

Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

---

**Untersuchungen zur Wirkung von Fungiziden  
auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften  
(Dr.agr.)

der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt von

**Diplom-Biologin Julia Wilde**  
aus Leverkusen

Referent: **Prof. Dr. H.-W. Dehne**

Korreferent: **Prof. Dr. J. Léon**

Tag der mündlichen Prüfung: **18.06.2014**

Erscheinungsjahr: **2014**

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.“

(Albert Einstein)

Julia Wilde

## **Untersuchungen zur Wirkung von Fungiziden auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices***

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Fungizidanwendungen auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* und dessen Symbiose mit Gerste untersucht. Der Einfluss zehn ausgewählter, für die Landwirtschaft bedeutender Fungizide wurde in einer schrittweisen Annäherung vom artifiziellen direkten Kontakt zu Pilzsporen über die Saatgutbehandlung in kleinen Pflanzgefäßen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen bis hin zu Versuchen in Großcontainern unter Freilandbedingungen untersucht. Bisherige Untersuchungen unter artifiziellen Bedingungen mit sehr hohen Dosierungen und nicht praxisrelevanten Anwendungsmethoden der Fungizide konnten die Auswirkungen der Fungizidanwendung auf arbuskuläre Mykorrhizapilze bislang nicht ausreichend klären.

Obwohl die untersuchten Fungizide auf das Wachstum typischer Schadpilze stark hemmend wirken, war ihre Wirkung auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* bei direktem artifiziellen Kontakt um das Zehn- bis Tausendfache schwächer. In der Reihenfolge Fludioxonil > Thiram, Fluoxastrobin, Trifloxystrobin, Iaconazol, Prothioconazol > Tebuconazol, Penflufen > Metalaxyl, Triadimenol nahm die hemmende Wirkung ab.

Bei Annäherung der Versuchsaufstellung an eine praxisrelevante Anwendungsweise der Wirkstoffe wurde eine zunehmend schwächere Wirkung der Fungizide auf die Mykorrhiza-Symbiose von Gerste und *Glomus intraradices* gefunden. Eine handelsübliche Saatgutbehandlung in Großcontainern unter Freilandbedingungen zeigte schließlich überhaupt keine negativen Effekte auf die Mykorrhiza-Symbiose. Ebenso wenig hatte diese Anwendung der Fungizide negative Effekte auf das Vorkommen und die Vitalität von *Glomus intraradices* im Boden.

Vertiefend wurde das Target der Azol-Fungizide untersucht. In einer Datenbanksuche wurde eine Nukleinsäure-Sequenz gefunden, die für eine *Glomus intraradices* Sterol 14- $\alpha$ -Demethylase (GintERG11) kodieren könnte. Deren Funktionalität wurde durch Expression in und Komplementation von ERG11-defektem *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Veränderte Aminosäuren in der Sequenz, die bei pathogenen Pilzen zu Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden führen, deuten auf strukturelle Eigenschaften des GintERG11-Proteins hin, die möglicherweise eine geringere Sensitivität von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden im Vergleich zu anderen Pilzen zur Folge haben könnten.

Insgesamt erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit belastbare Aussagen über die möglichen Auswirkungen von Fungizidanwendungen in der Landwirtschaft auf die pilzliche Wurzelsymbiose einer Kulturpflanze. Zwar hemmen die Fungizide den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* beim artifiziellen direkten Kontakt, jedoch erfordert dies um Größenordnungen höhere Wirkstoffkonzentrationen, als in der landwirtschaftlichen Praxis üblich. Eine übliche Saatgutbehandlung zeigte dagegen weder Effekte auf Mykorrhizasporen im Boden noch auf die Symbiose mit der Wirtspflanze.

Julia Wilde

### **Studies of the impact of fungicides on the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus intraradices***

This work reports in a systematic and significant way the effect of ten agricultural fungicides on the arbuscular mycorrhizal symbiosis formed between barley and *Glomus intraradices*. The effect of the fungicides was tested gradually from direct artificial contact to seed treatment in pot-experiments under glasshouse and field conditions. Previous studies carried out on fungicide impact on mycorrhizal symbiosis were focused on artificial conditions and application techniques with high dose rates that were not relevant for the practical use of fungicides.

In fact, the fungicides exert inhibitory effects on typical pathogens, but inhibition of spore germination of *Glomus intraradices* required ten to thousand-fold higher doses in comparison. The effect decreased from a strong inhibition by fludioxonil > thiram, fluoxastrobin, trifloxystrobin, ipconazole, prothioconazole > tebuconazole, penflufen > metalaxyl to triadimenol which had a less inhibitory effect.

The effect of the fungicides on mycorrhizal symbiosis between barley and *Glomus intraradices* decreased in approach of the experimental conditions to customary application of the fungicides. Seed treatment of barley in recommended dose rates did not influence the symbiosis in pot-experiments under field conditions. Furthermore, there were no effects of the fungicides on the occurrence and vitality of *Glomus intraradices* in the soil.

The target of azole fungicides was analysed in detailed studies and a database search identified a possible sterol-14- $\alpha$ -demethylase gene sequence of *Glomus intraradices* (*GintERG11*). A complementation assay in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain demonstrated that *GintERG11* encodes a functional sterol-14- $\alpha$ -demethylase. Amino acid changes in the target enzyme compared to *ERG11* of other fungi indicate that *GintERG11* may exhibit changed structural properties, which could lead to less sensitivity against azole fungicides.

Altogether the results permit to substantiated statements about the possible effects of fungicide applications on mycorrhizal symbiosis in agriculture. Although the fungicides can have a negative impact on *Glomus intraradices* under direct artificial conditions, this requires an orders of magnitude higher concentration than the recommended dose rates in agriculture. The seed treatment with fungicides had no effects on mycorrhizal spores in soil nor on the symbiosis between barley and *Glomus intraradices*.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose.....	2
1.2	Fungizide einschließlich Oomycetenwirkstoffe.....	8
1.3	Die Sterolbiosynthese von <i>Glomus intraradices</i> und Inhibitoren der Synthese am Beispiel der Azol-Fungizide.....	14
1.4	Der Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze – Stand des Wissens.....	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
2.1	Fungizide.....	22
2.2	Pilzmaterial.....	23
2.3	Pflanzenmaterial.....	23
2.4	Medien, Puffer- und Färbelösungen.....	24
2.5	Substrate und Ackererde.....	26
2.6	Nährstoffversorgung.....	26
2.7	<i>in vitro</i> Versuche.....	27
2.8	Gewächshausversuche.....	31
2.9	Großcontainer-Versuche unter Freilandbedingungen.....	33
2.10	Bestimmung pflanzlicher Wachstumsparameter.....	36
2.11	Mikroskopie.....	37
2.12	Molekularbiologische Arbeiten.....	40
2.13	Statistische Auswertung und Software.....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>50</b>
3.1	Der direkte Einfluss von Fungiziden auf <i>Glomus intraradices</i> .....	50
3.2	Der Einfluss von Fungiziden auf die Mykorrhiza-Symbiose zwischen <i>Glomus intraradices</i> und Gerstenwurzeln.....	62
3.3	Spezielle Untersuchungen zur Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase von <i>Glomus intraradices</i> .....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>94</b>
4.1	Der direkte Einfluss von Fungiziden auf die ersten Entwicklungsschritte von <i>Glomus intraradices</i> ....	97
4.2	Der Einfluss von Fungiziden auf die Mykorrhiza-Symbiose zwischen <i>Glomus intraradices</i> und Gerstenwurzeln.....	100

4.3	Einfluss der Fungizide auf die Funktionalität der Symbiose .....	109
4.4	Spezielle Untersuchungen zur Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase von <i>Glomus intraradices</i> .....	109
4.5	Schlussfolgerung .....	114
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	115
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	118
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	136
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	139

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	micro
A	Adenin
a.i.	Wirkstoff (active ingredient)
Abb.	Abbildung
AMF	Arbuskuläre Mykorrhizapilze (arbuscular mycorrhizal fungus)
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin)
c	centi
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNS (complementary DNA)
cfu/g	Kolonienbildende Einheit (colony forming unit)
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
DMI	Sterol C14-Demethylierungs-Inhibitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTPs	desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
dpi	Punkte pro Zoll (dots per inch)
dt	Dezitonne (100 kg)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidium-Bromid
FS	Suspensionskonzentrat zur Saatgutbehandlung (flowable concentrate for seed treatment)
fwd	forward
G	Guanidin
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
ha	Hektar
HCl	Hydrochlorid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
m	milli



M	Molarität (Mol/l)
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge (molar)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na-EDTA	Natrium-Ethylendiamin-Tetraacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chloride
nm	Nanometer
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per milion
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction)
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
rRNA	Ribosomale RNS (ribosomal RNA)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S.	Seite
SBI	Sterolbiosynthese-Inhibitor
SC	Suspensions-Konzentrat (suspension concentrate)
SDH	Succinat-Dehydrogenase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE-Puffer	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (T melting)

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transport RNS (transfer RNA)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
v/v	Volumen in Volumen
w/v	Masse in Volumen (g/ml)
WP	wasserlösliches Pulver (water soluble powder)
WS	Schläämpulver oder Schlämmbeize (water dispersible powder for slurry seed treatment)

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Für Fachbegriffe, für die in der deutschen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich oder unzureichend ist, wurden die englischen Termini verwendet.

# 1 Einleitung

Etwa 70–90 % der höheren Landpflanzen sind mit Pilzen in Form einer arbuskulären Mykorrhiza, einer seit mehr als 400 Millionen Jahren existierenden Symbiose, vergesellschaftet. Wurzelsymbionten haben eine enorme ökonomische und ökologische Bedeutung. Aufgrund ihrer zentralen Stellung an der Schnittstelle Boden–Pflanze prägen sie direkt und indirekt die Diversität und Produktivität von Pflanzengemeinschaften (Schüßler, 2009). Arbuskuläre Mykorrhizapilze können zu einer verbesserten Nährstoffversorgung der Pflanze beitragen und die Resistenz der Pflanzen gegenüber Pathogenen sowie Trockenstress erhöhen (Schüßler, 2009). Diese Vorteile führten in den letzten Jahren dazu, dass den arbuskulären Mykorrhizapilzen eine immer größer werdende Bedeutung für eine nachhaltige Landwirtschaft beigemessen wurde (Barea & Jeffries, 1995; Jordan *et al.*, 2002; Dalpé & Monreal, 2004; Gossling, 2006). Positive Effekte auf Wachstum, Qualität und Gesundheit der mykorrhizierten Pflanzen sowie positive Auswirkungen auf die Stabilität von landwirtschaftlich genutzten Flächen (Powell & Daniel, 1978; Bethlenfalvay & Schüepp, 1994; Smith *et al.*, 2011) sind im Zusammenhang mit arbuskulären Mykorrhizapilzen beschrieben. Die gezielte Anwendung der arbuskulären Mykorrhizapilze als Inokulum in der Landwirtschaft und im Gartenbau liegt daher nahe. Auf diese Weise kann ein Beitrag zur Sicherung der Erträge und Optimierung des Pflanzenwachstums geleistet werden (Bethlenfalvay & Schüepp, 1994; Smith *et al.*, 2011). Die für die menschliche Ernährung bedeutendsten Pflanzen wie Mais (*Zea mays*), Reis (*Oryza sativa*), Weizen (*Triticum aestivum*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Sojabohne (*Glycine max*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) bilden für ihre Nährstoff- und Wasserversorgung alle eine Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen aus (Marris, 2008, Schüßler, 2009).

Im Gegensatz dazu können pilzliche Krankheitserreger neben abiotischen Umwelteinflüssen und tierischen Schädlingen zu erheblichen Ertragseinbußen führen. Die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, insbesondere Fungiziden, ist unumgänglich, um einen effektiven Schutz der wichtigsten Kulturarten vor dem Befall mit Krankheitserregern zu gewährleisten. Unter dem Aspekt einer stetig wachsenden Weltbevölkerung und dem dadurch steigenden Ertragsbedarf ist der Einsatz moderner Agrarchemikalien wie Fungizide, Insektizide und Herbizide ein wichtiger Weg, um die Nahrungsmittelversorgung zu sichern, und die Produktivität zu steigern. Bei der Ergreifung ertragssteigernder und qualitätssichernder Maßnahmen sollen jedoch nützliche Organismen wie arbuskuläre Mykorrhizapilze sowie wertvolle Biotope und Lebensräume nicht geschädigt werden. In wissenschaftlichen und öffentlichen politischen Diskussionen wird die Frage aufgeworfen, welche Auswirkungen die Fungizidanwendung auf die für Kulturpflanzen nützliche Wurzelsymbiose mit Mykorrhizapilzen hat (Gianinazzi *et al.*, 2010). Darüber hinaus stellt sich die

Frage, ob sich die Fungizide nachhaltig schädlich auf die Bodenökologie auswirken. In einigen Publikationen werden negative Effekte von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze beschrieben (Bailey & Safir, 1978; Ocampo & Hayman, 1980; Menge *et al.*, 1982; Fitter, 1986; Habte & Majunath, 1992; Sukarno *et al.*, 1993; Zocco *et al.*, 2008, 2010; Ipsilantis *et al.*, 2011). Im Hinblick auf die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln zur Bekämpfung von Krankheitserregern und ihrer gleichzeitigen Wirkung auf Nicht-Zielorganismen lösen diese Untersuchungen Bedenken aus.

Da die bisherigen Untersuchungen jedoch unter artifiziellen Bedingungen mit sehr hohen Dosierungen und nicht praxisrelevanten Anwendungsmethoden der Fungizide durchgeführt wurden, beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Einfluss von Fungiziden auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* unter praxisrelevanten Konzentrationen und Bedingungen. Die zehn ausgewählten Fungizide decken ein breites Spektrum der für die Landwirtschaft bedeutenden Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen ab.

## 1.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose

Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose stellt die am weitesten verbreitete mutualistische Interaktion von Pflanzen und Mikroorganismen dar (Fitter 2005; Wang & Qiu 2006; Smith & Read, 1997, 2008). Die namensgebende Struktur der Symbiose sind die Arbuskeln (lat. arbuscula – kleine Bäume), intrazelluläre Bäumchen-artige Strukturen, die während der pilzlichen Kolonisierung der Pflanzenwurzelzellen gebildet werden und der Ort des aktiven bidirektionalen Nährstoffaustausches zwischen pflanzlichen und pilzlichen Partnern sind.

Entwicklungsgeschichtlich handelt es sich um die älteste Wechselbeziehung zwischen Pilzen und Pflanzen. Die Symbiose wird zwischen 70–90 % aller Landpflanzenspezies und Pilzen des monophyletischen Phylums *Glomeromycota* (Abb. 1) der Ordnung *Glomales* gebildet (Morton & Benny, 1990; Smith & Read, 1997; Read *et al.*, 2000; Schüßler *et al.*, 2001; Hibett *et al.*, 2007; Smith & Read, 2008). Der Ursprung der arbuskulären Mykorrhiza ist eine Spross- bzw. Thallussymbiose, die schon bei Pflanzen in bodenbürtigen Sprosssteilen, die noch keine Wurzeln ausdifferenzieren konnten, ausgebildet wurde (Remy *et al.*, 1994; Schüßler, 2009). Die frühesten Funde von arbuskulären Mykorrhizapilz-Strukturen wurden an verkieselten Wurzeln des Palmfarns *Antarcticycas schopfii* gefunden (Stubblefield *et al.*, 1987; Phipps & Taylor, 1996). Dort lagen nicht-septierte Hyphen, Vesikel, Arbuskeln sowie Clamydosporen vor. Ca. 400 Mio Jahre alte fossile Funde der Ausbildung der Symbiose mit der nicht-vaskulären Landpflanze *Aglaophyton major* sowie *Glomales*-Sporen aus dem Ordovicium vor ca. 460 Mio. Jahren belegen eine evolutionär sehr frühe Entwicklung der arbuskulären Mykorrhizapilze (Remy *et al.*, 1994;

Redecker *et al.*, 2000; Schüßler *et al.*, 2009). Dies erklärt die starke Verbreitung dieser Symbiose im heutigen Pflanzenreich.

Aufgrund dieser fossilen Funde folgerte man, dass die ersten terrestrischen Pilze bereits viele Millionen Jahre vor den Landpflanzen entstanden sind. Einige Wissenschaftler gehen davon aus, dass schon im aquatischen Umfeld die ersten Symbiosen mit Grünalgen (*Charophyta*) gebildet wurden (Pirozynski & Malloch, 1975; Pirozynski & Hawksworth, 1988; Schmidt, 2010). Dies unterstützt den Verdacht eines monophyletischen Ursprungs aller Landpflanzen durch eine Symbiose (Brundrett, 2002; Parniske, 2008).

Erst seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wird die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose intensiv erforscht und damit auch ihre Bedeutung für viele Pflanzen und ihr potenzieller Nutzen, vor allem für die Landwirtschaft, erkannt.

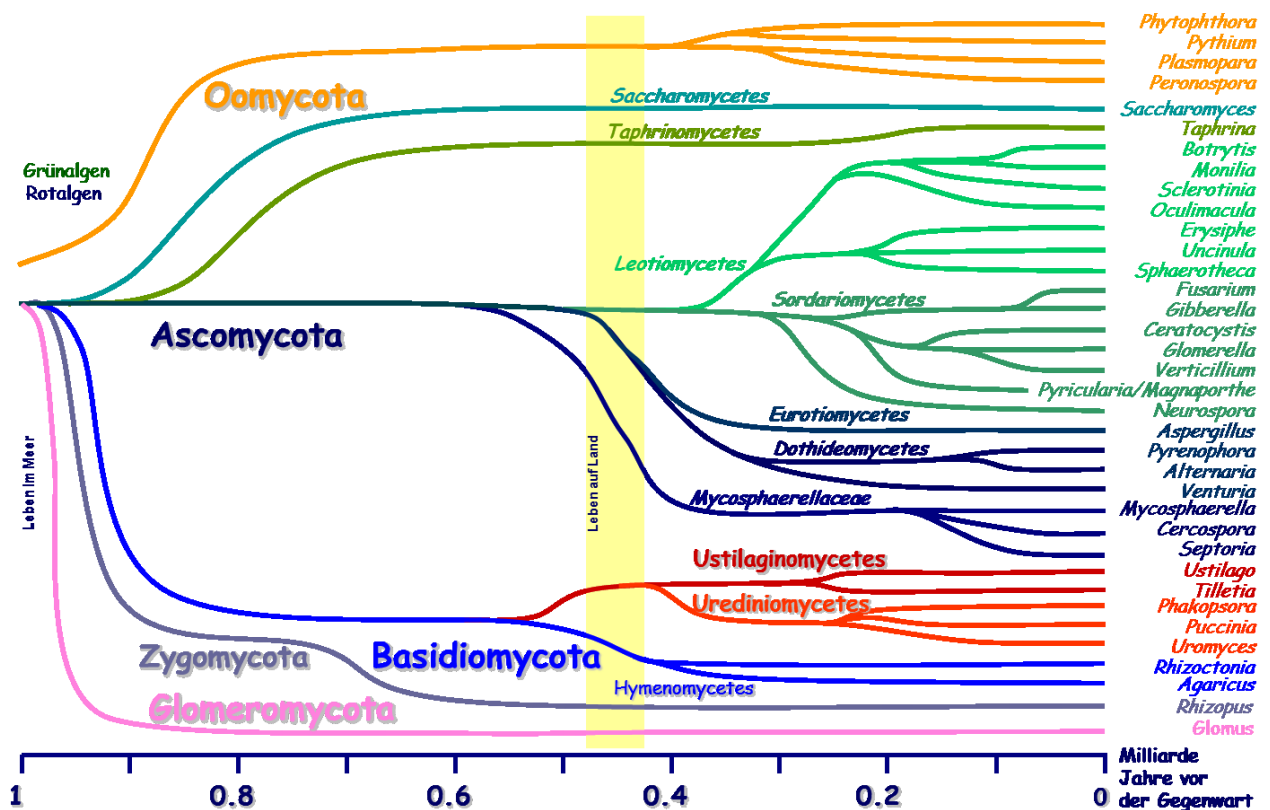


Abb. 1: Stammbaum der Pilze (persönliche Mitteilung Tietjen, 2009)

Der Hauptvorteil der Symbiose für Pflanze und Pilz liegt in der gegenseitigen Versorgung mit Nährstoffen, sodass beide Symbiose-Partner vom Zusammenleben profitieren (Smith & Read, 1997). Über ein ausgedehntes extraradikales Myzel liefert der Pilz mineralische Nährstoffe, besonders Phosphate, aber auch Wasser an die Pflanze (Sanders & Tinker 1973; Powel & Bagyaraj, 1984; Jakobsen *et al.*, 1992; Harrison & van Buuren, 1995; Smith *et al.*, 2011; Hodge *et al.*, 2001). Im Gegenzug erhält der Pilz Photosynthese-Assimilate, vor allem Glucose (Marschner, 1995; Smith & Read, 1997; Douds *et al.*, 2000; Graham, 2000).

Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose ist unter ökologischen und ökonomischen Aspekten sehr wichtig, da sie zu einer erhöhten Resistenz der Pflanze gegenüber Blatt- und Wurzelpathogenen führen kann (Cordier *et al.*, 1998; Vigo *et al.*, 2000; de la Pena *et al.*, 2006). Eine erhöhte Biomasseproduktion der Wirtspflanzen wurde ebenso beobachtet (Smith *et al.*, 2010). Darüber hinaus kann die Symbiose Schutz gegen Stressfaktoren wie Trockenheit oder Bodenfeuchtigkeit bieten (Augé, 2001; Aroca *et al.*, 2007). Weitere Nutzwirkungen sind die Erhöhung der Resistenz gegenüber Bodenversalzung sowie Schwermetallen (Schüepp, 1987; Dehne, 1987; Leyva *et al.*, 1991; Weissenhorn *et al.*, 1995; Al-Karaki, 2000; Al-Karaki & Hammad, 2001; Al-Karaki *et al.*, 2001). Durch diese Eigenschaften besteht die Möglichkeit, belastete Böden (Kippenböden, Bergbaufolgelandschaften), die arm an Pflanzen sind, mithilfe von Mykorrhizapilzen wieder aufzuforsten bzw. zu rekultivieren (Powell 1982; Thompson, 1987; Harnikumar & Bagyaraj, 1988). Insbesondere Pflanzen mit einem gering leistungsfähigen Wurzelsystem auf phosphatarmen, austrocknungsgefährdeten Grenzstandorten können durch eine Mykorrhizierung wachsen (Powell & Bagyaraj, 1984).

Phosphat ist ein essenzieller Mineralnährstoff für die Pflanze, der oft ein limitierender Faktor sein kann, da trotz hohen Phosphatgehaltes im Boden physikalische und chemische Faktoren die Aufnahme über die Wurzelhaare behindern können. Durch die Kooperation der Pflanze mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz kann die pflanzliche Phosphaternährung bedeutend verbessert werden. Bis zu 80 % des aufgenommenen Phosphates können durch den Pilz herangeführt werden, im Gegenzug werden bis zu 20 % der Kohlenhydrate an den Pilz abgegeben (Bucher, 2002; Schüßler, 2009). Der Hauptgrund für die verbesserte Nährstoffaufnahme liegt in der „Größe“ des Pilzes. Im Vergleich zu den relativ groben Wurzeln ist das Pilzmyzel sehr fein und kann aufgrund des geringen Durchmessers von nur 2 bis 8 µm kleinere Bodenporen als die Wurzelhaare erschließen (Harley, 1989; Schüßler, 2009). Des Weiteren führt es zu einer enormen Vergrößerung der Adsorptionsfläche der Wurzeln (Gianinazzi *et al.*, 1995). Infolgedessen können die arbuskulären Mykorrhizapilze Wasser, Phosphat und andere Nährstoffe aus den Bodenkompartmenten aufnehmen, die für die Pflanze über die Wurzelhaare und Feinwurzeln nicht erreichbar sind. Durch den Pilz können Bodenbereiche erreicht werden, die mehr als 25 cm von den Wurzeln entfernt sind (Leake *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2009). Eine Zunahme des Phosphatgehaltes in der Pflanze kann die Mykorrhizierung hingegen limitieren, sodass es in nährstoffreichen Böden zu einer reduzierten Mykorrhizierung gegenüber nährstoffarmen Böden kommen kann (Sanders & Tinker, 1973; Smith *et al.*, 2009).

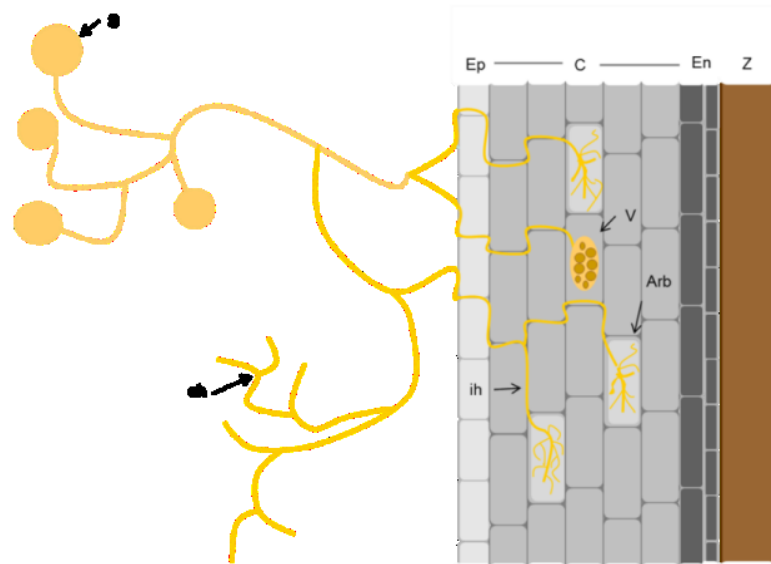
Die arbuskulären Mykorrhizapilze verbessern nicht nur die pflanzliche Ernährung durch den Transport von Phosphat und damit das Pflanzenwachstum, sondern stellen weitere Nährstoffe wie Kalium, Zink, Kupfer, Stickstoff, Magnesium und Eisen vermehrt zur Verfügung

(Sanyal & de Datta, 1991; Marschner & Dell, 1994; Mäder, 1996; Backhaus & Feldmann, 1996; George, 2000). Darüber hinaus ist die Bildung der Pflanze-Mikroorganismus-Interaktion von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Die optimale Temperatur, Lichtintensität, Tageslänge oder auch Bodeneigenschaften beeinflussen die Mykorrhizierung der Wirtspflanze (Smith & Bowen, 1979; Diederichs, 1981; Tisdall & Oades, 1982; Sieverding, 1988).

Arbuskuläre Mykorrhizapilze (AMF) sind obligat biotrophe Organismen, die ihren Lebenszyklus nicht ohne die Besiedlung eines photoautotrophen Partners beenden können (Bago & Bécard, 2002; Spanu, 2006; Parniske, 2008). Die im Boden vorkommenden Sporen der arbuskulären Mykorrhizapilze sind jedoch fähig, unabhängig von einem pflanzlichen Partner auszukeimen. Sie können bis zu mehrere tausend Zellkerne enthalten (Viera *et al.*, 1990; Hosny *et al.*, 1998). Ungeklärt ist bisher, ob die Sporen homo- oder heterokaryotisch sind (Pawloska *et al.*, 2004; Bever *et al.*, 2005).

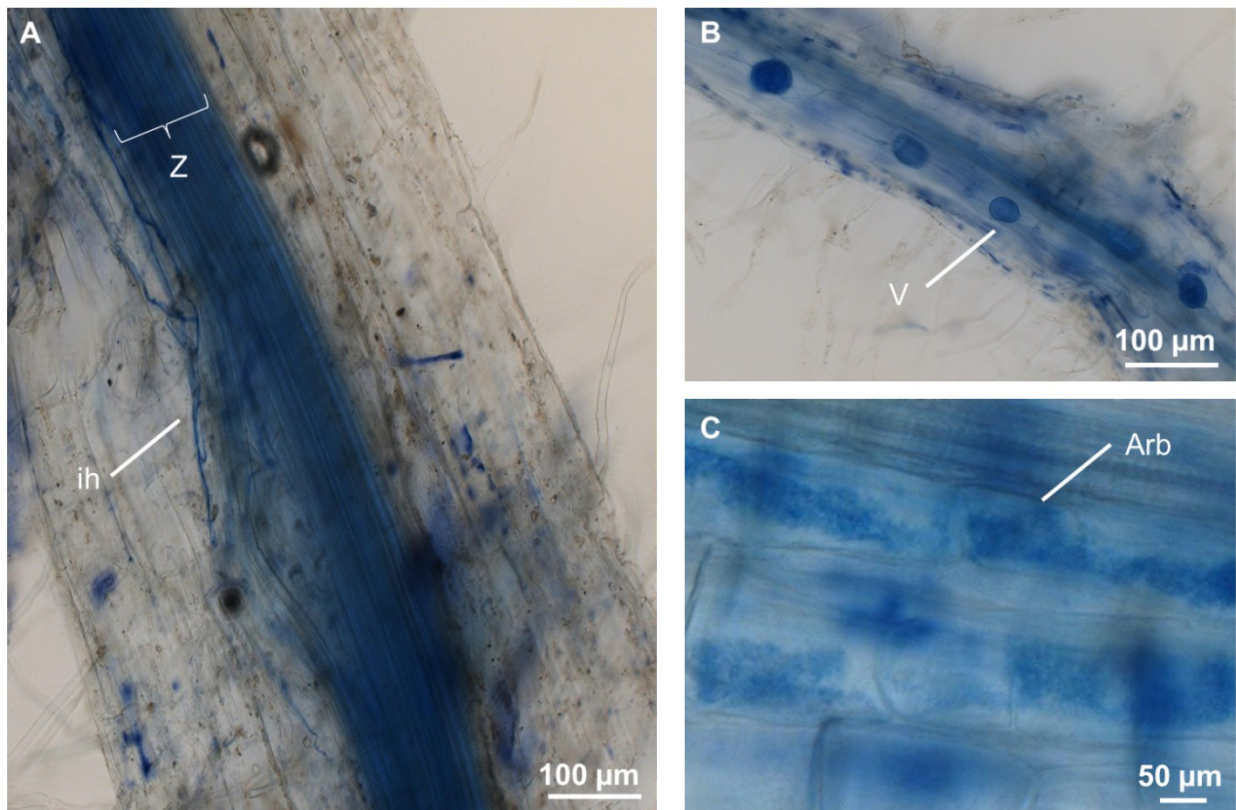
Die Sporenkeimung wird von diversen abiotischen Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und pH-Wert beeinflusst (Eskandari & Danesh, 2010). Findet der Pilz in bis zu 20 Tagen keinen geeigneten Partner so zieht er das Cytoplasma zurück, septiert die Keimhyphen und geht wieder in den Ruhezustand über (Bonfante & Perotto, 1995; Giovannetti, 2000). Wachsen die Hyphen des keimenden Pilzes hingegen in der Nähe einer Wurzel, werden Signale zwischen den beiden möglichen Partnern ausgetauscht (Giovannetti & Sbrana, 1988; Tamasloukht *et al.*, 2003; Kosuta *et al.*, 2003; Harrison, 2005; Paszkowski, 2006). Bei den pflanzlichen Wurzelexsudaten handelt es sich um Strigolaktone aus der Gruppe der Sesquiterpene. Diese können die Sporenkeimung anregen. Des Weiteren führen sie beim Pilz zu physiologischen Veränderungen und können außerdem die mitochondriale Aktivität beeinflussen (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006).

Der Kontakt zwischen Hyphen und Wurzelexsudaten führt zu einer starken Verzweigung („branching“) der Hyphen, sodass ein regelrechtes Myzel entsteht. Dieses ist unseptiert und vielkernig mit hunderten von Kernen, die dasselbe Cytoplasma teilen (Akiyama *et al.*, 2005; Parniske, 2008). Damit beginnt die präsymbiotische Phase des Pilzes, in der er die Fähigkeit verliert, wieder in den Ruhezustand zurückzukehren. Nach dem ersten physikalischen Kontakt zwischen Hyphenspitzen und der Wurzeloberfläche beginnt der Pilz mit der Bildung des Appressoriums über das er die Wurzelepidermis penetriert und anschließend intraradikale Strukturen ausbildet (Harrison, 1999; Nagahashi, 2000).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Ausbildung einer arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose. S: Sporen, eh: extrazelluläre Hyphen, ih: intraradikale Hyphen, V: Vesikel, Arb: Arbuskeln, EP: Epidermis, C: Cortex, En: Endodermis, Z: Zentralzylinder; (Barker et al., 1998)**

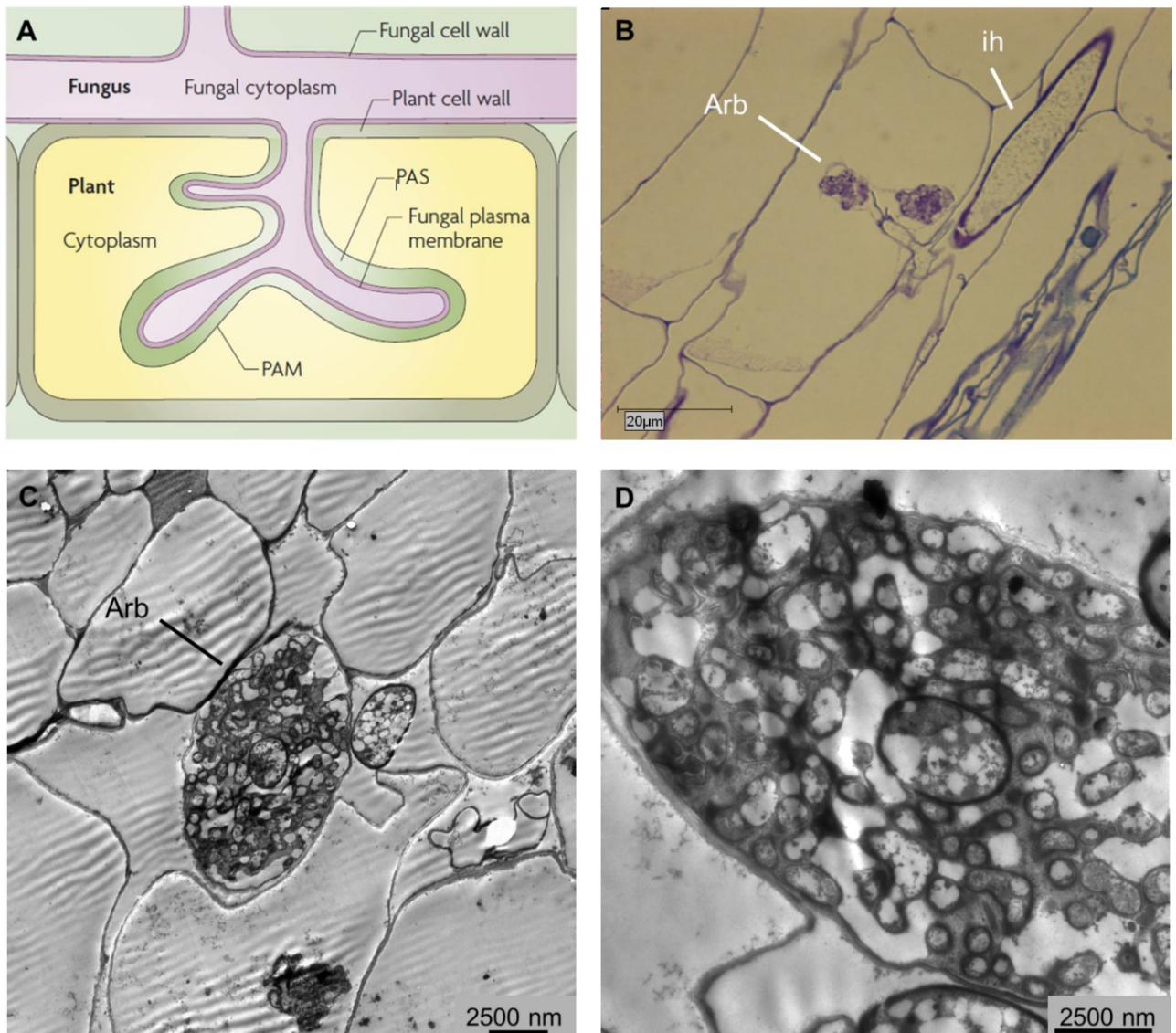
Bei den charakteristischen Strukturen handelt es sich um Arbuskeln, Vesikel und intraradikale Hyphen, die nur im Cortex gefunden werden. Die Endodermiszellen der Wurzel werden nicht besiedelt (Abb. 2 & Abb. 3).



**Abb. 3: Lichtmikroskop-Aufnahmen von Gerstenwurzeln kolonisiert mit *Glomus intraradices*. ih: intraradikale Hyphen, V: Vesikel, Arb: Arbuskeln, Z: Zentralzylinder; A) Intraradikale Hyphen; B) Vesikel; C) Arbuskeln; (Färbung der pilzlichen Strukturen mit Trypanblau)**



Die charakteristischen Arbuskeln der Symbiose sind das Ergebnis einer koordinierten subzellulären Entwicklung der Pflanzenzelle und des Pilzes (Abb. 4). Jede Verzweigung der Arbuskeln innerhalb der Wurzel ist durch die Periarbuskuläre Membran (PAM) vom Cytoplasma der Wirtszelle getrennt (Parniske, 2008). Diese Membran ist durchgängig und schließt den Pilzpartner vom pflanzlichen Cytoplasma aus. Die apoplastische Grenzfläche zwischen der pilzlichen Plasmamembran und der pflanzlichen PAM wird als Periarbuskulärer Raum (PAS) bezeichnet. Dieser Raum beinhaltet aufgrund des Zellwand synthetisierenden Potenzials beider Membranen pilzliches und pflanzliches Zellwandmaterial (Parniske, 2008).



**Abb. 4:** A) Schematische Darstellung einer Arbuskel in der Pflanzenzelle. PAS: Periarbuskulärer Raum; PAM: pflanzliche Periarbuskuläre Membran (Parniske, 2008); B) Lichtmikroskop-Aufnahme einer Chicorée-Wurzel im Längsschnitt. Arb: Arbuskel; ih: intraradikale Hyphe; C-D) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme einer Chicorée-Wurzel im Querschnitt. Arb: Arbuskel

Arbuskeln sind kurzlebige Strukturen, die in den meisten Pilz-Wirt-Interaktionen nach sieben bis zwölf Tagen wieder degenerieren und durch das Kollabieren sowie Verklumpen der Arbuskeläste und des Stammes gekennzeichnet sind (Alexander *et al.*, 1989; Gadkar *et al.*, 2001). Die aktive Phase dauert ca. zwei bis drei Tage (Alexander *et al.*, 1989; Javot *et al.*, 2008).

Gleichzeitig mit der Besiedlung wächst der Pilz wieder aus der Wurzel heraus und bildet im umgebenden Boden das extraradikale Myzel (Franken *et al.*, 2002). Dieses kann ein unterirdisches Netzwerk bilden, worüber Nährstoffe zwischen benachbarten Pflanzen ausgetauscht werden können (Bethlenfalvay *et al.*, 1991). Der Lebenszyklus schließt mit der Bildung von Tochtersporen an den Enden der extraradikalen Hyphen (Bianciotto & Bonfante, 1998). Durch die Bildung von Sporen kann der Pilz ungünstige Bedingungen überstehen, bis er unter geeigneten Umweltbedingungen (Feuchtigkeit, pH-Wert, Temperatur) in der asymbiotischen Entwicklungsphase zu keimen beginnt und einen Keimschlauch ausbildet (Bonfante *et al.*, 1995). Die Farben und Größen der Sporen können sehr stark variieren. So reichen die Farben der Sporen des in der Arbeit verwendeten *Glomus intraradices* von weiß über gold-gelb bis hin zu braun. Die Größe variiert zwischen 10-800 µm (Viera & Glenn, 1990).

Die Kohlenhydrate, die der Pilz aus Assimilaten der Pflanze erhält, werden vom Pilz schnell in eigene Kohlenhydrate, zum Beispiel Trehalose, umgebaut. Anschließend werden sie in Fette umgewandelt und in Form kleiner Tröpfchen in speziellen Pilzstrukturen, den Vesikeln, gespeichert (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Smith & Read, 1997; Pfeffer *et al.*, 1999). Sie besitzen dicke Zellwände, eine meist ovale Morphologie, und werden in oder zwischen kortikalen Zellen gefunden und entstehen terminal an einzelnen Hyphen.

## **1.2 Fungizide einschließlich Oomycetenwirkstoffe**

Fungizide sind Substanzen, die Pilze und/oder deren Sporen abtöten oder ihr Wachstum hemmen können. Sie werden im Pflanzenschutz eingesetzt, um durch Pilzbefall hervorgerufene Krankheiten zu verhindern oder zu stoppen. Durch ihren Einsatz können Ertragsverluste verhindert werden, die je nach Kultur und Region bis zu 40 % betragen können. Zudem kann durch den Einsatz von Fungiziden wirtschaftlichen Schwierigkeiten, Hungersnöten und Krankheiten vorgebeugt werden (Oerke, 1996; Börner, 2009). Die früheste Verwendung von anorganischen Substanzen wie Schwefel und Kupfersulfate („Bordeaux-Brühe“) zur effektiven Kontrolle von Pathogenen in landwirtschaftlichen Kulturen geht auf das 17. Jahrhundert zurück (Hutson, 1998). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die grundlegenden Prinzipien zur Kontrolle von Pflanzenkrankheiten etabliert und die ersten Präparate in Form der Saatgutbehandlung zunächst an Gartenbaukulturen (Obst und Gemüse) angewandt. In der Zeit von 1940 bis 1970 wurden neue chemische Klassen als Fungizide eingeführt. Die Verwendung der Dithiocarbamate und später Phthalamide bedeutete eine

große Verbesserung gegenüber den vorherig genutzten anorganischen Fungiziden. Sie waren aktiver, weniger toxisch und einfacher in der Handhabung. Zu den ersten organischen Fungiziden zählten die Dimethyldithiocarbaminsäuren-Derivate Ferbam, Ziram und Thiram, die in den frühen 1940er Jahren eingeführt wurden. In den 1960er Jahren dehnte sich die Forschung und Entwicklung um neue Produkte für den Fungizidmarkt weiter aus, so wurde zum Beispiel vermehrt der umweltproblematische Aspekt der Fungizide beachtet. Es wurden effektivere und weniger mit Nebenwirkungen belastende Fungizide entwickelt. Aus diesen Neuerungen heraus wurden Fungizide entwickelt, die selektiver wirkten und auf einen bestimmten Angriffsort in der Pilzphysiologie abzielten (Jaskolla, 2006).

Aufgrund ihres Verhaltens auf und in der Pflanze können Fungizide grob in nicht-systemisch, systemisch und mesostemisch eingeteilt werden (Bradley & Bissonnette, 2008). Darüber hinaus können sie eine protektive oder kurative Eigenschaft aufweisen (Dias, 2012). Protektiv bedeutet, dass die Applikation des Wirkstoffes vor dem Schaderregerauftreten erfolgt, also vorbeugend, da die Wirkung nur gegen frühe Befalls- bzw. Infektionsstadien und vor dem Eindringen in die Pflanze vorhanden ist. Bei kurativer Anwendung ist eine Wirkung auch nach dem Befallsbeginn feststellbar, was auf der Tiefenwirkung oder systemischen Verteilung des Wirkstoffes in der Pflanze beruht (Hallmann *et al.*, 2007).

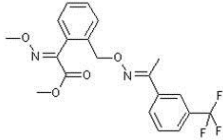
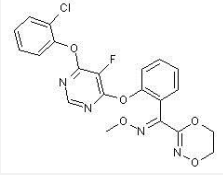
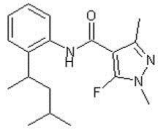
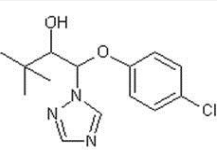
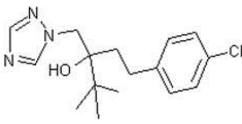
Nicht-systemische Wirkstoffe werden nicht aufgenommen und sind nicht in der Lage einen Schutz vor Pilzstrukturen innerhalb der Pflanze zu gewährleisten. Die Wirkstoffe können nur protektiv genutzt werden und bieten dadurch nur einen äußerlichen Schutz der Pflanze. Sie hemmen die Keimung sowie das Keimschlauchwachstums des Pilzes. Nachwachsende Pflanzenteile werden jedoch nicht geschützt (Oerke & Steiner, 2003; Bradley & Bissonnette, 2008; Morton & Staub, 2008).

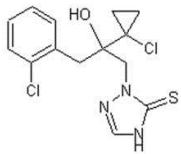
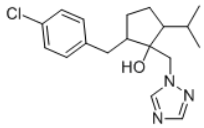
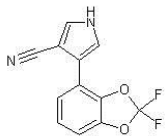
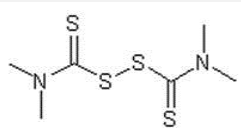
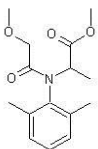
Systemische Wirksubstanzen werden aktiv über die Kutikula in das Pflanzengewebe aufgenommen und können den Pilz abwehren, wenn dieser bereits in die Pflanze eingedrungen ist (Isaac, 1992). Man unterscheidet zwischen vollsystemischer Wirkung, bei der der Wirkstoff über die Blätter und die Wurzel in die Pflanze aufgenommen wird und über das Gefäßsystem in der Pflanze verteilt wird, sowie lokalsystemische Wirkung, bei der die Wirksubstanz nur an dem von der Spritzbrühe getroffenen Gewebe aufgenommen wird. Eine weitere Wirkungsart bildet die quasisystemische Wirkung, bei der der Wirkstoff auf und in der Kutikula verbleibt, um über die Gasphase durch Diffusion in die Pflanze zu gelangen (v.d. Kerk, 1973; Cremllyn, 1961; Fehrmann, 1976; Oerke & Steiner, 2003; Bradley & Bissonnette, 2008; Morton & Staub, 2008).

Mesostemische Fungizide werden auf der Pflanzenoberfläche gut aufgenommen und bilden dort ein Wirkstoffdepot aus. Von diesem aus erfolgt eine stetige protektive Wirkung auf die auskeimenden Pilzsporen. Zudem dringt kontinuierlich Wirkstoff in geringen Mengen in das Pflanzengewebe ein. Die Ober- und Unterseite des Blattes werden durch die translaminare Verlagerung der Wirksubstanz gleichmäßig vor Infektionen geschützt. Außerdem werden Wirkstoffpartikel abgegeben, die über die Nachverteilung auf die nicht unmittelbar behandelten oder neu zugewachsenen Pflanzenteile gelangen (Bradley & Bissonnette, 2008; Morton & Staub, 2008; Börner, 2009).

*Oomyceten* werden der phylogenetischen Linie der *Chromalveolata* zugeordnet (Beakes *et al.*, 1998; Raven *et al.*, 2006). Ihre Herkunft von ehemals Photosynthese betreibenden Algen macht sie den Pflanzen näher verwandt als den Pilzen. Die Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheidet sich z.B. von den Pilzen dadurch, dass sie anstatt Chitin als Hauptbestandteil Cellulose enthält (Raven *et al.*, 2006). Ein weiteres Charakteristikum ist ein diploides unseptiertes und vielkerniges Myzel (Raven *et al.*, 2006). Im Rahmen der Arbeit umfasst der Begriff Fungizide trotzdem Wirkstoffe zur Bekämpfung von *Oomyceten* (Metalaxyl).

In der folgenden Tabelle (Tab. 1) werden die in der Arbeit verwendeten Fungizide und ihre charakteristischen Eigenschaften aufgezeigt.

Wirkstoff Handelspräparat	Strukturformel	Wirkmechanismus (Mode of action) und Target	Wirkstoff- gruppe	Kulturpflanzen	Indikationen	typische Applikations- art	Bemerkung	Markt- einführung	Literatur
Trifloxystrobin Twist SC 500		Atmungskette Komplex III cytochrom bc1 (Ubiquinol Oxidase)	QoI-Fungizide (Quinone outside inhibitors)	Getreide, Gemüse, Obst	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Cercospora beticola</i> ), Basidiomyceten, Oomyceten	Spritz- oder Sprüh- applikation	systemisch (geringe Systemizität im Vergleich zu anderen Strobilurinen); Hemmung der Sporen- keimung, Keimschlauch- verlängerung, Hyphen- wachstum; positive Auswirkungen auf Pflanzenphysiologie (greening effect); Bildung eines Wirkstoffdepots	2000	Anke, 1995; Margo <i>et al.</i> , 1998; Wong & Wilcox, 2001; Bartlett <i>et al.</i> , 2002; Sauter, 2007
Fluoxastrobin Fluoxastrobin FS 100		Atmungskette Komplex III cytochrom bc1 (Ubiquinol Oxidase)	QoI-Fungizide (Quinone outside inhibitors)	Getreide, Bananen, Zitrus, Kaffee	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Rhynchosporium</i> , <i>Pyrenophora spp.</i> ), Basidiomyceten, Deuteromyceten, Oomyceten	Spritz- oder Sprüh- applikation/ 1.tes Strobilurin zur Saatgut- behandlung	systemisch (hohe Xylem- Mobilität); protektiv, kurativ, Langzeitwirkung; Hemmung der Sporen- keimung, Keimschlauch- verlängerung, Hyphenwachstum; positive Auswirkungen auf Pflanzenphysiologie (greening effect);	2004	Anke, 1995; Margo <i>et al.</i> , 1998; Wong & Wilcox, 2001; Bartlett <i>et al.</i> , 2002; Dutzmann <i>et al.</i> , 2002; Sauter, 2007
Penflufen Penflufen FS 50		Atmungskette Komplex II Succinat- Dehydrogenase	SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors)	Kartoffel, Gemüse, Getreide	Ascomyceten, Basidiomyceten ( <i>Rhizoctonia solani</i> )	Spritz- oder Sprüh- applikation/ Saatgut- behandlung	systemisch; Hemmung der Sporenkeimung, Keimschlauch- verlängerung, Hyphenwachstum	2012	Rheinheimer, 2007; <a href="http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pending/fs_PC-100249_01-May-12.pdf">http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pending/fs_PC-100249_01-May-12.pdf</a>
Triadimenol Baytan FS 150		Sterolbiosynthese C14- $\alpha$ -Demethylase (erg11/cyp51)	Demethylierungs- Inhibitor (DMI) Klasse I	Getreide, Gemüse, Hopfen, Kaffee, Tabak	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Spaerotheca</i> , <i>Erysiphales</i> ), Basidiomyceten ( <i>Puccinia</i> ), Deuteromyceten	ursprünglich Saatgut- behandlung/ später Spritz- oder Sprüh- applikation bei Mono- und Dicotylen	systemisch; Hemmung der Keimschlauch- verlängerung, Infektions- strukturen;	1980	Steffens <i>et al.</i> , 1982; Thielert, 1984; Schneider, 1988
Tebuconazol Raxil FS 60		Sterolbiosynthese C14- $\alpha$ -Demethylase (erg11/cyp51)	Demethylierungs- Inhibitor (DMI) Klasse I	Getreide, Bananen, Kaffee	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Fusarium spec.</i> ), Basidiomyceten, Deuteromyceten	Spritz- oder Sprüh- applikation/ Saatgut- behandlung	systemisch; Hemmung der Keimschlauch- verlängerung, Infektions- strukturen; positive Auswirkungen auf Pflanzenphysiologie (greening effect)	1988	Mauler-Machnik, 1994; Hallmann <i>et al.</i> , 2007; Kuck & Vors, 2007

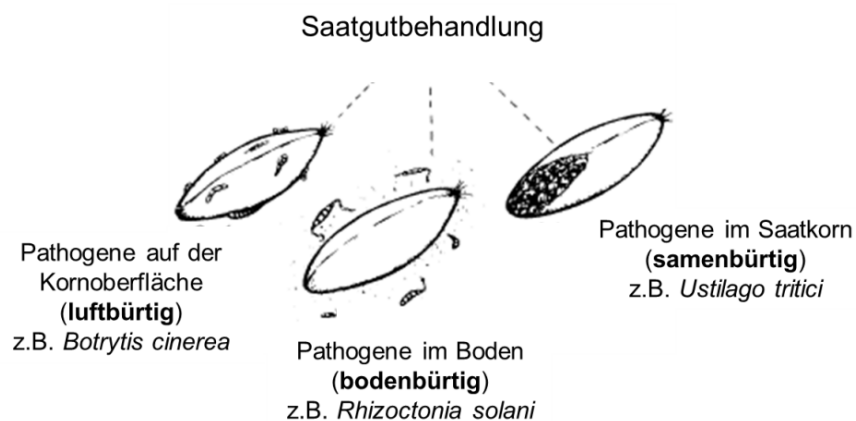
Wirkstoff Handelspräparat	Strukturformel	Wirkmechanismus (Mode of action) und Target	Wirkstoffgruppe	Kulturpflanzen	Indikationen	typische Applikationsart	Bemerkung	Markteinführung	Literatur
Prothioconazol Redigo FS 100		Sterolbiosynthese C14- $\alpha$ -Demethylase (erg11/cyp51)	Demethylierungs-inhibitor (DMI) Klasse I	Getreide, Raps, Gemüse	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Rhynchosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Septoria</i> ), Basidiomyceten, Deuteromyceten	Spritz- oder Sprüh-applikation/ Saatgut-behandlung	systemisch; Hemmung der Keimschlauchverlängerung, Infektionsstrukturen; positive Auswirkungen auf Pflanzenphysiologie (greening effect)	2004	Suty-Heinze & Dutzmann, 2004; Häuser-Hahn <i>et al.</i> , 2004; Hallmann <i>et al.</i> , 2007; Kuck & Vors, 2007
Ipconazol Vortex FS 452		Sterolbiosynthese C14- $\alpha$ -Demethylase (erg11/cyp51)	Demethylierungs-inhibitor (DMI) Klasse I	Reis, Raps, Baumwolle	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Fusarium moniliforme</i> ), Basidiomyceten, Deuteromyceten	Saatgut-behandlung	systemisch (geringere Mobilität als übrige Azol-Fungizide); Hemmung der Keimschlauchverlängerung, Infektionsstrukturen	1993	Eizuka <i>et al.</i> , 1994; Hallmann <i>et al.</i> , 2007; Kuck & Vors, 2007
Fludioxonil Celest FS 452		Signaltransduktion MAP/Histidin-Kinase in der osmotischen Signaltransduktion	Phenylpyrrol	Getreide, Reis, Gemüse	Breitspektrum: Ascomyceten ( <i>Botrytis cinerea</i> ), Basidiomyceten, Deuteromyceten/ keine Oomyceten!	Spritz- oder Sprüh-applikation/ Saatgut-behandlung	nicht-systemisch; protektiv; Hemmung der Sporenkeimung, Keimschlauchverlängerung, Myzelwachstum	1990	Ackermann <i>et al.</i> 2007
Thiram Pormasol WP 80		Multi-Site-Inhibitor, multi-site contact activity	Dithiocarbonate	Obst, Gemüse, Mais	Breitspektrum: Basidiomyceten, Ascomyceten ( <i>Peronospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> )	Spritz- oder Sprüh-applikation/ Saatgut-behandlung	Kontakt-Fungizid; protektiv; Hemmung der Sporenkeimung, Myzelwachstum	1948	Heitefuss, 2000; Sharma <i>et al.</i> , 2003; Celest-Dias, 2012
Metalaxyl Apron WS 35		Nukleinsäuresynthese wahrscheinlich: RNA Polymerase I	Phenylamid	Kartoffel, Tabak, Hopfen, Gemüse	Oomyceten ( <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Plasmopara viticola</i> )	Spritz- oder Sprüh-applikation/ Saatgut-behandlung	keine Wirkung gegen Pilze! hoch systemisch; protektiv; kurativ; Hemmung der Sporenkeimung, Myzelwachstum	1977	Schwinn & Margot, 1991; Lee <i>et al.</i> , 1999; Runno & Koppel, 2006; Sukul & Spittler, 2000

Die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln erfolgt je nach Pathogen, Präparat und Kulturpflanze mittels Spritz-, Boden- oder Saatgutbehandlung. Für den Erfolg der zu ergreifenden Maßnahmen zum Pflanzenschutz ist die Applikationstechnik von entscheidender Bedeutung. Es gilt, den Umweltauflagen zu entsprechen sowie den Bekämpfungserfolg sicherzustellen. Demnach muss die Applikation zielgerichtet und ohne Verluste z.B. durch Abdrift oder Abtropfen erfolgen (Heitefuss, 2000; Diercks & Heitefuss, 2002; Kunal & Sharma, 2012).

Die Bodenbehandlung mit Bodenfungiziden ist wegen des damit verbundenen Eingriffs in das Bodenleben nicht weit verbreitet und weitgehend auf gärtnerische Betriebe und Baumschulen begrenzt (Klodka *et al.*, 2004; Hallmann *et al.*, 2007).

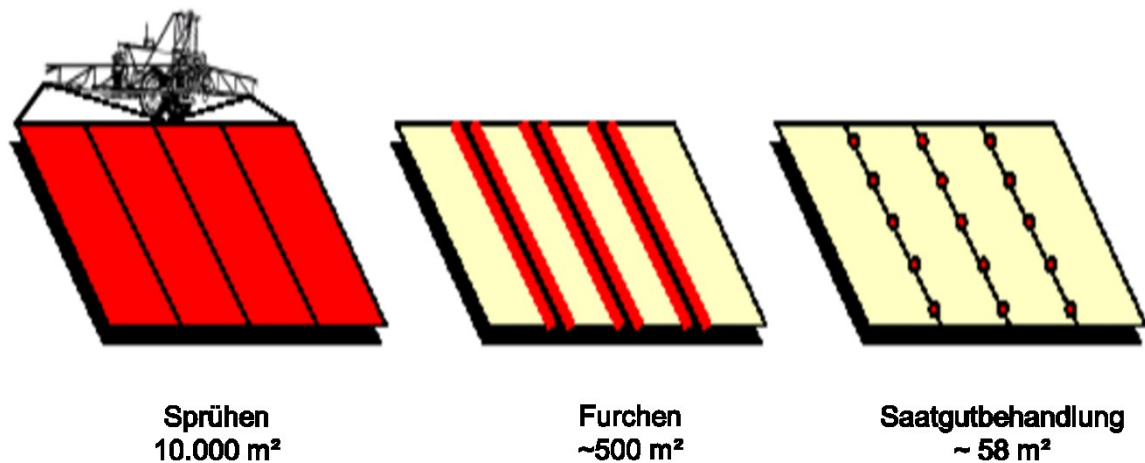
Für die Untersuchung des Einflusses von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze ist die Saatgutbehandlung besonders relevant, da die im Boden vorliegenden Pilze direkten Kontakt zum Fungizid haben können.

Im Hinblick auf eine ökologisch zielgenaue Krankheitsbekämpfung bietet die Saatgutbehandlung einen effektiven Schutz gegen samen-, boden- und luftbürtige Schaderreger (Abb. 5) (Fröhlich, 1991).



**Abb. 5: Indikationen der Saatgutbehandlung (Anonym, 2013)**

Im Vergleich zur Ganzflächenbehandlung durch Spritzung oder Bodenbehandlung wird die Bodenbelastung verringert, da mit einer viel geringeren Aufwandmenge ein hoher Grad der Wirksamkeit erreicht wird (Maack, 1977; Hallmann *et al.*, 2007; Börner, 2009). Bei einem bildlichen Vergleich von einem Hektar Land mit Flächen- oder Bodenapplikation eines Wirkstoffes ergeben sich 10.000 m<sup>2</sup> Land in Berührung mit dem Wirkstoff (Abb. 6). Eine Furchen-Applikation würde die exponierte Landfläche auf ca. 500 m<sup>2</sup> reduzieren. Bei einer Saatgutbehandlung würden nur 58 m<sup>2</sup> Land dem Wirkstoff ausgesetzt, wodurch die Belastung der Umwelt möglichst gering gehalten wird. Außerdem wird das Risiko von Auswirkungen auf zu verschonende Organismen sowie von Verwehungen (Drifts) reduziert (Anonym, 1999).



**Abb. 6: Mit Wirkstoff belastete Fläche (bezogen auf 1 ha Landfläche) bei verschiedenen Applikationstechniken (Puhl & Terhardt)**

Die Saatgutbehandlung bedeutet den Gebrauch und die Applikation biologischer, physikalischer oder chemischer Wirkstoffe und Techniken direkt am Saatgut und an den Pflanzen, um diese vor samen-, boden- und luftbürtigen sowie frührsaisonalen Krankheitserregern zu schützen. Ohne eine angemessene Kontrolle könnten diese Schadorganismen verheerende Folgen für die Pflanzenproduktion haben und zu Ertragsverlusten führen. In der Geschichte der Menschheit hatten Saatgutbehandlungsprodukte und ihre Anwendung eine große Bedeutung, die bis heute vorhanden ist. Die ersterwähnten Nutzungen der Saatgutbehandlung stammen aus dem ägyptischen und römischen Zeitalter. Neben der Behandlung von Schaderregern schafft die Saatgutbehandlung einen „Saatgut-Mehrwert“, der einen sicheren Aufruf der Pflanzen, Etablierung des Keimlings, Pflanzenbestand, Ertrag und Qualität der Ernte beinhaltet (Anonym, 1999).

Man unterscheidet die primäre Beizwirkung, bei der samenbürtige Krankheitserreger unmittelbar oder kurz nach der direkten Behandlung des Saat- und Pflanzgutes mit Wirkstoffen gehemmt werden, und die sekundäre Beizwirkung. Bei letzterer werden die Wirkstoffe nach der Aussaat oder Auspflanzung durch die Bodenfeuchtigkeit gelöst. Im umgebenden Boden entsteht durch Diffusion ein Beizhof, der einen Schutz gegen boden- oder luftbürtige Schaderreger auch noch nach der Keimlingsphase gewährt (Smiley *et al.*, 2002; Hallmann *et al.*, 2007).

### **1.3 Die Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices* und Inhibitoren der Synthese am Beispiel der Azol-Fungizide**

Sterole sind essentielle Bestandteile von Membranen, die in distinkte Domänen gegliedert werden. Spezielle Membrandomänen sind zum Beispiel „lipid rafts“, die als Organisationszentrum zellulärer Prozesse und der Signalweiterleitung sowie der Bildung von Signalmolekülen dienen (Schulze & Kierszniowska, 2010).



Arbuskuläre Mykorrhizapilze synthetisieren Sterole über den klassischen Mevalonsäure-Weg (Abb. 7), wie er von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist (Servouse *et al.*, 1984; Fontaine *et al.*, 2001; Grandmougin-Ferjani *et al.* 2005).



**Abb. 7: Postulierter Sterolbiosynthese-Weg in *Glomus intraradices* (Grandmougin-Ferjani *et al.* 2005)**

Im Gegensatz zu anderen Pilzen ist das Endprodukt der Sterolbiosynthese von arbuskulären Mykorrhizapilzen nicht das übliche Ergosterol, sondern 24-Methylcholesterol sowie 24-Ethylcholesterol (Beilby, 1980; Beilby & Kidby, 1980; Weete, 1989; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999; Fontaine *et al.*, 2001). Normalerweise ist das Vorkommen von 24-Ethylsterolen in Pilzen unüblich (Fontaine *et al.*, 2001). Dennoch wurden sie bei *Chytridiomycota* und *Hypohytridiomycota* identifiziert sowie ihr Vorkommen bei pathogenen

Pilzen wie Rostpilzen und dem *Ascomyceten Blumeria graminis f. sp. tritici* bestätigt (Lin *et al.*, 1973; Weete & Kelly, 1977; Weete, 1989; Kaneshiro *et al.*, 2000).

