



Qinghua Zhao (Autor)

**Untersuchungen zum Infektionsmodus,
immunologischen Nachweis und zur biologischen
Bekämpfung von *Leptosphaeria maculans* (Desm)
Ces. & de Not., dem Erreger der Wurzelhals- und
Stängelfäule an Winterraps**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3575>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Chemikalien	8
2.2	Nährmedien und Puffer	8
2.3	Organismen	12
2.3.1	Pflanzen	12
2.3.2	Testpilze	12
2.3.3	Bakterien	12
2.4	Anzucht und Haltung der Pflanzen	13
2.5	Anzucht und Erhaltung der Mikroorganismen	14
2.5.1	<i>Leptosphaeria maculans</i>	14
2.5.2	Pilzkulturen	14
2.5.3	Bakterien	14
2.6	Isolierung von Antagonisten	15
2.7	In vitro-Screening von Antagonisten	15
2.7.1	Dualkultur-Test	15
2.7.2	Test auf antibakterielle Wirkung von Antagonistenisolaten	16
2.7.3	Nachweis der Siderophorenbildung	16
2.7.4	Nachweis flüchtiger Hemmsubstanzen	17
2.7.5	Nachweis extrazellulärer Hydrolasen	17
2.8	Charakterisierung und Identifizierung der Antagonisten	18
2.8.1	Physiologische Untersuchungen	18
2.8.1.1	Gram-Färbung	19
2.8.1.2	Nachweis der L-Alanin-Aminopeptidase	19
2.8.1.3	Lyse durch KOH	19
2.8.1.4	Nachweis der Cytochrom-Oxidase	19
2.8.2	Identifizierung mit dem API-Testsystem	19
2.9	Bestimmung der Proteingehalte	21
2.10	Entwicklung und Optimierung eines DAS-ELISA zur Befallsquantifizierung	21
2.10.1	Herstellung der Antiseren	21
2.10.2	Biotinylierung der Antikörper	22
2.10.3	Optimierung des Testverfahrens	22
2.10.4	Durchführung des DAS-ELISA	22
2.10.5	Probenaufbereitung	24
2.11	<i>ad planta</i> Vorscreening mit Rapskeimlingen	24

2.11.1	Besiedlung von Rapssämlingen durch Antagonisten	24
2.11.2	Hemmwirkung der Antagonisten gegen <i>L. maculans</i> an Rapskeimlingen	24
2.11.2.1	Inokulation der Keimblätter mit <i>L. maculans</i>	24
2.11.2.2	Befallsbonitur an Keimblättern	24
2.11.2.3	Durchführung des Antagonistentests	25
2.12	Inokulationsmethode für <i>ad planta</i> Untersuchungen in BBCH 14/15	26
2.13	Antagonistentest im BBCH 14/15	26
2.13.1	Befallsbonitur am Stängel	26
2.13.2	Durchführung des Antagonistentests	28
2.14	Versuche zum Einfluss des Früh-Stängelbefall mit <i>L. maculans</i> auf den Kornertrag	28
2.15	Untersuchungen zu den Hemmmechanismen	28
2.15.1	Bestimmung von Wachstum und Hemmstoffproduktion in Flüssigkultur	28
2.15.2	Nachweis der Bildung von Cyanwasserstoff und Ammonium	29
2.15.3	Extraktion von Hemmstoffen aus Bakterienkulturfiltraten	30
2.15.4	Plättchentest	30
2.15.5	Dünnschichtchromatographie der Extrakte	30
2.15.6	Nachweis von Bildung zweier Antimykotika mit Hilfe von HPLC	31
2.15.7	Nachweis und Quantifizierung der IAA und IAA-Derivaten- Produktion	32
2.15.8	Quantitative Aktivitätsbestimmung hydrolytischer Enzyme	32
2.16	Wachstumsbeeinflussende Eigenschaften der Antagonisten	33
2.16.1	Keimlingswachstum in Antagonistensuspensionen	33
2.16.2	Einfluss einer Wurzelbehandlung mit Antagonisten auf das Wurzelwachstum	34
2.16.3	Einfluss einer Gießbehandlung mit Antagonisten auf das Wurzelwachstum	34
2.16.4	Bestimmung der Wurzellänge	34
2.17	Untersuchungen zur Besiedlung von Rapspflanze durch <i>Pseudomonas fluorescens</i> RII2 bzw. <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e anhand der Cryo-Rasterelektronenmikroskopie (Cryo-REM)	35
2.18	Mikroskopie und Photographie	35
2.19	Statistische Auswertung	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Isolierung antagonistischer Mikroorganismen	36
3.2	<i>in vitro</i>-Screening antagonistischer Mikroorganismen	37
3.2.1	<i>In vitro</i> -Hemmung des Myzelwachstums von <i>L. maculans</i> und <i>V. longisporum</i> durch Antagonisten	37
3.2.2	Ermittlung des antibakteriellen Spektrums der Antagonisten	41
3.2.3	Nachweis der Siderophorenbildung	43
3.2.4	Nachweis der Bildung extrazellulärer Hydrolasen	44

