überwachung der Tiere möglich. Der Arbeitsaufwand ist stark reduziert, ebenso wie die zur Auswertung benötigte Zeit. Dies ermöglicht mehr Wiederholungen und differenziertere Untersuchungen der Exsudat-Wirkungen. Die von Diez und Dusenbery (1989) übernommene und adaptierte Skala verkürzt die Auswertungszeit deutlich und ermöglicht eine Steigerung der Fallzahl, was zu repräsentativen Resultaten führt. Castro *et al.* (1989) bietet eine Verbesserung des verwendeten Systems. Die Übernahme des in dieser Veröffentlichung verwendeten Versuchsaufbaus bedeutete jedoch einen erhöhten apparativen Aufwand, der im gegebenen Zeitrahmen nicht zu realisieren war. Bei einer Weiterführung dieser Biotests sind mit der Übernahme des Setups von Castro *et al.* (1989) signifikante Unterschiede zwischen der Attraktivität der Exsudate mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen zu erwarten.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass zur Testung der Exsudatwirkung mykorrhizierter und mykorrhizafreier Pflanzen eine Flüssigkultur, wie hier etabliert, unbedingt notwendig ist, da die ursächlichen Stoffe offensichtlich schnell zersetzt werden bzw. zerfallen und daher regelmäßig frisch appliziert werden müssen. Darüber hinaus ist der metabolisierende Einfluss der Rhizosphäre in teil-hydroponischer Kultur durch das Auswaschen und mehrmalige Umsetzen der Pflanzen vermindert.

Auch der Einsatz von Sephadex[®] ist eine erfolgversprechende Methode zur Testung des

Attraktionsverhaltens von PPN (Ward 1973; Dusenbery 1983; Moltmann 1990; Thoden *et al.* 2007), da die granulöse Struktur des Mediums eine natürliche Fortbewegung und Rezeption der Tiere ermöglicht. Eine Implikation dieser Methode war jedoch im gegebenen Zeitrahmen nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Wirkung der Mykorrhiza-Isolate wirtsspezifisch und isolatabhängig ist, konnte gezeigt werden, dass *G.e.* 36 und *G.i.* 510 *in vivo* eine sortenübergreifende Reduktion der Wirts-Attraktivität bewirken. Der im Versuchsaufbau über einen Zeitraum von 72 h gebildete Gradient ist stark genug, um eine distinkte Orientierung von *M. incognita* zu ermöglichen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Tiere im Olfaktometer zum einen zwischen Pflanze und wirtspflanzenfreiem Substrat differenzierten und zum anderen, dass die Diffusate der Variante *G.e.* 36 in der Summe attraktiv waren, auch wenn die Larven mykorrhizafreie Pflanzen bevorzugten. Stärke und Ursache der Attraktivitätsminderung mykorrhizierter Pflanzen sind offenbar isolatabhängig: Die Mykorrhizierung mit *G.e.* 36 bewirkt anscheinend das Fehlen einer anziehenden Substanz, während *G.i.* 510 möglicherweise die Abgabe eines abstoßenden Stoffes bedingt. Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die für die verminderte Attraktivität verantwortliche Substanz niedermolekular und wasserlöslich, jedoch nicht gasförmig ist. Ob der Effekt durch ein neu gebildetes Repellent oder das Fehlen eines Attractants bewirkt wird, konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

Auch die Ergebnisse der UPLC erlauben keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Identität der wirksamen Substanz. Wird die Attraktivitätsminderung durch ein fehlendes Attractant ausgelöst, können die Substanzen Nr. 4 (MM = 226,16) und/oder Nr. 5

(MM = 452,28) die Ursache sein, welche nur bei -myk detektiert wurden. Ist ein bei Mykorrhizierung produziertes Repellent dafür verantwortlich, kann die Substanz Nr. 6 (MM = 281,24) den Effekt bedingen. Substanz Nr. 3 (MM = 238,13) tritt in allen Varianten auf, jedoch bei mykorrhizafreien Pflanzen in deutlich geringerer Menge. Die mittels UPLC gemessenen Stoffe konnten anhand ihrer Eigenschaften nicht auf in der Literatur erwähnte attraktive oder repellative Substanzen zurückgeführt werden. Da jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die detektierten Substanzen aus mehreren Molekülen (z.B. Aminosäuren) bestehen, werden weitergehende Analysen empfohlen.

Im Olfaktometer beeinflussen *G.i.* 510 und die Bakterienstämme *C. turbata* und *A. baumannii* einander nicht in ihrer Ausbreitung. *A. baumannii* wirkte signifikant attraktiv auf *M. incognita*. Die Kombination mit *G.i.* 510 nivellierte diese Attraktivitätssteigerung. *C. turbata* wirkte in Einzelinokulation abstoßend und in Dulainokulation mit dem AMP indifferent auf die applizierten Nematoden. Dass beide Isolate zudem in ihrer Populationsentwicklung nicht durch *G.i.* 510 gehemmt wurden, führt zu dem Schluss, dass die Isolate verschiedene C-Quellen metabolisieren. Die Mykorrhizierung führte zu einer Reduktion eines Substrates von *A. baumannii*, dessen Metabolit attraktiv auf *M. incognita* wirkte. Im Hinblick auf die Ergebnisse der UPLC kommen die Substanzen Nr. 4 (MM = 226,16) und Nr. 5 (MM = 452,18) hierfür in Frage, da sie nur in den Exsudaten mykorrhizafreier *S. lycopersicum* vorhanden waren.

Da *A. baumannii* ein breites Spektrum an Substraten nutzt, ermöglicht die Metabolisierung einer anderen C-Quelle eine stabile Populationsdichte (Stanier *et al.* 1966). Die Kombination der Bakterienstämme mit *G.i.* 510 empfiehlt sich nicht zur Attraktivitätsminderung der Wirtspflanze. Da die Isolate jedoch die Schutzwirkung der Mykorrhiza im Hinblick auf die Gallenbildung verstärken, ist eine entsprechende Kombination dennoch sinnvoll.