Trotz zahlreicher Informationen über die Sterol-Zusammensetzung in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices* ist wenig über Enzyme oder Gene bekannt, die in die Sterolbiosynthese der *Glomeromycota* involviert sind. Das bis heute einzige charakterisierte Enzym ist die C-4-Sterolmethyloxidase (*ERG25*), die die Abspaltung der 4 $\alpha$ -Methylgruppe zu Zymosterol katalysiert (Oger *et al.*, 2009).

Die Hemmung der Sterolbiosynthese durch Fungizide führt zur Hemmung jeglicher pilzlicher Wachstumsvorgänge, z.B. von Myzel oder Infektionshyphen (Hallmann *et al.*, 2007; Kuck & Vors, 2007). Für die Hemmung der Synthese sind mindestens drei Wirkorte bekannt, nach denen die einzelnen Wirkstoffe aus der Klasse der Sterolbiosynthese-Inhibitoren unterschieden werden (Tab. 2).

**Tab. 2: Wirkorte der Sterolbiosynthese-Inhibitoren (Hallmann *et al.*, 2007)**

DMI-Klasse	Wirkstoffgruppe	Eingriffsort	Beispiel
Klasse I	Demethylase-Inhibitoren	C <sub>14</sub> -Demethylase	Prothioconazol, Tebuconazol
Klasse II	Morpholine	$\Delta^{14}$ -Reduktase und $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -Isomerase	Fenpropimorph
Klasse III	Hydroxanilide	C <sub>3</sub> -Ketoreduktase	Fenhexamid

Die für die Landwirtschaft bedeutendste Klasse der Sterolbiosynthese-Inhibitoren sind die Demethylase-Inhibitoren oder Azol-Fungizide, von denen in den letzten 30 Jahren mehr als 30 Wirkstoffe in den Markt eingeführt wurden und breit eingesetzt werden (Kuck & Vors, 2007; Mehl & Stenzel, 2008). Das Target der Azol-Fungizide ist die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase (*ERG11/CYP51*) in der Sterolbiosynthese von Pilzen (Benveniste, 1986). Für die an der Sterolbiosynthese beteiligten Enzyme werden Abkürzungen statt systematische Namen verwendet. Dabei setzt sich die Enzymbezeichnung aus der Silbe *Erg* und einer Zahl zwischen 1 und 26 zusammen. Die korrespondierenden, kodierenden Gene dieser Enzyme werden in Großbuchstaben geschrieben (z.B. *ERG11*).

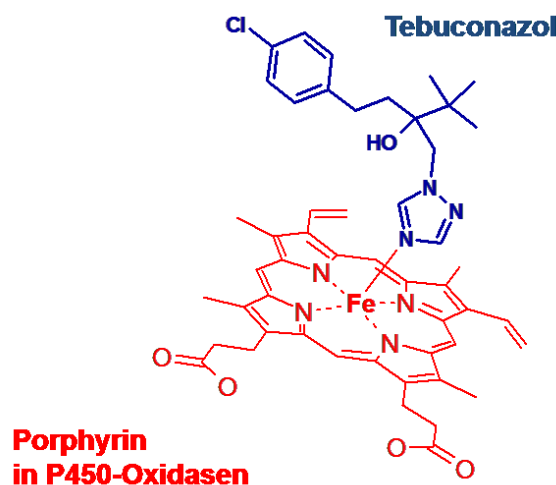
Die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase katalysiert die oxidative Entfernung der 14- $\alpha$ -Methylgruppe von Lanosterol oder Eburicol (Abb. 8).



**Abb. 8: Ausschnitt aus der Sterolbiosynthese von Pilzen am Wirkort der Azol-Fungizide (oxidative Entfernung der 14- $\alpha$ -Methylgruppe des Eburicol katalysiert durch die C14-Demethylase) (persönliche Mitteilung Tietjen, 2012)**

Das Protein CYP51 gehört zur Familie der Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme, die in allen Eukaryoten vorkommen (Burden *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1993). In den letzten 40 Jahren wurden die Enzyme ausführlich untersucht und dokumentiert (Fiecchi *et al.*, 1972; Mitropoulos *et al.*, 1976; Akhtar *et al.*, 1978; Galli-Kienle *et al.*, 1980; Trzaskos *et al.*, 1984, 1986 a, b; Yoshida & Aoyama, 1984; Kalb *et al.*, 1986; Kahn *et al.*, 1996; Aoyama *et al.*, 1998; Bellamine *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2011; Becher *et al.*, 2011).

Azol-Fungizide binden an Stelle des natürlichen Substrates Sauerstoff als sechster Ligand an das Fe-Atom des Häm im CYP51-Protein über das unprotonierte Stickstoff-Atom (Abb. 9) und besetzen das aktive Zentrum des Proteins, wodurch die Sterolbiosynthese gehemmt wird (Jecoate, 1978; Mullins *et al.*, 2011).



**Abb. 9: Bindung von Tebuconazol (blau) an das Fe-Atom des Häm im CYP51-Protein (rot) (persönliche Mitteilung Tietjen, 2012)**

Die Hemmung der Sterolbiosynthese lässt sich indirekt über die Untersuchung des *ERG11*-Genexpressionslevels bestimmen. Als Reaktion auf eine Sterolmangelsituation nach der Anwendung von Azol-Fungiziden ist die *ERG11*-Genexpression hochreguliert. Dies wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* sowie einigen *Candida*-Spezies wie *Candida albicans*, *Candida tropicalis* und *Candida glabrata* festgestellt (Dimster-Denk *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2000; Bammert & Fostel, 2000; Yu *et al.*, 2007).

### 1.4 Der Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze – Stand des Wissens

Die Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenschutzmitteln auf arbuskuläre Mykorrhizapilze gehen bis in die frühen 1960er Jahre zurück. In Abhängigkeit vom Wirkstoff und der Wirkstoffkonzentration sowie von der Applikationstechnik, der Pilzspezies und weiteren Faktoren wurden unterschiedliche Effekte festgestellt: dies kann bedeuten, dass es zu keiner Beeinflussung der Wurzelkolonisierung kommt oder positive oder negative Auswirkungen zu beobachten sind (Bailey & Safir, 1978; Ocampo & Hayman, 1980; Nemeč, 1980; Jabaji-Hare & Kendrick, 1985; Fitter, 1986; Habte & Majunath, 1992; Sukarno *et al.*, 1993; Land *et al.*, 1993; von Alten *et al.*, 1993).

Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zum Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze werden in der folgenden Tab. 3 zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 3: Zusammenfassung von publizierten Ergebnissen zum Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze**

Wirkmechanismus	Wirkstoff	Applikationsweise	Aufwandmenge	Art der Untersuchung	Pflanzen-spezies	Pilz-spezies	Effekt des Wirkstoffes auf den Pilz	Literatur
Inhibitoren der Atmungskette	Azoxystrobin, Kresoxim-methyl	Blattapplikation, Gießapplikation	Blattapplikation: 50 mg a.i./l; 500 mg a.i./l; 5000mg a.i./l; Gießapplikation: 50 mg a.i./kg Sand	Gewächshaus	Mais	<i>Glomus coronatum</i>	Blattapplikation: Reduktion der Kolonisierung vor Etablierung der Symbiose, kein Effekt wenn Symbiose etabliert war; Gießapplikation: Reduktion der Wurzelkolonisierung	Diedhiou <i>et al.</i> , 2004
	Azoxystrobin	Gießapplikation	1,5 ml/l	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Hernández-Dorrego & Parés, 2010
Inhibitoren der Sterolbiosynthese (SBI)	Propiconazol	Gießapplikation	0,25 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Erbse	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus invermaium</i> , <i>Glomus claroideum</i>	Kein Effekt	Kling & Jacobsen, 1997
		Gießapplikation	0,21 µg a.i./g Boden; 21 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Gurke	<i>Glomus caledonium</i>	Kein Effekt	Kjoller & Rosendahl, 2000
	Wirkstoff im Medium	0,02 ppm; 2 ppm; 20 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Chicorée	<i>Glomus irregulare</i>	Kein Effekt auf die Sporenproduktion (0,02 ppm), Hemmung der Sporenproduktion (0,2 ppm; 2 ppm); Reduktion der Kolonisierung (0,2 ppm; 2 ppm); Veränderung der Sterol-Zusammensetzung	Calonne <i>et al.</i> , 2010; 2012	
	Penconazol	Gießapplikation	0,4 ml/l	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Hernández-Dorrego & Parés, 2010
	Ciproconazol	Gießapplikation	0,2 g a.i./l	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Hernández-Dorrego & Parés, 2010
	Fenhexamid	Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm; 20 ppm; 200 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Möhre	<i>Glomus intraradices</i>	Kein Effekt auf Wurzelkolonisierung; kein Effekt auf Sporenkeimung (0,2 ppm); Hemmung der Sporenkeimung (2 ppm; 20 ppm; 200 ppm)	Zocco <i>et al.</i> , 2008
	Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Chicorée	<i>Glomus intraradices</i>	Kein Effekt auf die Sterolmenge in extraradikalem Myzel	Oger <i>et al.</i> , 2009	
	Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Klee	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus irregulare</i>	Kein Effekt	Zocco <i>et al.</i> , 2010	

Wirkmechanismus	Wirkstoff	Applikationsweise	Aufwandmenge	Art der Untersuchung	Pflanzen-spezies	Pilz-spezies	Effekt des Wirkstoffes auf den Pilz	Literatur
Inhibitoren der Sterolbiosynthese (SBI)	Fenpropimorph	Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm; 20 ppm; 200 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Möhre	<i>Glomus intraradices</i>	Kein Effekt auf Wurzelkolonisierung; kein Effekt auf Sporenenkeimung (0,2 ppm); Hemmung der Sporenenkeimung (2 ppm; 20 ppm; 200 ppm)	Zocco et al., 2008
		Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Chicorée	<i>Glomus intraradices</i>	Reduktion der Sterolmenge in extraradikalem Myzel; Zunahme der Genexpressionslevel von ERG25	Oger et al., 2009
		Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm; 20 ppm; 200 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Chicorée	<i>Glomus intraradices</i>	Hemmung der Sporenproduktion; Kein Effekt auf Wurzelkolonisierung; Veränderung der Sterol-Zusammensetzung	Campagnac, 2009
		Wirkstoff im Medium	0,2 ppm; 2 ppm	<i>in vitro</i> (Bi-Kompartiment-System)	Klee	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus irregulare</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Zocco et al., 2010
Inhibitoren der Signaltransduktion	Fludioxonil	Saatgutbehandlung	0,07 g a.i./kg seed	Feldversuch	Soja	?	Steigerung der Wurzelkolonisierung	Murillo-Williams & Pederson, 2005, 2008
Multi-site-Inhibitor (multi-site contact activity)	Thiram	Gießapplikation	0,5 g a.i./kg Boden; 1 g a.i./kg Boden; 2 g a.i./kg Boden	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i>	Reduktion und Steigerung der Kolonisierung (in Abhängigkeit von Bodenzusammensetzung)	Perrin & Plenchette, 1993
		Saatgutbehandlung, Gießapplikation	0,5 g a.i./kg seeds bis 2 g a.i./kg seeds; 75 ml/m <sup>2</sup>	Feldversuch	Erdnuss	?	Reduktion der Kolonisierung	Sugavanam, 1994
		Saatgutbehandlung	?	Gewächshaus	Mais, Tomate, Zucchini, Melone	<i>Glomus intraradices</i>	Kein Effekt	Burrows & Ahmed, 2007
		Gießapplikation	3 g a.i./l	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Hernández-Dorrego & Parés, 2010
	Anilazine 50W	Spritzapplikation	0,6 g a.i./m <sup>2</sup>	Gewächshaus, Feldversuche	Gräser	<i>Glomus microcarpus</i> , <i>Glomus macrocarpus</i> , <i>Glomus tenuis</i>	Applikation nach 4,6 und 8 Wochen der Aussaat: Reduktion der Kolonisierung; Applikation nach 16, 18 und 20 Wochen der Aussaat: kein Einfluss	Rhodes & Larsen, 1981
	Maneb 80W	Spritzapplikation	1 g a.i./m <sup>2</sup>	Gewächshaus und Feldversuche	Gräser	<i>Glomus microcarpus</i> , <i>Glomus macrocarpus</i> , <i>Glomus tenuis</i>	Applikation nach 4,6 und 8 Wochen der Aussaat: Reduktion der Kolonisierung; Applikation nach 16, 18 und 20 Wochen der Aussaat: kein Einfluss	Rhodes & Larsen, 1981
	Captan	Gießapplikation	empfohlene Aufwandmenge	Gewächshaus	Gurke, Mais	<i>Glomus etunicatum</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Dehne, 1986
Gießapplikation		100 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus caledonicum</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Kough et al., 1987	
Inhibitoren der Nucleinsäuresynthese	Metalaxyl	Gießapplikation	empfohlene Aufwandmenge	Gewächshaus	Gurke, Mais	<i>Glomus etunicatum</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Dehne, 1986
		Gießapplikation	125 mg a.i./kg/Boden; 31,3 mg a.i./kg/Boden; 50 mg a.i./kg/Boden	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus spp.</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Sukarno et al. 1993
		Gießapplikation	0,0125 g a.i./kg Boden	Gewächshaus	Mais	<i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus macrocarpum</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	Kein Effekt	Seymour et al., 1994
		Bodenapplikation vor Aussaat	0,5 ppm; 1 ppm; 2,5 ppm	Gewächshaus	Weizen	<i>Glomus fasciculatum</i>	Kein Effekt (0,5 ppm; 1 ppm); Reduktion der Wurzelkolonisierung (2,5 ppm)	Shetty & Magu, 1997

Wirkmechanismus	Wirkstoff	Applikationsweise	Aufwandmenge	Art der Untersuchung	Pflanzen-spezies	Pilz-spezies	Effekt des Wirkstoffes auf den Pilz	Literatur
Inhibitoren der Nukleinsäuresynthese	Metalaxyl	Bodenapplikation vor Aussaat	20 g/m <sup>2</sup>	Gewächshaus	Pfirsich	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Fontanet <i>et al.</i> , 1998
		Gießapplikation	1 g a.i./m <sup>2</sup> ; 2 g a.i./m <sup>2</sup>	Feldversuch (3 Versuchsfelder)	Zitrone	?	Kein Effekt auf 2 Versuchsfeldern; Reduktion der Wurzelkolonisierung auf einem Versuchsfeld	Carrenho <i>et al.</i> , 2000
		Gießapplikation, Spritzapplikation	0,02 g a.i./m <sup>2</sup>	Gewächshaus	Mais	<i>Glomus spp.</i>	kein Effekt bei Spritzbehandlung, wenn Symbiose bereits etabliert ist; Reduktion der Wurzelkolonisierung bei Gießapplikation	Feldmann, 2001
		Gießapplikation	1,2 ml/l	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Hernández-Dorrego & Parés, 2010
	Metalaxyl + Tebuconazol (SBI)	Saatgutbehandlung	2,4 ml/kg (Formulierung)	Gewächshaus	Mais, Tomate, Zucchini, Melone	<i>Glomus intraradices</i>	Kein Effekt	Burrows & Ahmed, 2007
Inhibitoren der Mitose und Zellteilung	Carbendazim	Gießapplikation	0,5 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Erbse	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus invermaium</i> , <i>Glomus claroideum</i>	Hemmung der SDH-Aktivität im Myzel	Kling & Jacobsen, 1997
		Wirkstoff im Medium	0,01 µl/ml bis 250 µl/ml	in vitro	?	<i>Glomus mosseae</i>	ab 0,1 µl a.i./ml Hemmung der Sporenkeimung	Venedikian <i>et al.</i> , 1999
		Gießapplikation	0,6 l/ha; 3 l/ha; 5 l/ha	Gewächshaus	Soja	<i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Venedikian <i>et al.</i> , 1999
		Gießapplikation	2,85 l/ha (2mg a.i./kg Boden)	Feld	Pfeffer	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Ipsilantis <i>et al.</i> , 2011
		Gießapplikation	0,05%; 0,1%	Gewächshaus	Apfel	<i>Glomus spp.</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Bharat, 2011
	Benomyl	Spritzapplikation	0,3 g a.i./m <sup>2</sup>	Gewächshaus, Feldversuche	Gräser	<i>Glomus microcarpus</i> , <i>Glomus macrocarpus</i> , <i>Glomus tenuis</i>	Applikation nach 4,6 und 8 Wochen der Aussaat: Reduktion der Kolonisierung; Applikation nach 16, 18 und 20 Wochen der Aussaat: kein Einfluss	Rhodes & Larsen, 1981
		Gießapplikation	100 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Lauch	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus caledonicum</i>	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Kough <i>et al.</i> , 1987
		Wirkstoff im Medium	0,001 µg/ml bis 21,25 µg/ml	in vitro	-	<i>Glomus mosseae</i>	ab 1 µg a.i./ml Hemmung der Sporenkeimung	Chiocchio <i>et al.</i> , 2000
		Gießapplikation	1,25 g a.i./m <sup>2</sup>	Feldversuch	Gräser	?	Reduktion der Wurzelkolonisierung	Smith <i>et al.</i> , 2000
		Gießapplikation	1 µg a.i./g Boden; 100 µg a.i./g Boden	Gewächshaus	Gurke	<i>Glomus caledonium</i>	Kein Effekt	Kjoller & Rosendahl, 2000

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Informationen zum Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze sind weitgehend auf die Bodenbehandlung oder auf *in vitro* Untersuchungen begrenzt. Die aufgewendeten Wirkstoffmengen entsprechen im Falle hoher Dosierungen nicht den praxisrelevanten Konzentrationen.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss ausgewählter Fungizide auf *Glomus intraradices* systematisch und statistisch aussagekräftig zu untersuchen. Die Auswirkungen der Fungizidanwendung sollten dabei in einer schrittweisen Annäherung vom artifiziellen direkten Kontakt über die

Saatgutbehandlung in kleinen Pflanzgefäßen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen bis hin zu Versuchen in Großcontainern unter Freilandbedingungen systematisch untersucht werden.

Darüber hinaus sollte der Einfluss der Fungizide auf verschiedene Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices* berücksichtigt werden.

Am Beispiel der für die Landwirtschaft bedeutenden Azol-Fungizide sollten vertiefende Untersuchungen zu ihrer Wirkung auf *Glomus intraradices* durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fungizide

Die in der Arbeit verwendeten Fungizide einschließlich des Oomycetenwirkstoffes Metalaxyl und die entsprechenden Handelspräparate sind Tab. 4 zu entnehmen. Die Aufwandmengen g a.i./dt (a.i. = active ingredient/Wirkstoff) entsprachen den praxisüblichen Wirkstoffmengen für die Saatgutbehandlung von Gerste.

**Tab. 4: Fungizid-Aufwandmengen (g a.i./dt) für die Saatgutbehandlung von Gerste**

Wirkstoff	Handelspräparat	Aufwandmenge	Hersteller
Trifloxystrobin	Twist SC 500	5 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Fluoxastrobin	Fluoxastrobin FS 100	7,5 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Penflufen	Penflufen FS 50	5 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Triadimenol	Baytan FS 150	37 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Tebuconazol	Raxil FS 60	3 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Prothioconazol	Redigo FS 100	10 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Ipconazol	Vortex FS452	2,5 g a.i./dt	Kureha AgroChemicals, Japan
Fludioxonil	Celest FS 25	5 g a.i./dt	Syngenta Agro GmbH, Maintal
Thiram	Pomarsol WP 80	80 g a.i./dt	BayerCropScience AG, Monheim am Rhein
Metalaxyl	Apron WS 35	2,5 g a.i./dt	Syngenta Agro GmbH, Maintal

#### 2.1.1 Saatgutbehandlung

Zur Saatgutapplikation einer Laborformulierung auf Gerstensaatgut wurden die Wirkstoffe in den praxisüblichen Aufwandmengen abgewogen und im Lösungsmittel NMP (N-Methyl-2-Pyrrolidon) gelöst. Pro 1 mg Wirkstoff wurden 10 µl NMP verwendet. Anschließend wurde die Laborformulierung in einem Mischbecher vorgelegt, das Saatgut hinzugegeben und für ca. zwei Minuten geschüttelt, bis es sich gleichmäßig auf dem Saatgut verteilt hatte. Die Flüssigkeitsaufwandmenge betrug 100 µl Laborformulierung pro 10 g Saatgut. Das verwendete Volumen des Lösungsmittels NMP war in allen Varianten gleich hoch. Zur Saatgutbehandlung mit dem formulierten Handelspräparat wurde die aufzuwendende Präparatmenge im Mischbecher vorgelegt, Wasser mit der Flüssigkeitsaufwandmenge von 100 µl pro 10 g Saatgut hinzugegeben und wie beschrieben verfahren. Wenn nicht anders angegeben, wurde das gebeizte Saatgut innerhalb weniger Stunden verwendet.



### 2.1.2 Gießapplikation

Zur Applikation der Fungizide als Gießbehandlung wurde für jeden Wirkstoff eine 1000 ppm Stammlösung mit 10 mg Wirkstoff in 10 ml NMP angesetzt. Die Stammlösungen wurden für die Applikation jeweils in einem Liter Wasser auf eine Endkonzentration von 0,5 ppm (0,5 ml) oder 5 ppm (5 ml) verdünnt.

## 2.2 Pilzmaterial

### 2.2.1 *Glomus intraradices* Sporen

Für den *in vitro* Sporenceimtest wurden *Glomus intraradices* Sporen der Firma Amykor GmbH verwendet. In der Sporenstammlösung waren 35.700 Sporen pro Milliliter wässriger 0,5 %iger Alginatlösung enthalten. Die Stammlösung wurde kurz vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf die benötigte Sporenkonzentration pro Milliliter verdünnt. In den übrigen *in vitro* Versuchen wurde der *Glomus intraradices*-Stamm DAOM197198 verwendet.

### 2.2.2 Mykorrhiza-Inokulum (Vaminoc<sup>®</sup>)

Laut Hersteller (Andermatt Biocontrol AG, Schweiz) setzte sich das für die Gewächshausversuche verwendete Inokulum wie folgt zusammen: *Glomus intraradices* mit 100 cfu/g und 98% Vermiculit als Trägermaterial. Es enthielt keimfähige Sporen und Myzel von *Glomus intraradices*. Für eine Mykorrhizierung der Versuchspflanzen wurde das Inokulum mit einer Dosierung von 10 g/l Substrat vermischt.

## 2.3 Pflanzenmaterial

### 2.3.1 Wurzelkulturen

Für das Arbeiten mit dem monoxenischen Wurzelkultur-System wurden transformierte Chicorée-Wurzeln (*Cichorium intybus*), die mit *Glomus intraradices* (DAOM197198) kolonisiert waren, verwendet.

### 2.3.2 Saatgut

Für alle Gewächshausversuche und Großcontainer-Versuche der Winterperiode wurde die Wintergerstensorte „Duet“ verwendet (Partie 3103; Erntejahr 2008). Für die Durchführung der Großcontainer-Versuche in der Sommerperiode wurde die Sommergerstensorte „Beatrix“ (Partie 3105; Erntejahr: 2008) verwendet.

## 2.4 Medien, Puffer- und Färbelösungen

### 2.4.1 M-Medium (Nährstoff-Medium)

**Tab. 5: Nährstoffkonzentration des M-Mediums zur *in vitro* Kultivierung von Chicorée-Wurzelkulturen und *Glomus intraradices* Sporen (Declerck *et al.*, 1998, modifiziert nach Strullu & Romand, 1986)**

	eingesetztes Volumen	Konzentration	
		Stammlösung [g/l]	Ziellösung [mg/l]
<b>Makroelemente (1)</b>	<b>10 ml/l</b>	<b>100x</b>	<b>1x</b>
KNO <sub>3</sub>		8	80
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O		73,1	731
KCl		6,5	65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,48	4,8
<b>Makroelemente (2)</b>	<b>10 ml/l</b>	<b>100x</b>	<b>1x</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O		28,8	288
<b>Mikroelemente (1)</b>	<b>1 ml/l</b>	<b>1000x</b>	<b>1x</b>
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O		6	6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		1,5	1,5
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O		2,65	2,65
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O		0,0024	0,0024
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O		0,13	0,13
<b>Mikroelemente (2)</b>	<b>1 ml/l</b>	<b>1000x</b>	<b>1x</b>
KI		0,75	0,75
<b>Fe-EDTA</b>	<b>10 ml/l</b>	<b>100x</b>	<b>1x</b>
NaFe-EDTA		0,8	8
<b>Vitamine</b>	<b>10 ml/l</b>	<b>100x</b>	<b>1x</b>
Glycin		0,3	3
Myoinositol		5	50
Nikotinsäure		0,05	0,5
Pyridoxin HCl		0,01	0,1
Thiamin HCl		0,01	0,1

Die Stammlösungen des M-Mediums wurden entsprechend den Angaben der Tab. 5 in einem Liter Wasser zusammenpipettiert und anschließend mit Kaliumhydroxid-Lösung (0,1 M) bzw. Salzsäure (0,1 M) auf den pH-Wert 5,5 eingestellt. Nach Zugabe von 1,5 g/l Gel-Gro<sup>TM</sup> wurde das Medium bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. War das Medium auf 60°C heruntergekühlt konnte es verwendet werden. Zur Verwendung als flüssiges Nährmedium wurde kein Gel-Gro<sup>TM</sup> hinzugefügt.

### 2.4.2 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Für einen Liter Phosphatpuffer wurden 8 g Natriumchlorid (NaCl), 0,2 g Kaliumchlorid (KCl) sowie 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in Wasser<sub>bidest</sub> gelöst und der pH Wert auf 7,4 eingestellt. Im Anschluss wurde die Pufferlösung bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert.

### 2.4.3 MTT-Lösung

1 mg MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] wurde in 1 ml Phosphatpuffer (PBS) gelöst und die Lösung frisch verwendet.

### 2.4.4 NBT-Stammlösungen

0,2 M Tris/HCl (pH 7,4)	2,5 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 ml
1,1 M Na-Succinat	2,5 ml

Die Stammlösungen wurden in 4 ml Wasser zusammenpipettiert, 10 mg NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chlorid) hinzugefügt und solange gemischt, bis das NBT vollständig gelöst war.

### 2.4.5 Konservierung von Wurzelproben in Ethanol-Essigsäure

Gesäuberte Wurzelproben wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und in einem Ethanol-Essigsäure-Gemisch (3:1) konserviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Wurzelproben bei 4°C dunkel gelagert.

### 2.4.6 Lactoglycerol-Trypanblau-Lösung (0,04 %)

300 ml Milchsäure, 300 ml Glycerin, 300 ml Wasser<sub>bidest</sub> und 100 ml Trypanblau-Lösung (0,4 %) wurden gut miteinander vermischt.

### 2.4.7 Hefewachstumsmedien (nach Sherman, 2002)

YPD-Medium (Vollmedium)	1% Yeast Extract	10 g/l
	2% Pepton	20 g/l
	2% Glucose	20 g/l
YPD-Platten (Vollmedium)	+ 2% Agarose	20 g/l
SD-Medium (Minimalmedium)	10x Yeast Nitrogen Base	6,7 g/l
	2% Glucose	20 g/l
	10x Aminosäuren-Mix	10 ml/l
SD-Platten (Minimalmedium)	+ 2% Agarose	20 g/l
Aminosäuren-Mix (10x)	Leucin	30 mg/100ml
	Tryptophan	20 mg/100ml
	Histidin	20 mg/100ml
	Lysin	30 mg/100ml
	Adenin	20 mg/100ml

## 2.5 Substrate und Ackererde

### 2.5.1 Substrat zur Anzucht von Gerstenpflanzen

Die Anzucht der Gerstenpflanzen erfolgte in einem nährstoffarmen Substratgemisch aus Quarzsand und Perlite. Die Bestandteile wurden zu gleichen Teilen mit einem 10 %igen Wasseranteil (Volumen) miteinander vermischt.

### 2.5.2 Lamstedt Ton für Hydrokultur

Zum Abdecken des Saatguts und zum Schutz vor Algenbildung wurde Leca-Ton (Leca – lightweight expanded clay aggregate) verwendet. Dieser hatte einen pH-Wert von 9,1 und einen Salzgehalt von 0,16 g/l.

### 2.5.3 Ackererde

Die für die Großcontainer-Versuche verwendete Ackererde stammte aus der Region Monheim am Rhein. Die Erde wurde durch die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt NRW (LUFÄ) auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Pro 100 g Erde waren 25 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sowie 16 mg K<sub>2</sub>O enthalten, was einem Nährstoffgehalt der Klasse D entspricht und somit hoch einzuordnen ist. Der pH-Wert lag bei 7,5. Des Weiteren lag ihr Humusgehalt bei 2,2 %. Molekularbiologische Analysen zur Spezies-Bestimmung von Mykorrhizapilzen in der Ackererde ergaben, dass 98 % *Glomerales* und 2 % *Diversisporales* vorhanden waren. Die Untersuchungen wurden extern von Prof. Paola Bonfante und ihren Mitarbeitern der Universität Turin in Italien durchgeführt.

## 2.6 Nährstoffversorgung

### 2.6.1 Hoagland-Lösung

Die Nährstoffversorgung der Gerstenpflanzen in allen Gewächshausversuchen (Abschnitt 2.8) bestand aus einer modifizierten Hoagland-Lösung (Arnon & Hoagland, 1940). Neben der wöchentlichen Wassergabe wurden zudem 50 ml der modifizierten Hoagland-Lösung mit einer Phosphatkonzentration von 20 µM gegossen. Die Konzentrationen der übrigen Komponenten wurden im Vergleich zum Standardprotokoll halbiert. Eine Hoagland-Lösung enthält alle für ein schnelles Wachstum erforderlichen mineralischen Elemente in der höchstmöglichen Konzentration, ohne dass es bei den Pflanzen zur Ausbildung toxischer Symptome oder zu Anzeichen von Salzstress kommt (Taiz & Zeiger, 2000).

**Tab. 6: Nährstoffversorgung der Gerstenpflanzen in Gewächshausversuchen mit Hoagland-Lösung (modifiziert nach Arnon & Hoagland, 1940)**

Verbindung	Konzentration der Stammlösung [mM]	Volumen für 1l Hoaglandlösung [ml]	Konzentration der Endlösung [mM]
MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	9,14	0,5	0,0046
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000	0,02	0,0200
ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	0,76	0,5	0,0004
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	11,85	0,5	0,0059
CuSO <sub>4</sub> *5 H <sub>2</sub> O	0,32	0,5	0,0002
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	0,12	0,5	0,0001
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	1000	1	1,0000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O	1000	2,5	2,5000
KNO <sub>3</sub>	1000	2,5	2,5000
Fetrilon 13%	46,5	5	0,2325

### 2.6.2 Stickstoffdünger (KAS – Kalkammonsalpeter)

Der für Großcontainer-Versuche verwendete Stickstoffdünger KAS bestand aus einer Mischung von 26% Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat und 10% Calcium in Form von Calciumcarbonat. Die Stickstoffdüngung erfolgte in einer Menge von 30 g/m<sup>2</sup>.

## 2.7 *in vitro* Versuche

### 2.7.1 *in vitro* Sporenkeimtest mit *Glomus intraradices*

Zur Untersuchung des direkten Effektes von Fungiziden auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* wurde *in vitro* ein Sporenkeimtest durchgeführt. Dafür wurden zwei Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurde der Wirkstoff im Nährmedium (Abschnitt 2.4.1) vor dem Aushärten verteilt und 20–30 Sporen gleichmäßig aufgetragen. Zum anderen wurde der Wirkstoff auf Gerstensaatzgut appliziert und dieses leicht ins feste Medium hineingedrückt, sodass die Hälfte des Korns vom Medium umhüllt war. Die Sporen wurden im Anschluss mit 1 cm Abstand zum Korn auf die Oberfläche des Mediums gegeben.

Die Keimung der Sporen auf wirkstoffhaltigem Medium erfolgte in 24 Well Platten. Pro Well wurden 2 ml handwarmes M-Medium pipettiert. Im Anschluss wurden die entsprechenden Wirkstoffe, die in einer Endkonzentration von 1 % Methanol gelöst waren, in den Verdünnungen 10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M sowie 10<sup>-7</sup> M zugefügt (Tab. 7).

Tab. 7: Endkonzentration (ppm) der Wirkstoffe im Nährmedium (M-Medium)

Wirkstoff	Molekulargewicht (g/mol)	Endkonzentration (ppm)			
		$10^{-4}\text{M}$	$10^{-5}\text{M}$	$10^{-6}\text{M}$	$10^{-7}\text{M}$
Trifloxystrobin	408,37	40,84	4,84	0,48	0,05
Fluoxastrobin	458,83	45,88	4,58	0,45	0,05
Penflufen	317,40	31,74	3,17	0,31	0,03
Triadimenol	295,77	29,58	2,95	0,29	0,03
Tebuconazol	307,82	30,78	3,07	0,30	0,03
Prothioconazol	344,26	34,43	3,40	0,34	0,03
Ipconazol	667,72	66,77	6,67	0,66	0,06
Fludioxonil	248,19	24,82	2,48	0,24	0,02
Thiram	240,44	24,04	2,40	0,24	0,02
Metalaxyl	279,33	27,93	2,79	0,27	0,03

Pro Platte wurden jeweils vier Wells mit der gleichen Wirkstoffkonzentration belegt, sodass ein Wirkstoff in vier verschiedenen Konzentrationen auf einer Platte getestet werden konnte (Abb. 10). Als Kontrollen dienten das reine M-Medium und das Strigolakton-Analog GR24 ( $10^{-7}\text{M}/0,03\text{ mg/l}$ ).

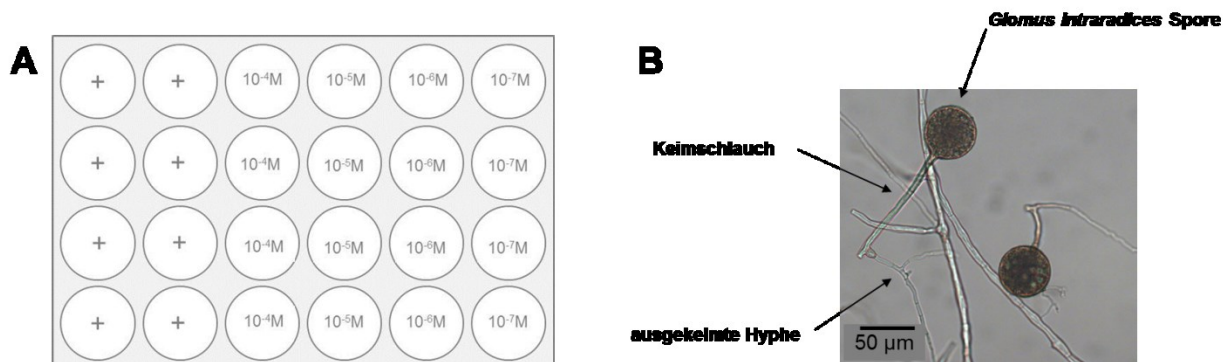
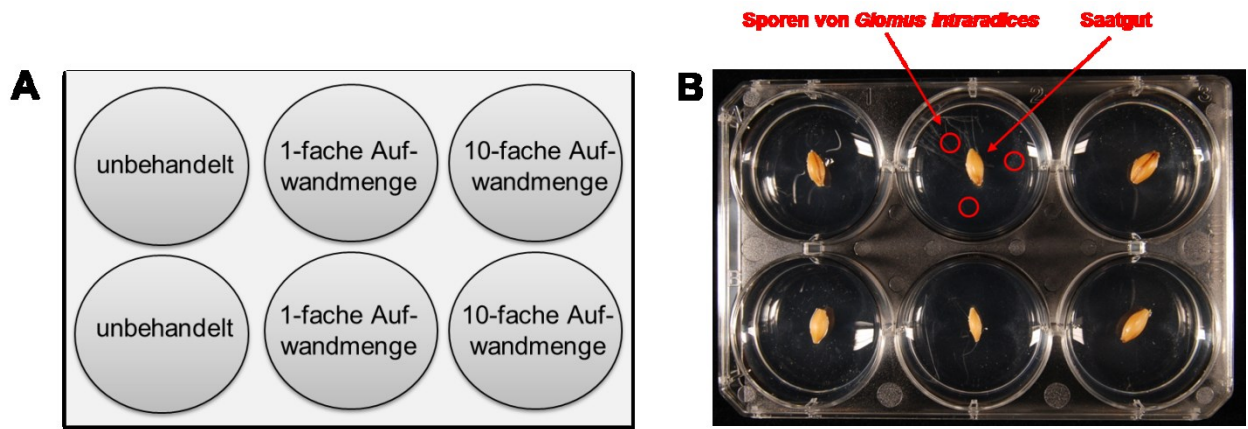


Abb. 10: A) Belegung der 24 Well Platte mit M-Medium als Kontrolle (+) und vier Wirkstoffkonzentrationen ( $10^{-4}\text{ M}$ ,  $10^{-5}\text{ M}$ ,  $10^{-6}\text{ M}$ ,  $10^{-7}\text{ M}$ ); B) Stereomikroskop-Aufnahme gekeimter *Glomus intraradices* Sporen in 10-facher Vergrößerung

Nach vollständiger Aushärtung des Mediums wurden die *Glomus intraradices* Sporen aufgetragen und die Platten verschlossen bei  $27^{\circ}\text{C}$  dunkel inkubiert.

Um den Einfluss der Fungizide, die auf das Saatgut appliziert wurden, auf die Sporenkeimung zu untersuchen, wurden 6 Well Platten verwendet, da diese einen größeren Well-Durchmesser für das Saatgut boten. Die Wells waren mit 6 ml festem Medium gefüllt (Abb. 11). Die Wirkstoffe wurden in der praxisüblichen sowie der zehnfach erhöhten Aufwandmenge (Tab. 4) in NMP gelöst und anschließend auf Gerstensaatgut appliziert (Abschnitt 2.1.1). Um eine Keimung des Saatguts zu verhindern sowie zur Saatgutsterilisation, wurde dieses zuvor für 15 Minuten bei  $121^{\circ}\text{C}$  autoklaviert. Pro Well wurde ein Saatkorn leicht in das Nährmedium hineingedrückt und im Anschluss die Sporen mit 1 cm Abstand zum Korn auf das Medium gegeben (ca. 20–30 Sporen, verteilt auf drei Punkte). Die Platten wurden bei  $27^{\circ}\text{C}$  dunkel inkubiert.



**Abb. 11: A) Belegung der 6 Well-Platte mit unbehandeltem und behandeltem Saatgut; B) Position des Saatguts und der Sporen von *Glomus intraradices* im M-Medium**

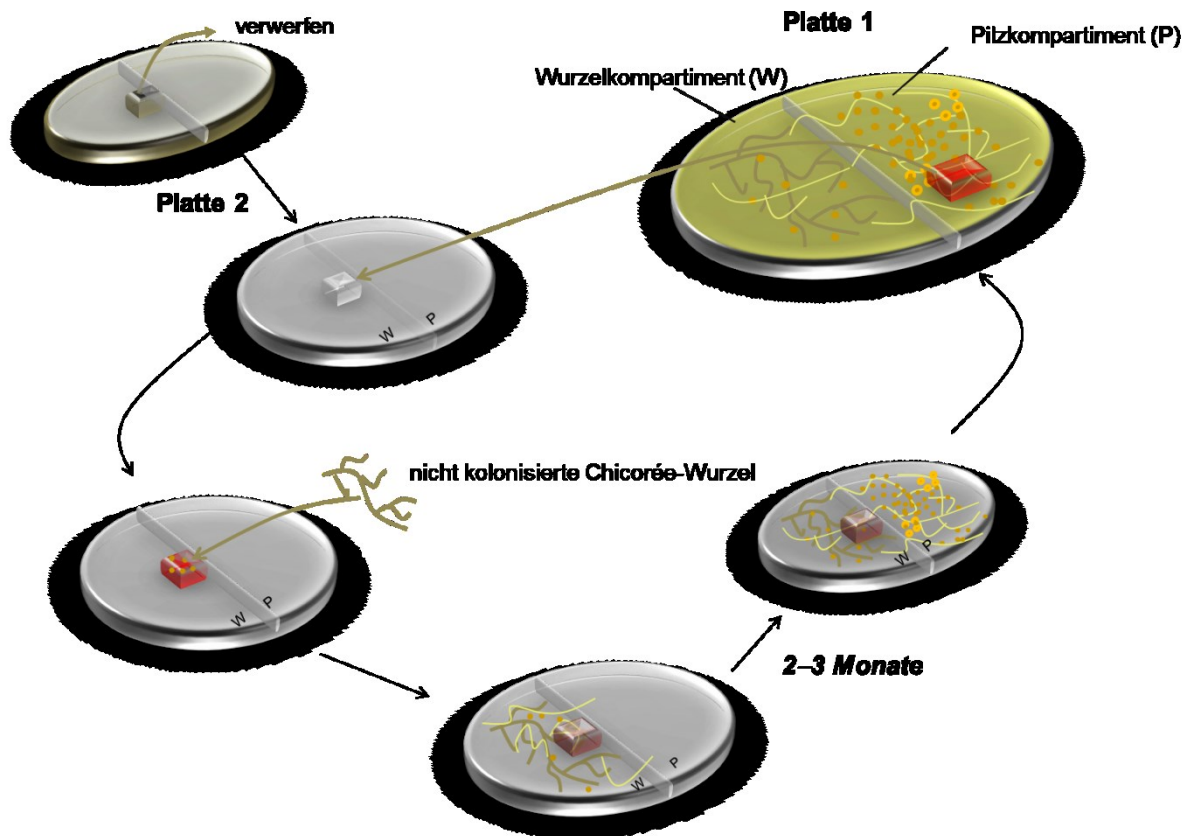
In beiden Versuchsreihen wurden jeweils drei Wiederholungsplatten pro Wirkstoff angesetzt und die Versuche zu drei verschiedenen Zeitpunkten unabhängig voneinander wiederholt. Die Sporenkeimrate wurde unter Zuhilfenahme des Stereomikroskops täglich bestimmt. Die Auswertung fand bis maximal 28 Tage nach Versuchsansatz statt.

Eine Spore galt als gekeimt, sobald der Keimschlauch sichtbar war. Zur Bestimmung der Sporenkeimrate wurde der Anteil gekeimter Sporen zur Gesamtzahl Sporen in einem Well ins Verhältnis gesetzt.

Nicht gekeimte Sporen wurden mit Wasser vom Medium abgewaschen, auf frisches M-Medium transferiert und erneut bei 27°C inkubiert. An den darauffolgenden Tagen (bis Tag 10) wurde täglich die Sporenkeimrate bestimmt.

### 2.7.2 Etablierung und Verwendung des monoxenischen Wurzelkultur-Systems

Bei der monoxenischen Kultur handelt es sich um die Kultivierung eines Organismus in Gegenwart eines weiteren bestimmten Organismus (Mikroskopische Nachrichten, 1994). Zur Etablierung eines solchen Systems wurde mit Zweikompartiment-Platten (Ø 9 cm) unter sterilen Bedingungen gearbeitet (Abb. 12). Eine Plastikwand trennt in diesem System den Wurzelteil vom pilzlichen Teil. Beide Kompartimente wurden mit ca. 25 ml M-Medium gefüllt. Das Medium im Wurzelteil wurde so hoch gegossen, dass sich an der Trennwand eine Erhöhung ergab, über die die Hyphen wachsen konnten. War das Medium ausgehärtet wurde ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück Medium aus dem Wurzelteil herausgeschnitten, verworfen und durch ein genauso großes Stück, das Sporen von *Glomus intraradices* beinhaltet, ersetzt (Re-Assoziation). Anschließend wurden transformierte Chicorée-Wurzeln (*Cichorium intybus*) auf die Sporen platziert. Die Platten wurden mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und „kopfüber“ bei 27°C dunkel inkubiert.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der Etablierung einer monoxenischen Wurzelkultur von transformierten Chicorée-Wurzeln mit *Glomus intraradices* (Re-Assoziation)**

Mittels Stereomikroskop wurde der Ansatz regelmäßig auf Kontaminationen untersucht. Zudem wurden die Wurzeln, die in das pilzliche Kompartiment wuchsen, entfernt. Fingen die Hyphen an, über die Trennwand in das pilzliche Kompartiment zu wachsen, konnte das feste M-Medium aus diesem Teil der Platte durch flüssiges Medium ersetzt werden. Für weitere 2–3 Wochen wurden die Platten erneut bei 27°C inkubiert, bis das pilzliche Kompartiment mit Myzel und Sporen ausgefüllt war. Anschließend wurde das flüssige M-Medium vorsichtig entfernt, und es konnte durch mit Wirkstoff versetztem flüssigem M-Medium ersetzt werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Petrischalen für einen (24h), zwei (48h) oder sieben Tage inkubiert, um im Anschluss das mit Wirkstoff behandelte Myzel zu erhalten und für molekularbiologische Analysen (Abschnitt 2.12.8.1) weiterzuverwenden.

Sollten die Petrischalen zur Sporenproduktion verwendet werden, so wurde das feste M-Medium im Pilzkompartiment nicht durch flüssiges Medium ersetzt. Im Pilzkompartiment entwickelten sich das Myzel und die Sporen, die für neue Platten als Ausgangsmaterial verwendet werden konnten. Eine zeitlich schnellere Kultivierung wurde durch das Übertragen bereits kolonisierter Wurzeln in das Wurzelkompartiment ermöglicht. Bei dieser Methodik wurde die Zeit der Wurzelkolonisierung eingespart, die, je nach Jahreszeit, bis zu drei Monate betragen kann.



## **2.8 Gewächshausversuche**

### **2.8.1 Versuchsstandort und Rahmenbedingungen**

Alle Versuche wurden in Gewächshäusern der Bayer CropScience AG in Monheim am Rhein durchgeführt. Die Gewächshäuser sind in Nord-Ost-Süd-West-Richtung, die Kulturtische in diesen in Ost-West-Richtung ausgerichtet. Die Gewächshäuser waren mit Seiten- und Dachlüftungen sowie Wandheizungen versehen und konnten über eine automatische Steuerung belüftet und geheizt werden.

### **2.8.2 Klimasteuerung**

Die Temperatur der Gewächshauskammern wurde automatisch gesteuert. Die Solltemperatur lag tagsüber bei 22,5°C und nachts bei 14,5°C (12 h). Da es sich um Gewächshauskammern ohne automatische Kühlung handelte, wurde über die Luftfeuchtigkeit gekühlt, die bei einem Sollwert von 80 % lag. Bei einer Aussenlichtintensität über 35 LUX wurde die Schattierung der Kammer aktiviert.

### **2.8.3 Kulturbedingungen**

Die Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte in Rosentöpfen (Höhe 18 cm, Ø 7 cm x 7 cm) mit einem Fassungsvermögen von 500 ml in einem Gemisch aus Quarzsand-Perlite (1:1). Pro Pflanzgefäß wurden fünf Körner Saatgut der Wintergerstensorte „Duet“ ausgesät. Die Füllhöhe im Topf betrug ca. 15 cm. Zur Mykorrhizierung der Pflanzenwurzeln wurde Mykorrhiza-Inokulum (Abschnitt 2.2.2) in der Menge 10 g/l Substrat beigemischt. Als unbehandelte Kontrolle dienten entsprechend gefüllte Töpfe ohne Inokulum. Zur Vermeidung von Algenbildung und zur Speicherung von Feuchtigkeit wurde das Saatgut mit einer drei bis fünf Zentimeter Leca-Ton Schicht abgedeckt. Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Variante fünfzehn Töpfe angesetzt, von denen jeweils fünf einer Wiederholung entsprachen. Demnach ergaben sich drei Wiederholungen pro Variante, die räumlich verteilt und randomisiert in der Gewächshauskammer aufgestellt wurden. Einmal pro Woche wurden die Pflanzen mit Leitungswasser gewässert sowie im Abstand von drei Tagen zusätzlich zur Wassergabe mit 50 ml Hoagland-Lösung gedüngt.

### **2.8.4 Ernte des Wurzelmaterials**

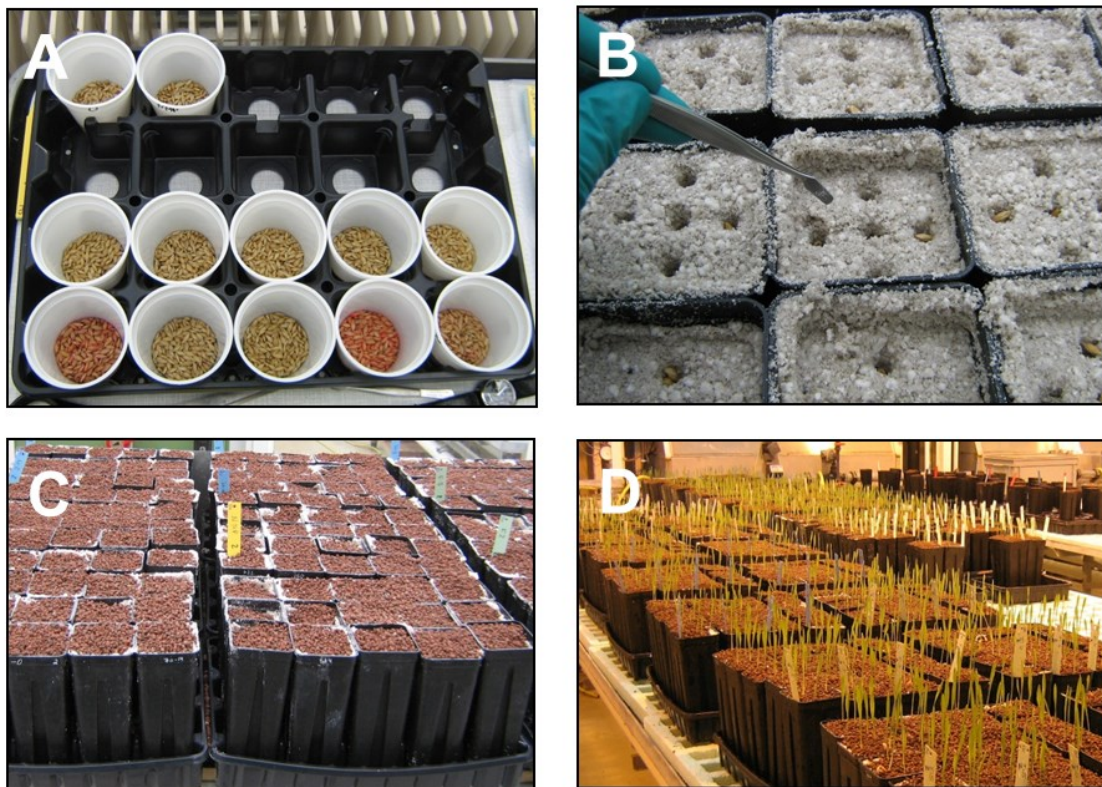
Durch vorsichtiges Waschen der Wurzeln mit Wasser wurden diese von Substratresten befreit. Anschließend wurden die unterirdischen Pflanzenteile durch Zerschneiden der Gerstenpflanze kurz unterhalb des Saatkorns von den oberirdischen Pflanzenteilen getrennt. Die Gesamtwurzelmasse wurde in ca. 1 cm große Stücke zerteilt und randomisierte Proben von ca. 1–2 g für die Mikroskopie entnommen. Die restliche Probe wurde in Alufolie verpackt und im Anschluss bei -80°C gelagert.

### 2.8.5 Gießapplikation

Zur Applikation der Fungizide als Gießbehandlung wurden jeweils neun Töpfe pro Variante, wie unter Kulturbedingungen (Abschnitt 2.8.3) beschrieben, angesetzt. Dies entsprach drei Töpfen pro Wiederholung. Die Applikation der Wirkstoffe erfolgte drei und fünf Wochen nach Versuchsansatz in den Endkonzentrationen 0,5 ppm sowie 5 ppm mit 50 ml Fungizid-Lösung pro Topf. Als Kontrollen dienten eine unbehandelte Variante, die zum Behandlungszeitpunkt mit 50 ml Wasser gegossen wurde sowie eine NMP-Lösungsmittelkontrolle (5 ml NMP/l Wasser). Die Ernte der Wurzelproben erfolgte fünf und acht Wochen nach Versuchsansatz.

### 2.8.6 Saatgutbehandlung

Zur Untersuchung des Effektes einer Saatgutbehandlung auf die Mykorrhiza-Symbiose zwischen *Glomus intraradices* und Gerstenwurzeln wurde Saatgut der Wintergerstensorte „Duet“ mit den ausgewählten Wirkstoffen behandelt (Abschnitt 2.1.1). Die aufgewendeten Konzentrationen ergaben sich durch die Empfehlung der Handelspräparate (Tab. 4). Neben dem in NMP gelösten Wirkstoff (Laborformulierung) wurden die entsprechenden Handelspräparate der Wirkstoffe verwendet. Als Kontrolle diente unbehandeltes Saatgut sowie als Lösungsmittelkontrolle mit NMP behandeltes Saatgut (1 l NMP/dt). Die Versuche (Abb. 13) wurden, wie unter „Kulturbedingungen“ (Abschnitt 2.8.3) angegeben, ausgeführt.



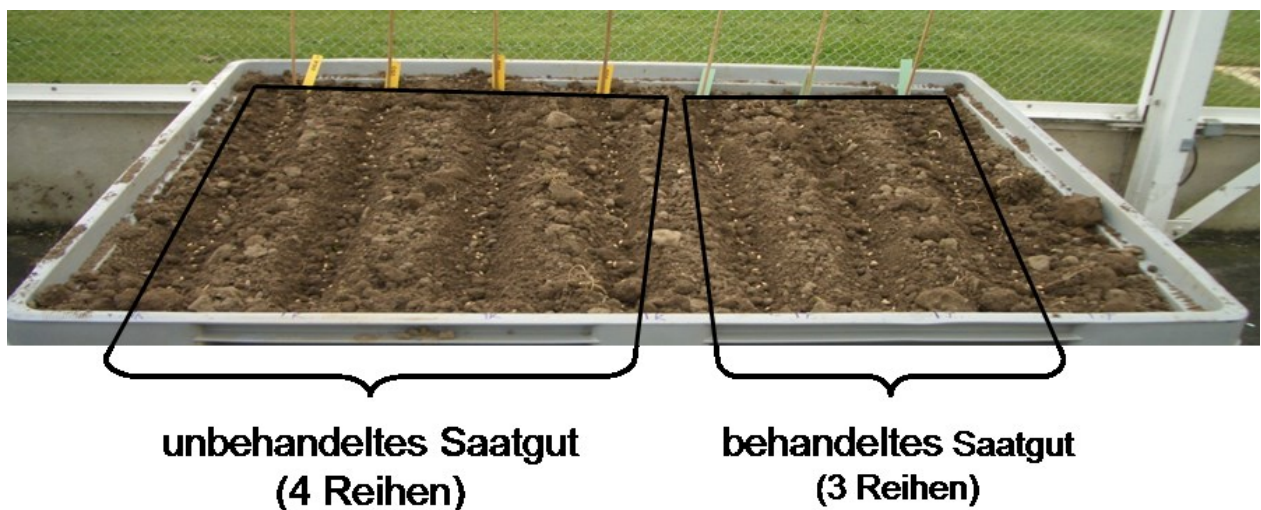
**Abb. 13:** A) Gerstensaatzgut (unbehandelt und mit Wirkstoff behandelt) in Mischbechern nach der Saatgutbehandlung; B) Auslegen des Saatguts mit der Pinzette in das Sand-Perlite-Gemisch in Rosentöpfe; C) Mit Substrat, Inokulum und Saatgut gefüllte Rosentöpfe; D) Übersicht der Verteilung der Rosentöpfe in der Gewächshauskammer

Pro Wirkstoff wurden drei voneinander unabhängige Versuche über einem Zeitraum von Februar bis August durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Pflanzen acht Wochen nach Versuchsansatz geerntet.

## 2.9 Großcontainer-Versuche unter Freilandbedingungen

### 2.9.1 Kulturbedingungen

In dieser Versuchsreihe wurden Gerstenpflanzen in Ackererde unter Freilandbedingungen kultiviert. Dazu wurden die Versuche in einer Vegetationshalle durchgeführt. Die Halle war durch Gitter überdacht sowie an drei Seiten durch Gitter eingezäunt, die vierte Seite grenzte an den Gebäudetrakt der Gewächshäuser. Für die Anzucht der Pflanzen wurden Kunststoff-Großcontainer mit einem Fassungsvermögen von 582 Litern und einem Umfang von 111 cm x 92 cm x 57 cm (Länge x Breite x Höhe) verwendet. Die Container wurden zur Drainage mit einer 10 cm hohen Grob-Kiesschicht (102 L) und 482 Litern Ackererde gefüllt. Jeder Container enthielt sieben Pflanzenreihen mit einem Abstand von 14 cm zueinander. Pro Aussaatreihe wurden 44 Körner in einem Abstand von 2 cm zueinander in einer Tiefe von 3 cm ausgesät. In jeweils vier Reihen wurde unbehandeltes und in drei Reihen behandeltes Saatgut ausgelegt (Abb. 14). Die Behandlung des Saatguts mit den formulierten Handelspräparaten erfolgte in den praxisüblichen Aufwandmengen (Tab. 4). Pro Handelspräparat wurde ein Container verwendet, sodass insgesamt zehn Container in der Vegetationshalle aufgestellt waren.



**Abb. 14:** Aussaatreihen der Sommergerstensorte „Beatrix“ in Großcontainern auf Ackererde

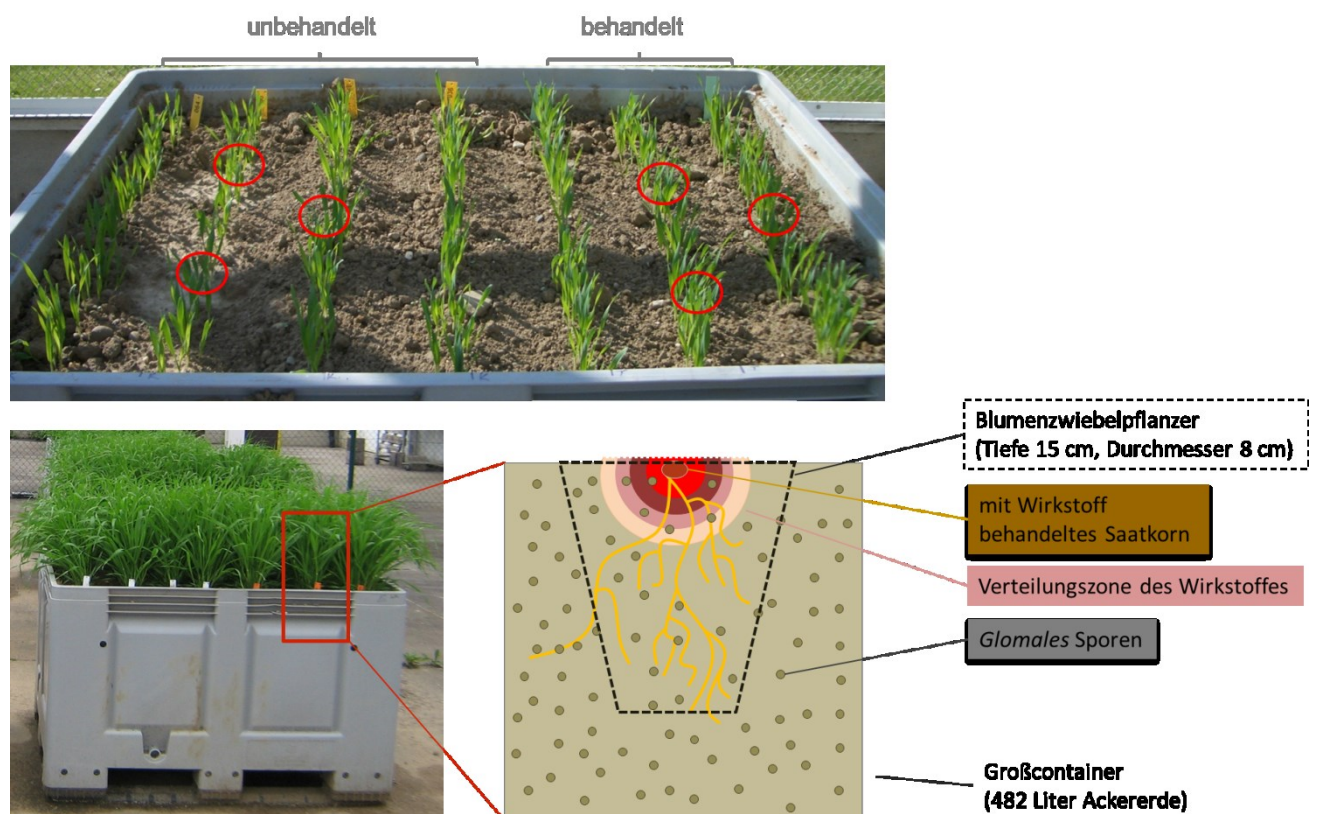
Die Container wurden mit einem Abstand von einem Meter zueinander in der Vegetationshalle aufgestellt. Die Aussaat der Wintergerstensorte „Duet“ erfolgte am 25.09.2009 bzw. 22.09.2010, die der Sommergerstensorte „Beatrix“ am 07.04.2009 und 04.05.2010.

Die Pflanzen wurden zu keinem Zeitpunkt „künstlich“ gewässert, sondern waren den natürlichen Witterungsverhältnissen ausgesetzt. Eine Düngung der Sommerversuche erfolgte 6 Wochen nach

Aussaat mit Kalkammonsalpeter KAS (30 g/m<sup>2</sup>) bzw. 25 Wochen (März) nach Aussaat bei den Winterversuchen. Das Wachstumsverhalten der Pflanzen wurden in regelmäßigen Abständen optisch bonitiert und fotografiert.

### 2.9.2 Entnahme von Bodenproben und Wurzelmaterial

Zur Bestimmung der Mykorrhiza-Sporenmenge in der Ackererde sowie der Kolonisierung der Wurzeln mit arbuskulären Mykorrhizapilzen wurden Boden- und Wurzelproben entnommen. Diese wurden in den Winterversuchen jeweils 6, 26 und 30 Wochen nach Aussaat bzw. 6, 10 und 14 Wochen nach Aussaat in den Sommersversuchen gezogen.



**Abb. 15: Lokalisierung der Boden- und Wurzelprobenentnahme aus dem Großcontainer mit einem Blumenzwiebelplanzer am Beispiel zwei Wochen alter Gerstenpflanzen**

Die Entnahme der Proben erfolgte im Bearbeitungshorizont mit einem Blumenzwiebelplanzer von 15 cm Länge und 8 cm Innendurchmesser, sodass gleichzeitig eine Boden- und Wurzelprobe genommen wurde. Es wurden jeweils drei Proben aus dem unbehandelten Bereich und drei aus dem behandelten Bereich gezogen. Aus der mittleren Reihe wurde keine Probe entnommen (Abb. 15).

