

3. Ergebnisse

3.1 Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Mais und Ackerbohne

Das vorliegende Forschungsprojekt war Bestandteil eines Schwerpunktprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft („Der Apoplast der höheren Pflanze: Speicher-, Transport- und Reaktionsraum“), innerhalb dessen bestimmte Kulturpflanzenarten aus Gründen der Einheitlichkeit der Versuchsanstellungen sowie der Vergleichbarkeit vorgeschrieben waren. Von diesen schienen Mais und Ackerbohne als Modellpflanzen geeignet, um den Wirkungsmechanismus der Resistenzauslösung nach Blattapplikationen von Phosphaten zu untersuchen.

Die erfolgreiche Auslösung von Resistenz nach Applikation verschiedener Phosphate gegenüber den Maispathogenen *Puccinia sorghi* (Maisrost) und *Setosphaeria turcica* (Northern Leaf Blight) war in mehreren Arbeiten beschrieben worden (Reuveni *et al.*, 1994a und b, 1996a). Des Weiteren konnten Walters und Murray (1992) zeigen, dass die Applikation von Phosphaten systemische Resistenz im System Ackerbohne/*Uromyces viciae-fabae* hervorrufen kann. Voraussetzung für die geplanten Arbeiten zum Wirkungsmechanismus von Phosphatverbindungen war zunächst die Etablierung der bereits beschriebenen Testsysteme, um anschließend in den Pflanzen die Prozesse näher zu charakterisieren, welche zur Auslösung von Krankheitsresistenz führen.

3.1.1 Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Mais

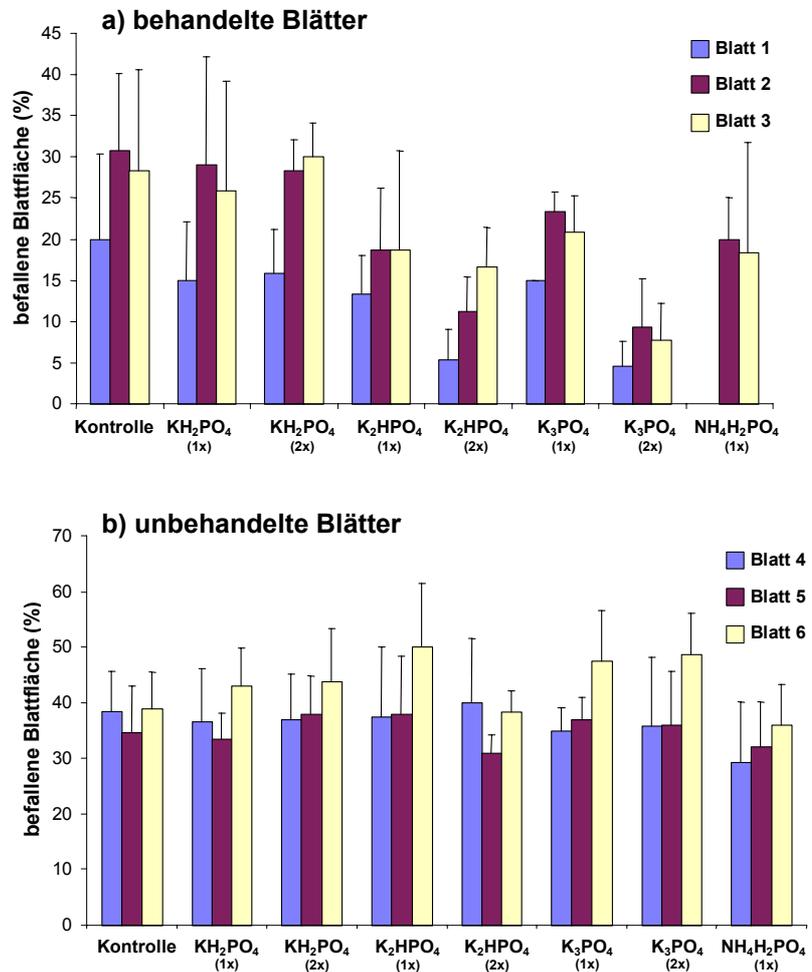
Generell gestalteten sich die Arbeiten mit Mais als relativ schwierig, so dass keine Etablierung eines stabilen Induktionssystems, in welchem reproduzierbar Resistenzauslösung möglich sein sollte, gelang. In Abb. 5 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments zur Quantifizierung der Ausprägung von lokaler (a) und systemischer (b) Krankheitsresistenz gegenüber dem Maisrosterreger *Puccinia sorghi* nach Blattapplikation von Phosphaten dargestellt. Die behandelten Blätter 1 - 3 wurden durch ein- oder zweimalige Applikation von KH_2PO_4 nicht gegenüber Rostbefall geschützt. Einmalige Behandlungen mit K_2HPO_4 und K_3PO_4 führten zu Befallsreduktionen von maximal 39 % bzw. 26 % gegenüber der Kontrolle. Durch Doppelbehandlungen mit K_2HPO_4 (2x) und K_3PO_4 (2x) in dreitägigem Abstand zwischen den Applikationsterminen konnten Befallsreduktionen von 73 % bzw. 77 % erreicht werden. Die Applikation von $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1x) führte zum Absterben des ersten Blattes und verminderte den Befall auf den Blättern 2 und 3 jeweils um 35 % (Abb. 5a). Anhand dieser Ergebnisse konnte somit eine lokale Wirkung di- und tribasischer Kaliumphosphate wie K_2HPO_4 und K_3PO_4 nachgewiesen werden. Systemische Effekte waren jedoch durch keine der Phosphatbehandlungen hervorzurufen, d. h. der Befall auf den unbehandelten,

3. ERGEBNISSE

höher inserierten Blättern vorbehandelter Pflanzen wurde gegenüber der Kontrollvariante nicht vermindert (Abb. 5b).

Abb. 5: Lokale (a) und systemische (b) Wirkung verschiedener Phosphate im System Mais/*Puccinia sorghi*

Die drei unteren Blätter 1 - 3 von Maispflanzen (*Zea mays* cv. Helix) wurden einmal (1x) oder zweimal (2x) mit verschiedenen Kaliumphosphaten bzw. Ammoniumphosphat behandelt. Die Konzentration der Phosphate betrug jeweils 100 mM. Die Doppelbehandlungen (2x) erfolgten in dreitägigem Abstand voneinander. Acht Tage nach der ersten Behandlung wurden die behandelten Blätter 1 - 3 sowie die höher inserierten Blätter 4 - 6 mit einer Uredosporensuspension (5×10^4 Sporen/ml) von *P. sorghi* inokuliert. Die Bestimmung der befallenen Blattfläche erfolgte 14 Tage nach der Inokulation. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.



Die befallsmindernden Effekte einiger Phosphatbehandlungen auf den behandelten Blättern (Abb. 5a) können möglicherweise auf direkten Wirkungen durch anhaftende Spritzbeläge der Salze auf die Sporen beruhen. Ein Hinweis dafür ist zudem der additive Effekt der zweimaligen Applikation der Phosphate im Vergleich zur einmaligen Applikation. Das in Abb. 5 dargestellte Experiment ist repräsentativ für zahlreiche durchgeführte Versuche im Testsystem Mais/*P. sorghi* und zeigt exemplarisch, dass keine eindeutige Auslösung systemisch aktivierter Resistenz nachgewiesen werden konnte, während direkte Effekte auf den behandelten Blättern durchaus zu erkennen waren. Zur Optimierung des Testsystems wurden diverse Versuchsparameter variiert. Getestet wurden verschiedene Maissorten, Anzuchtbedingungen, Düngungsintensitäten, Phosphatformen, Applikationstechniken und -intensitäten, Induktionsintervalle, Erregerstämme bzw. -isolate sowie Inokulumdichten. Nach Durchführung zahlreicher Versuche war es auch unter veränderten Bedingungen nur in einigen wenigen Experimenten möglich, schwach ausgeprägte systemische Phosphateffekte gegenüber dem Maisrost nachzuweisen.

Auch in Versuchen zur Resistenzauslösung gegenüber Northern Leaf Blight (*Setosphaeria turcica*) konnte durch Phosphatbehandlungen in keinem der durchgeführten Experimente Resistenz hervorgerufen werden (Daten nicht dargestellt).

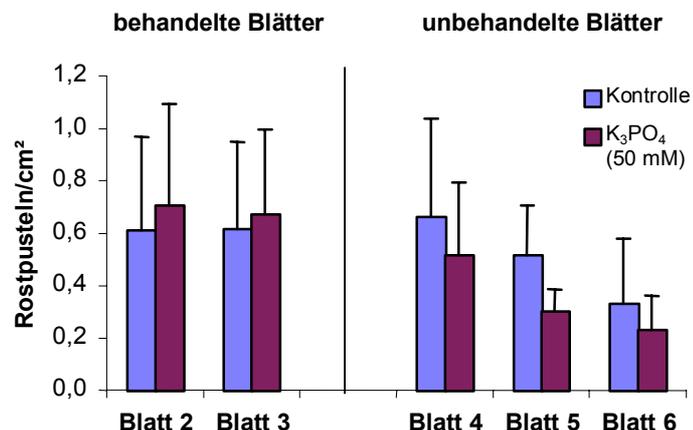
Aufgrund der unzureichenden Wirkung der getesteten Phosphate konnten Maispflanzen nicht für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Aufklärung von Wirkungsmechanismen der Phosphat-induzierten systemischen Resistenz eingesetzt werden.

3.1.2 Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Ackerbohne

Die Auslösung von Phosphat-induzierter Resistenz bei Ackerbohne sollte gegenüber dem Ackerbohnenrost *Uromyces viciae-fabae* getestet werden. Abb. 6 zeigt die lokale und systemische Wirkung von K_3PO_4 (repräsentativ für weitere getestete Phosphate) bei schwachem Infektionsdruck des Pathogens. Auf den behandelten Blättern 2 und 3 konnte keine befallsmindernde Wirkung der Phosphatbehandlung festgestellt werden. Auf den höher inserierten Blättern zeigte sich tendenziell zwar eine Abnahme des Befalls mit steigender Blattetage, doch konnte aufgrund der geringen Unterschiede zur Kontrolle sowie der starken Streuung kein klarer Effekt herausgearbeitet werden, so dass auch in diesem System keine eindeutige Auslösung systemisch induzierter Resistenz nachzuweisen war.

Abb. 6: Lokale und systemische Wirkung von K_3PO_4 im System Ackerbohne/*U. viciae-fabae*

Die drei unteren Blätter 1 - 3 von Ackerbohnenpflanzen (*Vicia faba* cv. Con Amore) wurden mit K_3PO_4 (50 mM) besprüht. Sieben Tage nach der Behandlung wurden die behandelten Blätter 2 - 3 sowie die Blätter 4 - 6 mit einer Uredosporensuspension von *U. viciae-fabae* (2×10^5 Sporen/ml) inokuliert. Die Bestimmung der Befallsintensität erfolgte sieben Tage nach der Inokulation. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.

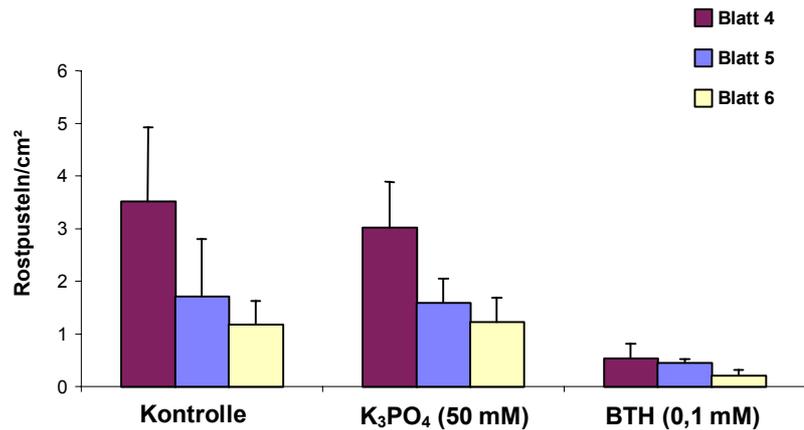


Dass eine Auslösung von SAR bei Ackerbohnen prinzipiell möglich ist, zeigt Abb. 7. Eine lokale Behandlung der Blätter 1 - 3 mit dem synthetischen Resistenzinduktor BTH (Bion[®]) führte auf den höher inserierten Blättern 4 - 6 zu einer Ausprägung von systemischer Resistenz, welche sich in Befallsreduktionen von 85, 74 und 83 % äußerte. Nach Vorbehandlung mit K_3PO_4 konnte auch bei diesem Experiment wiederum keine erfolgreiche Resistenzauslösung festgestellt werden.

3. ERGEBNISSE

Abb. 7: Systemische Wirkung von K_3PO_4 und BTH im System Ackerbohne/*U. viciae-fabae*

Die drei unteren Blätter 1 - 3 von Ackerbohnenpflanzen (*Vicia faba* cv. Con Amore) wurden mit K_3PO_4 (50 mM) bzw. BTH (0,1 mM) besprüht. Zehn Tage nach der Behandlung wurden die Blätter 4 - 6 mit einer Uredosporensuspension von *U. viciae-fabae* (5×10^5 Sporen/ml) inokuliert. Die Bestimmung der Befallsintensität erfolgte sieben Tage nach der Inokulation. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.



In einer Vielzahl weiterer Experimente mit dem System Ackerbohne/*U. viciae-fabae* konnte nur in wenigen Fällen eine schwache Resistenz-auslösende Wirkung von Phosphaten festgestellt werden. Darüber hinaus war auch gegenüber *Botrytis cinerea* keine Resistenzausprägung zu beobachten (Daten nicht dargestellt). Die Testung unterschiedlicher Phosphatverbindungen sowie die Variation der experimentellen Bedingungen brachten auch in diesen Systemen keine befriedigenden Ergebnisse (Daten nicht dargestellt), so dass auch diese Wirt-Pathogen-Interaktionen als Basis für weiterführende Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Phosphaten als Auslöser von SAR nicht geeignet erschienen.

Da sowohl bei Mais als auch bei Ackerbohnen keine stabile und reproduzierbare Induktion von systemischer Resistenz durch Blattapplikationen von Phosphaten hervorgerufen werden konnte, mussten andere biologischen Testsysteme herangezogen werden.

3.2 Experimente mit Gurken

Nachdem mit Mais und Ackerbohne kein stabiles Wirt-Pathogen-Testsystem bezüglich der Induktion von systemischer Resistenz durch Phosphatapplikationen etabliert werden konnte (3.1), sollten weitere in der Literatur bereits beschriebene Systeme in die Untersuchungen einbezogen werden. Dazu kam als Wirtspflanze insbesondere Gurke in Betracht, da bei dieser Kulturpflanzenart sowohl auf biotischem als auch auf abiotischem Wege Resistenz induziert werden kann. Zudem lagen auch umfangreiche Ergebnisse zu den physiologischen Vorgängen und Mechanismen der Auslösung von SAR insbesondere auf biotischem Wege mittels Vorinokulation mit Pathogenen vor (Jenns und Kuc, 1977; Caruso und Kuc, 1977a und b, 1979; Staub und Kuc, 1980; Gessler und Kuc, 1982a und b; Madamanchi und Kuc, 1991). Des Weiteren wurde ein Großteil der bisher publizierten Arbeiten über die Auslösung von Resistenz durch Phosphat an Gurkenpflanzen durchgeführt, wobei die Induktion systemischer Resistenz gegenüber acht verschiedenen viralen, bakteriellen sowie pilzlichen Pathogenen beschrieben wurde (Gottstein und Kuc, 1989; Mucharromah und

Kuc, 1991; Reuveni *et al.*, 1993a). Allerdings fanden bei diesen Arbeiten Studien zur Aufklärung der Wirkmechanismen von Phosphaten sowie zu Phosphat-induzierten physiologischen Prozessen keine bzw. kaum Berücksichtigung.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Prüfung der biologischen Wirksamkeit von Phosphaten als Resistenzinduktoren primär an der Wirt-Pathogen-Interaktion Gurke/*Colletotrichum lagenarium*, einem der Standardtestsysteme der SAR-Forschung. Weitere benutzte biologische Testsysteme waren Gurke/*Sphaerotheca fuliginea* (Echter Mehltau) sowie Gurke/*Pseudoperonospora cubensis* (Falscher Mehltau). Die Prüfung der biologischen Wirksamkeit von Phosphaten als Induktoren von SAR wurde unter verschiedenen Aspekten durchgeführt, wobei es zunächst galt, die bisher in der Literatur beschriebenen Grundphänomene zu bestätigen, um anschließend die zu Grunde liegenden Mechanismen charakterisieren zu können.

3.2.1 Induktion von lokaler und systemischer Resistenz in Gurkenpflanzen durch Vorbehandlungen mit Phosphaten

Die Induktionsexperimente bzw. Resistenzprüfungen an Gurkenpflanzen verliefen nach folgendem Grundschemata: Zur Induktion wurden die unteren Blätter ca. 3 - 6 Wochen alter Gurkenpflanzen mit Phosphaten bzw. mit diversen zu testenden Verbindungen behandelt. Die biotische Induktion erfolgte durch Inokulation mit dem Nekrose-auslösenden Tabaknekrosevirus (TNV), während als weitere Positivkontrolle i. d. R. der synthetische Pflanzenaktivator BTH appliziert wurde. Die behandelten sowie die unbehandelten, höher inserierten Blätter der vorbehandelten Pflanzen wurden nach einem definierten Zeitintervall mit den Pathogenen inokuliert (Challenge-Inokulation). Dieser Zeitraum zwischen Induktorbehandlung und Pathogeninokulation wird allgemein als Induktionsintervall bezeichnet und wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Versuchsfrage variiert. In der überwiegenden Anzahl der Experimente betrug es jedoch 5 - 7 Tage. Während dieser Periode erfolgte auch die Probenahme für weitergehende biochemische Untersuchungen. Das Ausmaß der durch das inokulierte Pathogen hervorgerufenen Krankheitsausprägung wurde nach dem Sichtbarwerden der Krankheitssymptome ca. 7 - 14 Tage nach der Challenge-Inokulation quantifiziert. Durch diese Versuchsanstellung, d. h. lokale Applikation der Induktoren auf untere Blätter und Inokulation unbehandelter, distaler Blätter, konnte eine räumliche Trennung zur exakten Erfassung der systemischen Wirkung gewährleistet werden.

3. ERGEBNISSE

3.2.1.1 Induktion lokaler Resistenz durch Phosphate

Obwohl in der vorliegenden Untersuchung die durch Phosphat hervorgerufene systemische Wirkung im Vordergrund stehen sollte, wurde zunächst auch die Ausprägung von lokaler Resistenz untersucht. Diese manifestiert sich in einer gesteigerten Abwehr gegenüber Pathogenen auf dem behandelten Blatt bzw. in unmittelbarer räumlicher Nähe zum Applikationsort des Induktors.

Ein typisches Ergebnis der erfolgreichen Auslösung von lokaler Resistenz in Gurkenpflanzen durch eine Blattapplikation von Phosphat zeigt Tab. 5. Hierbei wurde K_2HPO_4 auf die Unterseite des ersten Blattes gesprüht, während die Inokulation mit *C. lagenarium* auf den Blattoberseiten erfolgte, so dass durch diese räumliche Trennung direkte Effekte von K_2HPO_4 -Rückständen auf den Pilz weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Die Resistenz äußerte sich nach einem Induktionsintervall von 7 Tagen in der Reduktion der Anzahl der nekrotischen Läsionen auf den behandelten Blättern um 47 % gegenüber den Kontrollblättern sowie in der Reduktion des mittleren Durchmessers der durch *C. lagenarium* hervorgerufenen Läsionen um 39 %. Als weiterer Parameter wurde die nekrotische Blattfläche anhand der Läsionenanzahl/Blatt und der Läsionendurchmesser berechnet, so dass sich der lokale Effekt der Vorbehandlung mit K_2HPO_4 bei diesem Experiment in einer Minderung der befallenen Blattfläche um 80 % auf dem behandelten Blatt äußerte (Daten nicht dargestellt).

Tab. 5: Auslösung lokaler Resistenz durch K_2HPO_4 im System Gurke/*C. lagenarium*

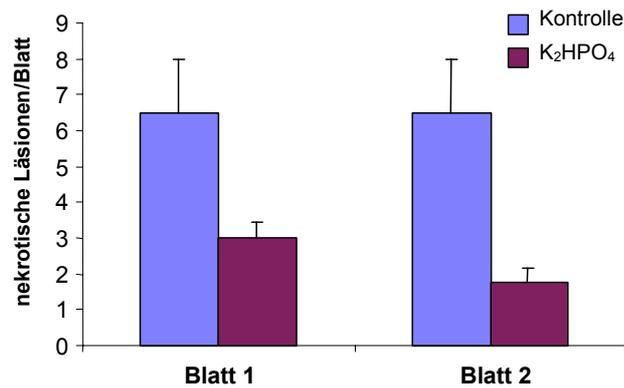
Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Delikatess) wurde auf der Unterseite mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht und für 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Sieben Tage nach der Induktorbehandlung wurden das behandelte Blatt 1 auf der Oberseite mit 20 Tropfen je 10 μ l einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. Sieben Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der nekrotischen Läsionen und deren Durchmesser bestimmt. Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.

| | Läsionen/Blatt | | Durchmesser (mm) | |
|------------------------------|----------------|-------|------------------|-------|
| Kontrolle | 17,7 | (2,1) | 3,8 | (0,8) |
| K_2HPO_4 | 9,3 | (3,6) | 2,3 | (1,1) |

In weiteren Experimenten wurde der Induktor auf eine Blatthälfte appliziert und die unbehandelte Blatthälfte mit *C. lagenarium* inokuliert. Die Anzahl der nekrotischen Läsionen konnte dabei um 54 % (Blatt 1) bzw. 73 % (Blatt 2) verringert werden (Abb. 8). Zudem wurde auch hier eine deutliche Reduktion der Läsionendurchmesser beobachtet (Daten nicht dargestellt).

Abb. 8: Induktion von lokal aktivierter Resistenz durch K_2HPO_4 im System Gurke/*C. lagenarium*

Die rechten Blatthälften der Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. Sieben Tage nach der Induktorbehandlung wurden die unbehandelten linken Blatthälften mit 10 Tropfen je 10 μ l einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. Sieben Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der nekrotischen Läsionen bestimmt.



Anhand der dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Blattbehandlungen mit K_2HPO_4 lokale Resistenz gegenüber einem Pathogenangriff durch *C. lagenarium* am Applikationsort (Tab. 5) und im angrenzenden Gewebe (Abb. 8) auslösen. Während bei Experimenten zur Untersuchung der systemischen Wirkung eine räumliche Trennung zwischen Applikationsort und Inokulationsort gegeben ist, lassen sich lokale Effekte von Phosphaten gegenüber pilzlichen Pathogenen generell schwieriger experimentell dokumentieren. Zum einen kann die Behandlung zu einer Veränderung bzw. Schädigung des behandelten Gewebes führen (3.2.5), zum anderen sind direkte Einflüsse auf die Sporenkeimung und den Infektionsprozess aufgrund von verbliebenen Phosphatrückständen als Spritzbeläge möglich. Durch die beiden dargestellten experimentellen Ansätze, Behandlung der Blattunterseite und Inokulation der Blattoberseite bzw. Behandlung der einen Blatthälfte und Inokulation der anderen Blatthälfte, konnten mögliche direkte Einflüsse von Rückständen der Induktoren weitgehend ausgeschlossen werden. Somit scheint eine Ausprägung von lokaler Resistenz nach Phosphatbehandlungen vorzuliegen.

3.2.1.2 Untersuchungen zur direkten Wirkung von Phosphat auf *Colletotrichum lagenarium*

Ein Kriterium, welches ein Resistenzinduktor nach Kessmann *et al.* (1994a) erfüllen muss, ist das Fehlen einer direkten Wirkung gegenüber Pathogenen. Somit dürfen beispielsweise keine antifungalen Effekte durch den Induktor hervorgerufen werden. Zur Prüfung dieses Kriteriums wurde die direkte Wirkung von K_2HPO_4 *in-vitro* auf das Myzelwachstum sowie auf die Sporenkeimung von *C. lagenarium* untersucht.