Der Sand-Block Pair-Choice-Assay ermöglichte sowohl das kontrollierte Einbringen von Testmaterial, als auch eine natürliche Fortbewegung von *M. incognita*. Er eignete sich jedoch nicht zur Reproduktion der *in vivo* gewonnenen Ergebnisse, sondern erbrachte gegenteilige Reaktionen der J2. Ursachen hierfür können die Applikationsmethodik, die Degradierung von Exsudatkomponenten, und der Mangel eines naturgemäßen Gradienten sein (Kühn 1959; Green 1971; Perry 1997).

Der zur Auswertung notwendige Zeit- und Arbeitsaufwand war immens und die Fall- und Wiederholungszahl infolgedessen gering. Attraktionstests auf Agar ermöglichten eine Überwindung dieser Probleme. Es wurde der Nachweis erbracht, dass die Orientierung von *M. incognita* auf Agar möglich ist und mittels Klinotaxis erfolgt.

Bei der Überprüfung der Attraktionswirkung auf Agar zeigte sich erneut, dass die Perkolate mykorrhizierter Pflanzen attraktiver waren als die mykorrhizafreier. Dies unterstützt die zuvor geäußerte Begründung, dass wichtige Exsudatkomponenten im Sand-Block und auf Agar vor Entfaltung ihrer Wirkung degradiert werden. Die Reduktion der Diffusionsfläche auf Agar führte zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung des Assays. Dadurch konnte die abstoßende Wirkung von direkt applizierten Exsudaten der Variante *G. intraradices* 510 aus teil-hydroponischer Kultur nachgewiesen werden. Da dieser Nachweis auf Agar gelang, im Sand-Block-Assay jedoch nicht, konnte der Schluss gezogen werden, dass sich aufgrund der Porengröße des Migrationsmediums die entstandenen Gradienten in beiden Setups grundsätzlich unterscheiden. Diese Beobachtungen führten weiterhin zu der Annahme, dass nahe der mykorrhizierten Wurzeln mehr und höhermolekulare attraktive Stoffe vorlagen und die verminderte Attraktivität *in vivo* auf schnell diffundierende, niedermolekulare Substanzen zurückzuführen ist.

Die Modifikation der Versuchsauswertung auf Agar ermöglichte eine deutliche Steigerung der Fallzahl, was die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit des Assays stark verbesserte. Der entwickelte Assay erwies sich als vorteilhaft und ist für eine Weiterführung der

Versuche zu empfehlen. Die entwickelte teil-hydroponische Kultur erwies sich gegenüber der Perkolatgewinnung ebenfalls als vorteilhaft und notwendig zur Reproduktion der Attraktionsreduktion *in vitro*.

6. Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse erbrachten keine Hinweise auf ein durch Mykorrhizierung gebildetes starkes Repellent. Trotzdem sind weitere Untersuchungen zur verminderten Attraktion empfehlenswert, da nur wenige Veröffentlichungen zur Exsudatzusammensetzung mykorrhizierter Pflanzen existieren, diese jedoch die Rhizosphäre maßgeblich beeinflusst. Dieses Thema stellt ebenso eine Forschungslücke dar wie die Untersuchung der Exsudatwirkung von mykorrhizierten Pflanzen auf die Attraktivität. Beide Themengebiete sind nahezu unerforscht und bieten ein breites Spektrum an Untersuchungsmöglichkeiten zu anwendungsrelevanten Fragestellungen. Um die Ergebnisse *in vivo* zu reproduzieren bietet sich der entwickelte Biotest in Kombination mit einer teil-hydroponischen Kultur an. Der Biotest ermöglicht zudem ein Screening von Exsudatfraktionen. Dieses Verfahren empfiehlt sich auch für die genauere Exsudatuntersuchung von Pflanzen, deren Attraktivität aufgrund der Besiedlung mit *Fusarium oxysporum* 162 stark reduziert ist (Dababat und Sikora 2007).

Weiterhin ist zu untersuchen, ob die häufig zur biologischen Bekämpfung von PPN eingesetzten Isolate von *P. fluorescens*, welche zudem die Populationsdichte im Boden reduzieren, sich auf die Attraktivität der Wirtspflanze auswirken (u. A. Aalten *et al.* 1998; Siddiqui und Mahmood 2001). Eine Kombination mit *Glomus* sp. und die subsequente Evaluation der Attraktivitätsänderung kann Aufschluss über die Bedeutung repellativer Substanzen zur Befallsminderung geben.

Literaturverzeichnis

- Aalten, P. M.; Vitour, D.; Blanvillain, D.; Gowen, S. R.; Sutra, L.:** Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. In: *Letters in Applied Microbiology* 27 (1998), S. 357–361
- Akhtar, M.:** Biological control of plant-parasitic nematodes by neem products in agricultural soil. In: *Applied Soil Ecology* 7 (1998), S. 219–223
- Akhtar, M.; Alam, M. M.:** Utilization of waste materials in nematode control: A review. In: *Bioresource Technology* 45 (1993), S. 1–7
- Akhtar, M.; Malik, A.:** Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. In: *Bioresource Technology* 74 (2000), S. 35–47
- Alten, H. von; Lindemann, A.; Schönbeck, F.:** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. In: *Mycorrhiza* 2 (1993), S. 167–173
- Andrade, G.; Mihara, K. L.; Linderman, R. G.; Bethlenfalvay, G. J.:** Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. In: *Plant and Soil* 202 (1998), S. 89–96
- Azcón-Aguilar, C.; Barea, J. M.:** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. In: *Mycorrhiza* 6 (1996), S. 457–464
- Bagyaraj, D.; Manjunath, A.; Reddy, D.:** Interaction of vesicular arbuscular mycorrhiza with root knot nematodes in tomato. In: *Plant and Soil* 51 (1979), S. 397–403
- Bagyaraj, D. J.:** *VA mycorrhiza*. Kap. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi, S. 163–198, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1984
- Bais, H. P.; Weir, T. L.; Perry, L. G.; Gilroy, S.; Vivanco, J. M.:** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. In: *Annual Reviews of Plant Biology* 57 (2006), S. 233–266
- Balhadere, P.; Evans, A. A. F.:** Characterization of attractiveness of excised root tips of resistant and susceptible plants for *Meloidogyne naasi*. In: *Fundamental and Applied Nematology* 17 (1994), S. 527–536