Die Wurzeln wurden durch Abschütteln und anschließendes Waschen mit Wasser von der Erde befreit, anschließend in 1 cm große Stücke geschnitten und im Ethanol-Essigsäure-Gemisch bis zur Färbung gelagert. Die abgeschüttelte Erde wurde aufgefangen, gut durchmischt, 150 ml davon für die Bestimmung der Sporenmenge abgefüllt und bis zur Verwendung bei 10°C dunkel gelagert.

### 2.9.3 Auswaschen von arbuskulären Mykorrhiza-Sporen (AM-Sporen) aus Bodenproben

Für die Bestimmung der Anzahl der in den Bodenproben vorhandenen arbuskulären Mykorrhiza-Sporen wurden die Bodenproben mittels modifizierter Sieb- und Dekantiermethode nach Gerdemann *et al.* (1963) ausgewaschen und anschließend mittels Zuckergradient zentrifugiert. Um eine Angabe über die Menge der Sporen in der Ackererde zu haben, wurden bereits vor der Aussaat drei Proben analysiert. Zunächst wurde 150 ml einer Erdprobe in ca. 300 ml Wasser mit einem Stabmixer homogenisiert. Anschließend wurde die Erde über einer Siebkaskade ausgewaschen (Abb. 16A). Das Sieb mit der größten Maschenweite befand sich dabei oben, das mit der kleinsten Maschenweite unten (1 mm, 300  $\mu\text{m}$ , 63  $\mu\text{m}$ ). Die Fraktionen des 300  $\mu\text{m}$ - und 63  $\mu\text{m}$ -Siebes wurden weiter zur Feinreinigung benutzt. Dafür wurden diese in eine 2-Liter-Mensur überführt und mit Wasser bis zur obersten Marke aufgefüllt. Sobald in dieser Mensur ein Sedimentationsgradient sichtbar war, wurde das Wasser in eine zweite Mensur dekantiert. Die erste Mensur wurde wieder mit Wasser aufgefüllt. Sobald auch in der zweiten Mensur ein Sedimentationsgradient sichtbar war, wurde das Wasser dieser Mensur durch das saubere 63  $\mu\text{m}$ -Feinsieb geschüttet. Im Anschluss wurde diese Mensur erneut durch die erste Mensur aufgefüllt und immer weiter fortgeföhren bis die obere Phase ganz klar war. Der Vorgang des Aufschwemmens und Absetzens wurde ca. 5–10 mal wiederholt.

Mithilfe von Wasser aus einer Spritzflasche wurde das Sediment aus dem Feinsieb in ein Becherglas (50 ml) überführt. Im Anschluss wurde der Inhalt des Becherglases mittels 50 ml-Einmal-Pipette auf zwei Zentrifugenröhrcchen verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Es bildete sich ein dunkler Bodensatz, in dem sich die AM-Sporen sowie Bodenreste befanden.

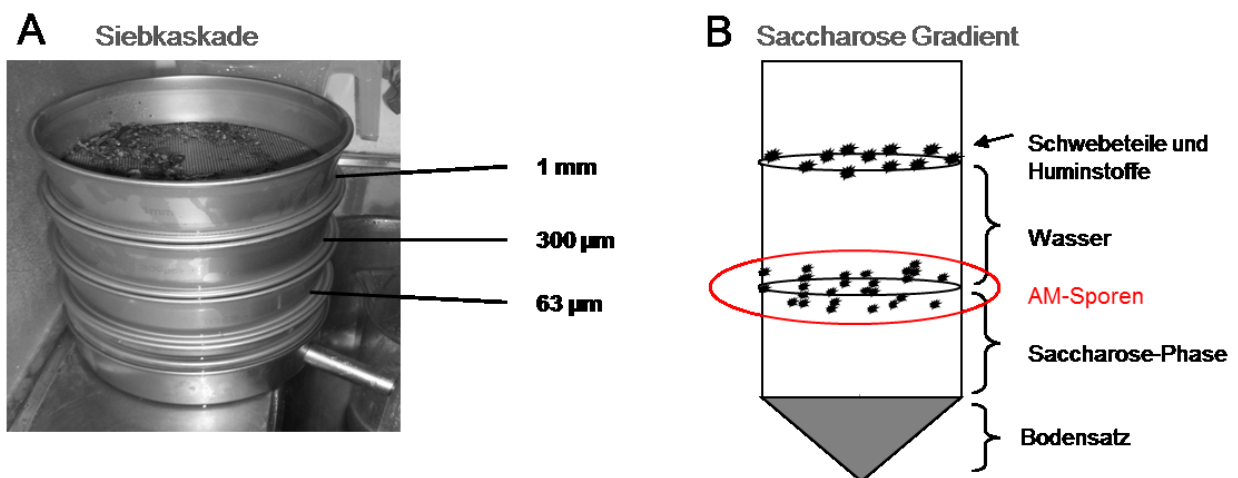


Abb. 16: A) Siebkaskade mit den Maschenweiten 1 mm, 30  $\mu\text{m}$  und 63  $\mu\text{m}$  zum Auswaschen von arbuskulären Mykorrhiza-Sporen aus Bodenproben; B) Schematische Darstellung eines Zentrifugenröhrcchens nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit Verteilung der AM-Sporen in der Interphase

Zur Trennung der AM-Sporen vom übrigen Material erfolgte eine Zuckergradienten-Zentrifugation (Abb. 16B). Im Volumenverhältnis von 1:1 wurde der Bodensatz mit einer 50 %igen Saccharose-Lösung unterschichtet. Mithilfe einer 25 ml-Einmal-Pipette wurde die Zuckerlösung unter den Bodensatz pipettiert. Es bildeten sich daraufhin drei Phasen. Zum einem die untere Saccharose-Phase, zum anderen eine Wasserphase mit Schwebeteilchen und Huminstoffen oberhalb (leichtes Material schwimmt oben) und eine Interphase, entlang derer sich die AM-Sporen angesammelt hatten. Nach Zentrifugieren bei 1000 x rcf für 5 Minuten bei 4°C waren die Phasen noch deutlicher voneinander abzugrenzen und alle AM-Sporen befanden sich in der Interphase. Diese wurde mittels 25 ml-Einmal-Pipette abgenommen und auf einem 63 µm-Feinsieb mit Wasser gewaschen. Die Sporen wurden anschließend mithilfe von Wasser aus einer Spritzflasche in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Endvolumen im Röhrchen betrug in der Regel 9 ml. Bis zur Bestimmung der Sporenanzahl wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung der Sporenmenge wurde der Inhalt eines Röhrchens auf drei Petrischalen (Ø 35 mm) zu jeweils 3 ml aufgeteilt. Anschließend wurden die vorhandenen AM-Sporen mittels Stereomikroskop ausgezählt. Um nicht den gesamten Inhalt der Petrischale zu zählen, wurde ein Zählraster (Abstand der Linien im Zählraster 5 mm) verwendet, welches unter die Petrischale gelegt wurde. Im Z-Schema wurden daraufhin in zehn Zählfeldern die AM-Sporen gezählt. Zur Berechnung der Sporenmenge wurden die Ergebnisse der drei Stichproben aus einer Probe summiert und anschließend mit dem Faktor 3,85 multipliziert. Der so erhaltene Wert entsprach der Menge Sporen, die sich in den anfänglich eingesetzten 150 ml Erde befanden.

## **2.10 Bestimmung pflanzlicher Wachstumsparameter**

### **2.10.1 Analyse des Wurzelsystems mit dem Programm WinRHIZO 2009 c**

Zur Beschreibung des Wurzelsystems und seiner Architektur wurde das Wurzelsystem mithilfe des Programms WinRHIZO 2009 c Basic, Reg, Pro & Arabidopsis (Regent Instruments Inc., Kanada) analysiert. Dafür wurden die frisch geernteten Wurzelproben in einen mit Wasser gefüllten, DIN-A4-großen Plexiglasbehälter überführt und die Schale auf einen Scanner gelegt (Epson Expression 10000 XL). Die Wurzeln wurden so ausgebreitet, dass möglichst wenig Überlappungen und Berührungspunkte entstanden, da dies die Hauptfehlerquelle bei der Längenmessung von Wurzeln sein kann (Bouma *et al.*, 2000). Die Wurzeln wurden bei einer Auflösung von 400 dpi in Graustufen eingescannt und folgende Parameter für die Auswertung genutzt: Wurzeloberfläche (cm<sup>2</sup>), Wurzelvolumen (cm<sup>3</sup>), Wurzeldurchmesser (mm) sowie Anzahl der Verzweigungen.

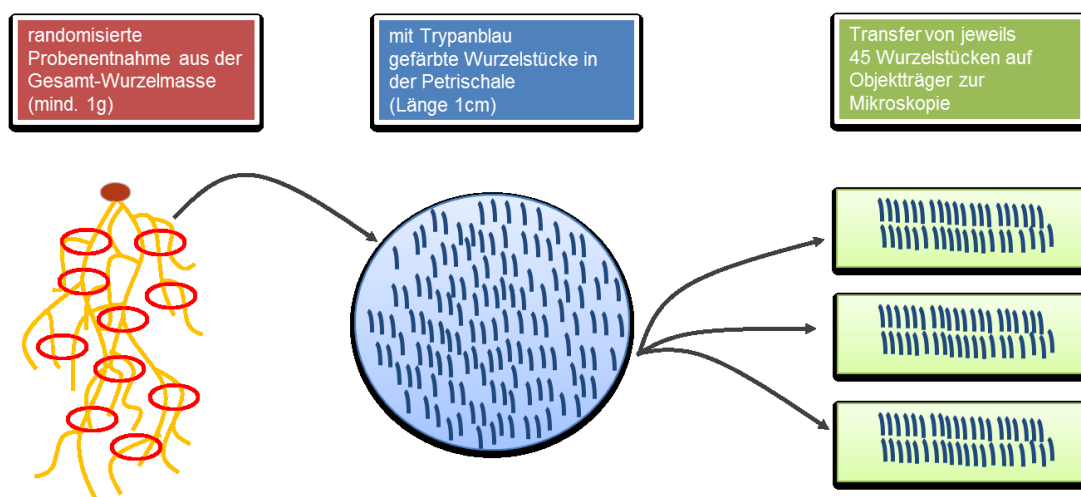
## 2.11 Mikroskopie

### 2.11.1 Färbung von Wurzelproben mit Trypanblau

Zur eindeutigen Identifizierung von Pilzstrukturen im mikroskopischen Bild erfolgte eine Färbung der fixierten Wurzelabschnitte mit Trypanblau. Zunächst wurden die Wurzeln zum Ausbleichen mit 2 % iger Kaliumhydroxid-Lösung (20 g KOH/l Wasser) bei 90°C im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Wurzeln mit Wasser gut gespült und mit 2 %iger Salzsäure (274 ml 37%ige HCL/726 ml Wasser) für mindestens eine Stunde oder länger bei Raumtemperatur inkubiert. Die Behandlung der Wurzeln mit Salzsäure führt zum Ansäuern der Wurzeln, wodurch eine gute Bindung des Farbstoffes an pilzliche Strukturen gewährleistet wird (Jensen *et al*, 1962). Nach Abschütten der Salzsäure erfolgte der eigentliche Färbeschritt mit Trypanblau. Mit einer 0,04 %igen Trypanblau-Lösung wurden die Wurzeln erneut für eine Stunde im Wasserbad bei 90°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung gut mit Wasser abgespült und die Wurzeln mit einer 50 %igen Glycerinlösung überschichtet, um die Wurzeln zu Entfärben. Die Wurzeln wurden mindestens eine Woche bei Raumtemperatur zum Entfärben gelagert oder die Glycerinlösung mehrfach täglich ausgetauscht, um die Entfärbung zu beschleunigen. Nach einer Woche wurden die Wurzeln in Petrischalen überführt und frische Glycerinlösung hinzugegeben. Bis zur mikroskopischen Bestimmung arbuskulärer Mykorrhiza-Strukturen wurden die Wurzeln bei Raumtemperatur gelagert.

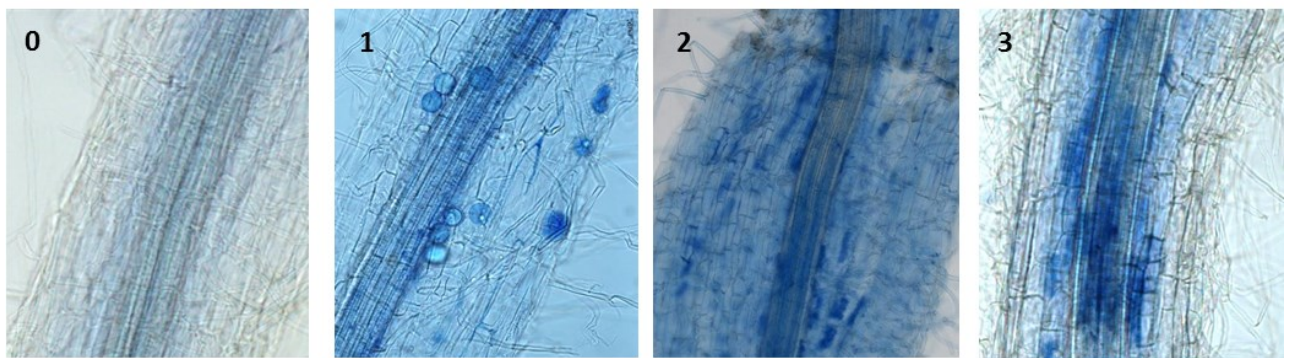
### 2.11.2 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades von Gerstenwurzeln

Die mit Trypanblau gefärbten Wurzelstücke wurden unter einem Lichtmikroskop (100-fache Vergrößerung) auf das Vorhandensein von arbuskulären Mykorrhiza-Strukturen (Vesikel, Hyphen, Arbuskeln) untersucht. Dafür wurden pro Variante drei Stichproben á 45, 1 cm langer Wurzelstücke genommen und auf Objektträgern in 100 % Glycerin fixiert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der Gerstenwurzelprobentnahme zur mikroskopischen Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades mit *Glomus intraradices* (pro Wiederholung und Variante 135 Wurzelstücke á 1 cm Länge)

Zur Bonitur der Mykorrhizierung wurde eine Modifizierung der Methode nach Trouvelot *et al.* (1986) herangezogen. Ein Wurzelabschnitt galt als mykorrhiziert, wenn mindestens eine der erwähnten Strukturen (Vesikel, Arbuskeln, Myzel) vorlag. Die Mykorrhizierungsfrequenz (F) wurde demnach aus der Zahl der mykorrhizierten Wurzelfragmente gemessen, an der Gesamtzahl der untersuchten Fragmente, berechnet. Zusätzlich wurde während des Mikroskopierens abgeschätzt, in welcher Intensität ein mykorrhiziertes Wurzelstück kolonisiert war. Dabei wurde in eine Skala von vier Intensitätsklassen eingeteilt (Abb. 18) in der 0 keine Kolonisierung bedeutete und Klasse 3 eine Kolonisierung des einzelnen Wurzelstückes von 61 bis 100 %. Für den in der Arbeit angegebenen Mykorrhizierungsgrad wurde die Häufigkeit der Intensitätsklassen miteinbezogen.



**Abb. 18: Einteilung der Mykorrhizierung in vier Intensitätsklassen an acht Wochen alten Gerstenwurzeln, inokuliert mit *Glomus intraradices* (200-fache Vergrößerung; Färbung pilzlicher Strukturen mit Trypanblau)**

Neben der allgemeinen Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades wurde der Arbuskelgehalt in den kolonisierten Wurzelstücken abgeschätzt und ebenfalls klassifiziert. Demnach ergab sich folgendes Boniturschema (Tab. 8):

**Tab. 8: Boniturschema zur Beschreibung der analysierten Wurzelstücke**

Intensitätsklasse	Beschreibung
0	keine Kolonisierung
1	1 bis 30 % des Fragments kolonisiert
2	31 bis 60 % des Fragments kolonisiert
3	61 bis 100 % des Fragments kolonisiert
A0	keine Arbuskeln
A1	1% bis 30% Arbuskeln pro Wurzelfragment
A2	31% bis 60% Arbuskeln pro Wurzelfragment
A3	61% bis 100% Arbuskeln pro Wurzelfragment



Die ermittelten Daten wurden mithilfe der folgenden Formeln verarbeitet und analysiert:

<b>Mykorrhizierungsfrequenz (F)</b>	$F = N_m/N_{ges} * 100$ $N_{ges}$ = Gesamtzahl der Wurzelfragmente $N_m$ = Zahl der mykorrhizierten Wurzelfragmente
<b>Mykorrhizierungsgrad (M)</b>	$M = (80n_3 + 45n_2 + 20n_1 + 5n_{<1})/N_{ges}$ $n$ = Zahl der Wurzelfragmente in Intensitätsklasse X
<b>Mykorrhizierungsintensität der infizierten Fragmente (m)</b>	$m = M * (N_{ges}/N_m)$
<b>Arbuskelgehalt im infizierten Teil der Wurzel (a)</b>	$a = (100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1)/100$ $mA_3, mA_2, mA_1$ entsprechen der Anzahl der infizierten Fragmente mit einem Arbuskelgehalt in den Klassen A3, A2 und A1 $mA_3 = [(80n_3A_3 + 45n_2A_3 + 20n_1A_3 + 5n_{<1}A_3)/N_m] * 100/m$ (entsprechend auch für A2 und A1)
<b>Arbuskelgehalt im gesamten Wurzelsystem (A)</b>	$A = a * (M/100)$

### 2.11.3 Vitalitätstest von *Glomus intraradices* Sporen (MTT-Färbung)

Mit dem MTT-Test wird die Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen anhand der Umsetzung des gelben MTT-Tetrazoliumsalzes zu einem violetten Formazan-Farbstoff (aktiv) bestimmt. Die Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, sodass die Menge an gebildetem Formazan als Maß für die Vitalität der Zellen steht (Mosmann, 1983; Kuhn *et al.*, 1941).

Nach Bestimmung der Sporenkeimrate im Sporenkeimtest (Abschnitt 2.7.1) wurden 500 µl MTT-Lösung (1 mg/ml) pro Well hinzugegeben und die Platten für weitere 24 h bei 27°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Stereomikroskop. Vitale Sporen werden pink bis dunkelrot gefärbt und tote weiß-gelblich. Zur Auswertung der Färbung wurde zwischen gekeimten und nicht gekeimten Sporen differenziert. Für die Sporenvitalität in Prozent wurde die Anzahl vitaler (gekeimter oder nicht gekeimter) Sporen zur Gesamtzahl der untersuchten Sporen ins Verhältnis gesetzt (Sporenvitalität = Anzahl vitaler Sporen/Gesamtzahl Sporen pro Well).

### 2.11.4 Succinat-Dehydrogenase-Aktivität des extraradikalem Myzels von *Glomus intraradices* (NBT-Färbung)

Eine weitere Methode der Vitalitätsbestimmung, neben der MTT-Färbung, ist die NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumsalz) mit der die Succinat-Dehydrogenase Aktivität (SDH – Komplex II der mitochondrialen Atmung) nachgewiesen wird. Es handelt sich dabei um eine enzymatische Färbung, bei der die Reaktionslösung Succinylsäure als Substrat sowie NBT als Indikator für die Enzymaktivität enthält. Ist Komplex II aktiv, so wird Succinat zu Fumarat oxidiert und NBT reduziert, welches daraufhin als blauer unlöslicher Niederschlag ausfällt. Bei Inaktivität des Komplexes ist keine Färbung des Myzels und weiterer pilzlicher Strukturen zu erwarten.

Für den Färbeschritt wurde eine frische 10 %ige Sorbitol-Lösung (10g/100ml) angesetzt. Die folgenden Schritte mussten auf Eis durchgeführt werden, da die Reaktion bei Raumtemperatur aktiviert wird. Das zu färbende Material wurde in eine Petrischale gegeben und anschließend jeweils 5 ml der Sorbitol-Lösung und NBT-Lösung hinzugegeben. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (oder 1h bei 37°C, unter Schütteln) wurde das Material zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend auf einem Objektträger in Glycerin fixiert. Die Auswertung der Färbung wurde mithilfe des Lichtmikroskops (100-fache Vergrößerung) durchgeführt. Dabei wurde die Fläche der blaugefärbten Strukturen im Vergleich zur ungefärbten Fläche abgeschätzt.

## 2.12 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.12.1 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Kit	Hersteller
Rneasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen GmbH; Hilden
Turbo DNA-free <sup>™</sup> Kit	Applied Biosystems UK
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH; Hilden
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
10 mM dNTP Mix	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
random primers (9 Units)	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
iQ <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	Bio-Rad Laboratories; CA
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR clean-up System	Promega Corporation; Madison USA
Phusion <sup>®</sup> High fidelity Taq Polymerase	New England BioLabs GmbH; Frankfurt a.M.
5x Phusion HF Buffer	New England BioLabs GmbH; Frankfurt a.M.
Platinum <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Taq DNA Polymerase PCR Buffer	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
QIAprep <sup>®</sup> Miniprep Kit	Qiagen GmbH; Hilden

### 2.12.2 Aminosäuresequenz Gint*ERG11*

Für Untersuchungen zur Wirkung der Azol-Fungizide auf *Glomus intraradices* wurde die bisher unveröffentlichte Proteinsequenz des *ERG11* (Gint*ERG11*) aus der *Glomus*-Genom-Datenbank (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMGC/GlomusGenome/index3.html>) verwendet. Die cDNA-Sequenz (ID 347810) des Gint*ERG11*-Gens umfasst ein 1620 bp großes offenes Leseraster, das 539 Aminosäuren kodiert (Abb. 19).

```

1  AAAAAATTTTTTTGATATTTTTTATATAAGCCGCTAAAAATTTTTTAGAGAACAATTTATCTCTGAA 70
71  TTATTTTTTGTAAAGAGAATAAAATGTTATTTGGACAATTCGATACTTGATACAATTTATAATGATTATT 140
141 TGATACCAATTTGCTTATCATGCAAATGTTACAGTGCAAAAATAATAAGTTAATGTCACCTTTTTGTTAAAGA 210
211 GGTTTCAGTTAATACAATTTTTATTTATGTGCAATTTGTAACCTTTAGTATACCACCTATTATATATCTTA 280
281 AATTCAAATTCCTTATGTTAAACGTAACAAAAATGAACCCCCAATTTGTACCTTATTTGGATCCAGTTATTG 350
351 GTTCAGCGATACTATGGGAATGGATCCAATCAAATTTCTACAGAAAATATCAACAAGAATATGGAAATTA 420
421 TTTTACATTTATATTAATCTGGGTAAAAGAATGGTAACATGTTTAGGGTCTGAAGGAAATAATTTGTATTTC 490
491 AATGCAAAATTAGCAAATGCATCAGCTGAAGCAGCTTATAAATCTTTAACCGTACCTGTATTTGGTAAAG 560
561 GTGTTGTTTTATGATGTACATAATTTCTGTACTCATGGAACAAAAAAATTTGTTAAAGCTGGATTATCAAA 630
631 TGAAAATTTAAGAGCATATGTACCAATGATTGAAATGGAACTAAAAATTTTTCAGATGGAATAAA 700
701 CAATCAGACATTCAGACGTTTCATAAAGCAACTGCTGAACTAATTTATTATGACAGCATCTAAGTGCTTAT 770
771 TGGGAGAAGAAGTCCGTTCAAAATTTAGATGAGTCATTTGCTCAAATATTTTCATGATTTGGATGGAGGGTT 840
841 TAAACCAGTTAATTTCTTATTTGAAGATTTACCACCTTCCTTCGAATAAATTAAGAGATCAAGCACATGTT 910
911 AAAATGCGACATTTCTTTATGGATATTATGAAAGATCGTAGAGAAAAGGAATTACAGATCGTACAGATA 980
981 TTATGCAATATTTAACAACACATTTGTCAATATAAAGATGGAAGAAAATTTATCAGATGAAGAATCAGCCCA 1050
1051 TATTATGATAGCAATGCTAATGGCAGGACAACATACTTCGTCCACTACAACGGCATGGGCATTTGCTTTAT 1120
1121 TTAGCATCACAACTAATTTATTTAATGAATTACGTAAGAACAATTTGAAGTATTTGGAAGTTTGGATG 1190
1191 AACCATTAACATTTGATGGTATTAAAAACTTACACTTCATGATAATGTCGTTAGAGAATCTCTTAGATT 1260
1261 ACGTCCCTCTATTTTAAATGTTATAAGAAAAGTACTTAGAGATTTACCTATTTCTGGTACTCAATATGTC 1330
1331 ATACCAAAGGATTTCTTATATCAATCTATACTTGCTATTTCTCATCGTTCTGAAGGATATTTTGAAAATG 1400
1401 CCGAAACGTTTAACTAACCAGATGGGTTGACTTTGATCAAAATGTTAAAGAAGGGATGACGATCTGGT 1470
1471 TGATTATGGTTTTGGTGTTTTACATTTCTGCTAGTGCAAAATCTCCTTTTCTCCATTTGGTGCAGGACGA 1540
1541 CATAGATGTATTTGGTGAACCTTTGCTTATTTACAGATAAAAACCATTATTTGCTGTATTTGCTTAGAATGT 1610
1611 TTGATCTTGAATTATATAAAAAATAAATTTCTGAAATGTGATTTTACTACAATGATAGTTCAACCTAAAGA 1680
1681 TCCTTTAGTACAATATACTAGACGAGATAATTAGTATTATATTGTAATTTATATTGAAATGTAATTTTAC 1750

```

**Abb. 19: cDNA-Sequenz von Gint*ERG11* mit Start-Codon (ATG) und Stop-Codon (TAG) (blau: nicht kodierende Sequenz; rot: kodierende Sequenz)**

### 2.12.3 Primer

Die in der Arbeit verwendeten Primerpaare wurden mit der Software Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) entworfen (Tab. 9).

**Tab. 9: Spezifische Primersequenzen und ihre Annealingtemperaturen**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Orientierung	Annealingtemperatur
9796_fwd	TTGGGAGAAGAAGTCCGTTT	forward	61°C
9796_rev	TCGCATTTTAAACATGTGCTTG	reverse	
EF-1- $\alpha$ _fwd	GCTATTTTGATCATTGCCGCC	forward	58°C
EF-1- $\alpha$ _rev	TCATTTAAACGTTCTTCCGAC	reverse	
ERGyes_fwd	GATCGGTACCGAGAATAAAATGTTATTGGACAATTCCG	forward	55°C
ERGyes_rev	GTCAGCGGCCGCCTAATTATCTCGTCTAGTATATTG	reverse	

### 2.12.4 RNA Isolation mit dem RNeasy® Plant Mini Kit™ (Qiagen)

Für die Isolation von RNA aus pilzlichem Material wurde dieses zuvor für 24 h gefrieretrocknet und anschließend mithilfe von runden Keramikugeln in einer Schwingmühle (Retsch GmbH) unter ständiger Kühlung zu feinem Pulver zermahlen. Die RNA wurde im Anschluss mittels RNeasy® Plant Mini Kit™ nach Angaben des Herstellers (RNeasy Mini Handbook 09/2010; S. 52-55) isoliert. Für das Lysieren der Zellen wurde RLT-Puffer, der mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

versetzt war, verwendet. Die RNA wurde mit einem Volumen von 36 µl RNA-freiem Wasser von der Säule eluiert, die Konzentration mit dem NanoDrop®-ND-1000 Spektrophotometer bestimmt und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.12.5 DNase Behandlung der Gesamt-RNA**

Zur Entfernung von DNA wurden die RNA-Proben mit dem Turbo DNA-free™ Kit von Ambion aufgereinigt (DNase I). Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen und im Anschluss mittels RT-PCR (Qiagen One-Step RT-PCR) überprüft, ob noch eine DNA-Kontamination in den RNA-Proben festzustellen war.

#### **2.12.6 Qiagen One-Step RT-PCR**

Die aufgereinigten RNA-Proben wurden mittels One-Step RT-PCR-Kit auf DNA-Kontamination untersucht. Dafür wurde 1 µl der RNA in einer PCR Reaktion eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verfahren (Handbook Qiagen One-Step RT-PCR Kit; S. 12-14). Im Anschluss wurden die PCR-Produkte auf einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Waren die Proben DNA-frei, so konnten sie bei -80°C gelagert werden. Bei einer Kontamination durch DNA wurde die Probe erneut und wie oben beschrieben mit dem Turbo DNA-free™ Kit aufgereinigt.

#### **2.12.7 cDNA Synthese mit dem Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen)**

Für weitere Untersuchungen der RNA wurde diese in komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription umgeschrieben. Die Synthese erfolgte mit dem Superscript II Reverse Transcriptase System (Invitrogen). Als Ausgangsmaterial dienten 1 pg–5 µg RNA in einem Volumen von maximal 10 µl. Zu diesem wurden 1 µl Random Primer (50–250 ng) sowie 1 µl 10 mM dNTP Mix hinzugefügt. Nach Auffüllen des Ansatzes mit Wasser auf ein Endvolumen von 12 µl wurde dieser fünf Minuten bei 65°C inkubiert und sofort eine Minute auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz zum cDNA Synthese-Mix II (4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT) hinzugegeben, kurz abzentrifugiert und 2 Minuten bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl (200 Units) der SuperScript™ II RT hinzugefügt. Nach gutem Mixen durch Pipettieren wurden die Proben bei 25°C für weitere 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubationszeit von 50 Minuten bei 42°C sowie eine weitere von 15 Minuten bei 70°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

#### **2.12.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction) ist eine *in vitro* Technik, mit der beliebige Abschnitte von Nukleinsäuren amplifizierbar sind. Es ist möglich, spezielle Regionen einer DNA oder cDNA durch Verwendung von sequenzspezifischen Primern und wiederholten

Zyklen der DNA-Synthese zu vermehren (Alberts *et al.*, 2004). Jeder Zyklus besteht dabei aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen: Denaturierung der DNA bei 90–98°C, Anlagerung der Primer bei für die Primer spezifischen Temperaturen sowie Elongation des DNA-Strangs bei 72°C. Der PCR-Ansatz erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach folgendem Protokoll:

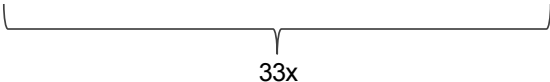
**Tab. 10: PCR-Reaktionsansatz**

Komponenten	Menge (µl)
5x Phusion Buffer	10
10mM dNTPs	1
10µM Primer-fwd	2,5
10µM Primer-rev	2,5
Phusion Taq-Polymerase	0,5
Wasser	31,5
Probe	2

48µl + 2µl Probe

Folgendes Temperaturprogramm wurde, wenn nicht anders angegeben, für alle durchgeführten Reaktionen verwendet:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
98°C	98°C	50°C	72°C	72°C	4°C
30"	10"	30"	2'	10'	∞

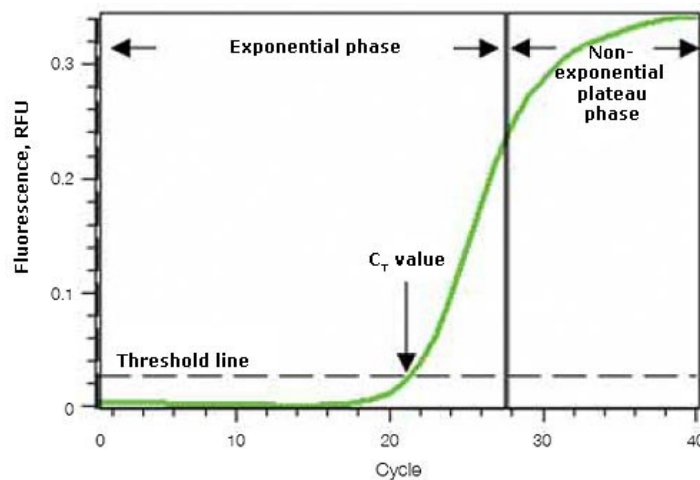


Mit dem Standardprogramm für die PCR wurde die optimale Annealingtemperatur für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer überprüft. Dazu wurde eine PCR mit Temperaturgradient und DNA, die aus extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* isoliert wurde, durchgeführt. Die Temperaturen des Gradienten wurden so gewählt, dass sie einige Grad (°C) über und unter der vom Hersteller errechneten Annealingtemperatur lagen. Im Anschluss fand eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte statt. Des Weiteren konnte mittels PCR die cDNA-Synthese überprüft werden. Dafür wurde die synthetisierte cDNA als Matrize für die PCR eingesetzt und ebenfalls im Anschluss das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.12.8.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der quantitativen PCR ist die Standard-PCR so abgewandelt, dass unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, z.B. SYBR<sup>®</sup>-Green, die Anreicherung der DNA in Echtzeit verfolgbar ist. Der Farbstoff fluoresziert bei Bindung an doppelsträngige DNA, sodass das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produkts ist. Das Emissionsmaximum liegt bei 520nm. Der Schlüsselfaktor für die Quantifizierung der quantitativen PCR-Analyse ist der

Schwellenwert (Ct-Wert). Die Template-Menge ist in der ersten Phase (Basislinie) der Amplifikation begrenzt. Die Fluoreszenzmenge ist noch zu gering, um detektiert zu werden (bis ~ 17. Zyklus). In der dritten Phase (Plateauphase) steigt hingegen die Menge der Produkte sehr schnell an. Es liegen keine optimalen Bedingungen mehr vor, da die Taq-Polymerase ihre Aktivität verliert und eine herabgesetzte Vervielfältigungseffizienz vorliegt (ab ~ 30. Zyklus). Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg ist nur in der Phase dazwischen möglich (exponentielle Phase). Daher verwendet man, um immer am Anfang einer exponentiellen Phase messen zu können, den Ct-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert–Zyklus). Dieser ist definiert als der Wert, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (Abb. 20).



**Abb. 20: Typischer Amplifikationsverlauf der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion**

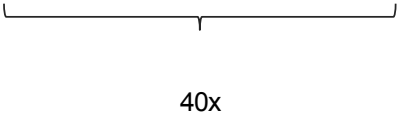
Die Effizienz der cDNA-Synthese liegt zwischen 5 % und 90 %, daher liefert die Quantifizierung unter diesen Bedingungen keinen absoluten Wert, sondern nur einen Hinweis auf die Mindestmenge an mRNA. Aus diesem Grund wird ein externer Standard herangezogen, bei dem es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen (housekeeping gene) handelt. In der Arbeit wurde der Elongationsfaktor *Ef-1- $\alpha$*  verwendet.

Für die Bestimmung der Genexpression von *GintERG11* wurde cDNA aus extraradikalem Myzel von *Glomus intraradices* isoliert. Das Myzel war zuvor in wirkstofffreiem oder -haltigem Medium inkubiert (Abschnitt 2.7.2). Die cDNA wurde unverdünnt mit mindestens drei technischen Replikaten in den qPCR Reaktionsansatz eingesetzt (Tab. 11). Zur Amplifikation eines 150 bp großen Teilssegmentes von *GintERG11* wurden die Primer 9796\_fwd und 9796\_rev verwendet.

Tab. 11: qPCR Reaktionsansatz zur Quantifizierung von *GintERG11*

Komponenten	Menge ( $\mu$ l)
iQ SYBR Green Supermix	10
Primer forward (3 $\mu$ M)	2
Primer reversed (3 $\mu$ M)	2
Template cDNA	5
Wasser	auf 25 $\mu$ l

Die Detektion der amplifizierten Fragmente und die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgten mit dem iCycler iQ System von BioRad (München) nach folgendem Programm:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
95°C	95°C	58°C	58°C	58°C	4°C
1:30'	15"	30"	50"	10"	$\infty$
			+ 0,5°C/ Zyklus 80x		

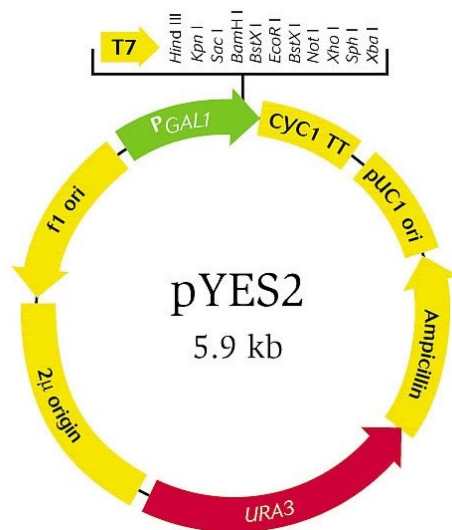
Die Temperaturen der Schritte 3–5 wurden entsprechend den Annealingtemperaturen der Primerpaare (Tab. 9) angepasst.

Nach Beenden der PCR-Reaktion wurden durch die Software iCycler iQ Systems die Amplifikationsdaten jeder Reaktion gegen die Hintergrundfluoreszenz eines Leerwertes (Negativ-Kontrolle) berechnet und der Ct-Wert jeder Probe ermittelt. Dieser wurde für die Relative Quantifizierung benötigt (Livak *et al.*, 2001). Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass beide Gene, zu untersuchendes *GintERG11* und Referenzgen *Ef-1- $\alpha$* , mit einer Effizienz von  $100 \pm 5\%$  amplifiziert wurden. Zunächst wurde das zu untersuchende Gen in Relation zum Referenzgen gesetzt, um die relative Expression von *GintERG11* zu bestimmen:  $\Delta Ct = Ct(GintERG11) - Ct(Ef-1-\alpha)$ . Um zu untersuchen, um welchen Faktor das zu untersuchende Gen in der behandelten Wirkstoffvariante höher exprimiert war als in der unbehandelten Variante, wurde folgende Formel angewendet:  $2^{-\Delta\Delta Ct} [\Delta Ct(Wirkstoff) - \Delta Ct(unbehandelt)]$ .

### 2.12.9 Klonierung

Eine Klonierung ist das Einführen eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit sollte das cDNA-Fragment *GintERG11* mit dem Vektor pYES 2 ligiert und anschließend in einen Hefestamm transformiert werden. Die kodierende Region von *GintERG11* wurde aus cDNA von extraradikalem Myzel in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar ERGyes\_fwd und ERGyes\_rev amplifiziert. Die Primer besitzen spezifische 5'-terminale Anhänge mit Homologie für die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des Integrationsbereichs des Zielvektors pYES 2.

Der 5,9 kb große Vektor pYES 2 (Invitrogen GmbH) besitzt ein selektierbares Markergen URA3 für die Uracilsynthese sowie einen galaktoseinduzierten Promotor GAL1, der die Expression der in den Vektor klonierten Gene in Abhängigkeit von Galaktose reguliert (Abb. 21).



**Abb. 21: pYES2-Vektor (Invitrogen GmbH; Deutschland)**

Darüber hinaus trägt der Vektor weitere typische Eigenschaften, wie das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in *E.coli*. Diese Eigenschaften waren für die vorliegende Untersuchung nicht relevant.

### 2.12.10 Restriktionsverdau

Zur Linearisierung des Vektors wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen Not I und KPN durchgeführt, um die Ligation von Vektor und Gint*ERG11* zu ermöglichen. Der Restriktionsansatz erfolgte mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem (Promega GmbH). Für Not I wurde Puffer D und für KPN Puffer J verwendet. Pro Ansatz wurden 15–30 µl Vektor-DNA (ca. 100–200 ng/µl), 4 µl Enzym-Puffer (10 x) und je 1 µl Restriktionsenzym verwendet. Mit Wasser wurde der Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 40 µl gebracht. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht und anschließend die gelelektrophoretische Auftrennung des Produktes zur Überprüfung eines erfolgreichen Verdau des geschnittenen Fragments. Die Bande des geschnittenen Vektors wurde unter UV-Licht mithilfe des passenden DNA-Markers identifiziert und mit dem Skalpell ausgeschnitten. Daraufhin folgte die Aufreinigung mit dem *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR clean-up System* (2.12.11).

### 2.12.11 Re-Isolation von DNA aus Restriktionsansätzen

Um den geschnittenen Vektor nach Abschluss des Restriktionsverdaus von den Komponenten des Restriktionsansatzes zu reinigen oder um DNA aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde das *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR clean-up System* genutzt und nach Angaben des Herstellers verfahren.



Das Fragment im zu reinigenden Ansatz wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran-Säule gebunden, gewaschen und anschließend wieder von der Säule eluiert. Die Elution erfolgte mit 20µl Wasser, anschließend wurde das Produkt bei -20°C gelagert.

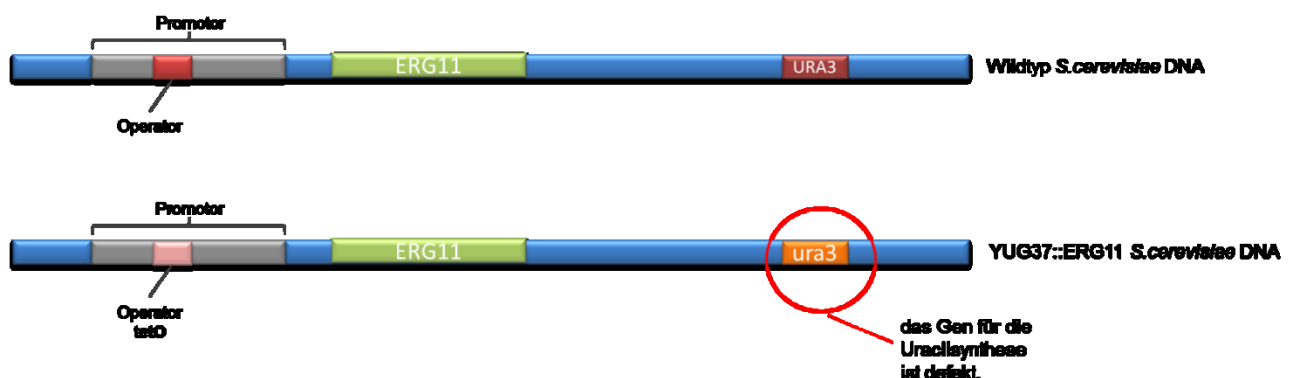
### 2.12.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Ligation führt zur Einfügung eines durch eine PCR amplifizierten DNA-Fragments in einen Vektor. Die DNA kann durch einen Restriktionsverdau vorbereitet und anschließend mithilfe einer Ligase an komplementären Enden des Vektors verknüpft werden. Für die Ligation des pGint*ERG11*-Konstruktes wurden der linearisierte Vektor pYES2 und das cDNA-Fragment Gint*ERG11* in einem 2:1-Verhältnis (ng) eingesetzt. Es wurden 1 µl des T4-Puffers und 0,5 µl der T4-DNA-Ligase verwendet und anschließend mit Wasser auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde vier Stunden bei 16°C und anschließend zur Inaktivierung 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend konnte der Reaktionsansatz zur Vermehrung der DNA in Bakterienzellen oder Hefen transformiert werden.

### 2.12.13 Funktionelle Hefekomplementation

#### 2.12.13.1 Hefestamm YUG37::*ERG11*

Der verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Hefestamm YUG37::*ERG11*, der von Prof. S.Kelly (Universität Swansea, UK) zur Verfügung gestellt wurde, ist im Vergleich zum Wildtyp-Hefestamm auxotroph für Uracil (*ura3*).



**Abb. 22:** Schematischer Vergleich der *ERG11*-DNA-Sequenz der Wildtyp-Hefe *S.cerevisiae* und dem mutierten Hefestamm YUG37::*ERG11*

Zudem steht die Regulation des hefeeigenen *ERG11*-Gens unter der Kontrolle eines Promotors, der eine Tetracyclin-Operatorsequenz (*tetO*) trägt (Abb. 22). Die Transkription der *ERG11*-mRNA wird in diesem Fall durch die An- oder Abwesenheit von Tetracyclin reguliert. In der Abwesenheit von Tetracyclin bindet sich der tetracyclinkontrollierte Transaktivator (tTA), der sich aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) und einer Aktivierungsdomäne zusammensetzt, an die Operatorsequenz (*tetO*), sodass die Gensequenz durch die RNA-Polymerase abgelesen werden

kann. Bei Tetracyclin-Anwesenheit, bindet sich dieses an den Tetracyclin-Repressor (TetR), der Transaktivator tTA dissoziiert von der Operatorsequenz und verhindert so die Transkription der *ERG11*-mRNA, woraufhin keine Sterolbiosynthese mehr stattfindet und die Hefe unfähig ist zu wachsen. Auf diese Weise ist die Regulation des endogenen *ERG11* der Hefe über die An- oder Abwesenheit von Tetracyclin im Medium möglich.

#### 2.12.13.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Für das Wachstum der Hefezellen wurden diese in YPD-Medium unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Als eine optische Dichte von 600 OD erreicht war, wurden die Hefezellen zentrifugiert (5 Minuten, 2000 rpm), das entstandene Pellet mit 20 ml Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Zugabe von 10 ml Lithium-Acetat (10 ml TE/0,1 M LiOAc pH 7,5) wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in 500 µl Lithium-Acetat resuspendiert. Durch alkalische Kationen werden die Hefezellen kompetent für die DNA-Aufnahme.

#### 2.12.13.3 Transformation (Lithium-Acetat-Methode)

Zu 50 µl der kompetenten Hefezellen wurden 1 µg (< 5 µl) zu transformierende DNA (pGint*ERG11*-Konstrukt) sowie 15 µg Einzelstrang-Lachsspermien-DNA gegeben und vorsichtig gevortext. Es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 30°C, in der alle 10 Minuten gevortext wurde. Anschließend wurden 300 µl PEG 8000 (TE, 0,1 M LiOAc, pH 7,5) zugegeben und für weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nachdem die Hefezellen einem Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C ausgesetzt wurden, erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf SD-Platten (ohne Uracil). Diese wurden im Anschluss für 3 Tage bei 30°C inkubiert. War die Transformation erfolgreich, sollten aufgrund des Selektionsgens des Vektors pYES 2 Hefekolonien gewachsen sein.

#### 2.12.13.4 Selektion der Hefezellen auf Minimalmedium

Von den auf SD-Platten (ohne Uracil) gewachsenen Hefekolonien wurde jeweils eine Kolonie in 80 µl Wasser verdünnt und je 5 µl auf Minimalmedium mit oder ohne Tetracyclin ausplattiert. Zusätzlich enthielt das Medium 20 % Galaktose, 10 % Raffinose und 20 µl Aminosäuren-Mix. Die Platten wurden zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.13 Statistische Auswertung und Software

Alle *in vitro*-, Gewächshaus- sowie Großcontainer-Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, dreimal in voneinander unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Wiederholungen der einzelnen Versuchsglieder in einem Versuch wurden bei den entsprechenden Ergebnissen angegeben. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mithilfe des Programms „SigmaStat® 3.5“. Die grafische Darstellung erfolgte mittels „SPSS Statistics 20“ (2012). Die Daten wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft.

Waren die Daten normalverteilt und bestand eine Varianzhomogenität der Gruppenmittelwerte, so wurden die Gruppen mit parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei kam entweder der t-Test zum Einsatz oder, bei mehr als zwei Varianten, die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Lag keine Normalverteilung und/oder Varianzhomogenität vor, erfolgte die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Varianten entweder mit dem Mann-Whitney-Ran-sum-Test bei zwei Gruppen oder dem H-Test nach Kruskal und Wallis (ANOVA on Ranks) bei mehr als zwei Gruppen. Ergab diese Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, schloss sich ein Post hoc-Test an, um festzustellen, welche Varianten voneinander verschieden sind. Als Post hoc-Tests wurden entweder der Holm-Sidak- oder der Tukey-Test verwendet.

**Tab. 12: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Quelle</b>
ClustalW2	<a href="http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi">http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi</a> (2013)
MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis)	Center for Evolutionary Medicine and Informatics; USA
Primer 3	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a> (2013)
Sigmastat 3.5	Systat Software Inc., California; USA
SPSS Statistics 20	IBM Deutschland GmbH; Ehningen
WinRhizo 2009 c Basic, Reg, Pro & Arabidospis	Reagent Instruments Inc; Kanada

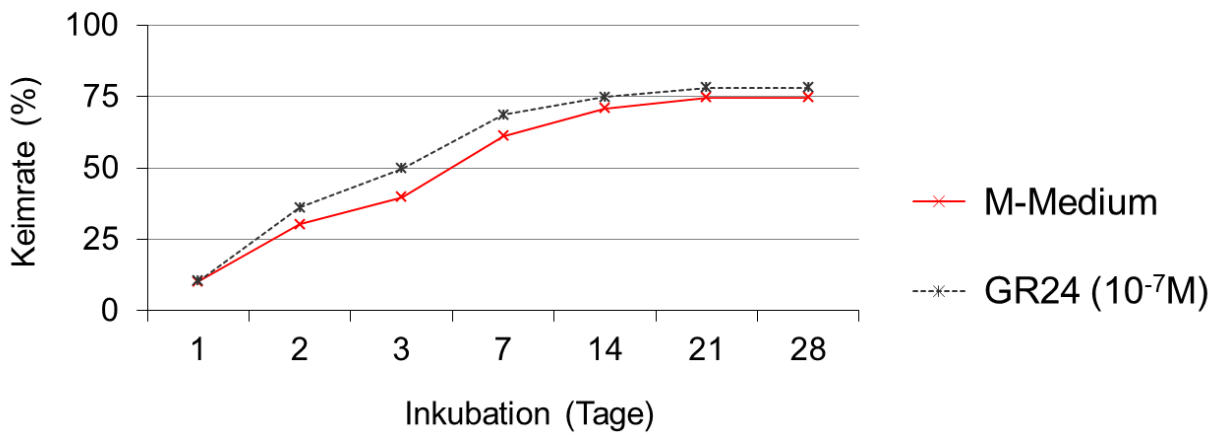
### 3 Ergebnisse

Gegenwärtig liegen nur wenige Informationen zu einer für die landwirtschaftliche Praxis relevanten Anwendung von Fungiziden und ihrem Einfluss auf arbuskuläre Mykorrhizapilze vor. In den bisherigen Untersuchungen überschritten die aufgewendeten Wirkstoffkonzentrationen die praxisüblichen Aufwandmengen. Darüber hinaus sind die Untersuchungen weitgehend auf die Bodenbehandlung oder auf *in vitro* Untersuchungen begrenzt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss ausgewählter, für die Landwirtschaft bedeutender Fungizide auf die Symbiose von Gerste und dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* aussagekräftig zu untersuchen. Im Rahmen der Arbeit wurden die Auswirkungen der Fungizidanwendung in einer schrittweisen Annäherung vom artifiziellen direkten Kontakt über die Saatgutbehandlung in kleinen Pflanzgefäßen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen bis hin zu Versuchen in Großcontainern unter Freilandbedingungen systematisch untersucht. Folgende Wirkstoffe wurden verwendet: Trifloxystrobin, Fluoxastrobin, Penflufen, Triadimenol, Tebuconazol, Prothioconazol, Iaconazol, Fludioxonil, Thiram und Metalaxyl.

#### 3.1 Der direkte Einfluss von Fungiziden auf *Glomus intraradices*

Die Untersuchung der Entwicklung arbuskulärer Mykorrhizapilze ist *in vitro* nur begrenzt möglich, da sie biotrophe Organismen sind. Die Sporenkeimung kann jedoch unabhängig von einem pflanzlichen Partner erfolgen und wurde genutzt, um den Einfluss der Fungizide auf die Sporenkeimung zu untersuchen.

Für die Versuche wurden *Glomus intraradices* Sporen der Firma Amykor GmbH verwendet. Zur *in vitro* Untersuchung ihrer Keimfähigkeit wurden die Sporen auf festem Nährmedium (M-Medium, modifiziert nach Strullu & Romand, 1986) bei 27°C in 24 Well oder 6 Well Platten inkubiert (Abschnitt 2.7.1). Zusätzlich wurde als weitere Kontrolle das Strigolakton-Analog GR24, von dem bekannt ist, dass es die Sporenkeimung positiv beeinflussen kann (Steinkellner *et al.*, 2007), gleichmäßig im Medium verteilt ( $10^{-7}$  M; 0,03 mg/l). Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde die Sporenkeimrate zu ausgewählten Zeitpunkten bestimmt. Dazu wurde die Anzahl gekeimter Sporen auf die Gesamtzahl Sporen pro Well bezogen. Für den Sporenkeimtest wurden verschiedene Sporenchargen verwendet, deren Keimfähigkeit vor jeder Anwendung untersucht wurde. Exemplarisch wird in Abb. 23 die Keimfähigkeit einer in der Arbeit verwendeten Sporencharge aufgezeigt.



**Abb. 23: Keimfähigkeit (%) von *Glomus intraradices* Sporen auf artifiziellem Nährmedium (M-Medium) mit und ohne Zugabe eines Strigolakton-Analogs (GR24) über einen Zeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen einer Sporencharge; n=9)**

Die ersten Sporen keimten bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden aus. Bis zum 14. Inkubationstag stieg die Anzahl gekeimter Sporen stetig bis zu einer maximalen Keimrate von  $75\% \pm 5,3\%$  an. Danach war keine weitere Zunahme gekeimter Sporen zu beobachten. Die Keimraten der Sporen, die dem Strigolakton-Analog GR24 ausgesetzt waren, stagnierten ebenfalls ab diesem Zeitpunkt. Es wurde der erwartete fördernde Effekt von GR24 festgestellt. Für alle verwendeten Sporenchargen wurde die gleiche Dynamik der Sporenkeimung festgestellt, wobei die maximal erreichten Sporenkeimraten zwischen den einzelnen Chargen zwischen 75 % und 90 % variierten.

Die Untersuchung der Keimgeschwindigkeit der verwendeten Sporenchargen wurde durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für die Untersuchung des Fungizideinflusses auf die Sporenkeimung auszuwählen. Dabei sollte die maximale Keimrate noch nicht erreicht, aber ein Zuwachs gekeimter Sporen gegeben sein. Dieser Zeitpunkt war chargenabhängig und wurde daher für jede Charge neu bestimmt.

### 3.1.1 Applikation der Fungizide in das Nährmedium

#### 3.1.1.1 Einfluss der Fungizide auf die Sporenkeimung

Ziel der Versuchsreihe war es, den direkten Einfluss der zehn ausgewählten Fungizide auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* in der Abwesenheit eines pflanzlichen Partners zu untersuchen. Die Hemmung der Sporenkeimung kann die Wurzelkolonisierung in der Anwesenheit eines geeigneten Pflanzenpartners negativ beeinflussen (Zocco *et al.*, 2008). Es wurden 24 Well Platten verwendet, deren Wells jeweils mit 2 ml Nährmedium gefüllt waren. Die Wirkstoffe wurden dem M-Medium vor dem Aushärten in den Verdünnungen  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M (Endkonzentration siehe Abb. 24) zugegeben und im Anschluss 20–30 Sporen pro Well auf der Mediumoberfläche gleichmäßig verteilt. Als Kontrolle diente wirkstofffreies

Medium. Die Sporenkeimrate wurde sieben Tage nach der Inkubation bei 27°C bestimmt. Eine Versuchsreihe wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Um den Einfluss der Wirkstoffe auf die Sporenkeimung zu beurteilen, wurde der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt, der die Konzentration angibt, bei der eine 50 %ige Hemmung der Sporenkeimung durch den Wirkstoff beobachtet wurde (Armitage & Berry, 1994). Daraus wurde der pI<sub>50</sub>-Wert berechnet, der dem negativen Logarithmus des IC<sub>50</sub>-Wertes entspricht (Abb. 24).

Unter den zehn getesteten Wirkstoffen hatte Fludioxonil den stärksten hemmenden Effekt auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices*. Bereits eine Konzentration von 0,1 ppm (10<sup>-6,5</sup> M) führte zu einer 50 %igen Hemmung der Sporenkeimung. Die Wirkstoffe Trifloxystrobin, Fluoxastrobin, Prothioconazol, Ipconazol sowie Thiram wiesen im Vergleich zu Fludioxonil eine mittelstarke Hemmung auf. Die Konzentrationen, die zu einer 50 %igen Hemmung führten, lagen in einem Bereich von 0,3 ppm für Thiram sowie 3 ppm für Prothioconazol. Tebuconazol führte mit einer Konzentration von 9,5 ppm und Penflufen mit 26 ppm zu einer 50 %igen Hemmung der Sporenkeimung. Den geringsten Einfluss im Vergleich zu den übrigen Fungiziden hatten Triadimenol mit 48,5 ppm und Metalaxyl mit 27,9 ppm auf die Sporenkeimung.

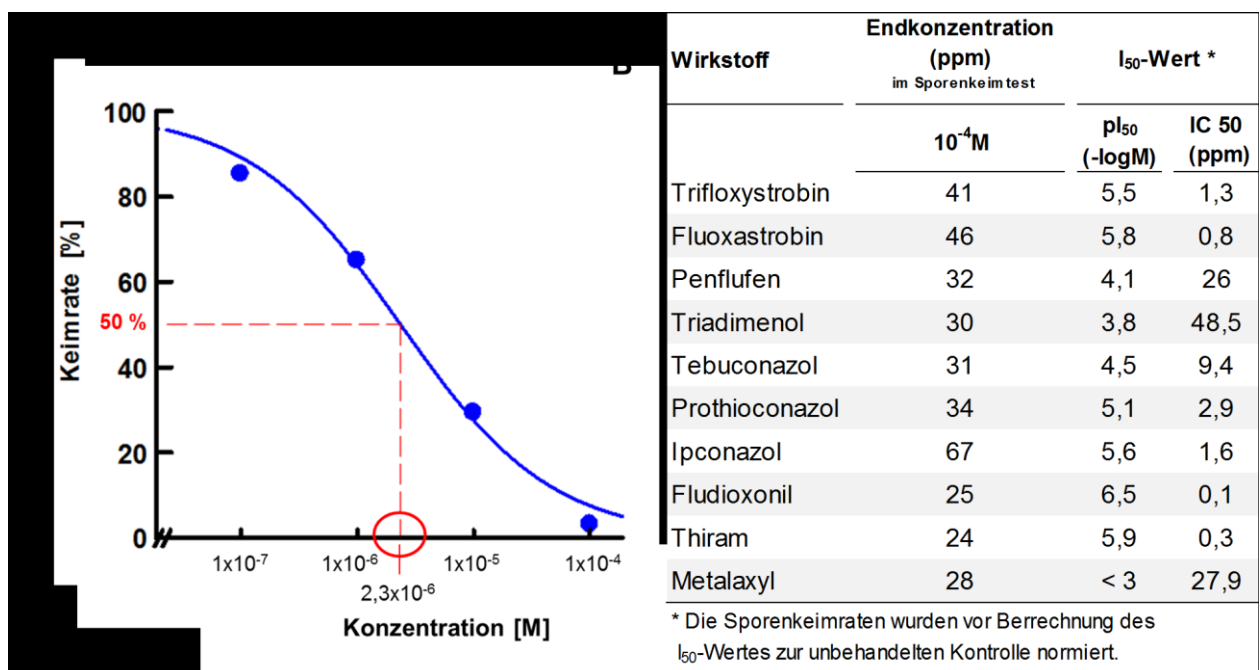
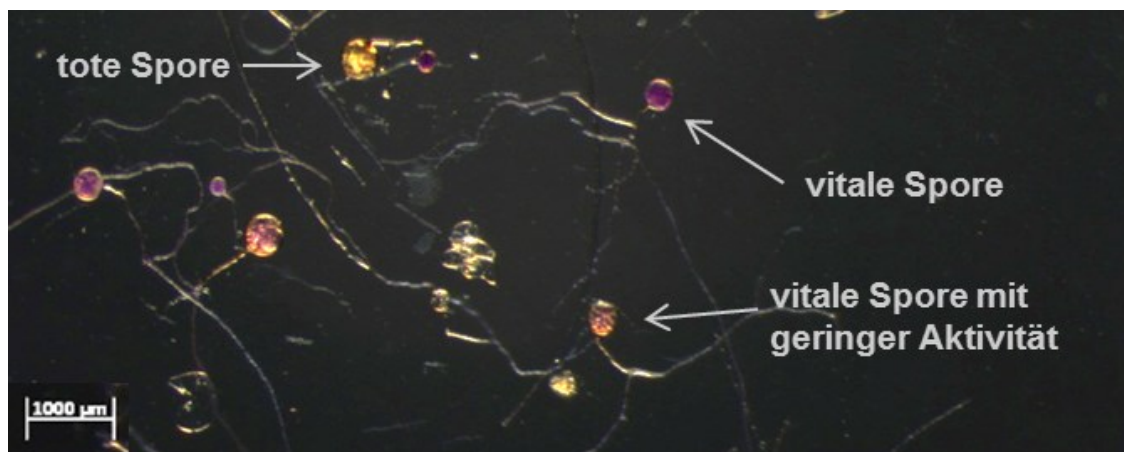


Abb. 24: A) Dosis-Wirkungskurve von Ipconazol auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* mit I<sub>50</sub>-Wert; B) Einfluss der Fungizide auf die Sporenkeimung. Endkonzentration der Wirkstoffe im Nährmedium; I<sub>50</sub>-Werte; (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchseinheiten)

### 3.1.1.2 Einfluss der Fungizide auf die Sporenvitalität

Um festzustellen, ob die Hemmung der Sporen mit einem Vitalitätsverlust einhergeht, wurde die Vitalität der gekeimten und nicht gekeimten Sporen aus Abschnitt 3.1.1.1 untersucht. Alle Sporen wurden mit dem Farbstoff MTT (Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid) gefärbt und für 24 h inkubiert. Mit diesem Test wird die Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen anhand der Umsetzung des gelben MTT-Tetrazoliumsalses zu einem violetten Formazan-Farbstoff (aktiv) bestimmt. Die Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, sodass die Menge an gebildetem Formazan (Abb. 25) als Maß für die Vitalität der Zellen steht. (Mosmann, 1983; Kuhn *et al.*, 1941).



**Abb. 25:** Auswertung der Vitalität von *Glomus intraradices* Sporen nach der Inkubation in wirkstofffreiem Medium; (MTT-Färbung: Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid; vitale Sporen: pink bis dunkelrot; tote Sporen: weiß bis gelb gefärbt)

Zur Auswertung der Färbung wurde zwischen gekeimten und nicht gekeimten Sporen differenziert. Für die Sporenvitalität in Prozent (Tab. 13) wurde die Anzahl vitaler Sporen zur Gesamtzahl der untersuchten Sporen ins Verhältnis gesetzt (Sporenvitalität = Anzahl vitale Sporen/Gesamtzahl Sporen pro Well).