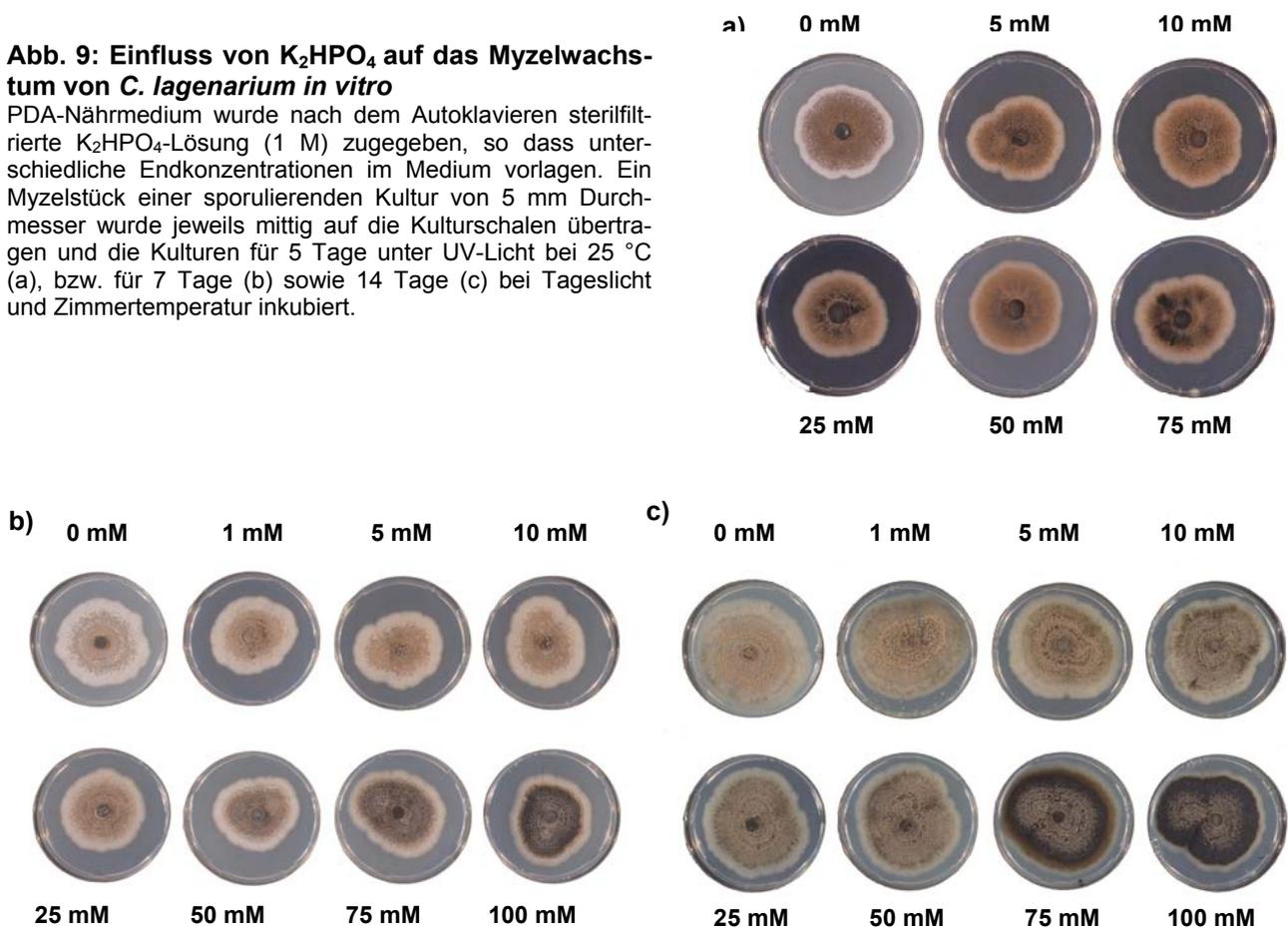
3. ERGEBNISSE

3.2.1.2.1 Einfluss von K_2HPO_4 auf das Myzelwachstum von *Colletotrichum lagenarium*

Colletotrichum lagenarium wurde auf PDA-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von K_2HPO_4 (1 - 100 mM) unter kontinuierlichem UV-Licht bzw. bei Tageslicht und Zimmertemperatur kultiviert. Ein hemmender Effekt auf das Myzelwachstum war während der Kulturdauer von 14 Tagen nicht zu beobachten (Abb. 9a - c). Makroskopisch erkennbare Unterschiede im Wuchsbild waren jedoch mit steigender K_2HPO_4 -Konzentration bei Kultivierung unter Tageslicht und Zimmertemperatur erkennbar. So war das Myzel ab 50 mM K_2HPO_4 deutlich dunkler, was auf eine vermehrte Einlagerung von Melanin in die Hyphen hindeutet (Abb. 9b und c). Unter UV-Licht war eine leichte Hemmung der Sporulation bei höheren Konzentrationen zu erkennen, so dass weniger Sporenlager bei 50 - 100 mM K_2HPO_4 vorhanden waren (Abb. 9a). Bei der Inkubation unter Tageslicht und Zimmertemperatur zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Sporulation, so dass keine Einschränkung der Vitalität des Pathogens unter diesen Bedingungen zu beobachten war.

Abb. 9: Einfluss von K_2HPO_4 auf das Myzelwachstum von *C. lagenarium in vitro*

PDA-Nährmedium wurde nach dem Autoklavieren sterilt gefilterte K_2HPO_4 -Lösung (1 M) zugegeben, so dass unterschiedliche Endkonzentrationen im Medium vorlagen. Ein Myzelstück einer sporulierenden Kultur von 5 mm Durchmesser wurde jeweils mittig auf die Kulturschalen übertragen und die Kulturen für 5 Tage unter UV-Licht bei 25 °C (a), bzw. für 7 Tage (b) sowie 14 Tage (c) bei Tageslicht und Zimmertemperatur inkubiert.

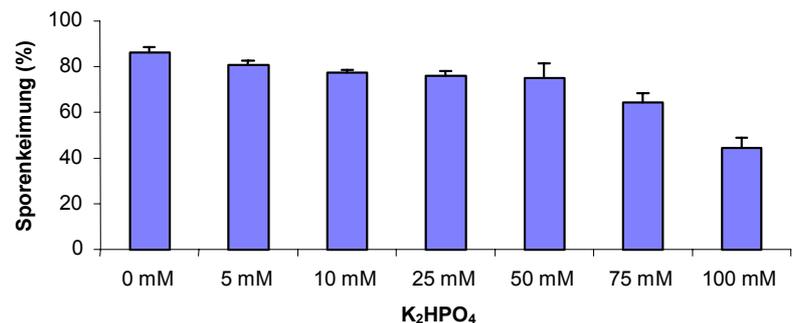


3.2.1.2 Einfluss von K_2HPO_4 auf die Konidienkeimung von *Colletotrichum lagenarium*

Die Keimrate der Konidien von *C. lagenarium* auf Agar ohne Phosphatzusatz betrug 86 %. Bis zu einer K_2HPO_4 -Konzentration von 50 mM im Medium wurde diese kaum negativ beeinflusst. Erst ab 75 bzw. 100 mM K_2HPO_4 wurden geringere Keimraten von 64 % bzw. von 44 % ermittelt (Abb. 10). Zudem wurde ab 50 mM K_2HPO_4 eine Verkürzung der Keimschläuche beobachtet, welche aber aufgrund des ungleichmäßigen Keimungsverhaltens des Pilzes nicht exakt quantifiziert werden konnte (Daten nicht dargestellt).

Abb. 10: Einfluss von K_2HPO_4 auf die Sporenkeimung von *C. lagenarium*

Wasseragar (2 %) wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte K_2HPO_4 -Lösung (1 M) zugegeben, so dass unterschiedliche K_2HPO_4 -Konzentrationen von 5, 10, 25, 50, 75 und 100 mM vorlagen. Die Kulturschalen wurden mit einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (5×10^5 Sporen/ml) besprüht und für 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Keimung von jeweils 100 Sporen/Kulturschale wurde bestimmt.



3.2.1.3 Systemische Resistenzinduktion durch Phosphate

3.2.1.3.1 Phosphat-induzierte systemische Resistenz im System Gurke/*Colletotrichum lagenarium*

Um zu prüfen, ob die in der Literatur beschriebene Auslösung von systemischer Resistenz im System Gurke/*C. lagenarium* unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen möglich ist, wurden zahlreiche Experimente unternommen, bei denen eine lokale Behandlung mit Phosphaten auf den unteren Blättern erfolgte und eine nachfolgende Challenge-Inokulation mit *C. lagenarium* auf den unbehandelten, distalen Blättern durchgeführt wurde.

In Abb. 11 ist das Grundphänomen der Phosphat-induzierten systemischen Resistenz gegenüber der Brennfleckenkrankheit dargestellt. Während die Blätter von Kontrollpflanzen nach Sprüh- (Abb. 11a) bzw. Tropfeninokulation (Abb. 11b) mit dem Pathogen zahlreiche chlorotische sowie nekrotische Läsionen als Krankheitssymptome aufwiesen, waren diese auf den unbehandelten Blättern Phosphat-vorbehandelter Pflanzen bezüglich der Anzahl, der befallenen nekrotischen Blattfläche und somit der Intensität der Schädigung stark reduziert.

3. ERGEBNISSE

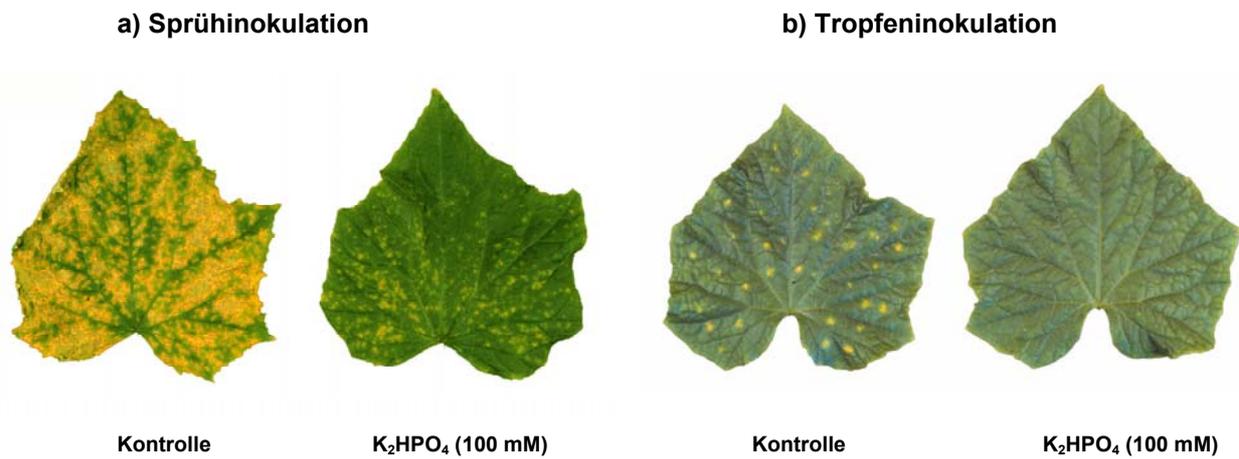


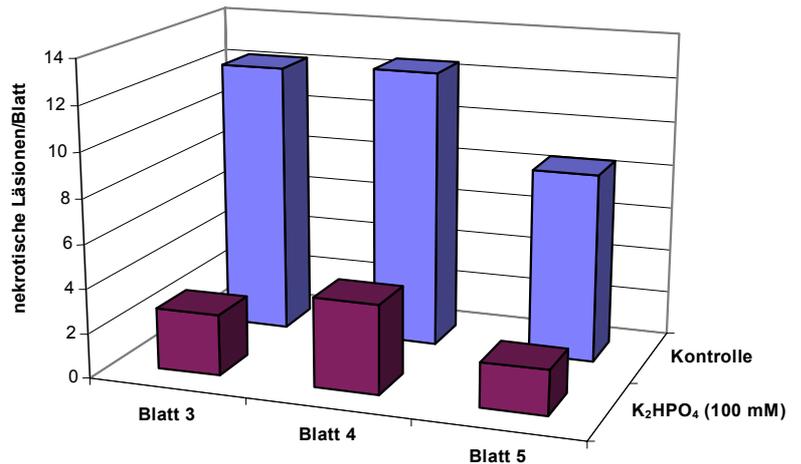
Abb. 11: Systemische Wirkung von Blattapplikationen mit K_2HPO_4 im System Gurke/*C. lagenarium*

Die jeweils beiden unteren Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (a: cv. Delikateß; b: cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. Sieben Tage nach Behandlung wurden die beiden höher inserierten Blattetagen 3 und 4 mit Sporensuspensionen von *C. lagenarium* inokuliert: a) Sprühinokulation mit $2,5 \times 10^5$ Sporen/ml; b) Tropfeninokulation mit 10^6 Sporen/ml und 30 Tropfen (je $10 \mu\text{l}$) pro Blatt. Dargestellt sind die Blätter der Blattetage 4, sieben Tage (a) bzw. zehn Tage (b) nach der Inokulation. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.

Die Sprühinokulation entspricht aufgrund der sich ergebenden Symptomausprägung zwar am ehesten einer Infektion unter natürlichen Bedingungen, doch kann der Befall nicht exakt quantifiziert werden, sondern muss visuell geschätzt werden. Die Tropfeninokulation, Auftragen von 10 - 30 Tropfen (je 5 - $10 \mu\text{l}$) einer Sporensuspension pro Blatt, bietet demgegenüber die Möglichkeit einer genaueren Quantifizierung der Schadsymptome, da die Anzahl der hervorgerufenen chlorotischen und nekrotischen Läsionen sowie der Läsionendurchmesser exakt bestimmt werden kann. Anhand dieser Parameter ist eine Berechnung der nekrotischen Fläche der Einzelläsionen sowie der gesamten nekrotischen Fläche eines Blattes möglich. Die quantitative Auswertung eines typischen Ergebnisses einer Resistenzprüfung nach Blattapplikation von K_2HPO_4 im System Gurke/*C. lagenarium* ist in Abb. 12 dargestellt. Die unteren beiden Blätter 1 - 2 wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) behandelt und die Blätter 3 - 5 nach einem Induktionsintervall von vier Tagen inokuliert. Bereits nach diesem relativ kurzen Induktionsintervall konnte eine systemische Resistenzlösung gegenüber *C. lagenarium* auf den unbehandelten Blättern festgestellt werden, die sich in einer Reduktion der Anzahl der durch den Pilz hervorgerufenen Läsionen um 78, 68 und 76 % (Blatt 3 - 5) äußerte.

Abb. 12: Systemische Wirkung einer Blattapplikation mit K_2HPO_4 auf die Krankheitsausprägung im System Gurke/*C. lagenarium*

Die beiden unteren Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (cv. Chinesische Schlangen) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht und für 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Vier Tage nach der Induktorbehandlung wurden die höher inserierten Blätter 3 und 4 mit je 20 Tropfen sowie Blatt 5 mit je 10 Tropfen je 10 μ l einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. Sieben Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der gebildeten nekrotischen Läsionen bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis mehrfach wiederholter Versuche.



Zum Applikationszeitpunkt des Induktors waren die behandelten Blätter 1 - 2 bereits vollständig ausgebildet, während die Blätter 3 - 4 sich noch im Wachstum befanden und Blatt 5 gerade erst angelegt wurde. Die lokale Applikation von Phosphat auf die älteren Blätter führte somit zu einem Schutz der bereits ausgebildeten Blätter sowie des Neuzuwachses. Dieses, immer wieder beobachtete Phänomen lässt vermuten, dass durch die Phosphatbehandlung Signale in den behandelten Blättern generiert und in die unbehandelten Blätter transloziert werden, die dort an der Auslösung von SAR beteiligt sind.

3.2.1.3.2 Phosphat-induzierte Resistenz gegenüber weiteren Pathogenen an Gurkenpflanzen

Zur weiteren Charakterisierung der biologischen Wirksamkeit von Phosphatverbindungen wurden die Wirt-Pathogensysteme Gurke/*Sphaerotheca fuliginea* sowie Gurke/*Pseudoperonospora cubensis* in die Untersuchungen einbezogen.

Testsystem Gurke/*Sphaerotheca fuliginea*

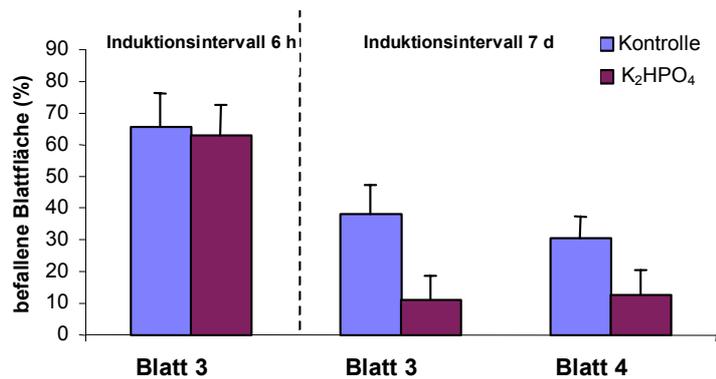
In Abb. 13 ist das Ergebnis eines Induktionsexperiments mit K_2HPO_4 im System Gurke/*S. fuliginea* dargestellt. Zusätzlich wurde das Induktionsintervall (6 h bzw. 7 d) variiert. Ein kurzes Induktionsintervall von 6 h erwies sich als nicht ausreichend, um Resistenz gegenüber dem Echtem Mehltau auszulösen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Reuveni *et al.* (1993a), die bereits 2 h nach lokaler Blattapplikation von K_2HPO_4 die Ausprägung von SAR in diesem Testsystem beobachten konnten. Im vorliegenden Versuch war jedoch, bei Einhaltung identischer experimenteller Bedingungen, nur bei Ausweitung des Induktionsintervalls auf 7 Tage eine Befallsminderungen auf den unbehandelten Blättern zu erreichen. Die befallene Blattfläche wurde gegenüber der Kontrollvariante um 71 % (Blatt 3) bzw. 58 % (Blatt 4) reduziert und lag somit in einer Größenordnung wie in der Literatur beschrieben (Reuveni *et al.*, 1993a; 1995; 1996b; 1997). Die Ergebnisse weiterer

3. ERGEBNISSE

Experimente zeigten, dass ein Induktionsintervall von mindestens drei Tagen notwendig war, um Resistenz gegenüber Echtem Mehltau hervorzurufen (Daten nicht dargestellt).

Abb. 13: Systemische Wirkung von K_2HPO_4 im System Gurke/*S. fuliginea*

Die beiden unteren Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (cv. Delila) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. 6 h bzw. 7 d nach der Induktorbehandlung wurden das höher inserierte Blatt 3 (Induktionsintervall 6 h) bzw. die Blätter 3 und 4 (Induktionsintervall 7 d) mit einer Sporensuspension von *S. fuliginea* (2×10^5 Sporen/ml) inokuliert. Zehn Tage nach der Inokulation wurde die mit Mehltaupusteln befallene Blattfläche geschätzt.

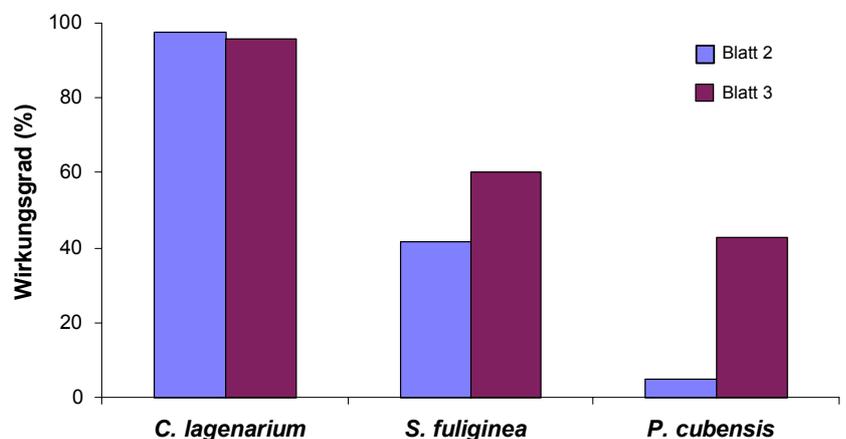


Vergleich der Wirksamkeit von Phosphatverbindungen bei der Resistenzauslösung gegenüber unterschiedlichen pilzlichen Pathogenen

Zum quantitativen Vergleich der Wirkungsgrade von Phosphatbehandlungen wurden Gurkenpflanzen mit verschiedenen pilzlichen Pathogenen (*C. lagenarium*, *S. fuliginea*, *P. cubensis*) inokuliert (Abb. 14). Die stärksten Befallsminderungen um mehr als 90 % wurden gegenüber *C. lagenarium* beobachtet, während geringere Wirkungsgrade von 5 - 43 % gegenüber *P. cubensis* sowie von 40 - 60 % gegenüber *S. fuliginea* festgestellt werden konnten.

Abb. 14: Systemische Wirkung einer Blattapplikation von K_2HPO_4 gegenüber *C. lagenarium*, *S. fuliginea* und *P. cubensis*

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K_2HPO_4 (50 mM) besprüht und für 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Sieben Tage nach der Induktorbehandlung erfolgte die Inokulation der unbehandelten Blätter 2 - 3 mit Sporensuspensionen von *C. lagenarium* (25 Tropfen je 10 μ l pro Blatt, 10^6 Sporen/ml), *P. cubensis* (10^3 Sporangien/ml) bzw. *S. fuliginea* ($7,5 \times 10^3$ Sporen/ml). Sieben Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der gebildeten Läsionen (*C. lagenarium*) bzw. die befallene Blattfläche (*P. cubensis*, *S. fuliginea*) bestimmt und die entsprechenden Wirkungsgrade berechnet.



In diesem Experiment sowie aus weiteren nicht dargestellten Versuchen wurde deutlich, dass im System Gurke/*C. lagenarium* stets die absolut höchsten Wirkungsgrade von über 90 % bis hin zum vollständigen Ausbleiben der Symptome erreicht werden konnten. Gegenüber den beiden Mehltau-Erregern war stets ein Restbefall zu beobachten und nur in wenigen Fällen ließen sich wirklich hohe Wirkungsgrade feststellen. Die in der überwiegenden Zahl der Experimente nachweisbaren

Befallsreduktionen durch Phosphate lagen gegenüber Echtem Mehltau bei 20 - 60 %, gegenüber Falschem Mehltau bei 10 - 50 %. Da im System Gurke/*C. lagenarium* durch Phosphatbehandlungen die höchsten Wirkungsgrade erzielt werden konnten, wurden die weiteren Untersuchungen mit diesem Modellsystem durchgeführt.

3.2.1.3.3 Charakterisierung der Phosphat-induzierten Resistenz im System Gurke/*Colletotrichum lagenarium*

Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Ausprägung von SAR

Während bei den bisher durchgeführten Versuchen relativ hohe Phosphatkonzentrationen zwischen 50 - 100 mM zum Einsatz kamen, wurde in weiteren Experimenten zusätzlich die Wirkung über einen breiteren Konzentrationsbereich von 10 - 100 mM K_2HPO_4 untersucht (Abb. 15). Die Blattapplikation einer niedrigen Konzentration von 10 mM K_2HPO_4 zeigte nur geringe Wirkung auf die Unterdrückung der Krankheitssymptome, wogegen bei 25 mM K_2HPO_4 bereits eine deutliche Befallsreduktion zu beobachten war (Abb. 15a und b). Es war somit eine mit zunehmender K_2HPO_4 -Konzentration gesteigerte Wirkung gegenüber dem Brennfleckererreger zu erkennen, die sich bei 100 mM K_2HPO_4 sowohl nach Sprüh- als auch nach Tropfeninokulation in einer nahezu vollständigen Unterdrückung der Symptome manifestierte.

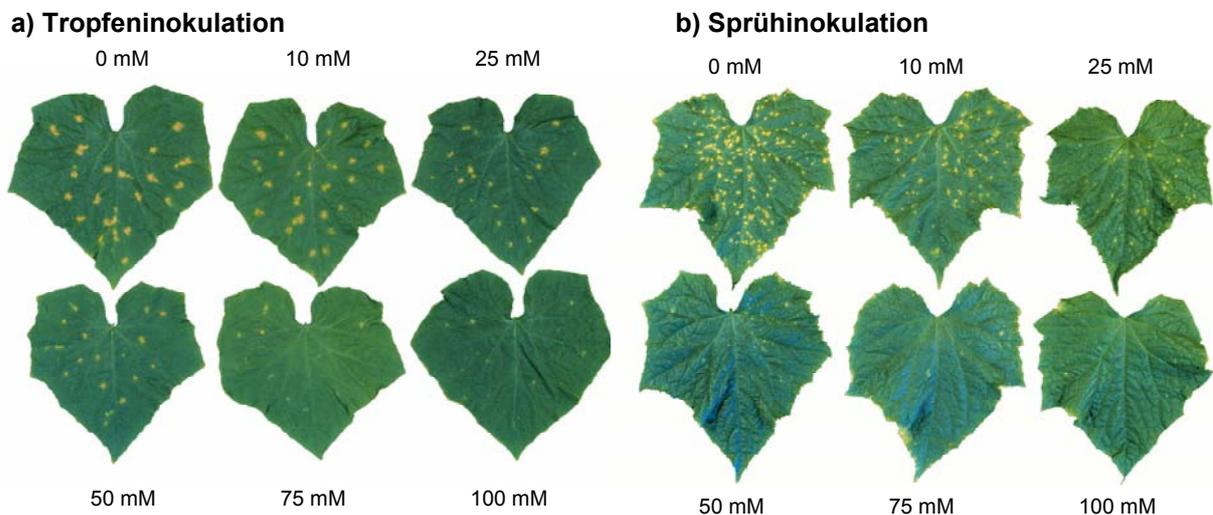


Abb. 15: Einfluss der Phosphatkonzentration auf die Ausprägung von systemisch aktivierter Resistenz im System Gurke/*Colletotrichum lagenarium*

a) Tropfeninokulation: Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden durch Sprühen der Blätter 1 und 2 mit K_2HPO_4 vorbehandelt. Die Tropfeninokulation auf dem distalen Blatt 3 erfolgte nach sieben Tagen mit 25 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml). Abgebildet ist das 3. Blatt, sieben Tage nach Inokulation.

b) Sprühinokulation: Gurkenpflanzen (cv. Delikateß) wurden durch Sprühen der Blätter 1 und 2 mit K_2HPO_4 vorbehandelt. Die Sprühinokulation auf dem distalen Blatt 3 erfolgte nach zehn Tagen durch Besprühen mit einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (2×10^5 Sporen/ml). Abgebildet ist das 3. Blatt, sechs Tage nach Inokulation. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.