- Bargmann, C. I.; Horvitz, H. R.:** Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. In: *Neuron* 7 (1991), S. 729–742
- Basu, U.; Basu, A.; Taylor, G. J.:** Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. In: *Plant Physiology* 106 (1994), S. 151–158
- Bello, A.; López-Pérez, J. A.; García-Álvarez, A.:** Biofumigation as an alternative to methyl bromide. In: *Proceedings of international conference on alternatives to methyl bromide “The remaining challenges“*, 2008, S. 221–225
- Benhamou, N.; Kloepper, J. W.; Quadt-Hallman, A.; Tuzun, S.:** Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. In: *Plant Physiology* 112 (1996), S. 919–929
- Benhamou, N.; Kloepper, J. W.; Tuzun, S.:** Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. In: *Planta* 204 (1998), S. 153–168
- Bertin, C.; Yang, X.; Weston, L. A.:** The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. In: *Plant and Soil* 256 (2003), S. 67–83
- Bilgrami, A. L.; Ahmed, I. A.; Jairajpuri, M. S.:** Responses of adult *Hirschmaniella oryzae* towards different plant roots. In: *Revue de Nématologie* 8 (3) (1985), S. 265–272
- Bird, A. F.:** The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. In: *Nematologica* 4 (1959), S. 322–335
- Bolton, E. E.; Wang, Y.; Thiessen, P. A.; Bryant, S. H.:** PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities. In: *Annual Reports in Computational Chemistry* 4 (2008), S. 217–241
- Borowicz, V. A.:** Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? In: *Ecology* 82 (2001), S. 3057–3068
- Bowen, G. D.; Rovira, A. D.:** The effects of micro-organisms on plant growth. In: *Plant and Soil* 15 (1961), S. 166–188
- Bowen, G. D.; Rovira, A. D.:** *Plant roots - the hidden half*. Kap. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half, S. 641–669, Marcel Dekker, New York, 1991
- Brimecombe, M. J.; De Leij, F. A. A. M.; Lynch, J. M.:** *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Kap. Rhizodeposition and microbial populations, S. 73–110, CRC Press Inc., 2007

- Calvet, C.; Pinochet, J.; Hernández-Dorrego, A.; Estaún, V.; Camprubí, A.:** Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root-knot nematodes. In: *Mycorrhiza* 10 (2001), S. 295–300
- Caron, M.:** Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. In: *Canadian Journal of Plant Pathology* 11 (1989), S. 177–179
- Caron, M.; Fortin, J. A.; Richard, C.:** Effect of phosphorous concentration and *Glomus intraradices* on Fusarium crown and root rot of tomatoes. In: *Phytopathology* 76 (1986), S. 942–946
- Castro, C. E.; Belser, N. O.; McKinney, H. E.; Thomason, I. J.:** Quantitative bioassay for chemotaxis with plant parasitic nematodes. In: *Journal of Chemical Ecology* 15 (1989), S. 1297–1309
- Castro, C. E.; Belser, N. O.; McKinney, H. E.; Thomason, I. J.:** Strong repellency of the root knot nematode *Meloidogyne incognita* by specific inorganic ions. In: *Journal of Chemical Ecology* 16 (1990), S. 1199–1205
- Chen, C.; Bélanger, R. R.; Benhamou, N.; Paulitz, T. C.:** Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56 (2000), S. 13–23
- Chernin, L.; Chet, I.:** *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Kap. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests, S. 171–225, Marcel Dekker, New York, 2002
- Christensen, H.; Jakobsen, I.:** Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: *Biology and Fertility of Soils* 15 (1993), S. 253–258
- Clark, R. B.; Zeto, S. K.:** Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. In: *Journal of Plant Nutrition* 23 (7) (2000), S. 867–902
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clement, C.; Barka, E. A.:** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), S. 4951–4959
- Cooper, K. M.; Grandisons, G. S.:** Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. In: *Annals of Applied Biology* 108 (1986), S. 555–565
- Copley, J.:** Ecology goes underground. In: *Nature* 406 (2000), S. 452–454

- Cordier, C.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.:** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. In: *Plant and Soil* 185 (1996), S. 223–232
- Culotti, J. G.; Russell, R. L.:** Osmotic avoidance defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 90 (1978), S. 243–256
- Curl, E. A.; Truelove, B.:** *The Rhizosphere*. Springer, 1986
- Dababat, A. E. A.; Sikora, R. A.:** Influence of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* attraction and invasion. In: *Nematology* 9 (2007), S. 771–776
- Daft, M. J.; El-Giahmi, A. A.:** Effect of endogone mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in french bean (*Phaseolus vulgaris*). In: *New Phytologist* 73 (1974), S. 1139–1147
- Dakora, F. D.; Phillips, D. A.:** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In: *Plant and Soil* 245 (2002), S. 35–47
- Davies, R. M.; Menge, J. A.:** Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorous on Phytophthora root rot of citrus. In: *Phytopathology* 70 (1980), S. 447–452
- Davis, R. M.:** Influence of *Glomus fasciculatus* on *Thielaviopsis basicola* root rot of citrus. In: *Plant Disease* 64 (1980), S. 839–840
- Deberdt, P.; Quénehervé, P.; Darrasse, A.; Prior, A.:** Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the Mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. In: *Plant Pathology* 48 (1999), S. 408–414
- Decker, H.:** *Phytonematologie - Biologie und Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden*. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 1969
- Dehne, H. W.:** Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. In: *Phytopathology* 72 (1982), S. 1115–1119
- Dehne, H. W.; Backhaus, G. F.:** The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production I. Inoculum production. In: *Journal of Plant Diseases and Plant Protection* 93 (1986), S. 415–424
- Dehne, H. W.; Schönbeck, F.:** Untersuchungen zum Einfluss der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten: II. Phenolstoffwechsel und Lignifizierung. In: *Phytopathologische Zeitschrift* 95 (1979), S. 210–216
- Diedhiou, P. M.; Hallmann, J.; Oerke, E.-C.; Dehne, H.-W.:** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. In: *Mycorrhiza* 13 (2003), S. 199–204