**Tab. 13:** Relative Sporenceimrate und Sporenvitalität (%) der unter Fungizideinfluss nicht ausgekeimten Sporen (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchseinheiten)

Wirkstoff	relative <sup>1</sup> Sporenceimrate (%)				relative <sup>1</sup> Sporenvitalität (%) der nicht gekeimten Sporen			
	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
Trifloxystrobin	21*	34*	28*	26*	100	100	100	100
Fluoxastrobin	19*	44*	51*	47*	100	100	100	100
Penflufen	40*	73	94	85	100	100	100	100
Triadimenol	65	78	100	100	100	100	78	100
Tebuconazol	65	81	94	94	100	100	100	100
Prothioconazol	52*	48*	83	85	100	100	100	100
Ipconazol	27*	50*	74	100	100	100	100	100
Fludioxonil	45*	47*	52*	49*	100	100	100	100
Thiram	34*	50*	44*	94	100	100	100	100
Metalaxyl	87	100	100	100	77	69	100	100

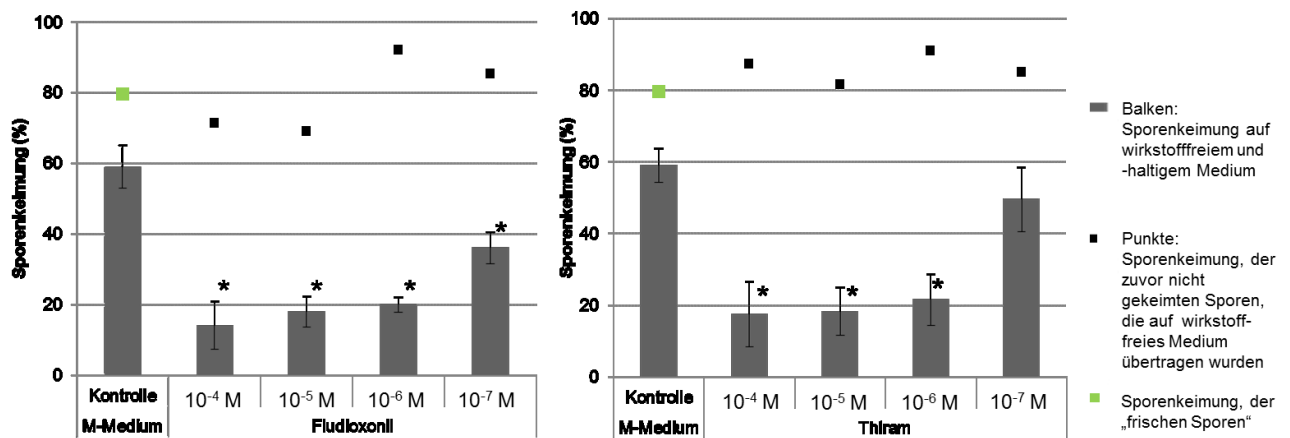
<sup>1</sup> Die Sporenceimrate (%) und Sporenvitalität (%) der behandelten Varianten wurden zum wirkstofffreiem Medium normiert.

\* Signifikanter Unterschied zum wirkstofffreiem Medium; One Way RM ANOVA on ranks; p<0,05, n=8.

Wie im vorherigen Abschnitt 3.1.1.1 gezeigt war die Sporenkeimung durch einige Wirkstoffe signifikant gehemmt. Die Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen war hingegen in diesen Sporen durch keine der getesteten Wirkstoffkonzentrationen nachweislich beeinflusst. Für die unter Fungizideinfluss nicht ausgekeimten Sporen wurde mit Ausnahme von Metalaxyl eine relative Vitalität von 100 % aufgezeigt (Tab. 13). Die beobachtete Reduktion der Vitalität war statistisch nicht abzuschließen.

### 3.1.1.3 Untersuchung der Sporenkeimfähigkeit nach dem Einfluss von Thiram und Fludioxonil

Es wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Keimung bei direktem Wirkstoff-Kontakt nicht mit einem Vitalitätsverlust der Sporen einhergeht (Tab. 13). Darüber hinaus sollte auch das Keimverhalten der Sporen nach einer Fungizid-Behandlung in Abwesenheit des Wirkstoffes untersucht werden. Fludioxonil und Thiram wurden dafür exemplarisch ausgewählt. Beide Wirkstoffe führten in den vier getesteten Konzentrationen zu einer signifikanten Hemmung der Sporenkeimung gegenüber der unbehandelten M-Medium-Kontrolle (Abb. 24). Die Sporen, die unter dem Einfluss der beiden Wirkstoffe nicht ausgekeimt waren, wurden auf reines Nährmedium transferiert. Nach sieben Inkubationstagen bei 27°C wurde die Sporenkeimrate bestimmt (Abb. 26). Als Kontrolle dienten frisch aufgetragene Sporen, die zuvor bei 4°C gelagert wurden.



**Abb. 26: Keimfähigkeit von zuvor unter Fungizideinfluss gehemmten *Glomus intraradices* Sporen auf wirkstofffreiem M-Medium nach 7 Inkubationstagen (Fludioxonil, Thiram; \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle M-Medium; One Way RM ANOVA on ranks;  $p > 0,05$ ;  $n=10$ )**

In der Kontrolle „frische Sporen“ wurde eine Sporenkeimrate von 80 %  $\pm$  2,3 % bestimmt. Die mit Wirkstoff behandelten zuvor nicht ausgekeimten Sporen, die auf wirkstofffreies Medium übertragen wurden, keimten ebenfalls aus und lagen mit Sporenkeimraten zwischen 70 % und 90 % im Bereich der Kontrolle „frische Sporen“. Trotz hemmenden Effekts von Thiram und Fludioxonil auf die Sporenkeimung war die Keimfähigkeit der Sporen unbeeinflusst.

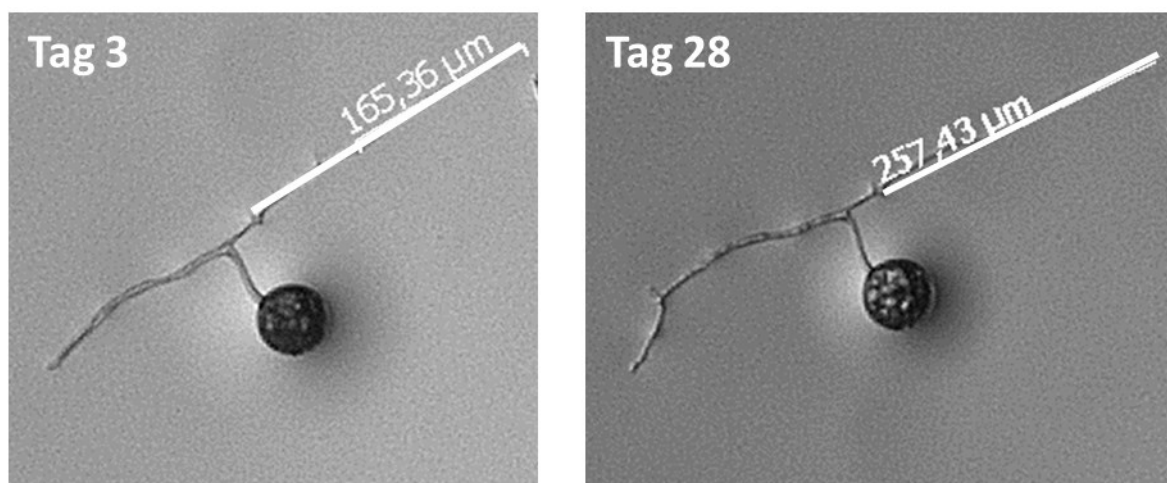


### 3.1.2 Spezielle Untersuchung der Sensitivität von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden

Eine für die Landwirtschaft bedeutende Fungizid-Klasse bilden die Azol-Fungizide (Kuck & Vors; 2007). Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung der Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase in der Sterolbiosynthese, welche die Hemmung jeglicher pilzlicher Wachstumsvorgänge zur Folge haben kann (Fuller *et al.*, 1990, Fontaine *et al.*, 2001, 2004). Im vorherigen Abschnitt 3.1.1.1 wurde gezeigt, dass die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* durch die Azol-Fungizide Tebuconazol und Prothioconazol in Abhängigkeit von der Konzentration gehemmt wird und die Vitalität der gehemmten Sporen dabei unbeeinflusst bleibt. Im Folgenden wurde exemplarisch am Beispiel beider Wirkstoffe untersucht, ob weitere Wachstumsvorgänge zu späteren Entwicklungszeitpunkten beeinflusst werden.

#### 3.1.2.1 Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Keimschlauchverlängerung

Bei arbuskulären Mykorrhizapilzen kann die Hemmung der Keimschlauchverlängerung bei Anwesenheit eines pflanzlichen Partners negative Auswirkungen auf eine erfolgreiche Kolonisierung haben (Fontaine *et al.*, 2004). Da die Wirkstoffe Tebuconazol und Prothioconazol die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* nicht zu 100 % hemmten, konnte die Keimschlauchverlängerung bei den auskeimenden Sporen untersucht werden. Dazu wurden die auf wirkstoffhaltigem M-Medium (30 ppm; 3 ppm; 0,3 ppm) auskeimenden Sporen über einen Versuchszeitraum von 28 Tagen in regelmäßigen Abständen fotografiert und die Länge des Keimschlauches mithilfe der Software AxioVision der Firma Zeiss bestimmt (Abb. 27). Als Kontrolle diente wirkstofffreies Medium. Insgesamt wurden 25 Sporen pro Variante ausgewertet.



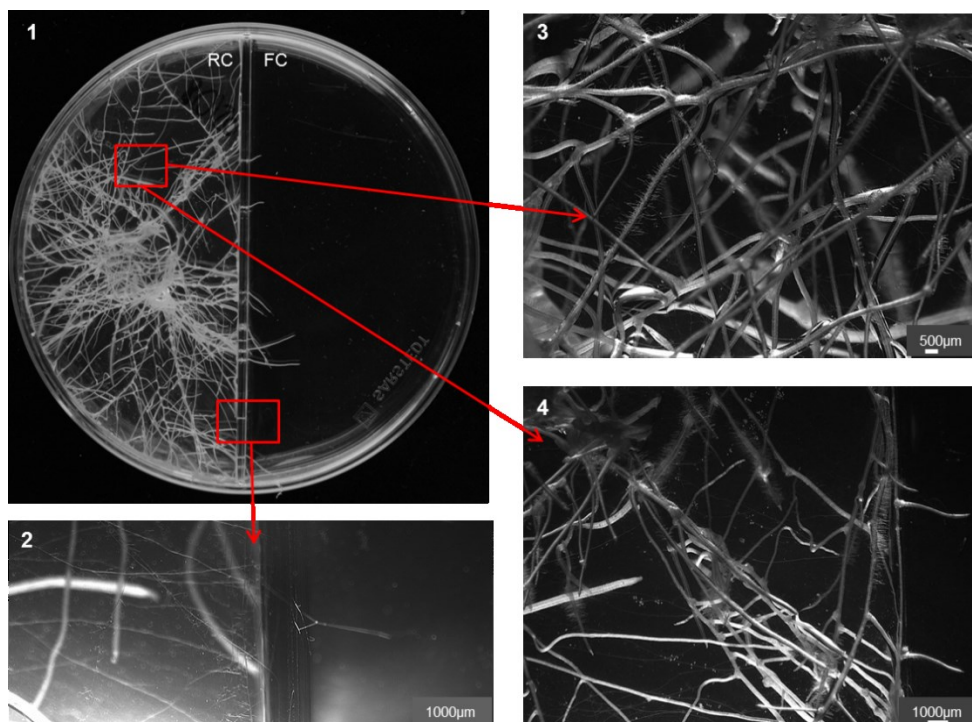
**Abb. 27: Auswertung zur Bestimmung der Keimschlauchlänge von *Glomus intraradices* auf wirkstofffreiem M-Medium: identische Spore am 3. und 28. Tag nach Versuchsbeginn**

Vom dritten bis zum letzten Inkubationszeitpunkt wurde ein Zuwachs des Keimschlauches auf wirkstofffreiem Medium von insgesamt 130  $\mu\text{m}$  gemessen. Die durchschnittliche Keimschlauchlänge auf wirkstofffreiem Medium betrug am 3. Inkubationstag 160  $\mu\text{m}$  und nach

28 Inkubationstagen 290  $\mu\text{m}$ . In der Konzentration 30 ppm Prothioconazol war die Keimschlauchlänge nach 28 Inkubationstagen um 100  $\mu\text{m}$  kürzer als auf wirkstofffreiem Medium. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. In den Prothioconazol-Konzentrationen 3 ppm und 0,3 ppm wurde kein Einfluss auf die Verlängerung des Keimschlauches festgestellt. Tebuconazol beeinflusste die Keimschlauchverlängerung ebenfalls nicht.

### 3.1.2.2 Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Sporenproduktion im Wurzelkultur-System

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss von Tebuconazol sowie Prothioconazol auf die Reproduktionsphase (Myzelwachstum, Sporenproduktion) von *Glomus intraradices* in einer bereits etablierten Symbiose untersucht. Da die Analyse bestimmter Entwicklungsschritte der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in Gefäß- oder Freilandversuchen durch nicht kontrollierbare Umweltfaktoren beeinflusst werden kann, wurde das monoxenische Wurzelkultur-System verwendet (Dual-Kompartiment-System; Abb. 28). Dabei handelt es sich um die Kultivierung eines Organismus, z.B. Chicorée-Wurzeln, in der Gegenwart eines weiteren Organismus, z.B. *Glomus intraradices*. Mit diesem System ist die räumliche Trennung zwischen extraradikalem Myzel und der Wirtswurzel und somit die Produktion relativ großer Mengen Pilzmaterial getrennt vom Wirt – aber symbiotisch verbunden – möglich (Zocco *et al.*, 2008).



**Abb. 28:** Mikroskopie-Aufnahmen einer 6 Wochen alten monoxenischen Wurzelkultur von Chicorée-Wurzeln und *Glomus intraradices*; 1) Übersicht Dual-Kompartiment-Platte (RC: root compartment, FC: fungal compartment); 2) Nahaufnahme der Trennwand mit in das pilzliche Kompartiment wachsender Hyphe; 3,4) Nahaufnahme der mit *Glomus intraradices* kolonisierten Wurzeln

Das System besteht aus einer zweigeteilten Petrischale, die sich in Wurzel- und Pilzkompartiment aufteilt. Im Wurzelkompartiment befindet sich das Nährmedium M-Medium, auf dem das mit *Glomus intraradices* mykorrhizierte Chicorée-Wurzelsystem wuchs. In der Reproduktionsphase des Pilzes breitet sich das Myzel zunächst im Wurzelkompartiment aus und überbrückt schließlich die Trennwand, um im Pilzkompartiment weiter zu wachsen und Sporen zu bilden. Das Nährmedium im Pilzkompartiment wurde vor dem Aushärten mit Tebuconazol sowie Prothioconazol in den Konzentrationen 30 ppm, 3 ppm sowie 0,3 ppm versetzt. Nach sieben, neun und elf Wochen Inkubation bei 27°C wurde die Anzahl der Sporen im Pilzkompartiment ausgewertet. Diese Zeitpunkte entsprechen der Reproduktionsphase von *Glomus intraradices* im Dualen-Wurzelkultur-System. Das Pilzkompartiment wurde in acht 1 cm x 1 cm große Abschnitte, die über die ganze Fläche des Kompartiments verteilt waren, unterteilt und in diesen die Anzahl der Sporen ausgezählt. Anschließend wurde die Summe der Sporen pro Petrischale bestimmt. Pro Variante wurden fünf Wiederholungen ausgewertet. Als Kontrollen dienten wirkstofffreies Medium sowie das Lösungsmittel Aceton (0,05 %) in dem die Wirkstoffe gelöst wurden.

Nach siebenwöchiger Inkubation war das gesamte Pilzkompartiment beider Arten von Kontrollen mit Sporen und Myzel ausgefüllt. Bei einer Konzentration von 30 ppm beider Fungizide war das Wachstum des Myzels auf den Bereich um die Trennwand zwischen Wurzel- und Pilzkompartiment beschränkt, während bei geringeren Konzentrationen das Myzel gleichmäßig über das gesamte Pilzkompartiment verteilt war. Die Myzelstruktur in beiden Kontrollen sowie in den Wirkstoffkonzentrationen 3 ppm und 0,3 ppm war durch eine hohe Anzahl verzweigter und dichter Strukturen charakterisiert, während das Myzel in der mit 30 ppm Wirkstoff behandelten Variante weniger verzweigt und die Ausbreitung auf die Oberfläche des Mediums beschränkt war.

Über den Untersuchungszeitraum wurde ein Zuwachs der Sporenmenge in beiden Kontrollen von 20 % bestimmt (Tab. 14). In der Lösungsmittelkontrolle Aceton war die Sporenmenge gegenüber dem wirkstofffreien Medium erhöht. Der Unterschied lag innerhalb der biologischen Varianz, sodass er nicht signifikant war. In der Konzentration 30 ppm wirkten Tebuconazol und Prothioconazol signifikant reduzierend auf die Sporenmenge. Die relative Sporenmenge lag bei 3 %, was einem Wirkungsgrad von 97 % entspricht. Geringere Konzentrationen Tebuconazol wirkten sich nicht reduzierend aus. Prothioconazol hingegen führte auch mit 3 ppm zu einer signifikanten Reduktion der Sporenmenge gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. In der Konzentration 0,3 ppm hatte es keinen signifikanten Einfluss auf die Sporenanzahl.

**Tab. 14: Sporenanzahl von *Glomus intraradices* im Pilzkompartiment des Wurzelkultur-Systems in Ab- bzw. Anwesenheit von Lösungsmittel und Wirkstoff**

Variante	Konzentration	Anzahl der Sporen pro Petrischale		
		7 Wochen	9 Wochen	11 Wochen
nach Fungizidapplikation				
<b>Wirkstofffrei</b>		662 <sup>a</sup>	765 <sup>a</sup>	845 <sup>a</sup>
<b>Aceton</b>	0,05%	1061 <sup>a</sup>	1229 <sup>a</sup>	1306 <sup>a</sup>
<b>Tebuconazol</b>	0,3 ppm	611 <sup>a</sup>	646 <sup>a</sup>	656 <sup>a</sup>
	3 ppm	682 <sup>a</sup>	918 <sup>a</sup>	1027 <sup>a</sup>
	30 ppm	17 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>
<b>Prothioconazol</b>	0,3 ppm	442 <sup>a</sup>	568 <sup>a</sup>	585 <sup>a</sup>
	3 ppm	158 <sup>b</sup>	168 <sup>b</sup>	212 <sup>b</sup>
	30 ppm	26 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>

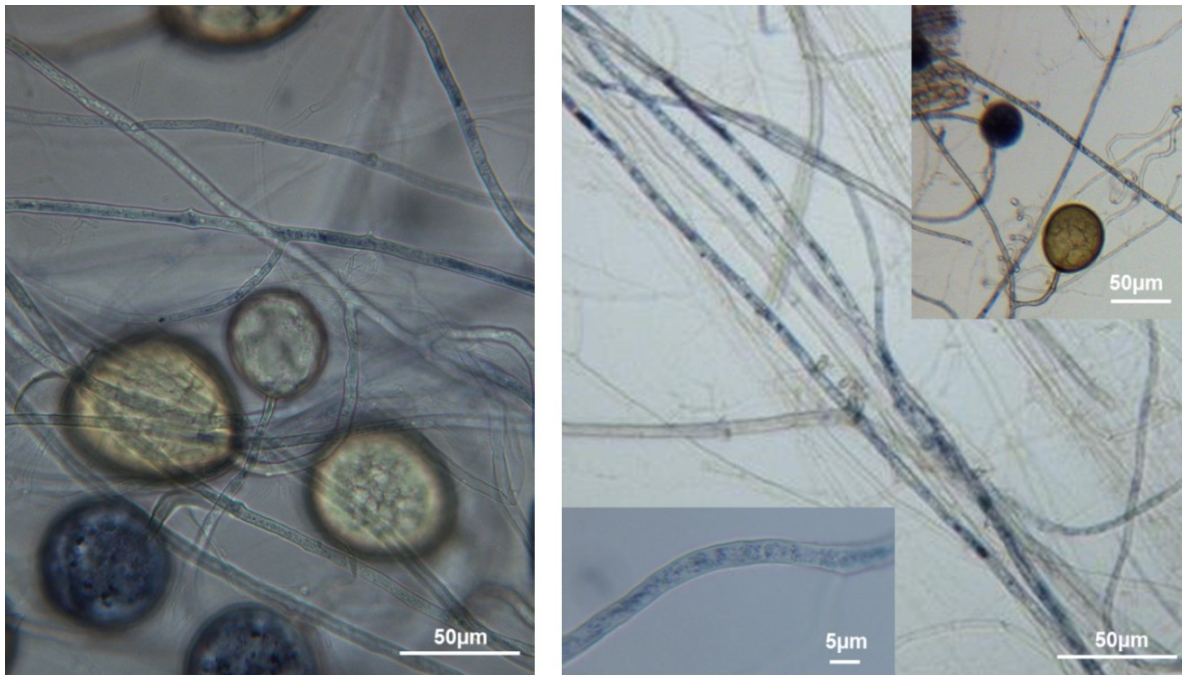
\* Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied in einer Spalte, One Way RM ANOVA on ranks, Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ,  $n=5$  (pairwise multiple comparison)

Mit zunehmender Wirkstoffkonzentration wurde das Myzelwachstum und die Sporenproduktion von *Glomus intraradices* durch Tebuconazol und Prothioconazol im Wurzelkultur-System gehemmt. Eine Wirkstoffkonzentration von 0,3 ppm hatte keinen Einfluss.

### 3.1.2.3 Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Vitalität des extraradikalen Myzels im Wurzelkultur-System

In der Regel reagieren die für Azol-Fungizide sensitiven Pilze bereits nach kurzzeitiger Wirkstoffexposition mit einem Wachstumsstopp, der durch die Sterol-Mangelsituation hervorgerufen wird. Im vorherigen Abschnitt 3.1.2.2 wurde gezeigt, dass das Myzelwachstum und die Sporenproduktion von *Glomus intraradices* durch die Konzentration 30 ppm Tebuconazol sowie Prothioconazol reduziert war. In dieser Versuchsreihe war es nicht möglich die enzymatische Aktivität (Vitalität) im Myzel nach kurzzeitiger Wirkstoffexposition (24h) zu untersuchen, da kein Myzelwachstum gegeben war. Daher wurde Myzel verwendet, das sich im Pilzkompartiment in flüssigem Nährmedium zunächst ohne Wirkstoffzugabe entwickelte. War das Pilzkompartiment mit Myzel ausgefüllt, wurden die Wirkstoffe in den Konzentrationen 0,3 ppm und 30 ppm dem Nährmedium zugegeben. Die Vitalität des Myzels wurde nach 24h, 48h sowie 7 Tagen Inkubationszeit bestimmt. Eine gängige Methode der Vitalitätsbestimmung ist die NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumsalz), mit der die Succinat-Dehydrogenase Aktivität (SDH – Komplex II der mitochondrialen Atmung) nachgewiesen wird. Es handelt sich dabei um eine enzymatische Färbung, bei der die Reaktionslösung Succinylsäure als Substrat sowie Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) als Indikator für die Enzymaktivität enthält. Ist Komplex II aktiv, so wird Succinat zu

Fumarat oxidiert und NBT reduziert, welches daraufhin als blauer unlöslicher Niederschlag ausfällt. Bei Inaktivität des Komplexes ist keine Färbung des Myzels und anderer pilzlicher Strukturen zu erwarten.



**Abb. 29: Bestimmung der Vitalität des extraradikalen Myzels von *Glomus intraradices* mittels NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumsalz) nach 48h Inkubation in wirkstofffreiem Nährmedium (blau: Aktivität der Succinat-Dehydrogenase; keine Färbung: keine Aktivität)**

Die Auswertung der Färbung wurde mithilfe des Lichtmikroskops (100-fache Vergrößerung) durchgeführt. Es wurde dabei die Fläche der blaugefärbten Strukturen im Vergleich zur ungefärbten Fläche abgeschätzt (Abb. 29).

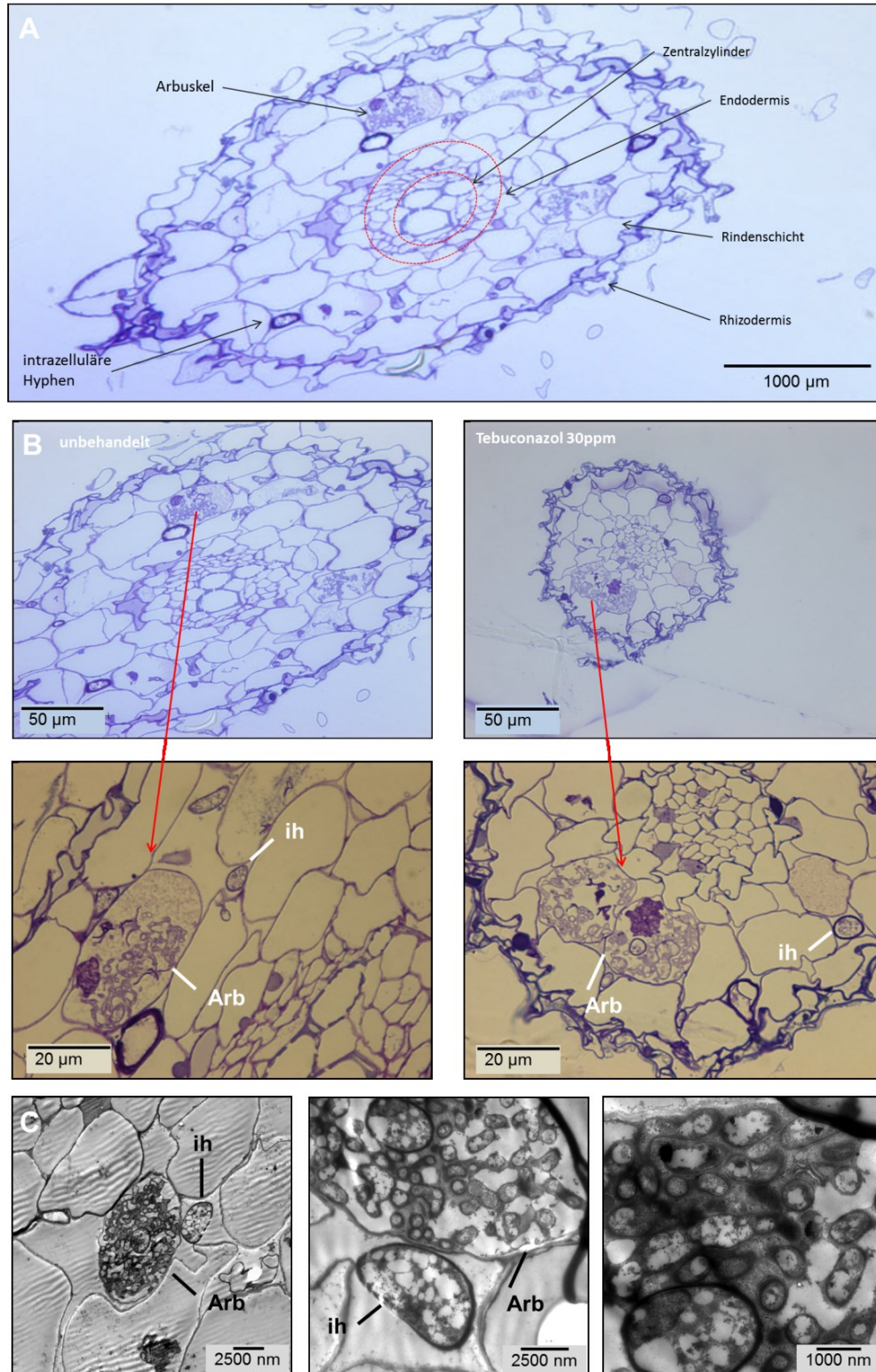
Der Anteil gefärbten Myzels betrug zu allen Zeitpunkten in der wirkstofffreien Kontrolle 40 %. Zu keinem Zeitpunkt war der Anteil gefärbten Myzels in den mit Wirkstoff behandelten Varianten gegenüber der wirkstofffreien Variante beeinflusst.

In Abschnitt 3.1.2.2 wurde demonstriert, dass eine Konzentration von 30 ppm Tebuconazol und Prothioconazol die Myzel-Entwicklung hemmt. Erfolgte die Wirkstoff-Zugabe hingegen zu einem Zeitpunkt zu dem das extraradikale Myzel bereits entwickelt war, wurde kein Effekt der Wirkstoffe auf die enzymatische Aktivität des Myzels nachgewiesen (Abschnitt 3.1.2.3).

#### 3.1.2.4 Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Arbuskeln in Chicorée-Wurzeln

Arbuskeln können ein Indiz für die Funktionalität der Mykorrhiza-Symbiose sein (Bécard & Piché, 1989 a; Giannazzi-Pearson *et al.*, 1995; Bago *et al.*, 1998). In der Abwesenheit von Arbuskeln kann der arbuskuläre Mykorrhizapilz zwar in seiner interzellularen Phase überleben, ein extensives Wachstum des Pilzes ist jedoch nicht zu erwarten (Soberon & Rio, 1985; Bécard & Piché, 1989 a). Der Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Arbuskeln in Chicorée-Wurzeln aus dem

Wurzelkultur-System wurde untersucht. Die Wurzeln, die in das pilzliche Kompartiment mit wirkstoffhaltigem Medium (0,3 ppm; 30 ppm) gewachsen waren, wurden dafür verwendet. Die Inkubationszeit der Wurzeln betrug 7 Tage. Von den Wurzeln wurden Semidünnschnitte angefertigt und diese mikroskopisch ausgewertet.



**Abb. 30:** A–C) Lichtmikroskop-Aufnahme von Semidünnschnitten von Chicorée-Wurzeln im Querschnitt, kolonisiert mit *Glomus intraradices* im Wurzelkultur-System; A) Übersicht des Wurzelquerschnittes; B) Wurzeln unbehandelt und mit 30 ppm Tebuconazol behandelt. (ih: intraradikale Hyphe; Arb: Arbuskel); C) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen einer Arbuskel im Querschnitt

In den untersuchten Wurzelstücken waren mykorrhizatypische Strukturen wie Arbuskeln und interzelluläre Hyphen in der Rindenschicht der Wurzel vorhanden (Abb. 30). Es waren degenerierte als auch funktionstüchtige Arbuskeln vorhanden. In den mit Wirkstoff behandelten Wurzeln waren die Arbuskel-Strukturen gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht verändert. Die Analyse elektronenmikroskopischer Bilder zeigte keinen Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Anzahl und Struktur der Arbuskeln.

Diese Versuchseinheit ist statistisch nicht abgesichert, weil der umfangreiche zeitliche und materielle Mehraufwand, der für die Etablierung der Wurzelkultur nötig ist, unverhältnismäßig im Vergleich zum Ergebnis war.

### **3.1.3 Applikation der Fungizide auf Gerstensaatgut**

#### **3.1.3.1 Einfluss der Fungizide auf die Sporenkeimung**

In der folgenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* beeinflusst wird, wenn eine Saatgutbehandlung mit den ausgewählten Wirkstoffen in der praxisüblichen Aufwandmenge vorgenommen wird. Da die Sporenkeimung in Gefäß- oder Freilandversuchen durch äußere Umweltfaktoren beeinflusst wird, fanden die Untersuchungen unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen statt (Abschnitt 2.7.1). Im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.1) wurden reduzierte Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt, die der praxisüblichen sowie der zehnfach erhöhten Aufwandmenge entsprachen (Tab. 4). Zudem wurden die Sporen mit 1 cm Abstand zum behandelten Saatkorn platziert. Das Gerstensaatgut wurde vor Versuchsbeginn autoklaviert, um die Oberfläche zu desinfizieren, anschließend wurde es mit Fungizid behandelt. Die Keimung der Sporen erfolgte auf wirkstofffreiem Medium in 6 Well Platten, in dessen Well-Mitte sich jeweils ein Saatkorn befand (Abb. 11). Es wurden 20 bis 30 Sporen mit einem Abstand von 1 cm zum Korn punktförmig in drei Positionen auf das Nährmedium platziert. Unbehandeltes Saatgut wurde als Kontrolle verwendet. Eine Versuchsreihe wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die Bestimmung der Sporenkeimrate erfolgte vier Tage nach Versuchsansatz und lag zu diesem Zeitpunkt in der unbehandelten Kontrolle bei 70 % ± 11 % (Tab. 15). Die Sporenkeimung wurde durch keinen der Wirkstoffe gehemmt oder gefördert, wenn diese in der praxisüblichen Aufwandmenge aufgebracht wurden. Die zehnfache Erhöhung der Aufwandmenge führte zur Reduktion der Sporenkeimung in den Varianten Trifloxystrobin, Penflufen, Triadimenol sowie Prothioconazol, wobei die Hemmung von Prothioconazol am stärksten war. Die absolute Sporenkeimung lag jedoch im Bereich der biologischen Varianz, sodass kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar war.

**Tab. 15: Relative Sporenkeimung (%) von *Glomus intraradices* nach viertägiger Inkubation auf M-Medium in der Anwesenheit eines mit Wirkstoff behandelten Saatguts (Entfernung der Sporen vom Saatkorn: 1 cm)**

Wirkstoff	Aufwandmenge (1-fach)	relative <sup>1</sup> Sporenkeimung (%)	
		Aufwandmenge	
		1-fach	10-fach
Trifloxystrobin	2,2 µg/Korn	92	77
Fluoxastrobin	3,4 µg/Korn	85	88
Penflufen	2,2 µg/Korn	83	69
Triadimenol	16 µg/Korn	83	67
Tebuconazol	1,3 µg/Korn	98	100
Prothioconazol	4,5 µg/Korn	80	63
Ipconazol	1,1 µg/Korn	90	98
Fludioxonil	2,2 µg/Korn	85	96
Thiram	36 µg/Korn	89	83
Metalaxyl	1,1 µg/Korn	92	100

<sup>1</sup> Die absolute Sporenkeimung der behandelten Varianten wurde zur Keimrate der unbehandelten Kontrolle normiert (Kontrolle = 100).

### 3.2 Der Einfluss von Fungiziden auf die Mykorrhiza-Symbiose zwischen *Glomus intraradices* und Gerstenwurzeln

Ein weiteres Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Fungizide auf die Interaktion zwischen *Glomus intraradices* und Gerstenwurzeln in Gefäßexperimenten unter Gewächshaus- und Freilandbedingungen zu untersuchen.

In ersten Untersuchungen wurde unter kontrollierten Gewächshausbedingungen am Modellsystem Gerste und *Glomus intraradices* der Einfluss einer Wirkstoffgießapplikation auf die frühe Etablierungsphase sowie das Reproduktionsstadium des Pilzes untersucht. Der Pilz war dabei im Vergleich zur Praxis dem Wirkstoff direkt und in hoher Konzentration ausgesetzt.

Im Gegensatz dazu stand die Untersuchung des Einflusses einer Saatgutbehandlung auf die sich entwickelnde Mykorrhiza-Symbiose unter kontrollierten Gewächshaus- sowie Freilandbedingungen. Es wurde untersucht, ob das Kolonisierungsverhalten von *Glomus intraradices* durch die Fungizide beeinträchtigt wird, wenn diese unter praxisrelevanten Bedingungen als Saatgutbehandlung in der empfohlenen Aufwandmenge appliziert werden.

Zur Anzucht der Gerstenpflanzen im Gewächshaus wurden 15 cm hohe Rosentöpfe mit einem Fassungsvermögen von 500 ml verwendet. Diese waren gegenüber herkömmlichen Töpfen tiefer und sollten ein tiefgehendes Wurzelwachstum ermöglichen. Gerstensaatzgut der Wintersorte „Duet“



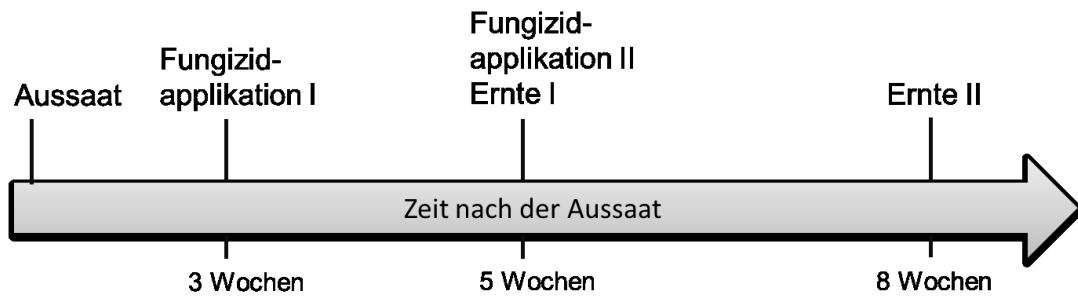
wurde in einem Gemisch aus Quarzsand:Perlite (1:1) ausgesät. Um eine Kolonisierung der Wurzeln zu erzielen, wurde dem Substrat Inokulum (10 g/l Substrat) mit keimfähigen Sporen und Myzel von *Glomus intraradices* (100 cfu/g) beigemischt. Die Pflanzen wurden einmal wöchentlich gewässert sowie im Abstand von drei Tagen mit Hoagland-Lösung gedüngt. Die Phosphat-Konzentration der Düngertlösung betrug dabei 20 µM. Die Ernte der Gerstenwurzeln erfolgte, wenn nicht anders angegeben, ab fünf Wochen nach Versuchsansatz, im wöchentlichen Rhythmus bis acht Wochen nach Versuchsansatz. Pro Variante wurden drei Wiederholungen á fünf Töpfen angesetzt, die randomisiert in der Gewächshauskammer aufgestellt wurden. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander, zu verschiedenen Zeitpunkten im Jahr durchgeführt. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, jeweils um eine repräsentative Versuchsreihe.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades der Gerstenwurzeln (Abschnitt 2.11.2). Dafür wurde, wenn nicht anders angegeben, das gesamte Wurzelmaterial aus fünf Töpfen, die einer Wiederholung entsprachen, in ca. 1 cm große Stücke zerteilt und randomisiert Proben (mind. 1 g) für die Mikroskopie entnommen. Anschließend wurden dreimal 45 Wurzelstücke pro Variante auf Objektträgern fixiert und die mikroskopische Bestimmung der Kolonisierung durchgeführt. Insgesamt wurden 405 Wurzelstücke pro Variante untersucht (Abb. 17). Dies ergibt sich aus den drei Wiederholungen innerhalb einer Versuchsreihe. Zur Bonitur der Mykorrhizierung wurde eine Modifizierung der Methode nach Trouvelot *et al.* (1986) herangezogen. Ein Wurzelabschnitt galt als mykorrhiziert, wenn mindestens eine der mykorrhizatischen Strukturen wie Arbuskeln, Vesikel oder Hyphen vorlag.

Die detaillierte Beschreibung der Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades ist dem Material- und Methodenteil zu entnehmen (Abschnitt 2.11.2).

### 3.2.1 Gießapplikation

Die Fungizid-Lösungen (Abschnitt 2.1.2) wurden drei und fünf Wochen nach Versuchsansatz in das Substrat gegossen, sodass der Pilz dem Wirkstoff direkt ausgesetzt war. Bei den Zeitpunkten handelt es sich um die frühe Etablierungsphase sowie das Reproduktionsstadium des Pilzes. Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss der Wirkstoffe auf diese Entwicklungsphasen der Mykorrhiza-Symbiose, bei gleichmäßiger Verteilung der Wirkstoffe im Substrat, zu untersuchen. Die Wirkstoffkonzentrationen betragen 0,5 ppm sowie 5 ppm. Fünf und acht Wochen nach Versuchsansatz erfolgte die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades. Die Wurzeln, die nach achtwöchiger Inkubation geerntet wurden, waren zweimal mit den Wirkstoffen behandelt (Abb. 31). Als Kontrollen dienten eine unbehandelte Kontrolle, die zum entsprechenden Zeitpunkt mit 50 ml Wasser gegossen wurde, sowie eine 5 ppm NMP-Lösungsmittelkontrolle (N-Methyl-2-Pyrrolidon).



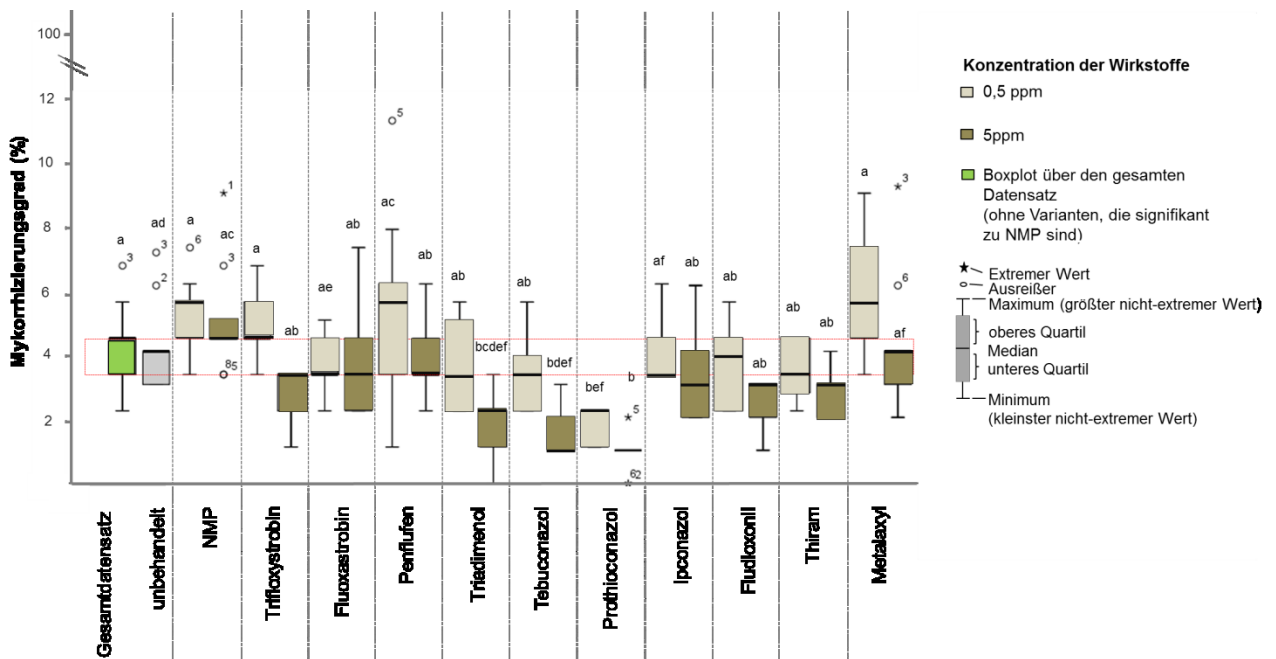
**Abb. 31: Zeitschema der Fungizidapplikation und Erntezeitpunkte**

### 3.2.1.1 Einfluss der Fungizide auf den Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelgehalt

Fünf Wochen nach Versuchsansatz waren die Gerstenwurzeln aller Varianten im Durchschnitt zu  $2\% \pm 0,7\%$  mit *Glomus intraradices* kolonisiert. Zu diesem Zeitpunkt war der Mykorrhizierungsgrad durch keinen der verwendeten Wirkstoffe gegenüber der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle erhöht oder erniedrigt. Die Wirkstoffe haben also, wenn sie in das Substrat gegossen werden, keinen Einfluss auf die frühe Etablierungsphase von *Glomus intraradices*.

Über den Versuchszeitraum nahm der Mykorrhizierungsgrad um drei Prozentpunkte in der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle zu. In der unbehandelten Kontrolle waren  $4\% \pm 0,5\%$  und in der NMP-Kontrolle  $5\% \pm 0,2\%$  der Wurzeln kolonisiert.

Zum zweiten Analysezeitpunkt 8 Wochen nach Aussaat wurden signifikant negative Unterschiede zur NMP-Kontrolle in den Varianten 0,5 ppm und 5 ppm Prothioconazol sowie 5 ppm Tebuconazol nachgewiesen. Die relativen Mykorrhizierungsgrade dieser Varianten waren geringer als 50 % und wurden als starke Hemmung klassifiziert. Durch die Wirkstoffkonzentration 5 ppm Triadimenol sowie Trifloxystrobin und Fludioxonil war der Mykorrhizierungsgrad ebenfalls reduziert. Der Unterschied zur NMP-Kontrolle war statistisch nicht signifikant. Die nachfolgende Boxplot-Graphik (Abb. 32) verdeutlicht die Verteilung der erfassten Mykorrhizierungsgrade innerhalb einer Variante. Um zu zeigen, in welchem Bereich 50 % der Werte des gesamten Datensatzes lagen, wurde ein Boxplot über den Gesamtdatensatz erstellt (grüner Kasten). Die Varianten, die signifikant unterschiedlich zur NMP-Kontrolle waren und dadurch zur Verringerung des durchschnittlichen Mykorrhizierungsgrades geführt hätten, wurden für diese Berechnung nicht mit einbezogen.



**Abb. 32: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenpflanzen inokuliert mit *Glomus intraradices* mit Applikation der Wirkstoffe (0,5 ppm, 5 ppm) 3 Wochen und 5 Wochen nach Aussaat (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-Test,  $p < 0,05$ ;  $n = 9$ )**

Trotz hohen Stichprobenumfangs von 405 untersuchten Wurzelstücken pro Variante variierte die Höhe des Mykorrhizierungsgrades zwischen 1 % und 10 % in allen Varianten. Innerhalb einer Variante lag die Streuung der Mykorrhizierungsgrade um den Median im Streuungsbereich des gesamten Datensatzes. In diesem Fall war keine signifikante Reduktion des Mykorrhizierungsgrades nachweisbar. Lag der Streuungsbereich einer Variante wie z.B. Prothioconazol 0,5 ppm unter dem Streuungsbereich des gesamten Datensatzes, war der Unterschied signifikant.

Der Arbuskelgehalt in den Gerstenwurzeln lag zu beiden Zeitpunkten unter 1 % und wurde durch keinen der Wirkstoffe negativ oder positiv beeinflusst.

Darüber hinaus hatten die Wirkstoffe keinen Einfluss auf die Intensität, mit der ein Wurzelstück kolonisiert war. Die untersuchten Wurzelstücke waren alle der Intensitätsklasse 1 zuzuordnen. Dies bedeutet, dass ein 1 cm langes Wurzelstück 1 % bis 30 % mykorrhizotypische Strukturen aufwies.

In dieser Versuchsreihe wurde nachgewiesen, dass die Fungizide, wenn sie in das Substrat gegossen werden, keinen Einfluss auf die frühe Etablierungsphase von *Glomus intraradices* haben (Analyse-Zeitpunkt fünf Wochen nach Aussaat). Das Reproduktionsstadium des Pilzes wurde durch einige Wirkstoffe negativ beeinflusst (Analyse-Zeitpunkt: acht Wochen nach Aussaat). Prothioconazol reduzierte in beiden Konzentrationen die Kolonisierung der Wurzeln, während Tebuconazol in der hohen Konzentration 5 ppm reduzierend wirkte. Der Pilz war unter diesen Bedingungen einer Konzentration ausgesetzt, die der praxisrelevanten Konzentration fern lag. Im Vergleich zur

Saatgutbehandlung, bei der die Aufwandmenge im  $\mu\text{g}$ -Bereich pro Saatkorn liegt, wurden bei der Gießapplikation Konzentrationen im  $\text{mg}$ -Bereich pro Pflanzgefäß aufgewendet.

### 3.2.2 Saatgutbehandlung mit der Laborformulierung

Im *in vitro* Sporenkeimtest mit Fungizid behandeltem Saatgut (Abschnitt 3.1.3) fungierte das Saatkorn als Wirkstoffträgermaterial. Eine Aussage über die Wirkung der Fungizide auf die Mykorrhiza-Symbiose kann unter diesen Bedingungen nicht getroffen werden. In Gefäßversuchen unter Gewächshaus- und Freilandbedingungen wurde untersucht, welchen Einfluss die Fungizide auf die Interaktion zwischen *Glomus intraradices* und Pflanzenwurzeln *in situ* haben, wenn sie zur Bekämpfung von samen-, boden- und luftbürtigen Krankheitserregern in der empfohlenen Aufwandmenge auf Saatgut appliziert werden.

Für die Gefäßversuche unter kontrollierten Gewächshausbedingungen wurde Gerstensaatgut der Sorte „Duet“ mit der Laborformulierung des jeweiligen Wirkstoffes behandelt. Bei der Laborformulierung handelte es sich um den in der praxisüblichen Aufwandmenge gelösten Wirkstoff in NMP (Tab. 16). Als Kontrolle diente daher neben unbehandeltem Saatgut auch eine NMP-Lösungsmittelkontrolle, die mit  $0,45 \mu\text{l}$  NMP pro Saatkorn behandelt war.

**Tab. 16: Aufwandmenge (g a.i./dt;  $\mu\text{g}$  a.i./Saatkorn) zur Saatgutbehandlung von Gerste und Versuchsansatzzeitpunkte der Gewächshausuntersuchungen**

Wirkstoff	Aufwandmenge		Zeitpunkt des Versuchsansatzes		
	g a.i. * pro Dezitonne	$\mu\text{g}$ a.i. * pro Saatkorn	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Trifloxystrobin	5	2,2	22.02.2010	11.05.2010	09.08.2010
Fluoxastrobin	7,5	3,4	22.02.2010	11.05.2010	09.08.2010
Tebuconazol	5	2,2	22.02.2010	11.05.2010	09.08.2010
Prothioconazol	37	16	22.02.2010	11.05.2010	09.08.2010
Ipconazol	3	1,3	22.02.2010	11.05.2010	09.08.2010
Penflufen	10	4,5	22.03.2010	07.06.2010	30.08.2010
Triadimenol	2,5	1,1	22.03.2010	07.06.2010	30.08.2010
Fludioxonil	5	2,2	22.03.2010	07.06.2010	30.08.2010
Thiram	80	36	22.03.2010	07.06.2010	30.08.2010
Metalaxyl	2,5	1,1	22.03.2010	07.06.2010	30.08.2010

\* a.i. = active ingredient (Wirkstoff)

Pro Wirkstoff wurden drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, sodass sich die Durchführung der Experimente über einen Zeitraum von Februar bis Oktober 2010 erstreckte. Die Entwicklung von *Glomus intraradices* unterliegt verschiedenen Umweltfaktoren. Dazu zählt u.a. die Abhängigkeit von der Jahreszeit (Vaidya, 2007). Die gegebenen Bedingungen der Versuchsdurchführung zu verschiedenen Zeitpunkten boten die Möglichkeit, dies mit zu berücksichtigen.

### 3.2.2.1 Einfluss der Fungizide in der Laborformulierung auf das pflanzliche Wurzelsystem

Einige Wirkstoffgruppen wie Azol-Fungizide oder Strobilurine haben neben ihrer hemmenden Wirkung auf pflanzenpathogene Pilze wachstumsregulierende Auswirkungen auf die Kulturpflanze (Hallmann *et al.*, 2007). Ein möglicher Einfluss der Fungizide auf die Entwicklung der Gerstenwurzeln wurde überprüft. Mithilfe des Programms WinRhizo 2009 c Basic, Reg, Pro & Arabidopsis (Reagent Instruments Inc., Kanada) wurde das Wurzelsystem acht Wochen alter Gerstenpflanzen, die mit *Glomus intraradices* inokuliert waren, analysiert (Tab. 17). Zur Auswertung wurden folgende Parameter genutzt: Wurzeloberfläche (cm<sup>2</sup>), Wurzelvolumen (cm<sup>3</sup>), Wurzeldurchmesser (mm) sowie die Anzahl der Verzweigungen der Wurzeln.

**Tab. 17: Wurzelparameter acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden**

Wirkstoff	Aufwandmenge	Wurzel- oberfläche (cm <sup>2</sup> )	Wurzel- volumen (cm <sup>3</sup> )	Wurzel- durchmesser (mm)	Anzahl der Ver- zweigungen
unbehandelt		287	4,4	0,06	1133
NMP	1 l/dt	271	4,3	0,062	1012
Trifloxystrobin	5 g a.i./dt	337	5,6	0,065	1026
Fluoxastrobin	7,5 g a.i./dt	273	4,3	0,061	1315
Penflufen	5 g a.i./dt	235	3,6	0,061	1153
Triadimenol	37 g a.i./dt	316	5,6	0,07	851
Tebuconazol	3 g a.i./dt	212	3	0,056	1041
Prothioconazol	10 g a.i./dt	248	4,6	0,068	1027
Ipconazol	2,5 g a.i./dt	222	3,6	0,064	992
Fludioxonil	5 g a.i./dt	322	5,1	0,063	964
Thiram	80 g a.i./dt	373	7,2 *	0,069	1046
Metalaxyl	2,5 g a.i./dt	294	4,7	0,063	862

\* Signifikanter Unterschied zur NMP-Kontrolle in einer Spalte, One Way RM ANOVA, p<0,05; n=15.

Es wurde kein nachweisbarer Effekt der Wirkstoffe auf die untersuchten Wurzelparameter festgestellt. In der unbehandelten als auch in den mit Wirkstoff behandelten Varianten unterschieden sich die Wurzelsysteme nicht voneinander, sodass in allen Varianten gleiche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Wurzelkolonisierung gegeben sein sollten.

### 3.2.2.2 Einfluss der Fungizide in der Laborformulierung auf die Entwicklung der Mykorrhizierung

Die frühe Besiedlungsphase der Wurzel durch den Pilz beginnt ca. drei Wochen nach Kontakt zwischen beiden Symbiose-Partnern. Es folgt die Etablierungsphase der Mykorrhiza-Symbiose, in der vermehrt Sporen produziert werden. Diese keimen aus und kolonisieren die wachsende Wurzel erneut. In der nachfolgenden Untersuchung wurde überprüft, welchen Einfluss die Fungizide auf diese Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices* und die sich etablierende

Mykorrhiza-Symbiose haben. Dazu erfolgte im wöchentlichen Rhythmus die Ernte der Gerstenwurzeln sowie anschließende Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades fünf bis acht Wochen nach Versuchsansatz und Inokulation (Tab. 18).

**Tab. 18: Entwicklung des Mykorrhizierungsgrades (%) von Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchseinheiten mit Standardabweichung  $\pm$ )**

Wirkstoff	Aufwandmenge g a.i./dt	Mykorrhizierungsgrad (%)			
		5 Wochen	6 Wochen	7 Wochen	8 Wochen
		Zeit nach der Inokulation			
unbehandelt		6 $\pm$ 2,4	7 $\pm$ 3,3	11 $\pm$ 4,4	13 $\pm$ 4,5
NMP	1 l/dt	7 $\pm$ 2,8	9 $\pm$ 2,5	12 $\pm$ 4,9	15 $\pm$ 6,3
Trifloxystrobin	5 g a.i./dt	6 $\pm$ 2,2	6 $\pm$ 1,6	13 $\pm$ 6,0	11 $\pm$ 4,8
Fluoxastrobin	7,5 g a.i./dt	5 $\pm$ 1,6	6 $\pm$ 2,6	8 $\pm$ 3,8	11 $\pm$ 5,2
Penflufen	5 g a.i./dt	7 $\pm$ 4,9	11 $\pm$ 6,5	13 $\pm$ 7,4	17 $\pm$ 8,9
Triadimenol	37 g a.i./dt	5 $\pm$ 3,2	6 $\pm$ 2,8	8 $\pm$ 5,1	11 $\pm$ 5,8
Tebuconazol	3 g a.i./dt	5 $\pm$ 2,4	6 $\pm$ 2,1	11 $\pm$ 7,1	10 $\pm$ 3,8
Prothioconazol	10 g a.i./dt	4 $\pm$ 0,9 *	5 $\pm$ 1,3	6 $\pm$ 3,0 *	6 $\pm$ 2,9 *
Ipconazol	2,5 g a.i./dt	5 $\pm$ 1,6	8 $\pm$ 2,3	9 $\pm$ 4,2	10 $\pm$ 4,4
Fludioxonil	5 g a.i./dt	6 $\pm$ 3,1	9 $\pm$ 4,1	9 $\pm$ 4,8	15 $\pm$ 8,2
Thiram	80 g a.i./dt	6 $\pm$ 3,0	11 $\pm$ 5,0	9 $\pm$ 5,1	20 $\pm$ 13,0
Metalaxyl	2,5 g a.i./dt	6 $\pm$ 3,4	10 $\pm$ 4,8	10 $\pm$ 3,8	17 $\pm$ 10,0

\* Signifikanter Unterschied zur NMP-Kontrolle in einer Spalte, One Way RM ANOVA on ranks, Hom-Sidak,  $p < 0,05$ ;  $n = 9$ .

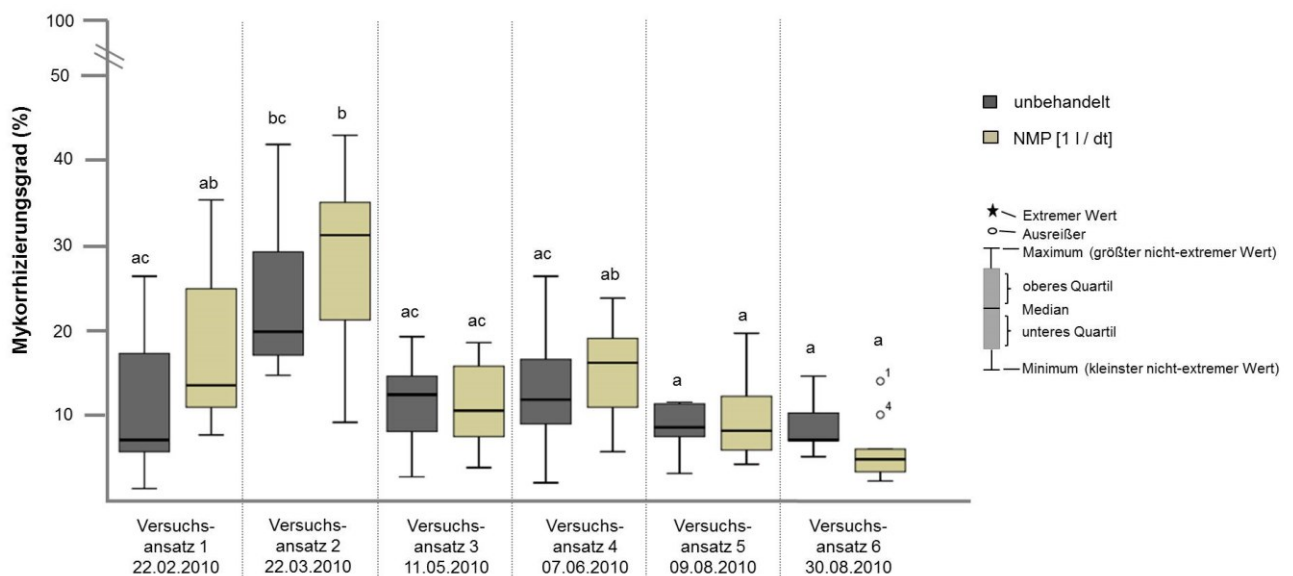
Zum Zeitpunkt der ersten Bonitur fünf Wochen nach Inokulation waren alle Wurzeln mit *Glomus intraradices* kolonisiert. Die maximalen (7 %) und minimalen (4 %) Mykorrhizierungsgrade lagen eng beieinander. Zu diesem Zeitpunkt wurde kein nachweisbarer Einfluss der Wirkstoffe mit Ausnahme von Prothioconazol auf den Mykorrhizierungsgrad festgestellt. Prothioconazol reduzierte den Mykorrhizierungsgrad signifikant zur NMP-Kontrolle. Über den untersuchten Versuchszeitraum wurde ein stetiger Anstieg des Mykorrhizierungsgrades in der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle nachgewiesen. Der Mykorrhizierungsgrad der Wurzeln acht Wochen nach Inokulation war um mindestens 50 % gegenüber der ermittelten Kolonisierungsrate fünf Wochen nach Inokulation erhöht. Der Anstieg der Mykorrhizierung war ebenfalls in den mit Wirkstoff behandelten Varianten nachweisbar. Eine Ausnahme bildete Prothioconazol, in dessen Fall die Kolonisierung der Wurzeln über den gesamten Versuchszeitraum stagnierte und keine Erhöhung nachweisbar war.

### 3.2.2.3 Einfluss der Fungizide in der Laborformulierung auf den Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelgehalt der Wurzel

Im vorherigen Abschnitt 3.2.2.2 wurde gezeigt, dass die Fungizide mit Ausnahme von Prothioconazol, keinen Einfluss auf die Entwicklung der Mykorrhiza-Symbiose haben. Es war ein stetiger Anstieg der Mykorrhizierung der Wurzeln festzustellen (Tab. 18). Die Saatgutbehandlung hat also keinen Einfluss auf die sich entwickelnde Mykorrhiza-Symbiose. Zum Zeitpunkt acht Wochen nach Inokulation wurde untersucht, ob die Reproduktionsphase von *Glomus intraradices* durch die Fungizide beeinflusst wird.

Die Anzahl der zu testenden Wirkstoffe innerhalb einer Versuchseinheit wurde auf fünf Wirkstoffe und zwei Kontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel) beschränkt. Jede Versuchseinheit wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Da insgesamt zehn Wirkstoffe untersucht wurden, ergaben sich sechs Versuchseinheiten mit entsprechenden Kontrollen.

Zu allen Versuchszeitpunkten sowie in der unbehandelten Variante als auch in allen behandelten Varianten waren die Gerstenwurzeln mit *Glomus intraradices* mykorrhiziert. Die Intensität, mit der die einzelnen Wurzelstücke mykorrhiziert waren, lag zwischen 1 % und 30 % und wurde durch keinen der Wirkstoffe beeinflusst. Im Folgenden wird der Mykorrhizierungsgrad der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle über alle Versuchsreihen dargestellt (Abb. 33):



**Abb. 33: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln (unbehandelt, Saatgutbehandlung mit NMP) inokuliert mit *Glomus intraradices* im jahreszeitlichen Verlauf (Februar bis August 2010) (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Holm-Sidak,  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ )**

Zwischen den einzelnen Versuchsreihen variierten die Höhe des Mykorrhizierungsgrades sowie der Streubereich um den Median des Mykorrhizierungsgrades. Bei einem niedrigen Median des Mykorrhizierungsgrades war der Streubereich der Einzelwerte geringer als bei Mykorrhizierungsgraden, die über 10 % lagen. In den ersten beiden Versuchsreihen im Februar und

März lag der Median des Mykorrhizierungsgrades zwischen 10 % und 30 % und wies einen größeren Streuungsbereich auf als in den letzten beiden Versuchen, die im August durchgeführt wurden. Der Grad der Mykorrhizierung lag hier unter 10 %.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Kolonisierung der Wurzeln biologischen Schwankungen unterliegt, die trotz kontrollierter Versuchsbedingungen, ausreichender Wiederholungen innerhalb einer Versuchseinheit sowie einem hohen Stichprobenumfang nicht zu minimieren waren. Dies ist bei der Bewertung des Einflusses der Fungizide auf den Mykorrhizierungsgrad stets zu beachten.

In allen Versuchsreihen wurde die Mykorrhiza-Symbiose durch kein Fungizid komplett unterdrückt. Die Wurzeln aller mit Fungizid behandelten Varianten waren mit *Glomus intraradices* mykorrhiziert (Tab. 19).