3. ERGEBNISSE

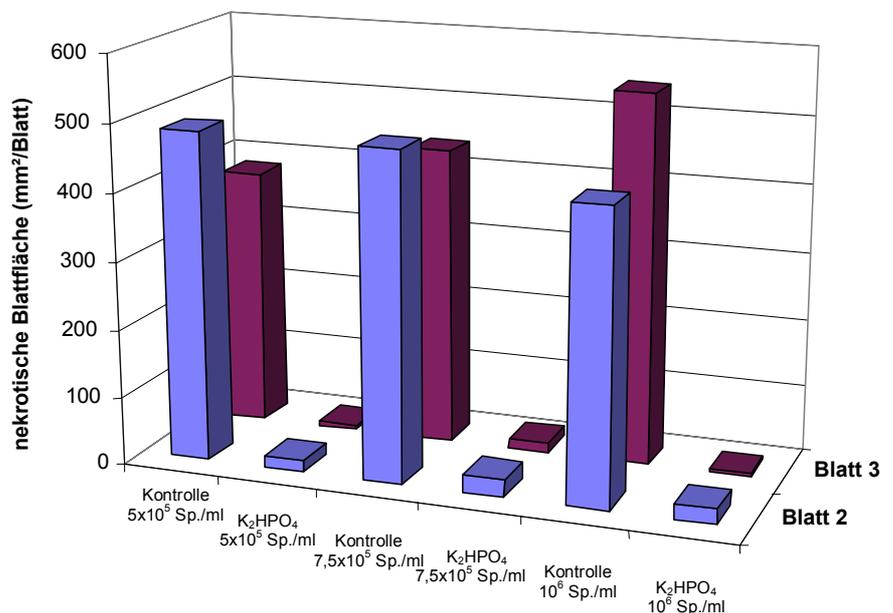
In weiteren Experimenten zur Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration konnte bestätigt werden, dass ab 25 mM K_2HPO_4 bereits deutliche befallsmindernde Effekte auftreten, die jedoch bei Konzentrationen von 50 mM und höher zusätzlich gesteigert werden konnten (Daten nicht dargestellt). Daraus kann abgeleitet werden, dass für eine sichere Wirkung Phosphatkonzentrationen von 50 - 100 mM eingesetzt werden müssen.

Einfluss der Inokulumdichte auf die Ausprägung von Phosphat-induzierter Resistenz

Der Einfluss der Inokulumdichte bzw. Konidienkonzentration bei der Inokulation mit *C. lagenarium* wurde an Phosphat-behandelten Pflanzen getestet (Abb. 16). Die quantitative Ausprägung der Resistenz war bei den hier getesteten Inokulumdichten nicht vom Infektionsdruck abhängig. Sowohl niedrige (5×10^5 Sporen/ml), mittlere ($7,5 \times 10^5$ Sporen/ml) als auch hohe (10^6 Sporen/ml) Inokulumdichten ergaben keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Krankheitssymptome, so dass stets Wirkungsgrade von über 95% Befallsreduktion im Vergleich zu Kontrollpflanzen erreicht wurden. Der Grad der Resistenzausprägung erwies sich über den getesteten Bereich als unabhängig von der Inokulumdichte. Somit konnte eine Resistenzreaktion, die oftmals nur bei niedrigem Inokulumdichten beobachtet wird, ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit *C. lagenarium* i. d. R. Inokulumkonzentrationen von 10^6 Sporen/ml eingesetzt.

Abb. 16: Einfluss der Inokulumkonzentration auf die Ausprägung von SAR im System Gurke/*C. lagenarium*

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) gesprüht. Sieben Tage nach der Behandlung erfolgte die Inokulation der unbehandelten, höher inserierten Blätter 2 und 3 mit 20 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (5×10^5 , $7,5 \times 10^5$ bzw. 10^6 Sporen/ml). Sieben Tage nach der Inokulation wurde die nekrotische Blattfläche nach Bestimmung der Läsionenanzahl sowie der Läsionendurchmesser berechnet.



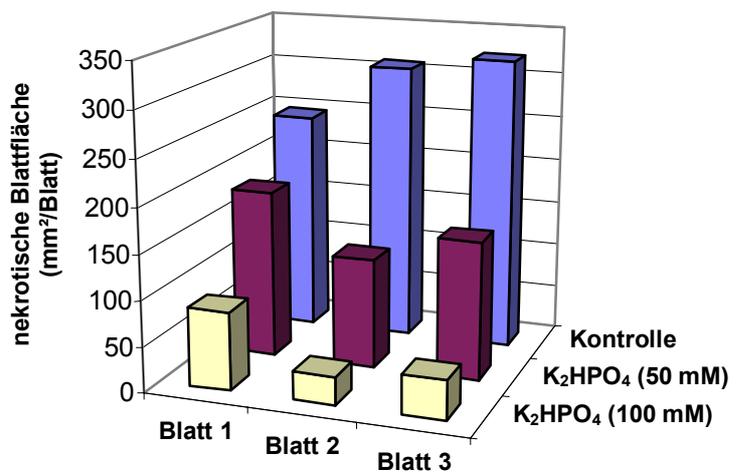
Auslösung von Phosphat-induzierter Resistenz durch Behandlung der Kotyledonen

Die Applikation von Phosphaten auf die Kotyledonen kann - ebenso wie die Behandlung der Blätter - systemische Resistenz in höher inserierten Pflanzenteilen induzieren (Abb. 17). Die Vorbehandlung der Kotyledonen mit 50 mM K_2HPO_4 reduzierte die befallene nekrotische Blattfläche auf den

Blättern 1 - 3 um 25 - 60 %, wogegen mit 100 mM K_2HPO_4 die Wirkungsgrade bis auf 65 - 90 % gesteigert werden konnten. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Vorbehandlung einer relativ kleinen Oberfläche, wie sie bei Kotyledonen von Gurkenpflanzen gegeben ist, eine Steigerung des Abwehrpotentials in dem flächenmäßig weit größeren und physiologisch jüngeren Blättern bewirkt. Interessant ist auch hierbei die Beobachtung, dass zum Zeitpunkt der Behandlung das Blatt 2 sich erst zu entfalten begann, während Blatt 3 gerade angelegt wurde. Auch hier kann vermutet werden, dass ein systemischer Schutz durch die Bildung sowie anschließende Translokation eines Signals aus den Kotyledonen in die noch nicht ausdifferenzierten bzw. wachsenden Gewebe aufgebaut wurde.

Abb. 17: Systemische Wirkung einer Blattapplikation von K_2HPO_4 auf die Kotyledonen im System Gurke/*C. lagenarium*

Die Kotyledonen von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (50 mM bzw. 100 mM) gesprüht. Nach acht Tagen erfolgte die Inokulation der Blätter 1 - 3 mit jeweils 10 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension (10^6 Sporen/ml) von *C. lagenarium*. Die Bestimmung der nekrotischen Blattfläche erfolgte 12 Tage nach der Inokulation. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.



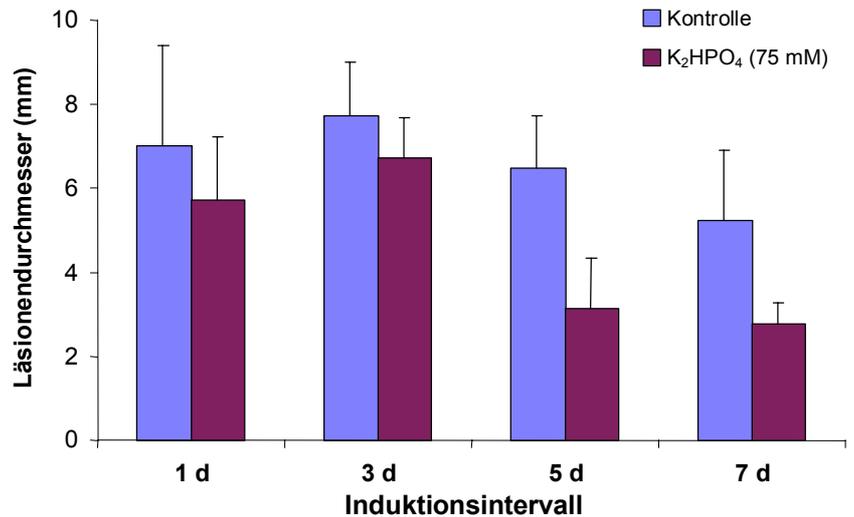
Ermittlung des notwendigen Induktionsintervalls zur Auslösung von systemisch aktivierter Resistenz

Unter dem Induktionsintervall versteht man den Zeitraum zwischen Induktorapplikation und der Inokulation mit einem Pathogen. Dieses wird als eine wesentliche Voraussetzung für das Vorliegen von SAR angesehen. Exemplarisch für mehrere durchgeführte Versuche sind in Abb. 18 die Ergebnisse eines Versuchs zur Ermittlung des notwendigen Induktionsintervalls dargestellt. Der Läsionendurchmesser auf dem ersten unbehandelten Blatt 2 nach Vorbehandlung der Kotyledonen und von Blatt 1 mit K_2HPO_4 unterschied sich nach dreitägigem Induktionsintervall nicht von der Kontrolle. Erst nach einem Induktionsintervall von fünf Tagen waren die Läsionendurchmesser auf Phosphat-vorbehandelten Pflanzen um über 50 % verringert. Ebenso war die Anzahl der Läsionen erst nach einem Intervall von 5 Tagen reduziert und konnte durch Verlängerung auf 7 Tage nicht gesteigert werden. Auch auf der nächsthöheren Blattetage (Blatt 3) war ein Induktionsintervall von 5 Tagen zur SAR-Auslösung notwendig (Daten nicht dargestellt).

3. ERGEBNISSE

Abb. 18: Bestimmung des notwendigen Induktionsintervalls für die Ausprägung von SAR im System Gurke/*C. lagenarium* nach Applikation von K_2HPO_4

Die Kotyledonen sowie das erste Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit einer Lösung von K_2HPO_4 (75 mM) besprüht. Im Abstand von 1, 3, 5 und 7 d nach der Behandlung wurde das unbehandelte Blatt 2 mit 20 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. Der Durchmesser der nekrotischen Pflanzläsionen wurde sieben Tage nach der Inokulation bestimmt.



Anhand der Ergebnisse aus mehreren Experimenten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass ein Induktionsintervall von mindestens 3 - 4 Tagen zur Ausprägung eines hohen Grades an systemischer Resistenz nach Induktion mit Phosphaten notwendig zu sein scheint.

Ermittlung der notwendigen Verweildauer des Induktorblattes zur Auslösung von systemisch aktivierter Resistenz

Während das Induktionsintervall die gesamte Zeitspanne von der Induktorbehandlung bis zur Ausprägung der SAR kennzeichnet, ist die Zeit, welche für die Bildung und Translokation von potentiellen Signalmolekülen notwendig ist, im Allgemeinen kürzer und kann experimentell durch Variation der Verweildauer des Induktorblattes charakterisiert werden (Dean und Kuc, 1986 und 1987b). Nach Behandlung des ersten entwickelten Blattes von Gurkenpflanzen mit K_2HPO_4 wurde dieses Blatt nach definierten Einwirkungszeiten jeweils durch Abschneiden entfernt. Das Induktionsintervall betrug bei allen Behandlungen weiterhin 7 Tage. Verblieb das Induktorblatt nur wenige Stunden (3 - 12 h) an den Pflanzen, so wurden in den darüber liegenden Blättern 2 und 3 nur geringe Wirkungsgrade (15 % bzw. 26 % Befallsreduktion) festgestellt (Abb. 19). Wurde das Induktorblatt für 24 h an der Pflanze belassen, so konnten die Brennfleckensymptome auf Blatt 2 zu 53 % bzw. auf Blatt 3 zu 66 % vermindert werden. Durch noch längere Verweilzeiten von 48 h bzw. 72 h konnten die Wirkungsgrade weiter gesteigert werden (52 - 93 %), während das Belassen des Induktorblattes an der Pflanzen über das gesamte Induktionsintervall zu maximalem Schutz (99 %) führte.

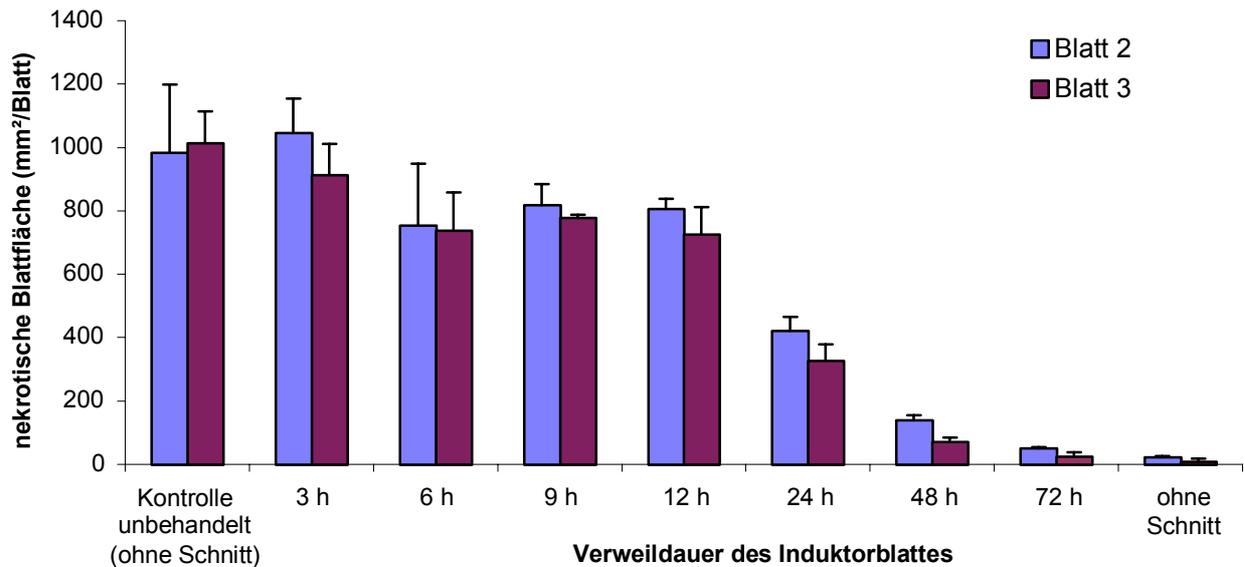


Abb. 19: Ausprägung von SAR im System Gurke/*C. lagenarium* in Abhängigkeit von der Verweildauer des Induktorblattes an der Pflanze

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) gesprüht. Dieses behandelte Blatt wurde nach definierten Zeitintervallen abgeschnitten bzw. bei einer Variante an der Pflanze belassen. Die Inokulation erfolgte sieben Tage nach der Induktorbehandlung durch Auftragen einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) auf Blatt 2 (25 Tropfen je $10 \mu l$) und Blatt 3 (20 Tropfen je $10 \mu l$). Die Anzahl der nekrotischen Läsionen und deren Durchmesser wurden sieben Tage nach der Inokulation bestimmt und daraus die nekrotische Blattfläche berechnet.

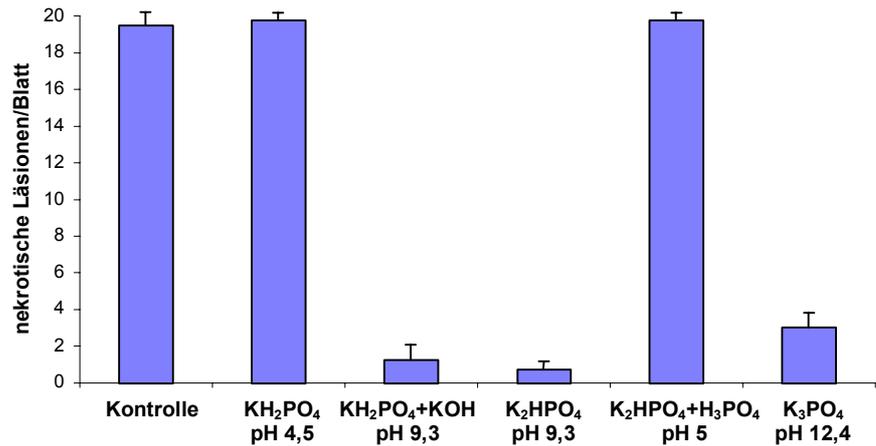
3.2.2 Testung der biologischen Wirksamkeit verschiedener Phosphate

Die Resistenz-auslösenden Eigenschaften von drei Kaliumphosphaten mit unterschiedlichen pH-Werten in wässriger Lösung wurden verglichen (Abb. 20). Dabei bewirkte die Applikation von K_2HPO_4 (pH 9,3) eine Reduktion der Anzahl der nekrotischen Läsionen, hervorgerufen durch *C. lagenarium*, um 96 %. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach Behandlung mit K_3PO_4 (pH 12,4) mit 85 % Befallsreduktion auf dem höher inserierten Blatt erreicht. Das saure KH_2PO_4 (pH 4,5) induzierte dagegen keine systemische Resistenz. Wurde der natürliche pH-Wert von KH_2PO_4 mit KOH auf pH 9,3 angehoben, konnten jedoch hohe Wirkungsgrade erreicht werden. Umgekehrt zeigte das in basischer Form wirksame K_2HPO_4 nach Ansäuern mit H_3PO_4 auf pH 5 keinerlei induzierende Wirkung mehr. Übereinstimmende Ergebnisse wurden mit den Natriumphosphaten (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4) erzielt (Daten nicht dargestellt).

3. ERGEBNISSE

Abb. 20: Systemische Effekte verschiedener Kaliumphosphate im System Gurke/*C. lagenarium*

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit wässrigen Phosphatlösungen (75 mM) besprüht und für ca. 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Sieben Tage nach der Induktorbehandlung wurde das höher inserierte Blatt 2 mit 20 Tropfen je 10 µl einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. 15 Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der gebildeten nekrotischen Läsionen bestimmt.



Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes kann man anhand der pKs-Werte (Dissoziationskonstanten) die Verschiebung der Gleichgewichte bei der Protolyse von H₃PO₄ darstellen. Das Gleichgewicht verschiebt sich wie in der Abb. 21 gezeigt mit steigendem pH-Wert nach rechts. Wird KH₂PO₄ mit KOH versetzt, so liegen hauptsächlich HPO₄²⁻- bzw. PO₄³⁻-Ionen vor, d. h. es liegen die gleichen Ionen vor, wie nach Lösen von K₂HPO₄ oder K₃PO₄. Andererseits führt das Ansäuern der basischen Kaliumphosphate mit H₃PO₄ zur Verschiebung des Gleichgewichtes nach links, was das Vorkommen von H₂PO₄⁻-Ionen begünstigt, welche auch nach dem Lösen von KH₂PO₄ in Wasser vorliegen.

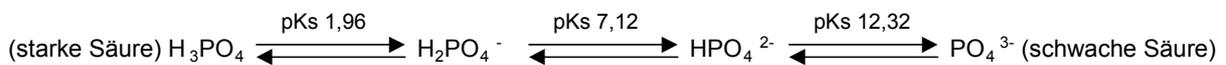


Abb. 21: Gleichgewichtsreaktion bei der Protolyse von H₃PO₄

Zusammenfassend ist anhand der Ergebnisse dieser Versuche festzustellen, dass ein basischer pH-Wert, wie er bei gelösten Kalium- und Natriumphosphaten vorliegt, zur Induktion systemischer Resistenz im System Gurke/*C. lagenarium* notwendig ist.

3.2.3 Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Phosphat und anderen Resistenzinduktoren im System Gurke/*Colletotrichum lagenarium*

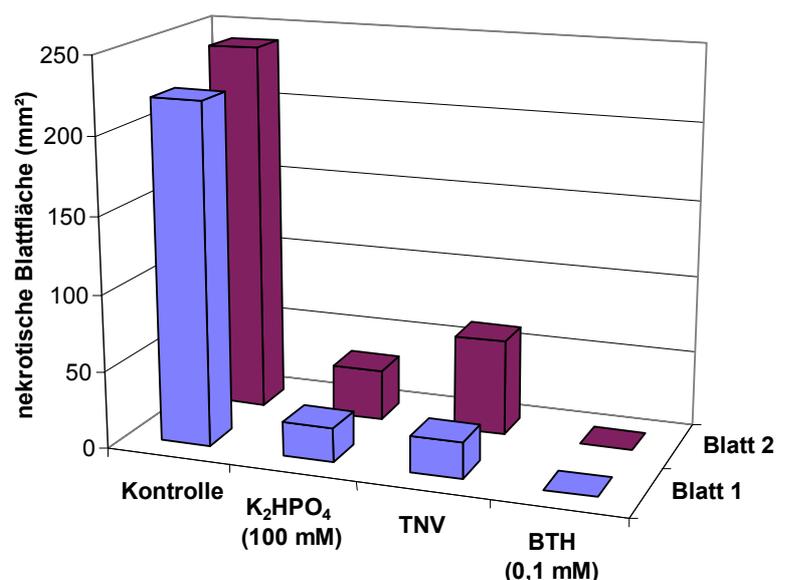
Die Wirkungsmechanismen biotischer Induktoren und synthetischer Resistenzaktivatoren unterscheiden sich bezüglich der nachweisbaren Prozesse im Vorfeld der SAR-Auslösung (Abb. 2). So kann SAR bei Gurken durch eine lokale Inokulation mit nekrotisierenden Pathogenen wie z. B. TNV, *Pseudomonas syringae* oder *C. lagenarium* ausgelöst werden (Kuc *et al.*, 1975; Caruso und Kuc, 1979; Guedes *et al.*, 1980, Bergstrom *et al.*, 1982; Dean und Kuc, 1986a). Dabei ist das Auftreten von Pathogen-verursachten Primärnekrosen als ein zentrales Ereignis für die spätere Resistenzausprägung unbehandelter Pflanzenteile gegenüber verschiedenen Pathogenen anzu-

sehen (Fought und Kuc, 1996), die von Prozessen wie der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Zelltod in einer HR-ähnlichen Reaktion sowie der Akkumulation von Salizylsäure und abwehr-assoziierten Proteinen begleitet werden (Keppler and Novacky, 1986 und 1987; Metraux und Boller, 1986; Boller und Metraux, 1988; Metraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Ji und Kuc, 1995; Mölders *et al.*, 1996; Strobel *et al.*, 1996; Mauch-Mani und Metraux, 1998). Diese Reaktionen unterbleiben bei einer Induktion durch synthetische Aktivatoren wie BTH und INA, deren Eingriffsort in der zur SAR führenden Signalkette nach dem SA-abhängigen Schritt vermutet werden. Beide Induktoren werden als Strukturanaloga der Salizylsäure angesehen, die direkt nach der Interaktion mit einem noch unbekanntem Target in genregulatorische Prozesse eingreifen (Delaney *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1996). Für die Auslösung von SAR durch Phosphate sollte versucht werden, anhand der beobachteten und quantifizierten Reaktionen, eine Einordnung des Induktionsmechanismus von Phosphaten in bisher bekannte Induktionsmodi vorzunehmen. Im Vorfeld dieser Untersuchungen musste jedoch zunächst deren biologische Wirkung auf die Pflanze mit der von biotischen Induktoren (z. B. TNV) sowie synthetischen Aktivatoren (z. B. BTH) verglichen werden.

Abb. 22 zeigt die Ausprägung von SAR nach biotischer Induktion durch Inokulation der Kotyledonen mit TNV bzw. nach Applikation des synthetischen Pflanzenaktivators BTH sowie von K_2HPO_4 auf die Kotyledonen. Die Vorinokulation mit TNV führte auf beiden höher inserierten Blättern zu Befallsminderungen von 89 % (Blatt 1) bzw. 74 % (Blatt 2). Die Vorbehandlung mit BTH unterdrückte die Krankheitsausprägung vollständig, während die Blattapplikation von K_2HPO_4 zu Wirkungsgraden von 90 % (Blatt 1) bzw. 86 % (Blatt 2) führte.

Abb. 22: Vergleich unterschiedlicher Resistenzinduktoren im System Gurke/*C. lagenarium*

Die Kotyledonen von Gurkenpflanzen (cv. Delikateß) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) bzw. BTH (0,1 mM) besprüht und für ca. 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Parallel dazu wurden Pflanzen mit TNV (Presssaft in Na-Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7) inokuliert. Sechs Tage nach den Induktorbehandlungen bzw. TNV-Vorinokulation wurden die Blätter 1 und 2 mit jeweils 10 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (8×10^5 Sporen/ml) inokuliert. Neun Tage nach der Inokulation wurden die Anzahl der nekrotischen Läsionen sowie die Durchmesser bestimmt und daraus die befallene Blattfläche berechnet. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.

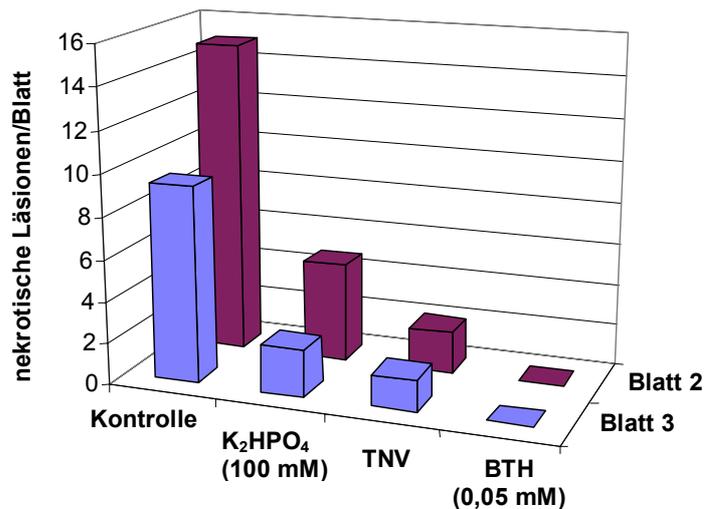


3. ERGEBNISSE

Auch eine Induktorbehandlung des ersten voll entwickelten Laubblattes mit den genannten Induktoren bewirkte die Auslösung von SAR in den distalen nachwachsenden Blättern (Abb. 23). Die Induktion mit K_2HPO_4 reduzierte die Anzahl der Läsionen auf Blatt 2 um 68 % bzw. auf Blatt 3 um 76 %. Vergleichbar hohe Wirkungsgrade von 87 % (Blatt 2) bzw. 84 % (Blatt 3) zeigten sich nach der Vorinokulation mit TNV, während BTH den Befall wiederum vollständig unterdrückte. Auch in diesem Experiment war der Schutz des Neuzuwachses (Blatt 3) bei allen drei Induktoren zu beobachten. Diese Resultate können zusätzlich als eine Bestätigung für die These angesehen werden, dass Phosphate als Induktoren der SAR wirken.

Abb. 23: Vergleich unterschiedlicher Resistenzinduktoren im System Gurke/*C. lagenarium*

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Chinesische Schlangen) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) bzw. BTH (0,05 mM) besprüht oder mit TNV inokuliert (Presssaft in Na-Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7). Sieben Tage nach den Induktorbehandlungen bzw. TNV-Vorinokulation erfolgte die Inokulation von Blatt 2 mit 20 Tropfen (je 10 μ l) sowie von Blatt 3 mit 10 Tropfen (je 10 μ l) einer Sporensuspension von *C. lagenarium* ($7,5 \times 10^5$ Sporen/ml). Die Befallsauswertung wurde 14 Tage nach der Inokulation durchgeführt. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.



Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Vorbehandlungen einen vergleichbar hohen Grad an Resistenz in unbehandeltem Gewebe induzieren können. Die stärkste Wirkung im System Gurke/*C. lagenarium* hatte in allen Experimenten der synthetische Pflanzenaktivator BTH. K_2HPO_4 als chemischer Induktor und der biotische Induktor TNV zeigten vergleichbare Wirkungsgrade gegenüber *C. lagenarium*, sowohl nach Behandlung der Kotyledonen als auch der voll entwickelten Laubblätter.

3.2.4 Primäre Reaktionen auf Gurkenblättern nach Phosphatapplikationen

Als direkte Folge der Phosphatapplikation konnte bereits 24 h nach der Behandlung das Auftreten zahlreicher kleiner nekrotischer Läsionen makroskopisch beobachtet werden. Die Nekrosen von ca. 1 mm Durchmesser sind im frühen Stadium zunächst chlorotisch und entwickeln sich im weiteren Verlauf zu hellen Nekrosen. Abb. 24 zeigt die zunehmende Intensität der Nekrotisierung auf behandelten Blättern von Gurkenpflanzen nach Applikation ansteigender Konzentrationen von K_2HPO_4 (1 - 100 mM). Erste Anzeichen der Nekrosenausbildung waren bei 5 mM K_2HPO_4 zu erkennen. Mit ansteigenden Induktorkonzentrationen stieg auch die Anzahl der gebildeten Nekrosen. Die maximale Nekrosenausprägung war bei 75 bzw. 100 mM zu erkennen (Abb. 24). Auf den unbehandelten Pflanzenteilen traten keine Nekrosen auf (Daten nicht dargestellt).

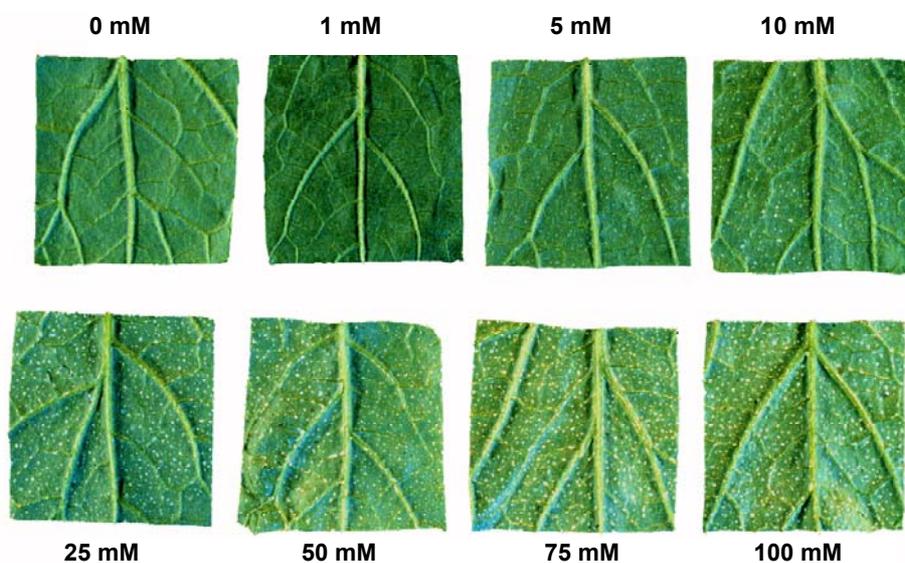


Abb. 24: Einfluss der K_2HPO_4 -Konzentration auf die Bildung von Nekrosen auf behandelten Blättern von Gurkenpflanzen

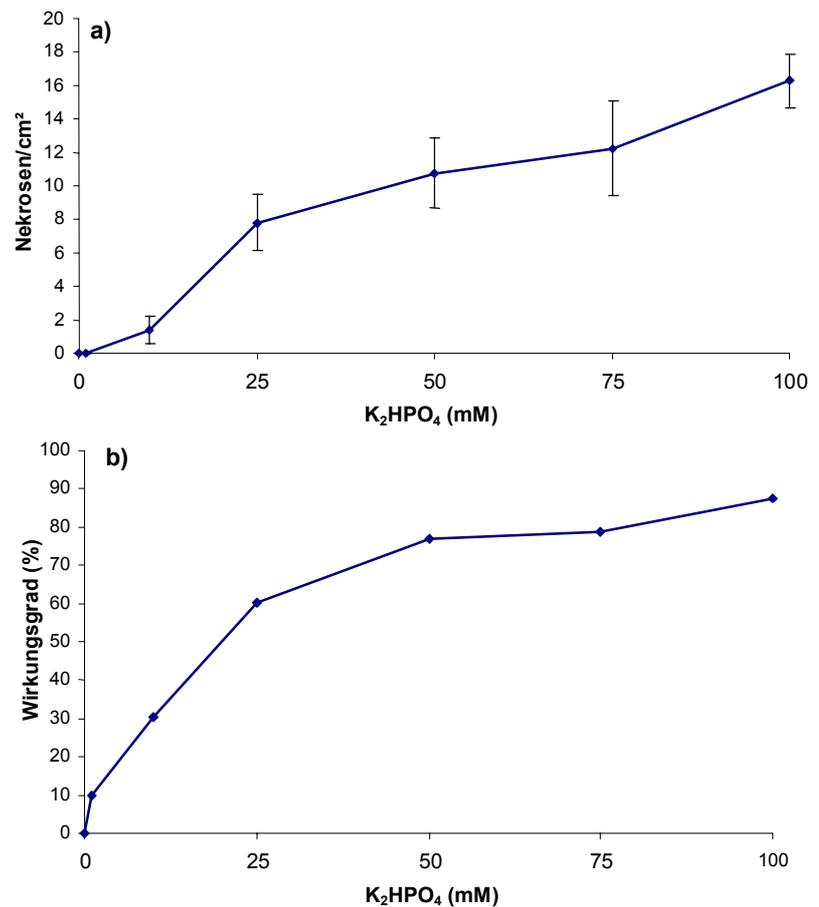
Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (1 - 100 mM) besprüht. Sieben Tage nach der Behandlung wurden Blattstücke (5 x 5 cm) aus der Mitte der jeweiligen Blätter geschnitten und die Blattunterseiten fotografiert.

Zwischen der eingesetzten K_2HPO_4 -Konzentration und der Anzahl der gebildeten Nekrosen auf dem Induktorblatt lässt sich eine nahezu positive lineare Beziehung ableiten (Abb. 25a). Die Ausprägung von SAR auf dem unbehandelten höheren Blatt konnte bereits bei Konzentrationen von 10 - 25 mM beobachtet werden (Abb. 25b). Die höchsten Wirkungsgrade von 77 - 88 % waren aber bei Konzentrationen von 50 - 100 mM K_2HPO_4 festzustellen und stets mit einer ausgeprägten Nekrotisierung des Induktorblattes korreliert. Die lokale Nekrotisierung des behandelten Gewebes scheint somit eng mit der erfolgreichen Auslösung von SAR verbunden zu sein.

3. ERGEBNISSE

Abb. 25: Einfluss der K_2HPO_4 -Konzentrationen auf die Bildung von Nekrosen auf dem Induktorblatt (a) und auf die Ausprägung von SAR gegenüber *C. lagenarium* im unbehandelten Blatt (b)

Das erste Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit steigenden Konzentrationen von K_2HPO_4 besprüht und die Pflanzen für 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Sieben Tage nach der Behandlung wurde die Anzahl der nekrotischen Primärläsionen auf dem Induktorblatt bestimmt (a). Acht Tage nach der Behandlung wurde das höher inserierte Blatt 2 mit 30 Tropfen je 10 μ l einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert (b). Zehn Tage nach der Inokulation wurde die Anzahl der durch den pathogenen Pilz verursachten nekrotischen Läsionen (a) bestimmt und der Wirkungsgrad (b) berechnet. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse mehrfach wiederholter Versuche.



In Tab. 6 sind die Wirkungen der in dieser Arbeit getesteten Phosphate (3.2.3) sowie KOH hinsichtlich Nekrosebildung und Auslösung von SAR zusammenfassend dargestellt. Es wurde festgestellt, dass eine der SAR vorhergehende Nekrotisierung des behandelten Gewebes nur nach der Applikation basischer Phosphate auftrat. Lagen lediglich K-Ionen sowie ein basisches Milieu vor, wie das Beispiel KOH zeigt, war keine Auslösung von SAR zu beobachten. Vielmehr scheinen HPO_4^{2-} - und PO_4^{3-} -Gruppen im basischen pH-Bereich notwendig, um im behandelten Gewebe Nekrotisierungen und LAR sowie im unbehandelten Gewebe SAR auszulösen.

Tab. 6: Auswirkung von verschiedenen Phosphaten und KOH auf die Nekrotisierung von behandelten Gurkenblättern sowie auf die Auslösung von SAR in distalen Pflanzenteilen

| Behandlung | pH | Nekrotisierung des Induktorblattes | SAR |
|------------------------|------|------------------------------------|-----|
| KH_2PO_4 | 4,5 | - | - |
| KH_2PO_4 + KOH | 9,3 | + | + |
| K_2HPO_4 | 9,3 | + | + |
| K_2HPO_4 + H_3PO_4 | 5 | - | - |
| K_3PO_4 | 12,3 | + | + |
| K_3PO_4 + H_3PO_4 | 5 | - | - |
| Na_2HPO_4 | 9,2 | + | + |
| Na_3PO_4 | 12,1 | + | + |
| KOH | 12,6 | - | - |

3.2.5 Untersuchungen zum Auftreten von Zelltod und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Phosphatbehandlungen

Wie in 3.2.4 dargestellt, ist die Entstehung von makroskopisch sichtbaren nekrotischen Läsionen auf Gurkenblättern nach Phosphatbehandlung anscheinend eng mit der Ausprägung von SAR korreliert. Für weiterführende Untersuchungen zu den der Phosphatwirkung zu Grunde liegenden Mechanismen wurde das Auftreten von Zelltod sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im behandelten Blattgewebe eingehend betrachtet. Der experimentelle Ansatz wurde in Anlehnung an die bereits in anderen Systemen nachgewiesenen Reaktionen zur Resistenzauslösung durchgeführt, die als besonders bedeutsam für die SAR erachtet werden (Dean und Kuc, 1986a; Hunt und Ryals, 1996; Low und Merida, 1996; Lamb und Dixon, 1997). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das Auftreten der obengenannten Reaktionen experimentell nach Applikation von Phosphaten, nach biotischer Induktion durch Virusinokulation (TNV) sowie nach Behandlung mit einem synthetischen Aktivator (BTH) vergleichend untersucht.

3.2.5.1 Untersuchungen zum Auftreten von Zelltod nach Phosphatbehandlungen

Nach der Behandlung mit verschiedenen Phosphaten sowie weiteren Agenzien konnte die Bildung von nekrotischen Läsionen beobachtet werden (Abb. 24, 25, 26). Exemplarisch ist in Abb. 26 der Phänotyp von Gurkenblättern nach Applikation von K_2HPO_4 (b) sowie nach Inokulation mit TNV (a) dargestellt. Beide Behandlungen äußerten sich im Auftreten zahlreicher kleiner nekrotischer Läsionen im Gewebe. Die durch Phosphatbehandlung hervorgerufenen Nekrosen zeigten hinsichtlich ihres Phänotyps deutliche Ähnlichkeiten mit den nach TNV-Inokulation auftretenden Lokalläsionen, so dass auch übereinstimmende physiologische/biochemische Reaktionen beider Induktionswege vermutet wurden. Demgegenüber konnten nach Applikation von BTH keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Aufgrund des übereinstimmenden Phänotyps auf Gurkenblättern nach biotischer Resistenzinduktion mittels TNV-Inokulation sowie nach abiotischer Induktion mittels K_2HPO_4 galt es zu klären, ob auftretender Zelltod und damit assoziierte Prozesse wie die Bildung von ROS kausal mit der Resistenzauslösung durch Phosphate verbunden sind.

3. ERGEBNISSE

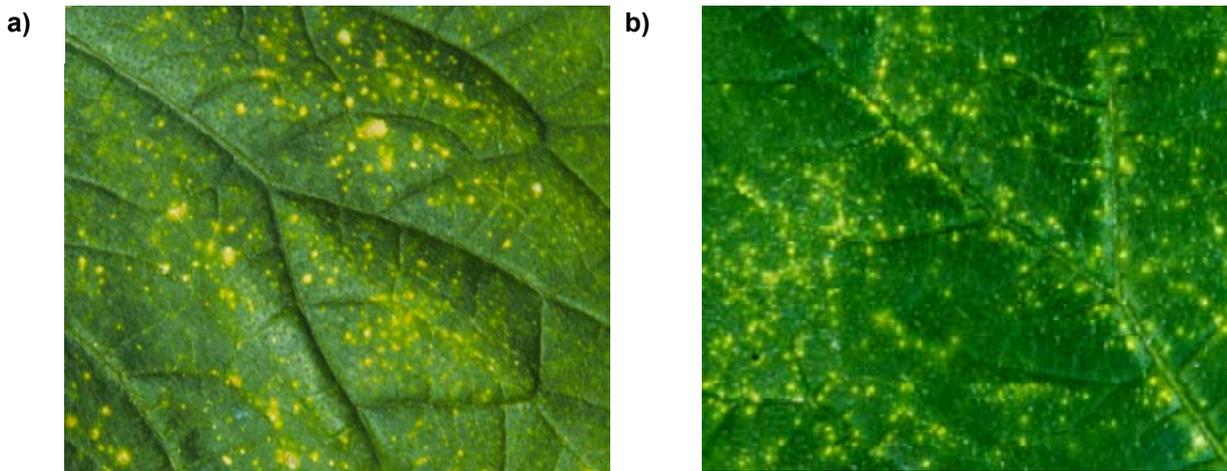


Abb. 26: Phänotyp von Gurkenblättern nach Applikation von K_2HPO_4 bzw. nach TNV-Inokulation

Ausschnitt aus einem Gurkenblatt (cv. Wisconsin SMR 58) sieben Tage nach der Applikation von K_2HPO_4 (75 mM) (a) bzw. sechs Tage nach Inokulation von TNV (b)

Das Auftreten von Zelltod als Folge der Phosphatapplikationen wurde mit Hilfe von histochemischen Färbetechniken nachgewiesen. So zeigten sich in Phosphat-behandeltem Blattgewebe nach Färbung mit Trypanblau kleine blaue Stellen, die auf lokale Zelltodereignisse hindeuten. Diese Reaktion konnte bereits 36 h nach der Phosphatapplikation beobachtet werden (Daten nicht dargestellt), war jedoch zu späteren Zeitpunkten wie nach 48 h deutlicher ausgeprägt (Abb. 27).

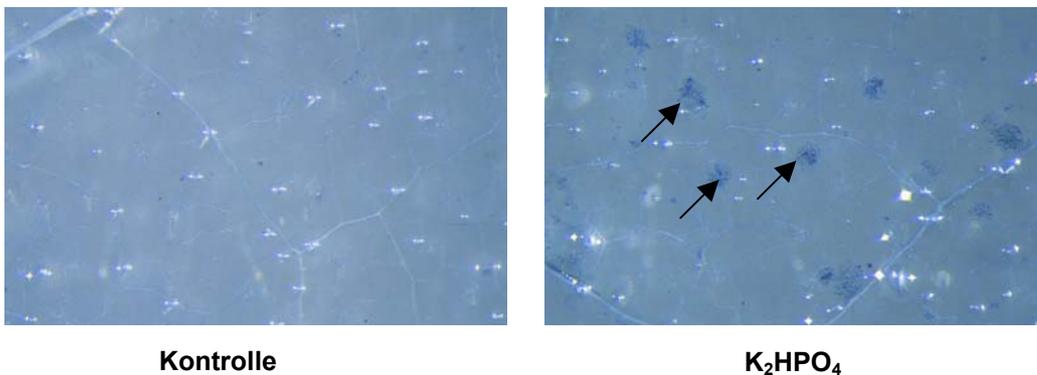


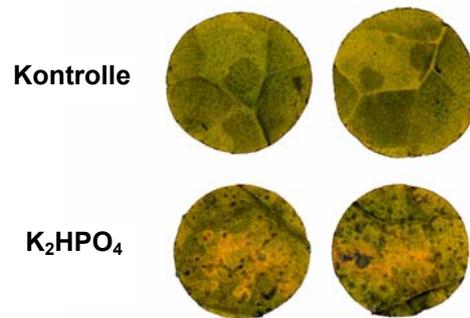
Abb. 27: Nachweis von Zelltod mittels Trypanblau-Färbung

Gurkenblätter (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (50 mM) besprüht. Nach 48 h wurden Blattscheiben (15 mm Durchmesser) ausgestochen, mit Trypanblau gefärbt und 24 h lang in Chloralhydrat entfärbt. Die Blattscheiben wurden unter einem Lichtmikroskop bei 16facher Vergrößerung fotografiert. Die Pfeile weisen auf Bereiche mit abgestorbenen Zellen hin.

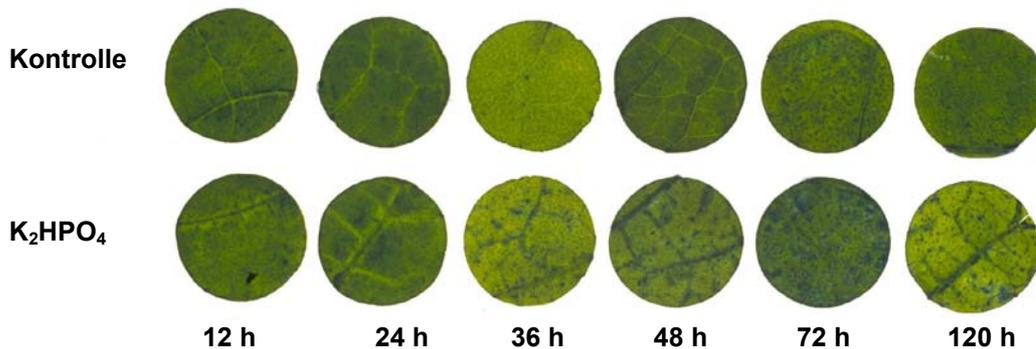
Eine weitere Nachweismethode für auftretenden Zelltod ist die Infiltration des Vitalfarbstoffs Evansblau in Blattgewebe, wobei der Farbstoff spezifisch nur in Bereichen mit abgestorbenen Zellen akkumuliert und eine Blaufärbung hervorruft (Baker und Mock, 1994). Im behandelten Blattgewebe von Gurkenpflanzen konnten ca. 48 - 72 h nach der Behandlung mit K_2HPO_4 mittels Evansblau-Infiltration zahlreiche dunkelblaue Bereiche von wenigen mm Durchmesser nachgewiesen werden, die Zelltodauslösung anzeigen (Abb. 28).

Abb. 28: Nachweis von Zelltod in Blattgewebe von Gurkenpflanzen nach Applikation von K_2HPO_4

K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. 72 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben (15-20 mm Durchmesser) mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit Evansblau (0,5 %; w/v) vakuuminfiltriert. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs wurden die Blattscheiben fotografiert.



Im Rahmen von Zeitreihenuntersuchungen wurde das Auftreten von Zelltod nach einer Phosphatapplikation mit der Evansblau-Methode weitergehend charakterisiert (Abb. 30). Während die Blattscheiben von Kontrollpflanzen (Abb. 29, obere Reihe) keine Blaufärbung aufwiesen und somit kein Zelltod detektierbar war, konnte ein vermehrtes Auftreten blau gefärbter Bereiche in den Blattscheiben von behandelten Pflanzen ab 36 h nach der Behandlung beobachtet werden (Abb. 29, untere Reihe). Im dargestellten Versuch sowie in weiteren Experimenten entsprach das Auftreten makroskopisch sichtbarer nekrotischer Läsionen zeitlich und räumlich dem histochemischen Nachweis für Zelltod.

**Abb. 29: Nachweis von Zelltod in Blattgewebe von Gurken nach Blattapplikation von K_2HPO_4**

K_2HPO_4 (75 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. 12 - 120 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben (15 - 20 mm Durchmesser) mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit Evansblau (0,5 %; w/v) vakuuminfiltriert. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs wurden die Blattscheiben fotografiert.

Nach einer Vorbehandlung mit unterschiedlichen Resistenzinduktoren konnte 24 h nach Applikation mittels Evansblau-Färbung bei keiner der Varianten Zelltod festgestellt werden (Abb. 30, obere Reihe). Nach 48 h zeigten lediglich die Blattscheiben von K_2HPO_4 -vorbehandelten sowie TNV-inokulierten Pflanzen Zelltodsymptome (Abb. 30, untere Reihe). Weder die unbehandelte noch die Puffer-behandelte Kontrolle wiesen Anzeichen von Zelltod auf. Nach Behandlung mit dem synthetischen Aktivator BTH (Abb. 30) konnte keine Zelltodauslösung mittels dieser Färbemethode festgestellt werden. Probennahmen später als 48 h führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht dargestellt).

3. ERGEBNISSE

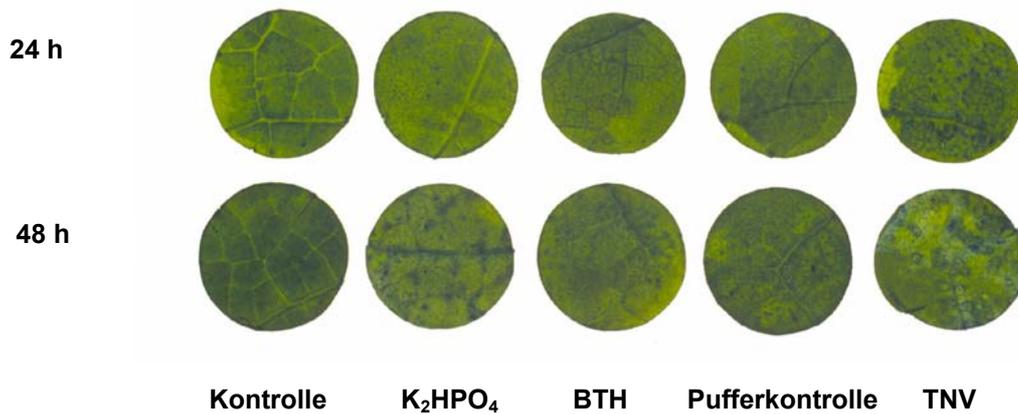


Abb. 30: Nachweis von Zelltod mittels Evansblau-Färbung in Gurkenblättern nach Behandlung mit verschiedenen Induktoren

Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K₂HPO₄ (75 mM) bzw. BTH (0,05 mM) gesprüht. Zur Inokulation von TNV wurde virushaltiger Presssaft nach Abrasivzugabe (Celite 1 mg/ml) mittels eines Pinsels aufgebracht, während die Kontrolle mit Puffer und Abrasiv behandelt wurde. 24 und 48 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben (15 - 20 mm Durchmesser) mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit Evansblau (0,5 %; w/v) vakuuminfiltriert. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs wurden die Blattscheiben fotografiert.

Das zeitgleiche Auftreten von nekrotischen Läsionen sowie von Zelltodsymptomen nach TNV-Inokulation und nach Phosphatapplikation deutet auf eine Assoziation der beiden Reaktionen hin.

3.2.5.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, wurde im Vorfeld des Auftretens von Zelltod in zahlreichen Wirt-Pathogen-Interaktionen als schnelle Reaktion nach Kontakt mit Pathogenen beobachtet (Doke, 1983; Dixon *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1998). Des Weiteren wird auch eine zentrale Rolle von ROS im Rahmen der Signalübertragung, welche zur SAR führt, von zahlreichen Autoren diskutiert (Jabs *et al.*, 1996 und 1997; Low und Merida, 1996; Lamb und Dixon, 1997).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zum Nachweis von Zelltod sowie zur Bildung von ROS wurden sowohl in Klimakammern unter konstanten Bedingungen (Dauerlicht) als auch unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Bei Experimenten in der Klimakammer wurden die behandelten Pflanzen für ca. 24 h unter einer durchsichtigen folienbespannten Haube mit ca. 100 % rel. Luftfeuchte inkubiert, um die Benetzungsdauer der Blätter nach der Sprühapplikation zu erhöhen. Aufgrund des intensiven Luftumsatzes durch die Klimakammerventilatoren wäre ansonsten ein sehr schnelles Abtrocknen der Blätter nach ca. 30 min eingetreten, was, wie Vorversuche gezeigt hatten, die Wirkung der Phosphatbehandlung deutlich herabsetzt (Daten nicht dargestellt). Bei Versuchen im Gewächshaus waren nach der Blattapplikation die Pflanzen über einen Zeitraum von 6 - 12 h noch feucht, so dass die ebenfalls in Vorversuchen ermittelte notwendige Blattnässeperiode stets gewährleistet war. Es hatte sich gezeigt, dass zur Ausprägung von nekrotischen

Läsionen nach Applikation von Phosphaten diese Feuchteperiode absolut notwendig war, um eine maximale SAR-Ausprägung zu erreichen. Bei zu schnellem Abtrocknen war die Zelltodauslösung nur noch durch sehr hohe Phosphatkonzentrationen zu erreichen bzw. die eingesetzten niedrigeren Konzentrationen führten lediglich zu einer schwachen SAR-Ausprägung. Bei den nachfolgend dargestellten Ergebnissen und insbesondere bei den Zeitreihenexperimenten ist stets auf die Beschreibung der experimentellen Bedingungen zu achten. Aufgrund der verlängerten Benetzungsdauer von ca. 24 h bei der Inkubation der Pflanzen unter Klimakammerbedingungen ist dieser Zeitunterschied beim Vergleich von Ergebnissen mit Ergebnissen aus Experimenten unter Gewächshausbedingungen zu berücksichtigen.

