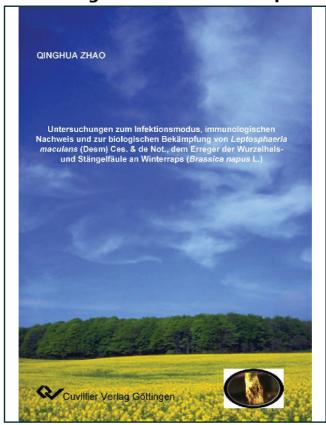


Qinghua Zhao (Autor)

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 Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

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

Inhaltsverzeichnis

Αb	küı	zu	ng	en
----	-----	----	----	----

1	Einl	eitung	1
2	Mate	erial und Methoden	8
2.1	Cher	nikalien	8
2.2	Nähr	medien und Puffer	8
2.3	Orga	nismen	12
2	.3.1	Pflanzen	12
2	.3.2	Testpilze	12
2	.3.3	Bakterien	12
2.4	Anzı	ıcht und Haltung der Pflanzen	13
2.5	Anzı	icht und Erhaltung der Mikroorganismen	14
2	.5.1	Leptosphaeria maculans	14
2	.5.2	Pilzkulturen	14
2	.5.3	Bakterien	14
2.6	Isoli	erung von Antagonisten	15
2.7	In vit	ro-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	Char	akterisierung 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	Best	immung der Proteingehalte	21
2.10	Ent	wicklung 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	ad	planta Vorscreening mit Rapskeimlingen	24

2	.11.1	Besiedlung von Rapssämlingen durch Antagonisten	24
2	.11.2	Hemmwirkung der Antagonisten gegen L. maculans an Rap	oskeimlingen 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	Inoku	ulationsmethode für <i>ad planta</i> Untersuchungen in BBCH	14/15 26
2.13	Antag	gonistentest im BBCH 14/15	26
2	.13.1	Befallsbonitur am Stängel	26
2	.13.2	Durchführung des Antagonistentests	28
2.14	Versu	uche zum Einfluss des Früh-Stängelbefall mit <i>L. macula</i>	ns auf den
	Korn	ertrag	28
2.15	Unter	rsuchungen zu den Hemmmechanismen	28
2	.15.1	Bestimmung von Wachstum und Hemmstoffproduktion in Fl	lüssigkultur 28
2	.15.2	Nachweis der Bildung von Cyanwasserstoff und Ammonium	n 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 HP	PLC 31
2	.15.7	Nachweis und Quantifizierung der IAA und IAA-Derivaten- F	Produktion 32
2	.15.8	Quantitative Aktivitätsbestimmung hydrolytischer Enzyme	32
2.16	Wach	nstumsbeeinflussende 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 W	urzelwachstum 34
2	.16.4	Bestimmung der Wurzellänge	34
2.17	Unter	rsuchungen zur Besiedlung von Rapspflanze durch Pse	udomonas
		escens RII2 bzw. Paenibacillus polymyxa HA3e anhand	-
		erelektronenmikroskopie (Cryo-REM)	35
		oskopie und Photographie	35
2.19	Statis	stische Auswertung	35
3	Ergeb	onisse	36
3.1 I	solieru	ung antagonistischer Mikroorganismen	36
3.2 <i>i</i>	in vitro	o-Screening antagonistischer Mikroorganismen	37
3	.2.1 <i>In</i>	vitro-Hemmung des Myzelwachstums von L. maculans und	V. longisporum
		rch Antagonisten	37
3	.2.2 Err	mittlung des antibakteriellen Spektrums der Antagonisten	41
3	.2.3 Na	achweis der Siderophorenbildung	43
3	.2.4 Na	achweis 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 Antagoniste	n 59
3.4.2.1 Optimierung der Infektionsmethode	59
3.4.2.2 Verringerung des <i>L. maculans</i> -Befalls durch den Einsatz von Antagoniste	n 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 Proteinstandard	s 67
3.6.3 Spezifität der Antikörper gegenüber L. maculans	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 ad planta 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 Ps. fluorescens RII2 und	
Paenibacillus polymyxa HA3e	78

3	3.11.2	Bildung von Indolessigsäure (IAA) bzw. IAA-Derivaten durch	
		Ps. fluorescens RII2 und Paenibacillus polymyxa HA3e	79
3	3.11.3	Fungizide Wirkung von Pyrrolnitrin auf das Wachstum von L. maculans	80
3	3.11.4	Nachweis der Bildung von DAPG und Pyrrolnitrin durch Ps. fluorescens RII2	
		und Gö2I in TSB durch DC und HPLC	81
3	3.11.4	Quantitativer Nachweis extrazellulärer Hydrolasen von Ps. fluorescens RII2	
		und Paenibacillus polymyxa HA3e	84
3.12	2 Unte	ersuchungen zur Besiedlung von Rapspflanze durch <i>Pseudomonas</i>	
	fluc	orescens RII2 bzw. <i>Paenibacillus polymyxa</i> HA3e	86
4	Disk	kussion	92
4.1	Isolie	erung von Antagonisten	92
4.2	In vit	tro-Screening	95
4 .3	4.3 Ad planta Screening an Rapskeimlingen		100
4.4	Verm	ninderung des Wurzelhals- und Stängelbasisbefall durch antagonistische	9
	Mikro	oorganismen	102
4.5	Etab	lierung von Antagonisten am Wurzelhals der Rapspflanzen	106
4.6	.6 Wirkmechanismen		110
4.7	Ausk	olick	117
5	Zus	ammenfassung	121
6	Lite	ratur	123