- Diez, J. A.; Dusenbery, D. B.:** Repellent of root-knot nematodes from exudate of host roots. In: *Journal of Chemical Ecology* 15 (1989), S. 2445–2455
- Dropkin, V. H. ; Dropkin, V. H. (Hrsg.):** *Introduction to plant nematology*. Wiley, New York, 1980
- Dropkin, V. H.; Nelson, P. E.:** The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. In: *Phytopathology* 50 (1960), S. 442–447
- Duffy, B.; Schouten, A.; Raaijmakers, J. M.:** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. In: *Annual Review of Phytopathology* 41 (2003), S. 501–538
- Dugassa, D. G.; Grunewaldt-Stöcker, G.; Schönbeck, F.:** Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. In: *Mycorrhiza* 5 (1995), S. 279–282
- Dugassa, G. D.; Schönbeck, F.:** *Pflanzliche Stoffaufnahme und mikrobielle Wechselwirkungen in der Rhizosphäre*. Kap. Physiologie, Morphologie und Gesundheit von mykorrhizierten Pflanzen, S. 79–86, B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, 1995
- Duineveld, B. M.; Rosado, A. S.; Elsas, J. D. van; Veen, J. A. van:** Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998), S. 4950–4957
- Dusenbery, D. B.:** Chemotactic behavior of nematodes. In: *Journal of Nematology* 15 (1983), S. 168–173
- Dusenbery, D. B.:** Theoretical range over which bacteria and nematodes locate plant roots using carbon dioxide. In: *Journal of Chemical Ecology* 13 (1987), S. 1617–1624
- Dusenbery, D. B.:** *Vistas on Nematology*. Kap. Prospects for exploiting sensory stimuli in nematode control, S. 131–135, Society of Nematology, 1987
- Eason, W. R.; Webb, K. J.; Michaelson-Yeates, T. P. T.; Abberton, M. T.; Griffith, G. W.; Culshaw, C. M.; Hooker, J. E.; Dhanoa, M. S.:** Effect of genotype of *Trifolium repens* on mycorrhizal symbiosis with *Glomus mosseae*. In: *Journal of Agricultural Science* 137 (2001), S. 27–36
- Edwards, S. G.; Young, J. P. W.; Fitter, A. H.:** Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rhizosphere. In: *FEMS Microbiology Letters* 166 (1998), S. 297–303

- Einhellig, F. A.; Souza, I. F.:** Phytotoxicity of sorgoleone found in grain Sorghum root exudates. In: *Journal of Chemical Ecology* 18 (1992), S. 1–11
- Elsen, A.; Declerck, S.; De Waele, D.:** Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic culture. In: *Mycorrhiza* 11 (2001), S. 49–51
- Elstner, E. F.; Oßwald, W.; Schneider, I.:** *Phytopathologie - Allgemeine und chemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, 1996. – 215–238 S
- Fan, T. W. M.; Lane, A. N.; Pedler, J.; Crowley, D.; Higashi, R. M.:** Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. In: *Analytical Biochemistry* 251 (1997), S. 57–68
- Forbes, P. J.; Ellison, C. H.; Hooker, J. E.:** The impact of arbuscular mycorrhizal fungi and temperature on root system development. In: *Agronomie* 16 (1996), S. 617–620
- Frankowski, J.; Lorito, M.; Scala, F.; Schmid, R.; Berg, G.; Bahl, H.:** Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. In: *Archives of Microbiology* 176 (2001), S. 421–426
- Fridlender, M.; Inbar, J.; Chet, I.:** Biological control of soilborne plant pathogens by a [beta]-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. In: *Soil Biology and Biochemistry* 25 (1993), S. 1211–1221
- Gamalero, E.; Trotta, A.; Massa, N.; Copetta, A.; Martinotti, M. G.; Berta, G.:** Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. In: *Mycorrhiza* 14 (2004), S. 185–192
- Garbaye, J.:** Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. In: *New Phytologist* 128 (1994), S. 197–210
- Gaur, H. S.; Beane, J.; Perry, R. N.:** The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticroyzae*. In: *Nematology* 2 (2000), S. 191–199
- Gernns, H.; Alten, H. von; Poehling, H.-M.:** Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen - is a compensation possible? In: *Mycorrhiza* 11 (2001), S. 237–243
- Graham, J. H.; Egel, D. S.:** Phytophthora root rot development on mycorrhizal and phosphorous-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. In: *Plant Disease* 72 (1988), S. 611–614

- Graham, J. H.; Leonard, R. T.; Menge, J. A.:** Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. In: *Plant Physiology* 68 (1981), S. 548–552
- Grayston, S. J.; Vaughan, D.; Jones, D.:** Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. In: *Applied Soil Ecology* 5 (1997), S. 29–56
- Green, C. D.:** *Plant Parasitic Nematodes*. Kap. Mating and host finding behavior of plant nematodes, S. 247–266, Academic Press, New York, 1971
- Griffin, G. D.; Waite, W. W.:** Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedlings. In: *Journal of Nematology* 3 (1971), S. 215–219
- Grimoldi, A. A.; Kavanová, M.; Lattanzi, F. A.; Schäufele, R.; Schnyder, H.:** Arbuscular mycorrhizal colonization on carbon economy in perennial ryegrass: quantification by $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ steady-state labelling and gas exchange. In: *New Phytologist* 172 (2006), S. 544–553
- Gryndler, M.; Vosátka, M.:** The response of *Glomus fistulosum*-maize mycorrhiza to treatments with culture fractions from *Pseudomonas putida*. In: *Mycorrhiza* 6 (1996), S. 207–211
- Guerena, M.:** *Nematodes: alternative controls*. NCAT Agriculture Specialist. 2006
- Guiran, G. de; Ritter, M.:** *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) - systematics, biology and control*. Kap. Life cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development, S. 173–192, Academic Press, 1979
- Gundy, S. D. van; Kirkpatrick, J. D.; Golden, J.:** The nature and role of metabolic leakage from root-knot nematode galls and infection by *Rhizoctonia solani*. In: *Journal of Nematology* 9 (1977), S. 113–121
- Habte, M.; Zhang, Y. C.; Schmitt, D. P.:** Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage. In: *Canadian Journal of Botany* 77 (1999), S. 135–139
- Hallmann, J.; Dahlin, P.; Daub, M.; Schlathölter, M.; Schütze, W.; Grosch, R.:** Untersuchungen zur Biofumigation in Deutschland. In: *36. Tagung des Arbeitskreises Nematologie und Arbeitskreis Freilebende Nematoden*, 2008
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Tiedemann, A. von:** *Phytomedizin*. Kap. Nematoden, S. 105–119, Ulmer UTB, 2007