3.2.5.2.1 Nachweis von Superoxidanionen

In Abb. 31 ist die Bildung von Superoxidanionen (O_2^-) im Blattgewebe von Gurkenpflanzen nach Applikation von K_2HPO_4 unter Gewächshausbedingungen dargestellt. Bereits 6 h nach der Behandlung konnte nach Infiltration mit Nitroblautetrazolium (NBT) im Blattgewebe die Bildung des typischen blauen Formazanderivats nachgewiesen werden, welches spezifisch die Generierung von O_2^- anzeigt (Beauchamp und Fridovich, 1971). Neun Stunden nach der Behandlung war die intensivste Blaufärbung zu beobachten, die auch nach 12 h noch deutlich sichtbar hervortrat, jedoch nach 24 - 72 h nicht mehr nachweisbar war. Bei Klimakammerexperimenten war die Generierung von O_2^- aufgrund der verlängerten Einwirkzeit auch noch nach 48 h zu beobachten (Abb. 32).

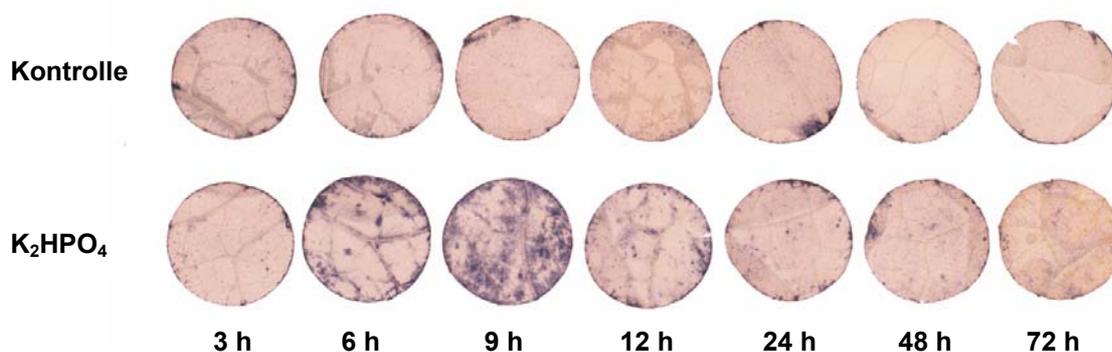


Abb. 31: Nachweis von O_2^- in Gurkenblättern nach Applikation von K_2HPO_4 unter Gewächshausbedingungen

K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. Zu den angegebenen Zeiten nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit NBT (0,1 %; w/v) vakuuminfiltiert. Nach einer Belichtungszeit von 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt.

Nach Applikation verschiedener Induktoren unter Klimakammerbedingungen (Inkubation der behandelten Pflanzen für 24 h) konnte in Blattscheiben von Kontrollpflanzen (unbehandelt bzw. mit Puffer und Abrasiv behandelt) sowie in Blattscheiben BTH-behandelter Pflanzen über den gesamten Untersuchungszeitraum (3 - 48 h) keine Bildung von O_2^- nachgewiesen werden (Abb.

3. ERGEBNISSE

32). Nur die Blattapplikation von K_2HPO_4 sowie die Inokulation mit TNV führten zu einer Bildung von O_2^- . Diese äußerte sich bei Phosphatbehandlung bereits nach 12 h in einem verstärkten Auftreten blau gefärbter Bereiche, das sich über 24 – 48 h weiter intensivierte. Die Bildung von O_2^- nach TNV-Inokulation setzte erst nach 24 h ein und war nach 48 h maximal.

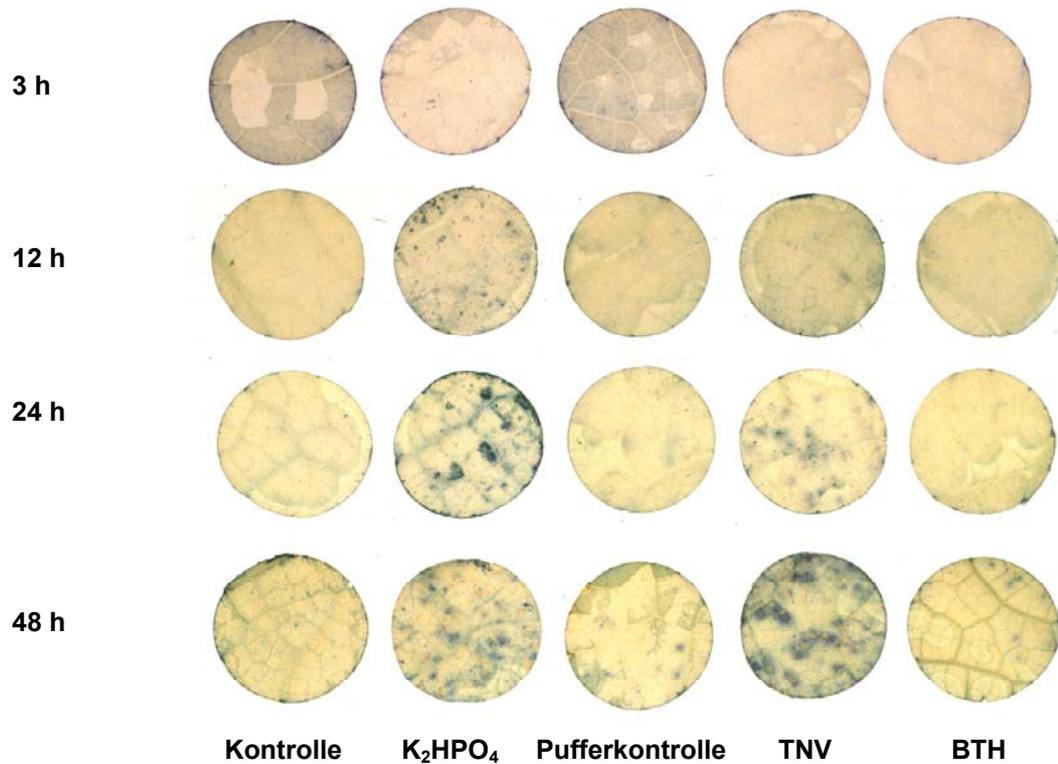


Abb. 32: Nachweis von O_2^- in Gurkenblättern nach verschiedenen Induktorbehandlungen unter Klimakammerbedingungen

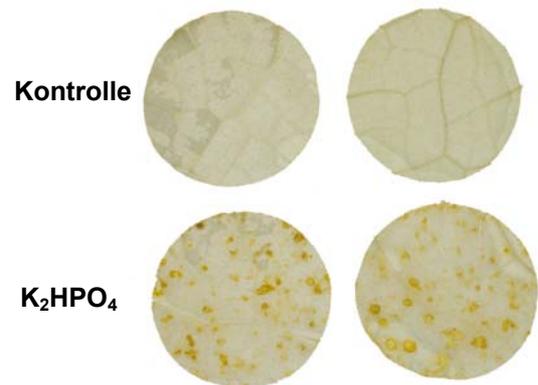
K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. Die behandelten Pflanzen wurden unter einer folienbespannten durchsichtigen Haube bei hoher Luftfeuchtigkeit für 24 h in einer Klimakammer inkubiert. BTH (0,05 mM) behandelte Pflanzen wurden nicht inkubiert. Die Inokulation mit TNV erfolgte mit virushaltigem Presssaft unter Zugabe eines Abrasivs (Celite 1 mg/ml). Die Kontrollpflanzen dazu wurden mit Puffer (Na-Phosphatpuffer, 25 mM, pH 7) und Abrasiv abgerieben. Zu den angegebenen Zeiten nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit NBT (0,1 %; w/v) vakuumfiltriert. Nach einer Belichtungszeit von 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt.

3.2.5.2 Nachweis von Wasserstoffperoxid

In Analogie zum Nachweis von O_2^- wurden die Untersuchungen zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durchgeführt. Mit Hilfe des Farbstoffs Diaminobenzidin (DAB) kann die Akkumulation von H_2O_2 nach Infiltration des Farbstoffs durch die Entstehung eines rötlich-braunen Farbkomplexes gezeigt werden. Nach Blattapplikation von K_2HPO_4 (ab 50 mM und höher) konnte mit dieser Methode eine Bildung von H_2O_2 nachgewiesen werden (Abb. 33).

Abb. 33: Nachweis von H_2O_2 in Gurkenblättern 72 h nach Blattapplikation von K_2HPO_4

K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. 72 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit DAB (0,1 %; w/v) vakuuminfiltriert. Nach einer Belichtungszeit von 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt. Gezeigt sind Blattscheiben aus einem typischen Experiment, das mehrfach wiederholt wurde.



Kontrolle

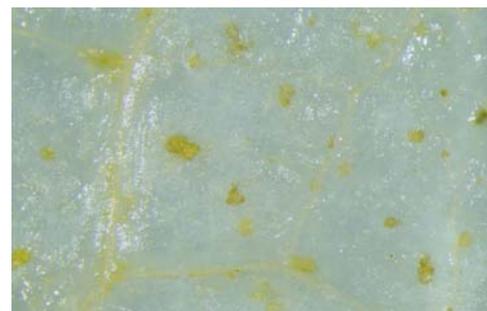
 K_2HPO_4

Abb. 34: Nachweis von H_2O_2 in Gurkenblättern 48 h nach Blattapplikation von K_2HPO_4

K_2HPO_4 (50 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. 48 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit DAB (0,1 %; w/v) vakuuminfiltriert. Nach einer Belichtungszeit von 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt. Dargestellt sind vergrößerte Ausschnitte (Binokular, 10fache Vergrößerung) aus Blattscheiben.

Grundsätzlich setzte die Bildung von H_2O_2 stets nach der Generierung von O_2^- ein. Wurden die Pflanzen nach Phosphatapplikation nicht in einer feuchten Kammer inkubiert, so war bereits 12 h nach der Behandlung das Auftreten von H_2O_2 feststellbar, während O_2^- schon ca. 6 - 9 h nach der Behandlung gebildet wurde (Abb. 31). Die maximale Intensität der H_2O_2 -Bildung wurde durch Inkubation der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen nach 24 - 48 h und bei Aufbewahrung der Pflanzen in einer feuchten Kammer nach ca. 72 h erreicht (Abb. 35, 36).

3. ERGEBNISSE



Abb. 35: Nachweis von H_2O_2 in Gurkenblättern zu verschiedenen Zeiten nach Blattapplikation von K_2HPO_4 unter Gewächshausbedingungen

K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. In definierten Abständen nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit DAB (0,1 %; w/v) vakuuminfiltiert. Nach der Belichtung für 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt.

Beim Vergleich unterschiedlicher Induktionsarten konnte nach Behandlung mit Phosphat sowie nach TNV-Inokulation deutlich die Bildung von H_2O_2 im Gewebe beobachtet werden. Die Behandlung mit Puffer unter Abrasivzusatz sowie mit dem Aktivator BTH bewirkte keine Bildung von Wasserstoffperoxid (Abb. 36).

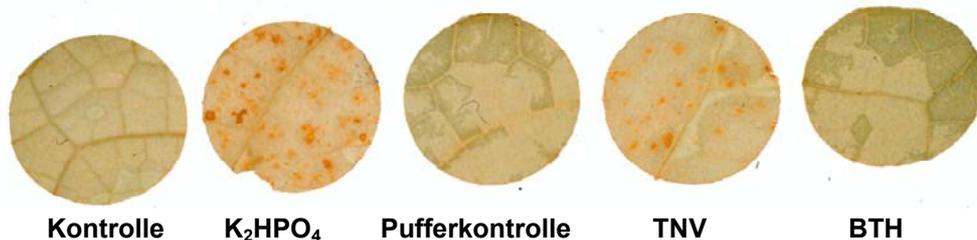


Abb. 36: Nachweis von H_2O_2 in Gurkenblättern 72 h nach verschiedenen Induktorbehandlungen

K_2HPO_4 (100 mM) wurde auf Blätter von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) gesprüht. Die behandelten Pflanzen wurden unter einer folienbespannten durchsichtigen Haube bei hoher Luftfeuchtigkeit für 24 h in einer Klimakammer inkubiert. BTH behandelte Pflanzen wurden nicht inkubiert. Die Inokulation mit TNV erfolgte mit virushaltigem Presssaft unter Zugabe eines Abrasivs (Celite 1 mg/ml). Die Kontrollpflanzen dazu wurden mit Puffer und Abrasiv abgerieben. 72 h nach der Behandlung wurden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen und in einer Spritze mit DAB (0,1 %; w/v) vakuuminfiltiert. Nach einer Belichtungszeit von 30 min bei Tageslicht wurden die Blattscheiben entfärbt und in Ethanol (96 %) aufbewahrt.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse dieses Abschnitts kann festgestellt werden, dass die Blattapplikation von Phosphaten zum Auftreten von Zelltod führt, welcher sich in makroskopisch sichtbaren nekrotischen Läsionen 48 h nach der Behandlung manifestiert. Ferner konnte die Bildung von ROS, und dabei zunächst die transiente Generierung von Superoxid-anionen über einen Zeitraum von ca. 3 - 12 h nach der Behandlung sowie anschließend die Bildung von Wasserstoffperoxid über 24 - 72 h nach Behandlung nachgewiesen werden. Vergleichbare Reaktionen waren auch nach der biotischen Induktion mit TNV feststellbar, so dass im Hin-

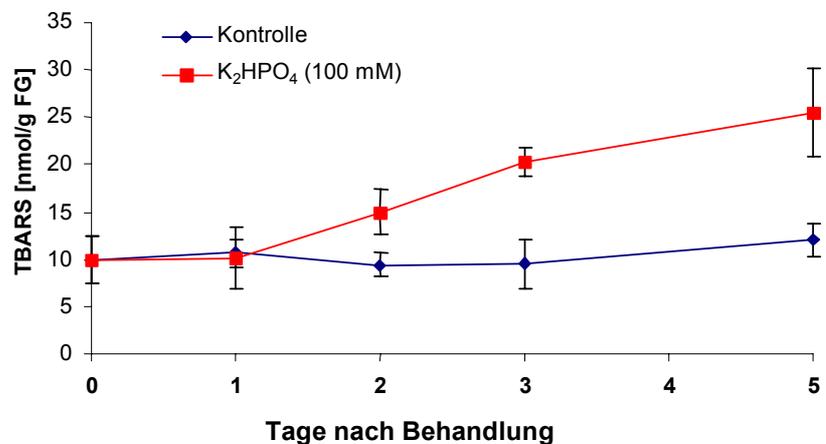
blick auf die Zelltodauslösung und Bildung von ROS für Phosphat ähnliche primäre Reaktionen wie nach einer biotischen Induktion vermutet werden können.

3.2.5.3 Lipidperoxidation

Als eine typische mit dem hypersensitiven Zelltod eng verbundene Reaktion von Pflanzen ist das Auftreten von Lipidperoxiden anzusehen. So konnten nach Inokulation von Tabak mit TMV im Zuge der HR-Ausprägung eine oxidative Schädigung der Plasmamembran sowie das Auftreten von Lipidperoxidationsprodukten nachgewiesen werden (Anderson *et al.*, 1998). Es lag daher nahe zu untersuchen, ob es nach Phosphatbehandlungen zur Lipidperoxidation kommt. In mehreren Experimenten konnte ein Auftreten von Lipidperoxidationsprodukten in Blättern von Gurkenpflanzen nach einer Phosphatbehandlung mit Hilfe der Thiobarbitursäure-Methode nachgewiesen werden. In Abb. 37 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt, wobei nach Applikation von K_2HPO_4 im behandelten Blattgewebe von Gurkenpflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen erhöhte Gehalte an TBARS (thiobarbituric acid related substances) gemessen wurden. Der Gehalt an TBARS war bereits zwei Tage nach der Behandlung um 60 % gegenüber der unbehandelten Kontrollvariante erhöht. Drei bzw. fünf Tage nach Applikation betragen die Steigerungen 115 % bzw. 112 %. In den unbehandelten bzw. systemischen Blättern konnten keine Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und Phosphat-behandelten Pflanzen festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Nach Applikation von K_2HPO_4 waren somit auf den behandelten Blättern Schädigungen der Plasmamembran quantifizierbar. Diese messbaren Veränderungen gingen zeitlich mit dem Auftreten von makroskopisch sichtbaren nekrotischen Läsionen einher.

Abb. 37: Lipidperoxidation in behandelten Blattgeweben von Gurkenpflanzen nach Applikation von K_2HPO_4

Das zweite Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Applikation wurden Blattproben genommen und die Gehalte an Lipidperoxiden nach Behandlung mit Thiobarbitursäure spektrophotometrisch als Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (thiobarbituric acid related substances = TBARS) bestimmt. Die Berechnung der TBARS-Gehalte erfolgte nach Rusterucci *et al.* (1996).



3. ERGEBNISSE

3.2.6 Untersuchungen zur Akkumulation von Salizylsäure im Rahmen der Phosphat-induzierten Resistenz

Nach biotischer Resistenzauslösung durch Mikroorganismen bzw. Viren wurden in verschiedenen Pflanzenarten gesteigerte Aktivitäten von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels, ihre Umsetzungsprodukte sowie die Akkumulation von Salizylsäure (SA) beobachtet (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Meuwly und Metraux, 1993; Meuwly *et al.*, 1994; Mölders *et al.*, 1994). Auch bei Gurkenpflanzen konnte nach einer Inokulation der Kotyledonen mit *Pseudomonas syringae* eine Akkumulation von SA im behandelten und unbehandelten Pflanzengewebe nachgewiesen werden (Mölders *et al.*, 1994). Zudem wurde in diesem System durch Infiltration der ¹⁴C-markierten Vorstufe Benzoessäure eine Translokation von SA aus dem behandelten Kotyledonen in höher inserierte Pflanzenteile sowie eine *de-novo* Synthese festgestellt (Meuwly *et al.*, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Akkumulation der SA, als mögliche funktionale Verbindung im Signalprozess zur Auslösung von SAR nach Behandlung mit Phosphaten, eingehender untersucht werden. Es galt zu prüfen, ob eine Behandlung mit Phosphaten, ähnlich wie nach biotischer Resistenzauslösung (Abb. 2), eine Akkumulation von SA bewirkt.

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die Gehalte an freier SA (FSA) sowie die gesamte SA (GSA) nach Hydrolyse mittels HPLC gemessen. Die Berechnung der Gehalte an glucosidisch gebundener SA (SAG) erfolgte anhand der Gleichung:

$$\text{GSA} = \text{FSA} + \text{SAG} \Leftrightarrow \text{SAG} = \text{GSA} - \text{FSA}$$

3.2.6.1 Systemische Resistenzauslösung und Akkumulation von Salizylsäure nach Phosphatbehandlungen

Um gleichzeitig die Wirkung von Phosphaten auf die Ausprägung von SAR sowie das Auftreten von SA zu untersuchen, wurden, nach Applikation von K₂HPO₄ auf die Kotyledonen und das Blatt 1 von Gurkenpflanzen, Resistenzprüfungen sowie Bestimmungen der SA-Gehalte durchgeführt (Tab. 7). Nach einem Induktionsintervall von drei Tagen konnte im unbehandelten Blatt 2 bereits ein hoher Resistenzgrad gegenüber *C. lagenarium* festgestellt werden (Tab. 7a). Die deutliche Unterdrückung der Krankheitssymptome äußerte sich in einer Reduktion der Läsionenzahl um 90 % sowie in einer Verminderung der Läsionendurchmesser um 82 %.

Tab. 7: Einfluss einer Blattapplikation von K_2HPO_4 auf den Befall von Gurkenpflanzen mit *C. lagenarium* und auf die Salizylsäuregehalte

Die Kotyledonen sowie Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. Drei Tage nach der Behandlung wurde das höher inserierte unbehandelte Blatt 2 mit 20 Tropfen je 10 μ l einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (5×10^5 Sporen/ml) inokuliert. Die Bonitur erfolgte zehn Tage nach der Inokulation durch Bestimmung der Anzahl der Läsionen sowie deren Durchmesser (a). Zeitgleich mit der Inokulation wurden andere Pflanzen beprobt und die Salizylsäuregehalte in den Blättern 1 und 2 bestimmt (b). Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.

a) Systemischer Effekt der Vorbehandlung von Blatt 1 mit K_2HPO_4 auf den Befall von Blatt 2 mit *C. lagenarium*-Resistenzprüfung

| | nekrotische Läsionen/Blatt | Durchmesser (mm) |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 18,9 (1,36) | 3,87 (0,75) |
| K_2HPO_4 | 2,0 (1,53) | 0,70 (0,33) |

b) Salizylsäuregehalte drei Tage nach der Induktorbehandlung

| | | freie SA (FSA) (ng/g FG) | gebundene SA (SAG) (ng/g FG) | gesamte SA (GSA) (ng/g FG) |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Kontrolle | Blatt 1 (behandelt) | 8 (5) | 66 (12) | 73 (16) |
| K_2HPO_4 | Blatt 1 (behandelt) | 128 (20) | 3181 (788) | 3309 (806) |
| Kontrolle | Blatt 2 (unbehandelt) | 6 (1) | 103 (30) | 109 (30) |
| K_2HPO_4 | Blatt 2 (unbehandelt) | 173 (45) | 667 (227) | 840 (256) |

Die Ausprägung von Krankheitsresistenz (Tab. 7a) war mit einer deutlichen Akkumulation von Salizylsäure in den behandelten und unbehandelten Blattgeweben verbunden (Tab. 7b). Die behandelten Blätter zeigten drei Tage nach K_2HPO_4 -Applikation etwa 45fach erhöhte SA-Gesamtgehalte gegenüber den Kontrollpflanzen. Die Gehalte lagen bei der freien SA um den Faktor 17 und bei der glucosidisch gebundenen SA um den Faktor 48 über denen der Kontrollvariante. Im höher inserierten Blatt 2 lagen die Gehalte an freier SA um das 29fache, an gebundener SA um das 6fache über denen der Kontrollen.

Zum Zeitpunkt der Inokulation waren die SA-Gehalte in den behandelten Blättern, die durch Phosphat hervorgerufene Nekrosen zeigten, stärker erhöht als in unbehandelten Blättern (Tab. 7b). Dieses Phänomen wurde von anderen Arbeitsgruppen nach biotischer Induktion ebenfalls beobachtet (Meuwly und Metraux, 1993; Shulaev *et al.*, 1995; Mölders *et al.*, 1996) und ist wahrscheinlich mit der Nekrotisierung, und dem damit verbundenen Zelltod korreliert. In unbehandeltem bzw. systemischem Gewebe war die Akkumulation von SA zwar niedriger als in behandeltem Gewebe, doch waren die SA-Gehalte Phosphat-vorbehandelter Pflanzen gegenüber den Kontrollpflanzen stets um ein Mehrfaches erhöht. Als Ursache für diese systemische Akkumulation von SA kommen Translokationsvorgänge aber auch *de-novo* Synthese in Betracht (Meuwly *et al.*, 1995).

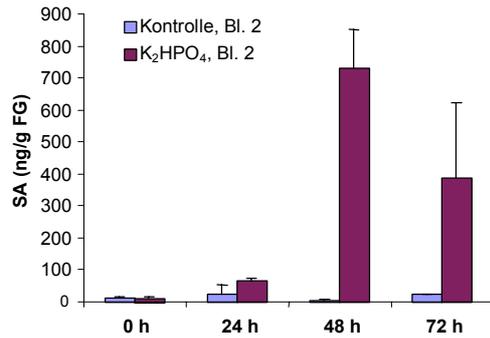
3. ERGEBNISSE

3.2.6.2 Zeitlicher Verlauf der Salizylsäure-Akkumulation nach Phosphatbehandlungen

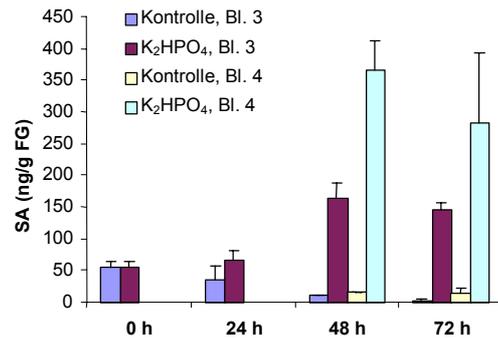
Nach der Blattapplikation von K_2HPO_4 konnte im Untersuchungszeitraum von 0 - 72 h (Kurzzeitkinetik) ein gegenüber der Kontrolle leicht erhöhter Gehalt an freier SA in den behandelten Blättern bereits nach 24 h gemessen werden. Maximale SA-Gehalte wurden aber erst nach 48 h erreicht (Abb. 38a). Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Gehalte an gebundener SA in den behandelten Blättern deutlich erhöht (47fach) (Abb. 38c). In den behandelten Blättern lag die glucosidisch gebundene SA um die Faktoren 2,5 - 5 höher als die freie SA (Abb. 38a und c), was auf eine stetige Umwandlung von freier zu inaktiver, d. h. glucosidisch gebundener SA hindeutet.

Als systemischer Effekt war eine SA-Akkumulation in den unbehandelten Blättern 3 und 4 von Phosphat-vorbehandelten Pflanzen nachweisbar. (Abb. 38b und d). Die Gehalte an FSA im Blatt 3 waren 24 h nach der Behandlung gegenüber der Kontrolle um das 2fache, nach 48 h um das 16fache und nach 72 h sogar um das 48fache erhöht. Im gerade erst nachwachsenden Blatt 4 lagen Steigerungen um den Faktor 25 (nach 48 h) bzw. 20 (nach 72 h) vor (Abb. 38b). Die Akkumulation von SAG war mit der Kinetik der FSA vergleichbar (Abb. 38d). Gegenüber der Kontrolle waren im Blatt 3 Steigerungen um den Faktor 3 (nach 24 h) bzw. 38 (nach 48 h) sowie 28 (72 h) messbar. Das jüngste Blatt (Blatt 4) wies 48 h nach Behandlung Steigerungen um den Faktor 112 (nach 48 h) bzw. 231 (nach 72 h) auf (Abb. 38d). Diese Ergebnisse stimmen überein mit denen aus dem ersten Experiment (Tab. 7) und zeigen, dass bereits im Vorfeld der SAR-Auslösung, d. h. während des Induktionsintervalls, 48 - 72 h nach der Induktorbehandlung, eine sehr deutliche SA-Akkumulation erfolgte, die möglicherweise mit der Auslösung der SAR durch Phosphate zusammenhängt.

