

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

Verbundprojekt „PathControl“; **Teilprojekt „Wechselwirkung von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 mit dem Pilzpathogen *Rhizoctonia solani* und der mikrobiellen Gemeinschaft bei der Kolonisierung von Wurzeln“**

Förderkennzeichen: 0315654C

Zuwendungsempfänger: Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Postfach 1129, 85758 Oberschleißheim

Ausführende Stelle: Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) – Abt. Mikroben-Pflanzen-Interaktionen (AMP), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

Projektleitung: Herr Prof. Dr. Anton Hartmann

Projektlaufzeit: 01.01.2010 bis 30.06.2013

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministerium für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315654C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“.

Schlußbericht

I. Kurze Darstellung:

1. Aufgabenstellung: Es war ein optimiertes axenisches Testsystem für die pathogenunterdrückende Wirkung des pflanzenwachstums-fördernden Bakteriums *B. amyloliquefaciens* FZB42 für Salatkeimlinge zu entwickeln und für detaillierte Kolonisierungsstudien zu nutzen, in dem der Beitrag einzelner Gene von FZB42 zur Wurzelkolonisierung und Biokontrollwirkung von *Rhizoctonia solani* erkannt und auch entsprechende sekundäre Metabolite analysiert werden können. Ferner sollte in Feld- und Topfversuchen in Böden mit entsprechender *R. solani*-Pathogenbelastung in praxisnaher Anwendung FZB42 eingesetzt werden und die Wirkung sowohl auf den *R. solani*-Befall von Salat als auch auf die Mikroflora der Rhizosphäre untersucht werden.
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde: Das Genom von *B. amyloliquefaciens* FZB42 war komplett sequenziert und entsprechende Mutanten und Genkonstrukte standen für eine detaillierte Analyse der Funktion bestimmter Antibiotika oder anderer sekundärer Stoffwechselprodukte zur Verfügung. Im Institut für Zierpflanzenbau IGZ Großbeeren stand das know how für das *R. solani* Pathogensystem zur Verfügung, während das CeBiTec großes (Meta)genomik-Analyse knowhow hatte. Dies sollte mit dem mikrobiologischen und metabolisch-analytischen knowhow des Helmholtz Zentrum München im „Pathcontrol“-Verbund zusammengeführt werden.
3. Planung und Ablauf des Vorhabens: Die Koordination hatte Prof. Dr. Rainer Borriss (ABITEP, Berlin; früher Humboldt-Universität Berlin), der auch die Konstruktion und Funktionsanalyse von diversen Mutanten von FZB42 übernahm. Die Feld- und Topfversuche führte das IGZ Großbeeren (Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau) durch. Die detaillierten Metaboliten- und Metabolomic-Analysen wurden im Rahmen dieses Projekts von der Abteilung für Biogeochemie des Helmholtz Zentrums München durchgeführt (unter Anleitung von Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin).
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens: Es waren eine Reihe von antibiotisch Metaboliten von FZB42 und deren Synthesegene bekannt; auch Synthese anderer sekundären Stoffwechselmetabolite war sowohl chemisch als auch genetisch aufgeklärt, doch die Bedeutung einzelner dieser Komponenten für die biologische Kontrolle des Pilzpathogens *R. solani* für den Befall und die Schädigung im ökologischen System der Wurzelbesiedlung war nicht geklärt. Die Lokalisierung der FZB42-Wildtyps und definierter Mutantenstämme wurde durch die Markierung mit gfp (green fluorescence protein) und konfokale Laser Scanning Mikroskopie möglich; auch der Pilzpathogen war durch Autofluoreszenz gut identifizierbar. Die Erfassung des Metabolitenspektrums erfolgte einerseits im umfassenden Sinne durch FT-ICR-Massenspektrometrie und andererseits spezifisch durch UPLC-qToF-MS-Analytik erfasst. Die Analyse der Bakteriengemeinschaft der Rhizosphäre von Salat in Ackerboden wurde durch eine genetische Fingerprintanalyse durchgeführt. Als Literatur wurde die einschlägige internationale Fachliteratur verwendet.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen: Im Rahmen des PATHCONTROL-Verbunds wurden auch genomische und transkriptomische Analysen von *R. solani* durch das CeBiTec der Uni Bielefeld in denselben Feldproben oder getrennten experimentellen Ansätzen durchgeführt, um die funktionelle Analyse der Interaktion von Pilzpathogen mit dem Biokontroll-Bakterium während der Kolonisierung des Salatwirts getestet.

II. Eingehende Darstellung:

II.1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen:

II.1.1. Zielstellung: Kolonisierungsverhalten von FZB42 Wildtyp und Mutanten an den Wurzeln von Salat (*Lactuca sativa*) in einem chemisch definierten Modellsystem in An- und Abwesenheit von *R. solani*

Methoden:

Verwendete Mikroorganismen:

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 Wildtyp und Mutanten sind in Tabelle 1a/b aufgelistet und wurden von Abitep, Berlin, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in LB Medium mit den jeweils nötigen Antibiotika Erythromycin 1 µg/ml, Lincomycin 25 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml und Chloramphenicol 10 µg/ml bei 30°C im Schüttelkolben angezogen. *Rhizoctonia solani* (Isolat 7/3/14) wurde von der Stammsammlung des Instituts für Gemüse und Zierpflanzenbau (Großbeeren, Deutschland) erhalten und auf Kartoffel Dextrose Agar angezogen.

Tabelle 1a: Liste von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Mutanten

Name	Genotype	Phenotype
FB01mut1	$\Delta amyE::em^r gfp^+$	GFP-markierter Wildtypstamm von FZB42
<i>yusV</i>	$\Delta yusV::Km^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in Biofilmbildung
<i>pabB</i>	$\Delta pabB::Km^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in Biofilmbildung
<i>degU</i>	$\Delta degU::Km^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in Biofilmbildung und Schwärmen
CH5	$\Delta yczE, \Delta spf::Cm^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in der Biosynthese von nicht-ribosomal synthetisierten Lipopetiden und Polyketiden

Rhizosphärenkolonisierungstest:

Zur Optimierung der Inokulationsdichte wurden vorgekeimte und oberflächensterilisierte Salatsamen mit einer Zellsuspension von *B. amyloliquefaciens* FZB42 FB01mut1 bei verschiedenen Zellkonzentrationen von 10^5 , 10^6 , und 10^7 cfu/mL mit 0.3% NaCl für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Für alle anderen Versuche wurden Bakteriensuspensionen mit einer Zelldichte von ca. 10^7 cfu/mL verwendet.



Salatkeimlinge im axenischen Quarzsandsystem

Ergebnisse:

Optimierung der Inokulumdichte

Salatkeimlinge, die mit verschiedenen Konzentrationen (10^5 , 10^6 , und 10^7 cfu/mL) des GFP-markierten *B. amyloliquefaciens* FZB42 FB01mut1 Wildtypstammes angeimpft worden waren, zeigten nach 1-2 Wochen Wachstum in der Wachstumskammer ein vergleichbares Wachstum. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zeigte zahlreiche Kolonien in jedem Fall, was eine gleichstarke Kompetenz für Kolonisierung zeigte (Abbildung 1).

Kolonisierungs- und Konkurrenzverhalten von FZB42 Wildtyp und Mutanten

Ko-inokulationsversuche mit *R. solani* und FZB42 Wildtyp sowie mit Mutantenstämmen im Quarzsand-Modell zeigten, dass FZB42 Wildtyp die Infektion mit dem pathogenen Pilz *R. solani* zumindest bis zur 2. Woche hemmen konnte (keine sichtbaren Zeichen für Infektion). Im Fall von Pflanzen, die nicht mit dem FZB42-Wildtyp inokuliert worden waren, führte *R. solani* nach 1 Woche braune Wurzelverrottungssymptome mit „damping off“-Phänotyp bei den Keimlingen hervor.

Bei Verwendung der FZB42-Mutanten *pabB*, *yusV*, *degU* (Biofilm-Mutanten) und CH5 (nicht-ribosomale Lipopeptid- und Polyketidsynthese gestört) zeigte sich eine gute Kolonisierungsfähigkeit im monoxenischen System. Pflanzen, die mit *R. solani* und einer der Mutanten inokuliert worden waren, zeigten sichtbare Zeichen von Infektion nach 1 Woche (Abbildung 2).

Im Falle der Mutante CH5 waren die Pflanzen bereits nach 1 Woche Infektion tot, falls *R. solani* ebenfalls geimpft worden war; es war eine starke Kolonisierung mit dem Pilz in Gegenwart einer hohen Zahl von Bakterien zu beobachten (Abbildung 3).

Folgerungen:

Das sehr starke Wachstum des Pilzes in Anwesenheit einer hohen Zahl der FZB42-Mutante CH5 kann auf die Unfähigkeit der Mutante, antifungische Substanzen zu synthetisieren, zurückgeführt werden.

Das Überleben der Salatkeimlinge nur bei Ko-inokulation mit FZB42 Wildtyp macht die zentrale Bedeutung der Biofilmbildung und der Antibiotikaproduktion von FZB42 für die *in situ* anti-fungische Wirkung gegen *R. solani* als Schlüsselfaktoren für die biologische Kontrolle unter Rhizosphärenbedingungen deutlich.

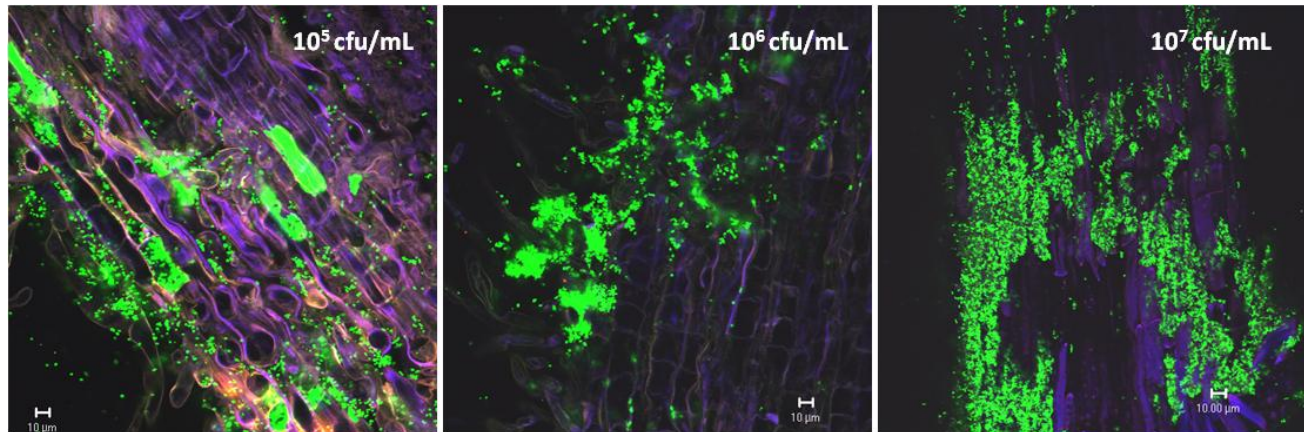


Abbildung 1: Konfokale Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Kolonisierung von Salatwurzeln bei unterschiedlichen Inokulierungsdichten des Wildtyps *B. amyloliquefaciens* FZB 42 (FB01mut1).

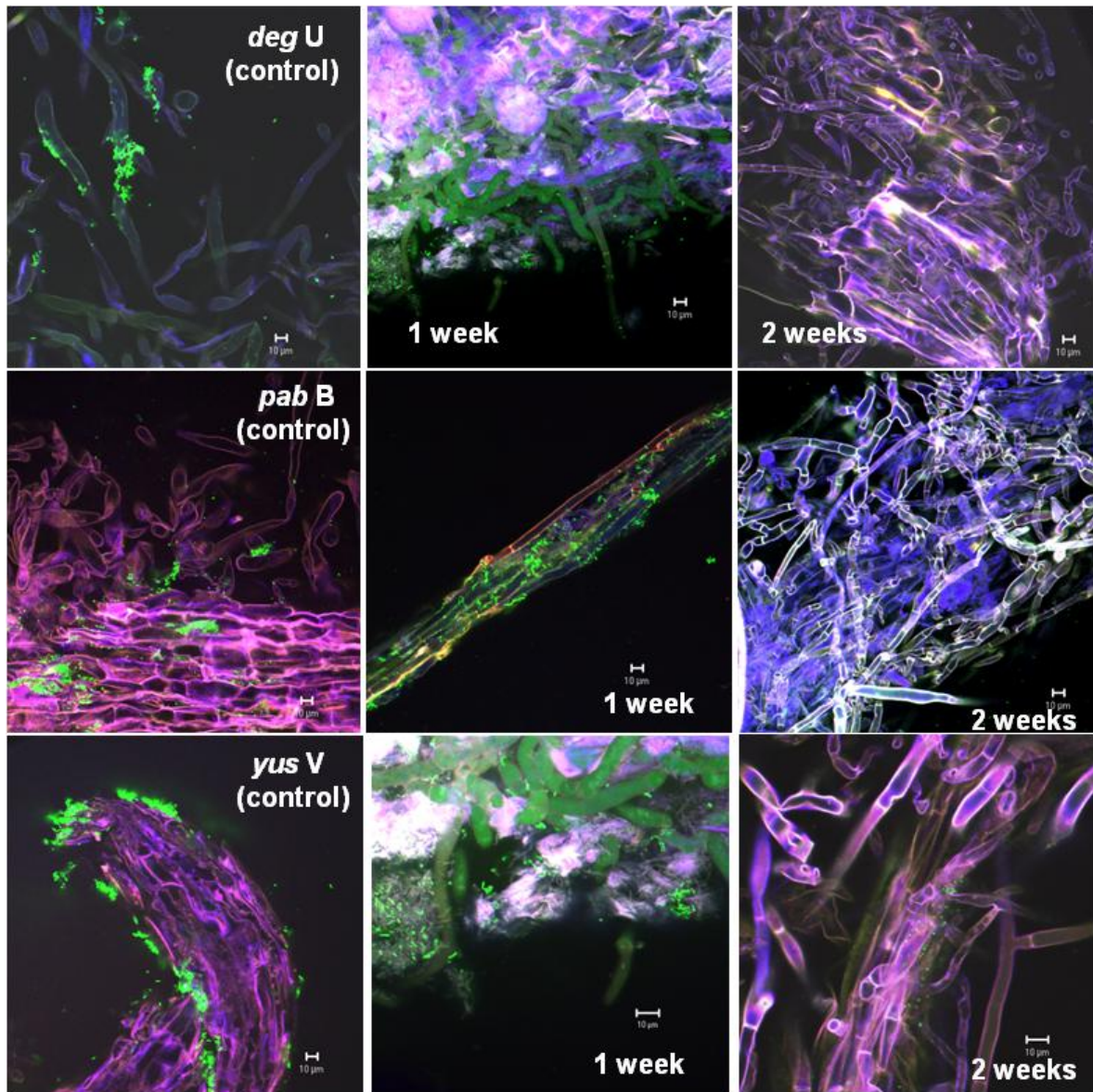


Abbildung 2: Konfokale Laser Scanning Mikroskopische Bilder, welche die Kolonisierung von Salatwurzeln mit GFP-markierten Mutanten von FZB42 (siehe Tabelle 1) in Abwesenheit (control) und Anwesenheit (1 week, 2 weeks) von *R. solani* zeigen.