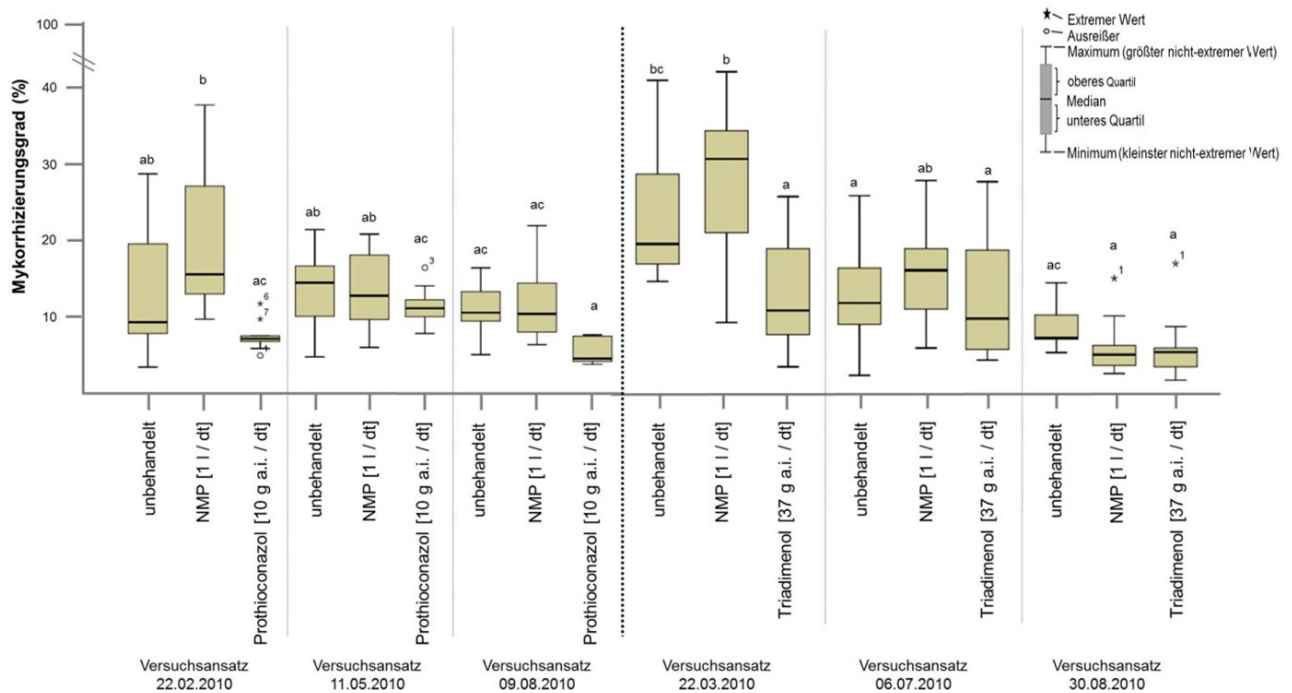
**Tab. 19: Relativer Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden**

Wirkstoff	relativer Mykorrhizierungsgrad (%) (bezogen auf die entsprechende NMP-behandelte Kontrolle)		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Trifloxystrobin	54	100	100
Fluoxastrobin	67	100	100
Penflufen	88	91	100
Triadimenol	48 *	100	37
Tebuconazol	47 *	100	100
Prothioconazol	30 *	82	55
Ipconazol	41 *	100	100
Fludioxonil	78	100	46
Thiram	100	100	89
Metalaxyl	92	100	56

\* Signifikanter Unterschied zu NMP in einer Spalte, One Way RMANOVA on ranks, Hom-Sidak,  $p < 0,05$ ;  $n = 9$ .

In der ersten Versuchseinheit war der Mykorrhizierungsgrad gegenüber der NMP-Kontrolle durch Triadimenol, Tebuconazol, Prothioconazol sowie Ipconazol signifikant reduziert. Dies wurde in den zwei weiteren Versuchseinheiten nicht bestätigt. Zwar war der Mykorrhizierungsgrad im dritten Versuch durch Prothioconazol, Triadimenol, Fludioxonil sowie Metalaxyl gegenüber der NMP-Kontrolle ebenfalls reduziert, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Der Streuungsbereich der Mykorrhizierungsgrade um den Median der behandelten Varianten lag im Streuungsbereich der unbehandelten und NMP-behandelten Kontrolle, sodass der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 34).

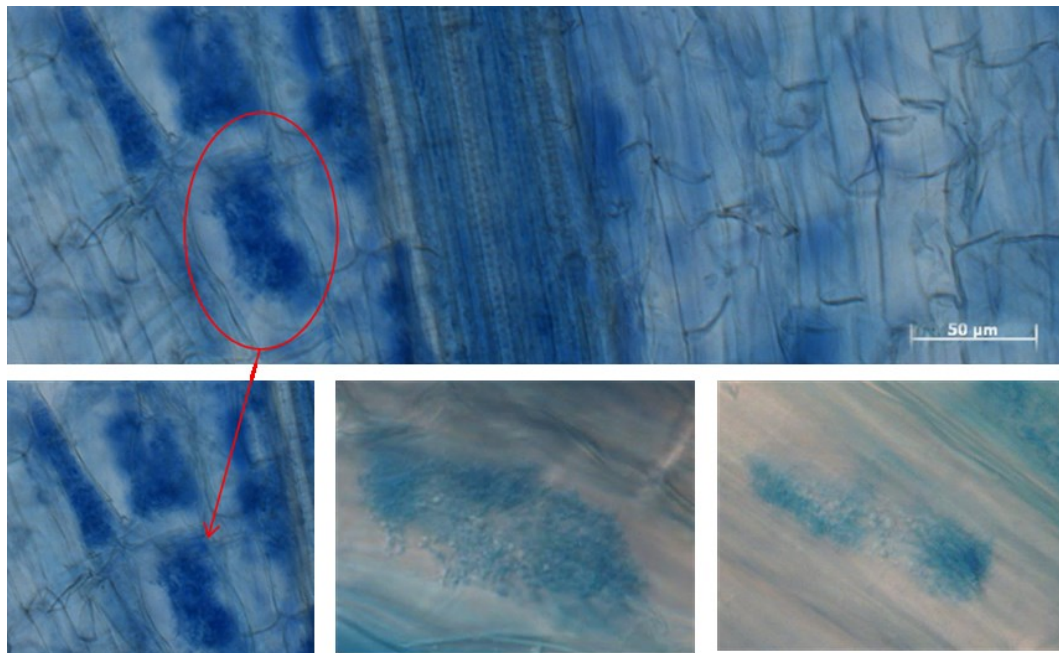




**Abb. 34: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Triadimenol, Prothioconazol) und NMP (drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche; gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-test  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ )**

Es wurde nachgewiesen, dass die Fungizide mit Ausnahme von Prothioconazol und Triadimenol, wenn sie auf Saatgut appliziert werden, keinen Einfluss auf das Reproduktionsstadium von *Glomus intraradices* haben. Der Mykorrhizierungsgrad unterliegt biologischen Schwankungen, die bei der Bewertung des Einflusses der Fungizide berücksichtigt werden müssen.

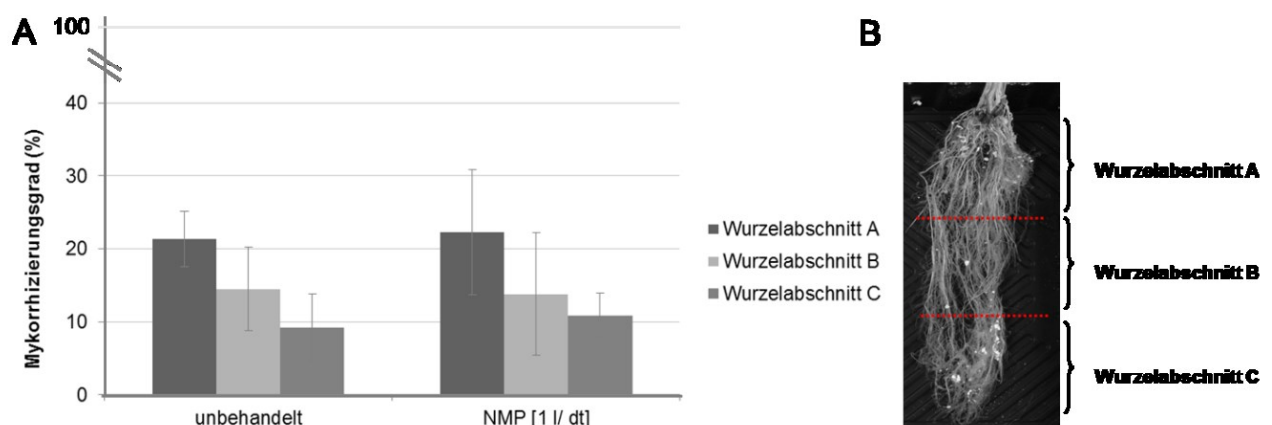
Zur Bewertung des Mykorrhizierungsgrades wurden mykorrhizotypische Strukturen wie Arbuskeln, Hyphen und Vesikel nicht voneinander differenziert. Der Arbuskelgehalt kann Aufschluss über die Funktionalität der Mykorrhiza-Symbiose geben, daher wurde auch der Einfluss der Wirkstoffe auf den Arbuskelgehalt untersucht (Abb. 35). Acht Wochen nach Inokulation lag der Arbuskelgehalt in einem Bereich zwischen 2 % und 6 %. In der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle betrug er  $4 \% \pm 2 \%$ . Durch keinen der Wirkstoffe wurde der Arbuskelgehalt signifikant reduziert oder erhöht. In den Varianten Triadimenol und Prothioconazol, bei denen eine Reduktion des Mykorrhizierungsgrades gezeigt wurde, war der Arbuskelgehalt gegenüber den Kontrollen nicht signifikant reduziert. Daraus ist zu schließen, dass die Aktivität der Mykorrhiza-Symbiose vermutlich durch diese Fungizide nicht beeinflusst wurde.



**Abb. 35:** Arbuskeln in acht Wochen alten Gerstenwurzeln (unbehandelt) inokuliert mit *Glomus intraradices* (200-fache Vergrößerung, Färbung der pilzlichen Strukturen mit Trypanblau)

#### 3.2.2.4 Einfluss von Prothioconazol und Triadimenol in der Laborformulierung auf den Mykorrhizierungsgrad in verschiedenen Wurzelabschnitten

Um die Verteilung der Kolonisierung in der Wurzel zu analysieren, wurden die Gerstenwurzeln nach achtwöchiger Inokulation mit *Glomus intraradices* vertikal in drei gleich große Abschnitte unterteilt und in jedem Wurzelabschnitt der Mykorrhizierungsgrad bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob Prothioconazol und Triadimenol einen Einfluss auf die Verteilung der Kolonisierung in der Wurzel haben. Wurzelabschnitt A war dem behandelten Saatkorn am nächsten, Abschnitt B bildete den mittleren Teil der Wurzel und C den unteren Teil mit den Wurzelspitzen (Abb. 36 B).



**Abb. 36:** A) Mykorrhizierungsgrad (%) in drei Abschnitten acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* (n=9; Mittelwerte mit Standardabweichung als Fehlerbalken); B) Aufteilung einer acht Wochen alten Gerstenwurzel in drei gleichmäßige Abschnitte

In den Wurzeln der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle nahm der Mykorrhizierungsgrad mit zunehmender Entfernung vom Saatkorn ab. Im Wurzelabschnitt A betrug die Kolonisierung  $22\% \pm 8\%$ , während der Mykorrhizierungsgrad im unteren Wurzelabschnitt C  $11\% \pm 5\%$  betrug (Abb. 36 A). Diese Unterschiede sind, aufgrund der Streuung der Einzelwerte innerhalb eines Wurzelabschnittes, nicht signifikant. Wie schon im vorherigen Abschnitt 3.2.2.3 gezeigt, war die Kolonisierung durch Triadimenol sowie Prothioconazol gegenüber der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle reduziert (Tab. 20).

**Tab. 20: Relativer und absoluter Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* in drei verschiedenen Wurzelabschnitten nach Saatgutbehandlung mit NMP, Triadimenol und Prothioconazol**

Wirkstoff	Aufwandmenge	relativer Mykorrhizierungsgrad (%) (Normierung des absoluten Mykorrhizierungsgrades zur mit NMP behandelten Kontrolle)			absoluter Mykorrhizierungsgrad (%)		
		Wurzelabschnitt			Wurzelabschnitt		
		A	B	C	A	B	C
unbehandelt		100	100	100	21	15	9
NMP	1 l/dt	100	100	100	22	14	11
Triadimenol	37 g a.i./dt	70	58	45	16	8*	5
Prothioconazol	10 g a.i./dt	33	50	51	6*	7	6

\* Signifikanter Unterschied zu NMP in einer Spalte, t-Test,  $p < 0,05$ ;  $n=3$ .

In der Variante Triadimenol nahm der Mykorrhizierungsgrad von Wurzelabschnitt A nach C im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls ab. Der höchste Mykorrhizierungsgrad lag im Abschnitt A mit  $16\% \pm 8\%$  vor. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Wurzelabschnitten waren nicht signifikant.

Die Wurzelabschnitte in der mit Prothioconazol behandelten Variante waren gleichmäßig zu  $6\% \pm 3\%$  kolonisiert. Gegenüber der unbehandelten und mit NMP behandelten Kontrolle war die Kolonisierung im Wurzelabschnitt A am stärksten reduziert und signifikant. Mit zunehmender Entfernung vom Saatkorn wurde der Unterschied zur Kontrolle geringer.

### 3.2.3 Saatgutbehandlung mit dem formulierten Handelspräparat

In der landwirtschaftlichen Praxis werden Formulierungen von Pflanzenschutzmitteln als Handelspräparate verwendet. Diese enthalten neben dem reinen Wirkstoff weitere Komponenten wie Emulgatoren oder Tenside, wodurch unter anderem die Wirkstofffreisetzung im Boden beeinflusst oder die Stabilität des Wirkstoffes in der Formulierung gewährleistet wird.

In den vorherigen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.2) wurde der Einfluss einer Saatgutbehandlung mit der Laborformulierung auf die Mykorrhiza-Symbiose analysiert. Um sich der praxisrelevanten

Anwendung der Fungizide zu nähern, wurde auch der Einfluss der Fungizide als formuliertes Handelspräparat untersucht.

### 3.2.3.1 Einfluss der Fungizide als formulierte Handelspräparate auf den Mykorrhizierungsgrad in Gefäßversuchen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen

Für die vorliegende Untersuchung wurde das Gerstensaatgut in den praxisüblichen Aufwandmengen mit dem Handelspräparat behandelt und die Gerstenpflanzen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen in der Gegenwart von *Glomus intraradices* im Substrat angezogen. Als Kontrolle diente unbehandeltes Saatgut.

Nach achtwöchiger Inkubation der Gerstenpflanzen waren die Wurzeln der unbehandelten als auch behandelten Varianten mit *Glomus intraradices* mykorrhiziert. Die Kolonisierungsraten lagen zwischen 11 % und 18 %. In drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wurde kein negativer oder positiver Einfluss der Fungizide, deren Handelspräparat auf Saatgut appliziert wurde, nachgewiesen. Die nachfolgende Boxplot-Darstellung stellt das Ergebnis eines repräsentativen Versuches dar (Abb. 37):

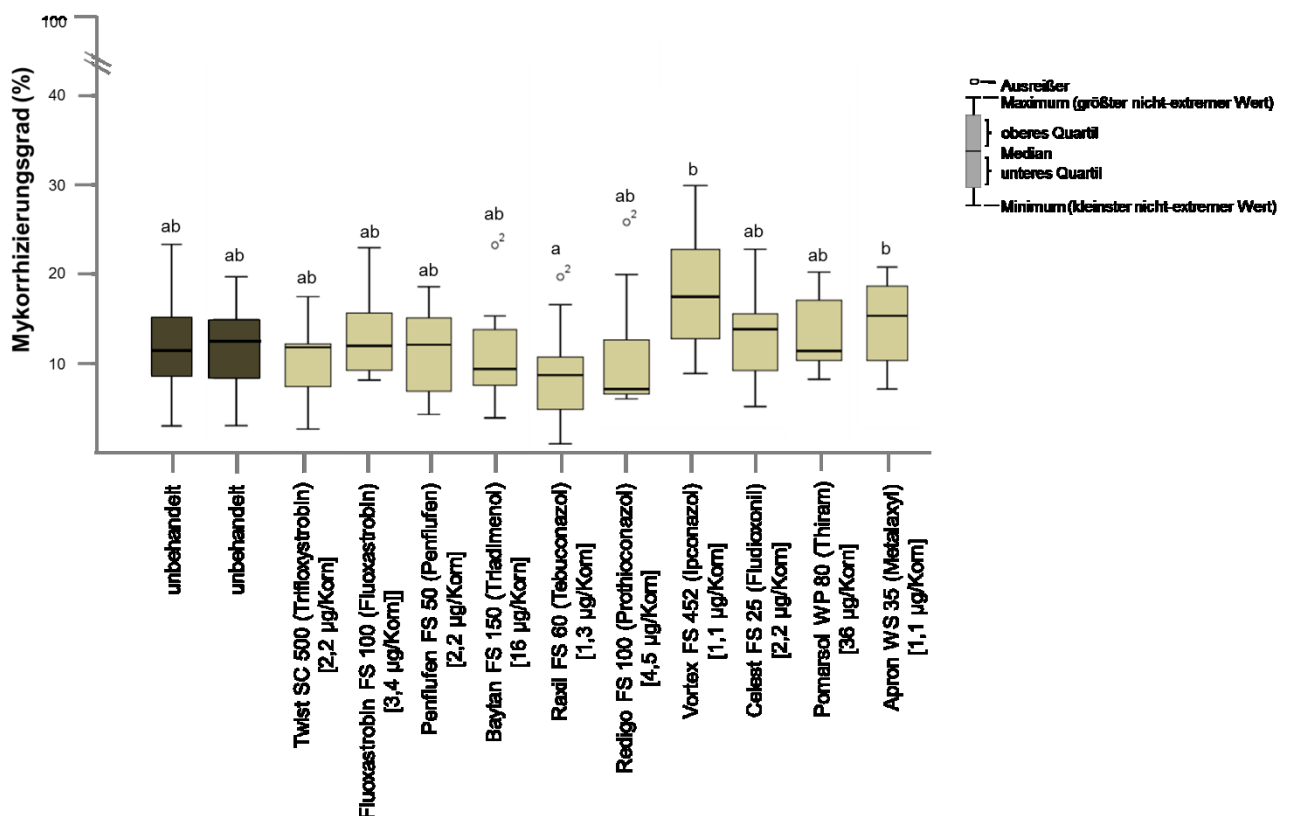


Abb. 37: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparat) (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-Test,  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ )

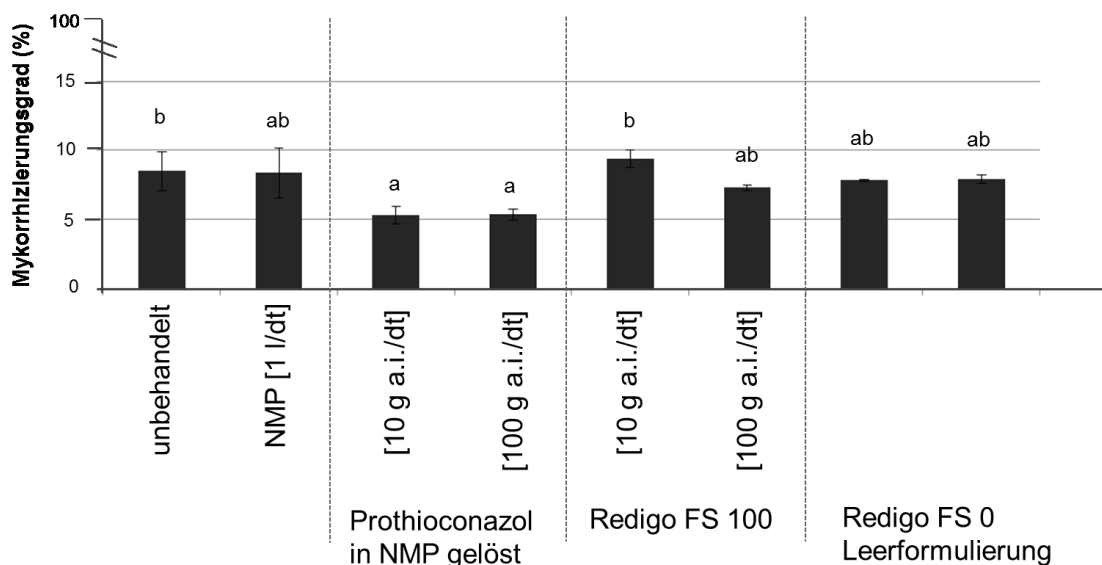
Die Höhe des Mykorrhizierungsgrades der mit Fungizid behandelten Varianten streute ober- oder unterhalb des Mykorrhizierungsgrades der unbehandelten Kontrolle. Der Streubereich der

Mykorrhizierungsgrade um den Median in den mit Fungizid behandelten Varianten, lag stets im Streuungsbereich der unbehandelten Kontrolle und war nicht signifikant.

In zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wurde eine Reduktion der Wurzelkolonisierung in den Varianten Triadimenol und Prothioconazol festgestellt (Abb. 34). Bei Verwendung der entsprechenden Handelspräparate Baytan FS 150 (Triadimenol) und Redigo FS 100 (Prothioconazol) wurde hingegen keine Reduktion in den drei durchgeführten Versuchen nachgewiesen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Formulierbegleitstoffe auf den Mykorrhizierungsgrad gegenüber einer unbehandelten Kontrolle haben können, wurde eine Leerformulierung ohne Wirkstoff verwendet. Das Gerstensaatgut wurde in den praxisüblichen sowie in der zehnfach erhöhten Aufwandmenge jeweils mit Prothioconazol gelöst in NMP (Laborformulierung), Redigo FS 100 (Handelspräparat) sowie Redigo FS 0 (Leerformulierung) behandelt. Nach achtwöchiger Inkubation im Gewächshaus in der Gegenwart von *Glomus intraradices* im Substrat wurde der Mykorrhizierungsgrad der Wurzeln bestimmt.

Die Wurzeln aller Varianten waren mit *Glomus intraradices* mykorrhiziert (Abb. 38). In der mit Prothioconazol (Laborformulierung) behandelten Variante war die Kolonisierung gegenüber den Kontrollvarianten unbehandelt und NMP reduziert. Der Unterschied zur unbehandelten Variante war signifikant, während der Unterschied zur NMP-Variante statistisch nicht signifikant war. Die Saatgutbehandlung mit dem Handelspräparat und der Leerformulierung des Handelspräparates zeigte keinen Einfluss auf die Höhe der Wurzelkolonisierung gegenüber beiden Kontrollen.



**Abb. 38: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung (NMP, Prothioconazol, Redigo FS 100, Redigo FS 0) (Mittelwert eines repräsentativen Versuches mit Standardabweichung; gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Holm-Sidak,  $P < 0,05$ ;  $n=9$ )**

Es wurde gezeigt, dass Prothioconazol als Laborformulierung reduzierend auf den Mykorrhizierungsgrad wirken kann. Die Applikation des Handelspräparates hat keinen Einfluss auf den Mykorrhizierungsgrad. Die Saatgutbehandlung von Redigo FS 100 ist unter praxisrelevanten Bedingungen unbedenklich für die Mykorrhiza-Symbiose.

### 3.2.3.2 Großcontainerversuche unter Freilandbedingungen

Die Anwendung der formulierten Handelspräparate als Saatgutbehandlung hatte in Gefäßversuchen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen keinen Einfluss auf die Symbiose zwischen Gerstenwurzeln und *Glomus intraradices* (Abb. 37). Um zu untersuchen, inwieweit die im Gewächshaus gewonnenen Daten zur Saatgutbehandlung ins Freiland übertragbar sind, wurde über zwei Vegetationsperioden der Einfluss der Fungizide, die als formuliertes Handelspräparat auf Gerstensaatgut appliziert wurden, auf die Mykorrhiza-Symbiose in Ackererde in Großcontainern untersucht.

Für die Untersuchungen, die in der Sommer- und Winterperiode durchgeführt wurden, wurde die Wintergerstensorte „Duet“ sowie die Sommergerstensorte „Beatrix“ verwendet und in den praxisüblichen Aufwandmengen mit den Handelspräparaten der Fungizide behandelt (Tab. 4).

Die Anzucht der Gerstenpflanzen in Ackererde erfolgte in Großcontainern, mit einem Fassungsvermögen von 582 Litern (111 cm x 92 cm x 57 cm). Es stand eine Bearbeitungsfläche von 1,03 m<sup>2</sup> zur Verfügung, die in sieben Aussaatreihen aufgeteilt wurde. Vier Reihen wurden für unbehandeltes Saatgut und drei Reihen für fungizidbehandeltes Saatgut verwendet. Pro Handelspräparat wurde ein Großcontainer verwendet. Die Ackererde wurde nicht, wie in den Gewächshausuntersuchungen, künstlich inokuliert. Vielmehr sollten die natürlich in der Erde vorkommenden Mykorrhizapilze die Symbiose ermöglichen. Eine vor Versuchsbeginn durchgeführte Analyse der in der Ackererde vorkommenden Mykorrhizapilz-Spezies ergab, dass die Sporen zu 98 % der Ordnung *Glomales* angehörten. Zudem wurde vor Beginn jeder Versuchseinheit die Sporenmenge in der Ackererde bestimmt, um einen Überblick über das Mykorrhiza-Potential zu bekommen.

Unter diesen Bedingungen sollte der Einfluss der Wirkstoffe, als Handelspräparat appliziert, auf den Mykorrhizierungsgrad der Wurzeln sowie die Sporenzahl in der Ackererde untersucht werden. Die Entnahme der Wurzel- und Bodenproben erfolgte parallel zu drei Zeitpunkten in jeder Vegetationsperiode. Mit einem Blumenzwiebelpflanzer erfolgte die Entnahme der Proben im Bearbeitungshorizont von 15 cm Tiefe und einem Durchmesser des Wurzelsystems von 8 cm.

Insgesamt wurden zwei voneinander unabhängige Versuche pro Vegetationsperiode durchgeführt, von denen jeweils einer repräsentativ im Folgenden dargestellt wird. Für die Winterperiode 2009/2010 wurde das Gerstensaatgut am 25.09.2009 sowie für die Sommerperiode 2010 am

04.05.2010 ausgesät. Die erste Probenentnahme erfolgte in beiden Versuchsperioden sechs Wochen nach Aussaat. Eine weitere Entnahme erfolgte 26 Wochen nach Aussaat in der Winterperiode bzw. 10 Wochen nach Aussaat in der Sommerperiode. Die letzte Probenentnahme erfolgte jeweils vier Wochen später. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Fungizide auf die Entwicklung der Mykorrhiza-Symbiose untersucht werden.

Faktoren wie Temperatur und Feuchtigkeit können die Entwicklung und Verbreitung von arbuskulären Mykorrhizapilzen beeinflussen (Koske, 1987). Daher wurden die durchschnittlichen Monatstemperaturen (°C) sowie Niederschlagsmengen (mm) aufgezeichnet (Tab. 21).

**Tab. 21: Witterungsverlauf in den Vegetationsperioden Sommer und Winter am Standort Monheim am Rhein**

Versuchszeitraum	Durchschnittstemperatur (°C)		Niederschlagsmenge (mm)		
	Versuch 1*	Versuch 2*	Versuch 1*	Versuch 2*	
Winterperiode	Oktober	9,9	9,7	58	48,9
	November	9,6	6,4	95	82,1
	Dezember	2,5	-1,7	82	75,6
	Januar	-1	2,9	53,5	93,4
	Februar	1,9	4,1	50,6	67,4
	März	6	7,2	61,5	15,5
	April	10,3	13,4	5,6	17,6
Sommerperiode	Mai	11,2	15,4	72,7	38,5
	Juni	17,5	17,1	23,3	142,1
	Juli	21,5	16,4	56,4	63,6
	August	17,3	18,2	214	119,5

\* Versuch 1: Winter 2009/2010; Sommer 2010.

\* Versuch 2: Winter 2010/2011; Sommer 2011.

#### *Einfluss der Fungizide als formulierte Handelspräparate auf den Mykorrhizierungsgrad*

In den beiden Vegetationsperioden Sommer und Winter waren die Gerstenwurzeln sechs Wochen nach Aussaat mykorrhiziert (Tab. 22). Im Winterversuch lagen die Mykorrhizierungsgrade unter 1 % und waren damit im Vergleich zum Sommersversuch, in dem die Kolonisierung im Durchschnitt 3 % betrug, geringer. Im Verlauf der Untersuchung nahmen die Mykorrhizierungsgrade stetig zu. Am Ende der Versuche lag eine Kolonisierung von durchschnittlich 8 % vor. Die Höhe des Mykorrhizierungsgrades in der unbehandelten als auch in den behandelten Varianten variierte zwischen den Versuchsgefäßen. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probenentnahmen wurde kein signifikanter Einfluss der Fungizide als formuliertes Handelspräparat auf den Mykorrhizierungsgrad nachgewiesen. Die Mykorrhizierungsgrade der mit Fungizid behandelten Varianten lagen zu allen Probenentnahmen stets im Streubereich der unbehandelten Kontrolle. Die Entwicklung der Mykorrhiza-Symbiose wurde unter praxisrelevanten Bedingungen nicht durch die Fungizide beeinflusst.

**Tab. 22: Mykorrhizierungsgrad (%) von Gerstenwurzeln nach Anzucht in Ackererde unter Freilandbedingungen und Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparate)**

Varianten	Mykorrhizierungsgrad (%)					
	Winterperiode 2009/2010			Sommerperiode 2010		
	6 Wochen nach Aussaat (09.11.2009)	26 Wochen nach Aussaat (30.03.2010)	30 Wochen nach Aussaat (28.04.2010)	6 Wochen nach Aussaat (14.06.2010)	10 Wochen nach Aussaat (12.07.2010)	14 Wochen nach Aussaat (09.08.2010)
unbehandelt	1,19	6	8	3	5	7
Twist SC 500 [5 g a.i./dt]	0,37	6	7	3	5	7
unbehandelt	0,46	5	7	4	7	8
Fluoxastrobin FS 100 [7,5 g a.i./dt]	0,73	4	5	5	6	7
unbehandelt	0,64	9	10	4	3	6
Penflufen FS 50 [5 g a.i./dt]	0,55	7	11	4	4	6
unbehandelt	0,64	6	6	3	5	9
Baytan FS 150 [37 g a.i./dt]	0,92	5	5	2	5	7
unbehandelt	0,46	6	6	3	5	8
Raxil FS 60 [3 g a.i./dt]	0,18	8	9	4	5	7
unbehandelt	0,83	5	11	3	7	5
Redigo FS 100 [10 g a.i./dt]	0,09	6	13	3	5	4
unbehandelt	0,46	5	8	2	4	4
Vortex FS 452 [2,5 g a.i./dt]	0,18	4	7	3	4	5
unbehandelt	1,74	6	7	4	4	6
Celest FS 25 [5 g a.i./dt]	0,73	7	7	4	4	7
unbehandelt	0,46	5	10	2	6	5
Pomarsol WP 80 [80 g a.i./dt]	0,73	4	11	3	6	4
unbehandelt	0,18	6	9	2	6	7
Apron WS 35 [2,5 g a.i./dt]	0,55	6	9	3	6	6
Mittelwert über alle "unbehandelt"	0,71	6	8	3	5	7
Standardabweichung "unbehandelt"	0,45	1,28	1,53	0,7	1,3	1,6

\* Signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle (unbehandelt), One Way RM ANOVA, Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ .

### *Einfluss der Fungizide als Handelspräparate auf den Sporengehalt in der Ackererde*

Der erste Schritt des Entwicklungszyklus arbuskulärer Mykorrhizapilze ist die Sporenkeimung, die in der Anwesenheit eines pflanzlichen Partners zur Etablierung der Mykorrhiza-Symbiose führen kann (Parniske, 2008). Der Lebenszyklus schließt sich mit der Bildung von Tochtersporen, die sich am Ende der extraradikalen Hyphen bilden (Bianciotto & Bonfante, 1998).

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der Fungizide, die auf Saatgut appliziert wurden, auf die Sporenmenge in der Ackererde untersucht (Tab. 23). Die Probenentnahme fand zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsansatz statt. Auf diese Weise war es möglich, die Entwicklung der Sporenbildung zu untersuchen.



In beiden Vegetationsperioden wurde eine anfängliche Sporenmenge von 9.000–10.000 Sporen pro Liter Ackererde bestimmt. Sechs Wochen nach Versuchsbeginn war die durchschnittliche Sporenmenge der Kontrolle in der Winterperiode um 68 % reduziert. Die Sporenmenge betrug  $3.245 \pm 498$  Sporen. Über den Versuchszeitraum nahm die Sporenmenge in der Ackererde zu, und 30 Wochen nach Aussaat waren  $5.399 \pm 1.215$  Sporen vorhanden. In der Sommerperiode war die Sporenmenge zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme um 17 % reduziert. Im Durchschnitt waren  $7.438 \pm 1.404$  Sporen pro Liter Ackererde vorhanden. Eine Zunahme der Sporenmenge, wie in der Winterperiode, wurde über den Versuchszeitraum nicht festgestellt.

**Tab. 23: Anzahl der Mykorrhizasporen pro Liter Ackererde in Großcontainern unter Freilandbedingungen nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparate)**

Varianten	Sporenanzahl pro 1 Liter Ackererde					
	Winterperiode 2009/2010			Sommerperiode 2010		
	6 Wochen nach Aussaat (09.11.2009)	26 Wochen nach Aussaat (30.03.2010)	30 Wochen nach Aussaat (28.04.2010)	6 Wochen nach Aussaat (14.06.2010)	10 Wochen nach Aussaat (12.07.2010)	14 Wochen nach Aussaat (09.08.2010)
unbehandelt	2744	5455	6310	10969	7479	8648
Twist SC 500 [5 g a.i./dt]	3185	7242	6005	10384	7081	7708
unbehandelt	2253	5522	6480	6725	7504	7352
Fluoxastrobin FS 100 [7,5 g a.i./dt]	3041	6149	6395	7013	8351	6031
unbehandelt	3413	5734	5506	7784	5726	6962
Penflufen FS 50 [5 g a.i./dt]	3524	7276	6598	7149	7708	7487
unbehandelt	2981	8080	4997	7123	7106	6158
Baytan FS 150 [37 g a.i./dt]	3041	4963	4066	9622*	8080	7149
unbehandelt	2922	6971	6657	6547	6014	6954
Raxil FS 60 [3 g a.i./dt]	3862	8063	5514	8157	7521	6615
unbehandelt	3710	7386	6556	6496	5362	6996
Redigo FS 100 [10 g a.i./dt]	3888	7005	4328	8055	7293	6590
unbehandelt	3498	7835	2880	8402	8716	9935
Vortex FS 452 [2,5 g a.i./dt]	3693	8504	5446	8766	7377	6513
unbehandelt	3481	4565	5057	6302	6310	6640
Celest FS 25 [5 g a.i./dt]	3574	6115	3989	6666	5192	7369
unbehandelt	3676	7123	4083	7394	6124	6420
Pomarsol WP 80 [80 g a.i./dt]	3049	8089	5107	7513	7191	9088
unbehandelt	3769	7123	5463	6640	6048	6979
Apron WS 35 [2,5 g a.i./dt]	2795	5184	5734	7615	6598	9105
Mittelwert über alle "unbehandelt"	3245	6579	5399	7438	6639	7304
Standardabweichung "unbehandelt"	498	1173	1215	1404	1031	1140

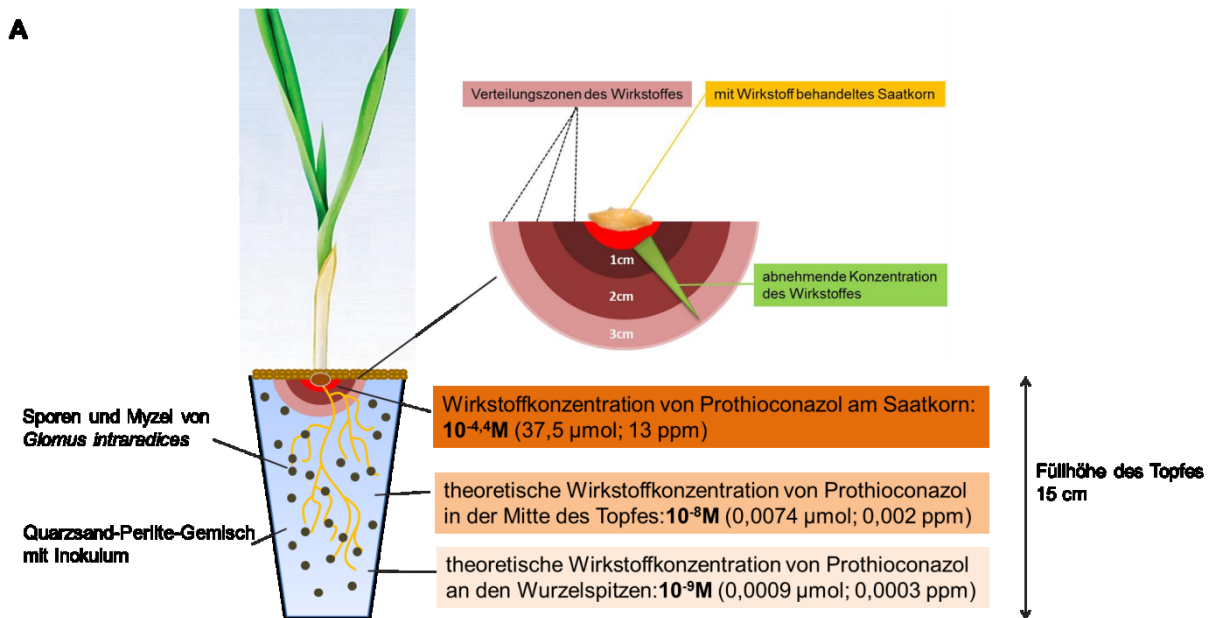
\* Signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle (unbehandelt), One Way RM ANOVA, Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ,  $n = 9$ .

Es wurde kein signifikanter Einfluss der Fungizide, als formuliertes Handelspräparat auf Gerstensaatzgut appliziert, auf die Sporenmenge in der Ackererde nachgewiesen. Zu allen drei Zeitpunkten der Probenentnahme war die Sporenmenge im Wurzelbereich der behandelten Variante gegenüber der unbehandelten Variante unverändert.

Die Applikation der untersuchten Fungizide, als formuliertes Handelspräparat auf Gerstensaatzgut appliziert, ist unter praxisrelevanten Bedingungen unbedenklich für die Mykorrhiza-Symbiose.

### 3.2.3.3 Berechnung der theoretischen Wirkstoffkonzentration in zunehmender Entfernung vom behandelten Saatgut

Zur Abschätzung der maximal denkbaren Auswirkung von saatgutgebeizten Wirkstoffen in Ackererde im Feld wurden theoretische Wirkstoffkonzentrationen in Abhängigkeit von der Entfernung vom behandelten Saatkorn aus berechnet. Unter der vereinfachenden Annahme, dass sich die Wirkstoffe gleichmäßig um das Saatkorn herum verteilen würden, wurden die möglichen Wirkstoffkonzentrationen in Kugelvolumina mit 1, 2 und 3 cm Radius berechnet. Wenn die theoretisch maximal mögliche Wirkstoffkonzentration im betrachteten Kugelvolumen kleiner ist als die dem  $pI_{50}$ -Wert entsprechende Konzentration bei direkter Applikation, dann ist eine kleiner als 50 %ige Hemmung der Sporenkeimung zu erwarten. Daraus ergibt sich eine maximale Wirkstoff-Reichweite.



Wirkstoff	Aufwandmenge für die Saatgutbehandlung	Wirkstoffmenge pro Korn	theoretische Wirkstoffkonzentration <sup>1</sup> (-logM)				$pI_{50}$ -Wert (-logM) <sup>2,3</sup>	Maximale Wirkstoff-Reichweite	
			in zunehmender Entfernung vom Saatkorn <sup>b</sup>						
			am Saatkorn <sup>a</sup>	1 cm	2 cm	3 cm			15 cm
Trifloxystrobin	5 g a.i./dt	2,2 µg	4,8	5,9	6,8	7,3	9,4	5,5	<1 cm
Fluoxastrobin	7,5 g a.i./dt	3,4 µg	4,7	5,8	6,7	7,2	9,3	5,8	<1 cm
Penflufen	5 g a.i./dt	2,2 µg	4,7	5,8	6,7	7,2	9,3	4,1	<1 cm
Triadimenol	37 g a.i./dt	16 µg	3,8	4,9	5,8	6,3	8,4	3,8	<1 cm
Tebuconazol	3 g a.i./dt	1,3 µg	4,9	6,0	6,9	7,4	9,5	4,5	<1 cm
Prothioconazol	10 g a.i./dt	4,5 µg	4,4	5,5	6,4	6,9	9,0	5,1	<1 cm
Ipconazol	2,5 g a.i./dt	1,1 µg	5,3	6,4	7,3	7,8	9,9	5,6	<1 cm
Fludioxonil	5 g a.i./dt	2,2 µg	4,6	5,7	6,6	7,1	9,2	6,5	1-2 cm
Thiram	80 g a.i./dt	36 µg	3,4	4,4	5,3	5,9	8,0	5,9	3 cm
Metalaxyl	2,5 g a.i./dt	1,1 µg	4,9	6,0	6,9	7,5	9,6	4,0	<1 cm

<sup>1</sup> Bei gleichmäßiger Verteilung im gesamten Volumen.

<sup>a</sup> Theoretische Wirkstoffkonzentration am Saatkorn, wenn dieses dem Volumen einer Kugel mit einem Radius von 0,44 cm entspricht.

<sup>b</sup> Entfernung = Radius.

<sup>2</sup> Aus: Abb. 24 (Direkter artifizieller Kontakt der Wirkstoffe zu den *Glomus intraradices* Sporen).

<sup>3</sup>  $pI_{50}$ -Wert = negativer Logarithmus des  $IC_{50}$ -Wertes.

**Abb. 39: A) Theoretische Wirkstoffkonzentration von Prothioconazol in zunehmender Entfernung vom Saatkorn im Gefäßexperiment unter Gewächshausbedingungen (insgesamt waren fünf behandelte Saatkörner pro Pflanzgefäß vorhanden). B) Theoretische Wirkstoffkonzentration (-log M) im Sand-Perlite-Gemisch in zunehmender Entfernung vom behandelten Saatkorn aus**

In der Gefäßmitte des Gewächshausversuches wäre z.B. eine Prothioconazol-Konzentration von  $10^{-8}$  M (0,0074  $\mu$ mol; 0,002 ppm) zu erwarten (Abb. 39A); diese liegt unter dem  $I_{50}$ -Wert von  $10^{-5,1}$  M (8,53  $\mu$ mol; 2,9 ppm), bei dem eine 50 %ige Hemmung der Sporenkeimung im Sporenkeimtest vorlag.

### 3.3 Spezielle Untersuchungen zur Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase von *Glomus intraradices*

#### 3.3.1 Die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase von *Glomus intraradices* (*GintERG11/Cyp51*)

Aufgrund ihrer Wirksamkeit, Wirkungsbreite und hohen Verträglichkeit für die Kulturpflanze und Nicht-Zielorganismen gehören die Azol-Fungizide zu den weltweit am meisten eingesetzten Fungiziden (Kuck & Vors; 2007; Hallmann *et al.*, 2007). Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung der in die Sterolbiosynthese involvierten Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase, welche die oxidative Entfernung der 14- $\alpha$ -Methylgruppe von Lanosterol oder Eburicol katalysiert. Dies kann die Hemmung jeglicher pilzlicher Wachstumsvorgänge zur Folge haben (Fuller *et al.*, 1990, Fontaine *et al.*, 2001, 2004).

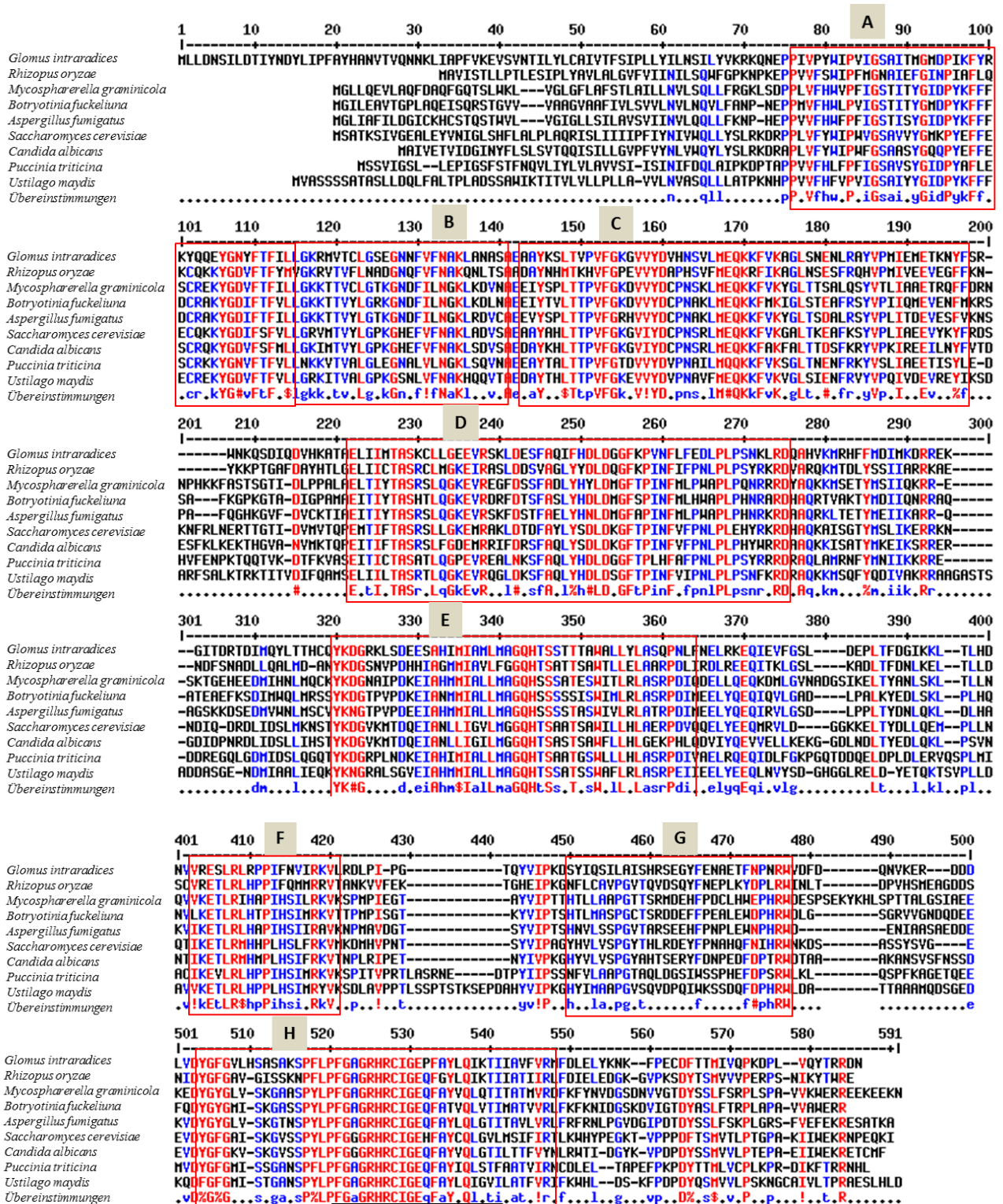
Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass die Sporenkeimung oder -produktion sowie die Wurzelkolonisierung durch einige Azol-Fungizide negativ beeinflusst werden kann, wenn der Pilz dem Wirkstoff direkt in hoher Konzentration ausgesetzt wird (Abschnitt 3.1.2). Unter praxisrelevanten Bedingungen war der negative Effekt nicht nachweisbar (Abschnitt 3.2.3.2).

In vertiefenden Untersuchungen wurde untersucht, ob das Gen *ERG11* (*CYP51*), welches die Sterol-14- $\alpha$ -Demethylase kodiert, bei *Glomus intraradices* vorhanden ist und ob es sich von dem anderer Pilze unterscheidet. Gegenwärtig sind keine Informationen über das Vorhandensein des *ERG11*-Gens bei *Glomus intraradices* veröffentlicht. Die aus der *Glomus*-Genom-Datenbank (<http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/GlomusGenome/index3.html>) stammende und bisher unveröffentlichte Gensequenz des *ERG11* (*GintERG11*) wurde für die folgenden Analysen verwendet. Die cDNA-Sequenz (ID 347810) des *GintERG11*-Gens umfasst ein 1620 bp großes offenes Leseraster, das 539 Aminosäuren kodiert.

##### 3.3.1.1 *ERG11*-Aminosäuresequenz-Alignment und phylogenetischer Stammbaum

In einem Sequenzalignment (ClustalW2) wurde die *GintERG11*-Proteinsequenz mit *ERG11*-Proteinsequenzen ausgewählter Pilze aus den Klassen der *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* sowie *Saccharomycetes* verglichen und auf Homologien untersucht (Abb. 40). Darüber hinaus wurde die Software „Blockmaker“ ([http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/blockmkr/www/make\\_blocks.html](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/blockmkr/www/make_blocks.html)) zur Bestimmung hochkonservierter Bereiche zwischen den Sequenzen der Organismen verwendet. Diese Bereiche werden als Blöcke dargestellt. Für das Sequenzalignment der *ERG11*-Sequenzen zwischen *Glomus intraradices* und ausgewählten Pilzen wurden acht Blöcke

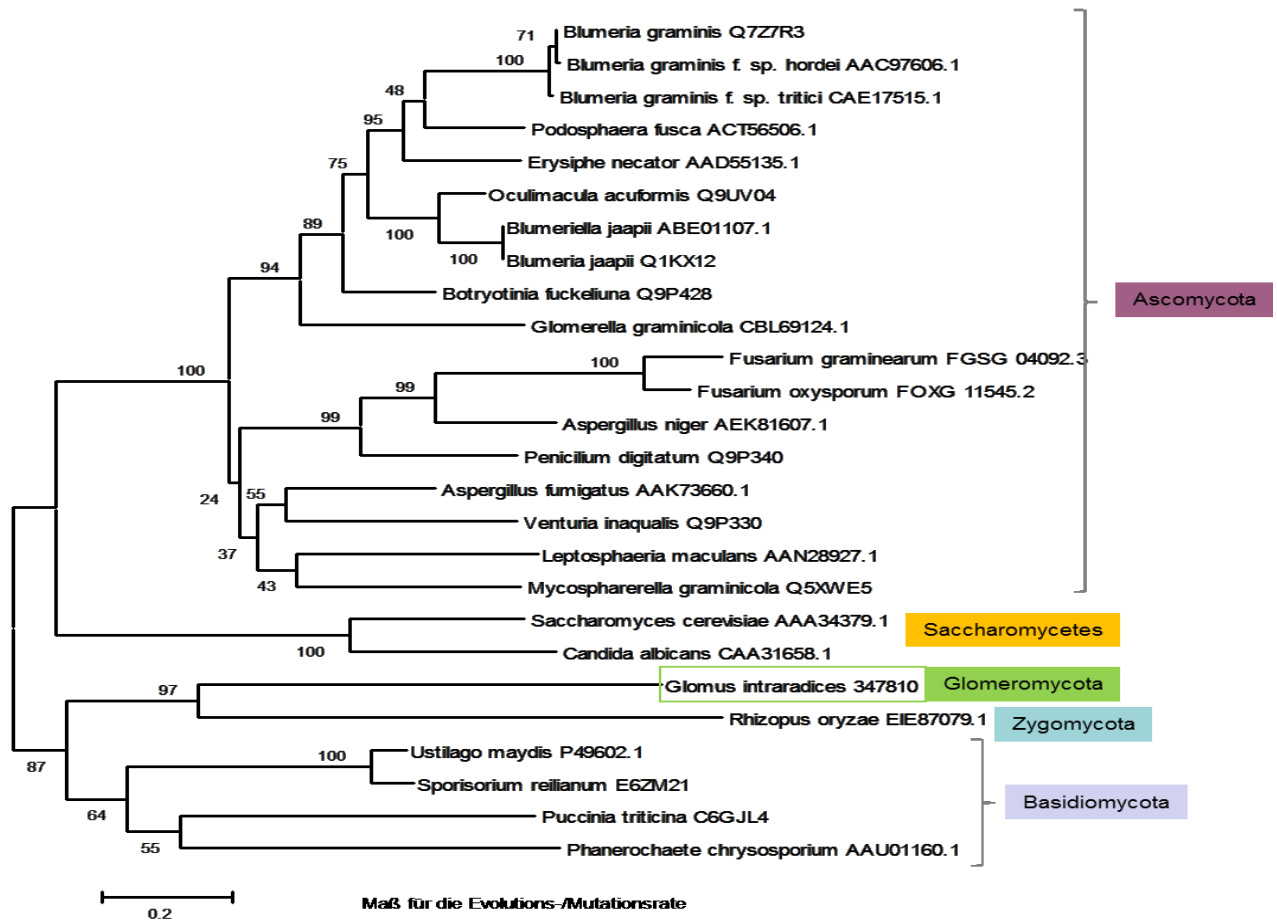
(A–H) definiert, deren Aminosäuresequenzen im Protein hoch konserviert sind. In Block H wurde außerdem die hoch konservierte Häm-Bindedomäne (HR2-Region), die charakteristisch für alle Mitglieder der P450-Superfamilie ist, in der Sequenz von *Glomus intraradices* gefunden.



**Abb. 40: ERG11-Aminosäuresequenz-Alignment (ClustalW2) und Einteilung hochkonservierter Bereiche in Blöcke (A–H); (rote Buchstaben: 90 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen allen Organismen; blaue Buchstaben: 50 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen allen Organismen; letzte Zeile: Sequenz aus der Mehrheit der identischen Aminosäuren in einer Spalte)**

Es wurden klare Homologien der *GintERG11*-Sequenz zu anderen *ERG11*-Sequenzen ausgewählter Pilze aufgezeigt. Die meisten identischen Aminosäuren wies *Glomus intraradices* zu *Rhizopus oryzae* mit 43 % auf. Die *GintERG11*-Gensequenz unterscheidet sich grundsätzlich nicht von der der anderen Pilze und weist darauf hin, dass *Glomus intraradices* ein Gen besitzt, das für die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase kodieren könnte.

Zur Verdeutlichung der verwandtschaftlichen Beziehung der *ERG11*-Gensequenzen von *Glomus intraradices* und anderen Pilzen wurde ein Stammbaum erstellt (Abb. 41).



**Abb. 41: Maximum-Likelihood-Stammbaum basierend auf *ERG11*-Gensequenzen (JTT matrix based model; MEGA5)**

Arbuskuläre Mykorrhizapilze sind monophyletisch und bilden eine Schwestergruppe zu den *Ascomycota* und *Basidiomycota* (Schüßler *et al.*, 2001). Die Stammbaum-Analyse der *ERG11*-Gensequenzen zeigte die nächste Verwandtschaft zwischen *Glomus intraradices* (*Glomeromycota*) und *Rhizopus oryzae* (*Zygomycota*). Im Aminosäuresequenz-Alignment der *ERG11*-Sequenz wurde zwischen diesen beiden Organismen bereits die höchste Übereinstimmung an Aminosäuren aufgezeigt. Die weiteste verwandtschaftliche Entfernung der *ERG11*-Gensequenzen zeigte sich zu den *Ascomycota* und *Saccharomycetes*.

### 3.3.1.2 Funktionelle Hefekomplementation

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob das *GintERG11*-Gen, welches für die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase kodieren könnte, funktionell ist. Dazu wurde eine funktionelle Hefekomplementation mit dem Hefestamm YUG37::*ERG11* durchgeführt. Bei dem dargestellten Ergebnis handelt es sich um einen Versuch, der noch nicht reproduziert wurde. Der verwendete Hefestamm YUG37::*ERG11* weist im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm eine Uracil-Auxotrophie auf, deren Bedeutung im Folgenden erläutert wird (Abb. 42). Darüber hinaus steht die Regulation des hefeeigenen *ERG11*-Gens unter der Kontrolle eines Promotors, der eine Tetracyclin-Operatorsequenz (*tetO*) trägt.

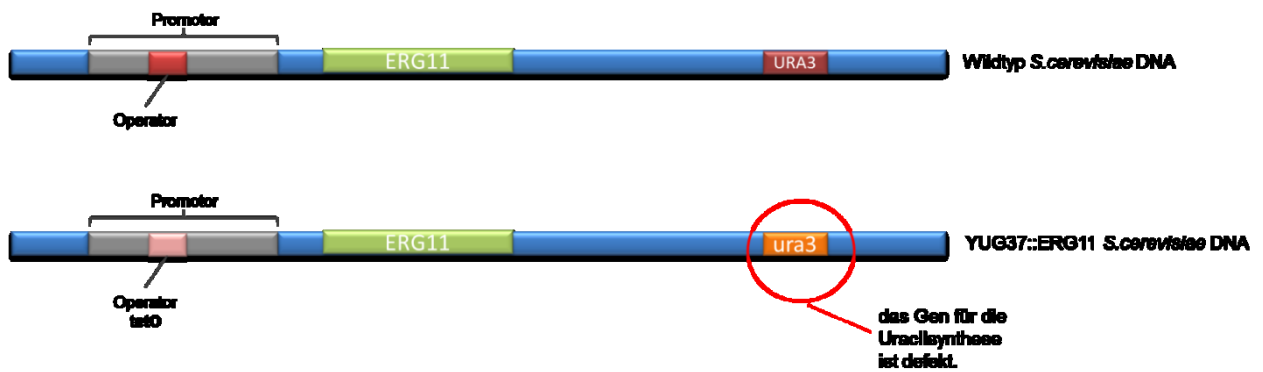


Abb. 42: Schematischer Vergleich der *ERG11*-DNA-Sequenz der Wildtyp-Hefe *S.cerevisiae* und dem mutierten Hefestamm YUG37::*ERG11*

Die Transkription der endogenen *ERG11*-mRNA wird in diesem Fall durch die An- oder Abwesenheit von Tetracyclin reguliert (Abb. 43).

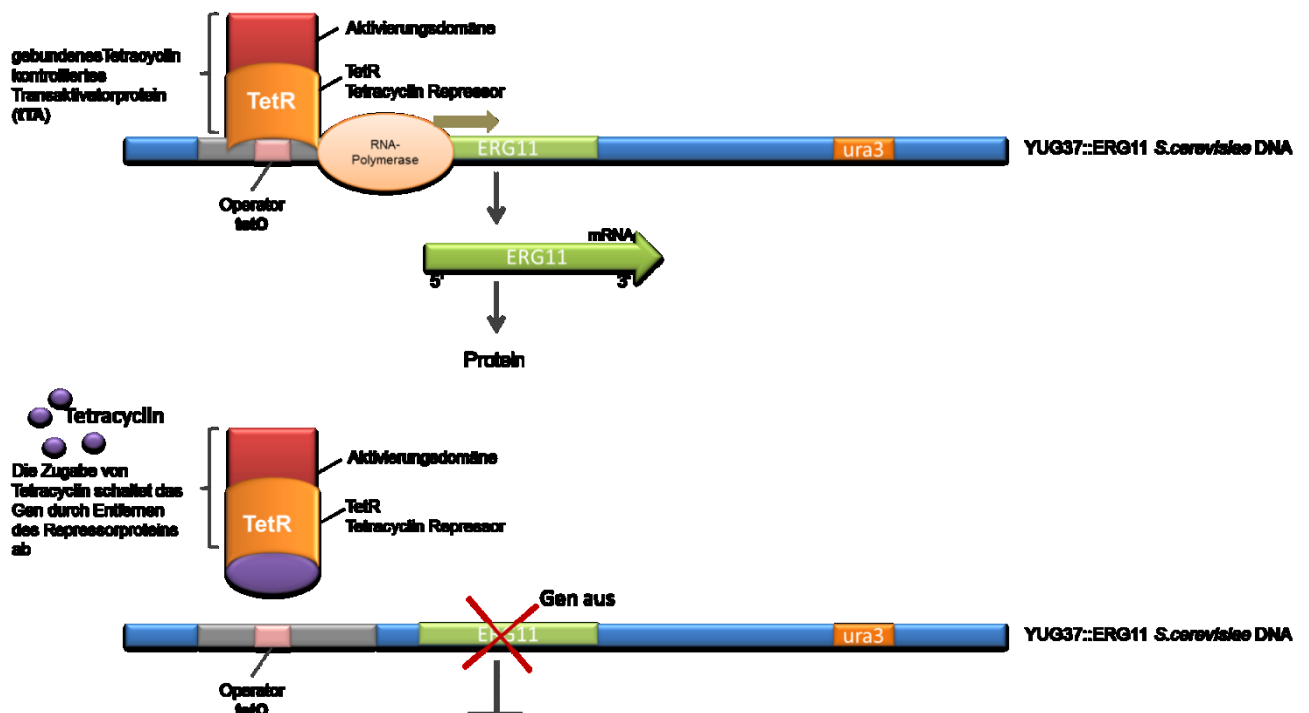
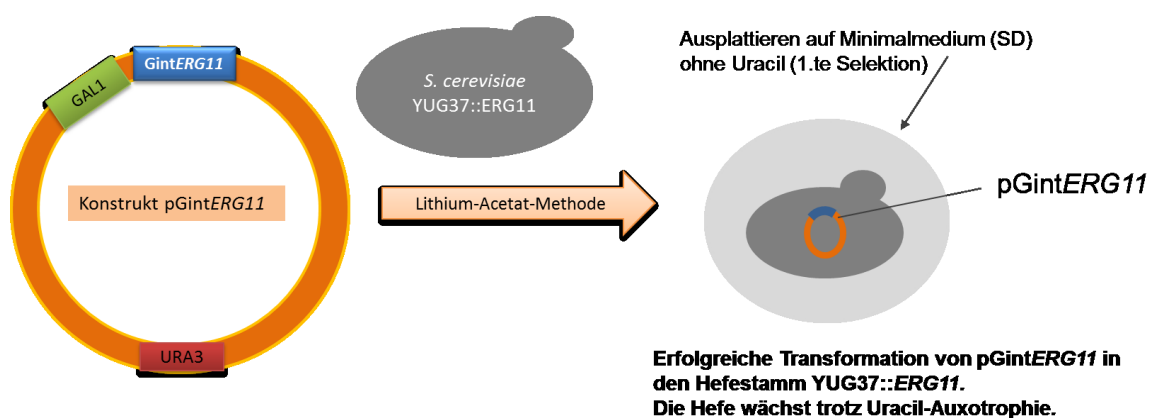


Abb. 43: Schematische Darstellung der tetracyclinabhängigen *ERG11*-Genregulation im Hefestamm YUG37::*ERG11*

In der Abwesenheit von Tetracyclin bindet der tetracyclinkontrollierte Transaktivator (tTA), der sich aus dem Tetracyclin-Repressor (TetR) und einer Aktivierungsdomäne zusammensetzt, an die Operatorsequenz (tetO), sodass die Gensequenz durch die RNA-Polymerase abgelesen werden kann. Bei Tetracyclin-Anwesenheit, bindet dieses an den Tetracyclin-Repressor (TetR). Der Transaktivator tTA dissoziiert daraufhin von der Operatorsequenz und verhindert die Transkription der *ERG11*-mRNA. Es findet keine Sterolbiosynthese mehr statt und die Hefe ist unfähig zu wachsen. Auf diese Weise ist die Regulation des endogenen *ERG11* der Hefe über die An- oder Abwesenheit von Tetracyclin im Medium möglich.