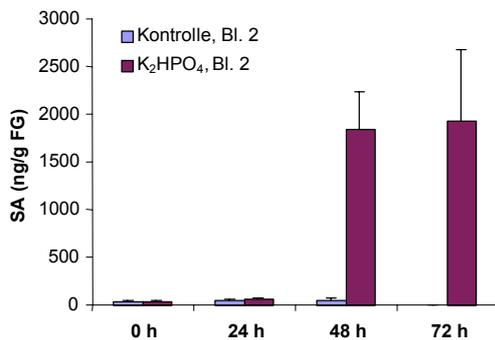
a) FSA in behandelten Blättern



b) FSA in unbehandelten Blättern



c) SAG in behandelten Blättern



d) SAG in unbehandelten Blättern

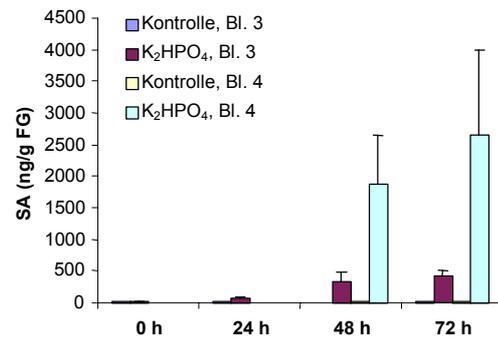


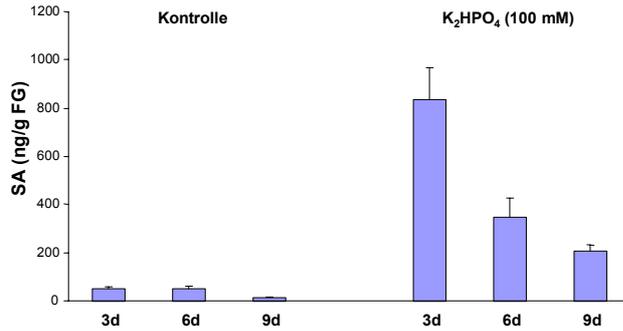
Abb. 38: Zeitlicher Verlauf der Salizylsäureakkumulation nach einer Blattapplikation von K₂HPO₄ (Kurzzeitkinetik)

Die beiden unteren Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit K₂HPO₄ (100 mM) besprüht. 0, 24, 48 und 72 h nach der Behandlung wurden die SA-Gehalte des behandelten Blattes 2 sowie der höher inserierten unbehandelten Blätter 3 und 4 bestimmt.

In der Mehrzahl der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Wirkung von Phosphatbehandlungen auf Pathogenbefall wurden Induktionsintervalle von sieben bis zehn Tagen gewählt. Es lag daher nahe, in einer weiteren Versuchsreihe auch die Akkumulation von SA nach einer Phosphatbehandlung über neun Tage zu verfolgen (Langzeitkinetik). Dabei wurden in den behandelten Blättern drei Tage nach der Behandlung Anstiege der Gehalte an GSA bis auf das 17fache gegenüber der Kontrollvariante ermittelt (Abb. 39a). Neun Tage nach der Behandlung war die Konzentration der GSA bis auf ca. ein Drittel des Gehaltes am Tag 3 gesunken (Abb. 39a). Die Akkumulation von GSA in den unbehandelten Blättern erreichte ihr Maximum ebenfalls drei Tage nach der Phosphatapplikation und nahm danach ab (Abb. 39b). Dieser systemische Effekt äußerte sich in erhöhten GSA-Gehalten, welche die Werte der entsprechenden Kontrollen um das 28fache (drei Tage), 10fache (sechs Tage) sowie 5fache (neun Tage) überstiegen.

3. ERGEBNISSE

a) GSA-Gehalte in behandelten Blättern



b) GSA-Gehalte in unbehandelten Blättern

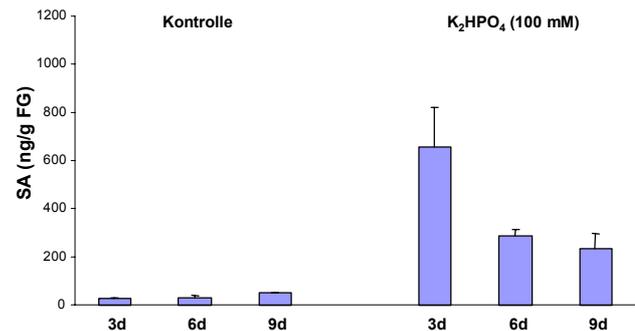


Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der Salizylsäureakkumulation nach einer Blattapplikation von K₂HPO₄ (Langzeitkinetik)

Die beiden unteren Blätter 1 und 2 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden mit einer K₂HPO₄-Lösung (100 mM) besprüht. Drei, sechs und neun Tage nach der Behandlung wurden die SA-Gehalte im behandelten Blatt 2 sowie im höher inserierten, unbehandelten Blatt 3 bestimmt.

Bei Betrachtung der SA-Langzeitkinetik über neun Tage zeigte sich, dass die maximale Akkumulation von SA ca. drei Tage nach der Induktorapplikation erreicht wurde. Danach war eine deutliche Abnahme der GSA-Gehalte festzustellen, die jedoch nicht auf das Niveau der Kontrollvariante zurückging.

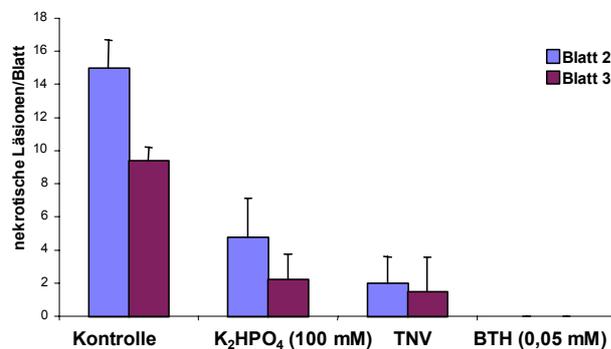
3.2.6.3 Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Phosphat und anderen Induktoren auf die Akkumulation von Salizylsäure

Die biologische Wirksamkeit verschiedener Induktoren (Phosphat, TNV und BTH) im System Gurke/*C. lagenarium* sowie deren Einfluss auf die SA-Akkumulation ist in Abb. 40 dargestellt. Die Resistenzprüfung zeigt, dass sich eine systemische Resistenzausprägung nach Vorbehandlung von Blatt 1 mit K₂HPO₄ in einer Befallsreduktion auf den Blättern 2 und 3 von 68 % bzw. 76 % äußert (Abb. 40a). Die biotische Induktion mit TNV führte zu vergleichbaren Befallsreduktionen auf den Blättern 2 und 3 von 87 % bzw. 84 %. Der synthetische Pflanzenaktivator BTH unterdrückte die Krankheitssymptome vollständig.

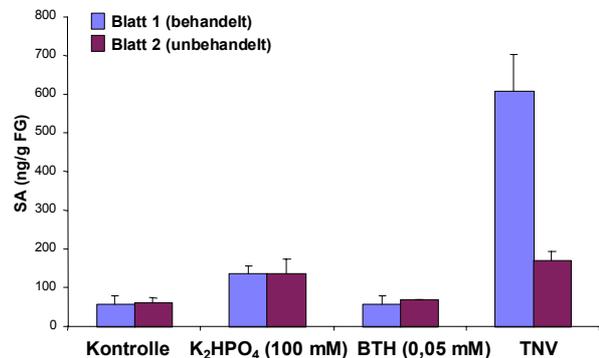
Der Gehalt an FSA im behandelten Blatt war am 3. Tag nach Phosphatapplikation um den Faktor 2, nach TNV-Inokulation um den Faktor 11 erhöht. Im unbehandelten Blatt 2 bewirkte K₂HPO₄ ebenfalls eine Steigerung der FSA um den Faktor 2 und TNV um den Faktor 3. Die GSA-Gehalte waren auch bei diesem Experiment stets deutlich höher als die Gehalte an FSA, so dass sie in den behandelten Blättern nach K₂HPO₄-Behandlung um das 24fache, nach TNV-Inokulation sogar um das 112fache erhöht waren. In den höher inserierten unbehandelten Blättern war eine ähnliche Tendenz feststellbar, jedoch auf einem niedrigeren Niveau (Abb. 40c und d). Die GSA wurde durch die K₂HPO₄-Vorbehandlung um den Faktor 3, durch die TNV-Inokulation um den Faktor 6 gesteigert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SA-Gehalte nach dreitägigem Induktionsintervall sowohl nach Phosphatapplikation sowie TNV-Inokulation erhöht waren, während die BTH-Applikation keine Veränderungen der SA-Gehalte hervorrief (Abb. 40b und c). Darüber hinaus ist anzumerken, dass zum Untersuchungszeitpunkt auf den Phosphat-behandelten und TNV-inokulierten Blättern makroskopisch sichtbare Nekrosen festzustellen waren, die nach der BTH-Behandlung nicht auftraten (Daten nicht dargestellt). Somit scheint eine Beziehung zwischen der Ausbildung von Nekrosen und der SA-Akkumulation nach biotischer und chemischer Induktion mit Phosphaten vorzuliegen.

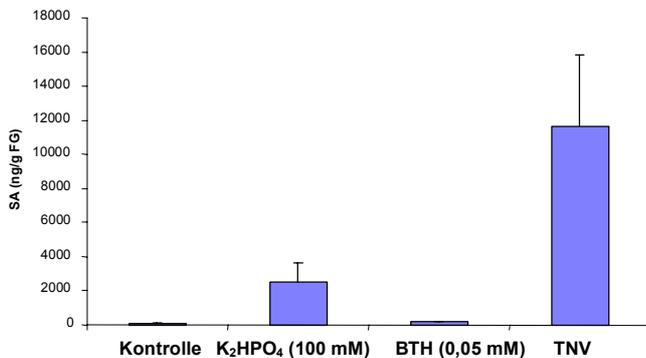
a) Resistenzprüfung



b) FSA-Gehalte



c) GSA-Gehalte im behandelten Blatt 1



d) GSA-Gehalte im unbehandelten Blatt 2

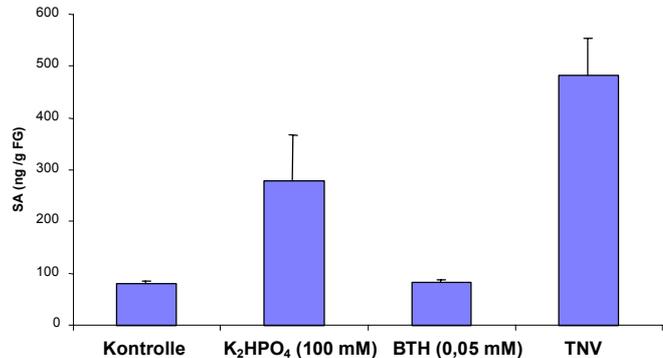


Abb. 40: Einfluss verschiedener Induktoren auf die Ausprägung von SAR im System Gurke/*C. lagenarium* und die SA-Akkumulation

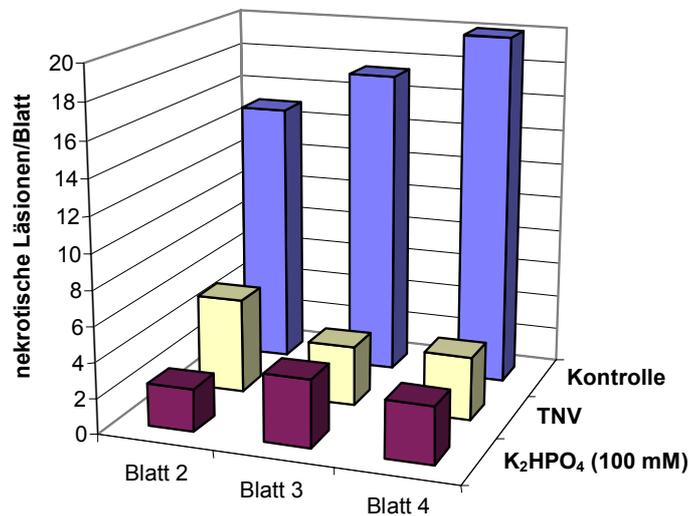
Das erste Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K₂HPO₄ (100 mM) bzw. BTH (0,05 mM) besprüht oder mit TNV inokuliert. Sieben Tage nach den Behandlungen wurden die höher inserierten unbehandelten Blätter 2 und 3 mit jeweils 20 Tropfen je 10 µl einer Konidien suspension von *C. lagenarium* (7,5 × 10⁵ Sporen/ml) inokuliert. Die Bonitur erfolgte zehn Tage nach der Inokulation durch Bestimmung der Anzahl der Läsionen (a). Drei Tage nach der Induktorbehandlung wurden von anderen Pflanzen das behandelte Blatt 1 sowie das höher inserierte unbehandelte Blatt 2 beprobt und die Salizylsäuregehalte bestimmt (b - d). Dargestellt ist ein typisches Ergebnis mehrfach wiederholter Experimente.

In einem umfassenden Zeitreihenexperiment wurde die SA-Akkumulation über einen Zeitraum von fünf Tagen nach der Behandlung mit K₂HPO₄ und TNV in sämtlichen Blattetagen von Gurkenpflanzen verfolgt. Die Resistenzprüfung gegenüber *C. lagenarium* ergab vergleichbare Wirkungsgrade

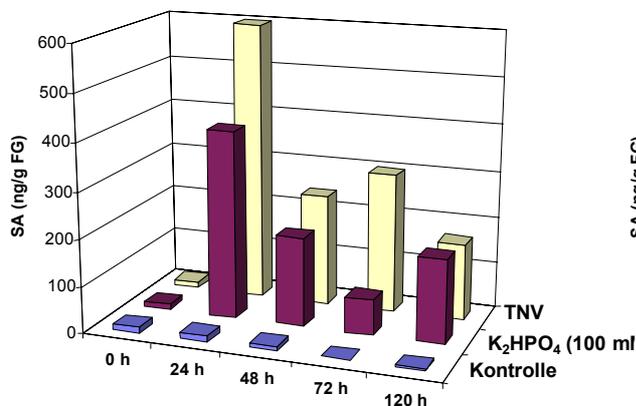
3. ERGEBNISSE

bei Phosphatbehandlungen (78 - 84 %) wie bei biotischer Induktion mit TNV (64 – 82 %) (Abb. 41a). Beide Induktorbehandlungen führten bereits nach 24 h in den behandelten Blättern zu höchsten Gehalten an FSA (Abb. 41b). Insgesamt waren über den gesamten Untersuchungszeitraum die Gehalte gegenüber der Kontrollvariante nach TNV-Behandlung um das 24 - 138fache sowie nach K_2HPO_4 -Applikation um das 19 - 39fache erhöht. Die Gehalte an SAG wurden ebenfalls durch beide Induktorbehandlungen - insbesondere 48 - 120 h nach der Behandlung - stark erhöht. Die Phosphatbehandlung bewirkte 72 h nach Applikation eine Steigerung des SAG-Gehaltes gegenüber der Kontrolle um das 28fache, die TNV-Inokulation (72 h nach Inokulation) um das 36fache, so dass vergleichbare SA-Gehalte durch beide Induktorbehandlungen hervorgerufen wurden (Abb. 41c).

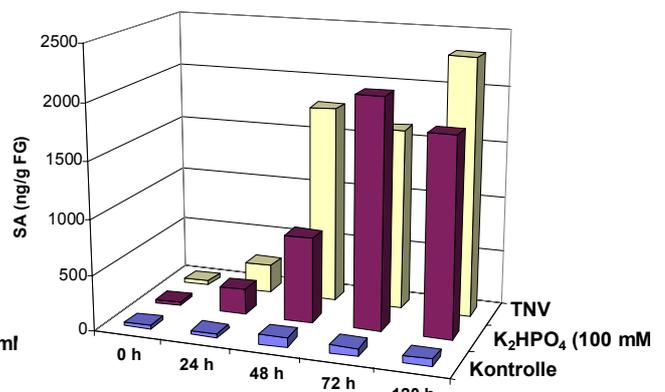
a) Resistenzprüfung



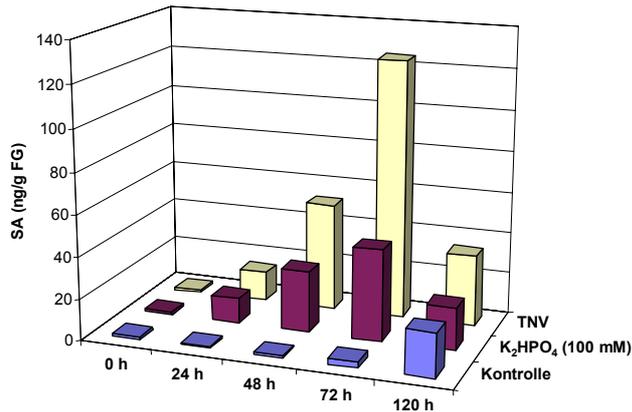
b) FSA-Gehalte im behandelten Blatt 1



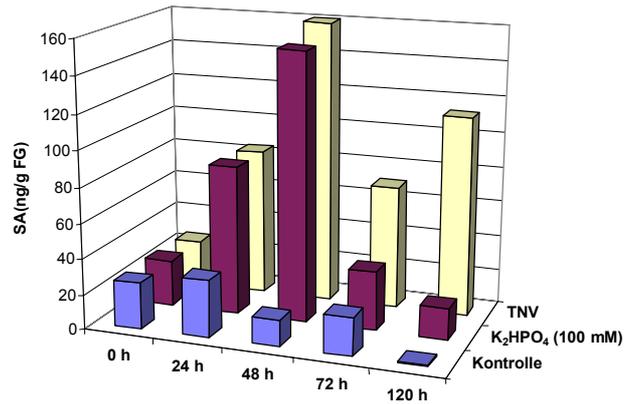
c) SAG-Gehalte im behandelten Blatt 1



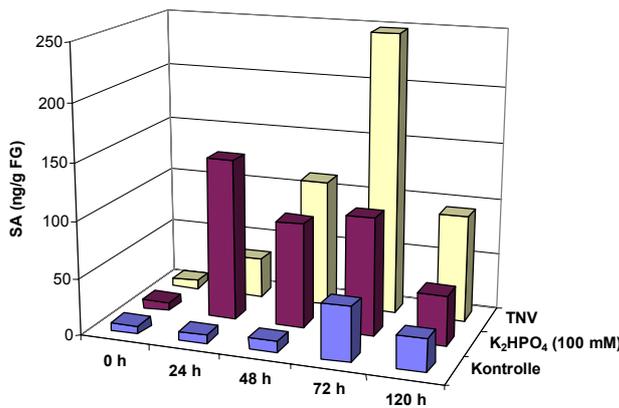
d) FSA-Gehalte im unbehandelten Blatt 2



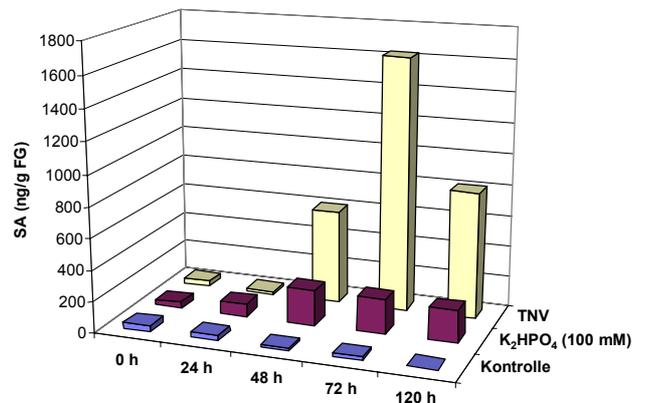
e) SAG-Gehalte im unbehandelten Blatt 2



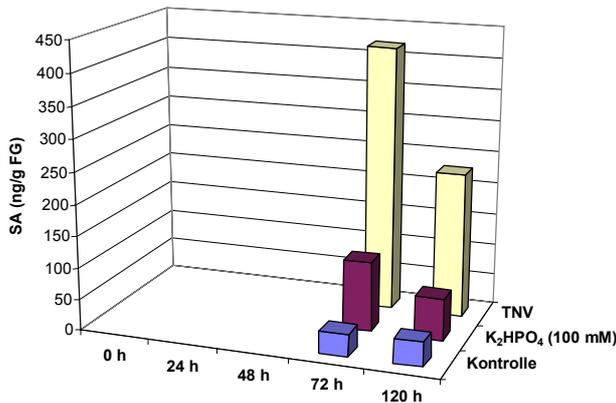
f) FSA-Gehalte im unbehandelten Blatt 3



g) SAG-Gehalte im unbehandelten Blatt 3



h) FSA-Gehalte im unbehandelten Blatt 4



i) SAG-Gehalte im unbehandelten Blatt 4

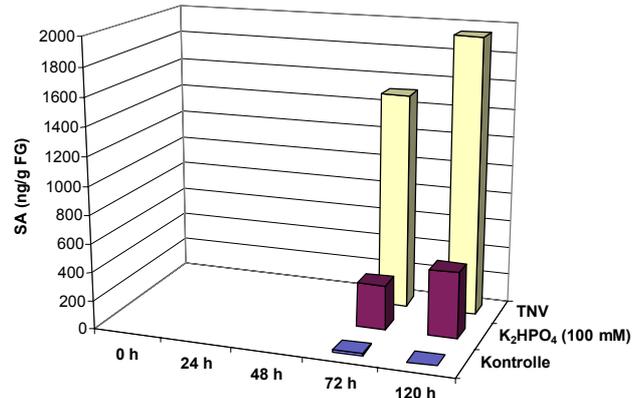


Abb. 41: Effekte von K₂HPO₄ und TNV auf die Resistenzausprägung im System Gurke/*C. lagenarium* und auf die Akkumulation von Salizylsäure

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K₂HPO₄ (100 mM) besprüht bzw. mit TNV inokuliert. Sieben Tage nach der Induktorbehandlung wurden die höher inserierten unbehandelten Blätter 2 - 4 mit jeweils 20 Tropfen je 10 µl einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10⁶ Sporen/ml) inokuliert. Die Bonitur erfolgte zehn Tage nach der Inokulation durch Bestimmung der Anzahl der Läsionen (a). Jeweils 0, 1, 2, 3, und 5 Tage nach der Behandlung wurden von anderen Pflanzen die Blätter 1 - 4 beprobt und die Salizylsäuregehalte bestimmt (b - i).

3. ERGEBNISSE

Von besonderem Interesse war bei diesem Experiment die systemische SA-Akkumulation vor der Ausprägung der SAR, d. h. während des Induktionsintervalls, da die Signalfunktion der SA wohl erst nach Translokation bzw. Neusynthese in unbehandeltem Gewebe zum Tragen kommt. Des Weiteren ist das Wachstumsstadium der Pflanzen zum Behandlungszeitpunkt zu berücksichtigen, um Aussagen über mögliche Translokationsprozesse ableiten zu können. Blatt 1, das Induktorblatt, war bei Applikation bzw. Inokulation vollständig entwickelt, während Blatt 2 zu ca. 80 % und Blatt 3 zu 20 - 30 % ausgebildet waren. Das jüngste Blatt 4 war noch nicht vorhanden bzw. begann sich gerade erst zu entwickeln.

In allen drei höher inserierten Blättern konnten nach den Behandlungen mit K_2HPO_4 sowie TNV deutliche Anstiege der FSA-Gehalte gemessen werden (Abb. 41d/f/h), wobei eine maximale SA-Akkumulationen im Blatt 2 nach 72 h erreicht wurde (Abb. 41d). Im Blatt 3 führte die Phosphatapplikation bereits nach 24 h zum höchsten Gehalt an FSA, welche über einen Zeitraum von 120 h gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht war. Die TNV-Vorinkulation ließ die FSA-Gehalte erst nach 48 h stark ansteigen. Das Maximum wurde nach 72 h erreicht (Abb. 41f). Generell war die Tendenz zur Abnahme der FSA-Gehalte mit zunehmender Versuchsdauer zu beobachten (Abb. 41 b/d/f/h). Im jüngsten Blatt 4, welches aufgrund der bis dahin geringen Größe erst nach 72 h untersucht werden konnte, waren jedoch die FSA-Gehalte nach 72 - 120 h auf einem hohen Niveau, insbesondere nach TNV-Inokulation (Abb. 41h).

Der SAG-Gehalt erreichte in den unbehandelten Blättern, z. B. im Blatt 2, sein Maximum 48 h nach der Induktorbehandlung. Im Vergleich zur Kontrolle war dieser um das 10fache nach K_2HPO_4 -Behandlung sowie um das 11fache nach TNV-Inokulation erhöht (Abb. 41e). In Blatt 3 trat nach TNV-Vorinkulation eine starke SAG-Akkumulation nach 48 h auf und erreichte das Maximum 72 h nach der Inokulation. Der SAG-Anstieg lag 48 - 120 h nach K_2HPO_4 -Behandlung auf einem erhöhtem, aber gleichmäßigem Niveau im Vergleich zur Kontrollvariante (Abb. 41g). Im Blatt 4 war eine Zunahme der SAG-Gehalte im Zeitraum von 72 h - 120 h nach beiden Induktorbehandlungen festzustellen (Abb. 41i). Während die FSA-Gehalte in dieser Periode abnahmen, ist ein Anstieg der SAG als indirekter Hinweis für die erfolgte Umwandlung von FSA zu SAG zu interpretieren.

TNV-Infektionen induzierten in den höher inserierten Blättern im Allgemeinen höhere SA-Gehalte als Phosphatbehandlungen (Abb. 41d-i).