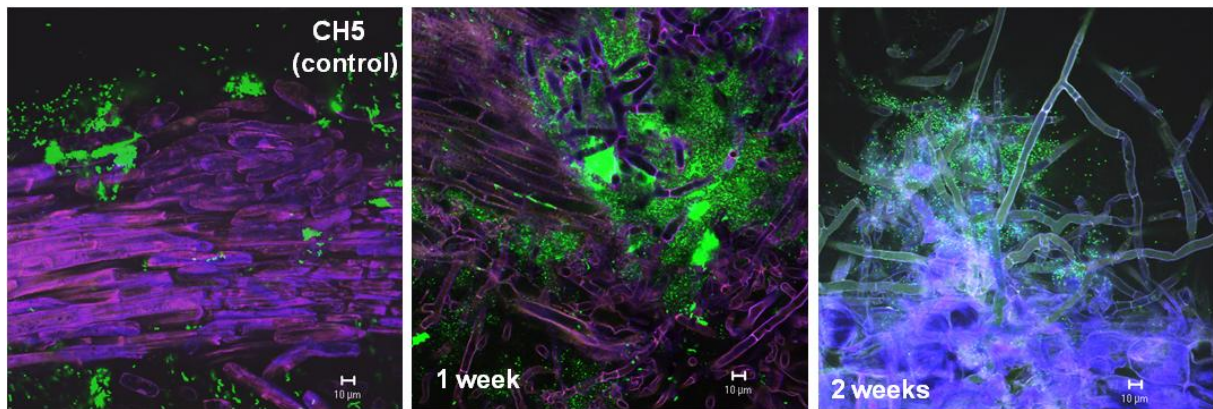


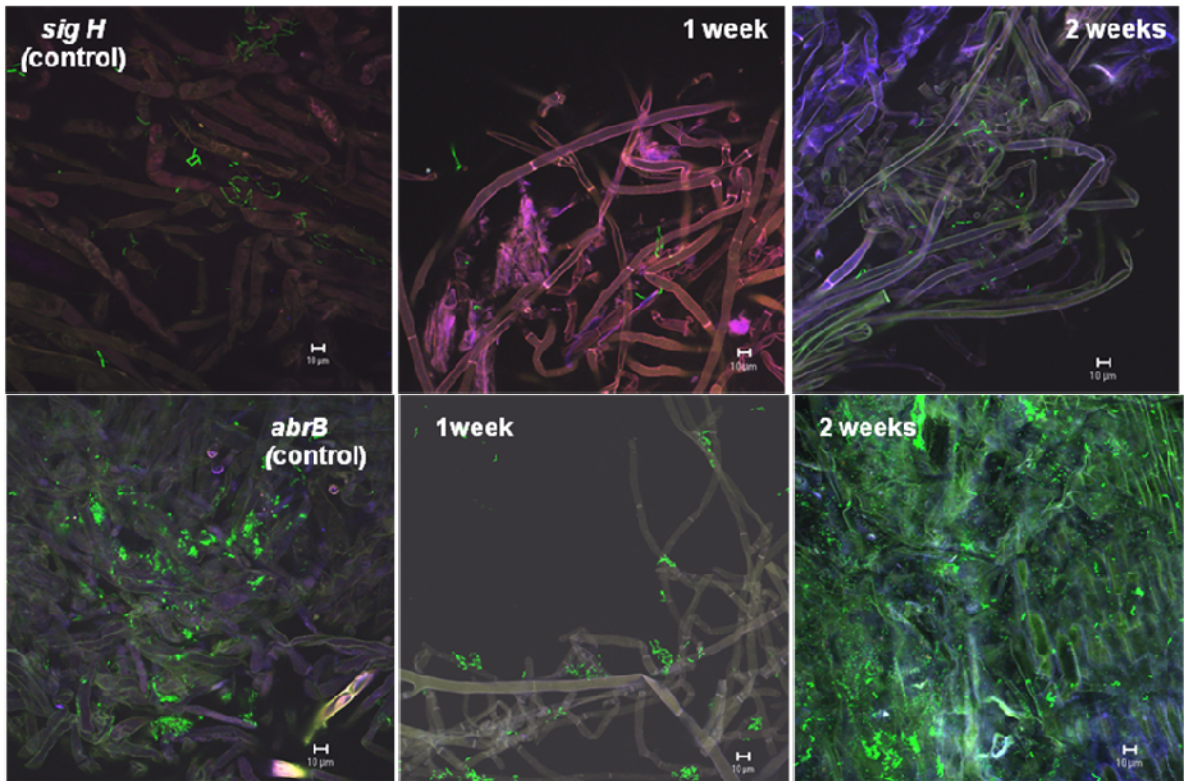
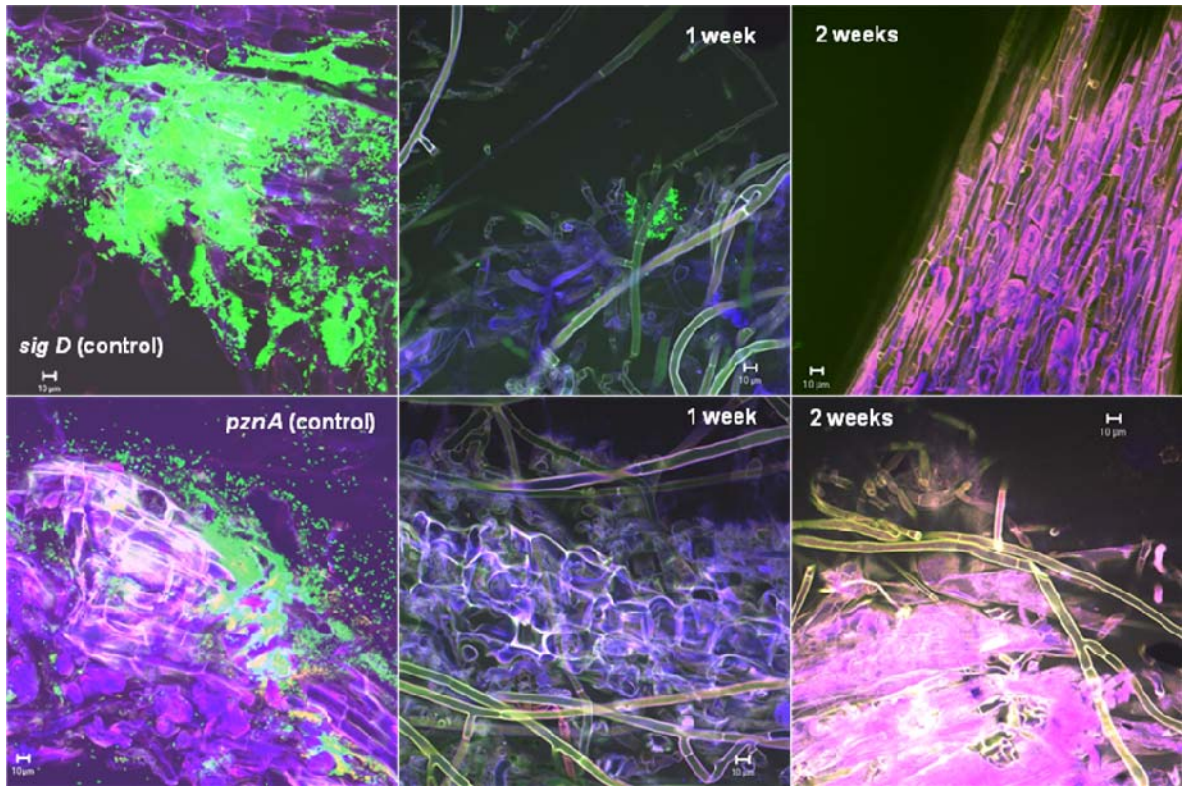
Abbildung 3: Konfokale Laser Scanning Mikroskopische Bilder, welche die Kolonisierung von Salatwurzeln mit der GFP-markierten Mutante CH5 (siehe Tabelle 1) in Abwesenheit (control) und Anwesenheit (1 week, 2 weeks) des Pilzpathogens *R. solani* zeigen.

Weitere Kolonisierungstests von GFP-markierten FZB42-Mutanten an Salatwurzeln in Ab- oder Anwesenheit von *R. solani* im chemisch definierten Modellsystem

Tabelle 1b: Liste von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Mutanten

Name	Genotype	Phenotype
FB01mut1	$\Delta amyE::em^r gfp^+$	GFP markierter Wildtyp
<i>sigD</i>	$\Delta sigD::Cm^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekte im Flagellen-, Beweglichkeits- und Autolysin- genen
<i>sigH</i>	$\Delta sigH::Cm^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in Bacillomycin D Biosynthese
<i>pnzA</i>	$\Delta pznA::Spc^R ; \Delta amyE::em^r gfp^+$	Defekt in der Production von Plantazolizin
<i>abrB</i>	$\Delta abrB::KmR ; \Delta amyE::emr gfp^+$	Reduzierte Pflanzen- wachstumsstimulierungs Aktivität

Abbildung 4: CLSM-Aufnahmen



Detailanalyse des Kolonisierungsverhaltens von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 und *Rhizoctonia solani* an den Wurzeln von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) im chemisch definierten Modellsystem

Die genetische Gruppe *R. solani* AG1-IB ist der Erreger der unteren Fäule auf Kopfsalat und tritt auf, wo immer Salat angebaut wird (Davis et al., 1997). Verschiedene *Rhizoctonia* AGs unterscheiden sich in der Entwicklungsphase von der Infektion und Kolonisierung und provozieren unterschiedlichen Host Reaktionen und Pektin abbau. Die genetische Gruppe *R. solani* AG1-IB ist eine der aggressivsten Gruppen und zeigt erhöhte Ansiedelung Blumenkohl Hypokotylen (Pannecoucq und Höfte, 2009). Eine starke Korrelation zwischen mikroskopischen Beobachtungen und den Schwere der Erreger verursachten Erkrankung wird gezeigt. Wegen der hoch Relevanz des Erregers *R. solani*, in der vorliegenden Studie hatten wir das Ziel die Anfangsphase der Pathogen Infektion auf Salat Wurzeln und die Auswirkungen der FZB42 Inokulierens zu analysieren.

Methoden:

Stämme

GFP-markierten *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (FB01mut1) (Δ amyE :: emr gfp +) wurde von ABiTEP, Berlin erhalten und wurde in LB-Brühe mit entsprechenden Antibiotika Erythromycin 1 ug / ml, Lincomycin 25 ug / ml, Kanamycin 50 pg / ml und Chloramphenicol 10 pg / ml bei 30 ° C gewachsen. *Rhizoctonia solani* (Isolat 7/3/14) wurden aus der Stammsammlung des Instituts für Gemüse-und Zierpflanzenbau, Großbeeren, Deutschland) erhalten und auf Kartoffel-Dextrose-Agar angezogen.

Rhizosphärenkolonisierungstest

Lactuca sativa cv. Tizian Samen wurden mit 1% Tween 80 für 2 min und 13% Natriumhypochlorid für 10 min sterilisiert und mit dem sterilem Wasser (3-mal) dazwischen gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden auf Nähr agar platten gelegt und im Dunkeln 2 Tage lang gekeimt zu bakterieller oder Pilzbefall zu überprüfen.

Vorgekeimte Salatsamen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer, mit 0,3% NaCl eingestellte Zellkonzentration auf 10⁷ CFU / ml, Zellsuspension von *B. amyloliquefaciens* FZB42 FB01mut1, eingeweicht. Inokuliert Sämlinge wurden in sterile Kunststoffschalen (Phytatray, Sigma) mit sterilisiertem Quarzsand und 20 ml Hoagland-Lösung (Sigma) angesetzt. Die Schalen wurden in Wachstumskammer (Vötsch BioLine VB 1514) bei 18 ° / 20 ° C mit 12-h Hell-Dunkel-Intervalle inkubiert und die Pflanzen für 7 Tage gewachsen.

Für Pilz-Inokulation, 1cm² Agar Stückchen aus 7 Tage alten *R. solani* gewachsenen PDA Platten wurden geschnitten. Die Agar-Stücke wurden auf den Quarzsand 1cm tief und 2cm voneinander entfernt zuvor mit Bakterien geimpft Keimling platziert. Pflanzen ohne bakterielle Inokulation mit *R. solani* wurden als Kontrolle verwendet.

Die Proben wurden nach 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach der Pilz Inokulation (hpi) aufgenommen. Wurzeln wurden aseptisch herausgeschnitten, mit sterilem Wasser zur Entfernung anhaftender Quarzsand gewaschen. Wurzeln wurden mit Anti-Bleichmittel (Citifluor) auf Glasplatten montiert und unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss Jena) mit Anregungswellenlänge 488 nm untersucht.

Ergebnisse

Wir haben früher gezeigt, dass die FZB42 ist eine gute Kolonisatoren von Salat Wurzeln und konnte in der axenischen System erfolgreich etablieren. In dieser zeitabhängigen Studie es konnte gezeigt werden dass FZB42 möglicherweise verzögert den ersten Anschlag des Erreger *R. solani* auf die inokulierten Pflanzen in Vergleich zu den nicht inokulierten Kontrolle (Abbildung 5). Die Beobachtungen bis 18 hpi zeigte, dass die Pflanzen zeigten keine Anwesenheit den Pilzhyphen (Abbildung 5 a-c). An der 24 hpi konnten wir feststellen, dass der Pilz in der Lage, sich in Form von Hyphen auf die Wurzeln der Kontrollpflanzen zu etablieren war. Doch die FZB42 inokulierten Pflanzen zeigten keine Anwesenheit von Pilzhyphen (Abbildung 1d). Die nächste Beobachtung nach 30 Stunden nach Pathogen Inokulation (Abbildung 6a) ergab, dass alle Pflanzen von Pilzpathogen überfallen sind und zeigten Pilzhyphen auf dem Hypokotyl Region. Die typische "Damping off" Symptome traten um 48 hpi in Kontrollpflanzen und um 72 hpi in FZB42 inokulierten Pflanzen. Wir konnten auch feststellen dass FZB42 wächst auf Pilzhyphen und seine Dichte allmählich mit der Zeit abnimmt (Abb. 6). Dies könnte aufgrund mangelnder Kohlenstoffquellen aus pflanzlichen oder Herstellung von antibakteriellen Metaboliten von *R. solani* sein. Die Pilzpathogen zeigten profuse Wachstum und penetrierte der Kontrolle Pflanzengewebe innerhalb von 24 Stunden, was seine aggressive Natur zeigt. Die mikroskopischen Beobachtungen zeigten auch, Zerfall pflanzlichen Zellwand durch die Produktion von pektinolytischen Enzymen von Pilz Erreger.