Zum Nachweis der Funktionalität von *GintERG11* wurde in der folgenden Untersuchung überprüft, ob *GintERG11* den Defekt der Hefe *YUG37::ERG11*, auf tetracyclinhaltigem Medium nicht wachsen zu können, komplementiert. Dazu wurde die kodierende Region von *GintERG11* aus cDNA von extraradikalem Myzel in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar ERGyes\_fwd und ERGyes\_rev amplifiziert. Die Primer besitzen spezifische 5'-terminale Anhänge mit Homologie für die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des Integrationsbereichs des Zielvektors pYES 2. Anschließend wurde das amplifizierte Fragment in den Vektor pYES 2 kloniert (2.12.9). Es wird im Folgenden als p*GintERG11*-Konstrukt bezeichnet. Der Vektor besitzt ein selektierbares Markergen für die Uracilsynthese (*URA3*) sowie einen galaktoseinduzierten Promotor (*GAL1*), der die Expression der in den Vektor klonierten Gene in Abhängigkeit von Galaktose, reguliert. Mittels Lithium-Acetat-Methode (Abschnitt 2.12.13.3) wurde das p*GintERG11*-Konstrukt in den Hefestamm *YUG37::ERG11* transformiert (Abb. 44). Der Vektor wird dabei normalerweise nicht ins Hefegenom integriert und liegt episomal vor. Als Positivkontrolle wurde das p*CAERG11*-Konstrukt von *Candida albicans* in den Hefestamm transformiert. Die Funktionalität der *ERG11* von *Candida albicans* wurde von Revankar *et al.* (2004) demonstriert. Als Negativkontrolle wurde der leere Vektor pYES in die Hefe transformiert.

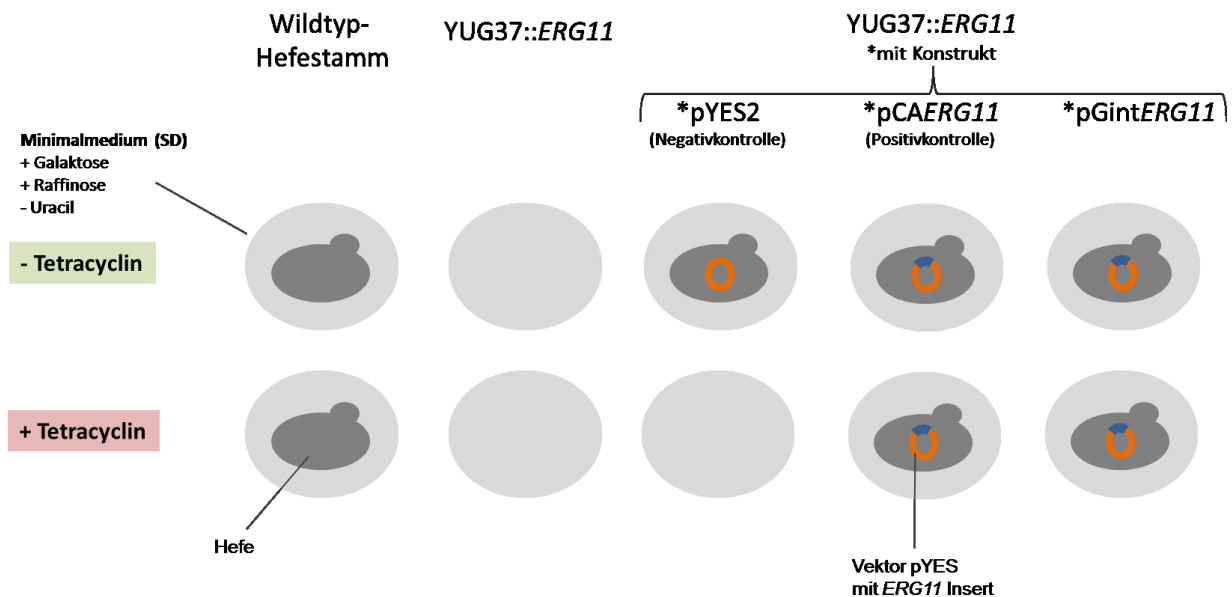


**Abb. 44:** Schematische Darstellung der Transformation (Lithium-Acetat-Methode) des p*GintERG11*-Konstrukts in den Hefestamm *YUG37::ERG11* mit anschließender Selektion auf Minimalmedium ohne Uracil

Zur Untersuchung auf eine erfolgreiche Transformation wurde der Hefestamm auf Minimalmedium ohne Uracil (SD, -URA) ausplattiert (Abschnitt 2.4.7). Da der Hefestamm auxotroph für Uracil ist, wächst er nicht auf diesem Medium. Bei Aufnahme des pGint*ERG11*-Konstrukts wächst er hingegen, da der Vektor das Gen für die essenzielle Uracilsynthese trägt.

Die transformierten Hefestämme wuchsen auf uracilfreiem Minimalmedium und konnten für den folgenden Selektionsschritt auf tetracyclinfreiem oder -haltigem Minimalmedium weiterverwendet werden (Abb. 45). Das Medium enthielt zudem Galaktose und Raffinose, um die Expression der Gint*ERG11* (*CAERG11*) zu induzieren.

Der Wildtyp-Hefestamm wuchs sowohl auf Minimalmedium mit als auch ohne Tetracyclin, da in diesem die Expression von *ERG11* nicht tetracyclinabhängig reguliert wird. Im Gegensatz dazu wuchs der mutierte Hefestamm YUG37::*ERG11* auf keinem der beiden Medien, da er auxotroph für Uracil ist. Wurde der Vektor pYES2 in den mutierten Hefestamm transformiert, so wuchs dieser nur in Abwesenheit von Tetracyclin, da die essenzielle Uracilsynthese durch das URA3-Selektionsmarkergen des aufgenommenen Vektors möglich war und die Genexpression von *ERG11* durch die Abwesenheit von Tetracyclin induziert wurde.



**Abb. 45: Schematische Darstellung des Wachstumsverhaltens der Wildtyp-Hefe und der transformierten Hefestämme YUG37::*ERG11* auf SD-Medium in der Ab- oder Anwesenheit von Tetracyclin**

In der Positivkontrolle des Hefestammes *pCAERG11* und des Hefestammes, der das *pGintERG11*-Konstrukt aufgenommen hatte, wuchsen die Hefen sowohl in der An- als auch Abwesenheit von Tetracyclin im Medium. Zum einen wird die Expression des hefeeigenen *ERG11*-Gens durch das Fehlen von Tetracyclin im Medium induziert und zum anderen durch galaktosehaltiges Medium die Expression des Gint*ERG11* und des *CAERG11* induziert. Es lässt sich jedoch in der Abwesenheit von Tetracyclin nicht zwischen der Expression des endogenen



*ERG11* und den in die Hefe transformierten Genen *GintERG11* bzw. *CAERG11* unterscheiden. In tetracyclinhaltigem Medium wuchsen jeweils die Hefestämme, die das Konstrukt *pGintERG11* oder *pCAERG11* aufgenommen hatten. Unter diesen Bedingungen ist die Expression des *ERG11* der Hefe unterdrückt und normalerweise kein Wachstum möglich. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass der Defekt der Hefe auf tetracyclinhaltigem Medium nicht zu wachsen, durch *GintERG11* (*CAERG11*) komplementiert wurde.

### 3.3.2 Einfluss von Azol-Fungiziden auf die Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices*

#### 3.3.2.1 Einfluss von Tebuconazol und Prothioconazol auf die Genexpression von *GintERG11* in extraradikalem Myzel

Nach der Anwendung von Azol-Fungiziden wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* und einigen *Candida*-Spezies wie *Candida albicans*, *Candida tropicalis* und *Candida glabrata* die Hochregulierung des *ERG11*-Genexpressionslevels als Reaktion auf eine Sterol-Mangelsituation beobachtet (Henry *et al.*, 2000; Bammert & Fostel, 2000; Yu *et al.*, 2007). Im Folgenden wurde untersucht, ob die *GintERG11*-Genexpression durch die Azol-Fungizide Tebuconazol und Prothioconazol ebenfalls hochreguliert wird. Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass *Glomus intraradices* bei direkter Wirkstoff-Exposition sensitiv auf diese Fungizide reagierte (Abschnitt 3.1.2). Beide Wirkstoffe reduzierten die Sporenproduktion und das Myzelwachstum im Pilzkompartiment des monoxenischen Wurzelkultur-Systems (Tab. 14).

Für die vorliegende *in vitro* Untersuchung wurde das Wurzelkultur-System (Abschnitt 2.7.2), mit dem die räumliche Trennung zwischen extraradikalem Myzel und der Wirtswurzel möglich ist, verwendet. Im Pilzkompartiment der geteilten Petrischale entwickelte sich das Myzel zunächst in wirkstofffreiem flüssigem M-Medium, bis das Kompartiment vollständig mit Myzel bedeckt war. Anschließend wurde das M-Medium gegen frisches wirkstofffreies (Kontrolle) oder wirkstoffhaltiges Medium (0,3 ppm, 30 ppm) ausgetauscht und das Myzel in diesem für 24 h, 48 h sowie 7 Tagen inkubiert.

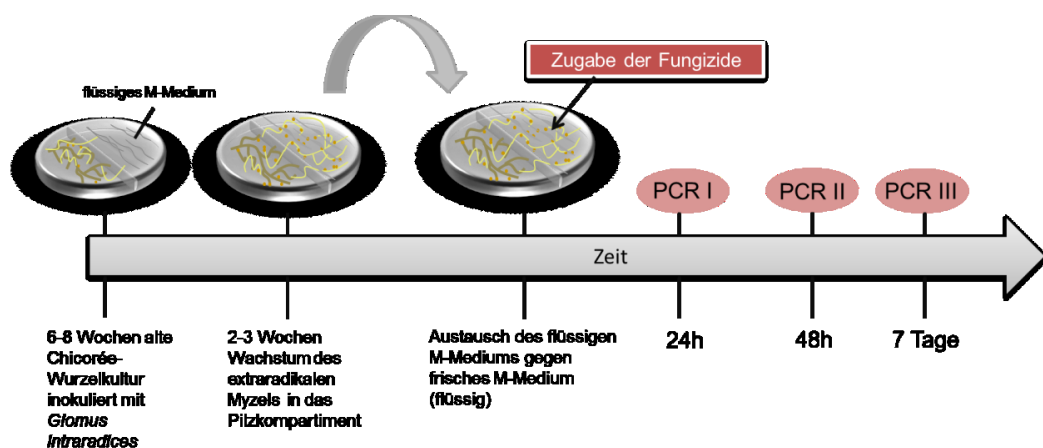


Abb. 46: Zeitschema der Fungizidapplikation und PCR-Reaktionen

Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,05 % acetonhaltiges Medium verwendet. Pro Variante wurden drei Wiederholungen á zwei Petrischalen angesetzt. Nach der Ernte wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und dann bis zum Erhalt der cDNA aufgearbeitet. Anschließend wurde in einer quantitativen PCR die Expression von *GintERG11* bestimmt (Abschnitt 2.12.8.1). Dazu wurden die Primer 9796\_fwd und 9796\_rev zur Amplifikation eines 150 bp großen Teilssegmentes von *GintERG11* verwendet. Als Referenzgen wurde der Elongationsfaktor *Ef-1- $\alpha$*  verwendet, bei dem von einer konstitutiven Genexpression ausgegangen wird.

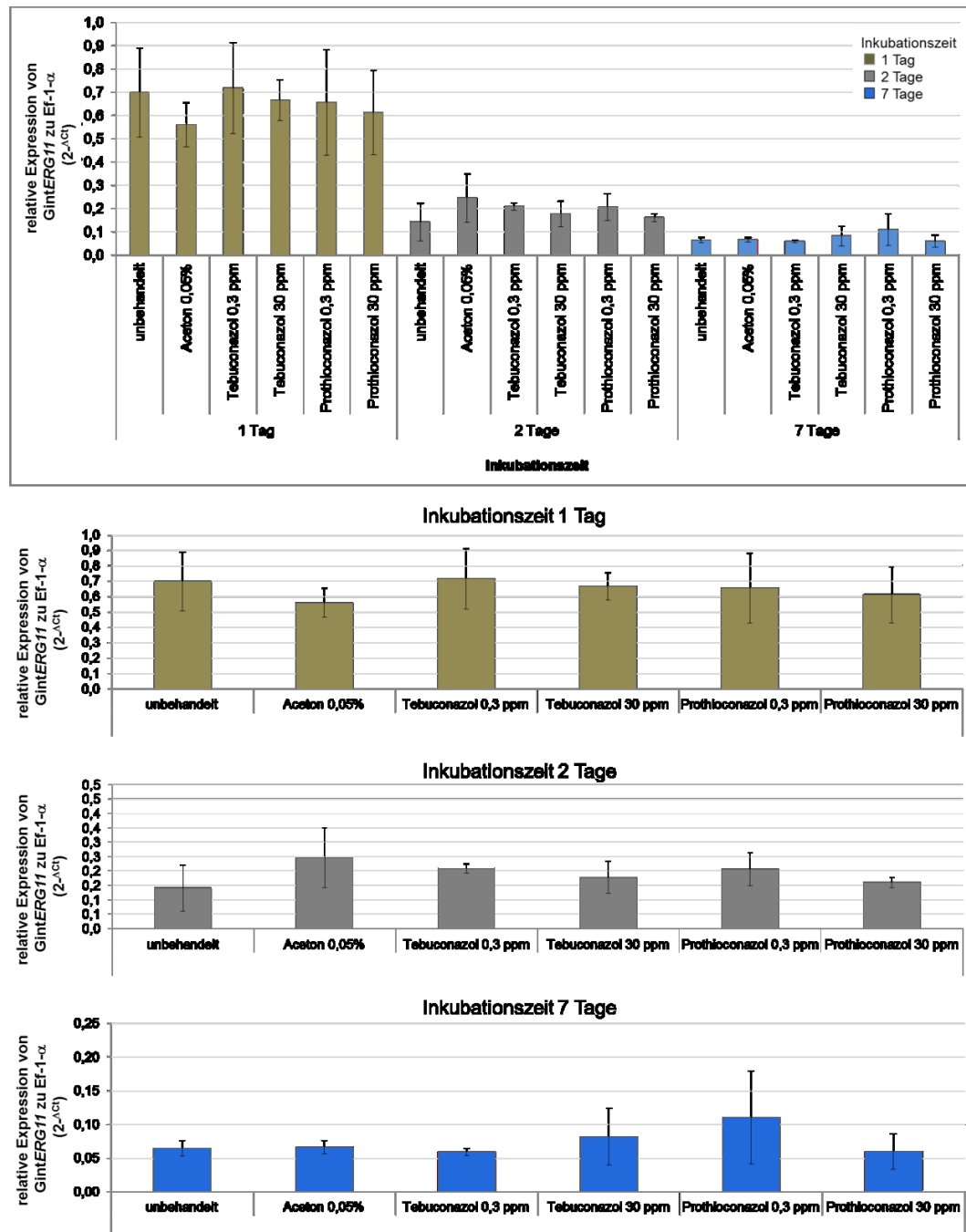


Abb. 47: Relative Expression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) von *GintERG11* des extraradikalen Myzels nach der Behandlung mit Aceton und Fungiziden (Tebuconazol, Prothioconazol) ( $\Delta Ct = Ct\text{-Wert } GintERG11 - Ct\text{-Wert } Ef-1-\alpha$ )

Zur Bestimmung der relativen Expression von *GintERG11* wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet, für den die Ct-Werte des zu untersuchenden Gens *GintERG11* in Relation zum Referenzgen *Ef-1- $\alpha$*  gesetzt wurden. Die relative Expression ergibt sich anschließend aus der Formel  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ .

Die ermittelten Ct-Werte der vorliegenden qPCR-Experimente lagen im detektierbaren Bereich ( $< 30$ ) und wiesen keine hohe Variabilität zwischen den technischen Replikaten ( $n=3$ ) auf.

Über den Untersuchungszeitraum sank die Genexpression von *GintERG11* sowohl in der unbehandelten als auch in den behandelten Varianten. 24 Stunden nach Auswechseln des Nährmediums gegen frisches Medium – mit oder ohne Wirkstoff – war die Expression von *GintERG11* am höchsten.

Es wurde zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Hochregulierung des *GintERG11*-Expressionslevels durch den Einfluss der Azol-Fungizide festgestellt (Abb. 47), obwohl die Sporenkeimung und –produktion von *Glomus intraradices* bei direkter Wirkstoff-Exposition sensitiv auf diese Fungizide reagierte (Abschnitt 3.1.2).

### 3.3.3 Analyse der *GintERG11*-Aminosäuresequenz auf typische Azol-Fungizid-Resistenzstellen

Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die an der Entwicklung von Resistenzen beteiligt sind. Die größte Auswirkung haben spezifische Mutationen am Wirkort, die die Bindung des fungiziden Wirkstoffes in diesen Wirkort und damit als Folge die Wirksamkeit reduzieren. Für Pathogene wie *Mycosphaerella graminicola*, dem wichtigsten Getreidepathogen, wurden Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden nachgewiesen (Cools *et al.*, 2005, 2006; Leroux *et al.*, 2010).

Die Aminosäuresequenzen *ERG11* von *Glomus intraradices* und einiger ausgewählter Pilze wurde auf typische Mutationen, die für Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden verantwortlich sind, untersucht (Tab. 24). Es sollte festgestellt werden, ob eine Resistenz von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden zu erwarten ist. Als Grundlage dienten die im *ERG11*-Gen von *Mycosphaerella graminicola* gefundenen Mutationen (Cools & Fraaije, 2013). Diese werden in Abb. 48 durch gelbe Pfeile gekennzeichnet und zeigen den Austausch der Aminosäure auf, der zu einer Mutation führen kann. Bei den ausgewählten Organismen handelt es sich jeweils um den Wildtyp.

In der *ERG11*-Proteinsequenz von *Glomus intraradices* wurden einige auffällige Aminosäurevarianten, an Stellen, die zu einer Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden führen könnten, gefunden (Abb. 48, Tab. 24). Darunter waren zwei bekannte Aminosäuresubstitutionen (D134G, G412A) sowie vier unbekannte Substitutionen, deren Aminosäuren nicht mit denen der anderen Pilze übereinstimmten. Dies deutet daraufhin, dass *Glomus intraradices* eine andere Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden hat, als die übrigen Pilze.

**Tab. 24: Vergleich der *Glomus intraradices*-ERG11-Aminosäuresequenz mit der Sequenz von *Mycosphaerella graminicola* sowie anderen Pilzen und Angabe der bekannten Azol-Resistenz-Mutationen von *Mycosphaerella graminicola***

Position No.	bekannte Resistenzmutanten <sup>1</sup>	Aminosäuren, die bei Pilzen in Abb. 47 vorkommen	Aminosäure bei <i>Glomus intraradices</i>	Vermutung zur Azol-Resistenz bei <i>Glomus intraradices</i> <sup>2</sup>
50	L50S	P, L, K, R, A	Q	?
107	D107V	Q, D, E, N, A	N	Nein
134	D134G	E, D, H, G,	G	Ja
136	V136A	V	V	Nein
136	V136C	V	V	Nein
136	V136G	V	V	Nein
137	Y137F	Y, F	Y	Nein
145	M145L	M, K	M	Nein
178	N178S	N, S, D, -	indel*	Nein
188	S188N	K, G, S, R, N	K	Nein
208	S208T	S, A	S	Nein
284	N284H	A, Q, E, H, N, S, V	Y	?
303	H303Y	H, G, N	H	Nein
311	A311G	A, G	A	Nein
312	G312A	G	G	Nein
379	A379G	P, T, A, S, H, M	P	Nein
381	I381V	I, L	I	Nein
410	A410T	V, S, A	I	?
412	G412A	G, L, I, A	A	Ja
459	Y459C	Y, F	Y	Nein
459	Y459D	Y, F	Y	Nein
459	Y459N	Y, F	Y	Nein
459	Y459P	Y, F	Y	Nein
459	Y459S	Y, F	Y	Nein
460	G460D	G	G	Nein
461	Y461D	Y, F, W	F	Nein
461	Y461H	Y, F, W	F	Nein
461	Y461S	Y, F, W	F	Nein
510	G510C	G, N, K, D, T, P	N	Nein
513	N513K	G, D, K, N, S, E	indel*	?
524	S524T	V, T, S, H	V	Nein

<sup>1</sup> Bekannte Resistenzmutanten bei *Mycosphaerella graminicola* (Cools et al., 2012).

\* indel = Alignmentprogramm gibt keine eindeutige Aussage (Insertion/Deletion).

<sup>2</sup> ? = Neue Aminosäure, die nicht der Resistenzmutation von *Mycosphaerella graminicola* entspricht und bisher nicht pilztypisch ist.

Ja = Entspricht einer Resistenzmutation, die bei *Mycosphaerella graminicola* vorkommt.

Nein = Wildtyp *Mycosphaerella graminicola* oder Aminosäure, die pilztypisch ist.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Glomus intraradices MLLNSILDTIYNDYLI PFAYHANVTVQNNKLIAPFVK---EVSNTILYLCAIVTFSIPLLYILNSILYVKRQ NEPPIVPYMIPVIGSAITMGMOPIK  
Rhizopus oryzae MAYIST---LLPTLESIPLYAVLALGVFVIINILSQWFGKMP KEPPVVFVSWIPFHMNAIEFGINPIA  
Saccharomyces cerevisiae MSATKSIYGEALEYVNI GLSHFLALPLAQRISLIIIPFIYNIYVQQLLYSLK KDRPPLVVFYHWPVHGSAAVYVGMKPYE  
Candida albicans MAIVETVIDGINYFLSLSYVTTQISILLGVPFVYVNLVHQYLYSLK KDRAPLVFYHWPVHGSAAVYVGMKPYE  
Botryotinia fuckeliana MGILEAVTGPLAQEIS---QRSTGVVYAAGVAAFI VLSVYLVNVLNQVLFANF NEPPVVFHMLPVIGSTITYGMDPYK  
Oculimacula acuformis MGILEAVSVPLAQQVS---QRGLGVYIAGFAAFVYVSVYLVNLSQILFKNF NEPPVVFHFFPIIGSTITYGMDPYK  
Blumeriella jaapii MGFFERAVSPLNEQIS---QRGLAVYITAGFGAFVYVSVYLVNLSQILFKNF NEPPVVFHMLPVIGSTITYGMDPYK  
Blumeria graminis MGISESFHFPYLQPLL---QLGFGIALASGIISL LLLL TFLNVLKQLLFKNF NEPPIVFHMIPVIGSTISYGMNPYK  
Podosphaera fusca MGLLATLAELLQQTITS---NHSMSFLALAGIGTFLILSVYVNVLSQLFFKNF NEPPVVFHMFPIIGSTIPYGIIDPYK  
Erysiphe necator MYIADILSOLLTQOTT---RYGWIFHYTSIAFSIILLAVLVNVLNLSQLFRF NEPPVVFHMFPIIGSTISYGIIDPYK  
Glomerella graminicola MGLRQEVAGPLSQQFQ---TLGTGLQIFVYIVTAVISLSVYLVNVAYQILFKNF NEPPVVFHMFPIIGSTITYGMDPPA  
Aspergillus fumigatus MGLIAFILDGICKHCS---TQSTWVLVGIGLLSILAVSVIINVLQQLLFKNF NEPPVVFHMFPIIGSTISYGIIDPYK  
Venturia inaequalis MGLLSPLLAXLP---G---SDRSMLFYTLASFGFTVAIYAANLVKQLLFSNF NEPPVVFHMFPIIGSTITYGMDPIK  
Mycosphaerella graminicola MGLLQEVLAQFDAQFG---QTSLAKLYLGLLAFSTLALLNVLNLSQLFRGHL SDPPLVFHMFPIIGSTITYGMDPYK  
Leptosphaeria maculans MAVLATVAGPLGDFTA---KSSNFVLAITGFASFILVAVYLVNVLKQLLFKNF NEPPVVFHMLPIIGSTITYGMDPYA  
Penicillium digitatum MDLVPL---VTGQIKCIAYYITGLVLAIVLVNVAIKQLVFNK NEPPVVFHMFPIIGSTIVAYGMDPYK  
Ustilago maydis MYASSSSATASLLDQLFALTPLA-DSSANIKTITVLLPLAVLVNVAISQLLLATAK NHPPVVFHFVVPVIGSAVYVGIIDPYK  
Sporisorium reilianum MYSTSSSSATASLLDQLFALTPLA-DSSASVKALSLAVALPVALIYLVNVAARQLLPAPR NHPPVVFHFVVPVIGSAVYVGIIDPYK  
Puccinia triticina MSSVIGSL--LEPIG-SFSTFNQVLIYLVLAYVSIISINIFDQLAIPKIP TAPPVVFHMFPIIGSAVYVGIIDPYA  
Phanerochaete chrysosporium MSTSRLLVFLINIPILSVYCNVYIYQL-LPKIK LPPVYVHMFPIIGSAVYVGIIDPYK  
Mycobacterium tuberculosis MSAVALPRVSGGHDEHGHLEEFRTDPIG

Übereinstimmungen .....s.....nv..qll.....eppv!fhu.p.igs...yg.dpy.

L50S

101 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

Glomus intraradices FYRKYQQEYGNVYFTFILLGKRMVTC LGSEGN FVNAKLANASAEARYKSLTVPVFGKGVVYD VVHNSVLM EQKKFVKAGLSNENLRAYVPMIEMETKNYF  
Rhizopus oryzae FLQKCQKKYGDVFTFYMVGKRVTYFLNADGN FVNAKQNLTSADAYNHMTKHYVGF EYVYDAPHSVFM EQKRFIKAGLNSSEFRQHVPVHVEEVGFF  
Saccharomyces cerevisiae FFEECQKKYGDIFS FVLLGRVNTVYLGPKGHE FVNAKLADVSAEARYAHLTTPVFGKGVYD CPNSRLM EQKKFVKAGLTKFAFKSYVPLIAEEVYKYF  
Candida albicans FFESCQKKYGDVFS FMLLGKINTVYLGPKGHE FVNAKLSDVSAEDAYKHLTTPVFGKGVYD CPNSRLM EQKKFAKFAITDSFKRYVVKIRIEILNYF  
Botryotinia fuckeliana FFFDCRAKYGDIFTFVLLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNAKLM EQKKFMKIGLSTEAFRSYVPIIQHEVENFM  
Oculimacula acuformis FFFDNKAKYGDIFTFILLGKKT VYLGKRGNE FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFMKIGL TTEAFKTYVPIIQHEVETFI  
Blumeriella jaapii FFFENKAKYGDCTFILLGKKT VYLGKRGNE FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNAKLM EQKKFMKIGL TTEAFKQYVPIIQHEVETFI  
Blumeria graminis FFHESQAKYGNIFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFMKIAL TTEAFRSYVPIIQHEVKSFI  
Podosphaera fusca FFSDCRAKYGDIFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFMKIGL TTEAFRSYVPIIQHEVETFY  
Erysiphe necator FFFDCRAKYGDIFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFMKIAL TTEAFRSYVPIIQHEVETFY  
Glomerella graminicola FFQAN--KYGDIFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFMKIAL TTEAFRSYVPIIQHEVETFY  
Aspergillus fumigatus FFFDCRAKYGDIFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYTVL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFVKYGLTSDALRSYVPLITDEVESFY  
Venturia inaequalis FFAECKEKHGDIFTFILLGKKT VYLGKRGNE FILNGKQSHVNAEEIYSPL TTPVFGSDVYD CPNSKLM EQKKFVKYGLTTEALRSYVPLITDEVEDYT  
Mycosphaerella graminicola FFFSCREKYGDVFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYSPL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFVKYGLTTEALRSYVPLITDEVEDYT  
Leptosphaeria maculans FFFRNQKKYGNVFTFILLGKKT VYLGKRGND FILNGKLDVNAEEIYSPL TTPVFGKDVYD CPNSKLM EQKKFVKYGLTTEALRSYVPLITDEVEDYT  
Penicillium digitatum FFFASRAKYGNIFTFILLGKKT VYLGKRGNE FILNGKLDVNAEEIYSPL TTPVFGSDVYD CPNSKLM EQKKFVKYGLTTEALRSYVPLITDEVEDYT  
Ustilago maydis FFFECREKYGDVFTFVLLGRKITVYLGPKGSD VFNKHHQVTAEDAYTHL TTPVFGKEVYD VPNVAFM EQKKFVKYGLSTENFRQYVGMIEEVLFQFM  
Sporisorium reilianum FFFECRAKYGDVFTFVLLGRKITVYLGPKGSD VFNKHHQVTAEDAYTHL TTPVFGKEVYD VPNVAFM EQKKFVKYGLSVDNFRVYVPIQVDEVREYI  
Puccinia triticina FFFDCREKYGNVFTFVLLNKKVTYVYLGKRGND VLNGLKSDVNAEEIYSPL TTPVFGSDVYD VPNAILM EQKKFVKYGLSTENFRQYVGMIEEVLFQFM  
Phanerochaete chrysosporium FFFDCREKYGNVFTFVLLNKKVTYVYLGKRGND VLNGLKSDVNAEEIYSPL TTPVFGSDVYD VPNAILM EQKKFVKYGLSTENFRQYVGMIEEVLFQFM  
Mycobacterium tuberculosis LMQRVRDECQGDVGTFLAGKQVYVLLSGSHANE FFRAGDDDLQAKAYPFMT-PIFGEVYVDFASPERK EN--LHNAALRGEQMKGHARTIEDQYRRMI

ff..c..kygd.Ftf.llgkk.tv.lg..Gr#f.lngk..dv.aee.y..ltpvfg..vvydcpns..lneqqkf.k.gl..e.fr.yvp.i..ev..%.

D107V D134V V136A/C/G Y137F M145L

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Glomus intraradices		-----	HNKQSDIQDVHKATAELIINTFS	-----	SKCLLGEEVRSKLDSEFAQIFHDL	DGGFKPVNLFEDLPLPSNKL	RQQAHVYKMRHFFMDIMKORRE	-----	-----	-----	-----
Rhizopus oryzae	KN	-----	YKPTGAFDAYHTLGEIICTFS	-----	SRLMGKEIRASLDDSVAGLYYDL	DQGFKPINFIFPNLPLPSYRKR	DVARQKMTDLYSSIIARRKA	-----	-----	-----	-----
Saccharomyces cerevisiae	RDSKNFR	-----	LNERTTGTIDVYVYQPEMTIFT	-----	SRLLGKEMRAKLDTFAYLYSOLD	DKGFTPINFVFPNLPLEHYRKR	DHAQKAISGYMSLIKERRK	-----	-----	-----	-----
Candida albicans	VTDESFK	-----	LKEKTHGVANVMKQPEITIFT	-----	SRLFQDEMRRIFDRSFAYLYSOLD	DKGFTPINFVFPNLPLEHYRKR	DHAQKAISGYMSLIKERRK	-----	-----	-----	-----
Botryotinia fuckeliana	KA	-----	SSAFKGPKTADIGPMAEITIFT	-----	ATLQGKEVRDRFDTSFASLYHDL	DMGFSPIHFMLHWAPLPHNRAR	DHAQRTVAKTYMDIIQNRA	-----	-----	-----	-----
Oculimacula acuformis	KA	-----	SALGHSGTADIPQMAEITIFT	-----	HALQGGKDCROKFDSSFAELYHAL	DMGFSPIHFMLHWAPLPHNRAR	DHAQRTVAKTYMEIHEARRK	-----	-----	-----	-----
Blumeriella jaapii	KA	-----	SALGHSGTADIPQMAEITIFT	-----	HALQGGKDCROKFDSSFAELYHAL	DMGFSPIHFMLHWAPLPHNRAR	DHAQRTVAKTYMEIHEARRK	-----	-----	-----	-----
Blumeria graminis	EK	-----	CDDFRFGKGIINIDAVMAEITIFT	-----	HTLQGKEVRDRFDSSFAELYHDL	DMGFSPIHFMLHWAPLPHNRAR	DHAQRTVAKTYMEIHEARRK	-----	-----	-----	-----
Podosphaera fusca	KK	-----	CPGFKGEEGTYDIPAMAQITIFT	-----	HTLQGKEVRDRFDSSFAELYHDL	DMGFSPIHFMLPSAPLPHNRAR	DRAQATVAKLYMEVIKMRRL	-----	-----	-----	-----
Erysiphe necator	NN	-----	CVSFGQSGTYNISKVMAEITIFT	-----	HALQGEVRENFDSSFAELYHDL	DMGFTPINFTFYHAPLPHNRAR	DHAQRTVARTYMNIIQARRE	-----	-----	-----	-----
Glomerella graminicola	KS	-----	SPDFKGSQVYNIPTKMAEITIFT	-----	HALQGAERIRKFDSESLAYHDL	DMGFTSINFVYLHWAPLPHNRAR	DHAQRTVARTYMNIIQARRE	-----	-----	-----	-----
Aspergillus fumigatus	KN	-----	SPAFQGHKGVDFVYKTIKMAEITIFT	-----	SRLQGVDFVYKTIKMAEITIFT	FAELYHNLDMGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Venturia inaequalis	KA	-----	YPAFKGEGKSFDFVYKMAEITIFT	-----	SRLQGVDFVYKTIKMAEITIFT	FAELYHNLDMGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Mycosphaerella graminicola	DFN	-----	NPHKFASTSGTIDLPPALAEITIFT	-----	SRLQGVDFVYKTIKMAEITIFT	FAELYHNLDMGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Leptosphaeria maculans	KA	-----	HKAFKGSQVYNIPTKMAEITIFT	-----	SRLQGVDFVYKTIKMAEITIFT	FAELYHNLDMGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Penicillium digitatum	KS	-----	SPSFKGSGTIDLVPAMAETITFT	-----	RTLQGEVRSKLTTEFAKLFHDL	DLGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Ustilago maydis	KSD	-----	ARFSALKT-RKTITVDFQAMSEILIT	-----	SRTLQGEVRSKLTTEFAKLFHDL	DLGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Sporisorium reilianum	KTD	-----	PRFA-PVQQGKSFVDFQAMSEILIT	-----	SRTLQGEVRSKLTTEFAKLFHDL	DLGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Puccinia triticina	E	-----	DHYFE-NPKT-QQTVKDTFKVASEITICT	-----	SRTLQGEVRSKLTTEFAKLFHDL	DLGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Phanerochaete chrysosporium	RND	-----	ASFKIYQMNIDINWGAFDVLYKVMSEITIT	-----	SRTLQGEVRSKLTTEFAKLFHDL	DLGFTPINFVFPNLP	PHNRARDAQKLTETEMEIKARR	-----	-----	-----	-----
Mycobacterium tuberculosis	AD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

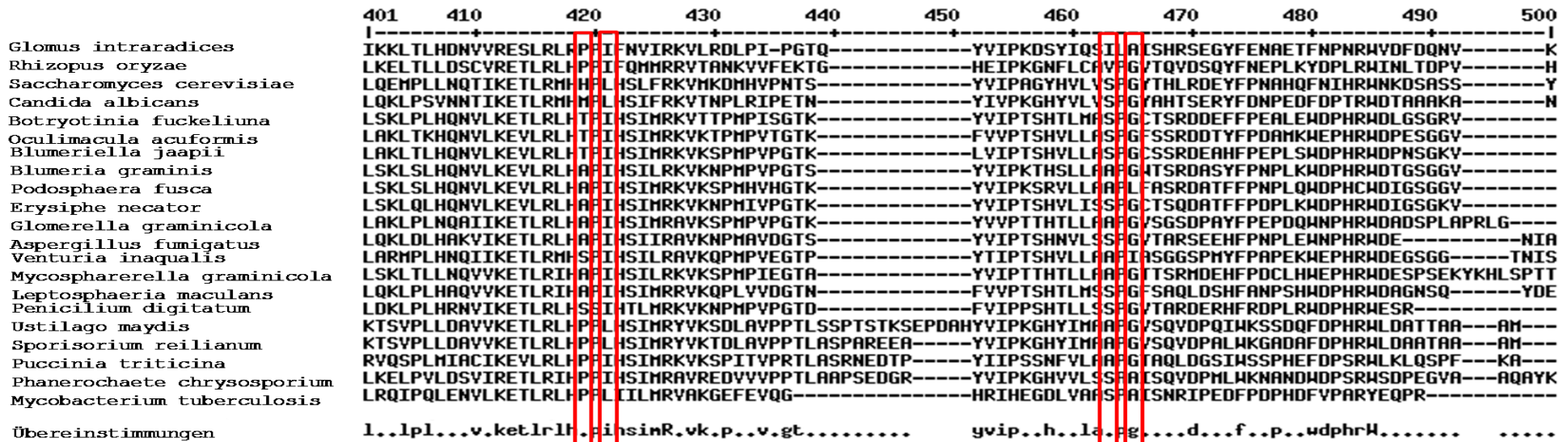
Übereinstimmungen  
 .....g..d.....ae.ti.tes..LqgkevR...d.sfa.lyhdL.d.gf.pinf..p..pLp.nr.Rd.a.....gm.ii..rr.

N178S      S188N      S208T

	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
Glomus intraradices	KGITDR	-----	TDIMQY	-----	LTHCQYKDGKRLSDEESFA	MIAMLAG	QHTSSSTTAWALLYLASQPNL	FNELRKEQIEVFGSL	-----	DEPLT	-----	FDG	
Rhizopus oryzae	ENDFSN	-----	ADLLQA	-----	MD-ANYKDGSNYPDHHIA	GMIAVYLVGG	QHTSATSANTLLELARPD	LIRDLREEQITKLGSL	-----	KADLT	-----	FDN	
Saccharomyces cerevisiae	NNDIQ-DR	-----	DLIDS	-----	MKNSTYKDGVMKTDQEI	FM	LIGVLMGG	QHTSATSANTLLELARPD	YEEQMRVL	-D	-----	GGKELT	
Candida albicans	RGDIDPNR	-----	DLIDS	-----	LHSTYKDGVMKTDQEI	FM	LIGVLMGG	QHTSATSANTLLELARPD	YEEQMRVL	-D	-----	GGKELT	
Botryotinia fuckeliana	QATEAEFK	-----	SDIMQ	-----	M-RSSYKDGTPVPDKEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Oculimacula acuformis	DKKSLD-N	-----	MDIMS	-----	M-RSTYKNGVYPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Blumeriella jaapii	DKKSLD-N	-----	MDIMS	-----	M-RSTYKNGVYPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Blumeria graminis	QKETDDSN	-----	LDIMS	-----	M-RSSYKDGTPVPDKEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Podosphaera fusca	QEGDQTR	-----	HDIME	-----	M-RSTYKDGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Erysiphe necator	EKRSGENK	-----	HDIME	-----	M-RSTYKDGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Glomerella graminicola	QGRT--NG	-----	LDIMS	-----	M-RSTYKNGIKVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Aspergillus fumigatus	QAGSKKDS	-----	EDMIA	-----	M-SCVYKNGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Venturia inaequalis	REGVKKDS	-----	EDMIA	-----	M-SCVYKNGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSSSIWMLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Mycosphaerella graminicola	ESKTGEHE	-----	EDMIA	-----	M-QCKYKDGNAIPDKEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSATESWITLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Leptosphaeria maculans	-AGVAKDS	-----	EDMIA	-----	M-DCKYKDGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSATESWITLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Penicillium digitatum	AGEEANDNGRDKTKGDMISN	-----	EDMIA	-----	M-RCVYRDGTPVPDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSSATESWITLRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Ustilago maydis	AGASTSADDA-SGE-NDMIA	-----	LI	-----	EQKYKNGRALSGVEI	FM	MIALLMAG	QHTSSATSSWAFRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Sporisorium reilianum	AG--HAGDG-RGE-NDMIA	-----	LI	-----	EQKYKNGRALSGVEI	FM	MIALLMAG	QHTSSATSSWAFRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Puccinia triticina	-----DDR-EGQLGDMIDS	-----	LI	-----	Q-GQTYKDGRLNDEI	FM	MIALLMAG	QHTSSATSSWAFRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Phanerochaete chrysosporium	-----NPG-QEEHDMIA	-----	LI	-----	M-NQKYRVGRPLKDHEI	FM	MIALLMAG	QHTSSATSSWAFRLASRP	DIMEELYQEIQVVLGAD	-----	LPALK	-----	YED
Mycobacterium tuberculosis	NPPTDKSD	-----	RDMLD	-----	LI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

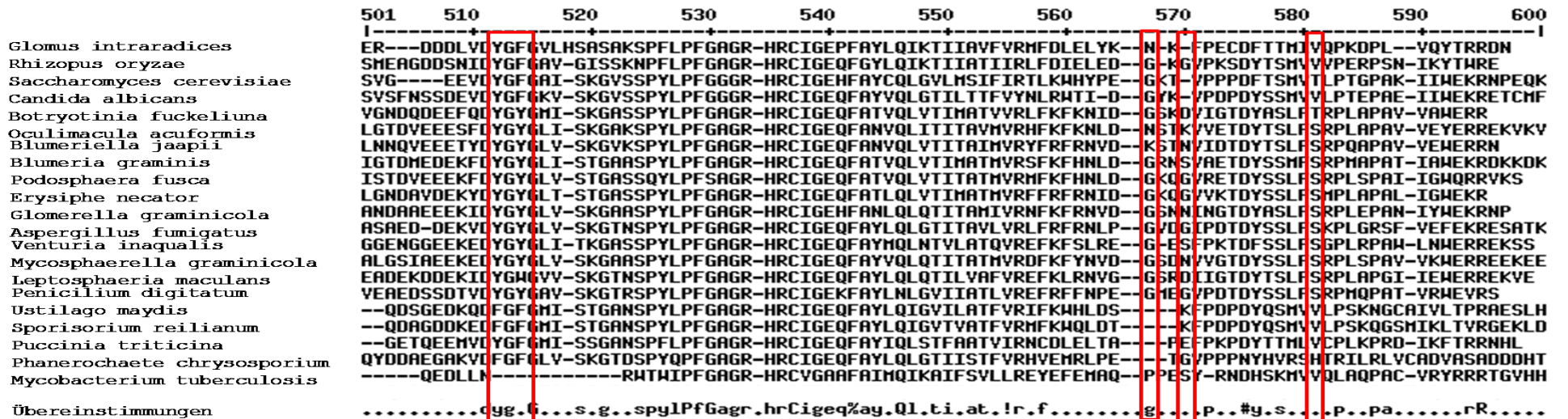
Übereinstimmungen  
 .....d....ln....gkdg....d.#!ahmiiallmagQH.ss.t.su.ll.la.rpd..eely.eq...lg.....l...y..

N284H      H303Y      A311G  
 G312A



A379G  
I381V

A410T  
G412A



Y459C/D/N/P/S  
G460D  
Y461D/H/S

G510C  
N513K

S524T

Abb. 48: ERG11-Aminosäuresequenz-Alignment (ClustalW2) ausgewählter Pilze mit Markierung der typischen Azol-Fungizid-Resistenzstellen aufgrund von Aminosäureaustausch (gelber Pfeil: Position in der Sequenz, an der ein Austausch der Aminosäure zur Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden führt)

## 4 Diskussion

Ertragssteigernde Effekte oder einer erhöhte Stresstoleranz sind nur wenige Faktoren, die der Mykorrhiza-Symbiose eine erhebliche Bedeutung für die Landwirtschaftliche Nutzung zukommen lassen. So zeigen Pflanzen, deren Wurzeln mit arbuskulären Mykorrhizapilzen kolonisiert sind, eine wesentlich höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber mykorrhizafreien Pflanzen. Andererseits sind hinsichtlich einer effizienten Produktion von Nahrungs- und Futtermitteln sowie eines immer stärker werdenden Bedarfs an erneuerbaren Energieträgern hochwirksame Pflanzenschutzmittel ein unverzichtbarer Bestandteil in der Landwirtschaft. Diese sollen sowohl die Quantität als auch die notwendige Qualität der Ernte sichern sowie die Erträge steigern. Bei der Ergreifung dieser Maßnahmen sollen jedoch nützliche Organismen wie arbuskuläre Mykorrhizapilze nicht geschädigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Fungizidanwendung auf die für Kulturpflanzen nützliche Wurzelsymbiose mit Mykorrhizapilzen hat, wenn sie zur Bekämpfung von Krankheitserregern in der empfohlenen Aufwandmenge aufgebracht werden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich die Fungizide nachhaltig schädlich auf die Bodenökologie auswirken. Auf verschiedenen Versuchsebenen wurde der Einfluss der Fungizide auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* vom direkten artifiziellen Kontakt bis hin zum Einfluss auf die symbiontische Beziehung mit Gerstenpflanzen unter Berücksichtigung einer praxisrelevanten Anwendung von Pflanzenschutzmitteln untersucht. Die Arbeit bietet erstmals umfassende Informationen zum Einfluss von Fungiziden auf *Glomus intraradices* unter Bedingungen, die für die landwirtschaftliche Praxisanwendung von Fungiziden relevant sind. Bisherige Untersuchungen wurden entweder unter völlig artifiziellen Bedingungen mit hohen Dosierungen durchgeführt oder sind weitgehend auf die Bodenbehandlung beschränkt, deren Anwendung überwiegend auf den Gartenbau begrenzt ist. Angewendet wurde ein breites Spektrum von Wirkstoffen zur Bekämpfung von Schaderregern an Pflanzen, das die aus Landwirtschaft und Gartenbau bedeutenden Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen abdeckt. Dabei wurden charakteristische Vertreter aus einer Substanzklasse geprüft, die sich hinsichtlich ihres Wirkungsspektrum und physikochemischen Eigenschaften unterscheiden.

Trifloxystrobin	Inhibitor der mitochondrialen Atmung (Komplex III <i>Ubiquinol Oxidase</i> )
Fluoxastrobin	Inhibitor der mitochondrialen Atmung (Komplex III <i>Ubiquinol Oxidase</i> )
Penflufen	Inhibitor der mitochondrialen Atmung (Komplex II <i>Succinat-Dehydrogenase</i> )
Triadimenol	Inhibitor der Sterolbiosynthese (Klasse I <i>C14-Demethylase</i> )
Tebuconazole	Inhibitor der Sterolbiosynthese (Klasse I <i>C14-Demethylase</i> )
Prothioconazole	Inhibitor der Sterolbiosynthese (Klasse I <i>C14-Demethylase</i> )
Ipconazole	Inhibitor der Sterolbiosynthese (Klasse I <i>C14-Demethylase</i> )
Fludioxonil	Inhibitor der Signaltransduktion (MAP/ <i>Histidin-Kinase</i> )
Thiram	Inhibitor mit mehreren teils unbekanntem Wirkorten ( <i>Multi-site</i> )
Metalaxyl *	Inhibitor der Nukleinsäuresynthese ( <i>RNA Polymerase I</i> )

\* Oomycetenmittel ohne Pilzwirkung.



Die Fungizide wurden zu verschiedenen Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices* appliziert. Abb. 49 gibt einen Überblick über den Lebenszyklus von *Glomus intraradices* sowie die Zeitpunkte und die Arten der Fungizid-Applikation.

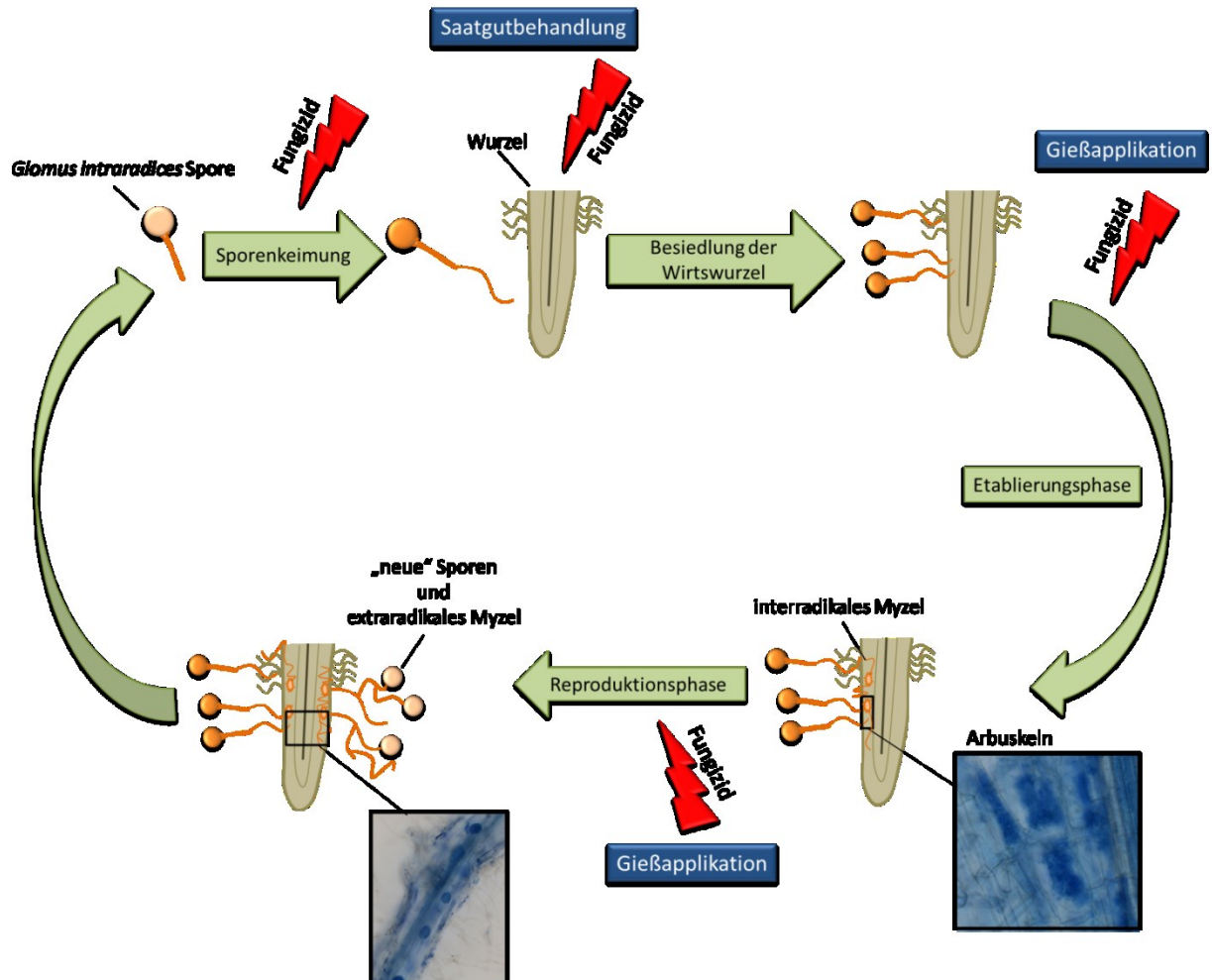


Abb. 49: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Glomus intraradices* und Zeitpunkte der Fungizid-Applikation

Alle Ergebnisse der Arbeit sind in Tab. 25 zur Übersicht zusammengefasst und werden im Folgenden einzeln diskutiert. Die farbliche Kennzeichnung der Tabelle ergibt sich aus der Wirkungsstärke der Fungizide und der  $I_{50}$ -Werte. Eine starke Hemmung des pilzlichen Wachstums oder der Sporenenkeimung wird rot gekennzeichnet, wenn der  $pI_{50}$ -Wert ( $-\log M$ ) größer als 7 ist oder eine Wirkungsstärke von  $>50\%$  vorliegt. Bei einem  $pI_{50}$ -Wert kleiner 4 liegt keine oder eine geringe Beeinflussung vor und wird grün markiert (Wirkungsstärke 0–20 %).

Wirkstoff	pathogene Zielpilze			Glomus intraradices				Glomus intraradices						
	Applikation des Wirkstoffes ins Nährmedium/Substrat							Saatgutbehandlung						
	Wirkung auf pathogene Zielpilze <sup>1</sup> (OD-Messung in Mikrotiterplatten)			Sporenceimung auf M-Medium <sup>2</sup>		Gießapplikation in Töpfen im Gewächshaus <sup>3</sup>		Sporenceimung auf M-Medium <sup>4</sup>		Saatgutbehandlung in Töpfen im Gewächshaus <sup>5</sup>		Saatgutbehandlung in Großcontainern unter Freilandbedingungen <sup>6</sup>		
	pathogene Zielpilze der Fungizide (außer *2)		I50	I50		relativer Mykorrhizierungsgrad (%)		relative Sporenceimung (%)		relativer Mykorrhizierungsgrad (%)		relativer Mykorrhizierungsgrad (%)		
-logM	IC50 (ppm)	-logM	IC50 (ppm)	Konzentration		Aufwandmenge		Laborformulierung <sup>a</sup>		Handelspräparat <sup>b</sup>				
Trifloxystrobin	<i>Septoria tritici</i> (SEPTRI)	>6,6	<0,1	5,5	1,3	0,5 ppm	100	2,2 µg/Korn	92	95	100	Sommer 2010	100	
						5 ppm	74	22 µg/Korn	77			Winter 2009/2010	89	
Fluoxastrobin	<i>Septoria tritici</i> (SEPTRI)	6,6	0,11	5,8	0,8	0,5 ppm	100	3,4 µg/Korn	85	96	95	Sommer 2010	100	
						5 ppm	96	34 µg/Korn	88			Winter 2009/2010	83	
Penflufen	<i>Rhizoctonia solani</i> (RHIZSO)	>6,5	<0,1	4,1	26,0	0,5 ppm	100	2,2 µg/Korn	83	100	94	Sommer 2010	92	
						5 ppm	100	22 µg/Korn	69			Winter 2009/2010	100	
Triadimenol	<i>Ustilago avenae</i> (USTAV)	5,5	0,9	3,8	49,0	0,5 ppm	100	16 µg/Korn	83	72	84	Sommer 2010	85	
						5 ppm	51	160µg/Korn	67			Winter 2009/2010	85	
Tebuconazol	<i>Ustilago avenae</i> (USTAV)	7,5	0,009	4,5	9,5	0,5 ppm	88	1,3 µg/Korn	98	88	92	Sommer 2010	88	
						5 ppm	45	13 µg/Korn	100			Winter 2009/2010	100	
Prothioconazol	<i>Ustilago avenae</i> (USTAV)	6,9	0,046	5,1	3,0	0,5 ppm	45	4,5 µg/Korn	80	54	100	Sommer 2010	86	
						5 ppm	26	45 µg/Korn	63			Winter 2009/2010	100	
Iaconazol	<i>Fusarium moniliforme</i> (FUSAVR) <sup>1</sup>	7	0,033	5,6	1,6	0,5 ppm	100	1,1 µg/Korn	90	95	100	Sommer 2010	100	
						5 ppm	92	11 µg/Korn	98			Winter 2009/2010	85	
Fludioxonil	<i>Gibberella zeae</i> (GIBBZE)	>6,7	<0,05	6,5	0,1	0,5 ppm	95	2,2 µg/Korn	85	97	88	Sommer 2010	100	
						5 ppm	71	22 µg/Korn	96			Winter 2009/2010	100	
Thiram	<i>Rhizoctonia solani</i> RHIZSO)	6,1	0,2	5,9	0,3	0,5 ppm	88	36 µg/Korn	89	100	95	Sommer 2010	90	
						5 ppm	80	360 µg/Korn	83			Winter 2009/2010	100	
Metalaxyl	<i>Fusarium oxysporum</i> (FUSAME) <sup>2</sup>	<3,4	>100	<3	28,0	0,5 ppm	100	1,1 µg/Korn	92	100	92	Sommer 2010	95	
						5 ppm	100	11 µg/Korn	100			Winter 2009/2010	100	

Quelle der Daten:

<sup>1</sup> Bayer CropScience AG, Research and Development, Monheim. Unveröffentlichte Screeningdaten (außer \*<sup>1</sup>).

\*<sup>1</sup> "Antifungal properties of the seed disinfectant ipaconazole and it's protection against "Bakane" and other diseases of rice" Tateishi, Hideaki; Saishoji, Toshihide; Suzuki, Toji; Chida, Tsuneaki; Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho (1998), 64(5), 443-450.

\*<sup>2</sup> Metalaxyl hat keine Wirkung auf Pilze. Wirkung auf *Pythium rostratum* (PYTHRO): pl-50 molar = >7,4; I-50 ppm = <0,01.

<sup>2</sup> Abb. 24B: Einfluss der Fungizide auf die Sporenceimung (Endkonzentration der Wirkstoffe im Nährmedium; I<sub>50</sub> Werte)

<sup>3</sup> Abb. 32: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenpflanzen inokuliert mit *Glomus intraradices* mit Applikation der Wirkstoffe (0,5 ppm; 5 ppm) 3 Wochen und 5 Wochen nach Aussaat; bezogen auf den Mittelwert des gesamten Datensatzes, ohne Ausreißer.

<sup>4</sup> Tab. 15: Relative Sporenceimung (%) von *Glomus intraradices* nach vertägiger Inkubation auf M-Medium in Anwesenheit eines mit Wirkstoff behandelten Saatgutes; Normierung der absoluten Sporenceimung zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100).

<sup>5a</sup> Tab. 19: Relativer Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenpflanzen inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden; Normierung des absoluten Mykorrhizierungsgrades zur NMP-Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle = 100); bezogen auf den Mittelwert (über alle drei Versuchseinheiten) des gesamten Datensatzes ohne Ausreißer.

<sup>5b</sup> Abb. 37: Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit *Glomus intraradices* nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparat); Normierung des absoluten Mykorrhizierungsgrades zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100).

<sup>6</sup> Tab. 22: Mykorrhizierungsgrad (%) von Gerstenwurzeln nach Anzucht in Ackererde unter Freilandbedingungen und Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparat); Normierung des Mykorrhizierungsgrades zur unbehandelten Kontrolle innerhalb eines Versuchsgefäßes (Kontrolle = 100), letzter Erntezeitpunkt.

kein/geringer Einfluss	< 4	80–100
leichte Hemmung	< 4–5	66–79
mittelstarke Hemmung	< 5–6	51–65
starke Hemmung	> 6	50–10
sehr starke Hemmung	> 7	<10

#### 4.1 Der direkte Einfluss von Fungiziden auf die ersten Entwicklungsschritte von *Glomus intraradices*

Zur Untersuchung der **Sporenceimung** von *Glomus intraradices* in der Abwesenheit eines pflanzlichen Partners wurden die Sporen auf dem artifiziellen M-Medium, das in der *in vitro* Mykorrhiza-Wurzelkultivierung verwendet wird (Bécard & Fortin, 1988; Zocco *et al.*, 2008), inkubiert. In Übereinstimmung mit Untersuchungen der Arbeitsgruppen Dalpé *et al.*, 2005, und Eskandari & Danes, 2010, keimten die Sporen auf wirkstofffreiem M-Medium bereits nach einem Inkubationstag aus. Über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen stieg die Sporenceimrate stetig an und erreichte ab dem 14. Inkubationstag ein Plateau, ab dem eine Sporenceimrate von 75% nicht mehr überschritten wurde. Das Vorhandensein des Plateaus geht einher mit Untersuchungen von Zocco *et al.* (2008), die ab dem 15. Inkubationstag ebenfalls keinen weiteren Anstieg der *Glomus intraradices*-Sporenceimung feststellten. Zu erklären ist dies mit dem typischen Keimverhalten, das in der Abwesenheit eines pflanzlichen Partners zu beobachten ist. Der bei der Sporenceimung gebildete Keimschlauch kann bis zu zwei Wochen überleben (Bonfante & Perotto, 1995) und wird in dieser Zeit mit Lipiden, Proteinen sowie Glykogen aus den Sporen versorgt (Bonfante *et al.*, 1995). Wird in diesem Zeitraum kein pflanzlicher Partner gefunden, zieht sich das Cytoplasma zurück, der Keimschlauch septiert und die Sporen gehen wieder in den Ruhezustand über. Auf diese Weise werden Sporenreserven nicht unnötig verbraucht (Giovannetti, 2000; Bedini *et al.*, 2010). Unter geeigneten Umweltbedingungen sind die Sporen erneut in der Lage auszukeimen.

Die Sporenceimung stellt den ersten Angriffspunkt für Fungizide im pilzlichen Lebenszyklus dar. Durch eine Hemmung der Sporenceimung werden alle weiteren Entwicklungsschritte gestört und das Wachstum des Pilzes verhindert (Zocco *et al.*, 2008). Zur Untersuchung des direkten Einflusses der für die Praxis relevanten Fungizide auf die Sporenceimung von *Glomus intraradices* wurden diese gleichmäßig im M-Medium in den Verdünnungen  $10^{-4}$  M bis  $10^{-7}$  M verteilt, sodass die Sporen den Wirkstoffen direkt ausgesetzt waren. Die Sporen, die vor ihrer Verwendung bei 4°C gelagert wurden, befanden sich zu Beginn des Versuches im Ruhezustand. Die Keimung wurde durch Inkubation bei 27°C induziert (Daniels & Trappe, 1980; Sheik *et al.*, 1988). Unter Berücksichtigung des oben beschriebenen Verlaufs der Sporenceimung wurde der Auswertzeitpunkt so gewählt, dass 50 % der Sporen gekeimt waren und das Plateau noch nicht erreicht war, da der Pilz in dieser Phase beginnt, wieder in den Ruhezustand überzugehen, und ein negativer Effekt der Fungizide auf die Keimung nicht mehr nachweisbar wäre.

Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte der Fungizide auf die *Glomus intraradices*-Sporenceimung lagen zwischen 0,1 ppm und 49 ppm (Tab. 25) und waren damit im Vergleich zu ihrer Wirkung auf typische Zielorganismen um den Faktor 100 geringer. In der Regel zeigen die Handelspräparate

schon zwischen 0,001 ppm und <0,1 ppm eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Zielorganismen (Tab. 25).

Fludioxonil wirkte unter den getesteten Fungiziden auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* am stärksten hemmend. Die Wirkung war aber immer noch um den Faktor 20 schwächer im Vergleich zur Wirkung auf *Gibberella zeae*.

Tebuconazol wirkte auf *Glomus intraradices* um den Faktor 1000 schwächer als auf *Ustilago avenae*. Im Vergleich zu den anderen Sterolbiosynthese-Inhibitoren hatte Triadimenol die geringste Hemmwirkung auf *Ustilago avenae*. Dies wurde bei der Wirkung auf die *Glomus intraradices*-Sporenkeimung ebenfalls festgestellt (Tab. 25). Trotz gleichem Wirkmechanismus kann der hemmende Effekt auf das pilzliche Wachstum unterschiedlich stark sein. Dies kann seine Ursache zum Beispiel in der unterschiedlich starken Affinität des Wirkstoffes zum Zielenzym haben (Parker *et al.*, 2011).

Erwartungsgemäß hatte Metalaxyl gegenüber *Glomus intraradices* keinen Effekt und keine unerwünschten Nebenwirkungen. Es wirkt spezifisch auf Oomyceten und ist gegenüber *Ascomyceten* sowie *Basidiomyceten* unwirksam. Auch gegenüber *Zygomyceten* zeigt es keine Wirkung. Die *Glomeromycota* gehören phylogenetisch zu den Pilzen, die den *Zygomyceten* nahestehend sind, daher ist ein möglicher Effekt von Metalaxyl auf *Glomus intraradices* nicht zu erwarten.