- Harrier, L. A.; Watson, C. A.:** The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. In: *Pest Management Science* 60 (2004), S. 149–157
- Hewitt, E. J.:** Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In: *Technical Communication* Bd. 22. Farnham Royal, Bucks, 1952
- Hodge, A.; Robinson, D.; Fitter, A. H.:** An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in soil. In: *New Phytologist* 145 (2000), S. 575–584
- Hol, W. H. G.; Cook, R.:** An overview of arbuscular mycorrhizal fungi-nematode interactions. In: *Basic and Applied Ecology* 6 (2005), S. 489–503
- Hooker, J. E.; Black, K. E.; Perry, R. L.; Atkinson, D.:** Arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration to root longevity of poplar. In: *Plant and Soil* 172 (1995), S. 327–329
- Hothorn, T.; Munzel, U.:** Non-parametric confidence interval for the ratio. In: *Report University of Erlangen, Department Medical Statistics* (2002)
- Hussey, R. S.; Barker, K. R.:** A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. In: *Plant Disease Reporter* 57 (1973), S. 1025–1028
- Hussey, R. S.; Roncadori, R. W.:** Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. In: *Plant Disease* 66 (1982), S. 9–14
- Jaizme-Vega, M.C.; Tenoury, P.; Pinochet, J.; Jaumot, M.:** Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. In: *Plant and Soil* 196 (2004), S. 27–35
- Jung, C.; Wyss, U.:** New approaches to control plant parasitic nematodes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (1999), S. 439–446
- Kamilova, F.; Kravchenko, L. V.; Shaposhnikov, A. I.; Azarova, T.; Makarova, N.; Lugtenberg, B.:** Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (2006), S. 250–256
- Kapulnik, Y.; Okon, Y.:** *Plant Roots: The Hidden Half*. Kap. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria, S. 869–885, Marcel Dekker, New York, 2002
- Karsen, G.; Moens, M.:** *Plant Nematology*. Kap. Root-knot nematodes, S. 59–90, CABI, 2006

- Kellam, M. K.; Schenck, N. C.:** Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean. In: *Phytopathology* 70 (1980), S. 293–296
- Kloepper, J. W.:** *Azospirillum/Plant Associations*. Kap. Plant-growth promoting rhizobacteria (other systems), S. 137–166, CRC Press. Boca Raton, FL, 1994
- Krafczyk, I.; Trolldenier, G.; Beringer, H.:** Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. In: *Soil Biology and Biochemistry* 16 (1984), S. 315–322
- Kühn, H.:** Zum Problem der Wirtsfindung phytopathogener Nematoden. In: *Nematologica* 4 (1959), S. 165–171
- Kuzyakov, Y.; Raskatov, A.; Kaupenjohann, M.:** Turnover and distribution of root exudates of *Zea mays*. In: *Plant and Soil* 254 (2003), S. 317–327
- Le Saux, R.; Quénehervé, P.:** Differential chemotactic responses of two plant-parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*, to some inorganic ions. In: *Nematology* 4 (2002), S. 99–105
- Linderman, R. G.:** Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: The Mycorrhizosphere Effect. In: *Phytopathology* 78 (1988), S. 366–371
- Loon, L. C. van; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J.:** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. In: *Annual Review of Phytopathology* 36 (1998), S. 453–483
- Loper, J. E.; Henkels, M. D.:** Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. In: *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999), S. 5357–5363
- Loveys, B. R.; Bird, A. F.:** The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. In: *Physiological Plant Pathology* 3 (1973), S. 525–529
- Lownsbery, B F; Viglierchio, D R:** Importance of response of *Meloidogyne hapla* to an agent from germinating tomato seeds. In: *Phytopathology* 5 (1961), S. 219–221
- Lynch, J. M.; Whipps, J. M.:** Substrate flow in the rhizosphere. In: *Plant and Soil* 129 (1990), S. 1–10
- Lynch, J.M.:** The rhizosphere – form and function. In: *Applied Soil Ecology* 1 (1994), S. 193–198
- Marschner, P.; Crowley, D.; Lieberei, R.:** Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16 S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. In: *Mycorrhiza* 11 (2001), S. 297–302

- Marschner, P.; Crowley, D. E.; Higashi, R. M.:** Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). In: *Plant and Soil* 189 (1997), S. 11–20
- Masadeh, B.:** *Biological control of Meloidogyne incognita (Tylenchida: Meloidogynidae) on tomato using arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria*, University of Hanover, Dissertation, 2005
- Matsubara, Y.; Tamura, H.; Harada, T.:** Growth enhancement and Verticillium wilt control by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculation in eggplant. In: *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64 (1995), S. 555–561
- Maurhofer, M.; Hase, C.; Meuwly, P.; Mettraux, J.P.; Defago, G.:** 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. In: *Phytopathology* 84(2) (1994), S. 139–146
- Melakeberhan, H.; Ferris, H.:** Impact of *Meloidogyne incognita* on physiological efficiency of *Vitis vinifera*. In: *Journal of Nematology* 21 (1989), S. 74–80
- Moltmann, E.:** Kairomones in root exudates of cereals. Their importance in host finding of juveniles of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* (Woll.), and their characterization. In: *Journal of Plant Diseases and Protection* 97 (1990), S. 458–469
- Morandi, D.:** Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. In: *Plant and Soil* 185 (1996), S. 241–251
- M’piga, P.; Bélanger, R. R.; Paulitz, T. C.; Benhamou, N.:** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50 (1997), S. 301–320
- Nations, United:** *Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer*. United Nations, New York, 2006
- Nico, A. I.; Jiménez-Díaz, R. M.; Castillo, P.:** Solarization of soil in piles for the control of *Meloidogyne incognita* in olive nurseries in southern Spain. In: *Plant Pathology* 52 (2003), S. 770–778
- Nielsen, T. H.; Sorensen, D.; Tobiasen, C.; Andersen, J. B.; Christophersen, C.; Givskov, M.; Sorensen, J.:** Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002), S. 3416–3423