Um die Mechanismen dieser Verzögerung des Pilzbefalls auf den salat Wurzeln durch FZB42 Inokulation zu verstehen, weitere Studien auf die Gene Expression in den Bakterien und den Pflanzen müssen durchgeführt werden. Diese Studien gekoppelt mit Metabolom Analyse werden uns Informationen aus der tatsächlichen in-situ Rhizosphäre Situation zeigen.

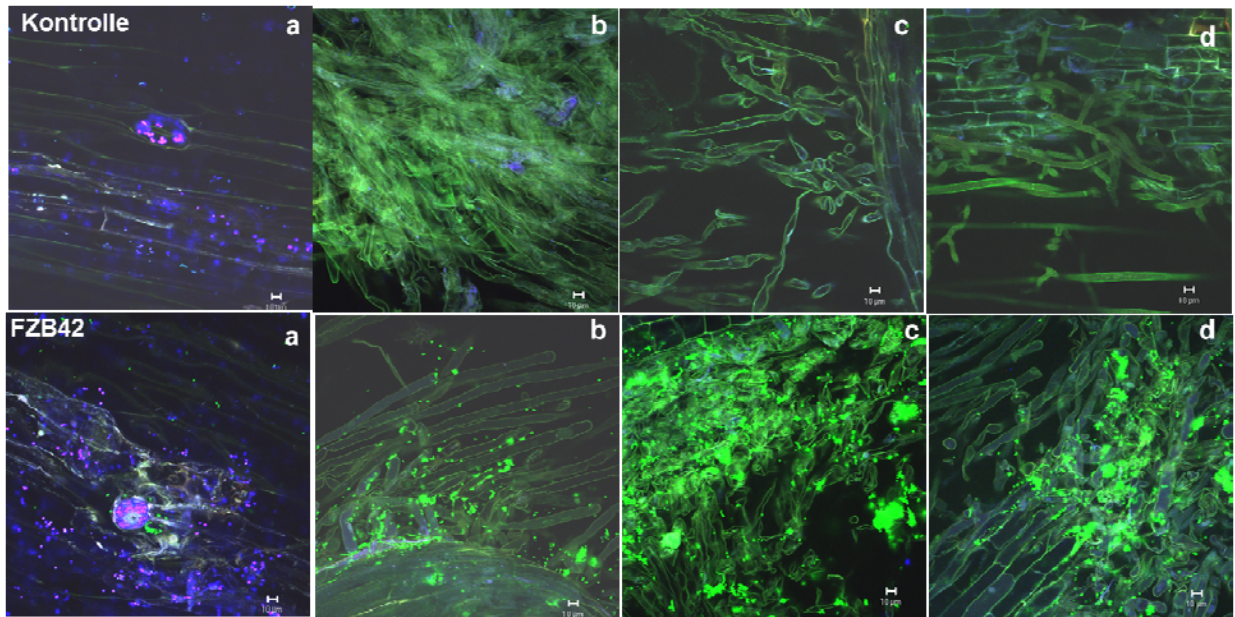


Abbildung 5: Konfokale Laser Scanning Mikroskop Bilder der Kolonisierung von Salat-Wurzeln im axenischen System. Obere Reihe: Kontrolle Pflanzen; untere Reihe: inokuliert mit FZB42. Die Bilder sind von 6 Stunden (a), 12 Stunden (b), 18 Stunden (c) und 24 Stunden (d) nach *R. solani* Inokulation entstanden.

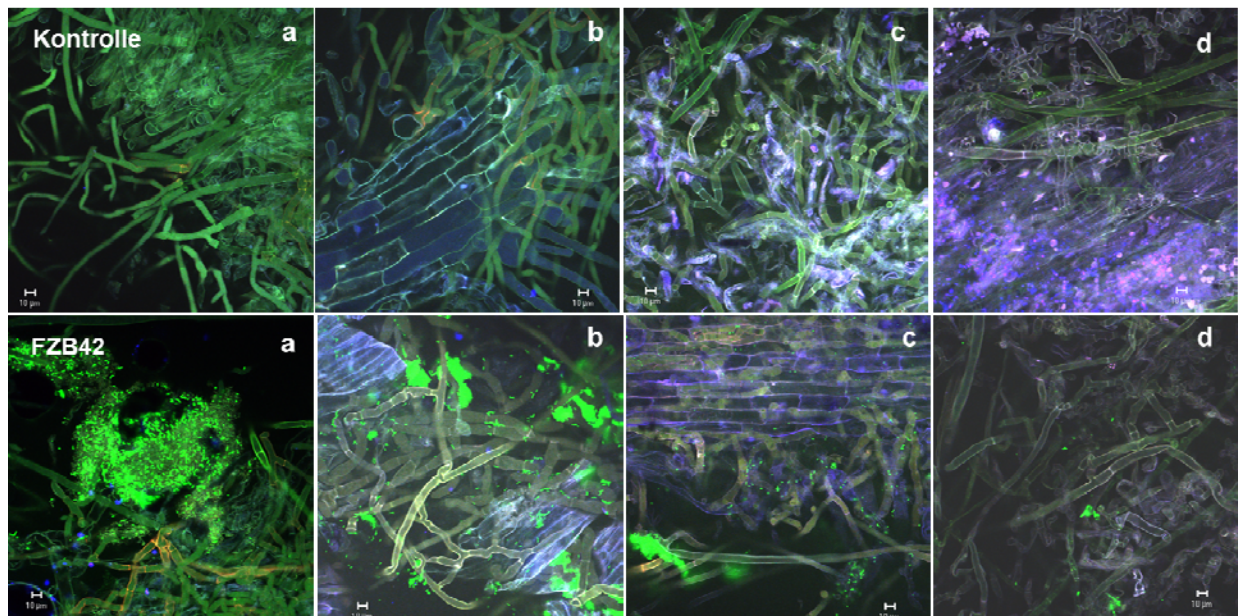


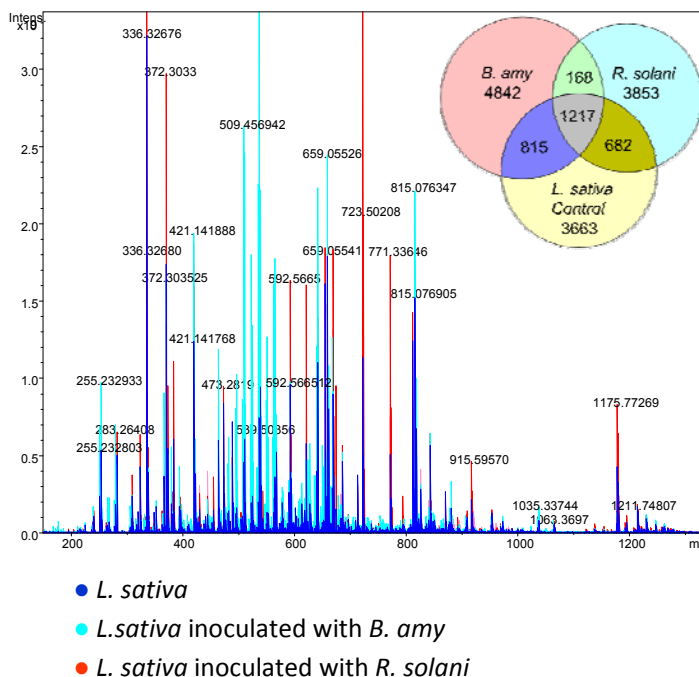
Abbildung 6: Konfokale Laser Scanning Mikroskop Bilder der Kolonisierung von Salat-Wurzeln im axenischen System. Obere Reihe: Kontrolle Pflanzen; untere Reihe: inokuliert mit FZB42. Die Bilder sind 30 Stunden (a), 36 Stunden (b), 48 Stunden (c) und 72 Stunden (d) nach *R. solani* Inokulation entstanden.

II.1.2. Zielstellung: Ungerichtete Metabolitenanalyse in der Rhizosphäre von Salat (*Lactuca sativa*) allein (Kontrolle), verglichen mit Inokulation mit *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 und mit *Rhizoctonia solani*.

Methoden:

Es wurde mit dem axenischen, chemisch definierten Modellsystem (mit Salat) gearbeitet (siehe oben). Die Metaboliten der verschiedenen Ansätze wurden mit NH₂-Festphase extrahiert und im FTICR-MS (Fourier Transform Ionen- Cyclotron Massenspektrometer) analysiert.

Um den Einfluss von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (wt) auf die Besiedlung der Rhizosphäre von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) mit dem Pflanzenpathogen *Rhizoctonia solani* zu beschreiben, wurde in Kooperation mit den Kollegen der Abteilung Mikroben-Pflanzen-Interaktionen ein chemisch definiertes keimfreies System entwickelt, in dem der Kopfsalat über insgesamt 2 Wochen kultiviert werden kann. Für eine Spezifizierung sekundärer Metabolite wurden die Anpflanzungen in vier Gruppen eingeteilt: *Lactuca sativa* (Kontrollgruppe), *Lactuca sativa* inokuliert mit FZB42 (wt), *Lactuca sativa* inokuliert mit *R. solani* und *Lactuca sativa* inokuliert mit FZB42 und *R. solani*. Es konnte mittels ICR-FT/MS Analysen eine erfolgreiche Inokulation mit *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 und Koinokulation mit *Rhizoctonia solani* verifiziert werden (Abbildungen 7 und 8).



Abbildungen 7 und 8:
Kalibriertes Spektrum aller kultivierter Gruppen; Proben NH₂ extrahiert; negativer Ionisationsmodus

- *L. sativa, co-inoculated*

Venn Diagramm mit den gemeinsamen identifizierten Massen von *B. amyloliquefaciens*, *R. solani* und *L. sativa* (Kontrollgruppe)

II.1.3. Zielstellung: Untersuchung des Einfluss von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 auf die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre von Salat (*Lactuca sativa*) im Feldversuch

In der vorliegenden Studie hatten wir das Ziel, die Auswirkungen der FZB42 auf Kopfsalat und deren indigener bakterieller Gemeinschaft während des Anbaus von Kopfsalat unter normaler landwirtschaftlicher Anbaupraxis für Salat zu untersuchen. Die bakterielle Gemeinschaftsstruktur wurde unter Verwendung der 16S-rRNA-Gen basierten Fingerprint-Methode T-RFLP untersucht. Die Kenntnis der Wechselwirkung von FZB42 mit der indigenen mikrobiellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre kann unser Verständnis der ökologischen Auswirkungen dieses Pflanzenstärkungsmittels in der Praxis auf bessere Datenbasis stellen. Obwohl T-RFLP-Analysen nur eine vereinfachte Darstellung der dominanten Mitglieder in bakteriellen Gemeinschaften im Vergleich zur Analyse von Hochdurchsatzsequenzierungstechnologien bietet, ist es eine kostengünstige, reproduzierbare und robuste Methode. Es wird häufig zur schnellen und effektiven Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften von Bodenproben verwendet.

Material und Methoden

Stämme

Die Auswirkungen des Biodüngerprodukts mit Sporen von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (RhizoVital® 42, ABiTEP GmbH, Berlin, Deutschland) auf das Pflanzenwachstum von Salat wurde in dieser Studie ausgewertet. *Rhizoctonia solani* AG1-IB (Isolat O1/1) wurde aus der Stammsammlung des Leibniz-Instituts für Gemüse- und Zierpflanzenbau (Großbeeren, Deutschland) erhalten.

DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation und T-RFLP-Analyse

Die DNA wurde aus dem gefrorenen Rhizosphären-Pellet extrahiert. Etwa 500 mg Wurzel-material wurden in 2 ml Schraubverschluss Fläschchen, die 1 g einer Mischung von Keramik und Siliciumdioxid-Teilchen enthielt, übertragen. Die DNA-Extraktionen erfolgte mit dem Fast-DNA SPIN® Kit for Soil (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Nach der Messung der DNA-Konzentration unter Verwendung eines Spektrophotometers NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA), wurden die DNA-Extrakte bei -20 ° C gelagert.

Für die T-RFLP-Analyse der bakteriellen Gemeinschaft wurde ein Abschnitt des 16S-rRNA-Gens unter Verwendung der Primer 27f-FAM (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Edwards et al., 1989) und 907r (CCGTCAATTCCT TTAGATTT) (Lane et al., 1985)

untersucht. Die Reaktionsgemische (50 µl) enthielten 10 ng der extrahierten DNA als Matrize und 1X AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ein Touch-Down Amplifikations Protokoll folgte, mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95 ° C für 5 min, dann folgten 10 Zyklen mit Denaturierung bei 95 ° C für 1 min, Annealing bei 65 ° C bis 55 ° C für 1 min, Elongation bei 72° C für 1 min, anschließend erfolgten 20 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Annealing bei 55 ° C für 1 min, Verlängerung bei 72 ° C für 1 min und einer abschließenden Verlängerung bei 72 ° C für 10 min. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentrationen der DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des Spektrophotometers NanoDrop.

Etwa 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt wurde über Nacht bei 37 ° C verdaut, mit 5 U MspI und 1X Puffer Tango™ (Fermentas GmbH). Nach dem Verdau wurden die Proben mithilfe SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-up-Säulen (Sigma, Deutschland) entsalzt. Aliquots von

3 µl wurden mit 10 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems) und 0,3 µl des internen Standard-DNA MapMarkers® ROX1000 (BioVentures) gemischt. Die elektrophoretische Auftrennung des entsalzten Verdaus wurde auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät (ABI 3730, Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Längen der terminalen Restriktionsfragmente (T-RF) wurden unter Verwendung der Software GeneMapper® v4.0 (Applied Biosystems) analysiert, nur Signale mit einer Peakhöhe von mehr als 100 Fluoreszenzeinheiten wurden weiter analysiert (Osborn et al., 2000).

T-RFLP Datenverarbeitung

Rohdaten aus GeneMapper™ wurden exportiert, um mit T-REX, Online-Software für die Verarbeitung und Analyse der T-RFLP-Daten (<http://trex.biohpc.org/~v>) (Culman et al., 2009) weiter analysiert zu werden. Die T-RFLP Daten wurden mehreren Verfahren zur Qualitätskontrolle unterzogen: Rauschfilterung (Peakfläche, Standardabweichung Multiplikator = 1), T-RF Ausrichtung (Clustering Schwelle = 1 bp). Es wurden nur T-RFs zwischen 50 und 500 bp analysiert. Zur Analyse der Datenmatrizen wurde das Haupteffekt- und multiplikative Interaktions (AMMI)-Modell zusätzlich verwendet, das auf der Analyse der Varianz basiert (ANOVA) (Culman et al. 2008). Die relative Häufigkeit eines detektierten T-RFs innerhalb eines bestimmten T-RFLP-Profiles wurde als Höhsignal der Peaks geteilt durch die gesamte Höhe aller Peaks des T-RFLP-Profiles berechnet. Die von T-REX konstruierten Datenmatrizen wurden dann in PAST (Hammer et al., 2001) importiert und die Daten unter Verwendung der nicht metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS) mit Bray-Curtis Distanzen ermittelt. Die AMMI-Ordinationsergebnisse wurden als Scatterplots mithilfe T-REX und Microsoft Excel grafisch dargestellt.