Zusammenfassend konnte anhand der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse gezeigt werden, dass Blattapplikationen mit Phosphaten sowohl in den behandelten als auch in unbehandelten Blättern von Gurkenpflanzen die Akkumulation von FSA und SAG hervorrufen können. Der Anstieg der FSA-Gehalte setzte i. d. R. bereits 24 h nach der Behandlung ein und blieb über mehrere Tage auf einem gesteigerten Niveau. Zeitversetzt erfolgte auch die Akkumulation von SAG,

welche auf Metabolisierung der FSA zurückzuführen ist. Zwischen dem chemischen Resistenzinduktor K_2HPO_4 und dem biotischen Induktor TNV zeigten sich hinsichtlich der hervorgerufenen SA-Effekte deutliche Parallelen. So induzierten beide Agenzien eine hohes Maß an systemischer Krankheitsresistenz und verursachten Zelltodsymptome auf den behandelten Blättern, welche mit der Akkumulation von SA einhergingen. Demgegenüber waren nach Behandlung mit dem synthetischen Pflanzenaktivator BTH keine Zelltodsymptome sowie keine SA-Akkumulation nachweisbar, was auf einen anderen Induktionsmechanismus hindeutet.

3.2.7 Wirkung verschiedener Agenzien hinsichtlich der Zelltodauslösung, Induktion von Krankheitsresistenz sowie der Akkumulation von Salizylsäure

Die bereits dargestellten Experimente mit verschiedenen Phosphatverbindungen (Tab. 6) hatten ergeben, dass die Auslösung von Zelltod, welche sich im Auftreten von nekrotischen Läsionen auf den behandelten Blättern äußerte, eng mit der Ausprägung von SAR verbunden zu sein scheint. Im Rahmen von zusätzlichen Versuchen wurden daher weitere Agenzien hinsichtlich ihrer Nekrose- bzw. HR-auslösenden Fähigkeiten im System Gurke/*C. lagenarium* getestet. Ziel dieser Experimente war es, die Resistenz-auslösenden Eigenschaften verschiedener Substanzen mit ihrer Fähigkeit Zelltod auszulösen zu korrelieren. K_2HPO_4 wurde bei diesen Versuchen stets als positive Kontrolle mitgeführt.

Mechanische Verletzung mit Trockeneis

Trockeneis ist in der Lage, bei Kontakt mit pflanzlichem Gewebe dieses innerhalb kürzester Zeit abzutöten, wobei ebenfalls nach wenigen Stunden Nekrosen auf den Blättern entstehen. Im Vergleich mit einer Phosphatapplikation sollte nun untersucht werden, ob durch diese Art von Zelltod auch SAR hervorgerufen werden kann bzw. ob eine SA-Akkumulation erfolgt. Dazu wurde das erste Blatt von Gurkenpflanzen mit K_2HPO_4 besprüht bzw. durch Auflegen von Trockeneis beschädigt. Diese mechanische Verletzung führte innerhalb weniger Stunden zu flächig abgestorbenem Blattgewebe. Im Gegensatz dazu traten nach Phosphatbehandlungen die bekannten, zahlreichen kleinen nekrotischen Läsionen über einen Zeitraum von 24 - 72 h nach der Behandlung auf. SAR konnte jedoch nur durch Phosphatbehandlung, nicht aber durch die Behandlung mit Trockeneis ausgelöst werden (Tab. 8).

3. ERGEBNISSE

Tab. 8: Systemische Effekte von Behandlungen mit K_2HPO_4 sowie Trockeneis im System Gurke/*C. lagenarium*

Die Kotyledonen bzw. das Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Chinesische Schlangen) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) gesprüht bzw. mit Trockeneisblöcken für ca. wenige Sekunden in Kontakt gebracht. Sieben Tage nach der Behandlung der Kotyledonen wurde das Blatt 1 mit 10 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt bzw. bei Vorbehandlung von Blatt 1 die beiden höher inserierten Blätter 2 und 3 mit jeweils 15 Tropfen (je 10 μ l) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert. Zehn Tage nach der Inokulation wurden die Durchmesser der nekrotischen Läsionen bestimmt. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.

| | Läsionendurchmesser (mm) | | | | | |
|------------------------------|----------------------------------|-------|---------------------------|-------|------------|-------|
| | Vorbehandlung der Kotyledonen | | Vorbehandlung von Blatt 1 | | | |
| | Blatt 1 | | Blatt 2 | | Blatt 3 | |
| Kontrolle | 4,9 | (0,7) | 4,4 | (0,8) | 5,0 | (0,5) |
| K_2HPO_4 | 1,9 | (0,8) | 1,5 | (0,8) | 1,8 | (0,8) |
| Trockeneis | 6,1 | (0,9) | 4,1 | (0,6) | 4,9 | (0,8) |

In Trockeneis-behandelten Blättern war darüber hinaus auch kein Anstieg der SA-Gehalte nachweisbar, während nach Blattapplikation von K_2HPO_4 die FSA-Gehalte um das 3fache und insbesondere die SAG-Gehalte um das 43fache gesteigert waren (Tab. 9). Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass ein schnelles, unspezifisches Abtöten des Pflanzengewebes nicht generell zur Ausprägung von SAR und SA-Akkumulation führt, sondern - wie nach Phosphatbehandlung - physiologische Prozesse über einen längeren Zeitraum ablaufen müssen, die zur Entstehung von Nekrosen bzw. zur Auslösung von Zelltod führen.

Tab. 9: Salizylsäure-Gehalte in Gurkenblättern nach Applikation von K_2HPO_4 bzw. Behandlung mit Trockeneis

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit einer Lösung von K_2HPO_4 (100 mM) besprüht bzw. für einige Sekunden mit Trockeneis in Kontakt gebracht. Vier Tage nach der Behandlung wurden die behandelten Blätter beprobt und die Salizylsäuregehalte bestimmt. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung an.

| | gesamt SA (ng/g FG) | | freie SA (ng/g FG) | | gebundene SA (ng/g FG) | |
|------------------------------|---------------------|-------|--------------------|------|------------------------|-------|
| Kontrolle | 37 | (7) | 18 | (7) | 18 | (9) |
| K_2HPO_4 | 825 | (200) | 47 | (14) | 778 | (187) |
| Trockeneis | 36 | (11) | 10 | (4) | 26 | (15) |

Testung weiterer Substanzen

In mehreren Versuchen wurden verschiedene Agenzien in Resistenztests einbezogen sowie hinsichtlich des Auftretens von Zelltodsymptomen untersucht. Dabei wurden sowohl anorganische als auch organische Chemikalien, u. a. Metall- und Schwermetallsalze, Pflanzenextrakte, herbizide Wirkstoffe, vergleichend mit K_2HPO_4 untersucht. Die Ergebnisse aus mehreren Teilversuchen sind in Tab. 10 zusammengefasst. Innerhalb des Teilversuchs 1 lösten Behandlungen mit Na_2HPO_4 und $CuSO_4$ lokale Zelltodsymptome sowie SAR im distalem Gewebe aus. KNO_3 , KCl, KOH und $NH_4H_2PO_4$ zeigten jedoch keinerlei Wirkung hinsichtlich der untersuchten Parameter. Die in Teilversuch 2 geprüften Verbindungen lösten allesamt nekrotische Zelltodsymptome aus. Diese Reak-

tion war bei allen Substanzen nach frühestens 24 h makroskopisch zu erkennen. Der Einsatz des prooxidativen herbiziden Wirkstoffs Paraquat führte ebenso wie eine Behandlung mit Galacturonsäure zur Auslösung von SAR. Acifluorfen, ein weiterer herbizider Wirkstoff, löste ebenfalls Nekrosen und SAR aus (Daten nicht dargestellt). Im Teilversuch 3 hatte H_3BO_3 keinen makroskopisch sichtbaren Effekt auf das behandelte Blatt und zeigte mit einem Wirkungsgrad von 32 % nur eine geringe Wirkung gegenüber *C. lagenarium*. Als weitere Testsubstanzen wurden Milsana[®], ein Extrakt aus dem Sachalinstaudenknöterich *Reynoutria sachalinensis*, der als Resistenzinduktor im System Gurke/*Sphaerotheca fuliginea* Anwendung findet (Herger *et al.*, 1988) sowie NaCl in ihrer Wirkung mit K_2HPO_4 verglichen (Teilversuch 4). Lediglich die Behandlung mit K_2HPO_4 verursachte nekrotische Läsionen auf dem behandelten Induktorblatt, die auch mit der Ausprägung systemischer Resistenz korrelierte. Die Applikation von Milsana[®] sowie von KCl löste keine Zelltodsymptome aus und führte in diesem Testsystem auch nicht zur Ausprägung von SAR.

Tab. 10: Testung verschiedener Agenzien auf Zelltod-auslösende Eigenschaften sowie auf ihr Potential zur Resistenzinduktion im System Gurke/*C. lagenarium*

In vier unabhängigen Versuchen mit ca. 4 Wochen alten Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurden nachfolgende Agenzien getestet. Die Behandlung erfolgte auf den Blättern 1 und 2 bzw. auf Blatt 1 durch Sprühen wässriger Lösungen bzw. bei Paraquat durch Auftragen von Tropfen auf die Blattoberfläche. Sieben bis neun Tage nach der Behandlung wurden die höher inserierten Blätter mit 20 Tropfen (je 10 µl) pro Blatt einer Sporensuspension von *C. lagenarium* (10^6 Sporen/ml) inokuliert sowie eine makroskopische und histochemische Zelltodprüfung ein bis drei Tage nach der Behandlung durchgeführt. Die Bonitur erfolgte acht bis zehn Tage nach der Inokulation, wobei die Anzahl der nekrotischen Läsionen/Blatt bestimmt wurden.

| Behandlung | behandelte Blätter | Zelltod | Wirkungsgrad (%) |
|----------------------------|--------------------|---------|------------------|
| Teilversuch 1 | | | Blatt 3 |
| K_2HPO_4 (50 mM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 76 |
| KNO_3 (50 mM) | Blatt 1 - 2 | - | 4 |
| Na_2HPO_4 (50 mM) | Blatt 1 - 2 | ++ | 61 |
| KCl (50 mM) | Blatt 1 - 2 | - | 7 |
| $CuSO_4$ (50 mM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 84 |
| KOH (50 mM) | Blatt 1 - 2 | - | 0 |
| $NH_4H_2PO_4$ (50 mM) | Blatt 1 - 2 | - | 16 |
| Teilversuch 2 | | | Blatt 3 |
| K_2HPO_4 (100 mM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 99 |
| Paraquat (50 µM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 97 |
| Galacturonsäure (50 mM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 99 |
| Teilversuch 3 | | | Blatt 3 |
| K_2HPO_4 (75 mM) | Blatt 1 - 2 | +++ | 74 |
| H_3BO_3 (20 mM) | Blatt 1 - 2 | + | 32 |
| Teilversuch 4 | | | Blatt 2 |
| K_2HPO_4 (100 mM) | Blatt 1 | +++ | 87 |
| Milsana [®] (2 %) | Blatt 1 | - | 24 |
| NaCl (100 mM) | Blatt 1 | - | 0 |

3. ERGEBNISSE

Die Agenzien, welche sich in den Screeningversuchen als wirksam im Hinblick auf die Auslösung von Zelltod und SAR erwiesen, wurden weitergehend auch bezüglich der Akkumulation von Salizylsäure untersucht (Abb. 42). Hierbei wurden Blattproben von Pflanzen analysiert, die mit den herbiziden Wirkstoffen Paraquat und Acifluorfen sowie mit dem Schwermetallsalz CuSO_4 behandelt worden waren. Als positive Kontrolle diente K_2HPO_4 . Die Verbindungen wurden auf das unterste Blatt von Gurkenpflanzen gesprüht bzw. als Tropfen aufgetragen. Vier Tage nach der Behandlung erfolgte die Probennahme des behandelten ersten und des unbehandelten zweiten Blattes zur Bestimmung der SA-Gehalte. Nach sieben Tagen wurde eine Resistenzprüfung am unbehandelten Blatt 2 durchgeführt. Sämtliche in Abb. 42 angegebenen Chemikalien führten zur Ausprägung von SAR mit Wirkungsgraden von 71 – 100 %. Zudem verursachten alle eingesetzten Verbindungen innerhalb weniger Tage nach Applikation ausgeprägte nekrotische Reaktionen auf den behandelten Blättern (Daten nicht dargestellt). Die systemische Resistenzauslösung gegenüber *C. lagenarium* ging mit einer mehr oder weniger starken Akkumulation der SA in den behandelten Blättern einher (Abb. 42b). So waren vier Tage nach der Induktorbehandlung die SA-Gehalte um das 55fache (K_2HPO_4 50 mM) und 142fache (K_2HPO_4 100 mM) bzw. um das 55fache (CuSO_4 10 mM) gegenüber der Kontrollvariante erhöht (Abb. 42b). Da Paraquat und Acifluorfen lediglich als Tropfen aufgebracht und nicht großflächig gesprüht wurden wie K_2HPO_4 und CuSO_4 , waren die nekrotischen Flächen auf den behandelten Blättern geringer (Daten nicht dargestellt). Die SA-Gehalte in den Blattextrakten waren möglicherweise deshalb ebenfalls niedriger als in den Extrakten der mit K_2HPO_4 und CuSO_4 behandelten Blätter, jedoch noch deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht - bei Paraquat um das 14- (50 μM) bzw. 29fache (100 μM), bei Acifluorfen um das 12- (50 μM) bzw. 16fache (100 μM).

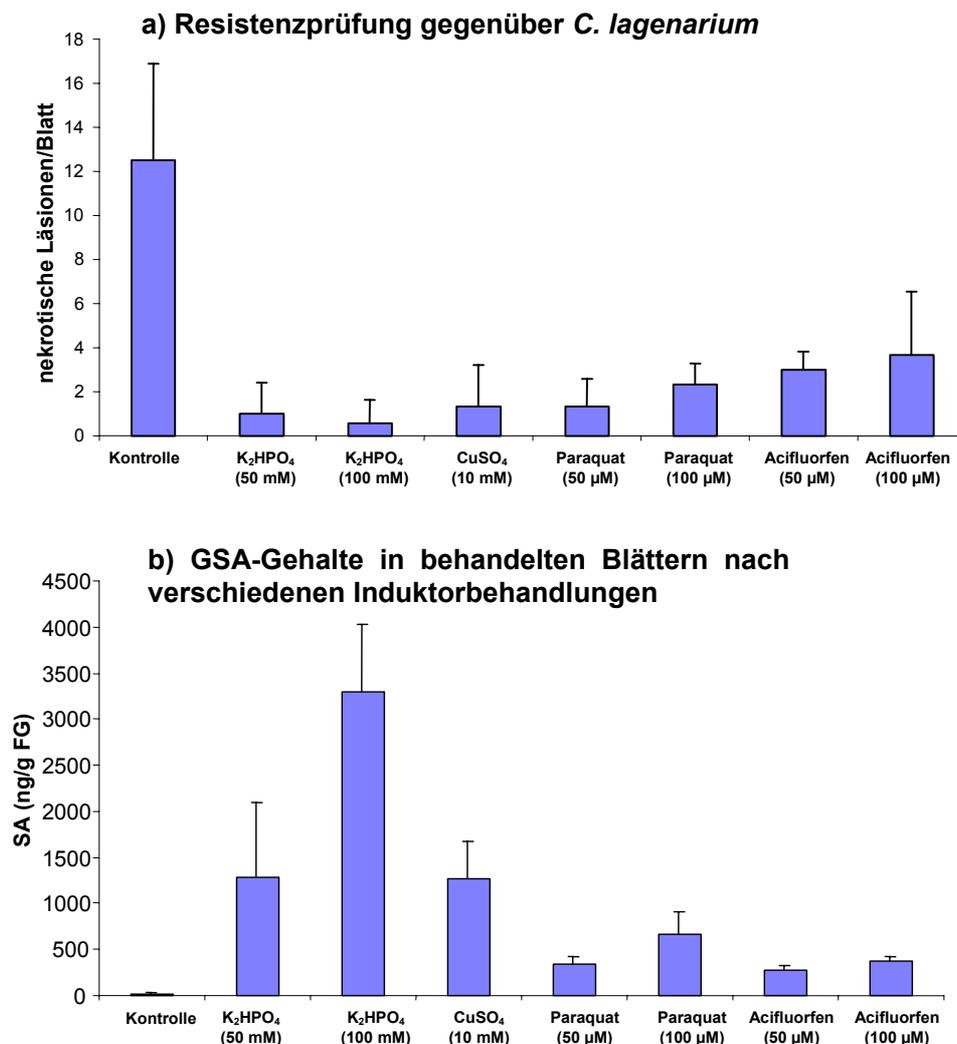


Abb. 42: Einfluss verschiedener Zelltod-auslösender Chemikalien auf die Ausprägung von SAR in Gurkenpflanzen gegenüber *C. lagenarium* und auf die Salizylsäure-Akkumulation

Das erste Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K₂HPO₄ (50 und 100 mM) und CuSO₄ (10 mM) besprüht. Paraquat (50 und 100 µM) und Acifluorfen (50 und 100 µM) wurden als 20 Tropfen (je 5 µl) auf das Blatt gegeben. Vier Tage nach der Behandlung erfolgte die Probenahme des behandelten ersten Blattes zur Bestimmung der SA-Gehalte (b). Die Resistenzprüfung (a) an anderen Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Behandlung durch Inokulation von Blatt 2 mit 25 Tropfen je 10 µl einer Sporensuspension (10⁶ Sporen/ml) von *C. lagenarium*. Die Bonitur wurde zehn Tage nach der Inokulation durch Bestimmung der gebildeten nekrotischen Läsionen durchgeführt.

Die Eigenschaften von verschiedenen in die Arbeit einbezogenen Agenzien Zelltod auszulösen und systemische Krankheitsresistenz zu induzieren sind in Tab. 11 zusammengestellt. Es kann vermutet werden, dass bestimmte Phosphate sowie weitere Chemikalien wie CuSO₄, einige Herbizide und Galacturonsäure über die Auslösung von Zelltod zur Ausprägung von SAR führen und somit in wichtigen Merkmalen mit der biotischen Resistenzinduktion durch Zelltod-auslösende Pathogene übereinstimmen.

3. ERGEBNISSE

Tab 11: Zusammenfassung der Wirkungen verschiedener Agenzien auf die Ausbildung von Zelltodsymptomen und die Auslösung systemischer Resistenz im System Gurke/*C. lagenarium*

| | Zelltod | SAR |
|----------------------------------|---------|-----|
| KH ₂ PO ₄ | - | - |
| K ₂ HPO ₄ | + | + |
| K ₃ PO ₄ | + | + |
| KOH | - | - |
| KCl | - | - |
| NaCl | - | - |
| CuSO ₄ | + | + |
| Paraquat | + | + |
| Acifluorfen | + | + |
| Milsana | - | - |
| Trockeneis | + | - |
| D-Galacturonsäure | + | + |
| Na ₂ HPO ₄ | + | + |
| Na ₃ PO ₄ | + | + |

3.2.8 Untersuchungen zur Phosphat-induzierten Aktivierung abwehrrassoziierter Enzyme

3.2.8.1 Peroxidasen

In Gurkenpflanzen wird die Synthese von PR-Proteinen wie Peroxidase (POX) und Chitinase nach verschiedenen Induktorbehandlungen aktiviert (Hammerschmidt *et al.*, 1982; Dalisay und Kuc, 1995; Strobel *et al.*, 1996). Insbesondere wird die Peroxidase als zuverlässiger biochemischer Marker für eine erfolgreiche Auslösung von SAR in Gurke angesehen. Beide Enzyme (Peroxidase und Chitinase) weisen nach biotischer Induktion sowohl in Blättern mit lokaler als auch in Blättern mit systemischer Resistenzaktivierung gesteigerte Aktivitäten auf (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Die durch biotische Induktion mittels TNV-Inokulation bzw. durch Phosphatbehandlung induzierten POX-Aktivitäten in Blattextrakten sowie in interzellulären Waschflüssigkeiten (IWF) von Gurkenblättern sind in Abb. 43 dargestellt. In einer parallel dazu durchgeführten Resistenzprüfung konnte ein für beide Induktoren vergleichbar hoher Resistenzgrad beobachtet werden (65 - 97 % Befallsreduktion; Daten nicht dargestellt).

In den Extrakten der Phosphat-behandelten sowie der TNV-inokulierten Blätter konnten bereits nach ein bzw. drei Tagen deutliche Anstiege in den POX-Aktivitäten beobachtet werden. Bezogen auf die Kontrolle wurden durch die Phosphatapplikation Aktivitätssteigerungen um das 6 - 11fache, und durch die TNV-Inokulation um das 2 - 10fache hervorgerufen (Abb. 43a). Über den gesamten Untersuchungszeitraum von sieben Tagen lagen die Enzymaktivitäten dieser Varianten auf einem deutlich höheren Niveau als die der Kontrollvariante (Abb. 43a und b). In den unbehandelten Blättern war ein deutlicher Anstieg der POX-Aktivitäten erst nach drei Tagen zu beobachten. Dieser äußerte sich nach Phosphatbehandlung in einem maximalen Anstieg um das 13fache und nach Induktion mittels TNV um das 11fache (Abb. 43b).

Die interzellulären Waschflüssigkeiten (IWF) stellen wässrige Auszüge aus dem Apoplasten dar und ermöglichen Rückschlüsse auf gefundene Veränderungen in einem Kompartiment, welches im Rahmen vieler Wirt-Pathogen-Beziehungen als bedeutender Interaktionsraum in Erscheinung tritt. Die Qualität der IWF wurde anhand der Aktivität der ausschließlich im Cytosol lokalisierten Malatdehydrogenase (MDH) überprüft. Die Kontamination der IWF durch Faktoren des Zellinhaltes kann als insgesamt äußerst gering angesehen werden, da lediglich MDH-Aktivitäten von 0,2 - 0,7 % der Aktivität von Gesamtblattextrakten gemessen wurden (Daten nicht dargestellt). Wie in den Blattextrakten (Abb. 43a und b), wurden durch die Induktorbehandlungen auch deutliche Steigerungen der POX-Aktivitäten in den IWF nachgewiesen (Abb. 43c und d). Von besonderem Interesse waren auch hier die Aktivitäten in den unbehandelten Blättern, die gegenüber der Kontrollvariante ebenfalls deutlich erhöht waren (Abb. 43d). Die erhöhten Aktivitäten des biochemischen Markerenzym

3. ERGEBNISSE

POX in den oberen nicht behandelten/inokulierten Blättern sind ein weiteres Kriterium für die Eigenschaften von Phosphat und TNV SAR auszulösen.

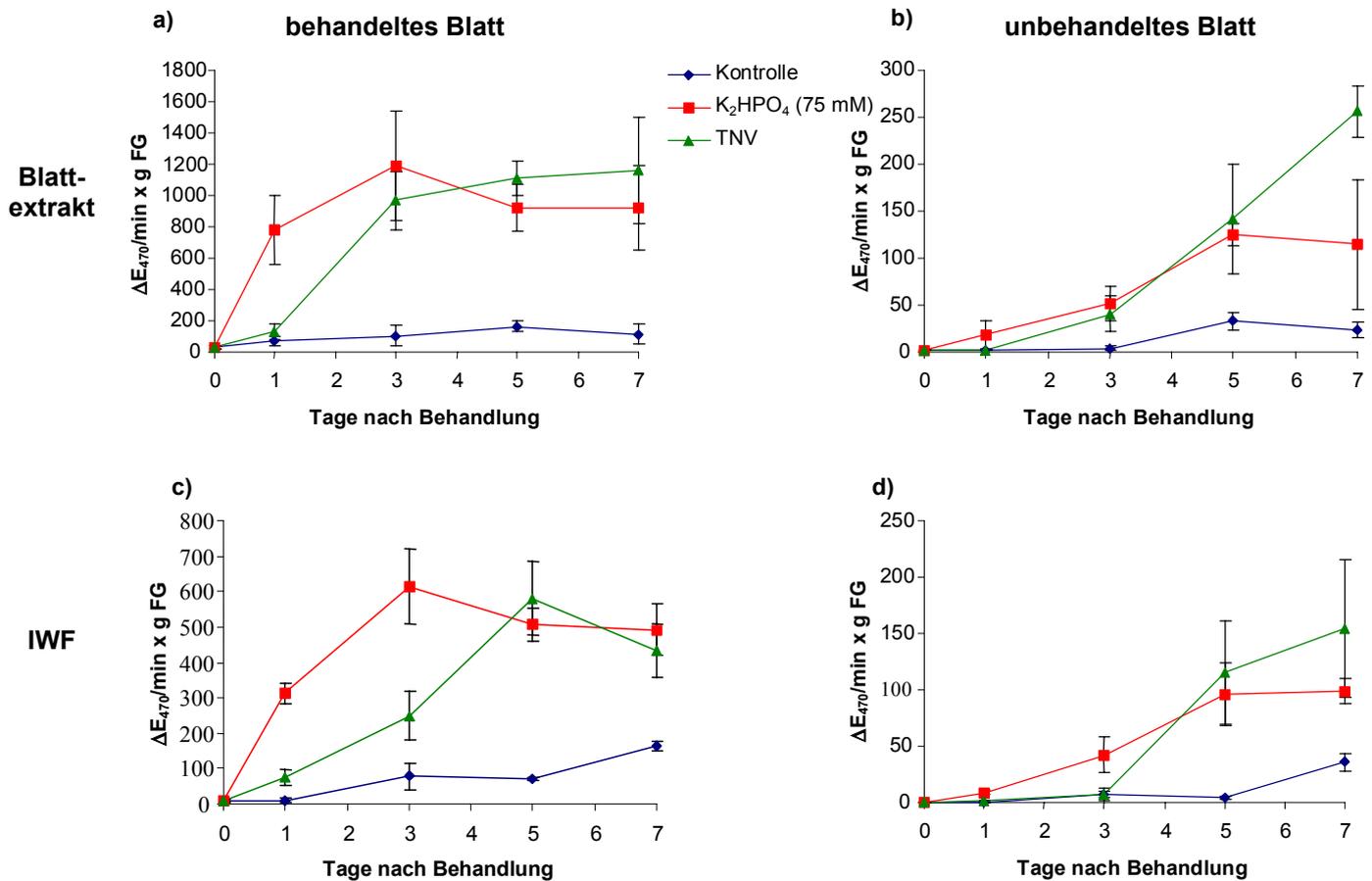


Abb. 43: Peroxidase-Aktivität im Blattgewebe von Gurkenpflanzen nach Blattapplikation von K₂HPO₄ bzw. Inokulation mit TNV

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K₂HPO₄ (75 mM) besprüht bzw. mit TNV inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten vor und nach der Behandlung erfolgten die Probenahmen für die Gewinnung von Blattextrakten bzw. von IWF am behandelten Blatt 1 und dem unbehandelten Blatt 2. Die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch. Dargestellt sind die Ergebnisse eines mehrfach wiederholten Versuchs.