- Nielsen, T. H.; Sorensen, J.:** Production of cycliclipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), S. 861–868
- Nitao, J. K.; Meyer, S. L. F.; Chitwood, D. J.:** In-vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-anatagonistic fungal compounds. In: *Journal of Nematology* 31 (1999), S. 172–183
- Nowak, J.; Shulaev, V.:** Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39 (2003), S. 107–124
- Oka, U.:** Suppressive effects of composts against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. In: *Nematology* 4 (2002), S. 891–898
- Oka, Y.; Koltai, H.; Bar-Eyal, M.; Mor, M.; Sharon, E.; Chet, I.; Spiegel, Y.:** New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. In: *Pest Management Science* 56 (2000), S. 983–988
- Oka, Y.; Nacar, S. I.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Yaniv, Z.; Spiegel, Y.:** Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. In: *Phytopathology* 90 (2000), S. 710–715
- Ongena, M.; Daayf, F.; Jacques, P.; Thonart, P.; Benhamou, N.; Paulitz, T. C.; Bélanger, R. R.:** Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. In: *Plant Pathology* 49 (2000), S. 523–530
- Oostenbrink, M.:** *Nematology*. Kap. Estimating nematode population by some selected methods, S. 85–102, University of North Carolina Press, Chapel Hill, N. C., 1960
- Oostendorp, M.; Sikora, R. A.:** In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. In: *Revue de Nématologie* 13 (1990), S. 269–274
- O’Sullivan, D J; O’Gara, F:** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56 (1992), S. 662–676
- Park, K. S.; Kloepper, J. W.:** Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. In: *Biological Control* 18 (2000), S. 2–9
- Perry, R. N.:** Chemoreception in plant parasitic nematodes. In: *Annual Review of Phytopathology* 34 (1996), S. 181–199

- Perry, R. N.:** *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions*. Kap. Plant signals in nematode hatching and attraction, S. 38–50, Kluwer Academic Publishers, 1997
- Pierce-Shimomura, J. T.; Morse, T. M.; Lockery, S. R.:** The Fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. In: *The Journal of Neuroscience* 19 (1999), S. 9557–9569
- Pline, M.; Dusenbery, D. B.:** Responses of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* to carbon dioxide determined by video camera-computer tracking. In: *Journal of Chemical Ecology* 13 (1987), S. 873–888
- Powell, N. T.:** Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. In: *Annual Review of Phytopathology* 9 (1971), S. 253–274
- Pozo, M.; Azcon-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E.; Barea, J.:** Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. In: *Journal of Experimental Botany* 49 (1998), S. 1729–1739
- Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J. M.; Azcon-Aguilar, C.:** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. In: *Journal of Experimental Botany* 53 (2002), S. 525–534
- Prot, J.-C.:** Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. In: *Revue de Nématologie* 3 (1980), S. 305–318
- R, Development Core Team:** *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing (Veranst.), 2005
- Ramamoorthy, V.; Viswanathan, R.; Raguchander, T.; Prakasam, V.; Samiyappan, R.:** Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. In: *Crop Protection* 20 (2001), S. 1–11
- Ratanayake, M.; Leonard, R. T.; Menge, J. A.:** Root exudation in relation to supply of phosphorous and its possible relevance to mycorrhizal formation. In: *New Phytologist* 81 (1978), S. 543–552
- Rawsthorne, D.; Brodie, B.:** Movement of potato root diffusate through soil. In: *Journal of Nematology* 19 (1987), S. 119–122
- Reimann, S.; Sikora, R. A.:** Managing the mycorrhizosphere - an approach to sustainable agriculture after the phaseout of methyl bromide. In: *Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences* 68 (2003), S. 129–134

- Reller, L. B.; Maddoux, G. L.; Eckman, M. R.; Pappas, G.:** Bacterial Endocarditis caused by *Oerskovia turbata*. In: *Annals of Internal Medicine* 83 (1975), S. 664–666
- Riddle, D. L.; Bird, A. F.:** Responses of the plant parasitic nematodes *Rotylenchulus reniformis*, *Anguina agrostis* and *Meloidogyne javanica* to chemical attractants. In: *Parasitology* 91 (1985), S. 185–195
- Robinson, A. F.; Perry, R. N.:** *Plant nematology*. Kap. Behaviour and Sensory Perception, S. 210–233, CABI, 2006
- Roncadori, R. W.; Hussey, R. S.:** Interaction of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* and root-knot nematode on cotton. In: *Phytopathology* 67 (1977), S. 1507–1511
- Ross, J. P.:** Influence of endogone mycorrhiza on Phytophthora rot of soybean. In: *Phytopathology* 62 (1972), S. 896–897
- Rovira, A. D.:** Plant root exudates. In: *The Botanical Review* 35 (1969), S. 35–57
- Rovira, A. D.:** *The rhizosphere and plant growth*. Kap. Rhizosphere research - 85 years of progress and frustration, S. 3–13, Kluwer Academic Publishers Netherlands, 1991
- Rühm, R.:** *Untersuchungen zum Kairomon von Heterodera schachtii aus Wurzelexsudat von Sinapis alba*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dissertation, 2000
- Rühm, R.; Dietsche, E.; Harloff, H.-J.; Lieb, M.; Franke, S.; Aumann, J.:** Characterisation and partial purification of a white mustard kairomone that attracts the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*. In: *Nematology* 5 (2003), S. 17–22
- Sana, T. R.; Roark, J. C.; Li, X.; Waddell, K.; Fischer, S. M.:** Molecular formula and METLIN personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. In: *Journal of Biomolecular Techniques* 19 (2008), S. 258–266
- Sasser, J. N.:** Behaviour of *Meloidogyne* spp. from various geographical locations on ten host differentials. In: *Nematologica* 12 (1966), S. 97–98
- Schönbeck, F.:** *Soil borne plant pathogens*. Kap. Endomycorrhiza in relation to plant diseases, S. 271–280, Academic Press, New York, 1979
- Schouten, A.; Berg, G. van den; Edel-Hermann, V.; Steinberg, N.; Alabouvette, C.; Vos, C. H. de; Lemanceau, P.; Raaijmakers, J. M.:** Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (2004), S. 1201–1211