Statistische Analyse

Um die signifikanten Unterschiede zwischen den T-RFLP-Gruppen, die mit T-REX erhalten wurden zu testen, wurden die Datenmatrizen in PAST (Hammer et al., 2001) importiert. Einweg ANOSIM (Clarke, 1993) wurde durchgeführt, um R-Werte zu berechnen. Die R-Statistik untersucht, ob eine Trennung der Gemeinschaftsstruktur gefunden wird ($R = 1$) oder ob keine Trennung auftritt ($R = 0$). Werte über 0,75 gelten als gut getrennt, über 0,5 als getrennt, aber sich überlappend und R-Werte kleiner als 0,25 als kaum trennbar (Clarke und Gorley, 2001). Die p-Werte wurden mit der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche (Ramette, 2007) korrigiert um signifikante Unterschiede aufzuzeigen.

Ergebnisse

Es wurden zwei verschiedene Management-Praktiken in dieser Feldstudie untersucht. Dafür wurden mit FZB42 beimpfte Pflanzen gegenüber nicht inokulierten Kontrollen sowohl unter natürlichem Erregerdruck als auch mit zusätzlicher Pathogen-inokulation angesetzt. Die Proben wurden zwei und fünf Wochen nach der Pflanzung auf dem Feld gesammelt. Die mithilfe von T-RFLP erzeugten bakteriellen Gemeinschaftsmuster wurden, wie die Ordinationsergebnisse der AMMI Analyse (Abbildung 1) zeigten, in verschiedene „Umgebungen“ eingeteilt. Dies zeigt, dass die T-RFs sowohl unterschiedlich auf die Behandlungen und Management-Praktiken als auch auf die Zeitpunkte reagieren. Jede Gruppe in dem T-REX-Programm besteht aus 12 T-RFLP-Muster (4 Pflanzenproben mit jeweils 3 technischen Replikaten). Die Analyse der Datensätze ergab, dass die Anwesenheit des Pilzerregers als wichtigster Faktor ermittelt wurde, wie die erste Hauptkomponente (IPCA1) zeigt. Der Zeitpunkt der Probenahme war der zweitgrößte Faktor, der die bakterielle Gemeinschaftsstruktur beeinflusst und auf der zweiten Hauptkomponente (IPCA2) trennt. Bemerkenswerterweise war kein wesentlicher Effekt der Inokulation von *B. amyloliquifaciens* FZB42 auf die bakterielle Gemeinschaft der Pflanzen zu erkennen, da sich keine Variation des Musters zeigte.

Um zu untersuchen, ob nicht-parametrische Analysen ähnliche Ordinationsergebnisse zeigen, wurden nMDS-Analysen durchgeführt. Die erhaltene Anordnung der Proben war sehr ähnlich zu der obigen Eigenvektor-Methode. Die Ordination Darstellung zeigt deutliche Unterschiede in den bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen basierend auf den verschiedenen Behandlungen und Management-Praktiken und den Zeitpunkten. Allerdings gruppierten die Proben aus der FZB42 Anwendung eng mit den Proben der nicht inokulierten Kontrollen.

Die Daten wurden weiter analysiert, um zu testen, ob der Modus der Anwendung von FZB42 einen großen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft hat (Abbildung 2). Auch in diesem Fall wurde beobachtet, dass die Management-Praktiken der primäre

Einfluss auf die Gemeinschaftsstruktur war und die Probenahmezeit der sekundäre Faktor (wie die IPCs zeigen). Obwohl einige kleinere Unterschiede bei verschiedenen Behandlungen beobachtet wurden, hatten diese keinen Einfluss auf der T-RFs in dem beobachteten Gemeinschaftsmuster.

Die Analyse der Ursachen der Variation des Datensatzes zeigte, dass die bakteriellen Gemeinschaften eine relativ geringe Interaktion zeigte (Tabelle 1), die aus 14,15% Muster und 1,38% Rauschen bestand. Die Analyse der Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Gemeinschaften wurde unter Verwendung von ANOSIM durchgeführt und die resultierenden R-Werte sind in Tabelle 1 dargestellt. Aus den Werten geht hervor, dass die Gemeinschaften sich in Abhängigkeit der Zeit und der Anwendung von höherem Erregerdruck veränderten. Dies wurde bei den nicht inokulierten Kontrollen sowie allen unterschiedliche Behandlungen mit FZB42 gesehen. Allerdings waren die Werte von R nahe bei 0, wenn FZB42 inokulierte Proben mit Kontrollproben für die jeweiligen Ansätze (siehe Tabelle) verglichen wurden und somit kaum trennbar Unterschiede in der Gemeinschaftsstruktur belegt.

Diskussion

Biokontroll-Bakterien können entweder direkt oder indirekt die Pflanzen gegen Krankheitserreger schützen; jedoch ist ihre Wirksamkeit weitgehend durch ihre Wechselwirkungen mit der indigenen mikrobiellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre (Berendsen et al., 2012) beeinflusst. Daher war es von besonderem Interesse, die Änderung der bakteriellen Gemeinschaft in Reaktion auf die Anwendung des Biokontroll-Bakteriums *B. amyloliquefaciens* FZB42 zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Anwendung von FZB42, unabhängig von der Art der Anwendung, keinen großen Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft der Rhizosphäre hatte. Es zeigte sich jedoch eine Änderung der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizosphäre in Abhängigkeit von der Zeit (bei 2 Wochen und 5 Wochen nach der Pflanzung). Es wurde häufig festgestellt, dass die Inokulation mit einzelnen biologischen Pflanzenschutzmitteln keine ausgeprägten Veränderungen in den relativen Häufigkeiten der dominanten bakteriellen Populationen der Rhizosphäre darstellten (Adensina et al, 2009; Grosch et al, 2012). Eine frühere Studie mit dem *B. amyloliquefaciens* Stamm BNM122 zeigte, dass die bakterielle Gemeinschaft keine ausgeprägte Veränderungen nach der Inokulation von Sojabohnensamen mit diesem Biokontrollmittel aufwies (Correa et al., 2009). Eine Feldstudie mit Salat konnte ebenfalls demonstrieren, dass Biokontroll-Bakterien (*Serratia plymuthica*, *Pseudomonas trivialis*, *P. fluorescens*) nur eine geringe und vorübergehende Wirkung auf die indigene Rhizosphärengemeinschaft haben; dennoch zeigten sich ortsspezifische und saisonale Veränderungen (Scherwinski et al, 2008).

Die Ergebnisse verdeutlichen außerdem, dass die zusätzliche künstliche Inokulation mit *R. solani* AG1-IB einen Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft der Rhizosphäre

bewirkt. Die Änderung der bakteriellen Gemeinschaft war statistisch signifikant, wie ANOSIM Analysen ergaben. Dies bestätigen unsere Ergebnisse im Topfexperiment und stimmten mit früheren Beobachtungen von Wachstumskammerexperimenten mit Salat überein, die nachgewiesen haben, dass unter hohem Pathogendruck von *R. solani* Populationen von Bakterien und Pilzen in der Rhizosphäre beeinflusst werden (Adensina et al, 2009. Grosch et al., 2006, 2012). Die Wechselwirkung zwischen dem Erreger und der Pflanze kann zu Änderungen in Wurzelexsudationsmustern führen - mit Auswirkungen auf die indigene mikrobielle Gemeinschaft der Rhizosphäre. Veränderungen in den Wurzelexsudaten können ebenfalls einen Grund für die beobachtete Abnahme der vegetativen Zellen von FZB42-Rif in der Anwesenheit von *R. solani* sein. Änderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung der Rhizosphären nach einer Infektion kann das Ergebnis der induzierten Ausscheidung von antimikrobiellen Verbindungen durch infizierte Wurzeln oder durch die Rekrutierung von nützlichen Mikroben sein. Einige neuere Studien wiesen darauf hin, dass in der Tat Pflanzen nach mikrobieller Hilfe in der Not rufen (Berendsen et al, 2012). Ein zusätzlich verstärkter Erregerdruck ist ein unnatürlicher Zustand, aber er simuliert Situationen, in denen die Pflanzen durch bodenbürtige Krankheitserreger angegriffen werden und zeigt sehr wichtige Einblicke in die komplexen Wechselwirkungen im Mikrobiom der Rhizosphäre.

Tabelle 2. T-REX-Ergebnisse der Prozentvariationen in den Datensätzen

Quellen	FZB vs. Kontrolle	Unterschiedliche Applikationsarten
Haupteffekte:		
T-RFs	84.47	84.65
Umwelteinflüsse	0	0
Interaktionseffekte		
Muster (pattern)	14.15	13.71
Rauschen (noise)	1.38	1.64
Probenheterogenität	1.1	1.5

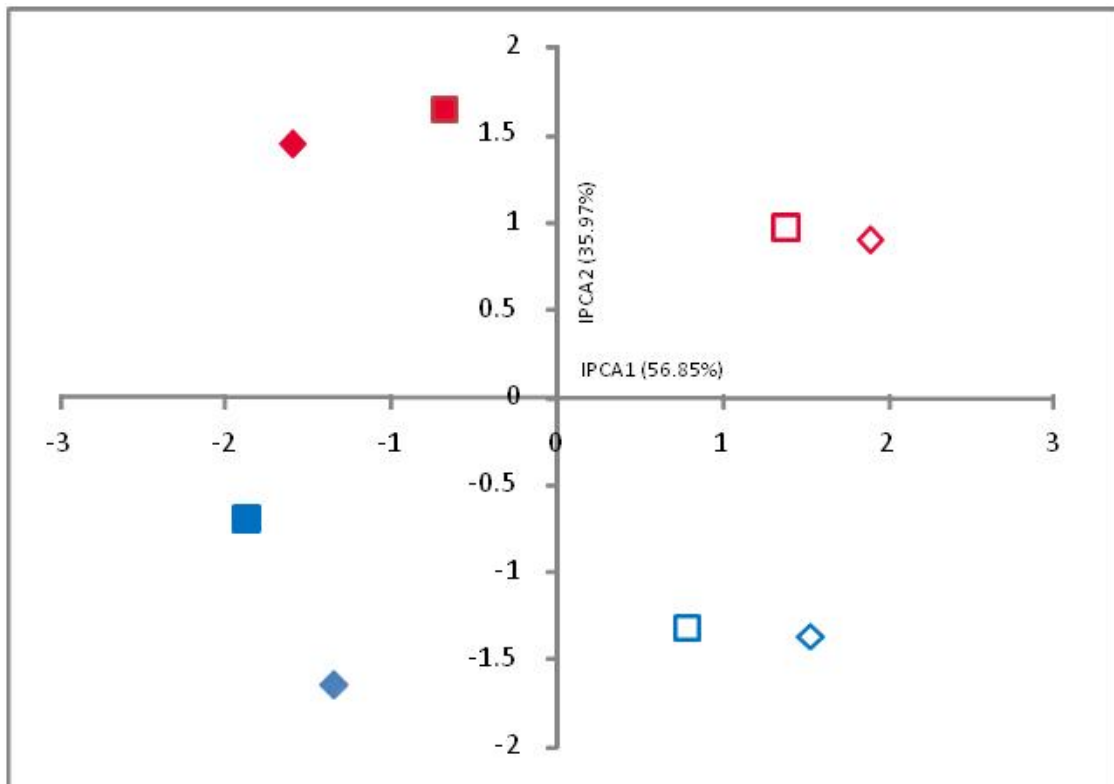


Abbildung 9: Ordinationsabbildung der T-RFLP-Daten der bakteriellen Gemeinschaft, die mit AMMI analysiert wurde.

Symbole:

■: Pflanzen, die mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 behandelt wurden

□: Nichtinokulierte Kontrollpflanzen

Offene Symbole: Pflanzen unter natürlichem Pathogendruck von *Rhizoctonia solani* AG1-IB im Feld,

Geschlossene Symbole: Pflanzen unter zusätzlichem Pathogendruck von *R. solani*

Rote Symbole: Probenahme nach 2 Wochen

Blaue Symbole: Probenahme nach 5 Wochen

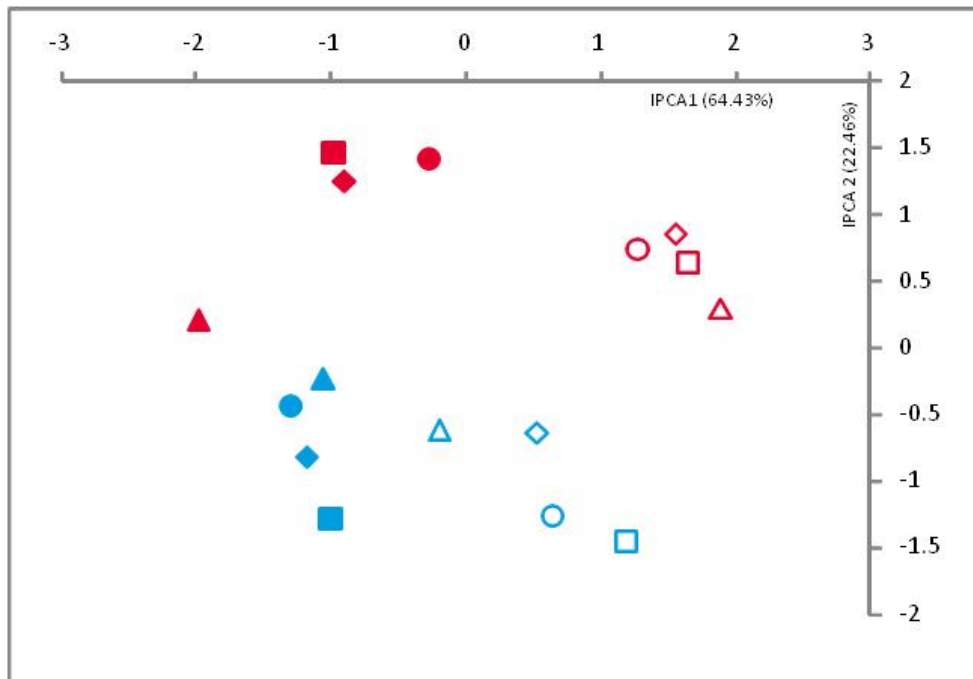


Abbildung 10: Ordinationsabbildung der T-RFLP Daten der bakteriellen Gemeinschaft, die mit Hilfe von AMMI analysiert wurde. Es wird der Einfluß von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 auf die bakterielle Gemeinschaft in Abhängigkeit des Applikationsweise gezeigt.