3.2.5 Überprüfung der <i>in vitro</i> Hemmwirkung ausgewählter Isolate auf nährstoffarmem Medium bzw. bei niedrigen Temperaturen	47
3.2.6 <i>In vitro</i> Hemmwirkung ausgewählter Isolate auf nährstoffarmem Medium bzw. bei niedrigen Temperaturen	48
3.2.7 Überprüfung der Hemmwirkung ausgewählter Antagonisten gegenüber verschiedenen phytopathogenen Pilzen	49
3.2.8 Selektion der Isolate für <i>ad planta</i> -Untersuchungen	50
3.3 Charakterisierung und Identifizierung von Antagonisten	52
3.3.1 Physiologische Eigenschaften der Bakterien	53
3.3.2 Identifizierung mit kommerziellen Testsystemen	53
3.3.2.1 Identifizierung der gramnegativen Bakterien	53
3.3.2.2 Identifizierung der Gram-positiven Bakterien	56
3.4 <i>ad planta</i> Vorscreening von Antagonisten mit Rapskeimlingen	58
3.4.1 Besiedlung von Rapskeimlingen durch Antagonisten	58
3.4.2 Hemmwirkung gegen <i>L. maculans</i> an Rapskeimlingen durch die Antagonisten	59
3.4.2.1 Optimierung der Infektionsmethode	59
3.4.2.2 Verringerung des <i>L. maculans</i> -Befalls durch den Einsatz von Antagonisten	60
3.5 Entwicklung einer Methode zur Inokulation von Raps mit <i>L. maculans</i>	61
3.6 Optimierung des ELISA zur Befallsquantifizierung mit <i>L. maculans</i>	66
3.6.1 Ermittlung der optimalen Konzentrationen der Reagenzien im ELISA	66
3.6.2 Nachweisgrenze des Antigens und Erstellung eines internen Proteinstandards	67
3.6.3 Spezifität der Antikörper gegenüber <i>L. maculans</i>	68
3.7 Ausbreitung von <i>L. maculans</i> nach Infektion am Wurzelhals bzw. an der Stengelbasis von Rapspflanzen	70
3.8 Einfluß des frühen Befalles mit <i>L. maculans</i> auf die Kornertragsbildung	71
3.9 Biologische Bekämpfung von <i>L. maculans</i> an Rapspflanzen im Entwicklungsstadium BBCH 14/15	72
3.9.1 Hemmwirkung der ausgewählten Antagonisten <i>ad planta</i>	73
3.9.2 Verbesserung der Wirksamkeit einer biologischen Bekämpfungsmaßnahme durch eine kombinierte Anwendung bakterieller Antagonisten	74
3.10 Einfluss der bakteriellen Antagonisten auf das Rapspflanzenwachstum	76
3.11 <i>In vitro</i> Untersuchungen zu den Hemmmechanismen der Antagonisten	77
3.11.1 Bildung von Cyanwasserstoff durch <i>Ps. fluorescens</i> RII2 und <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e	78

3.11.2	Bildung von Indoleessigsäure (IAA) bzw. IAA-Derivaten durch <i>Ps. fluorescens</i> RII2 und <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e	79
3.11.3	Fungizide Wirkung von Pyrrolnitrin auf das Wachstum von <i>L. maculans</i>	80
3.11.4	Nachweis der Bildung von DAPG und Pyrrolnitrin durch <i>Ps. fluorescens</i> RII2 und Gö2I in TSB durch DC und HPLC	81
3.11.4	Quantitativer Nachweis extrazellulärer Hydrolasen von <i>Ps. fluorescens</i> RII2 und <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e	84
3.12	Untersuchungen zur Besiedlung von Rapspflanze durch <i>Pseudomonas fluorescens</i> RII2 bzw. <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e	86
4	Diskussion	92
4.1	Isolierung von Antagonisten	92
4.2	<i>In vitro</i> -Screening	95
4.3	<i>Ad planta</i> Screening an Rapskeimlingen	100
4.4	Verminderung des Wurzelhals- und Stängelbasisbefall durch antagonistische Mikroorganismen	102
4.5	Etablierung von Antagonisten am Wurzelhals der Rapspflanzen	106
4.6	Wirkmechanismen	110
4.7	Ausblick	117
5	Zusammenfassung	121
6	Literatur	123