Zusätzlich zur photometrischen POX-Bestimmung wurde mittels Gelelektrophorese versucht, POX-Aktivitätssteigerungen sowie Veränderungen des POX-Isoenzymmusters in der IWF nach Phosphatvorbehandlung nachzuweisen. Die Aktivitätsfärbung des in Abb. 44 dargestellten Gels zeigt deutlich drei Banden mit POX-Aktivität, während in der IWF der Kontrollvariante keine Banden mit POX-Aktivität zu erkennen sind. Das Auftreten der drei POX-Isoenzyme konnte ebenfalls in den nächsthöheren Blättern beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

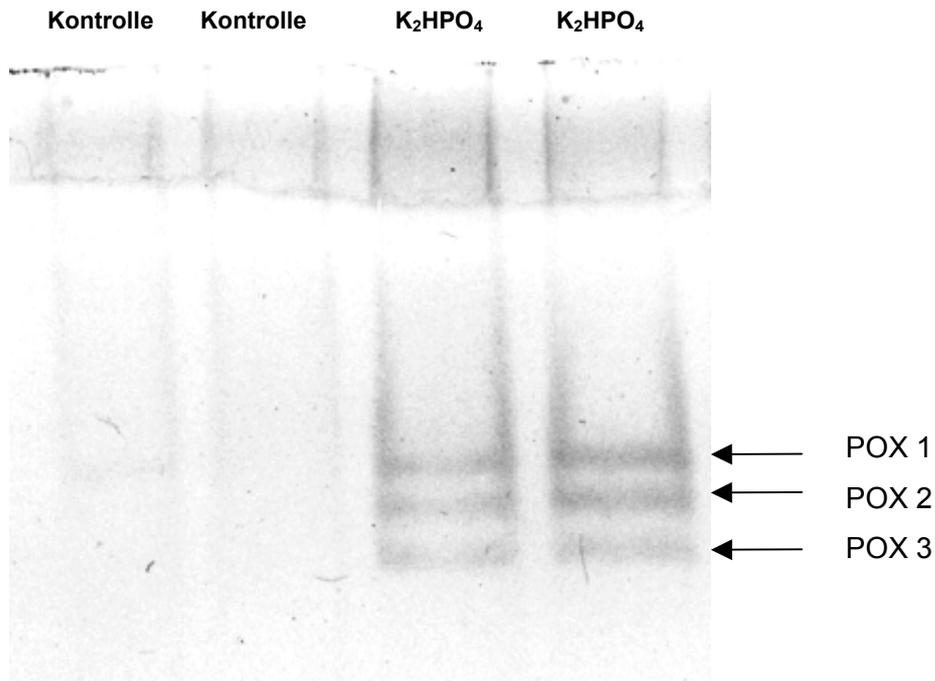


Abb. 44: Einfluss einer Blattapplikation von K_2HPO_4 auf das Peroxidase-Isoenzympmuster in Gurkenblättern

Das untere Blatt 1 von Gurkenpflanzen wurde mit K_2HPO_4 (100 mM) gesprüht. Fünf Tage nach der Behandlung wurden IWF vom höher inserierten Blatt 2 gewonnen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer POX-Aktivitätsfärbung unterzogen. Dargestellt sind in den Spuren 1 und 2 Proteinpräparationen aus der IWF von Kontrollpflanzen und in den Spuren 3 und 4 aus der IWF von Phosphat-vorbehandelten Pflanzen. Die Pfeile markieren die drei detektierten Isoenzyme der POX.

3.2.8.2 Polyphenoloxidase

Der Enzymkomplex der Polyphenoloxidasen (PPO) ist im Rahmen von pflanzlichen Abwehrreaktionen, insbesondere an Lignifizierungsreaktionen beteiligt, denen eine besondere Bedeutung bei der Abwehr von *C. lagenarium* zugeschrieben wird (Bryngelsson und Collinge, 1992). Die Analysen ergaben für die PPO-Aktivität einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie bei der POX-Aktivierung. Nach einer Behandlung von Gurkenblättern mit K_2HPO_4 bzw. einer Inokulation mit TNV waren lokal deutlich gesteigerte PPO-Aktivitäten nachweisbar (Abb. 45a). In den Blattextrakten lagen die Aktivitäten nach Phosphatbehandlung bereits einen Tag nach der Applikation um das 4fache, nach TNV-Inokulation um das 2fache höher als in der Kontrollvariante. Im weiteren Untersuchungszeitraum wurden in den Phosphat-behandelten Blättern die 3,7fach und in den TNV-inokulierten Blättern die 4,5fach höhere Aktivität nachgewiesen. In den IWF konnte ebenfalls ein starker Anstieg der PPO-Aktivitäten festgestellt werden, welcher jedoch erst nach drei Tagen klar hervortrat (6,2fache Steigerung nach K_2HPO_4 -Behandlung; 7,5fach nach TNV-Inokulation). Die PPO-Aktivitäten lagen in Blattextrakten und den IWF nach beiden Induktorbehandlungen auch sieben Tage nach der Behandlung noch um das 3 - 4fache höher als in der Kontrollvariante.

3. ERGEBNISSE

Als systemischer Effekt der beiden Vorbehandlungen waren Steigerungen der PPO-Aktivitäten in den distalen Blättern feststellbar (Abb. 45b und d). In den Extrakten dieser Blätter wurden 1,8fach (K_2HPO_4) bzw. 2,9fach (TNV) höhere Enzymaktivitäten ermittelt (Abb. 45b). Die IWF systemischer Blätter zeigten einen ähnlichen Verlauf der PPO-Aktivitäten (Abb. 45d), wobei jedoch höhere Steigerungen als in Blattextrakten auftraten. Allerdings waren sowohl in den Extrakten als auch in den IWF aus unbehandelten Blättern erst nach 5 Tagen deutlich gesteigerte Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Der stärkste Anstieg in der Enzymaktivität um das 3fache (K_2HPO_4) bzw. 4,4fache (TNV) wurde sieben Tage nach der Behandlung nachgewiesen.

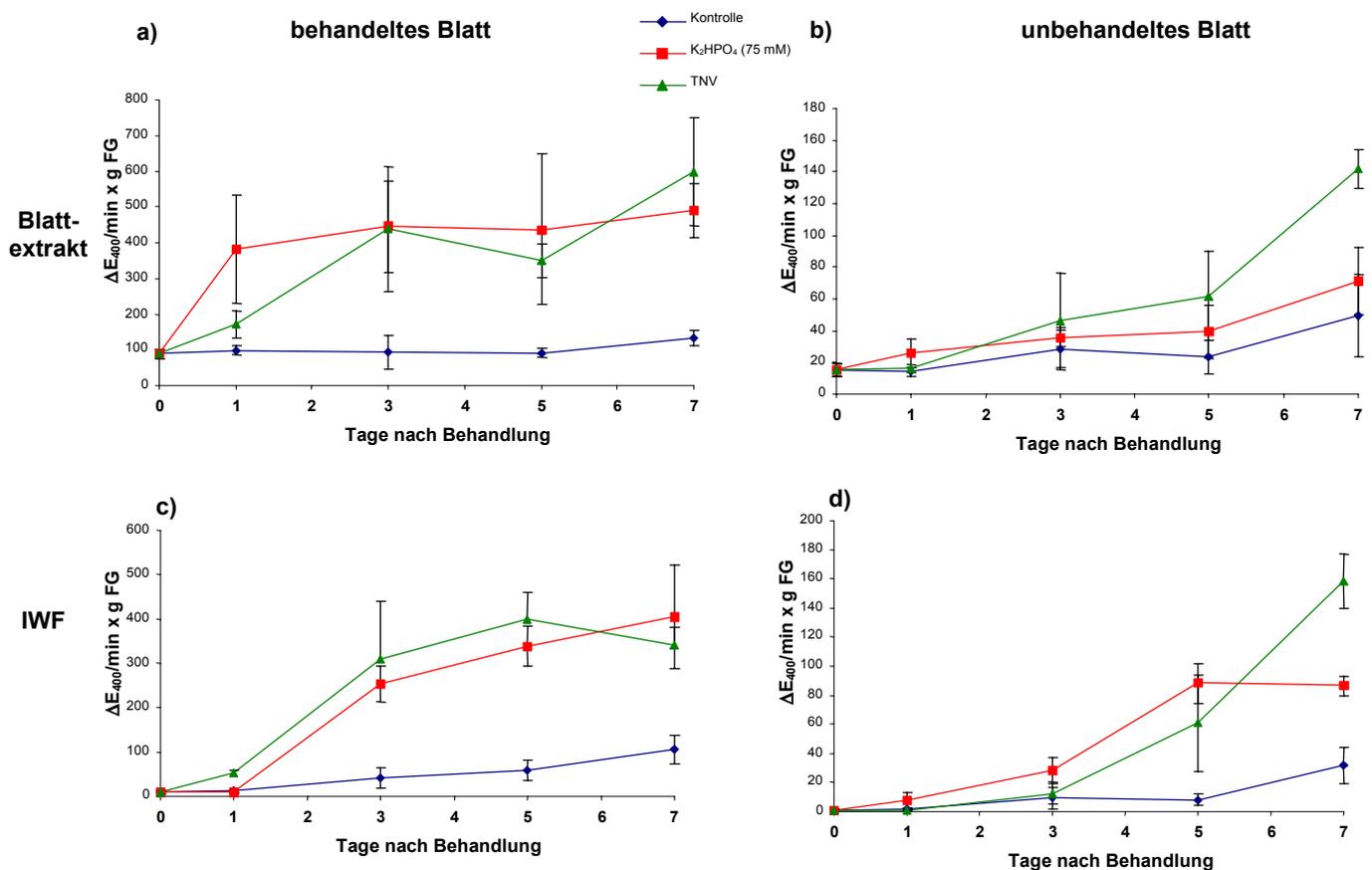


Abb. 45: Polyphenoloxidase-Aktivität im Blattgewebe von Gurkenpflanzen nach Blattapplikation von K_2HPO_4 bzw. Inokulation mit TNV

Das erste Blatt von Gurkenpflanzen (cv. Wisconsin SMR 58) wurde mit K_2HPO_4 (75 mM) besprüht bzw. mit TNV inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung erfolgten die Probenahmen für die Gewinnung von Blattextrakten bzw. von IWF am behandelten Blatt 1 und dem unbehandelten Blatt 2. Die Bestimmung der Polyphenoloxidase-Aktivität erfolgte spektrophotometrisch. Dargestellt sind die Ergebnisse eines mehrfach wiederholten Versuchs.

3.3 Phosphat-induzierte Reaktionen bei Tabak

Tabak stellt neben Gurke ein weitere klassische Modellpflanze dar, welche in der Vergangenheit im Rahmen der SAR-Forschung intensiv bearbeitet wurde. Es lag daher nahe, die an Gurkenpflanzen erzielten Ergebnisse auch im System Tabak/Tabakmosaikvirus (TMV) zu überprüfen. Auch in diesen Studien sollte gezeigt werden, dass Phosphate Zelltodsymptome auslösen, zur SA-Akkumulation führen und SAR induzieren.

3.3.1 Auslösung von Zelltod bei Tabak durch Phosphatbehandlungen

Ebenso wie bei Gurkenpflanzen (Abb. 24, 26 b) führten Blattapplikationen mit Phosphaten wie K_3PO_4 und K_2HPO_4 zur Bildung von nekrotischen Läsionen auf den behandelten Tabakblättern, insbesondere auf der Blattunterseite (Abb. 46). Bereits 24 h nach der Behandlung waren zahlreiche weißliche Läsionen auf den Tabakblättern sichtbar, welche sich einige Tage später zu wenige mm großen nekrotischen Läsionen entwickelten. Tendenziell war die Auslösung von Zelltodsymptomen nach Behandlung mit K_3PO_4 stärker ausgeprägt als nach Applikation von K_2HPO_4 , doch wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Gurkenpflanzen K_2HPO_4 bei den Experimenten mit Tabak eingesetzt.

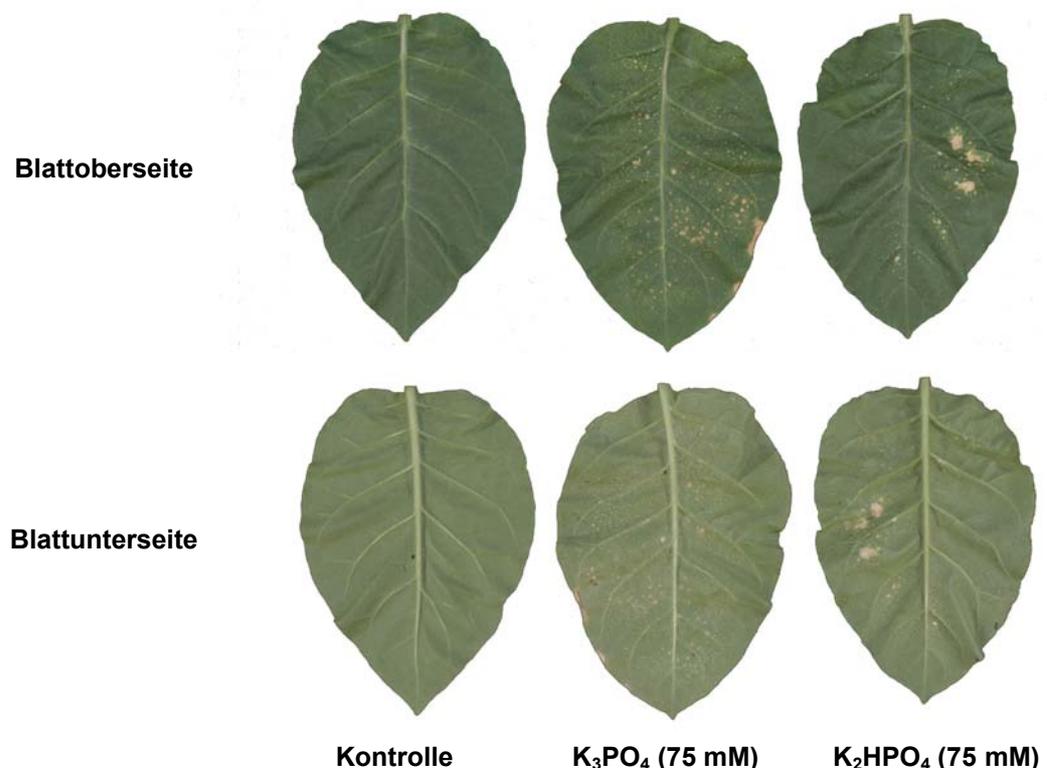


Abb. 46: Phänotyp von Tabakblättern sieben Tage nach Blattapplikation von K_3PO_4 bzw. K_2HPO_4

3. ERGEBNISSE

Histochemische Untersuchungen wurden in Analogie zu den für Gurke beschriebenen Experimenten (3.2.5) durchgeführt. So konnte das Auftreten von Zelltod mittels Trypanblau- und Evansblau-Färbung ebenso nachgewiesen werden wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (O_2^- und H_2O_2). Alle diese Reaktionen traten in einem vergleichbaren Zeitrahmen wie nach der Phosphatbehandlung von Gurken auf (Daten nicht dargestellt).

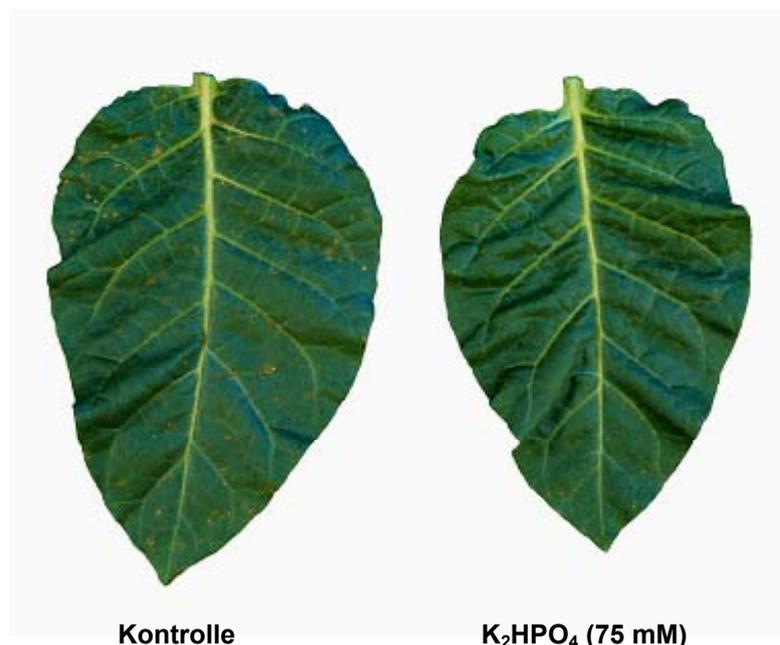
3.3.2 Biologische Wirkung von Phosphatbehandlungen im System Tabak/TMV

Für die Resistenzprüfung wurden Tabakpflanzen nach einer Vorbehandlung der unteren Blätter mit Phosphaten auf den höher inserierten Blättern mit TMV inokuliert. Während bei Infektion von Tabaksorten ohne N-Gen systemische Mosaiksymptome ausgebildet werden, treten bei der Sorte Xanthi nc, die das N-Gen besitzt, nekrotische Lokalläsionen im Rahmen einer hypersensitiven Reaktion auf, wobei die Ausbreitung des Virus lokal begrenzt bleibt. Trotz der bereits vorhandenen genetisch fixierten Resistenz ist das Testsystem N-Gen-Tabak/TMV für Untersuchungen spezieller Aspekte der SAR geeignet, da Vorbehandlungen mit biotischen Induktoren wie TNV oder synthetisch-chemischen Resistenzinduktoren die Ausprägung der TMV-Lokalläsionen nach Challenge-Inokulation beeinflussen und sich i. d. R. in einer gesteigerten Resistenzantwort auswirken (Ross, 1961 a und b; Vernooij *et al.*, 1995).

In Abb. 47 ist die systemische Wirkung einer lokalen Blattapplikation von K_2HPO_4 gegenüber TMV auf den höher inserierten, unbehandelten Blättern dargestellt. Die Entwicklung von TMV-Lokalläsionen war auf dem unbehandelten Blatt einer Phosphat-vorbehandelten Pflanze (Abb. 47, rechts) stark reduziert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 47, links) wurden deutlich weniger und auch kleinere TMV-Läsionen gebildet.

Abb. 47: Systemische Wirkung von K_2HPO_4 im System Tabak/TMV

Die drei unteren Blätter 1 - 3 von Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi nc) wurden mit K_2HPO_4 (75 mM) besprüht. Nach sieben Tagen erfolgte die Inokulation der drei höher inserierten Blätter 4 - 6 mit TMV (10 μ g/ml in 25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7, mit 1 mg Celiite/ml). Abgebildet ist Blatt 5, sieben Tage nach der Inokulation.



Die quantitative Auswertung eines solchen Versuchs ist in Tab. 12 dargestellt. Die Anzahl der nekrotischen TMV-Läsionen/Blatt auf unbehandelten Blättern von Phosphat-vorbehandelten Pflanzen war um 54 % bzw. 81 % reduziert. Auch der mittlere Durchmesser der Einzelläsionen war auf Blatt 5 um 39 % und auf Blatt 6 um 62 % verringert. Bezogen auf die nekrotische Blattfläche wurden Wirkungsgrade durch die Phosphatvorbehandlung von 70 % (Blatt 5) bzw. 96 % (Blatt 6) erzielt (Daten nicht dargestellt).

Tab. 12: Systemische Wirkung einer Blattapplikation von K_2HPO_4 im System Tabak/TMV

Die Unterseiten der Blätter 2 - 4 von Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Xanthi nc) wurden mit K_2HPO_4 (100 mM) besprüht. Sieben Tage nach der Applikation wurden die beiden distalen Blätter 5 und 6 mit TMV (7,5 µg/ml in 25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7, mit 1 mg Celite/ml) inokuliert. Zehn Tage nach der Inokulation wurde die Gesamtzahl der TMV-Läsionen sowie der Durchmesser von 10 Läsionen pro Blatt bestimmt. Die Werte in Klammern geben die Standardabweichung an. Dargestellt sind die Ergebnisse eines typischen Experiments mit drei Wiederholungen.

| | TNV-Läsionen/Blatt | | | | Läsionendurchmesser (mm) | | | |
|------------------------------|--------------------|--------|-----------|--------|--------------------------|--------|-------------|--------|
| | Blatt 5 | | Blatt 6 | | Blatt 5 | | Blatt 6 | |
| Kontrolle | 34 | (11,3) | 77 | (22,3) | 1,03 | (0,29) | 1,59 | (0,44) |
| K_2HPO_4 | 16 | (3,9) | 14 | (4,5) | 0,63 | (0,18) | 0,60 | (0,15) |

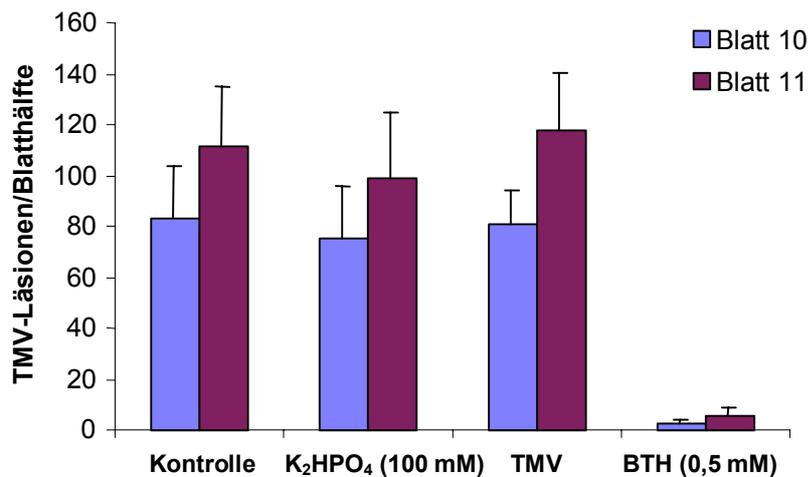
3.3.3 Untersuchungen zur Salizylsäure-Abhängigkeit der Phosphatwirkung im System Tabak/TMV

Transgener Tabak (*N. tabacum* cv. Xanthi NahG-10), welcher das Gen für die SA-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* konstitutiv exprimiert, ist nicht zur Akkumulation von SA befähigt. Eine biotische Resistenzinduktion durch Vorinokulation mit TMV ist bei dieser transgenen Pflanze im Gegensatz zum Wildtyp-Xanthi nicht möglich, da hierzu die Akkumulation von SA notwendig ist (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994). Die Induktion mit synthetischen Aktivatoren wie BTH oder INA ist jedoch möglich, da diese Induktoren in der Kette der Signaltransduktion nach der SA eingreifen und wahrscheinlich SA funktionell ersetzen (Delaney *et al.*, 1994; Vernooij *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1996). Mit Hilfe der Tabaklinie NahG-10 wurde die Abhängigkeit der Resistenzinduktion durch Phosphate von der SA-Akkumulation überprüft.

Abb. 48 zeigt die Ergebnisse eines Experiments mit verschiedenen Induktorbehandlungen. Neben der Behandlung mit K_2HPO_4 wurden die Pflanzen biotisch durch Vorinokulation mit TMV induziert. Als positive Kontrolle erfolgte eine Applikation des synthetischen Aktivators BTH. Obwohl für K_2HPO_4 in Wildtyptabak Xanthi nc eine Resistenzsteigerung gezeigt werden konnte (Abb. 47; Tab. 12), war in NahG-Pflanzen weder durch Vorbehandlung mit K_2HPO_4 noch durch Vorinokulation mit

3. ERGEBNISSE

TMV eine Minderung der Anzahl an TMV-Lokalläsionen und somit eine Resistenzsteigerung zu erreichen. Die Applikation von BTH führte als einzige Variante zu einer Resistenzinduktion, die sich in einer Reduktion der Anzahl der TMV-Lokalläsionen um 97 % (Blatt 10) bzw. 95 % (Blatt 11) manifestierte. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment bezüglich der Läsionendurchmesser beobachtet (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Applikation von Phosphaten bei Tabak über die Akkumulation von SA zu einer Steigerung der Resistenz gegenüber TMV führt. Somit scheint SA bei Tabak essentiell für die Auslösung Phosphat-induzierter Resistenz zu sein.



**Abb. 48: Systemischer Effekt einer Behandlung mit induzierenden Agenzien auf die Resistenz-
ausprägung in transgenem NahG-Tabak**

Vier voll entwickelte Blätter 4 - 7 von Tabak (*N. tabacum* cv. Xanthi nc) wurden mit K₂HPO₄ (100 mM) und BTH (0,5 mM) besprüht bzw. mit TMV (7,5 µg/ml in 25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7, mit 1 mg Celite/ml) inokuliert. Sieben Tage nach den Behandlungen wurden die distalen Blätter 8 - 11 aller Pflanzen mit TMV (7,5 µg/ml, Na-Phosphat-Puffer, 25 mM, pH 7, 1 mg Celite/ml) inokuliert. Die Auswertung erfolgte zehn Tage nach der Inokulation durch Auszählen der Anzahl der TMV-Lokalläsionen.