Symbole:

● nicht inokulierte Kontrollen

□ DYP – Doppelte Jungpflanzen-Behandlung mit FZB42 (eine Woche vor der Pflanzung und vier Tage nach der Pflanzung)

□ SYP – Einfache Jungpflanzen-Behandlung mit FZB42 (2 Tage nach der Pflanzung)

□ DYP2x – Doppelte Jungpflanzenbehandlung vor und nach der Pflanzung mit doppelter Konzentration von FZB42

Offene Symbole: Pflanzen mit natürlichem Pathogendruck of *Rhizoctonia solani* AG1-IB

Geschlossene Symbole: Pflanzen mit zusätzlichem Pathogendruck of *R. solani*.

Rot: Probenahme nach 2 Wochen

Blau: Probenahme nach 5 Wochen

II.1.4. Zielstellung: Gerichtete Metabolitenanalysen bei verschiedenen *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen mittels Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie und Flugzeitmassenspektrometrie (UPLC-qTOF-MS)

In Vorbereitung der Analyse der molekularen Interaktion von FZB42 Wildtyp und Mutanten mit *Rhizoctonia solani* in der Rhizosphäre von *Lactuca sativa* in einem chemisch definierten axenischen System wurden im ersten Halbjahr 2012 chemische Analysen von FZB42 und Mutanten durchgeführt. Diese dienen der Bestätigung bereits getätigter Genom- und Transkriptomanalysen durch das CeBiTec und der später benötigten Vergleichbarkeit metabolomischer Untersuchungen von co-kultivierten Kopfsalat (*Lactuca sativa*).

Die erzeugten Zellpellets und Überstände wurden durch die ABiTEP GmbH auf einem Minimalmedium kultiviert und nach 48 Stunden steril filtriert und eingefroren. Für die Untersuchungen am UPLC-qTOF-MS (Acquity, Waters Corporation; maXis, Bruker Daltonik) wurden die Pellets und Überstände in Methanol über 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und daraufhin in 2 ml Safe-lock Tubes (Eppendorf) aliquotiert.

Um funktionelle Peptide in diesen Proben nachweisen zu können, wurde eine schnelle und sensitive UPLC-MS Methode entwickelt. Als Grundlage dient eine 5-minütige chromatographische Trennung des Gemisches über eine BEH C18 Säule (1.0 x 50 mm, Partikelgröße: 1.7 µm, Waters Corporation). Die verwendete mobile Phase setzt sich prozentual (entsprechend dem gewählten Gradienten) aus A2: 60% Acetonitril + 10 mM Ammoniumformiat + 0.1% Ameisensäure und B2: 90% 2-Propanol + 10% Acetonitril + 10 mM Ammoniumformiat + 0.1% Ameisensäure zusammen. Eine erste Detektion erfolgt am Photodiodenarraydetektor des UPLC Systems bei einer Wellenlänge von 280 nm (Bereich: 200 – 400 nm). Die massenspektrometrische Erfassung der Analyten geschieht nach der Elektrosprayionisierung (Apolloni Quelle, Bruker Daltonik) im maXis qTOF-MS mit einer Auflösung von 43000 bei einem Massen-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 400 (Bereich: m/z 100 – 1500).

Wie erwartet, konnten die Ergebnisse der Genom- und Transkriptomanalysen der Mutanten durch die Untersuchungen des Metaboloms bestätigt und ergänzt werden. Es wurde sowohl eine chromatographische Trennung der funktionellen Peptide erreicht (Abbildung 11), als auch der massenspektrometrische Nachweis über deren Zusammensetzung erbracht (Abbildungen 12 und 13).

Zukünftig soll die erarbeitete UPLC-MS Methode neue *in situ*-Erkenntnisse über die Produktion von relevanten antibiotisch wirksamen sekundären Stoffwechselprodukten im chemisch und mikrobiologisch definierten Gesamtsystem Kopfsalat-FZB42-*Rhizoctonia solani* ermöglichen und detaillierte Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen bei der Hemmung von *R. solani* durch FZB42 in der Rhizosphäre von Salat gewähren.

Abbildung 11: Aufgegliedertes Chromatogramm und Heatmap

Beispielchromatogramm von Wildtyp FZB42, getrennt nach den UV-detektierten Substanzen; Heatmap zur Darstellung des Verhältnisses von Retentionszeit, Masse und Intensität

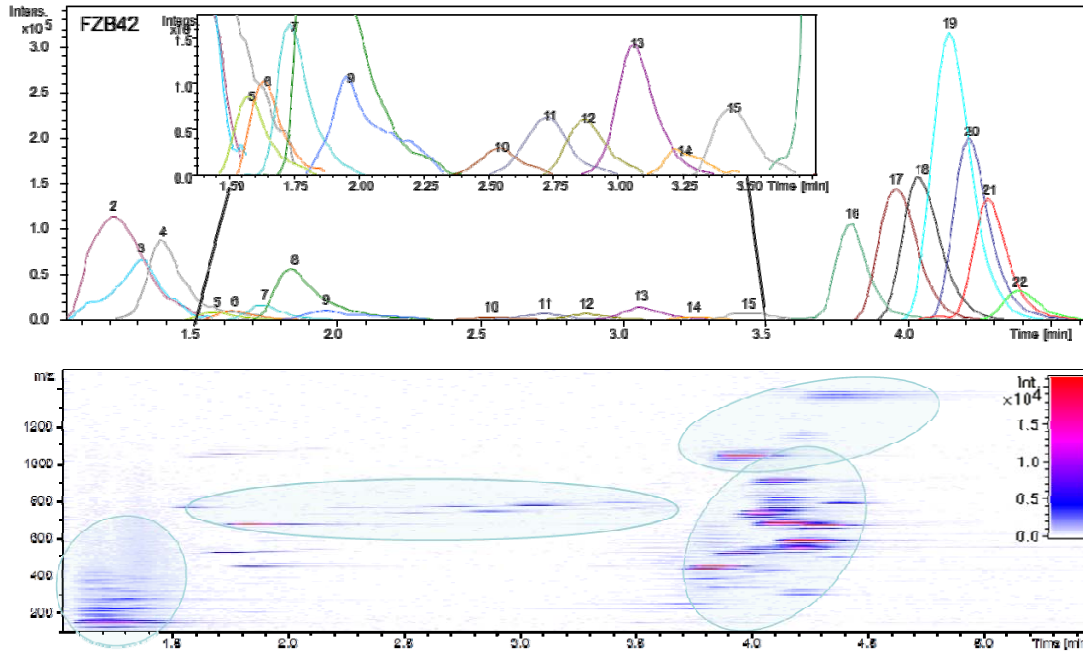


Abbildung 12: Massenspektrum von FZB42 über den gesamten untersuchten m/z Bereich

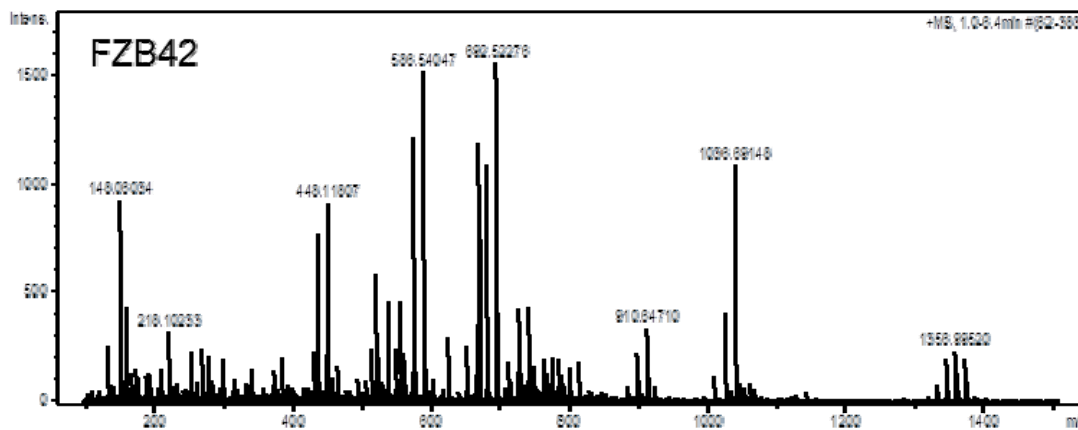
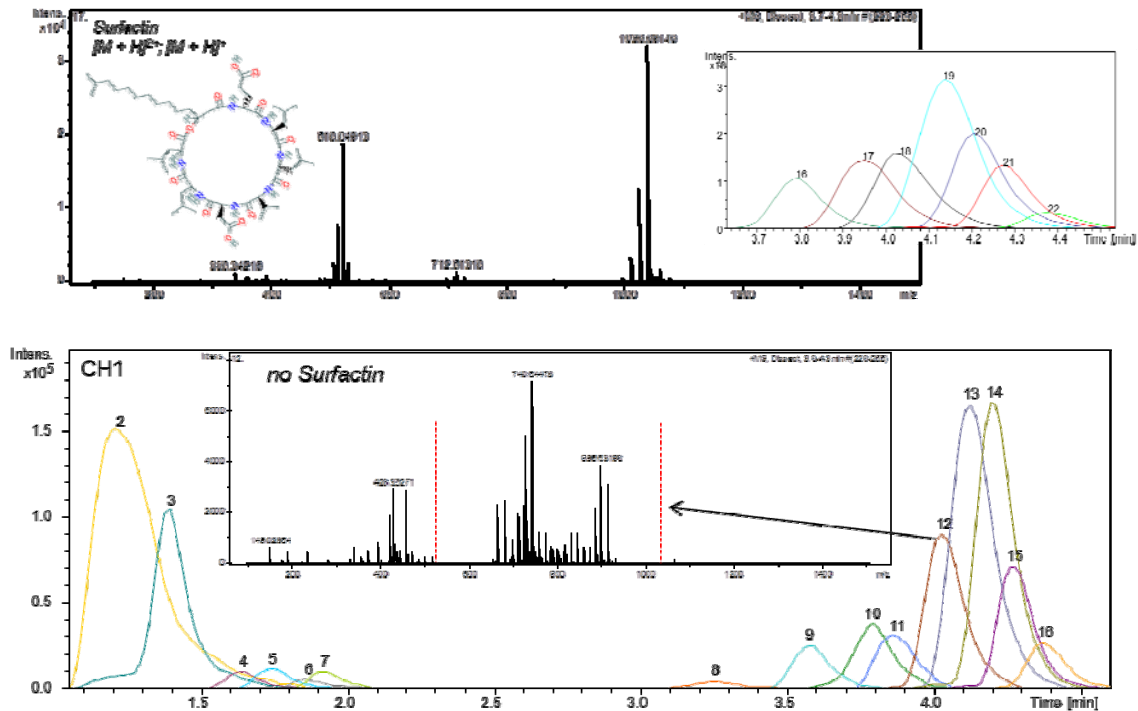


Abbildung 13: Vergleich zweier Analysen

Vergleich der Chromatogramme und Massenspektren von Wildtyp FZB42 und Mutante CH1; hier als Beispiel der Nachweis des Polypeptids Surfactin im Wildtyp und der Ausschluss der Surfactinproduktion in der genomisch veränderten Mutante CH1



Fortsetzung vergleichender Analysen des Metaboloms von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-Kulturen ohne und mit *Rhizoctonia solani*-Zusatz und Durchführung von Metabolomanalysen im axenischen Rhizosphärensystem von *Lactuca sativa* von FZB42 Wildtyp und CH20-Mutante

Aufgrund der Erfahrungen aus den voran gegangenen Experimenten wurde das zeitliche Design der Experimente angepasst und zudem wurden FZB42-Mutanten CH5, CH20, AK2, KD1 und PnZ-A verglichen, um Details der Einflüsse der jeweiligen Mutationen auf die Produktion der Sekundärmetabolite Bacillomycin D, Fengycin, Plantazolicin und Surfactin aufzuklären.

Untersuchung der Produktion ausgewählter Sekundärmetabolite von FZB42 und der Mutante CH20 in Laborkulturen mit und ohne *Rhizoctonia solani*:

Methodik: Die Herstellung der Bakterienkulturen erfolgte durch Dr. Soumitra Paul-Chowdhury nach dem zuvor erprobten Methodenstandard: Für die Kultivierung der infizierten Proben wurden 50 ml eines 50%igen PDB Mediums mit einer Sklerotie des

Bodenpilzes *R. solani* behandelt und über 20 Stunden bei 28/29 °C und 90 rpm kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von ca. 1×10^3 Zellen des Wildtyps FZB42. Für die Probenahmen im Abstand von jeweils 6 Stunden nach der Inokulation wurden je 3 x 10 ml der Zellkultur für 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert und deren Zellpellets von den Überständen getrennt. Sowohl Pellets, als auch Überstände (Aliquote von 2 ml) wurden im Anschluss daran in flüssigem Stickstoff gequenchet und bei -80 °C eingefroren. Insgesamt fanden 6 Probenahmen nach 6, 12, 18, 24, 30 und 36 Stunden statt.

Um eine Substanzmischung aus den Zellpellets zu extrahieren, wurden diese vor Beginn der Messungen in 2 ml destilliertem Wasser für 15 Minuten ins Ultraschallbad gegeben und anschließend bei 12.000 rpm zentrifugiert. Von dem erhaltenen Überstand wurden 200 µl für die Messungen abgefüllt. Das zum Teil gelöste Pellet wurde erneut bei -80 °C eingefroren. Diese Proben wurden als technische Duplikate mittels UPLC-qToF-MS analysiert.

Ergebnis: Bei der Auswertung der Analysenergebnisse wurde besonderes Augenmerk auf die An- bzw. Abwesenheit der Sekundärmetabolite Bacillomycin D, Fengycin, Plantazolicin und Surfactin gelegt. In Abbildung 1 ist das Auftreten der Lipopeptide Surfactin, Fengycin und Bacillomycin D in 4 der 6 kultivierten Mutanten dargestellt. Im Spektrum der Mutante CH5 konnten erwartungsgemäß keine Analyten aus den Substanzklassen der Lipopeptide oder Polyketide nachgewiesen werden, da die Mutationen in deren Biosynthese vorhanden sind. Plantazolicin konnte in keiner Messung in verifizierbaren Mengen nachgewiesen werden. Die Mutante CH20 (bmyA⁻) zeigt erwartungsgemäß nur einen Ausfall der Bacillomycin D-Produktion.