- Seid, E. A.:** *Wirkungen des Rhizobakteriums Bacillus subtilis auf den Befall von Tomatenpflanzen durch Wurzelgallen- (Meloidogyne spp.) und Wurzelläsions-Nematoden Pratylenchusspp.),* Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation, 1999
- Sharma, A. K.; Johri, B. N.; Gianinazzi, S.:** Vesicular-arbuscular mycorrhizae in relation to plant disease. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8 (1992), S. 559–563
- Siddiqui, Z.; Baghel, G.; Akhtar, M.:** Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (2007), S. 435–441
- Siddiqui, Z. A.:** Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. In: *Bioresource Technology* 95 (2004), S. 223–227
- Siddiqui, Z. A.; Mahmood, I.:** Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. In: *Bioresource Technology* 79 (2001), S. 41–45
- Sikora, R. A.:** Effect of the endotrophic mycorrhizal fungus, *Glomus mossae* on the host-parasite relationship of *Meloidogyne incognita* in tomato. In: *Journal of plant diseases and plant protection* 85 (1978), S. 197–202
- Sikora, R. A.; Schuster, R.-P.:** *Handbuch der Phytonematologie.* Shaker Verlag, Aachen, 2000 (Berichte aus der Agrarwissenschaft)
- Sitaramaiah, K.; Sikora, R. A.:** Effect of the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus* on the host-parasite relationship of *Rotylenchus reniformis*. In: *Nematologica* 28 (1982), S. 412–419
- Slezack, S.; Dumas-Gaudot, E.; Paynot, M.; Gianinazzi, S.:** Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (2000), S. 238–241
- Smith, G. S.:** The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. In: *Phytopathology* 78 (1988), S. 371–374
- Smith, G. S.; Hussey, R. S.; Roncadori, R. W.:** Penetration and postinfection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradices* and phosphorus. In: *Journal of Nematology* 18 (1986), S. 429–435
- Smith, M. G.; Gianoulis, T. A.; Pukatzki, S.; Mekalanos, J. J.; Ornston, L. N.; Gerstein, M.; Snyder, M.:** New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. In: *Genes & Development* 21 (2007), S. 601–614

- Smith, S.:** *Vistas on nematology*. Kap. Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi, in, S. 292–300, Society of Nematology, Hyattsville, MD, 1987
- Smith, S. E.; Read, D. J.:** *Mycorrhizal symbiosis*. Kap. Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhizas, S. 42–90, Academic Press, 2008
- Sood, S. G.:** Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. In: *FEMS Microbiology Ecology* 45 (2003), S. 219–227
- Souza, J. T. de; Boer, M. de; Waard, P. de; Beek, T. A. van; Raaijmakers, J. M.:** Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), S. 7161–7172
- Spence, K. O.; Lewis, E. E.; Perry, R. N.:** Host-finding and invasion by entomopathogenic and plant-parasitic nematodes: Evaluating the ability of laboratory bioassays to predict field results. In: *Journal of Nematology* 40(2) (2008), S. 93–98
- Spiegel, Y.; Burrows, P. M.; Bar-Eyal, M.:** A chemo attractant in onion root exudates recognized by *Ditylenchus dipsaci* in laboratory bioassay. In: *Phytopathology* 93 (2003), S. 127–132
- Stanier, R. Y.; Palleroni, N. J.; Doudoroff, M.:** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. In: *Journal of General Microbiology* 43 (1966), S. 159–271
- Suresh, C. K.; Bagyaraj, D. J.; Reddy, D. D. R.:** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on survival, penetration and development of root-knot nematode in tomato. In: *Plant and Soil* 87 (1985), S. 305–308
- Talavera, M.; Itou, K.; Mizukubo, T.:** Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato-*Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) and carrot-*Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: Pratylenchidae) pathosystems. In: *Applied Entomology and Zoology* 36 (2001), S. 387–392
- Tam, V. T. T. ; Tam, V. T. T. (Hrsg.):** *Modes of action of non-pathogenic Fusarium oxysporum endophytes for bio-enhancement of banana towards Radopholus similis*. Cuvillier Verlag Göttingen, 2005
- Thoden, T. C.; Boppre, M.; Hallmann, J.:** Pyrrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematocidal agents and reduce infestation of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. In: *Nematology* 9 (2007), S. 343–349
- Thomashow, L. S.; Weller, D. M.; Bonsall, R. F.; Pierson, L. S.:** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species

- in the rhizosphere of wheat. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), S. 908–912
- Toljander, J. F.; Lindahl, B. D.; Paul, L. R.; Elfstrand, M.; Finlay, R. D.:** Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. In: *FEMS Microbiology Ecology* 61 (2007), S. 295–304
- Turnbull, G. A.; Morgan, J. A. W.; Whipps, J. M.; Saunders, J. R.:** The role of motility in the *in vitro* attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. In: *FEMS Microbiology Ecology* 35 (2001), S. 57–65
- Urbach, W.; Rupp, W.; Sturm, H.:** *Praktikum zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart New York, 1983
- Uren, N.:** *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Kap. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants, S. 19–40, Marcel Dekker, Inc., 2001
- Vierheilig, H.; Coughlan, A. P.; Wyss, U.; Piche, Y.:** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. In: *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998), S. 5004–5007
- Viglierchio, D. R.:** Attraction of parasitic nematodes by plant root emanations. In: *Phytopathology* 51 (1961), S. 136–142
- Viglierchio, D. R.; Lownsbery, B. F.:** The hatching response of *Meloidogyne* species to the emanations from the roots of germinating tomatoes. In: *Nematologica* 5 (1960), S. 153–157
- Vigo, C.; Norman, J. R.; Hooker, J. E.:** Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. In: *Plant Pathology* 49 (2000), S. 509–514
- Vivanco, J. M.; Guimarães, R. L.; Flores, H. E.:** *Plant roots: the hidden half*. Kap. Underground plant metabolism: the biosynthetic potential of roots, S. 1045–1070, Marcel Dekker Inc., 2002
- Vosátka, M.; Gryndler, M.:** Treatment with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation. In: *Applied Soil Ecology* 11 (1999), S. 245–251
- Wallace, H. R.:** The influence of root knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on photosynthesis and on nutrient demand by roots of tomato plants. In: *Nematologica* 20 (1974), S. 27–33