Nachdem eine hemmende Wirkung einiger getesteter Fungizide gezeigt werden konnte, die jedoch weitaus schwächer war als auf pathogene Schadorganismen, sollte überprüft werden ob die gehemmten Sporen die Fähigkeit besitzen auf wirkstofffreiem Medium **wiederauszukeimen**. Die Fungizide Thiram und Fludioxonil hemmten die *Glomus intraradices*-Sporenkeimung am stärksten und wurden für diese Untersuchung ausgewählt. In der Regel wirken beide Wirkstoffe fungitoxisch auf phytopathogene Pilze. Fludioxonil hyperaktiviert einen MAP-Kinase Signalweg in Pilzen, was hypoosmotischen Stress zur Folge hat (Cayley & Record, 2003; Kojima *et al.* 2004; Agrios, 2005; Kanetis *et al.*, 2007). Durch den Wirkstoff wird ein Signal ausgelöst, das einen Wasserverlust vortäuscht, wodurch wiederum die Wasseraufnahme induziert wird und die Zellen anschwellen. Das Anschwellen und Platzen von Konidien und Hyphenzellwänden wurde bei *Neurospora crassa* nach der Applikation von Fludioxonil demonstriert (Zhang *et al.*, 2002). Thiram gehört zu den „multi-site“-Inhibitoren, die den pilzlichen Stoffwechsel an mehreren Stellen gleichzeitig beeinflussen und mit den SH-Gruppen von Proteinen reagieren (Elskens & Penninckx, 1997; Börner, 2009). Entgegen der beschriebenen Fungitoxizität auf phytopathogene Pilze hatten, die zuvor nicht ausgekeimten *Glomus intraradices*-Sporen nach dem Transfer auf frisches fungizidfreies Medium, die Fähigkeit wiederauszukeimen. Darüber hinaus wurde mittels **MTT-Vitalitätsfärbung** gezeigt, dass die Sporen trotz Keimhemmung zu 100 % vital waren. Die

Möglichkeit von *Glomus intraradices*-Sporen auf ungünstige Umweltbedingungen zu reagieren, kann eine mögliche Erklärung für die gefundene Hemmung der Sporenkeimung durch Fludioxonil und Thiram bieten. Es wurde beschrieben, dass Sporen unter ungünstigen Bedingungen nicht auskeimen, um Sporenreserven nicht unnötig zu verbrauchen (Giovannetti, 2000; 2009). Sind hingegen günstige Bedingungen in der Abwesenheit eines Fungizids gegeben, können die Sporen wieder auskeimen (Bonfante, 1995).

Am Beispiel der Wirkung der Strobilurin-Fungizide auf *Glomus intraradices* wird außerdem deutlich, dass die Fungizide vermutlich keinen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Sporen haben. Mittels MTT-Färbung wurde der Einfluss der Fungizide auf die Sporenvitalität untersucht. Mit dieser Methode kann die enzymatische Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen nachgewiesen werden (Mosmann, 1983; Kuhn *et al.*, 1941). Die Strobilurin-Fungizide haben ihren Wirkort in der mitochondrialen Atmung und führen durch Enzymhemmung dazu, dass der Elektronentransfer der Atmungskette unterbunden wird, wodurch wiederum die Versorgung der Pilzhyphen mit Energie und essenziellen Zellbausteinen aus dem Citratzyklus unterbunden wird (Anke, 1995; Bartlett *et al.*, 2002). Während Trifloxystrobin und Fluoxastrobin die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* hemmten (Tab. 25), war die Vitalität der nicht ausgekeimten Sporen unbeeinflusst. Eigentlich wäre aufgrund ihres Wirkortes keine enzymatische Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen zu erwarten gewesen, was jedoch nicht festgestellt wurde.

Auch die Vitalität, der unter dem Einfluss der übrigen getesteten Wirkstoffe nicht ausgekeimten Sporen, war unbeeinflusst. Die Sporen waren trotz Hemmung der Keimung zu 100 % vital. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei dem Einfluss aller untersuchten Fungizide auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* primär um eine fungistatische Wirkung handelt.

Charakteristisch für Wirkstoffe aus der Klasse der Sterolbiosynthese-Inhibitoren ist weniger die Hemmung der Sporenkeimung als die Hemmung der **Keimschlauchverlängerung** (Haenssler & Kuck, 1987). Die Sporen der Pilze besitzen einen Sterolvorrat, der bei Hemmung der Sterolbiosynthese zunächst aufgebraucht wird. Erst wenn dieser ausgeschöpft ist, entsteht eine Sterol-Mangelsituation aufgrund derer das Wachstum des Keimschlauches blockiert ist (Buchenauer *et al.*, 1987; Fuller *et al.*, 1990; Kang *et al.*, 2001). Calonne *et al.* (2012) berichteten über den reduzierenden Effekt von Propiconazole (2 ppm) auf die Keimschlauchverlängerung von *Glomus irregulare*. Auch die Sterolbiosynthese-Inhibitoren Fenhexamid (Hydroxyanilide) und Fenpropimorph (Amine), die die Sterolbiosynthese zu einem späteren Zeitpunkt in der Sterolbiosynthese hemmen als die Azol-Fungizide, reduzierten bei Konzentrationen höher als 20 ppm die Keimschlauchverlängerung von *Glomus intraradices* (Campagnac *et al.*, 2008, 2009, 2010; Zocco *et al.*, 2008, 2010; Oger *et al.*, 2009; Cardenas-Flores *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die bei pathogenen Schadorganismen hochwirksamen Fungizide Prothioconazol und

Tebuconazol hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Keimschlauchwachstum von *Glomus intraradices* untersucht. Für beide Wirkstoffe wurde ein hemmender Effekt auf die Sporenkeimung nachgewiesen, jedoch war kein Einfluss auf die Keimschlauchverlängerung sowie die Vitalität der Sporen festzustellen. Die aufgewendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,3 ppm und 30 ppm. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten Wirkstoffe in der Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices* intrinsisch weniger aktiv sind als es bei pathogenen Pilzen der Fall ist.

Nach der Verlängerung des Keimschlauches und erfolgter Infektion der Wirtswurzel kommt es zu einer verstärkten **Hyphenbildung und Sporenproduktion**. In Untersuchungen von Calonne *et al.* (2010, 2012) wurde mit zunehmender Konzentration von Propiconazol (bis 2 ppm) eine Abnahme der Sporenproduktion und Reduktion des Myzelwachstum bei *Glomus irregulare* festgestellt. In weiteren Arbeiten wurde ebenfalls eine Reduktion der Sporenproduktion von *Glomus intraradices* bei Konzentrationen höher als 20 ppm durch die Fungizide Fenhexamid und Fenpropimorph gefunden (Zocco *et al.*, 2008).

Eine mögliche Hemmung des Myzelwachstum und der Sporulation bei *Glomus intraradices* durch Tebuconazol sowie Prothioconazol wurde unter Verwendung des monoxenischen Wurzelkultur-Systems erfasst. Das System ermöglicht die räumliche Trennung zwischen extraradikalem Myzel und der Wirtswurzel, bei der es sich in diesem Fall um Chicorée-Wurzeln handelte. Tebuconazol und Prothioconazol wurden jeweils in das Nährmedium des Pilzkompartimentes gegeben, in dem sich die extraradikalen Hyphen entwickelten und die Reproduktionsphase des Pilzes eingeleitet wurde. Im Wurzelkompartiment befanden sich bereits die mit *Glomus intraradices* kolonisierten Chicorée-Wurzeln, die dem Fungizid nicht direkt ausgesetzt waren. Das Myzelwachstum sowie die Sporenproduktion der etablierten Symbiose zwischen *Glomus intraradices* und Chicorée-Wurzeln wurden durch beide Fungizide in der hohen Konzentration 30 ppm signifikant reduziert. Dieser Effekt ließ mit abnehmender Konzentration deutlich nach, sowie es bereits im Sporenkeimtest festgestellt wurde. Prothioconazol war stärker hemmend als Tebuconazol. Bei der niedrigsten Konzentration 0,3 ppm war kein Einfluss zu finden, weder auf das Myzelwachstum noch die Sporulation. Ob dieser Effekt jedoch auf demselben Prinzip der Keimschlauchverlängerung beruht oder eine spezifische Hemmung der Imitierung der Sporulation ist, kann nicht beurteilt werden, da bei relevanten niedrigen Konzentrationen dieser Effekt nicht auftrat.

#### **4.2 Der Einfluss von Fungiziden auf die Mykorrhiza-Symbiose zwischen *Glomus intraradices* und Gerstenwurzeln**

In den vorherig beschriebenen *in vitro* Untersuchungen hat sich gezeigt, dass es bei direkter Wirkstoffexposition und höheren Konzentrationen zu beachtlichen Hemmungen der Sporenkeimung als auch Sporulation kommen kann. Zu vernachlässigen sind die Auswirkungen auf

die Sporenvitalität und das Keimschlauchwachstum. Für die Entwicklung der Mykorrhiza-Symbiose ist aber die symbiontische Beziehung zur Wirtspflanze von Bedeutung. Dieser wurde in Gefäßversuchen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen nachgegangen.

Obwohl Fungizide meist als Blattapplikation angewendet werden, können signifikante Mengen die oberen Bodenschichten erreichen (Roy et al., 2000). Diese wiederholten Dosen oder Akkumulation des Wirkstoffes im Boden könnte zerstörende Effekte auf die Funktion der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose haben (Dodd & Jeffries, 1989). Vermutlich schirmt aber tatsächlich der Blattbestand den Boden größtenteils ab, sodass nur geringe Mengen am Boden ankommen. Um dennoch mögliche Nebeneffekte der Fungizide auf *Glomus intraradices* auszuschließen, erfolgte in Gefäßversuchen unter Gewächshausbedingungen die Applikation der Fungizide zunächst mittels **Gießbehandlung** in den Konzentrationen 0,5 ppm und 5 ppm. Die Zeitpunkte der Anwendung wurden so ausgewählt, dass sich die Fungizide auf die frühe Etablierungsphase sowie das Reproduktionsstadium von *Glomus intraradices* auswirken konnten. Durch eine ausreichende Flüssigkeitsmenge wurde sichergestellt, dass sich die Wirkstoff-Lösungen gleichmäßig im Substrat verteilten, sodass die im Inokulum vorhandenen Sporen und Myzelstücke (Infektionsstrukturen) dem Wirkstoff direkt ausgesetzt waren – wodurch ein experimenteller Anschluss an die *in vitro* Untersuchungen sichergestellt werden konnte.

Wie im *in vitro* Sporenceimtest gezeigt werden konnte, keimen die Sporen von *Glomus intraradices* unter geeigneten Umweltbedingungen innerhalb von einem bis fünf Tagen aus. In der Anwesenheit eines pflanzlichen Partners kommt es nach weiteren drei Tagen zum ersten Kontakt zwischen Pilzmyzel und Wirtswurzel (Giovannetti et al., 2000). Die Applikation der Fungizide erfolgte im vorliegenden Gefäßversuch drei Wochen nach Versuchsbeginn und entsprach einem Zeitpunkt, zu dem der erste Kontakt zwischen Sporen und Wirtswurzel bereits gegeben sowie der erste „Infektionsprozess“ abgeschlossen war (Eskandari & Danesh, 2010).

Fünf Wochen nach Inokulation und entsprechend zwei Wochen nach der ersten Fungizidapplikation waren die Wurzeln aller Varianten mit *Glomus intraradices* kolonisiert. Es war kein Effekt der Fungizide auf die Höhe der Besiedlung nachweisbar.

Das Entwicklungsstadium der Gerstenpflanzen lag ungefähr bei einem BBCH von 20 (Witzenberger et al., 1989; Lancashire et al., 1991). Die erste Maßnahme zur Krankheitskontrolle bei Wintergetreide erfolgt in der praxisrelevanten Anwendung in Abhängigkeit vom zu verwendenden Pflanzenschutzmittel erst zu einem späteren Zeitpunkt, wenn ein BBCH-Stadium von 30 erreicht ist. Die **frühe Besiedlungsphase** (Keimhyphenbildung, Apressorienbildung, Penetrationsphase) und Etablierungsphase von *Glomus intraradices* war unter den gegebenen Bedingungen nicht negativ durch die Fungizide beeinflusst. Würde die Gießapplikation unter

praxisrelevanten Bedingungen dennoch zu diesem Zeitpunkt angewendet, ist also nicht mit einer Beeinflussung der Mykorrhiza-Symbiose zu rechnen.

Normalerweise nimmt die Kolonisierungsrate stetig zu, da vermehrt Sporen produziert werden, diese auskeimen und zur Kolonisierung der zuwachsenden Wurzeln führen (Khalil *et al.*, 1992; Fontanet, 1998; Eskandari & Danesh, 2010). Tatsächlich waren die Kolonisierungsraten der Gerstenwurzeln gegenüber dem ersten Erntezeitpunkt erhöht.

Um die Einflussnahme der Fungizide auf die **Pilzentwicklung und Reproduktion** erfassen zu können erfolgte eine zweite Gießbehandlung zum Zeitpunkt der Reproduktion von *Glomus intraradices* (Abb. 49). Bei dieser Terminierung war eine Reduktion der Kolonisierung durch Tebuconazol und Prothioconazol festzustellen. Diese erwies sich als konzentrationsabhängig. Während Tebuconazol die Kolonisierung nur in der Konzentration 5 ppm reduzierte, führte Prothioconazol zusätzlich auch in der Aufwandmenge 0,5 ppm zur Reduktion. Alle anderen Fungizide hatten keinen Einfluss auf die Kolonisierungsrate. Die Reduktion der Mykorrhizierung durch Tebuconazol und Prothioconazol passt zu den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen, bei denen die Hemmung der Sporenproduktion und -keimung nachgewiesen wurde. Es ist davon auszugehen, dass die reduzierte Sporenkeimung die weitere Kolonisierung gehemmt hat und andererseits aufgrund der reduzierten Sporenproduktion weniger Infektionseinheiten vorhanden sind, die dazu beitragen die weiterwachsende Wurzel zu kolonisieren. Durch beide Faktoren kann die Kolonisierungsrate deutlich reduziert werden. Obwohl Zocco *et al.* (2008) in *in vitro* Untersuchungen mit Verwendung des Wurzelkultur-Systems die Hemmung der Sporenproduktion und -keimung durch Fenhexamid sowie Fenpropimorph demonstrierten, wurde eine Reduktion der Kolonisierungsrate, der in diesem System verwendeten Karottenwurzeln, nicht festgestellt. Der Pilz in den Wurzeln hatte keinen direkten Kontakt zum Wirkstoff, da diese im Wurzelkompartiment vorlagen. Die Gerstenwurzeln in den vorliegenden Gefäßversuchen hatten hingegen direkten Kontakt zum Fungizid, was eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Wurzelkolonisierung durch Tebuconazol und Prothioconazol zum Zeitpunkt des Reproduktionsstadiums von *Glomus intraradices* sein kann. Eine Reduktion der Wurzelkolonisierung von Gerste mit *Glomus spp.* wurde ebenfalls unter Gewächshausbedingungen durch Propiconazol bei 312 ppm festgestellt (von Alten *et al.*, 1993). Geringere Konzentrationen von 0,2 ppm und 2 ppm Propiconazol hatten hingegen keinen Einfluss auf die Kolonisierungsraten mit *Glomus spp.* (Kling *et al.*, 1997; Kjoller & Rosendahl, 2000; Schweiger *et al.*, 2001). Dies verdeutlicht die Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Konzentration der Fungizide.

Die Hemmung der Sporenkeimung kann jedoch nicht alleiniger Grund für die Reduktion der Kolonisierung sein, da für die untersuchten Fungizide, die die Sporenkeimung ebenfalls *in vitro* hemmten, keine Reduktion der Kolonisierungsrate nachgewiesen wurde. So hemmten z.B.



Fludioxonil und Thiram die Sporenkeimung unter allen Fungiziden am stärksten, hatten aber *in situ* keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung von *Glomus intraradices*. Eine mögliche Erklärung dafür ist in der Bindung im Substrat oder **Systemizität** der Wirkstoffe zu sehen.

Menge (1982) zeigte, dass nicht-systemische Fungizide weniger schädigend auf Mykorrhizapilze wirkten als systemische, da ein Großteil der Mykorrhiza-Strukturen im Inneren der Pflanzenwurzeln, im Cortex liegt und dieser Bereich durch nicht-systemische Fungizide nicht erreicht wird, während systemische Wirkstoffe diese Strukturen erreichen. Feldmann (2001) berichtete ebenfalls über negative Auswirkungen systemischer Fungizide auf den Kolonisierungsgrad. Strobilurine sind systemische Fungizide, die bei pflanzenschädigenden Pilzen in der Regel hemmend auf die Sporenkeimung und die Präpenetrationsphase wirken, wodurch die Infektion und Ausbreitung in der Pflanze beeinträchtigt werden (Godwin *et al.*, 1994, Ypema & Gold, 1999; Wong & Wilcox, 2001; Reuveni & Shelgov, 2002).

Unter *in vitro* Bedingungen wurde zwar ein hemmender Effekt der Strobilurine auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* festgestellt, in Gefäßversuchen wurde jedoch kein Einfluss auf die Kolonisierung nachgewiesen. Trotz systemischer Verteilung der Fungizide in der Wurzel war die Entwicklung von *Glomus intraradices* nicht beeinträchtigt. Die Fungizidapplikation fand in den Gefäßversuchen zu Zeitpunkten statt, zu denen die Kolonisierung der Gerstenwurzeln bereits etabliert war. Eine mögliche Hemmung der neugebildeten Sporen hatte keinen Einfluss mehr auf den Besiedlungsgrad. Im Vergleich zu den Azol-Fungiziden Tebuconazol und Prothioconazol, die zur Reduktion der Wurzelkolonisierung führten, war trotz möglicher Hemmung der Sporenkeimung durch die Strobilurine der Anteil neuproduzierter Sporen ausreichend, um zu einer Erhöhung der Kolonisierungsrate zu führen.

Bei Fludioxonil und auch Thiram handelt es sich um nicht-systemische Wirkstoffe, die protektiv angewendet werden (Dias, 2012). Obwohl beide Fungizide unter *in vitro* Bedingungen stark hemmend auf die Sporenkeimung wirken, haben sie aufgrund ihrer nicht-systemischen Eigenschaft keine negative Wirkung auf eine etablierte Kolonisierung von Gerstenwurzeln, da es diese Strukturen in der Wurzel vermutlich nicht erreicht. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Plenchette & Perin (1992), die in Untersuchungen mit Thiram keine oder nur geringe negative Effekte auf die Mykorrhiza-Symbiose feststellten, wenn diese bereits erfolgreich etabliert war. Selbst hohe Fungizidkonzentrationen von 800 ppm bis 3200 ppm hatten keinen negativen Einfluss auf die Symbiose.

Die Bodenbehandlung mit Bodenfungiziden ist wegen des damit verbundenen Eingriffs in das Bodenleben nicht weit verbreitet und weitgehend auf gärtnerische Betriebe und Baumschulen begrenzt (Klodka *et al.*, 2004; Hallmann *et al.*, 2007). Bei der Saatgutbeizung hingegen ist der Kontakt des Fungizids zum Boden einerseits ebenfalls vorhanden, jedoch ist die Anwendung viel

gezielter, so dass mit kleinsten Mengen optimale Bekämpfungserfolge mit geringsten Auswirkungen auf die Umwelt erzielt werden können. Hinsichtlich der ökologisch zielgenauen Krankheitsbekämpfung bietet die Saatgutbehandlung also einen effektiven Schutz gegen samen-, boden- und luftbürtige Schaderreger (Fröhlich, 1991). Die im Boden vorliegenden Mykorrhizapilze können bei einer Saatgutbehandlung direkten Kontakt zum Fungizid haben, daher war für die Untersuchung des Einflusses von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze die **Saatgutbehandlung** besonders relevant. Diese wurde hinsichtlich ihres Effektes auf die Sporenkeimung, Wurzelkolonisierung sowie Sporulation untersucht.

Die Fungizide appliziert auf Gerstensaatgut führten *in vitro* in der praxisüblichen Aufwandmenge zu keiner Beeinflussung der **Sporenkeimung**, wenn die Sporen mit 1 cm Entfernung zum behandelten Saatkorn vorlagen. In der zehnfach erhöhten Aufwandmenge war zwar eine tendenzielle Hemmung der Keimung durch Trifloxystrobin, Penflufen, Triadimenol und Prothioconazol festzustellen, die aber immer noch im Bereich der biologischen Varianz lag. Im Vergleich zu ihrer Wirkung auf die Sporenkeimung bei direktem artifiziellem Kontakt, war der Einfluss der Fungizide, die auf Saatgut appliziert wurden, deutlich abgeschwächt, Normalerweise verteilt sich der Wirkstoff in einem kleinen Bodenvolumen rund um das Saatkorn und bildet einen Beizhof, dessen Durchmesser abhängig von den physikochemischen Eigenschaften des jeweiligen Wirkstoffe ist. In zunehmender Entfernung vom Saatkorn aus ist außerdem aufgrund der teilweise schlechten Wasserlöslichkeiten der Wirkstoffe ein steiler Gradient der Wirkstoffkonzentration zu erwarten. Die Wasserlöslichkeit der untersuchten Fungizide liegt in einem Bereich zwischen 0,6 mg/l (Trifloxystrobin) und 300 mg/l (Prothioconazol). Vermutlich verteilten sich die Fungizide im vorliegenden Sporenkeimtest nicht im Medium, sondern blieben am Korn haften. Tatsächlich zeigten Eizuka *et al.* (2009) in Gewächshausuntersuchungen mit Reis, dessen Saatgut zuvor mit Ipconazol behandelt war, dass der Großteil des Wirkstoffes am Korn verbleibt. Außerdem wurden 5–6 % des Wirkstoffes im Spross und 16 % in der Wurzel nachgewiesen. Dies unterstützt die Annahme, dass sich die Wirkstoffe in der vorliegenden Untersuchung mit behandeltem Gerstensaatgut vermutlich auch nicht gleichmäßig verteilten, sondern weitgehend unmittelbar am Korn blieben und die Wirkstoffkonzentrationen im die Saatkörner umgebenden Medium zu gering waren, als das sie sich hemmend auf die Sporenkeimung ausgewirkt hätten.

Eine Aussage über den Einfluss der auf Saatgut applizierten Fungizide auf die Mykorrhiza-Symbiose konnte unter *in vitro* Bedingungen nicht getroffen werden, daher wurden Gefäßversuche in kleinen Töpfen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen sowie in Großcontainern unter Freilandbedingungen durchgeführt.

In den Gefäßversuchen unter **Gewächshausbedingungen** erfolgte die Saatgutbehandlung mit einer **Laborformulierung** in der praxisüblichen Aufwandmenge. Die erste Bestimmung des

Mykorrhizierungsgrades fand fünf Wochen nach Versuchsansatz statt. Zu diesem Zeitpunkt sollte die frühe Besiedlungsphase der Wurzel abgeschlossen und die Etablierungsphase der pilzlichen Strukturen in der Wurzel gegeben sein (Eskandari & Danesh, 2010). Bis acht Wochen nach Versuchsansatz wurde der Mykorrhizierungsgrad wöchentlich bestimmt, sodass der Einfluss der Fungizide auf die Entwicklung der Mykorrhizierung analysiert werden konnte.

Die Fungizide hatten keinen Einfluss auf die Entwicklung des Wurzelsystems, sodass gleiche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Wurzelkolonisierung gegeben sein sollten.

Acht Wochen nach Versuchsansatz wurde mit Ausnahme von Prothioconazol und Triadimenol kein Einfluss der Fungizide auf die Wurzelkolonisierung festgestellt. Darüber hinaus hatten die Fungizide mit Ausnahme von Prothioconazol über den untersuchten Versuchszeitraum keinen Einfluss auf die Dynamik der Mykorrhizierung. Die Kolonisierungsrate nahm stetig zu. Dies deutet darauf hin, dass die frühe Besiedlungsphase sowie die Etablierungsphase durch die Fungizide unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst wurden. Bei der Anwendung einer Gießapplikation wurde ebenfalls gezeigt, dass die Fungizide keinen Einfluss auf die frühe Etablierungsphase der Gerstenwurzeln haben. Im Gießapplikations-Versuch wäre hingegen eher eine Beeinflussung der Kolonisierung zu erwarten gewesen, da der Wirkstoff gleichmäßig im Substrat verteilt wurde und so direkten Kontakt zum Pilz hatte. Zudem lag eine 1000-Fach höhere absolute Wirkstoffmenge vor als bei der Saatgutbehandlung. Die Aufwandmengen für die Saatgutbehandlung lagen im µg-Bereich pro Korn im Vergleich zur Gießbehandlung, bei der die Wirkstoffmengen bei 0,5 mg und 5 mg pro Pflanzgefäß (500 ml Substrat) lagen.

Geht man bei der Saatgutbehandlung von einer Verteilung der Fungizide im Substrat aus, so verdünnt sich die Wirkstoffkonzentration mit zunehmender Entfernung vom behandelten Saatkorn. Nur 5 % der im Substrat gleichmäßig verteilten Sporen würden einer so hohen Wirkstoffkonzentration ausgesetzt sein, dass diese hemmend auf die Sporenkeimung wirken würde. Für die übrigen 95 % der Sporen würde keine Beeinflussung der Sporenkeimung erwartet werden, da die Wirkstoffkonzentration nicht hoch genug wäre, um einen negativen Effekt auf die *Glomus intraradices* Sporen zu haben. Schon in der frühen Entwicklungsphase des Pilzes ist die Wirkstoffkonzentration zu gering, um sich negativ auszuwirken (Burrows & Ahmed, 2007). Zusätzlich wächst die Wurzel aus dem Beizhof in einen Bereich heraus, in dem die Wirksamkeit nicht mehr ausreichend sein würde. Für den vorliegenden Gefäßversuch bedeutet dies, dass der Großteil der Infektionsstrukturen im Substrat keinen direkten Kontakt zum Wirkstoff hatte und so die wachsende Wurzel stetig besiedelt werden konnte. Im Sporenkeimtest mit auf Saatgut applizierten Fungiziden wurde bereits festgestellt, dass bei praxisüblicher Aufwandmenge keine Beeinflussung der Sporenkeimung vorliegt. Dennoch wurde für Prothioconazol ein hemmender Effekt auf die Dynamik der Wurzelkolonisierung über den gesamten Versuchszeitraum festgestellt.

Zur Abschätzung der maximal denkbaren Auswirkung von saatgutgebeizten Wirkstoffen wurde die theoretische Wirkstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Entfernung vom behandelten Saatkorn aus berechnet. Durch den Verdünnungseffekt des Wirkstoffes wäre in 1 cm Entfernung vom Saatkorn aus die Prothioconazol-Konzentration bereits zu gering, um sich negativ auf die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* auszuwirken und einen möglichen Einfluss auf die Kolonisierung zu haben. Bei der Analyse der Kolonisierung in drei verschiedenen Wurzelabschnitten wurde die höchste Reduktion im oberen Wurzelabschnitt, am Prothioconazol-behandelten Saatkorn festgestellt. Im mittleren und unteren Wurzelabschnitt war der Mykorrhizierungsgrad gegenüber der unbehandelten Kontrolle jedoch nicht reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich Prothioconazol trotzdem hemmend auf die frühe Besiedlungsphase der Wurzel auswirkte. Dadurch war die weitere pilzliche Entwicklung im Vergleich zu den anderen behandelten Varianten vermutlich zeitlich verzögert, was sich wiederum in einer Hemmung der Dynamik äußerte.

Acht Wochen nach Versuchsansatz wurde eine reduzierte Kolonisierungsrate durch Triadimenol und Prothioconazol festgestellt. Der direkte Vergleich der Kolonisierungsraten in den drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchseinheiten zeigt, dass nur in der ersten Versuchseinheit eine signifikante Reduktion des Mykorrhizierungsgrades durch Prothioconazol und Triadimenol vorlag. In einer weiteren Versuchsreihe war der Mittelwert der Kolonisierungsrate geringer als der der Kontrollen. Die beobachtete Reduktion der Wurzelkolonisierung durch Prothioconazol und Triadimenol lag tatsächlich aber immer noch im Bereich der statistischen Unsicherheit, sodass der Unterschied nicht signifikant war. Es ist davon auszugehen, dass es sich im ersten Versuch um einen statistischen Ausreißer handelt und die Hemmung der Kolonisierung nicht auf dem Effekt von Triadimenol bzw. Prothioconazol beruht. Vielmehr scheinen **Umweltfaktoren** unter praxisrelevanten Bedingungen einen weitaus größeren Einfluss auf die Mykorrhiza-Symbiose zu haben als die eigentliche Fungizidwirkung.

Es ist bekannt, dass die Entwicklung und Verbreitung von arbuskulären Mykorrhizapilzen von verschiedenen **biotischen und abiotischen** Faktoren wie z.B. Bodenzusammensetzung, organischen Inhaltsstoffe, pH-Wert, oder Temperatur abhängig ist (Anderson *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1987; Koske, 1987; Ryan *et al.*, 1994; van Aarle *et al.*, 2002; Vaidya, 2007). Dieser Einfluss zeigte sich in den Gewächshausversuchen in denen kontrollierte Bedingungen vorlagen. In den Saatgutapplikations-Versuchen variierte der Mykorrhizierungsgrad zwischen den einzelnen Versuchseinheiten. In den ersten beiden Versuchen im Februar und März war die Kolonisierung sowohl in der unbehandelten als auch in der mit NMP-behandelten Kontrolle gegenüber den folgenden Versuchen von Mai bis August erhöht. Darüber hinaus wurde in den ersten beiden Versuchen eine stärkere Streuung der Einzelwerte festgestellt, als in den folgenden Versuchen. Bei

der statistischen Auswertung der Kolonisierungsrate ist die Varianz zwischen den einzelnen Versuchseinheiten daher stets zu beachten. Obwohl kontrollierte Bedingungen in den Gefäßversuchen vorlagen, kann die Temperatur dennoch eine mögliche Erklärung für die **Jahresschwankungen** der Kolonisierungsraten in den unbehandelten als auch behandelten Varianten sein. Die Gewächshauskammern waren nicht mit einer automatischen Kühlung ausgestattet. Es kann sein, dass sich die Gewächshauskammern durch vermehrte Sonnenscheindauer und erhöhte Außentemperaturen in den Sommermonaten so aufwärmten, dass dadurch die Wurzelkolonisierung limitiert wurde. Durch zu hohe Temperaturen kann die Kolonisierungsfähigkeit, Sporenkeimung und das Hyphenwachstum gehemmt sein (Jahromi *et al.*, 2008; Miransari, 2010). Der optimale Temperaturbereich für die Entwicklung der Mykorrhiza liegt zwischen 20° und 25°C (Zhang *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 2000). Die in den Gewächshauskammern eingestellte Temperatur betrug tagsüber 22,5°C und lag damit im optimalen Temperaturbereich. Wenn Temperaturen von 30°C erreicht werden, kann die Kolonisierung hingegen gehemmt sein (Bowen, 1987; Heinemeyer *et al.*, 2004).

Die **Formulierung** eines Pflanzenschutzmittels ist die Kombination des Wirkstoffes mit Zusatzstoffen, welche die Handhabung, Aufnahme und Wirksamkeit verbessern (Hallmann *et al.*, 2007). Um möglichst nah an die praxisrelevanten Anwendung der Fungizide heranzukommen wurde in Gefäßversuchen unter Gewächshausbedingungen als auch in Großcontainern unter Freilandbedingungen der Einfluss der Wirkstoffe als handelsübliche Saatgutbeize auf die Mykorrhizierung untersucht. Weder unter kontrollierten Gewächshausbedingungen noch unter Freilandbedingungen war die Kolonisierung der Wurzeln beeinflusst.

Die Saatgutbehandlung soll, eine langzeitige Wirkung gegenüber samen-, boden- und luftbürtigen Krankheitserregern gewährleisten, wobei der Wirkstoff dabei möglichst über einen langen Zeitraum am Korn bzw. in unmittelbarer Nähe des Korns zur Verfügung stehen soll (Heitefuss, 2000; Smiley *et al.*, 2002; Diercks & Heitefuss, 2002; Hallmann *et al.*, 2007). Formulierungen enthalten daher unter anderem Haftmittel zur besseren Haftfähigkeit und Regenbeständigkeit (Valkenburg *et al.*, 1998; Anonym, 2005). Während Prothioconazol in der Laborformulierung den Mykorrhizierungsgrad reduzierte, hatte es im Handelspräparat Redigo FS 100 keinen Einfluss auf den Mykorrhizierungsgrad. Auch bei der Anwendung einer **Leerformulierung** ohne den Wirkstoff wurde kein Einfluss auf die Kolonisierung festgestellt. In der Formulierung Redigo FS 100 ist Prothioconazol vermutlich stabiler und beständiger, sodass der Wirkstoff zu einem späteren Zeitpunkt vom Korn diffundiert als bei Verwendung der Laborformulierung, in der Prothioconazol in NMP gelöst vorlag. Zu diesem Zeitpunkt ist das Vorhandensein des Wirkstoffes im Substrat nicht mehr relevant für die Mykorrhiza-Symbiose und führt nicht zu einer reduzierten Kolonisierung.

In den **Großcontainerversuchen** wurde neben dem Einfluss der Handelspräparate auf den Mykorrhizierungsgrad auch der Einfluss der Fungizide auf die **Sporenmenge** in der Ackererde untersucht. Es wurde kein Einfluss der Fungizide auf die Sporenmenge in der Ackererde festgestellt. Zwar war sechs Wochen nach Versuchsbeginn die Sporenmenge gegenüber der anfänglichen Sporenmenge reduziert, jedoch ist diese vermutlich auf das Ausspülen der Sporen zurückzuführen, da dies sowohl im behandelten als unbehandelten Bereich der Probenentnahme beobachtet wurde. Die durchschnittlichen Niederschlagsmengen in den Anfangsmonaten waren höher als in den Folgemonaten. Dies kann dazu geführt haben, dass die Sporen aus dem Wurzelbereich in weiter unten liegende Bereiche, aus denen keine Proben genommen wurden, gespült wurden. In Vorversuchen, die nicht in der Arbeit aufgeführt werden, wurde festgestellt, dass die Sporen in der Ackererde tatsächlich durch Niederschlag verlagert werden. In *in vitro* Untersuchungen wurde von der Arbeitsgruppe Eskandari & Danesh (2010) demonstriert, dass die Sporenbildung 25 Tage nach dem ersten Kontakt zwischen Wurzel und Pilz beginnt und nach 12 Wochen 1.000 bis 2.500 Sporen vorliegen können. Im Sommersversuch wurde jedoch keine Erhöhung der Sporenmenge beobachtet. Zwischen den Zeitpunkten der Probenentnahme lagen vier Wochen. Dieser Zeitraum ist vermutlich zu kurz, um eine ausreichende Sporenproduktion zu gewährleisten bzw. die Sporenmenge deutlich zu erhöhen.

Im Winterversuch nahm die Sporenmenge über die Wintermonate bis zur Probenentnahme im Frühjahr (März) hingegen zu und verdoppelte sich. Zwischen der ersten (November) und zweiten Probenentnahme (März) lagen 20 Wochen, die Verdopplung der Sporenmenge entspricht den Ergebnissen von Eskandari & Danesh (2010), die eine Zunahme der Sporenproduktion postulierten. Eine Steigerung der Sporenmenge von der zweiten zur dritten Probenentnahme wurde im vorliegenden Versuch nicht beobachtet. Die dazwischenliegende Zeitspanne betrug wie im Sommersversuch vier Wochen und war wie beschrieben vermutlich zu kurz, um die Sporenmenge deutlich zu erhöhen.

Der Hintergrund einer Saatgutbehandlung ist es die Wirkstoffe so gezielt anzuwenden, dass mit kleinsten Mengen optimale Bekämpfungserfolge mit geringsten Auswirkungen auf die Umwelt erzielt werden. Aus **ökologischen Gründen** soll sich der Wirkstoff also möglichst nicht im Boden verteilen, sondern weitestgehend am Korn haften bleiben (Heitefuss, 2000; Smiley *et al.*, 2002; Diercks & Heitefuss, 2002; Hallmann *et al.*, 2007). Die Bildung eines großen Beizhofes würde nicht der ökologischen Entwicklung entsprechen. Die Ergebnisse zur Saatgutbehandlung unter Gewächshaus- als auch Freilandbedingungen verdeutlichen, dass sich die untersuchten Fungizide nachhaltig nicht schädlich auf die Bodenökologie auswirken. Bei der praxisrelevanten Anwendung der Saatgutbehandlung sind also keine unerwünschten Nebeneffekte auf die für landwirtschaftliche Kulturpflanzen nützliche Mykorrhiza-Symbiose zu erwarten. Des Weiteren bedeuten die

Ergebnisse, dass das Ökosystem durch eine Saatgutbeizung nachhaltig nicht mehr zu beeinflussen ist.

### 4.3 Einfluss der Fungizide auf die Funktionalität der Symbiose

Mit der Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades allein kann noch keine vollständige Aussage über den Einfluss der Fungizide auf die Funktionalität der Mykorrhiza-Symbiose getroffen werden. Ein Indiz für die Funktionalität können hingegen **Arbuskeln** sein (Bécard & Piché, 1989 a; Giannazzi-Pearson *et al.*, 1995; Bago *et al.*, 1998). In seiner interzellulären Phase kann der arbuskuläre Mykorrhizapilz in der Abwesenheit von Arbuskeln überleben (Soberon & Rio, 1985), ein extensives Wachstum des Pilzes ist jedoch nicht zu erwarten (Bécard & Piché, 1989 a). In den Gefäßversuchen im Gewächshaus mit Anwendung einer Saatgutbeizung wurde kein Einfluss der Fungizide auf den Arbuskelgehalt der kolonisierten Gerstenwurzeln nachgewiesen. Auch in den Gießbehandlungsversuchen, in denen zwar eine Reduktion der Kolonisierungsrate durch Tebuconazol und Prothioconazol nachgewiesen wurde war die Anzahl der Arbuskeln gegenüber einer unbehandelten Kontrolle nicht reduziert.

Arbuskeln sind kurzlebige Strukturen, die in den meisten Pilz-Wirt-Interaktionen nach sieben bis zwölf Tagen wieder degenerieren (Alexander *et al.*, 1989; Gadkar *et al.*, 2001) und durch das Kollabieren sowie Verklumpen der Arbuskeläste und des Stammes gekennzeichnet sind. Die aktive Phase dauert ca. zwei bis drei Tage (Alexander *et al.*, 1989). Mit der Anwendung der Lichtmikroskopie lässt sich jedoch nicht zwischen aktiven und degenerierten Arbuskelstrukturen unterscheiden, sodass keine genaue Aussage über den Einfluss der Fungizide auf die Arbuskelaktivität getroffen werden konnte. In Semidünnschnitten von Chicorée-Wurzeln, die Tebuconazol und Prothioconazol für sieben Tage ausgesetzt waren, wurden keine veränderten Arbuskelstrukturen gegenüber einer unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Auch die Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder zeigte keine Veränderung der Strukturen durch die Fungizide.

Die Ergebnisse zeigen, dass selbst bei einer Reduktion der Wurzelkolonisierung unter artifiziellen Bedingungen mit direkter Wirkstoffexposition keine Anzeichen einer Beeinträchtigung der Funktionalität der Mykorrhiza-Symbiose festzustellen war.

### 4.4 Spezielle Untersuchungen zur Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase von *Glomus intraradices*

Die Sterolbiosynthese-Inhibitoren Tebuconazol und Prothioconazol hatten unter den getesteten Fungiziden den stärksten Effekt auf die verschiedenen Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices*. So war die Sporenkeimung als auch Sporulation bei direktem artifizielltem Kontakt gehemmt. Außerdem reduzierten sie die Wurzelkolonisierung bei Anwendung einer Gießbehandlung. Bei der praxisrelevanten Anwendung als Saatgutbehandlung war hingegen kein Einfluss auf *Glomus intraradices* festzustellen. Da die Azol-Fungizide eine für die Landwirtschaft

bedeutende Fungizid-Klasse bilden (Kuck & Vors; 2007), sollten vertiefende Untersuchungen zu ihrer Wirkung Aufschluss über die Wirkung auf *Glomus intraradices* geben.

Sterolbiosynthese-Inhibitoren sollten auch die Sterolbiosynthese von arbuskulären Mykorrhizapilzen hemmen können, da diese ähnlich wie andere Pilze Sterole über den klassischen Mevalonsäure-Weg synthetisieren (Disch & Rohmer, 1998). Sie unterschieden sich lediglich hinsichtlich ihrer Endprodukte im Syntheseweg. Während Ergosterol das Endprodukt von phytoparasitären Pilzen wie *Ascomyceten* und *Basidiomyceten* ist, bilden 24-Methylcholesterol und 24-Ethylcholesterol die Endprodukte in der Sterolbiosynthese von arbuskulären Mykorrhizapilzen (Beilby, 1980; Beilby & Kidby, 1980; Weete, 1989; Grandmougin-Ferjani *et al.*, 1999; Fontaine *et al.*, 2001). In diesem Syntheseweg bildet die Sterol C14- $\alpha$ -Demethylase (*ERG11/Cyp51*) das Target für Azol-Fungizide. Bei *Glomus intraradices* wurde in den vorliegenden Untersuchungen ein Gen (**GintERG11**) gefunden, das für eben diese kodieren könnte. Die bisher unveröffentlichte Gensequenz des GintERG11 wurde in einem Aminosäuresequenz-Alignment mit *ERG11*-Sequenzen anderer Pilze verglichen und gezeigt, dass sich diese grundsätzlich nicht voneinander unterscheiden. So weist die *Glomus* Sequenz die konservierte Häm-Bindedomäne auf, die charakteristisch für alle Mitglieder der P450-Superfamilie ist (Kalb *et al.*, 1986).

Darüber hinaus wurde die Funktionalität von GintERG11 mittels **Hefekomplementation** nachgewiesen. Unter Verwendung des Hefestammes YUG37::*ERG11* wurde demonstriert, dass GintERG11 den Defekt der Hefe, auf tetracyclinhaltigem Medium nicht wachsen zu können, komplementiert und es sich um ein funktionelles Gen handelt. Es können sich weiterführende Untersuchungen anschließen, in denen die Sensitivität dieser Hefetransformanten gegenüber Azol-Fungiziden untersucht wird. Der Einfluss der Fungizide auf das Wachstum der Hefe kann als  $I_{50}$ -Wert wiedergegeben werden und Aufschluss über die Wirksamkeit der Azol-Fungizide geben. Ähnliche Untersuchungen führten Cools *et al.* (2011) durch, um die Sensitivität von *Mycosphaerella graminicola* gegenüber Azol-Fungiziden festzustellen.

Fungizide werden unter dem Aspekt entwickelt, vorwiegend auf Vertreter aus dem Phylum der *Basidiomycota* sowie *Ascomycota* zu wirken. Die *Zygomycota* stellen hingegen eher ein Problem in der Humanmedizin dar (Ribes *et al.*, 2000) und sind nicht das Hauptziel bei der Entwicklung von Fungiziden gegen phytopathogene Pilze. Die Analyse der **verwandtschaftlichen Beziehung** des *ERG11*-Gens von *Glomus intraradices* zu *ERG11*-Genen von anderen Pilzen ergab eine weite Entfernung zu den *Ascomycota* gefolgt von *Basidiomycota* und kann damit eine mögliche Erklärung für die geringere Sensitivität von *Glomus intraradices* gegenüber den Azol-Fungiziden im Vergleich zur Wirkung auf phytopathogene Zielorganismen sein. Zu den *ERG11*-Proteinsequenzen der *Zygomycota* wurde hingegen die nächste Verwandtschaft mit GintERG11 festgestellt. Zwar



werden die arbuskulären Mykorrhizapilze dem eigenen Phylum der *Glomeromycota* zugeordnet (Schüssler *et al.*, 2004), dennoch sind Gemeinsamkeiten zwischen den *Glomeromycota* und *Zygomycota* vorhanden. Beide sind zum Beispiel vielkernig, da ihnen septierte Hyphen fehlen, die im Gegensatz dazu eines der Merkmale von *Basidiomycota* und *Ascomycota* sind (Redecker *et al.*, 2000).

In **biochemischen Untersuchungen** zum Einfluss von Azol-Fungiziden auf die Sterolbiosynthese arbuskulärer Mykorrhizapilze stellten Calonne *et al.* (2012) eine Abnahme der Endprodukte 24-Methylcholesterol und 24-Ethylcholesterol in extraradikalem Myzel von *Glomus irregulare* als Antwort auf eine sechswöchige Exposition in propiconazolhaltigem Medium fest. Zudem wurde 24-Methylendihydrolanosterol akkumuliert. Eine Konzentration von 0,02 ppm Propiconazol hatte keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Sterole, während 0,2 ppm und 2 ppm die Zusammensetzung signifikant veränderten (Calonne *et al.*, 2012). Aus ihren Untersuchungen schlussfolgerten sie, dass die Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase durch den Einfluss von Propiconazol gehemmt wird, da diese das Target der Azol-Fungizide ist.

Die Hemmung der Sterolbiosynthese durch die Azol-Fungizide Tebuconazol und Prothioconazol konnte im Rahmen der Arbeit auf diesem Weg nicht untersucht werden. In einer nicht aufgezeigten Untersuchung wurde versucht, die Sterol-Zusammensetzung ausgekeimter *Glomus intraradices* Sporen nach der Behandlung mit Tebuconazol und Prothioconazol zu analysieren. Die Sterole wurden aus Sporen extrahiert und gaschromatographisch aufgetrennt. Doch die für arbuskuläre Mykorrhizapilze typischen Sterole 24-Methylcholesterol und 24-Ethylcholesterol konnten nicht detektiert werden, da nicht genug Sporen zur Verfügung standen. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten über die Schwierigkeit, die Sterolzusammensetzung biochemisch zu analysieren, da die Menge pilzlicher Sterole zu gering sind, um detektiert zu werden (Fontaine *et al.*, 2004; Campagnac *et al.*, 2008). Es ist eine hohe pilzliche Biomasse erforderlich, um diese Untersuchungen durchzuführen.

Ein indirekter Weg, die Hemmung der Sterolbiosynthese zu bestimmen, war über die Untersuchung der Genexpression von *GintERG11* möglich. Nach der Anwendung von Azol-Fungiziden wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* und einigen *Candida*-Spezies (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*) die Hochregulierung des *ERG11*-Genexpressionslevels als Reaktion auf eine Sterolmangelsituation beobachtet (Henry *et al.*, 2000; Bammert & Fostel, 2000; Yu *et al.*, 2007). Bei einer Hemmung der Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices* würde *GintERG11* hochreguliert werden. Extraradikales Myzel von *Glomus intraradices* wurde im Wurzelkultur-System den Azol-Fungiziden Tebuconazol und Prothioconazol (0,3 ppm; 30 ppm) für 24 h, 48 h und 7 Tage ausgesetzt, um anschließend das **Transkriptionslevel von *GintERG11*** mittels qPCR zu untersuchen. Das Genexpressions-Level von *GintERG11* sank im Laufe der Zeit

sowohl in der unbehandelten Variante als auch in den mit Wirkstoff behandelten Varianten. Nach sieben Inkubationstagen war die Genexpression von *GintERG11* in allen Varianten um das 9-Fache geringer als nach 24-stündiger Inkubation, was darauf hindeutet, dass die Sterolbiosynthese im Verlauf der Zeit nachlässt. Ein Einfluss der Fungizide auf die Genexpression von *GintERG11* wurde nicht nachgewiesen.

Obwohl Tebuconazol und Prothioconazol bei direkter Wirkstoffexposition *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die Sporenkeimung und Sporenproduktion hatten, war die Vitalität von extraradikalem Myzel durch die Fungizide unbeeinflusst. Diese wurde mittels NBT-Färbung nachgewiesen. Ebenso wenig wurde eine, wie in anderen Pilzen beschriebene, Hochregulierung der Genexpression von *GintERG11* gefunden. Dimster-Denk *et al.* (1999) stellten eine Zunahme des Transkriptionslevels der *ERG*-Gene (*ERG3*, *ERG4*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG11*) von *Saccharomyces cerevisiae* in der Gegenwart von Fluconazol fest. Die vorliegenden Ergebnisse könnten bedeuten, dass die Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices* einer anderen Regulation unterliegt als in den bisher untersuchten Pilzen. Oger *et al.* (2009) fanden allerdings bei *Glomus intraradices* nach einer Inkubationszeit von 48 h sowie 7 Tagen mit Fenpropimorph und Fenhexamid, eine Hochregulierung der C-4-Sterolmethyloxidase (*ERG25*), die die Abspaltung der 4 $\alpha$ -Methylgruppe zu Zymosterol katalysiert (Oger *et al.*, 2009). Nach achtwöchiger Inkubation wurde von ihnen eine Reduktion der Endprodukte 24-Methylcholesterol und 24-Ethylcholesterol festgestellt.

Weiterführende Untersuchungen zur Analyse der Sterolzusammensetzung des extraradikalen Myzels und der Genexpression könnten die aufgeworfene Frage, dass die Sterolbiosynthese von *Glomus intraradices* einer anderen Regulation unterliegt, klären.

Die **Resistenzentwicklung** gegenüber Pflanzenschutzmitteln ist ein natürliches Ereignis seitdem Wirkstoffe zur Behandlung von Krankheitserregern eingesetzt werden. Die Resistenz kann gegenüber spezifisch wirkenden Fungiziden in unterschiedlicher Häufigkeit, Intensität und Auswirkung auftreten (Mehl & Stenzel, 2008). In den 1980er Jahren wurden Resistenzen der Pathogene, wie *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella fijiensis* oder *Venturia inaequalis* gegenüber Azol-Fungiziden beschrieben (Fletcher & Wolfe, 1981; Stanis & Jones, 1985, De Waard *et al.*, 1986;). Im Rahmen von Untersuchungen zur Aufklärung der Resistenzbildung gegenüber Azol-Fungiziden beschäftigten sich in den letzten Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen mit dem Getreidepathogen *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*), das mit Azol-Fungiziden nicht mehr erfolgreich bekämpft werden kann (Fraaije *et al.*, 2007, Leroux *et al.*, 2007; Mehl & Stenzel, 2008; Brunner *et al.*, 2008; Bean *et al.* 2009; Cools *et al.* 2011; Parker *et al.* 2011).

Ursachen für den Wirkverlust von Azol-Fungiziden können Punktmutationen des für das Protein CYP51 kodierenden *ERG11*-Gens sein. Diese sind für die Anwendung der Azol-Fungizide im Agrarbereich und medizinischen Bereich beschrieben (Akins, 2005; Cools *et al.*, 2006; Coste *et al.*, 2007). Eine Überexpression des *ERG11*-Gens ist ebenso als resistenzauslösender Mechanismus beschrieben wie die Mutation weiterer Gene der Ergosterolbiosynthese (Ghannoum & Rice, 1999; Heilmann *et al.*, 2009). Bildung und Aktivität von Efflux-Transportproteinen können ebenfalls Resistenzen bedingen (Cannon *et al.*, 2009; Schuster *et al.*, 2009).

In der Proteinsequenz von Gint*ERG11* wurden zwei **Aminosäuresubstitutionen** (D134G, G412A<sup>1</sup>) gefunden, die bei *Mycosphaerella graminicola* zu Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden führten (Leroux *et al.*, 2010; Cools *et al.*, 2011, Cools & Fraajie, 2013). Der Austausch der Aminosäuren an Position D134G führte allerdings nur in Kombination mit den Substitutionen V136A und I381V zu einer Resistenz (Stammler *et al.*, 2008; Cools & Fraajie, 2013). Der Resistenzfaktor lag lediglich zwischen 1,5 und 3,5 (Leroux & Walker, 2010). Auch der Aminosäure-Austausch an dieser Position ohne die Kombination mit anderen Substitutionen hatte bei *Candida albicans* nur einen geringen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Azol-Fungiziden (Sanglard *et al.*, 1998; Stammler & Semar, 2011). Für die Aminosäuresubstitution G412A sind Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden auch nur in Kombination mit anderen Substitutionen beschrieben (Cools & Fraajie, 2013). Bei *Glomus intraradices* wurden darüber hinaus vier weitere Aminosäuresubstitutionen gefunden, die an typischen Resistenz-Positionen in der Sequenz vorlagen, jedoch andere Aminosäuren aufwiesen als die anderen Pilze. Daraus ist zu schließen, dass es bei *Glomus intraradices* einen hohen Resistenzgrad geben muss, da unter 31 möglichen Mutanten schon vier Fälle von Aminosäuresubstitutionen gefunden wurden, die bisher nicht bekannt waren. Diese könnten so spezifisch für *Glomus intraradices* sein, dass die Azol-Fungizide aufgrund dessen unter Feldbedingungen keine Wirkung mehr haben.

Darüber hinaus weisen die Veränderungen in der Aminosäuresequenz darauf hin, dass Gint*ERG11* durch eine mögliche Konformationsänderung andere **Bindungseigenschaften** als das *ERG11* der übrigen Pilze aufweist und dadurch vermutlich unterschiedlich empfindlich gegenüber Azol-Fungiziden ist. Ein Modell der Proteinstruktur könnte daher Aufschluss über die möglichen Bindungseigenschaften der Azol-Fungizide geben.

---

<sup>1</sup> Aminosäureaustausch an Position 134 und 412 (D= Asparaginsäure; G= Glycin ; A= Alanin).

#### 4.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen der Arbeit wurden zum ersten Mal umfangreiche Untersuchungen zum Einfluss von Fungiziden auf einen arbuskulären Mykorrhizapilz durchgeführt, die eine praxisrelevante Anwendung der Fungizide berücksichtigten und den Einfluss auf verschiedene Entwicklungsstadien von *Glomus intraradices* abdeckten.

Obwohl die untersuchten Fungizide auf das Wachstum typischer Schadpilze stark hemmend wirken, war ihre direkte Wirkung gegenüber *Glomus intraradices* um das Zehn- bis Tausendfache schwächer.

Die Wirkung der Fungizide auf *Glomus intraradices* wurde bei schrittweiser Annäherung vom artifiziellen direkten Kontakt zu Pilzsporen über die Saatgutbehandlung in Gefäßversuchen unter Gewächshausbedingungen zunehmend schwächer. Bei Versuchen in Großcontainern unter Freilandbedingungen hatten die Fungizide als handelsübliche Saatgutbeizung letztendlich keinen Einfluss mehr. Im Hinblick auf die Entwicklung und Etablierung der Mykorrhiza-Symbiose ist die praxisnahe Anwendung der Fungizide als Saatgutbehandlung also unbedenklich.

In vertiefenden Untersuchungen zur Wirksamkeit von Azol-Fungiziden wurde gefunden, dass *Glomus intraradices* ein Gen besitzt, das für die Sterol 14- $\alpha$ -Demethylase (*GintERG11*) kodieren könnte und sich grundsätzlich nicht von dem anderer Pilze unterscheidet. Die nächste verwandtschaftliche Beziehung der *GintERG11*-Sequenz zu den *Zygomycota* sowie veränderte Aminosäuren in der Sequenz, die bei pathogenen Pilzen zu Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden führen, deuten auf strukturelle Eigenschaften des *GintERG11* hin, die eine mögliche Erklärung für die in der Arbeit aufgezeigte geringere Sensitivität von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden im Vergleich zu anderen Pilzen liefern kann.

## 5 Zusammenfassung

Zur Ertragssicherung in der modernen Landwirtschaft ist die Anwendung von Fungiziden gegen Pflanzenkrankheiten unerlässlich. In wissenschaftlichen und öffentlichen politischen Diskussionen wird aber die Frage aufgeworfen, welche Auswirkungen die Fungizidanwendung auf die für Kulturpflanzen nützliche Wurzelsymbiose mit symbiontischen Mykorrhizapilzen hat und wie sich die Fungizide überhaupt auf die Bodenökologie von Mykorrhizapilzen auswirken. Bisherige Untersuchungen unter artifiziellen Bedingungen mit sehr hohen Dosierungen und nicht praxisrelevanten Anwendungsmethoden der Fungizide können diese wichtigen Fragen nicht ausreichend beantworten. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss ausgewählter, für die Landwirtschaft bedeutender Fungizide auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* und dessen Symbiose mit Gerste aussagekräftig zu untersuchen. Die Auswirkungen der Fungizidanwendung wurden dabei auf verschiedenen Versuchsebenen vom artifiziellen direkten Kontakt zu Pilzsporen über die Saatgutbehandlung in kleinen Töpfen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen bis hin zu Versuchen in Großcontainern unter Freilandbedingungen systematisch untersucht.

- Die besonders wichtigen Ergebnisse sind in Tabelle 25 (Seite: 96) in einer Übersicht zusammengefasst.
- Tatsächlich können Fungizide die Sporenkeimung von *Glomus intraradices* bei direktem artifiziellen Kontakt beeinträchtigen. Geringe Beeinflussung zeigten Triadimenol und Metalaxyl, leichte Hemmung zeigten Penflufen und Tebuconazol, mittelstarke Hemmung zeigten Trifloxystrobin, Fluoxastrobin, Prothioconazol, Iaconazol und Thiram, nur Fludioxonil führte zu einer starken Hemmung. Im Vergleich zu ihrer Wirkung auf typische Zielorganismen war die Wirkung auf *Glomus intraradices* jedoch quantitativ viel schwächer. Nach Auswaschen der Fungizide keimten die gehemmten Sporen in allen Fällen wieder aus, was auf einen nur fungistatischen Effekt der Fungizide gegenüber Mykorrhizapilzen hindeutet und durch einen Vitalitätstest bestätigt wurde.
- Die Wirkung von Tebuconazol und Prothioconazol wurde zusätzlich im wurzelfreien, aber wirkstoffhaltigen Pilzkompartiment des monoxenischen Wurzelkultur-Systems aus Chicorée-Wurzeln und *Glomus intraradices*, untersucht. Beide Wirkstoffe reduzierten mit 30 ppm oder 3 ppm die Sporenproduktion und das Myzelwachstum von *Glomus intraradices* um bis zu 90 % während eine Wirkstoffkonzentration von 0,3 ppm keinen Einfluss mehr hatte.
- Eine Gießbehandlung der Fungizide in Gefäßversuchen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen hatte in keinem Fall einen Einfluss auf die frühe

Besiedlungsphase bzw. Etablierungsphase der Mykorrhiza-Symbiose zwischen *Glomus intraradices* und Gerstenwurzeln. Nach einer zweiten Fungizid-Applikation zum Zeitpunkt des Reproduktionsstadiums von *Glomus intraradices* wurde die Kolonisierungsrate durch 5 ppm Tebuconazol oder 5 ppm Triadimenol sowie durch 0,5 und 5 ppm Prothioconazol allerdings zur Hälfte reduziert.

- Die Beizung von autoklaviertem Gerstensaatzgut mit den Fungiziden in praxisüblicher Aufwandmenge führte *in vitro* in keinem Fall zu einer Beeinflussung der Sporenkeimung auf Nährmedium. Erst in der zehnfach erhöhten Aufwandmenge war eine Hemmung der Keimung durch Trifloxystrobin, Penflufen, Triadimenol und Prothioconazol nachzuweisen, die aber im Vergleich zur Wirkung der Fungizide bei direktem artifiziellem Kontakt deutlich abgeschwächt war.
- Nach Saatgutbehandlung mit Laborformulierungen fand sich in Gefäßversuchen eine Reduktion der Wurzelkolonisierung durch Prothioconazol und Triadimenol. Alle anderen Fungizide hatten keinen Einfluss auf die Kolonisierungsrate. Eine theoretische Betrachtung zeigt allerdings, dass die Wirkstoffkonzentrationen bei der Saatgutbehandlung in jedem Fall zu gering wären, um direkt negativ auf die räumlich entfernte Wurzelbesiedelung durch *Glomus intraradices* wirken zu können. Die beobachtete Reduktion der Wurzelkolonisierung durch Prothioconazol und Triadimenol lag tatsächlich auch immer noch im Bereich der statistischen Unsicherheit.
- Die Applikation der Fungizide in Form der formulierten Handelspräparate auf Gerstensaatzgut führte sowohl unter Gewächshaus- als auch Freilandbedingungen in keinem Fall zu einer Beeinflussung der Mykorrhiza-Symbiose.
- Die praxisnahe Anwendung der Fungizide auf Gerstensaatzgut in Großcontainern unter Freilandbedingungen hatte ebenfalls keine Effekte auf das Vorkommen und die Vitalität von *Glomus intraradices* in der umgebenden Ackererde.
- In vertiefenden Untersuchungen zu Azol-Fungiziden wurde in einer Datenbanksuche eine Nukleinsäure-Sequenz gefunden, die für eine *Glomus intraradices* Sterol-C14- $\alpha$ -Demethylase (Gint*ERG11*) kodieren könnte. Es wurde gezeigt, dass sich die Sequenz grundsätzlich nicht von der der anderen Pilze unterscheidet. Durch Expression in und Komplementation von *ERG11*-defektem *Saccharomyces cerevisiae* konnte die Funktionalität des *Glomus*-Gint*ERG11*-Proteins nachgewiesen werden.
- Die nächste verwandtschaftliche Beziehung der Gint*ERG11*-Sequenz zu den *Zygomycota* sowie veränderte Aminosäuren in der Sequenz, die bei pathogenen Pilzen zu Resistenzen gegenüber Azol-Fungiziden führen, deuten auf strukturelle Eigenschaften des

Gint*ERG11*-Proteins hin, die möglicherweise eine geringere Sensitivität von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden im Vergleich zu anderen Pilzen zur Folge haben könnten.

- In der Gint*ERG11*-Sequenz wurden in 4 von insgesamt 31 Fällen Aminosäuresubstitutionen gefunden, die zwar an typischen Azol-Resistenzpositionen vorlagen, jedoch in anderen Pilzen nicht bekannt sind. Dies deutet auf einen hohen Resistenzgrad von *Glomus intraradices* gegenüber Azol-Fungiziden hin.
- Obwohl Tebuconazol und Prothioconazol bei direkter Wirkstoffexposition die Sporenkeimung *in vitro* hemmten, wurde in solchermaßen behandeltem *Glomus intraradices* Myzel keine, wie in anderen Pilzen beschriebene, Hochregulierung der Genexpression von Gint*ERG11* gefunden.