Untersuchung des Metaboloms und der Produktion ausgewählter Sekundärmetabolite von FZB42 und der Mutante CH20 im definierten axenischen *Lactuca sativa*-System mit und ohne *Rhizoctonia solani*:

Zusätzlich zu den Reinkulturanalysen wurden 2013 weitere Experimente im entwickelten axenischen System (bestehend aus *Lactuca sativa*, *Bacillus amyloliquefaciens* und *Rhizoctonia solani*) durchgeführt. Hierfür wurde der zeitliche Verlauf entsprechend den Zellkulturanalysen verkürzt und die Anzahl der Proben, die sowohl auf den Wildtyp FZB42 als auch auf die Mutante CH20 (bmyA⁻) entfallen, auf 24 begrenzt.

Methodik: *Lactuca sativa* Keimlinge wurden in einem Minimalmedium kultiviert und nach 4 – 5 Tagen sterilisiert und in das axenische Quarzsandsystem überführt. Nach 2 weiteren Tagen Wachstum mit Hoagland Lösung auf Quarzsand wurden die jungen Pflanzen erstmals mit *Bacillus amyloliquefaciens* über 1 Stunde angeimpft. Um eine entsprechend Vermehrung und Ansiedlung des Bacillus zu gewährleisten wurden die Pflanzen nach 24 Stunden erneut mit FZB42 bzw. CH20 geimpft und

jeweils die Hälfte der Pflanzen mit *R. solani* inokuliert. Die Probenahmen fanden jeweils 6, 12, 18 und 24 Stunden nach der letzten Impfung bzw. Inokulation statt.

Zur Präparation der Proben für die Metabolom-/Metabolitenanalysen wurden die Wurzeln der Pflanzen in 2 ml Methanol überführt und für 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die methanolische Lösung wurde geteilt und die Aliquote abgedampft. Für die UPLC Messungen wurde jeweils ein Aliquot in 1 ml Wasser aufgenommen. Für die FTMS Analysen mussten die jeweiligen Aliquote in saurem Wasser gelöst und einer Festphasenextraktion unterzogen werden. Die sich hieraus ergebenden methanolischen Lösungen wurden vor den Messungen 1:20 verdünnt.

Ergebnis: Die Analysen wurden erneut hinsichtlich ihrer Unterscheidung zwischen Abwesenheit (not infected) und Anwesenheit (infected) von *Rhizoctonia solani* ausgewertet. In den Abbildungen 15 und 16 sind Gleichungsmodelle (Partial least squares) dargestellt, in denen sowohl die Unterschiede zwischen den eingesetzten Typen des *Bacillus amyloliquefaciens*, als auch eine deutliche Veränderung im Metabolitenprofil im Verlauf der Experimente zu erkennen ist. Die Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der *in situ*-Produktion von ausgewählten Sekundärmetaboliten ist in den Abbildungen 17 und 18 beispielhaft an drei eindeutig identifizierbaren Metaboliten Surfactin, Fengycin und Bacillomycin für den Wildtyp FZB42 und die Mutante CH20 (mutiert in *bmyA*, dem Strukturgen für die Synthese von Bacillomycin D) gezeigt. Dabei wird deutlich, daß der WT FZB42 alle drei Metabolite in der Rhizosphäre von *Lactuca sativa* im Quarzsand-Modellsystem produziert, wohingegen die Mutante CH20 kein Bacillomycin D in Reinkultur (Abb. 14) und im Pflanzenmodellsystem (Abb. 15 und 16) produziert. Die CH20-Mutante war auch nicht in der Lage, *Rhizoctonia solani* im Quarzsand-Modellsystem mit *Lactuca sativa* zu hemmen (CLSM-Daten von S. Paul-Chowdhury).

Abbildung 14: Produktion von Surfactin, Fengycin und Bacillomycin D in *B. amyloliquefaciens* FZB42 Wildtyp- und Mutantenstämmen in Reinkultur

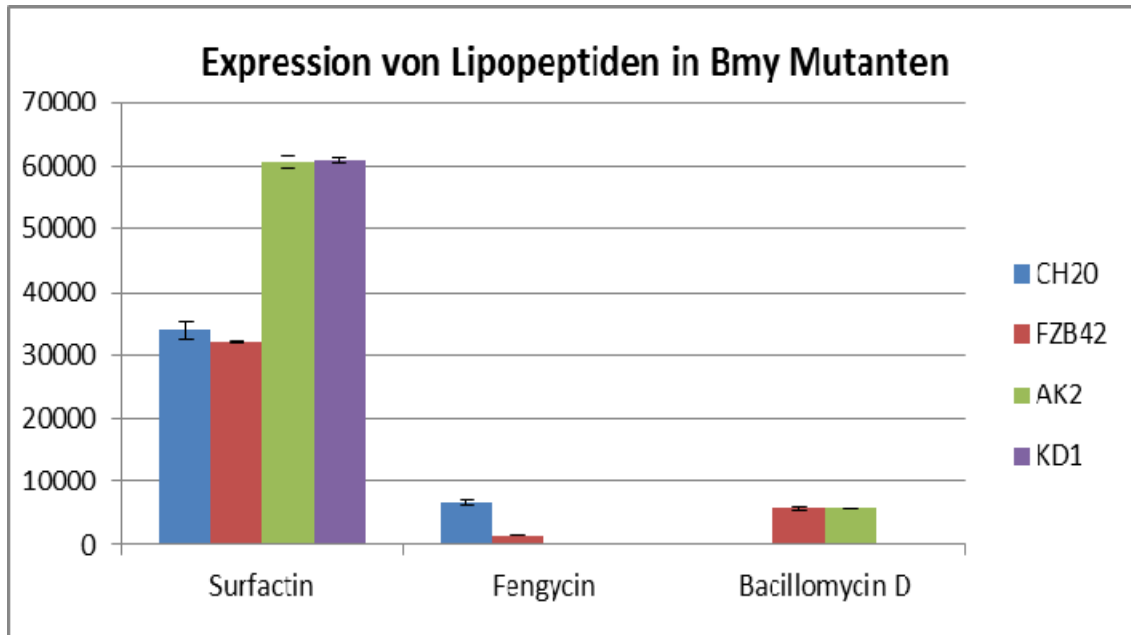


Abbildung 15: Partial least squares (PLS) Analyse des Metaboloms von *Bacillus amyloliquefaciens* Stämmen FZB42 und CH20

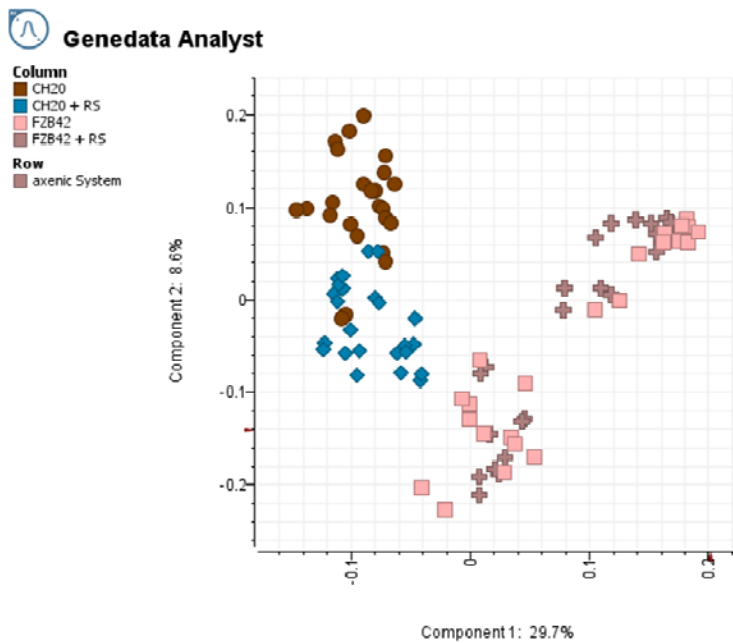


Abbildung 16: PLS Analyse von Probenahmezeitpunkten hpi 6, 12, 18 und 24 des Metaboloms von FZB42 mit und ohne *Rhizoctonia solani*

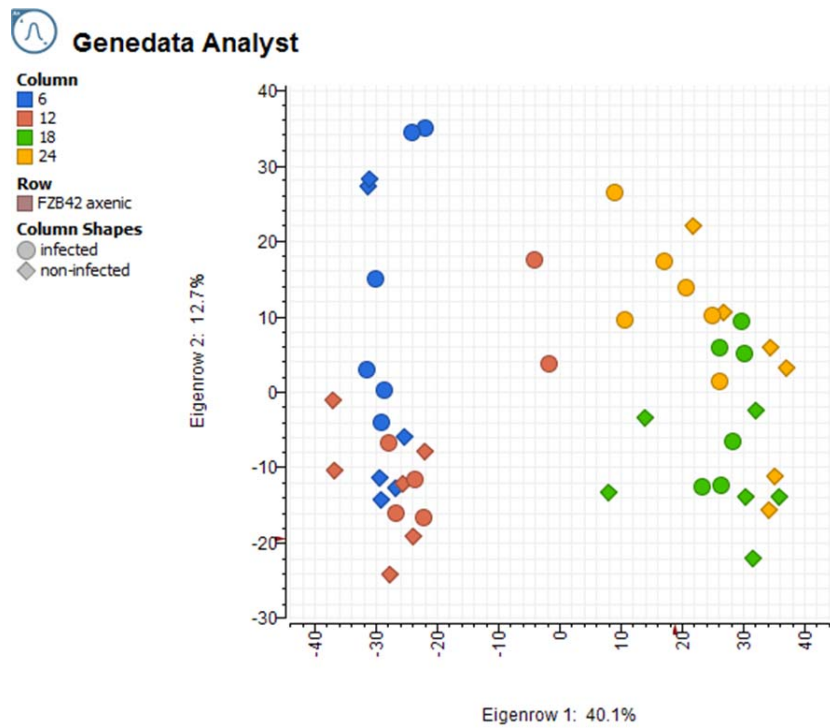
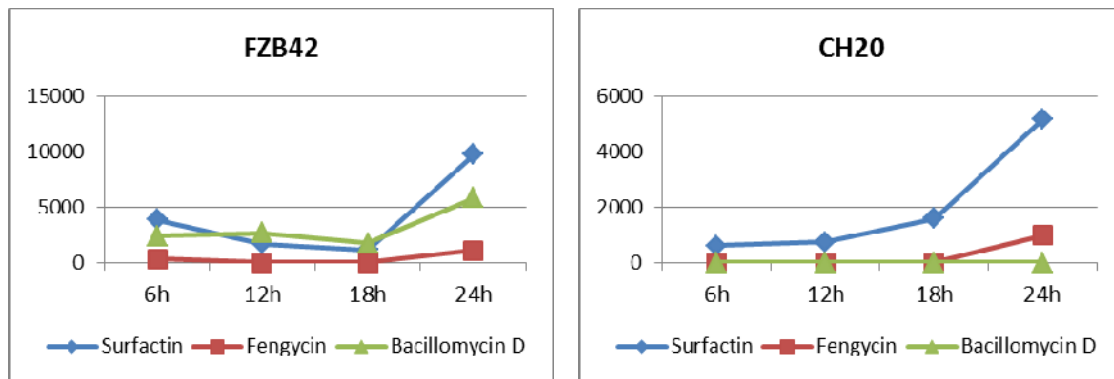


Abbildung 17 und 18: Zeitlicher Verlauf der in situ Metabolitenproduktion des Wildtyp FZB42 und der Mutante CH20 an der Wurzel von *Lactuca sativa* im axenischen Quarzsand-Modellsystem



II.1.5. Zielstellung: Untersuchung der Wirkung von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 auf die Induktion systemischer Resistenz (ISR) gegen *Rhizoctonia solani* Infektionen in Kopfsalat (*Lactuca sativa*) in einem chemisch definierten Modellsystem

Das Pflanzen-assoziierte Gram-positive Bakterium *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 wurde bereits vielfach untersucht und ist im Handel als Biostimulierendes Inokulat erhältlich (RhizoVital® 42, ABiTEP GmbH, Berlin, Deutschland). Der Stamm weist eine hohe genetische Fähigkeit für die Synthese von Sekundärmetaboliten, wie zyklische Lipopeptide, Bacillomycin D, Surfactin, Fengycin und Polyketiden mit starken antimykotischen und antibakteriellen Aktivitäten auf. In einer aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass die Salatfäule in einem Feld mit dem Phytopathogen *R. solani* durch FZB42-Applikationen deutlich reduziert werden konnte (Chowdhury et al., 2013). Um die von FZB42 gezeigten biologischen Kontrolleffekte zu verstehen, stellten wir die Hypothese auf, dass neben der Produktion von mehreren bioaktiven Sekundärmetaboliten, die positive Wirkung von FZB42 auf den Pathogenschutz von Salatpflanzen auch durch eine induzierte systemische Resistenz (ISR) verursacht sein könnte. Dabei werden in den Pflanzen die Abwehrkräfte verstärkt auf eine spätere Attacke von Bakterien- oder Pilzinfektionen vorbereitet. Wir haben ein chemisch definiertes axenisches System angewandt, um die durch FZB42 stimulierten Signalwege und Abwehrmechanismen von Kopfsalat in Reaktion auf *R. solani* detailliert analysieren zu können. Quantitative Real time Polymerase-Kettenreaktions-Tests (qRT-PCR) für mehrere Gene, die möglicherweise in SA-abhängigen oder in JA / Ethylen-abhängigen Signalwegen der induzierten systemischen Resistenz (ISR) in Salat beteiligt sein könnten, wurde entwickelt. Mutanten von FZB42 für verschiedene Gene, die an der Synthese von nicht-ribosomalen Lipopeptiden und Polyketiden sowie an der Acetoin-Produktion beteiligt sind, wurden verwendet, um mögliche molekulare Marker und Determinanten für die Induktion einer ISR in Salatpflanzen zu identifizieren.

Methoden:

Verwendete Bakterienstämme und –mutanten und Wachstumsbedingungen

GFP-markierten *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (FB01mut1) (Δ amyE :: emr gfp +) mutanten CH5 (Δ yczE, Δ spf:: Cm^R ; Δ amyE: :em^r gfp⁺ ; ohne Lipopeptide und Polyketide), *fenA* (Δ fenA::Cm^R; amyE::gfp/Er^R ; ohne Fengycin) , *srf* (Δ srf::Cm^R; amyE::gfp/Er^R ; ohne Surfactin), *alsS* (Δ alsS::Spec^R; amyE::gfp/Er^R ; ohne Acetoin) wurde von ABiTEP, Berlin erhalten und wurde in LB-Brühe mit entsprechenden Antibiotika Erythromycin 1 ug / ml, Lincomycin 25 ug / ml, Kanamycin 50 pg / ml und Chloramphenicol 10 pg / ml bei 30 ° C kultiviert. *Rhizoctonia solani* (Isolat 7/3/14) wurde aus der Stammsammlung des Instituts für

Gemüse- und Zierpflanzenbau, Großbeeren, Deutschland) erhalten und auf Kartoffel-Dextrose-Agar angezogen.