- Ward, S.:** Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: Identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (1973), S. 817–821
- Waschkies, C.; Schropp, A.; Marschner, H.:** Relations between grapevine replant disease and root colonization of grapevine (*Vitis* sp.) by fluorescent pseudomonads and endomycorrhizal fungi. In: *Plant and Soil* 162 (1994), S. 219–227
- Weert, S. de; Vermeiren, H.; Mulders, I. H. M.; Kuiper, I.; Hendrickx, N.; Bloemberg, G. V.; Vanderleyden, J.; De Mot, R.; Lugtenberg, B. J. J.:** Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (2002), S. 1173–1180
- Weger, L. A. de; Vlugt, C. I. van der; Wijffjes, A. H.; Bakker, P. A.; Schippers, B.; Lugtenberg, B.:** Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. In: *Journal of Bacteriology* 169 (1987), S. 2769–2773
- Whipps, J. M.:** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. In: *Journal of Experimental Botany* 52 (2001), S. 487–511
- Williamson, F.A.; Jones, R.G.W.:** The influence of soil microorganisms on growth of cereal seedlings and on potassium uptake. In: *Soil Biology and Biochemistry* 5 (1973), S. 569–575
- Wilson, C. L.:** Biological control and plant diseases - a new paradigm. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19 (1997), S. 158–159
- Wuyts, N.; Swennen, R.; Waele, D. de:** Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. In: *Nematology* 8 (2006), S. 89–101
- Zhang, L.; Zhang, J.; Christie, P.; Li, X.:** Effect of inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in cucumber. In: *Journal of Plant Nutrition* 32 (2009), S. 967–979
- Zhao, X.; Schmitt, M.; Hawes, M. C.:** Species-Dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. In: *Phytopathology* 90 (2000), S. 1239–1245
- Zhu, Y. G.; Smith, A.; Smith, S.:** Phosphorus efficiencies and responses of barley (*Hordeum vulgare* L.) to arbuscular mycorrhizal fungi grown in highly calcareous soil. In: *Mycorrhiza* 13 (2003), S. 93–100

Zobel, R. W.: *The rhizosphere and plant growth*. Kap. Root growth and development, S. 61–71, Kluwer Academic Publishers, 1991

Zuckerman, B. M.; Jansson, H.: Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. In: *Annual Review of Phytopathology* 22 (1984), S. 95–113

A. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christiane von den Berg
Geburtsdatum 26. März 1981
Geburtsort Wernigerode/Harz
Nationalität deutsch
Familienstand verheiratet, geb. Pech

Schulbildung

09/1991–08/1999 Gerhart-Hauptmann-Gymnasium, Wernigerode
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Soziales Jahr

09/1999–08/2000 Freiwilliges soziales Jahr beim Christlichen Blindendienst
Wernigerode/Harz

Studium

10/2000–06/2006 Leibniz Universität Hannover
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Botanik
Nebenfächer: Zellbiologie, Phytomedizin
Diplom-Note: „sehr gut“

09/2005–06/2006 Diplomarbeit an der Leibniz Universität Hannover
Thema: „Untersuchungen zur Antibiosis ericoider Mykorrhiza-Pilze gegenüber Wurzelpathogenen“
in der Arbeitsgruppe Mykorrhiza (Dr. Henning von Alten)
am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

10/2003–07/2004 Teilnahme am studienbegleitenden Qualifizierungsprogramm zum Erwerb wirtschaftlich relevanter Zusatzqualifikationen
„Mit Leibniz zu Bahlsen“

Promotion

seit 07/2006 Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover
Promotionsthema: „Wirkung der Exsudate mykorrhizierter Tomatenpflanzen auf das Migrationsverhalten von *Meloidogyne incognita*“
in der Arbeitsgruppe Mykorrhiza (Dr. Henning von Alten)
am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

Veröffentlichungen

Grunewaldt-Stoecker, G.; Pech, C.: Interactions of ericoid mycorrhizal fungi and root pathogens in *Rhododendron* plantlets grown in a sterile culture system. In: *Abstracts 5th International Conference on Mycorrhiza* (2006) S. 200.

B. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Menschen danken, die mich unterstützt haben: Vielen Dank an Prof. Dr. H.-M. Poehling für die Übernahme des Referates und die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz anfertigen zu können.

Prof. Dr. R. A. Sikora bin ich dankbar für die Übernahme des Korreferates, viele sehr hilfreiche Hinweise und die Einladung an das INRES in Bonn, welches meine Arbeit maßgeblich bereichert und vorangetrieben hat.

Mein großer Dank gilt auch Dr. Henning von Alten für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit und zahlreiche Hinweise, Denkanstöße und Lösungsvorschläge, sowie die sehr hilfreiche Durchsicht dieser Arbeit.

Prof. Dr. H. Küster danke ich für die freundliche Übernahme der Drittprüfertätigkeit.

Prof. Dr. G. Dräger gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der biochemischen Analysen und die unentbehrliche und stets freundliche Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. J. Hallmann, der die Nematoden zur Verfügung stellte und mir den Einstieg in das Thema ermöglichte. Vielen Dank für die freundliche methodische und fachliche Hilfe!

Unentbehrlich waren mir die Ratschläge der Mitarbeiter der AG Sikora in Bonn. Hier danke ich vor Allem Dr. A. Schouten, Mohammed Selim und Andreas Kurtz. Ein Nachmittag im INRES hat meine Arbeit um Monate vorangetrieben, vielen Dank dafür.

Sebastian Menke bin ich sehr dankbar für seine unschätzbaren und ermutigenden Beistand bei statistischen Problemstellungen.

Natalie Röder und Claudia Marx haben mich im Labor stets gut gelaunt und tatkräftig unterstützt und mir ermöglicht, eine große Menge an Experimenten im gegebenen Zeitrahmen durchzuführen. Vielen Dank!

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Freunde Yvonne Koleczek, Eva Scholz und Jenny Kraul für viele wertvolle Gespräche, Ermutigung und moralische Unterstützung. Ihnen und den restlichen Mitarbeitern des IPP, insbesondere der AG Mykorrhiza danke ich für die gemeinsame Zeit und ein hervorragendes Arbeitsklima.

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt im Rahmen des Verbundprojektes „Protected cultivation - an approach to sustainable vegetable production in the humid tropics“. Dieses Projekt wurde von der DFG (DFG-Forschergruppe FOR 431) gefördert, welcher ich hiermit herzlich für die finanzielle Unterstützung danke.

Zuletzt genannt, aber zuerst bedacht: meine Familie, die mich in all der Zeit stets liebevoll unterstützt hat. Sönke, der mich auf jedem Meter dieses Weges so liebevoll und hilfreich begleitet und so sehr unterstützt hat, dass mir die Worte fehlen. Danke für Alles und noch viel mehr!

C. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfestellung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 21.09.2009

Christiane von den Berg