Rhizosphärenkolonisierungs-Assay

Lactuca sativa cv. Tizian Samen wurden mit 1% Tween 80 für 2min und mit 13% Natriumhypochlorit für 10 min oberflächensterilisiert und dazwischen jeweils mit sterilem Wasser (3-mal) gewaschen. Die sterilisierten Samen wurden auf Nähragarplatten gelegt und im Dunkeln 2 Tage lang gekeimt, um auf bakteriellen und pilzlichen Befall zu prüfen.

Vorgekeimte Salatsamen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer mit 0,3% NaCl-Lösung auf 10^7 CFU / ml eingestellten Zellsuspension von *B. amyloliquefaciens* FZB42 / FB01mut1 inkubiert. Inokulierte Sämlinge wurden in sterile Kunststoffschalen (Phytatray, Sigma) mit sterilisiertem Quarzsand und 20 ml Hoagland-Lösung (Sigma) angesetzt. Die bepflanzten Schalen wurden in einer Wachstumskammer (Vötsch BioLine VB 1514) bei 18° / 20°C mit 12-h Hell-Dunkel-Intervall für 7 Tage inkubiert.

Für die Pilz-Inokulation wurden 1cm² Agarstückchen aus 7 Tage alten *R. solani* gewachsenen PDA-Platten steril ausgeschnitten und die Agarstückchen auf den Quarzsand 1cm tief und 2cm voneinander entfernt neben dem zuvor mit Bakterien geimpften Keimling plaziert (FZB42+RS). Um Effekte von nur mit Bakterien- oder nur mit Pathogen-beeinflußten Pflanzen untersuchen zu können, wurden Pflanzen mit bakterieller Inokulation ohne *R. solani* (FZB42) oder ohne Bakterien aber mit *R. solani* (RS) Beimpfung untersucht. Pflanzen ohne Inokulation mit Bakterien und *R. solani* wurden als Kontrolle verwendet (C).

Die Proben wurden 24 Stunden nach der Pilz-Inokulation genommen. Wurzeln wurden aseptisch herausgeschnitten und mit sterilem Wasser zur Entfernung von anhaftenden Quarzsandpartikeln gewaschen.

Auswahl der Zielgene und Primer –Design

Zielgene von Kopfsalat, die Ähnlichkeiten mit einer bekannten oder abgeleiteten Funktion in den SA- und JA/ET-Wegen haben, wurden auf Basis zuvor veröffentlichter „expressed sequence tags“ (EST) aus der NCBI EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) Datenbank ausgewählt: Pathogenese-assoziiertes Protein 1 (**PR1; SA-Signalweg**), Defensin (**PDF1.2; JA/ET-Signalweg**), Lipoxygenase (LOX; **JA/ET Signalweg**), WRKY-Transkriptionsfaktor (WRKY), myc-Transkriptionsfaktor (myc 2), myb Transkriptionsfaktor (myb1), und Ethylen-Response-Faktor (ERF) wurden in dieser Studie verwendet und mit qRT-PCR getestet. Die vollständigen Sequenzen der entsprechenden Gene wurden aus dem *Lactuca sativa* Genom Shotgun-Sequenzierung Projekt am NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/ PRJNA68025) ausgewählt. BlastX

Durchsuchungen gegen die NCBI-Datenbank wurden durchgeführt, um konservierte Bereiche in den ausgewählten Gene zu identifizieren. Die Kandidaten-Referenzgene Ubiquitin (Ubi), Protein-Phosphatase 2A (PP2A), Glyceraldehyd-3- Dehydro-genase (GADPH) und Aktin (ACT) wurden zur Normalisierung der Genexpression in Kopfsalat ausgewählt. Die Expression dieser Gene wurde mit der Normfinder Software analysiert. GADPH wurde als stabilstes Gen identifiziert und als endogene Kontrolle bei der RT-qPCR-Analyse verwendet. Die für die RT-qPCR-Analyse verwendeten Primer-Paare wurden nach den auf dem Primer3Plus Programm festgelegten Parametern bestimmt. Die Gen-Primerspezifität wurde durch PCR auf cDNA geprüft; die Sequenz der Amplifikate wurden sequenziert und auf Authentizität überprüft. Die Amplikonsequenzen wurden im *Lactuca sativa* Genom Shotgun-Sequenzierung Projekt mit BLAST™ bei NCBI gesucht.

Real-time qPCR

qPCR wurde, wie zuvor beschrieben, mit einigen Modifikationen durchgeführt. Fünf Pflänzchen wurden vereinigt und die Gesamt-RNA wurde mit Trizol (Invitrogen) aus gefrorenem Material nach Herstellerangaben extrahiert. 1µg RNA wurde für die cDNA- Synthese unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transkription -Kit mit RNase Inhibitor (Applied Biosystems) verwendet . Expression ausgewählter Gene wurden durch Echtzeit-qPCR mit Power SYBR Green Supermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Verwendung einer iCycler Thermocycler (Applied Biosystems) bestimmt. cDNA- Verdünnungen (1 µg; 1, 1:4) wurden als PCR-Matrizen verwendet. Jede PCR-Reaktion enthielt 12,5µl 2 x Netz SYBR Green Supermix, 0,4µM Primers (MVG Eurofins Operon, Ebersberg ,Deutschland); 1µl der Vorlage wurde in ein 25µl-Reaktionsgefäß gegeben. PCR-Reaktionen wurden auf 95°C für 3 min für 40 Zyklen mit den Schritten von 95° C für 30s, 60°C für 30s und 60°C für 30s erhitzt. Die Erzeugung von spezifischen PCR- Produkten wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese bestätigt. Das $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Verfahren wurde zur relativen Quantifizierung eingesetzt. Die Menge der betroffenen Transkripte wurde auf die Menge eines endogenen Kontrollgens (z.B. Ubiquitin) für jede Bedingung normalisiert. Die Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt (jeweils mit zwei technischen Replikaten). Die Ergebnisse wurden im Durchschnitt dreifach bestimmt und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Um die durch FZB42 hervorgerufenen Signalwege zu bestimmen, wurde die Expression von Pathogenese Protein-1 (PR1, SA Marker-Gen), Defensin (PDF1.2, JA/ET Marker-Gen), und von Lipoxygenase (LOX, JA/ET Marker-Gen) mit Hilfe von quantitativer RT-PCR analysiert. Pflanzen mit FZB42-Inokulation, mit

R. solani Infektion oder mit FZB42-Vorinokulation und *R. solani* Infektion waren die 3 Behandlungsansätze (plus unbehandelte Kontrolle) für die Expressionsanalysen. Transkriptionsfaktoren wie WRKY, myc2, myb1 und Ethylen - Response-Faktor (ERF), die im Rahmen von Pflanzenschutzmechanismen exprimiert werden, wurden ebenfalls untersucht.

In Abwesenheit von *R. solani* stimulierte FZB42 (*mut01*) die Expression von PR1 (Abb. 19a) und PDF1.2 (Abb. 19b), und hemmt die Expression von Lipoxygenase (Abb. 19c). Die Expression der Transkriptionsfaktoren DEF, WRKY, myb, ERF und myc2 waren durch FZB42-Inokulation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpflanzen ebenfalls erhöht (Abbildung 20). **FZB42 scheint also sowohl den SA-Weg, als auch den JA/ET-Weg in Salat zu stimulieren.** In Anwesenheit von *R. solani* zeigten FZB42 (*mut01*) inokulierte Pflanzen eine deutlich höhere PDF1.2- und LOX-Expression als im Vergleich zu der nicht mit Pathogen infizierten Kontrolle (Abbildung 19b, c); die Expression von PR1 war dabei nicht erhöht. Als Reaktion auf *R. solani* alleine zeigten die Pflanzen eine erhöhte Expression von PDF1.2, LOX und Transkriptionsfaktor DEF, LIPO und myc2; die PR1-Expression sowie die Expression des Transkriptionsfaktors WRKY wurden durch den Pilz unterdrückt. Dies zeigt, dass bei der **Reaktion der Pflanze auf den Pilzpathogen eine Aktivierung des JA/ET-Wegs erfolgt - der SA-Signalweg wird jedoch unterdrückt; FZB42 dagegen aktiviert die PR1-Expression und damit den SA-Weg.** Die mit FZB42 vorgeimpften Pflanzen zeigten eine andere Reaktion auf *R. solani*; es gab sich eine signifikant höhere Expression (> 12 -fach) von PDF1.2 (JA/ET-Signalweg) im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 1b); **eine höhere Expression von PDF 1.2 -und des Transkriptionsfaktors ERF zeigen eine stimulierte Expression des JA / ET – Wegs durch FZB42.** Eine Induktion von ISR in den FZB42-vorgeimpften Pflanzen könnte sowohl durch eine Stimulierung des SA- als auch des JA/ET-Signalwegs die Abwehr von *R. solani* verbessern.

Um die Rolle der Lipopeptide, Polyketide und des Acetoin als molekulare Marker bei der Induktion der systemischen Resistenz in Salat zu untersuchen, wurde die Expression von PR1, PDF1.2 und Lipoxygenase (LOX) in Salatpflanzen getestet, die mit verschiedenen Mutanten von FZB42 in Gegenwart und Abwesenheit von *R. solani* inokuliert waren (Abb. 19a, b, c). Salatpflanzen, welche mit den Mutanten *fenA* und *srf* inokuliert waren, zeigten eine signifikant höhere **Expression von PR1** als Antwort auf den Pilzerreger, aber eine signifikant niedrigere Expression von PR1 in Anwesenheit des Pathogens. Die mit den Mutanten CH5 (*yczE_spf*) oder *alsS* beimppften Pflanzen zeigten eine ähnliche Zunahme der PR1-Expression wie nach der Inokulation mit FZB-Wildtyp in Abwesenheit des Pathogens (Abb. 19a). In Anwesenheit von *R. solani* war jedoch die Expression von RP1 bei der Stimulation mit der CH5-Mutante bedeutend niedriger (Abb. 19a). In Anbetracht der Ergebnisse der Expression von PR1 für die Mutanten in *fenA* und *srf* kann geschlossen werden, dass die Stimulierung

des SA-Wegs bei der Herausforderung durch den Pathogen noch möglich ist; damit wäre die Funktion der Stimulierung des SA-Signalwegs nicht von *fenA*- und *srf*-kodierten Metabolitensynthese abhängig (Abb. 19a). qRT-PCR-Ergebnisse zeigten, dass die **Expression von PDF1.2** in Salatpflanzen, die mit den Mutanten CH5, *fenA*, *srf*, *alsS* in Abwesenheit dem Pilzerreger beimpft waren, mit der Expression in Salatpflanzen vergleichbar ist, welche mit dem Wildtyp FZB42 beimpft worden waren (Abbildung 1b). Im Gegensatz zum Wildtyp FZB42 zeigte keine der Mutanten eine signifikante Expression in Gegenwart von *R. solani*. Die Mutanten CH5 (*yczE_sfp*) und *alsS* zeigten eine signifikant höhere **Expression des LOX-Gens** in Abwesenheit des Pathogens (-RS) (Abb. 19c); diese Expression ist höher als bei den mit FZB42 (*mut01*) inokulierten Pflanzen. Diese LOX-Expression kann also auch durch andere Faktoren ausgelöst werden. Die LOX-Expression als Reaktion auf den Pilzpathogen in den Pflanzen war bei den FZB42-Mutanten gleich (*fenA*-Mutante) oder niedriger (*alsS*-Mutante) im Vergleich zu den nur inokulierten pflanzen.

Nach der Herausforderung mit dem Erreger *R. solani* wurde in der Anwesenheit von FZB42 das Abwehrgen PDF1.2 des JA / ET -Weg stark hochreguliert (Abb. 19b); dies war in Anwesenheit der *als*-Mutante (Acetoin-negativ) nicht der Fall – **also ist die Stimulierung von PDF1.2 im JA/ET-Weg von der Acetoin-Produktion von FZB42 abhängig**. Zusammen genommen zeigen unsere Ergebnisse, daß mehrere Faktoren wahrscheinlich bei der durch Wildtyp FZB42 gezeigten ISR-Reaktion bei der Abwehr von *R. solani* eine Rolle spielen.

Zusammenfassung:

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Inokulation von Salatpflanzen mit FZB42 eine Reihe von Pflanzenabwehrgenen auch ohne die Anwesenheit des Pilzerregers *R. solani* aktiviert. Allerdings kann FZB42 keine vollständige Resistenzreaktion auslösen, weil keine pathogenen Determinanten vorhanden sind. Diese Abwehrinduktion führt jedoch zu einer wirksameren und verstärkten Reaktion auf die Herausforderung durch den Krankheitserreger *R. solani*. Bei *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit endophytischen Actinobakterien geimpft worden waren, wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet (Conn et al., 2008). Diese endophytischen Actinobakterien sind auch in der Lage, bioaktive Sekundärmetaboliten, ähnlich wie FZB42, zu produzieren. Eine direkte Beteiligung dieser bioaktiven Sekundärmetabolite an der Auslösung von Abwehrreaktionen wurde jedoch in *Arabidopsis* noch nicht nachgewiesen (Conn et al., 2008).

In Salatpflanzen ist nicht viel bekannt über die verschiedenen Signalwege und Resistenzmechanismen und deren Regulation. Untersuchungen mit Mutanten an bestimmten Komponenten in dem SA-, und JA / ET-Weg fehlen. Deshalb ist man

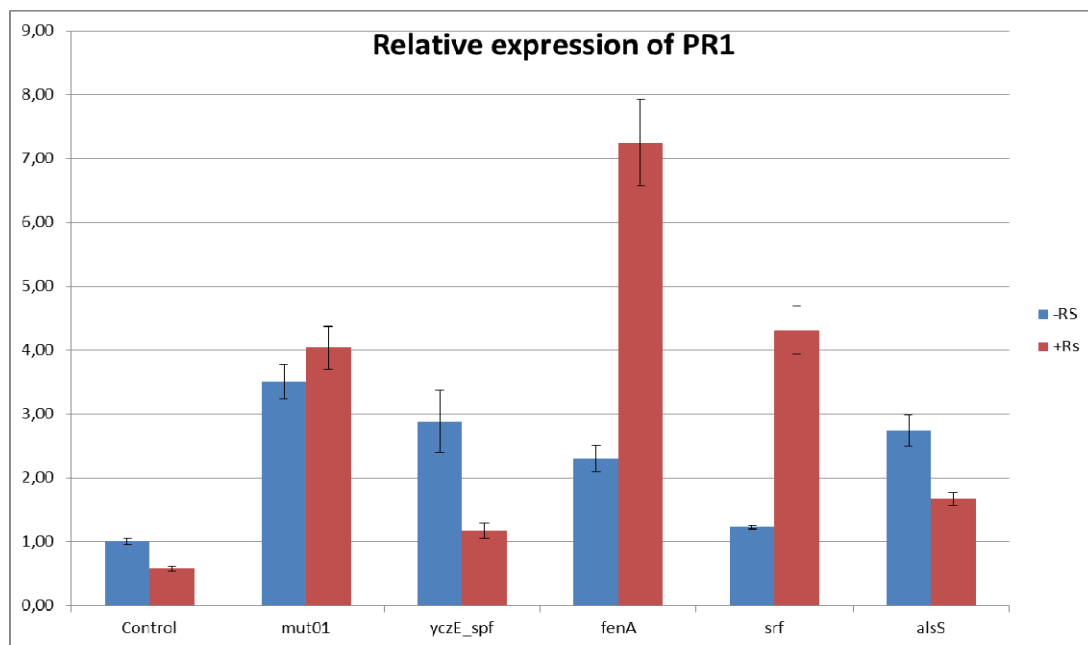
auf das Wissen über die Signalwege auf deren Analogien zu *Arabidopsis* und anderen Pflanzen angewiesen. Es sollte jedoch immer berücksichtigt werden, dass es wichtige Unterschiede zwischen den Abwehrmechanismen in verschiedenen Pflanzen gibt (van Loon et al., 2006). Die Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz von Kopfsalat würde zu weiteren Kenntnissen führen und würde auf jeden Fall wertvolles Basiswissen über die Wechselwirkungen dieser kommerziell wichtigen Pflanze mit ihrer nützlichen Mikroflora und über diverse Krankheits-erreger hinzufügen.

Eine multifaktorielle Wirkung der von FZB42 produzierten sekundären Metabolite und der volatilen organischen Substanz Acetoin können entsprechend der erzielten Ergebnisse für die Aktivierung von ISR verantwortlich sein. Inokulation von Salat mit FZB42 in unserem chemisch definierten axenischen System zeigte eine Low-Level-Induktion von SA- und JA / ET-Genen durch FZB42-Inokulation. Durch diese ISR-Reaktion könnte die erhöhte Resistenz von Salat gegenüber *R. solani* unterstützt werden. Diese Induktion von Krankheitsresistenz zusammen mit den direkten antibiotischen Wirkungen und einer effizienten Besiedlung können als Grundlage dafür angesehen werden, daß FZB42 ein effektives Pflanzenwachstumsförderndes Bakterium mit starker Biokontrolwirkung ist.

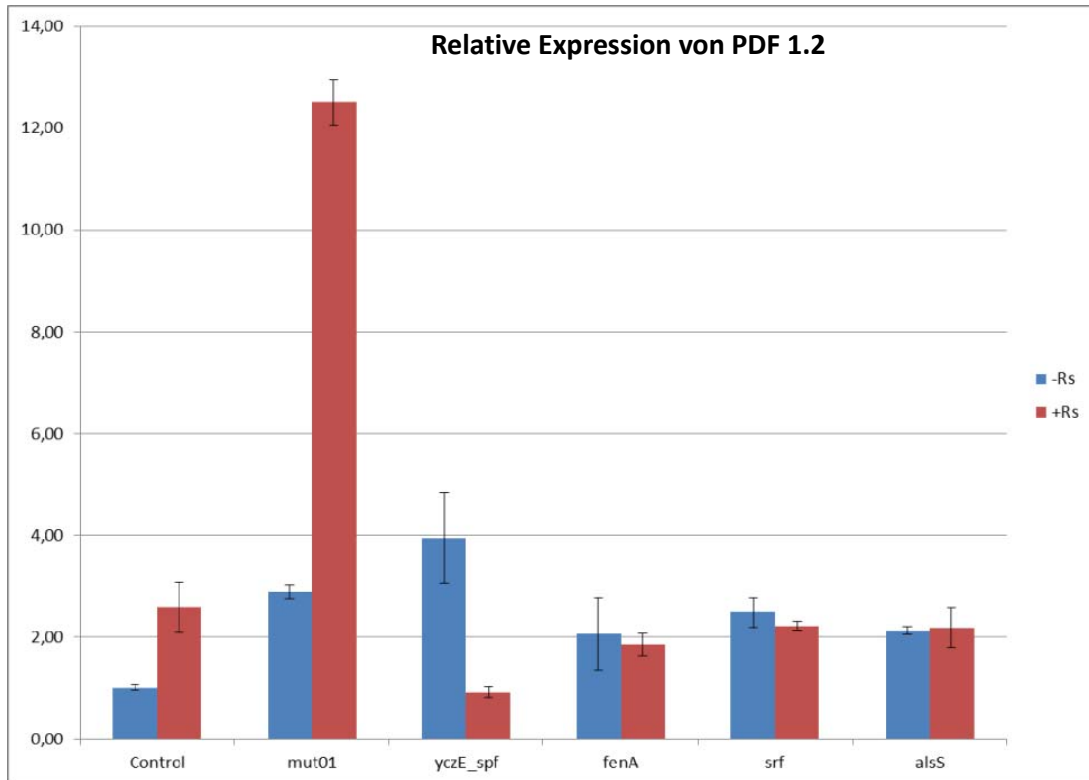
Abb. 19: qRT-PCR-Analyse: Relativ Expression von (a) PR1, (b) PDF1.2, und (c) Lipoxygenase (LOX) in Salatpflanzen, welche mit FZB42 Wildtyp (mut01) und verschiedenen Mutanten in Gegenwart und Abwesenheit von *R. solani* (-RS; +RS) inokuliert worden waren.

-RS: ohne *R. solani*; +RS: mit *R. solani*; mut01: FZB42-WT, gfp-markiert.

a)



b)



c)

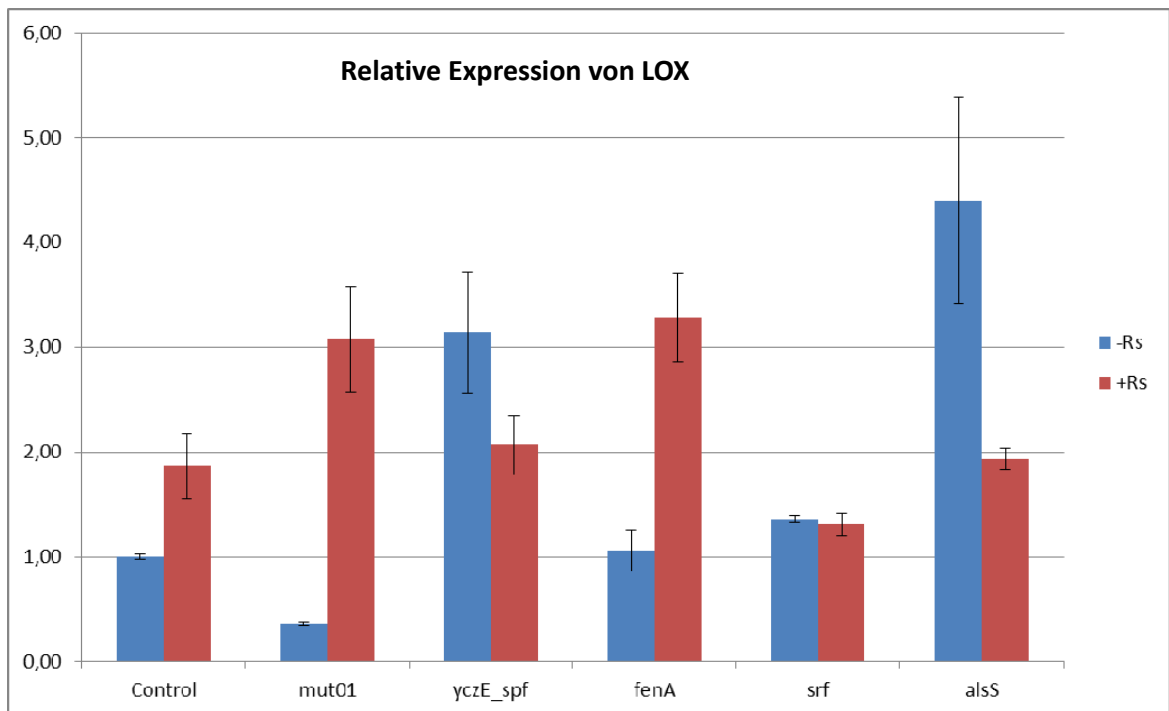
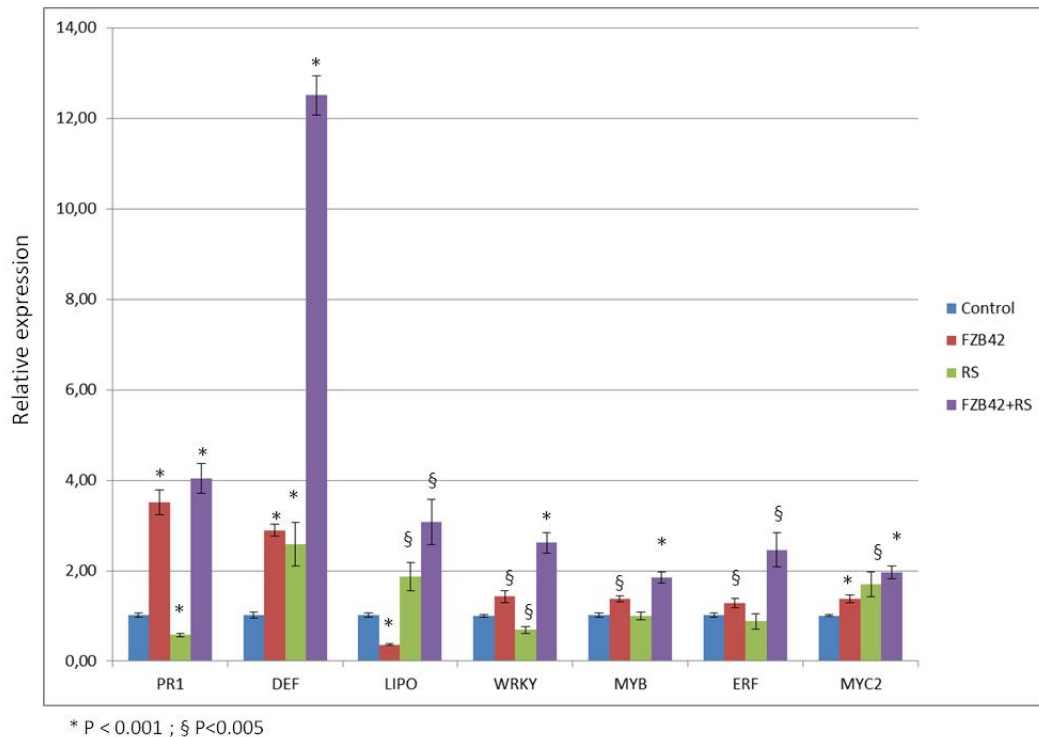


Abbildung 20: qRT-PCR-Analyse: Relative Expression mehrerer Gene, die an der Stimulierung des SA-abhängigen oder des JA / Ethylen -abhängigen Signalwegs in Salat beteiligt sein könnten.



II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Gehälter: 334.077,76 Euro;

Verbrauchsmaterial: 80.801,34 Euro;

Reisekosten: 11.688,80 Euro;

Gesamtkosten: 507.522,98 Euro.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Projekt greift eine Thematik auf, die im Rahmen der Verbesserung der Nachhaltigkeit und gesundheitlicher Aspekte bei der Nahrungsmittelproduktion von Bedeutung ist. Der Einsatz von biologischen Möglichkeiten der Kontrolle von Schaderregern / Pathogenen Mikroorganismen im Pflanzenbau hilft die chemische Belastung von Nahrungsmittel und der Umwelt zu reduzieren. Das verwendete sog. Biologische Stärkungsmittel FZB42 (*Bacillus amyloliquefaciens*) ist bereits im erfolgreichen praktischen Einsatz bei verschiedenen Gemüsepflanzen und anderen Produkten, vor allem auch beim Salatanbau, da hier bodenbürtige Schadpilze, wie

Rhizoctonia solani, ein allgegenwärtiger Problempilz ist. In dem Projekt ging es darum, erstmals die ökologische Basis der Wirksamkeit von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zu verstehen. Durch den Einsatz von spezifischen Mutanten und eines klar definierten Testsystems, das die detaillierte Wechselwirkung von FZB42 mit dem Wurzelsystem von Salat und mit dem Schadpilz erlaubt, war erstmals zu erwarten, die wichtigsten Faktoren für den Erfolg von FZB42 bei der Bekämpfung des Schadpilzes beim Salatanbau identifizieren zu können. So sollte erstmals gezeigt werden, welche Metabolite FZB42 tatsächlich bei der Kolonisierung von Salatwurzeln produziert. Ferner erwartete man sich Aufklärung, ob und welche Metabolite bei der Steigerung der systemischen Resistenz der Pflanzen nach der FZB-Beimpfung wichtig sind. Basierend auf diesen Ergebnissen sollen nun noch effizientere Biokontrollbakterien gefunden werden.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Wie in II.3. erläutert, können nun nach der Charakterisierung der wichtigsten Komponenten bei der Biokontrollwirkung von FZB42 auf Salat diese Erfahrungen bei anderen Gemüseprodukten ebenfalls angewandt werden und Bakterienstämme, die in den entscheidenden Kriterien noch verbessert sind, gezielt gesucht werden. Außerdem sind Hinweise erhalten worden, inwiefern das Biokontrollbakterium noch effizienter und sicherer in der Praxis eingesetzt werden kann, um zu bestmöglichem Schutz der Kulturpflanzen beizutragen (auch in Kombination mit einem Fungizid). Wertvoll ist für die biotechnologische Anwendung auch die neue Erkenntnis, dass durch den Einsatz von FZB42 die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre nicht signifikant verändert wird.

II.5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Gegen Ende der Laufzeit des Projekts wurden auf dem Feld der biologischen Kontrolle von pathogenen Pilzen durch (andere) *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämme zwei Publikationen bekannt (Nihorimbere et al., 2012; Pertot et al., 2013), die zeigten, dass cyclische Peptide und Surfactin in der Rhizosphäre bzw. *in planta* produziert werden.

Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M. (2012) Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. FEMS Microbiol. Ecol. 79, 176-191. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x

Pertot, I., Puopolo, G., Hosni, T., Pedrotti, L., Jourdan, E., Ongena, M. (2013) Limited impact of abiotic stress on surfactin production in planta and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean. FEMS Microbiol. Ecol. DOI: 10.1111/1574-6941.12177

II.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichung des Ergebnisses:

Im Juni 2013 wurde die Publikation: S. Paul-Chowdhury, K. Dietel, M. Rändler, M. Schmid, H. Junge, R. Borriss, A. Hartmann and R. Grosch „Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community” in PLOS one angenommen (PLOS one Vol. 8/7 e68818).

Ein weiteres Manuskript (A. Budiharjo, S. Paul-Chowdhury et al.) wurde in PLOS one (PONE –O-14-03312) eingereicht und ein drittes ist in Vorbereitung (geplant) (S. Paul Chowdhury et al.: Systemic resistance of *Lactuca sativa* against *R. solani* and secondary metabolite production by FZB42 in an axenic model system).