Insgesamt erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit belastbare Aussagen über die möglichen Auswirkungen von Fungizidanwendungen in der Landwirtschaft auf die Wurzelsymbiose einer Kulturpflanze. Zwar hemmen die Fungizide den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* bei artifiziellem direktem Kontakt, dies erfordert jedoch um Größenordnungen höhere Wirkstoffkonzentrationen, als es in der landwirtschaftlichen Praxis üblich ist. Die praxisübliche Anwendung der Fungizide in Form einer Saatgutbehandlung hatte dagegen nachweisbar keine negativen Effekte auf die Mykorrhiza-Symbiose von Gerste mit *Glomus intraradices*. Ebenso wenig hatte diese Anwendung der Fungizide negative Effekte auf das Vorkommen und die Vitalität von *Glomus intraradices* im Boden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ackermann P., Knauf-Beiter G., Zeun R. (2007).** Chemistry and Biology of Fludioxonil, Fenpiclonil and Quinoxyfen. Modern Crop Protection Compounds. Hrsg. W. Krämer & U. Schirmer; Wiley-VCH Verlag
- Addy H.D., Schaffer G.F., Miller M.H., Peterson R.L. (1994).** Survival of the external mycelium of a VAM fungus in frozen soil over winter. *Mycorrhiza* 5: 1–5
- Afek U., Menge J.A., Johnson E.L.V. (1990).** The effect of *Phythium ultinatum* and treatments with metalaxyl on root length and mycorrhizal colonization of cotton, onion and pepper. *Plant Disease* 4: 117–120
- Agrios, G.N. (2005).** Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. p. 329–351
- Akhtar M., Alexander K., Boar R.B., McGhie J.F., Barton D.H. (1978).** Chemical and enzymic studies on the characterization of intermediates during the removal of the 14 $\alpha$ -methyl group in cholesterol biosynthesis. The use of 32-functionalized lanostane derivatives. *Biochemical Journal* 169: 449–463
- Akins R.A., (2005).** An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 43 (4): 285–318
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. & Hayashi, H. (2005).** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827
- Alberts B., Johnsons A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004).** Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH Verlag Weinheim
- Alexander T., Toth R., Meier R., Weber, H. C. (1989).** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany* 67: 2505–2513
- Al-Karaki G.N. (2000).** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10: 51–54
- Al-Karaki G.N., Hammad R. (2001).** Mycorrhizal influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1311–1323
- Al-Karaki G.N., Hammad R., Rusan M. (2001).** Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza* 11: 43–47
- Anderson R.C., Liberta A.E., Dickman L.A., Katz A.J. (1983).** Spatial variation in vesicular-arbuscular mycorrhiza spore density. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 110: 519–525
- Anke T. (1995).** The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 940–945
- Anonym (1999).** Saatgut-Behandlung – Ein Werkzeug für die nachhaltige Landwirtschaft. FIS Ausschuss für Saatgut-Behandlung und Umwelt des Internationalen Samenhandelsverbands; Schweiz
- Anonym (2005).** Vom Wirkstoff zum Produkt – die Formulierung macht's. Bayer Kurier 1/05, S. 6–9
- Anonym (2013).** Indikationen der Saatgutbehandlung. [www.ag.ndsu.edu](http://www.ag.ndsu.edu)
- Aoyama Y., Horiuchi T., Gotoh O., Noshiro M., Yoshida Y. (1998).** CYP51-like gene of *Mycobacterium tuberculosis* actually encodes a P450 similar to eukaryotic CYP51. *Biochemical Journal* 124: 694–696
- Arnon D.I., Hoagland D.R. (1940).** Crop production in artificial solutions and soils with special reference to factor influencing yield and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science* 50: 463–471
- Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. (2007).** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808–816



- Augé R.M. (2001).** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3–42
- Augusto J., Breneman T.B. (2012).** Assessing Systemicity of Peanut Fungicides through Bioassay of Plant Tissues with *Sclerotium rolfsii*. *Plant Disease* 96: 330–337
- Azcón-Aguilar C., Bago B. (1994).** Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In S. Gianinazzi, H., Schüepp, eds, *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhäuser-Verlag, Basel, pp 47–60
- Backhaus G.F., Feldmann F. (1996).** Mykorrhiza in gärtnerischen Substraten – endlich einsatzreif? *Taspo Gartenbaumagazin* 4, S. 12–14
- Backmann P.A. (1978).** Fungicide Formulation: Relationship to Biological Activity. *Annual Review of Phytopathology* 16: 211–237
- Bago B., Azcon-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. (1998).** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 139: 375–388
- Bago B., Bécard G. (2002).** Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. ed. by S. Gianinazzi, H., Schüepp, J.M. Barea, K. Haselwandter. Birkhäuser-Verlag, Basel
- Bago B., Pfeffer P., Douds D.D., Brouillette J., Bécard G., Shachar-Hill Y. (1999).** Carbon Metabolism in Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* as Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Plant Physiology* 121: 263–271
- Bago B., Pfeffer P.E., Zipfel W., Lammers P., Shachar-Hill Y. (2002b).** Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Metabolism and transport in AM fungi*. *Plant Soil* 244: 189–197
- Bago B., Zipfel W., Williams R.M., Jun J., Arreola R., Lammers P.J., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. (2002a).** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 128: 108–124
- Bailey J.E., Safir G.R. (1978).** Effect of benomyl on soybean endomycorrhizae. *Phytopathology* 68: 1810–1812
- Bammert G.F., Fostel J.M. (2000).** Genome-Wide Expression Patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of Drug Treatments and Genetic Alterations Affecting Biosynthesis of Ergosterol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (44): 1255–1265
- Baon J.B., Smith S.E., Alston A.M. (1994).** Phosphorus uptake and growth of barley as affected by soil temperature and mycorrhizal infection. *Journal of Plant Nutrition* 17: 479–491
- Barea J.M., Jeffries P. (1995).** Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. In: Hock B & Varma A (Eds.) *Mycorrhiza soil plant systems. Structure Function, Molecular Biology and Biotechnology* (pp 521–559). Springer-Verlag, Heidelberg
- Barker S.J., Tagu D., Delp G. (1998).** Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiology* 116: 1201–1207
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobranski B. (2002).** Review: The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649–662
- Beakes, G.W., Coombs, G.H., Vickerman, K., Sleight, M.A., Warren, A. (1998).** Evolutionary relationships among protozoa. *The systematic association special* 54: 351–373
- Bean T.P., Cools H.J., Lucas J.A., Hawkins N.D., Ward J.L., Shaw M.W., Fraaije B.A. (2009).** Sterol content analysis suggests altered eburicol 14- $\alpha$  demethylase (cyp51) activity in isolates of *Mycosphaerella graminicola* adapted to azole fungicides. *FEMS Microbiology Letters* 296: 266–273

- Bécard G., Doner L.W., Rolin D.B., Douds D.D., Pfeffer P.E. (1991).** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in vivo* <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. *New Phytologist* 118: 547–552
- Bécard G., Fortin J.A. (1988).** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211–218.
- Bécard G., Piche Y. (1989a).** Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2320–2322
- Bécard G., Piche Y. (1989b).** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 112: 77–83
- Becher R., Weihmann F., Deising H.B., Wirsal S.G.R. (2011).** Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *Genomics* 12: 52
- Bedini S., Turrini A., Rigo C., Argese E., Giovannetti M. (2010).** Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 758–765
- Beilby J.P. (1980).** Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis*. *Lipids* 15: 949–952
- Beilby J.P., Kidby D.K. (1980).** Sterol composition of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*. *Lipids* 15: 375–378
- Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. (1999).** Characterization and catalytic properties of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 96: 8937–8942
- Bendavid-Val R., Rabinowitch H.D., Katan J., Kapulnik Y. (1997).** Viability of VA-mycorrhizal fungi following soil solarization and fumigation. *Plant Soil* 195: 185–193
- Benveniste P. (1986).** Sterol biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 37: 275–308
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.-C., Roux C., Bécard G., Séjalon-Delmas N. (2006).** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4: 1239–1247
- Bethlenfalvay G.J., Reyes-Solis M.G., Carmel S.B., Ferrera-Cerrato R. (1991).** Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal inoculum. *Physiology Plant* 82: 423–432
- Bethlenfalvay G.J., Schüepp H. (1994).** Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. In: Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural Ecosystems. S. Gianinazzi and H. Schüepp (eds). pp. 117–131. Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz
- Bever J.D., Wang M. (2005).** Arbuscular mycorrhizal fungi: Hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature* 433: E3–E4
- Bharat N.K. (2011).** Effect of commonly used fungicides on arbuscular mycorrhizal association with apple roots. *World Journal of Science and Technology* 1 (6): 61–64
- Bianciotto V., Bonfante P. (1998).** Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza*. Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 229–251
- Bonfante P., Perotto S. (1995).** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* 130: 3–21
- Börner H. (2009).** *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

- Bouma J., Nielsen K.L., Koutstaal B. (2000).** Sample preparation and scanning protocol for computerized analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* 218: 185–196
- Bowen G.D. (1987).** The biology and physiology of infection and its development. In: Safir GR (ed) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC, Boca Raton, pp 27–70
- Bradley C.A., Bissonnette M. (2008).** *Plant Disease Management for field crops*. Agricultural Pest Management Handbook
- Briggs G.G. (1973).** A simple relationship between soil adsorption of organic chemicals and their octanol/water partition coefficients. In: *Proceedings of the 7th British Insecticide and Fungicide Conference*, 83–86
- Brudenell A. J. P., Baker D. A., Grayson B. T. (1995).** Phloem mobility of xenobiotics: tabular review of physicochemical properties governing the output of the Kleier model. *Plant Growth Regulation* 16: 215–231
- Brundrett M.C. (2002).** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *Tansley Review no. 134*. *New Phytologist* 154: 275–304
- Brundrett M.C., Kendrick B. (1990).** The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I Quantitative aspects of morphology. *New Phytologist* 114: 457–468
- Brunner P.C., Stefanato F.L., McDonald B. (2008).** Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Molecular Plant Pathology* 9 (3): 305–316
- Buchenauer H. (1987).** Mechanism of action of trizolyl fungicides and related compounds. In *Modern selective Fungicides, Properties, Applications and Mechanism of Action*, ed by Lyr H, Longman and Wiley, New York, pp. 205–231
- Bucher M. (2002).** Kooperation der Pflanzen mit Mykorrhizapilzen lohnt sich. *Bioworld* 1: 16–18
- Burden R.S., Cooke D.T., Carter G.A. (1989).** Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi. *Phytochemistry* 28: 1791–1804
- Burrows R.L., Ahmed I. (2007).** Fungicide Seed Treatment Minimally Affect Arbuscular-Mycorrhizal Fungal (AMF) Colonization of Selected Vegetable Crops. *Journal of Biological Sciences* 7 (2): 417–420
- Calonne M., Fontaine J., Debiante D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. (2010).** Propiconazol Toxicity on the Non-Target Organism, the Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus irregulare*. *Fungicides*, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978–953–307–266-1, InTech
- Calonne M., Lounès-Hadj Sahraoui A., Campagnac E., Debiante D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J. (2012).** Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere* 87 (4): 376–383
- Campagnac E., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. (2008).** Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry* 69: 2912–2919
- Campagnac E., Fontaine J., Sahraoui A.L.-H., Laruelle F., Durand R., Grandmougin-Ferjani A. (2009).** Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 19: 365–374
- Campagnac E., Sahraoui A.L.-H., Debiante D., Fontaine J., Laruelle F., Garcon G., Verdin A., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A. (2010).** Arbuscular mycorrhiza partially protects chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* 20: 167–178
- Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C. (2009).** Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 291–321

- Cardenas-Flores A., Cranenbrouck S., Draye X., Guillet A., Govaerts B., Declerck S. (2011).** The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza* 21(5): 443–449
- Carrenho R., Ramos Bononin V.L., Gracioli L.A. (2000).** Effect of the fungicides Fosetyl-Al and Metalaxyl on arbuscular mycorrhizal colonization of seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck grafted onto *C. limon* (L.) Burmf. *Acta Scientiarum* 22 (2): 305–310
- Cayley S., Record M.T. (2003).** Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry*. 42: 12596–12609
- Chiocchio V., Venedikian N., Martinez A.E., Ocampo J.A., Godeas A. (2000).** Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology* 3: 173–175
- Cools H.J., Fraaije B.A. (2013).** Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Sciences*. 69: 150–155
- Cools H.J., Fraaije B.A., Kim S.H., Lucas J.A. (2006).** Impact of changes in the target P450 *CYP51* enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochemical Society Transactions* 34 (6): 1219–2122
- Cools H.J., Fraaije B.A., Lucas J.A. (2005).** Molecular examination of *Septoria tritici* isolates with reduced sensitivities to triazoles. In: *Modern fungicides and anti-fungal compounds IV*, eds Dehne H.-W., Gisi U., Kuck K.-H., Russell P.E., Lyr H., 103-114. BCPC: Alton, UK
- Cools H.J., Mullins J.G.L., Fraaije B.A., Parker J.E., Kelly D.E., Lucas J.A., Kelly S.L. (2011).** Impact of recently emerged sterol 14-alpha demethylase (*cyp51*) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicides sensitivity. *Applied and environmental microbiology* 77 (11): 3830–3837
- Cordier C., Pozo M.J., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (1998).** Cell defence responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1077–1028
- Coste A., Selmecki A., Forche A., Diogo D., Bougnoux M.E., d'Enfert C., Berman J., Sanglard D. (2007).** Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryotic Cell*. 6 (10): 1889–1904
- Cremlyn, R.J.W. (1961).** Systemic fungicides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 12: 805–812
- Dalpé Y., Monreal M. (2005).** Arbuscular Mycorrhiza Inoculum to support sustainable cropping systems. Online: *Crop Management*: 10.1094/CM–2004–0301–09–RV
- Daniels B.A., Menge J.A. (1980).** Hyperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology* 70: 584–588
- Daniels B.A., Trappe J.M. (1980).** Factors affecting spore germination of VAM fungus, *Glomus epigeus*. *Mycologia* 72: 407–471
- de la Pena E., Rodriguez Echerverria S., van der Putten W.H., Freitas H., Moens M. (2006).** Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 169: 829–840
- De Waard M.A., Kipp E.M.C., Horn N.M., van Nistelrooy J.G.M. (1986).** Variation in sensitivity to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in wheat powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 92: 21–32
- Declerck S., Strullu D.-G., Fortin J.A. (2005).** *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer Verlag Berlin

Heidelberg

- Dehne H.W. (1986).** Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenbehandlungsmitteln auf das Auftreten der VA Mykorrhiza. Med Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 51/2a
- Dehne H.W. (1987).** Zur Nutzung der VA Mykorrhiza als Antistressfaktor. *Angewandte Botanik* 61: 135–143
- Dias M.C. (2012).** Phytotoxicity: An Overview of the Physiological Responses of Plants Exposed to Fungicides. Hindawi Publishing Corporation Journal of Botany. Article ID 135479, 4 pages
- Diederichs C. (1981).** Einfluss des Lichtes auf die Wirksamkeit der vesikulär-arbuskulären (VA) Mykorrhiza bei tropischen und subtropischen Pflanzen. Diss., Univ. Göttingen
- Diedhiou P.M., Oerke E.-C., Dehne H.W. (2004).** Effects of the strobilurin fungicides azoxystrobin and kresoxim-methyl on arbuscular mycorrhiza. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111 (6): 545–556
- Diercks R., Heitefuß R. (2002).** Integrierter Landbau. BLV VerlagsgesellschaftmbH; Auflage: 2., überarb. und erweiterte Ausgabe. ISBN-13: 978-3405144722
- Dimster-Denk D., Rine J., Phillips J., Scherer S., Cundiff P., DeBord K., Gilliland D., Hickman S., Jarvis A., Tong L., Ashby M. (1999).** Comprehensive evaluation of isoprenoid biosynthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing the Genome Reporter Matrix. *Journal of Lipid Research* 40: 850–860
- Dodd J.C., Jeffries P. (1986).** Early development of VAM in autumn-sown cereals. *Soil Biology & Biochemistry* 18: 149–154
- Douds D.D., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. (2000).** Carbon partitioning, cost and metabolism of arbuscular mycorrhizae in arbuscular mycorrhizas: physiology and function. In: Y. Kapulnick, D.D. Douds Jr, eds, *Arbuscular Mycorrhizas: Molecular Biology and Physiology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 107–129
- Dutzmann S., Mauler-Machnik A., Kerz-Möhlendick F., Applegate J., Heinemann U. (2002).** HEC 5725 – a novel strobilurin fungicide. *Proceedings of the BCPC Conference – Pests and Diseases*: 365–370
- Dutzmann S., Suty-Heinze A. (2004).** Prothioconazole: a broad spectrum demethylation-inhibitor (DMI) for arable crops. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 57 (2): 249–264
- Eizuka T., Saitoh K., Chida T., Satake K., Yamaguchi I. (2004).** Metabolism of Iaconazole, a new Triazole Fungicide for Seed Treatment, in Rice Plants. *Journal of Pesticide Science* 19: 285–297
- Elskens M.T., Penninckx M.J. (1997).** Thiram and Dimethyldithiocarbamic Acid Interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a Possible Metabolic Pathway under the Control of the Glutathione Redox Cycle. *Applied and Environmental Microbiology*: 2857–2862
- Eskandari A., Danesh Y.R. (2010).** Study on life cycle of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* using *in vitro* culturing technique. *Journal of Phytology* 2 (6): 69–75
- Fehrmann, H. (1976).** Systemische Fungizide — ein Überblick. *Journal of Phytopathology* 86: 67–89
- Feldmann F. (2001).** Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf arbuskuläre Mykorrhizapilze als Nichtzielorganismen. Unveröffentlichter Bericht vom Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11/12, D-38126 Braunschweig
- Fiechi A., Galli-Kienle M., Scala A., Galli G., Grossi Paoletti E., Cattabeni F., Paoletti R. (1972).** Hydrogen exchange and double bond formation in cholesterol biosynthesis. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biological Science* 180: 147–165
- Fitter A.H. (1986).** Effect of benomyl on leaf phosphorus concentration in alpine grasslands: A test if mycorrhizal benefit. *New Phytologist* 103: 767–776

- Fitter, A.H. (2005).** Darkness visible: Reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* 93: 231–243
- Fletcher J.S., Wolfe M.S. (1981).** Insensitivity of *Erysiphe graminis f. sp. hordei* to triadimefon, triadimenol and other fungicides. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference, Pests & Diseases: 633–640
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Glorian V., Durand R. (2004).** 24-Methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 163 (1): 159–167
- Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Hartmann M.A., Sancholle M. (2001).** Sterol biosynthesis by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Lipids* 36: 1357–1363
- Fontanet X., Estaun V., Camprubi A., Calvet C. (1998).** Fungicides added to potting substrate affect mycorrhizal symbiosis between a peach-almond rootstock and *Glomus spp.* *HortScience* Vol. 33,no 7: 1119–1135; (31 ref.): 1217–1219
- Fraaije B.A., Cools H.J., Kim S.-H., Motteram J., Clark W.S., Lucas J.A. (2007).** A novel substitution I381V in the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology* 8: 245–254
- Franken P., Kuhn G., Gianinazzi-Pearson V. (2002).** Development and molecular biology of arbuscular mycorrhizal fungi. Osiewacz HD, ed. *Molecular biology of fungal development*. New York: Marcel Dekker, Inc.: 325–348
- Fröhlich G. (1991).** *Phytopathologie und Pflanzenschutz*. Gustav Fischer Verlag
- Fuller M.S., Roberson R.W., Gisi U. (1990).** Effects of the sterol demethylase inhibitor, cyproconazole, on hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii* III. Cell Wall chemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 115–126
- Gadkar V., David-Schwartz R., Kunik T., Kapulnik Y. (2001).** Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition. *Plant Physiology* 127 (4): 1493–1499
- Galli-Kienle M., Anastasia M., Cighetti G., Galli G., Fiecchi A. (1980).** Studies on the 14 alpha-demethylation mechanism in cholesterol biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* 110: 93–105
- George E. (2000).** Nutrient uptake. Kapulnik Y, Douds Jr DD, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers: 307–343
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. (1963).** Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46 (2): 235–244
- Gerhard M., Habermeyer J., Zinkernagel V. (1998).** The impact of strobilurins on plant vitality on winter wheat under field condition. In: Lyr, H.; Russel, P.E.; Dehne, H.-W.; Sisler, H.D. (eds): *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Proceedings 12th International Reinhardsbrunn Symposium, 1998. Intercept, Andover, UK, 197–208
- Ghannoum M.A., Rice L.B. (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 501–517
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.-N., van Tuinen D., Redecker D., Wipf D. (2010).** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20 (8): 519–530
- Gianinazzi S., Schüepp H., Masson J.P. (1995).** *Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems*. EC , Brüssel
- Gianinazzi-Pearson V., Gollotte A., Lherminier J., Tisserant B., Franken P., Dumas-Gaudot E., Lemoine M.C., van Tuinen D., Gianinazzi S. (1995).** Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular-mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany* 73: 526–532

- Giovannetti M. (2000).** Spore germination and pre-symbiotic mycelia growth. In: Kapulnik Y., Douds D.D. Jr (eds). *Arbuscular mycorrhizas physiology and function*. Kluwer, Dordrecht. The Netherlands
- Giovannetti M., Avio L., Sbrana C., Fortuna P. (2009).** *In vivo* Model Systems for Visualisation, Quantification and Experimental Studies of Intact Arbuscular Mycorrhizal Networks. In: A. Varma and A.C. Kharkwal (eds), *Symbiotic Fungi, Soil Biology* 18, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Giovannetti M., Sbrana C. (1988).** Meeting a non-host: the behavior of AM fungi. *Mycorrhiza* 8: 123–130
- Giovannetti M., Sbrana C., Logi C. (1994).** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 127: 703–709
- Gisi U. (1997).** *Bodenökologie*. Thieme Verlag
- Godwin J.R., Young J.E., Hart C.A. (1994).** ICIA 5504: Effects on development of cereal pathogens. Hart, C.A.; 1994: ICIA5504, Brighton Crop Protection Conference, 259–264
- Gossling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D. (2006).** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113: 17–35
- Graham J.H. (2000).** Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In GK Podila, D.D. Douds Jr, eds, *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, pp 127–140
- Grandmougin-Ferjani A., Dalpé Y., Hartmann M.A., Laruelle F., Sancholle M. (1999).** Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* 50: 1027–1031
- Grandmougin-Ferjani A., Fontaine J., Durand R. (2005).** Carbon metabolism, lipid composition and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. In: Declercq S., Strullu D.-G., Fortin J.A. (2005). *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Gustavson D.I. (1989).** Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 339–357
- Habte M., Manjunath M. (1992).** Initial and residual toxicity of soil-applied thiram in the vesicular-arbuscular symbiosis. *Mycorrhiza* 2: 25–31
- Haenssler, G., Kuck, K.H. (1987).** Microscopic investigations on effect of (R) Folicur on pathogenesis of brown rust (*Puccinia recondita f. sp. tritici*). *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 40(2): 153–180
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., von Tiedemann A. (2007).** *Phytomedizin – Grundwissen Bachelor*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Harley J.L. (1989).** The significance of mycorrhiza. *Mycological Research* 92: 129–139
- Harnikumar K.M., Bagyaraj D.J. (1988).** Effect of crop rotation on native vesicular arbuscular mycorrhizal propagules. *Plant Soil* 110: 77–80
- Harrison M.J. (1999).** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 50: 361–389
- Harrison M.J. (2005).** Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Reviews in Microbiology* 59: 19–42
- Harrison M.J., van Buuren M.L. (1995).** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626–629
- Häuser-Hahn I., Baur P., Schmitt W. (2004).** Prothioconazole – a new dimension DMI Biochemistry, mode of action, systemic effects. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 57 (2): 237–248
- Heilmann C.J., Schneider S., Barker K.S., Rogers P.D., Morschhäuser J. (2009).** An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive *ERG11* upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 353–359

- Heinemeyer A., Ridgway K.P., Edwards E.J., Benham D.G., Young P.W., Fitter A.H. (2004).** Impact of soil warming and shading on colonization and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of a native grassland community. *Global Change Biology* 10: 52–64
- Heitefuss R. (2000).** Pflanzenschutz: Grundlagen der prakt. Phytomedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 3. Auflage
- Henry K.W., Nickels J.T., Edlind T. (2000).** Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 1660–1670
- Hernández-Dorrego A., Mestre Parés J. (2010).** Evaluation of some fungicides on mycorrhizal symbiosis between two *Glomus* species from commercial inocula and *Allium porrum* L. seedlings. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (S1): 43–50
- Hetrick B.A.D., Wilson G.T. (1992).** Effect of mycorrhizal fungus species and metalaxyl application on microbial suppression of mycorrhizal symbiosis. *Mycologia* 83 (1): 97–102
- Hibett D.S. (2007).** A higher level phylogenetic classification of the fungi. In: *Mycological Research* 111 (5): 509–547
- Hodge A., Campbell C.D., Fitter A.H. (2001).** An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413 (6853): 297–299
- Hosny M., Gianinazzi-Pearson V., Duileu H. (1998).** Nuclear content of 11 fungal species in *Glomales*. *Genome* 41: 422–428
- Hutson D., Myamoto J. (1998).** Fungicidal activity chemical and biological approaches to plant protection. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Mannheim, Brisbane, Singapore, Toronto
- Ipsilantis I., Samourelis C., Karpouzas D.G. (2011).** The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 45: 147–155
- Isaac S. (1992).** Plant-fungal interactions. Chapman and Hall, London
- Jabaji-Hare S.H., Kendrick W.B. (1985).** Effects of fosetyl-Al on root exudation and on composition of extracts of mycorrhizal and nonmycorrhizal leek roots. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 118–126
- Jahromi F., Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. (2008).** Influence of salinity on the *in vitro* development of *Glomus intraradices* and on the *in vivo* physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology* 55: 45–53
- Jakobsen I., Abbott L.K., Robson A. (1992).** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.I. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120: 371–380
- Jalali B.L., Domsch K.H. (1975).** Effect of systemic fungitoxicants on the development of endotrophic mycorrhiza. In F.E. Sanders, B. Mosse and P.B.H. Tinker eds. *Endomycorrhizas*. Academic Press, New York. pp. 619–626
- Jaskolla D. (2006).** Der Pflanzenschutz vom Altertum bis zur Gegenwart. Biologische Bundesanstalt, Informationszentrum Phytomedizin und Bibliothek Berlin-Dahlem
- Javot H., Penmetsa R. V., Terzaghi N., Cook D. R., Harrison M. J. A (2008).** *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 1720–1725
- Jecoate C.R. (1978).** Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy, 258–279. In: Fleischer S., Packer L. eds. *Biomembranes Part C, Methods in Enzymology*, Elsevier inc. USA
- Jensen W.A. (1962).** Botanical Histochemistry, San Francisco: Freeman



- Jordan N.R., Zhang J., Huerd S. (2002).** Arbuscular mycorrhizal fungi: potential roles in weed management. *Weed Research* 40: 397–410
- Kahn R.A., Bak S., Olsen C.E., Svendsen I., Moller B.L. (1996).** Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase from *Sorghum bicolor* (L.). *Journal of Biological Chemistry* 271: 32944–32950
- Kalb V.F., Loper J.C., Dey C.R. (1986).** Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 45: 237–245
- Kalb V.F., Loper J.C., Dey C.R., Woods C.W., Sutter T.R. (1986).** Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* 45: 237–245
- Kaneshiro E.S., Wyder M.A. (2000).** C27 to C32 Sterols found in *Pneumocystis*, an opportunistic pathogen of immuno-compromised mammals. *Lipids* 35: 317–324
- Kanetis L., Förster H., Adaskaveg J.E. (2007).** Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Disease* 91: 1502–1511
- Kang Z., Huang L., Krieg U., Mauler-Machnik A., Buchenauer H. (2001).** Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* *in vitro*. *Pest Management Science* 57: 491–500
- Khalil S., Loynachan T.E., McNabb jr. H.S. (1992).** Colonization of soybean by mycorrhizal fungi and spore populations in Iowa soils. *Agronomy Journal* 84: 832–836
- Kjoller R., Rosendahl S. (2000).** Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soil* 31: 361–365
- Klodka D., Nowak J. (2004).** Influence of combined fungicides and adjuvants application on enzymatic activity and ATP content in soil. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Environmental Development* Vol. 7 (1)
- Kling M., Jakobsen I. (1997).** Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi species: effect on <sup>32</sup>P transport and succinat dehydrogenase activity. *Mycorrhiza* 7: 33–37
- Kojima K., Takano Y., Yoshimi A., Tanaka C., Kikuchi T., Okuno T. (2004).** Fungicide activity through activation of a fungal signaling pathway. *Molecular Microbiology* 53: 1785–1796
- Koske, R.E. (1987).** Distribution of VA mycorrhizal fungi along a latitudinal temperature gradient. *Mycologia* 79: 55–68
- Kosuta S., Chabaud M., Loughon G., Gough C., Denarie J., Barker D.G., Bécard G. (2003).** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 952–962
- Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (1987).** Depressed Metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide application. *New Phytologist* 106: 707–715
- Kuck K.H., Vors J.P. (2007).** Sterol Biosynthesis Inhibitors. In: *Modern Crop Protection Compounds*. Hrsg. W. Krämer & U. Schirmer; Wiley-VCH Verlag
- Kuhn R., Jerchel D. (1941).** Über Invertseifen. VII Mittelteil.: Tetrazoliumsalsze. *Deutsche Chemische Gesellschaft* 3: 941–948
- Kunal P., Sharma P. (2012).** Influence of Pesticide-treated seeds on survival of *Mesorhizobium sp. Cicer*, Symbiotic Efficiency and Yield in Chickpea. *Plant Protection Science* 48: 37-43
- Lancashire P.D., Bleiholder P., Langelüddecke R., Stauss T., Van den Boom E., Weber E., Witzinger A. (1991).** An uniformdecimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann. appl. Biol.* 119, 561-601

- Land S., Dauck H., von Alten H. (1989).** Evaluation of VA-Mycorrhizae in different agricultural soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29: 217–224
- Land S., van Alten H., Schönbeck F. (1993).** The influence of host plant, nitrogen fertilization and fungicide application on the abundance and seasonal dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi in arable soils in northern Germany. *Mycorrhiza* 2: 157–166
- Landwirtschaftskammer Hamburg (2010).** Leader-Projekt Applikationstechnik. <http://pflanzenschutz.hamburg.de/leader-projekt/>
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G. Boddy L., Read D. (2004).** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. International Conference on Mycorrhizas (ICOM4), 10.–15. August 2003, Montreal, Canada. *Canadian Journal of Botany* 82: 1016–1045
- Lee T.Y., Mizubuti E., Fry W.E. (1999).** Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 26(2): 118–130
- Leroux P. (2003).** Mode of action of agrochemicals towards plant pathogen. *C.R. Acad. Sci.* 326: 9–21
- Leroux P., Albertini C., Gautier A., Gredt M., Walker A.S. (2007).** Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 alpha-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63 (7): 688–698
- Leroux P., Walker A.S. (2010).** Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 67 (1): 44–59
- Leyval C., Berthelin J., Schontz J., Weissenhorn I., Morel J.L. (1991).** Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu and Cd applied as mineral salts and sewage sludge. Farmer JG (ed): *Heavy Metals in the Environment*. CEP Consultants LTD., pp 204–207
- Li S., Zhang J., Cao S., Han R., Yuan Y., Yang J., Yan Y., Liu D. (2011).** Homology modeling molecular docking and spectra assay studies of sterol 14-alpha demethylase from *Penicillium digitatum*. *Biotechnology Letters* 33: 2005–2011
- Lin H., Langenbach R.J., Knoche H.W. (1973).** Sterols of *Uromyces phaesoli* Uredospores. *Phytochemistry* (11): 2319–2322
- Liu A., Wang B., Hamel C. (2004).** Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza* 14: 93–101
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(- $\Delta\Delta$ CT)</sup> Method. *Methods* 25 (4): 402–408
- Maack G. (1977).** Schadwirkung der Kleinen Kohlfliege (*Phorbia brassicae Bouché*) und Möglichkeiten zur Reduzierung des Insektizidaufwandes bei der Bekämpfung. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gemüsebau, Hürth-Fischenich
- Mac Donald R.M., Lewis M. (1978).** The Occurrence of some acid phosphatase and dehydrogenases in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytologist* 80 (1): 135–141
- Mäder P. (1996).** Stickstoffversorgung durch Mykorrhizapilze. *Ökologie und Landbau* 24, S. 36
- Margot P., Huggenberger F., Amrein J., Weiss B. (1998).** CGA 279202: a new broad spectrum strobilurin fungicide. Proceedings of the BCPC Conference on Pests and Diseases, BCPC, Farnham Surrey, UK, 2, pp. 375–382
- Marschner H. (1995).** Mineral Nutrition of higher plants. Academic press, London UK
- Marschner H., Dell B. (1994).** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89–102

- Martin C.A., Stutz J.C. (2004).** Interactive effects of temperature and arbuscular mycorrhizal fungi on growth, P uptake and root respiration of *Capsicum annuum* L. *Mycorrhiza* 14: 241–244
- Matsubara Y., Kayukawa Y., Fukui H. (2000).** Temperature-stress tolerance of *Asparagus* seedlings through symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69: 570–575
- Mauler-Machnik A. (1994).** Ährenfusariosen an Weizen – neue Erkenntnisse zur Bekämpfung mit Folicur (Tebuconazole). *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 47 (2): 133–160
- Mehl A., Stenzel K. (2008).** Resistenzmanagement zur Erhaltung der Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln in der Praxis – am Beispiel der Fungizide. In: Tiedemann A v, Heitefuss R, Feldmann F (2008): *Pflanzenproduktion im Wandel – Wandel im Pflanzenschutz*. S. 122–137
- Menge J.A. (1982).** Effect of Soil Fumigants and Fungicides on Vesicular-Arbuscular Fungi. *Phytopathology* 72:1125–1132
- Miley R., Cook R.J., Paulitz T. (2002).** Seed Treatments for small grain cereals. Oregon State University. Extension Publ. EM 8797
- Miransari M. (2010).** Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology* 12: 563–569
- Mitropoulos K.A., Gibbons G.F., Reeves B.E. (1976).** Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. Similarity of the enzyme system from yeast and rat liver. *Steroids* 6: 821–829.
- Morton J.B., Benny G.L. (1990).** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order *Glomales*, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471–491
- Morton V., Staub T. (2008).** A Short History of Fungicides. Online, *APSnet Features*. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308
- Mosmann T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63
- Müller U., Mortimer C.E. (2010).** *Chemie*. Thieme Verlag
- Mullins J.G.L., Parker J.E., Cools H.J., Togawa R.C., Lucas J.A., Fraaije B.A., Kelly D.E., Kelly S.L. (2011).** Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLOS ONE* 6(6): doi:10.1371/journal.pone.00209373
- Murillo-Williams A., Pedersen P. (2005).** Effect of fungicide seed treatments on mycorrhizal colonization of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Agronomy journal* 100 (3): 795–800
- Murillo-Williams A., Pedersen P. (2008).** Arbuscular mycorrhizal colonization response to three seed-applied fungicides. *Agronomy Journal* 100 (3): 795–800
- Nagahashi G., Douds D., Buee M. (2000).** Light-induced hyphal branching of germinated AM fungal spores. *Plant Soil* 219 (1–2): 71–79
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen .R, Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996).** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*.6 (1): 1–42
- Nemec S. (1980).** Effects of 11 fungicides on endomycorrhizal development in sour orange. *Canadian Journal of Botany* 63: 1673–1675
- Ocampo J.A., Hayman D.S. (1980).** Effects of pesticides on mycorrhiza in field grown barley, maize and potatoes. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 413–415

- Oerke E.C. (1996).** Ertragsverluste und Wirksamkeit des Pflanzenschutzes - eine kritische Bewertung der Situation weltweit. *Gesunde Pflanzen* 48 (1): 28-33
- Oerke E.C., Steiner U. (2003).** Wie funktionieren Fungizide? Bayer Kurier Online 2003
- Oger E., Ghignone S., Campagnac E., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Lanfranco L. (2009).** Functional characterization of a C-4 sterol methyl oxidase from the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 486–495
- Parker J.E., Warrilow A.G.S., Cools H.J., Martel C.M., Nes W.D., Fraaije B.A., Lucas J.A., Kelly D.E., Kelly S.L. (2011).** Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that to other azole antifungals. *Applied and environmental microbiology* 77 (4): 1460–1465
- Parniske M. (2008).** Arbuscular Mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Nature Reviews Microbiology* (6) 763–775
- Paszkowski U. (2006).** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 172: 35–46
- Patil S.G., Nicholls P.H., Chamberlain K., Briggs G.G., Bromilow R.H. (1988).** Degradation rates in soil of 1-benzyltriazoles and two triazole fungicides. *Pesticide Science* 22: 333–342
- Pawłowska T. E., Taylor J.W. (2004).** Organisation of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427: 733–737
- Perrin R., Plenchette C. (1993).** Effect of some fungicides applied as soil drenches on the mycorrhizal infectivity of two cultivated soils and their receptiveness to *Glomus intraradices*. *Crop Protection* 12: 127–133
- Pfeffer P.E., Douds jr. D.D., Bécard G. (1999).** Carbon Uptake and the Metabolism and Transport of Lipids in an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587–598
- Phipps C.J., Taylor T.N. (1996).** Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* 88: 707–714
- Pirozynski K.A., Hawksworth D.L. (1988).** Coevolution of fungi with plants and animals. Academic Press London, San Diego u.a.
- Pirozynski K.A., Malloch D.W. (1975).** The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153–164
- Plenchette C., Perrin R. (1992).** Evaluation in the greenhouse of the effects of fungicides on the development of mycorrhiza on leek and wheat. *Mycorrhiza* 1: 59–62
- Porter W.M., Robsen A.D., Abott L.K. (1987).** Field survey of the distribution of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology* 24: 659–662
- Powell C.L. (1982).** Effect of kale mustard crops or white clover to VAM inoculation in pot trial. *N.Z. J. Agricultural Research* 25: 461–464
- Powell C.L., Bagyaraj D.J. (1984).** VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton
- Powell C.L., Daniel J. (1978).** Mycorrhizal fungi stimulate uptake of soluble and insoluble phosphate fertilizer from phosphate deficient soil. *New Phytologist* 80: 351–358
- Rajendran L., Simons K., (2005).** Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* 118: 1099–1102
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (2006).** Biologie der Pflanzen. De Gruyter Verlag, S. 365
- Read D.J., Duckett J.G., Francis R., Ligrone R., Russel A. (2000).** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 815–830
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. (2000).** *Glomalean* Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920–1921

- Reinert L., Baumer M., Baumer V.B. (1988).** Wintergerste Aktuell. Frankfurt am Main, DLG-Verlag
- Remy W., Taylor T.M., Hass H., Kerp H. (1994).** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular-mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841–11843
- Reuveni M., Sheglov D. (2002).** Effects of azoxystrobin, difenoconazole, poloxin B (polar) and trifloxystrobin in germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. *Crop Protection* 21: 951–955
- Revankar S.G., Fua J., Rinaldi M.G., Kelly S.L., Kelly D.E., Lamb D.C., Keller S.M., Wickes B.L. (2004).** Cloning and characterization of the lanosterol 14a-demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324: 719–728
- Rheinheimer J. (2007).** Succinate Dehydrogenase Inhibitors. In *Modern Crop Protection Compounds*. Hrsg. W. Krämer & U. Schirmer; Wiley-VCH Verlag
- Rhodes L.H., Larsen P.O. (1981).** Effects of Fungicides on Mycorrhizal Development of Creeping Bentgrass. *Plant Disease* 65: 145–147
- Ribes J.A., Vanover-Sams C.L., Baker D.J. (2000).** *Zygomycetes* in Human Disease. *Clin Microbiol Rev* 13 (2): 236–301
- Runno E., Koppel M. (2006).** The question of metalaxyl resistance on light blight fungus in Estonia. *Agronomy Research* 4: 341–344
- Ryan M.H., Chilvers G.A., Dumaresq D.C. (1994).** Colonisation of wheat by VA-mycorrhizal fungi was found to be higher on a farm managed in an organic manner than on a conventional neighbor. *Plant and Soil* 160: 33–40
- Saito M. (1995).** Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 129: 425–431
- Sanders F.E., Tinker P.B. (1973).** Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science* 4: 385–395
- Sanglard D., Ischer F., Koymans L., Bille J. (1998).** Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 42: 241–253
- Sanyal S.K., De Datta S.K. (1991).** Chemistry of phosphorus transformations in soil. *Advances in Soil Sciences* 16: 1–120
- Sauter H. (2007).** Strobilurins and other complex III inhibitors. In: *Modern Crop Protection Compounds*. Hrsg. W. Krämer & U. Schirmer; Wiley-VCH Verlag
- Schmidt A. (2010).** Bemerkungen zur Evolution der Mykorrhizen. <http://www.atelier-symbiota.de/NEU%20A06c%20Fallbsp%20%20Evolution%20der%20Mykorrhizen.pdf>
- Schneider M. (1988).** Aufnahme von <sup>14</sup>C-Triadimenol über Korn und Wurzel nach Flüssigbeizung von Wintergerste: Einfluss von Bodenfeuchte und Saattermin auf Radioaktivitätsverteilung und Wirkstoffgehalt in Pflanze und Boden. Dissertation, Kernforschungsanlage Jülich GmbH
- Schulze W., Kierszniowska S. (2010).** Lipid-Rafts Specialized areas of the plasma membrane. Forschungsbericht 2010 – Max Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie ([www.mpg.de](http://www.mpg.de))
- Schüepp H., Dehn B., Sticher H. (1987).** Interactions between VA mycorrhizas and heavy metal stress. *Angewandte Botanik* 61: 85–96
- Schüßler A. (2009).** Struktur, Funktion und Ökologie der arbuskulären Mykorrhiza. *Rundgespräche der Kommission für Ökologie*, Bd. 37 »Ökologische Rolle von Pilzen«, S. 97–108
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001).** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421

- Schuster C, Nowak A., Marx P., Gärber U., Konstantinidou-Doltsinis S., Seddon B., Schmitt A. (2009).** Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*) im Praxisversuch Julius-Kühn-Archiv 424, S. 50–55
- Schweiger P.F., Spliid N.H., Jakobsen I. (2001).** Fungicide application and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi into field-grown peas. *Soil & Biochemistry* 33: 1231–1237
- Schwinn F.J., Margot P. (1991).** Control with chemicals. In *Phytophthora infestans, the Cause of Late Blight of Potatoe* (D.S. Ingram, P.H. Williams, Eds.), pp. 225–265. Academic Press, London
- Servouse M., Mons N., Baillargeat J.L., Karst F. (1984).** Isolation and characterization of yeast mutants blocked in mevalonic acid formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123(2):424–30
- Seymour N.P., Thompson J.P., Fiske M.L. (1994).** Phytotoxicity of fosetyl al and phosphonic acid to maize during production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Disease* 78 (5): 441–446
- Shachar-Hill Y., Pfeffer P.E., Douds D., Osman S.F., Doner L.W., Ratcliffe R.G. (1995).** Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek. *Plant Physiology* 108: 7–15
- Sharma V.K., Aulakh J.S., Malik A.K. (2003).** Thiram: degradation, applications and analytical methods. *Journal of Environmental Monitoring* 5: 717–723
- Sheikh N.A., Sanders F.E. (1988).** Effect of temperature on germination of mycorrhizal spores and infection in roots. *Biologia* 34: 223–236
- Sherman F. (2002).** Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* 350: 3–41
- Shetty P.K., Magu S.P. (1997).** Influence of metalaxyl on *Glomus fasciculatum* associated with wheat (*Triticum aestivum L.*). *Current Science* 72 (4): 275–277
- Sieverding E. (1988).** Effect of soil temperature on performance of different VA mycorrhizal fungal isolates with cassava. *Angewandte Botanik* 62: 295–300
- Smith M.D., Hartnett D.C., Rice C.W. (2000).** Effects of long-term fungicide applications on microbial properties in tallgrass prairie soil. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 935–946
- Smith P. H, Chamberlain K., Sugars J. M, Bromilow R. H. (1995).** Fungicidal activity of N-(2-cyano-2-methoximinoacetyl) amino acids and their derivatives. *Pesticide Science* 44: 219–224
- Smith S.E, Read D.J. (1997).** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Smith S.E., Bowen G.D (1979).** Soil temperature, mycorrhizal infection and nodulation of *Medicago truncatula* and *Trifolium subterraneum*. *Soil Biology & Biochemistry* 11: 469–473
- Smith S.E., Facelli E., Pope S., Smith F.A. (2010).** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326: 3–20
- Smith S.E., Jakobsen I. Gronlund M., Smith F.A. (2011).** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorous uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology* 156: 1050–1057
- Smith S.E., Read D.J. (2008).** *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic, London
- Soberon M.J., Martinez del Rio C. (1985).** Cheating and taking advantage in mutualistic symbiosis. In Boucher DH, ed. *The Biology of Mutualism*. London: Croom Helm, pp. 192–216
- Spanu P.D. (2006).** Why do some fungi give up their freedom and become obligate dependants on their host? *New Phytologist* 171: 447–450
- Spokes J.R., Mac Donald R.M., Hayman D.S. (1981).** Effects of protection chemicals on vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Pesticide Science* 12: 346–350

- Stammler G., Carstensen M., Koch A., Semar M., Strobel D., Schlehuber S. (2008).** Frequency of different CYP51-halotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and field-efficacy. *Crop Protection* 27: 1448–1456
- Stammler H., Semar G. (2011).** Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bull* 49: 149–155
- Stanis V.F., Jones A.L. (1985).** Reduced sensitivity to sterol inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 75: 1098–1101
- Steffens W., Führ F., Kraus P., Scheinpflug H. (1982).** Aufnahme und Verteilung von Baytan in Sommergerste und Sommerweizen nach Saatgutbehandlung. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 35: 171–188
- Steinkellner S., Lenzemo V., Khaosaad I., Toussaint J.-P., Vierheilig H. (2007).** Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules* 12: 1290–1306
- Strullu D.G., Romand C. (1986).** Methodes d'obtention d'endomycorrhizes a vesicules et arbuscules en conditions axeniques. *Comptes rendus de l'Académie des sciences* (303): 245–250.
- Stubblefield S.P., Taylor T.N., Trappe J.M. (1987).** Fossil mycorrhizae: a case for symbiosis. *Science* 237: 59–60
- Sugavanam V. (1994).** Effect of fungicides on Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and nodulation in Groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 48 (3): 285–293
- Sukarno N., Smith S.E., Scott E.S. (1996).** The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 25: 139–147
- Sukul P., Spiteller M. (2000).** Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism and analytical methods. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 164: 1–26
- Suty-Heinze A., Dutzmann S. (2004).** *Fusarium* head blight: an additional strength of Prothioconazole. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 57 (2): 265–282
- Taiz L., Zeiger E. (2000).** *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin
- Tamasloukht M., Sejalon-Delmas N., Kluever A., Jauneau A., Roux C., Bécard G., Franken P. (2003).** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* 131: 1468–1478
- Thielert W. (1984).** Aufnahme und Nachlieferung von [benzolring-U-14C]Triadimenol über die Karyopse und aus den Beizhöfen nach Saatgutbeizung von Wintergerste und Winterweizen mit einer Trockenbeizformulierung. Dissertation, Universität Bonn, Berichte der Kernforschungsanlage Jülich Nr. 1958
- Thielert W., Steffens W., Führ F., Kuck K.H., Scheinpflug H. (1986).** Aufnahme und Nachlieferung von [benzolring-U-14C]Triadimenol aus den Beizhöfen von Wintergerste und Winterweizen nach Saatgutbehandlung. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 39: 97–187
- Thompson J.P. (1987).** Decline of vesicular-arbuscular mycorrhiza in long fallow disorder of field crops and its expression in phosphorous deficiency of sunflower. *Australian Journal of Agricultural Research* 38: 847–867
- Tisdall J.M., Oades J.M. (1982).** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science* 33: 141–163
- Trappe J.M., Molina R., Castellano M. (1984).** Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Annual Reviews of Phytopathology* 22: 331–359

- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. (1986).** Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, pp. 217–221
- Trzaskos J., Kawata S., Gaylor J.L. (1986a).** Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 261: 14651–14657
- Trzaskos J.M., Bowen W.D., Shafiee A., Fischer R.T., Gaylor J.L. (1984).** Cytochrome P-450-dependent oxidation of lanosterol in cholesterol biosynthesis. Microsomal electron transport and C-32 demethylation. *Journal of Biological Chemistry* 259: 13402–13412
- Trzaskos J.M., Fischer R.T., Favata M.F. (1986b).** Mechanistic studies of lanosterol C-32 demethylation. Conditions which promotes oxysterol intermediate accumulation during the demethylation process. *Journal of Biological Chemistry* 261: 16937–16942
- Vaidya G.S., Shrestha K., Khadge B.R., Johnson N.C., Wallander H. (2007).** Study of Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in addition with different organic matter in different seasons of kavre district (central Nepal). *Scientific World* 5 (5): 75–80
- van Aarle I.M., Olsson P.A., Söderström B. (2002).** Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytologist* 155: 173–182
- Van d. Kerk G.J.M. (1973).** Chemical and Biochemical Aspects of systemic fungicides. *EPPO Bulletin* Vol 2 (19): 5-21
- Valkenburg v.W., Sugavanam B., Khetan S.K. (1998).** *Pesticide Formulation: Recent Developments and Their Applications in Developing Countries.* Dekker Verlag, New York, 1973
- Venedikian N., Chiochio V., Martinez A., Menendez A., Ocampo J.A., Godeas A. (1999).** Influence of the fungicides carbendazim and chlorothalonil on spore germination, arbuscular mycorrhizal colonisation and growth of soybean plants. *Agrochemica*, Vol XLIII N. 3–4
- Viera A., Gleen M.G. (1990).** DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* 82: 263–267
- Vigo C., Norman J.R., Hooker J.E. (2000).** Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology* 49: 509–514
- von Alten H., Lindemann A., Schönbeck F. (1993).** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* 2: 167–173
- Wang B., Qui Y.L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16: 299–363
- Weete J.D. (1989).** Structure and Function of Sterols in Fungi. *Advances in Lipid Research* (23): 115–167
- Weete J.D., Kelley W.D. (1977).** Fatty Acids and Sterols of *Cronartium fusiforme* Basidiospores. *Lipids* (12): 398–401
- Weissenhorn I., Mench M., Leyval C. (1995).** Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (3): 287–296
- Witzenberger A., Hack H., Van den Boom T. (1989).** Erläuterungen zum BBCH Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides – mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen* 41: 384-388
- Wong F.P., Wilcox W.F. (2001).** Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb and metalaxyl against *Plasmopara viticola*. *Plant Disease* 85: 649–656



- Wright K. M., Prior D. A. M., Oparka K. J. (1994).** Observations on the accumulation of five xenobiotic chemicals in phloem versus parenchyma tissues of celery. *Pesticide Science* 42: 17–24
- Yoshida Y., Aoyama Y. (1984).** Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. I. Purification and spectral properties. *Journal of Biological Chemistry* 259: 1655–1660
- Ypema H.L., Gold R.E. (1999).** Kresoxim-methyl: Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83: 4–19
- Yu L., Zhang W., Wang L., Yang J., Liu T., Peng J., Leng W., Chen L., Li R., Jin Q. (2007).** Transcriptional Profiles of the Response to Ketoconazole and Amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 144–153
- Zhang F., Hamel C., Kianmehr H., Smith D.L. (1995).** Root-zone temperature and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Vesicular arbuscular mycorrhizae: development and interactions with the nitrogen fixing symbiosis. *Environmental and Experimental Botany* 35: 287–298
- Zhang Y., Lamm R., Pilonel C., Lam S., Xu J.-R. (2002).** Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* os-2 Gene Encodes a HOG1 Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue. *Applied Environmental Microbiology* 68(2): 532–538
- Zhu X.C., Song F.B., Liu S.Q. (2011).** Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on photosynthesis and water status of maize under high temperature stress. *Plant Soil* 346: 189–199
- Zocco D., Fontaine J., Lozanova E., Renard L., Bivort C., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Declerck S. (2008).** Influence of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* 112: 592–601
- Zocco D., Van Aarle I.M., Oger E., Lanfranco L., Declerck S. (2010).** Fenpropimorph and fenhexamid impact phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21 (5): 363–374

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Stammbaum der Pilze (persönliche Mitteilung Tietjen, 2009) .....	3
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung der Ausbildung einer arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose. S: Sporen, eh: extrazelluläre Hyphen, ih: intraradikale Hyphen, V: Vesikel, Arb: Arbuskeln, EP: Epidermis, C: Cortex, En: Endodermis, Z: Zentralzylinder; (Barker <i>et al.</i> , 1998) .....	6
<b>Abb. 3:</b> Lichtmikroskop-Aufnahmen von Gerstenwurzeln kolonisiert mit <i>Glomus intraradices</i> . ih: intraradikale Hyphen, V: Vesikel, Arb: Arbuskeln, Z: Zentralzylinder; A) Intraradikale Hyphen; B) Vesikel; C) Arbuskeln; (Färbung der pilzlichen Strukturen mit Trypanblau) .....	6
<b>Abb. 4:</b> A) Schematische Darstellung einer Arbuskel in der Pflanzenzelle. PAS: Periarbuskulärer Raum; PAM: pflanzliche Periarbuskuläre Membran (Parniske, 2008); B) Lichtmikroskop-Aufnahme einer Chicorée-Wurzel im Längsschnitt. Arb: Arbuskel; ih: intraradikale Hyphe; C-D) Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahme einer Chicorée-Wurzel im Querschnitt. Arb: Arbuskel .....	7
<b>Abb. 5:</b> Indikationen der Saatgutbehandlung (Anonym, 2013).....	13
<b>Abb. 6:</b> Mit Wirkstoff belastete Fläche (bezogen auf 1 ha Landfläche) bei verschiedenen Applikationstechniken (Puhl & Terhardt) .....	14
<b>Abb. 7:</b> Postulierter Sterolbiosynthese-Weg in <i>Glomus intraradices</i> (Grandmougin-Ferjani <i>et al.</i> 2005) .....	15
<b>Abb. 8:</b> Ausschnitt aus der Sterolbiosynthese von Pilzen am Wirkort der Azol-Fungizide (oxidative Entfernung der 14- $\alpha$ -Methylgruppe des Eburicol katalysiert durch die C14-Demethylase) (persönliche Mitteilung Tietjen, 2012) .....	17
<b>Abb. 9:</b> Bindung von Tebuconazol (blau) an das Fe-Atom des Häm im CYP51-Protein (rot) (persönliche Mitteilung Tietjen, 2012) .....	17
<b>Abb. 10:</b> A) Belegung der 24 Well Platte mit M-Medium als Kontrolle (+) und vier Wirkstoffkonzentrationen ( $10^{-4}$ M, $10^{-5}$ M, $10^{-6}$ M, $10^{-7}$ M); B) Stereomikroskop-Aufnahme gekeimter <i>Glomus intraradices</i> Sporen in 10-facher Vergrößerung .....	28
<b>Abb. 11:</b> A) Belegung der 6 Well Platte mit unbehandeltem und behandeltem Saatgut; B) Position des Saatguts und der Sporen von <i>Glomus intraradices</i> im M-Medium.....	29
<b>Abb. 12:</b> Schematische Darstellung der Etablierung einer monoxenischen Wurzelkultur von transformierten Chicorée-Wurzeln mit <i>Glomus intraradices</i> (Re-Assoziation) .....	30
<b>Abb. 13:</b> A) Gerstensaatzgut (unbehandelt und mit Wirkstoff behandelt) in Mischbechern nach der Saatgutbehandlung; B) Auslegen des Saatguts mit der Pinzette in das Sand-Perlite-Gemisch in Rosentöpfe; C) Mit Substrat, Inokulum und Saatgut gefüllte Rosentöpfe; D) Übersicht der Verteilung der Rosentöpfe in der Gewächshauskammer.....	32
<b>Abb. 14:</b> Aussaatreihen der Sommergerstensorte „Beatrix“ in Großcontainern auf Ackererde .....	33
<b>Abb. 15:</b> Lokalisierung der Boden- und Wurzelprobenentnahme aus dem Großcontainer mit einem Blumenzwiebelpflanzer am Beispiel zwei Wochen alter Gerstenpflanzen.....	34
<b>Abb. 16:</b> A) Siebkaskade mit den Maschenweiten 1 mm, 30 $\mu$ m und 63 $\mu$ m zum Auswaschen von arbuskulären Mykorrhiza-Sporen aus Bodenproben; B) Schematische Darstellung eines Zentrifugenröhrchens nach Dichtegradienten-Zentrifugation mit Verteilung der AM-Sporen in der Interphase .....	35
<b>Abb. 17:</b> Schematische Darstellung der Gerstenwurzelprobenentnahme zur mikroskopischen Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades mit <i>Glomus intraradices</i> (pro Wiederholung und Variante 135 Wurzelstücke á 1 cm Länge).....	37

<b>Abb. 18:</b> Einteilung der Mykorrhizierung in vier Intensitätsklassen an acht Wochen alten Gerstenwurzeln, inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> (200-fache Vergrößerung; Färbung pilzlicher Strukturen mit Trypanblau)	38
<b>Abb. 19:</b> cDNA-Sequenz von <i>GintERG11</i> mit Start-Codon (ATG) und Stop-Codon (TAG) (blau: nicht kodierende Sequenz; rot: kodierende Sequenz)	41
<b>Abb. 20:</b> Typischer Amplifikationsverlauf der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion	44
<b>Abb. 21:</b> pYES2-Vektor (Invitrogen GmbH; Deutschland)	46
<b>Abb. 22:</b> Schematischer Vergleich der <i>ERG11</i> -DNA-Sequenz der Wildtyp-Hefe <i>S.cerevisiae</i> und dem mutierten Hefestamm YUG37:: <i>ERG11</i>	47
<b>Abb. 23:</b> Keimfähigkeit (%) von <i>Glomus intraradices</i> Sporen auf artifiziellem Nährmedium (M-Medium) mit und ohne Zugabe eines Strigolakton-Analogs (GR24) über einen Zeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen einer Sporencharge; n=9)	51
<b>Abb. 24:</b> A) Dosis-Wirkungskurve von Ipconazol auf die Sporenkeimung von <i>Glomus intraradices</i> mit I <sub>50</sub> -Wert; B) Einfluss der Fungizide auf die Sporenkeimung. Endkonzentration der Wirkstoffe im Nährmedium; I <sub>50</sub> -Werte; (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchseinheiten)	52
<b>Abb. 25:</b> Auswertung der Vitalität von <i>Glomus intraradices</i> Sporen nach der Inkubation in wirkstofffreiem Medium; (MTT-Färbung: Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid; vitale Sporen: pink bis dunkelrot; tote Sporen: weiß bis gelb gefärbt)	53
<b>Abb. 26:</b> Keimfähigkeit von zuvor unter Fungizideinfluss gehemmten <i>Glomus intraradices</i> Sporen auf wirkstofffreiem M-Medium nach 7 Inkubationstagen (Fludioxonil, Thiram; * signifikanter Unterschied zur Kontrolle M-Medium; One Way RM ANOVA on ranks; p>0,05; n=10)	54
<b>Abb. 27:</b> Auswertung zur Bestimmung der Keimschlauchlänge von <i>Glomus intraradices</i> auf wirkstofffreiem M-Medium: identische Spore am 3. und 28. Tag nach Versuchsbeginn	55
<b>Abb. 28:</b> Mikroskopie-Aufnahmen einer 6 Wochen alten monoxenischen Wurzelkultur von Chicorée-Wurzeln und <i>Glomus intraradices</i> ; 1) Übersicht Dual-Kompartiment-Platte (RC: root compartment, FC: fungal compartment); 2) Nahaufnahme der Trennwand mit in das pilzliche Kompartiment wachsender Hyphe; 3,4) Nahaufnahme der mit <i>Glomus intraradices</i> kolonisierten Wurzeln	56
<b>Abb. 29:</b> Bestimmung der Vitalität des extraradikalen Myzels von <i>Glomus intraradices</i> mittels NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumsalz) nach 48h Inkubation in wirkstofffreiem Nährmedium (blau: Aktivität der Succinat-Dehydrogenase; keine Färbung: keine Aktivität)	59
<b>Abb. 30:</b> A–C) Lichtmikroskop-Aufnahme von Semidünnschnitten von Chicorée-Wurzeln im Querschnitt kolonisiert mit <i>Glomus intraradices</i> im Wurzelkultur-System; A) Übersicht des Wurzelquerschnittes; B) Wurzeln unbehandelt und mit 30 ppm Tebuconazol behandelt. (ih: intraradikale Hyphe; Arb: Arbuskel); C) Transmissionslektronenmikroskop-Aufnahmen einer Arbuskel im Querschnitt	60
<b>Abb. 31:</b> Zeitschema der Fungizidapplikation und Erntezeitpunkte	64
<b>Abb. 32:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenpflanzen inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> mit Applikation der Wirkstoffe (0,5 ppm, 5 ppm) 3 Wochen und 5 Wochen nach Aussaat (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-Test, p<0,05; n=9)	65
<b>Abb. 33:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln (unbehandelt, Saatgutbehandlung mit NMP) inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> im jahreszeitlichen Verlauf (Februar bis August 2010) (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Holm-Sidak, P<0,05; n=9)	69
<b>Abb. 34:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Triadimenol, Prothioconazol) und NMP (drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche; gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-test P<0,05; n=9)	71

<b>Abb. 35:</b> Arbuskeln in acht Wochen alten Gerstenwurzeln (unbehandelt) inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> (200-fache Vergrößerung, Färbung der pilzlichen Strukturen mit Trypanblau).....	72
<b>Abb. 36:</b> A) Mykorrhizierungsgrad (%) in drei Abschnitten acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> (n=9; Mittelwerte mit Standardabweichung als Fehlerbalken); B) Aufteilung einer acht Wochen alten Gerstenwurzel in drei gleichmäßige Abschnitte .....	72
<b>Abb. 37:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparat) (gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Tukey-Test, P<0,05; n=9).....	74
<b>Abb. 38:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung (NMP, Prothioconazol, Redigo FS 100, Redigo FS 0) (Mittelwert eines repräsentativen Versuches mit Standardabweichung; gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied; One Way RM ANOVA on Ranks, Holm-Sidak, P<0,05; n=9) .....	75
<b>Abb. 39:</b> A) Theoretische Wirkstoffkonzentration von Prothioconazol in zunehmender Entfernung vom Saatkorn im Gefäßexperiment unter Gewächshausbedingungen (insgesamt waren fünf behandelte Saatkörner pro Pflanzgefäß vorhanden). B) Theoretische Wirkstoffkonzentration (-log M) im Sand-Perlite-Gemisch in zunehmender Entfernung vom behandelten Saatkorn aus .....	80
<b>Abb. 40:</b> <i>ERG11</i> -Aminosäuresequenz-Alignment (ClustalW2) und Einteilung hochkonservierter Bereiche in Blöcke (A–H); (rote Buchstaben: 90 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen allen Organismen; blaue Buchstaben: 50 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen allen Organismen; letzte Zeile: Sequenz aus der Mehrheit der identischen Aminosäuren in einer Spalte) .....	82
<b>Abb. 41:</b> Maximum-Likelihood-Stammbaum basierend auf <i>ERG11</i> -Gensequenzen (JTT matrix based model; MEGA5).....	83
<b>Abb. 42:</b> Schematischer Vergleich der <i>ERG11</i> -DNA-Sequenz der Wildtyp-Hefe <i>S.cerevisiae</i> und dem mutierten Hefestamm YUG37:: <i>ERG11</i> .....	84
<b>Abb. 43:</b> Schematische Darstellung der tetracyclinabhängigen <i>ERG11</i> -Genregulation im Hefestamm YUG37:: <i>ERG11</i> .....	84
<b>Abb. 44:</b> Schematische Darstellung der Transformation (Lithium-Acetat-Methode) des p <i>GintERG11</i> -Konstrukts in den Hefestamm YUG37:: <i>ERG11</i> mit anschließender Selektion auf Minimalmedium ohne Uracil .....	85
<b>Abb. 45:</b> Schematische Darstellung des Wachstumsverhaltens der Wildtyp-Hefe und der transformierten Hefestämme YUG37:: <i>ERG11</i> auf SD-Medium in der Ab- oder Anwesenheit von Tetracyclin .....	86
<b>Abb. 46:</b> Zeitschema der Fungizidapplikation und PCR-Reaktionen .....	87
<b>Abb. 47:</b> Relative Expression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) von <i>GintERG11</i> des extraradikalen Myzels nach der Behandlung mit Aceton und Fungiziden (Tebuconazol, Prothioconazol) ( $\Delta Ct = Ct\text{-Wert } GintERG11 - Ct\text{-Wert } Ef-1-\alpha$ ).....	88
<b>Abb. 48:</b> <i>ERG11</i> -Aminosäuresequenz-Alignment (ClustalW2) ausgewählter Pilze mit Markierung der typischen Azol-Fungizid-Resistenzstellen aufgrund von Aminosäureaustausch (gelber Pfeil: Position in der Sequenz, an der ein Austausch der Aminosäure zur Resistenz gegenüber Azol-Fungiziden führt) .....	93
<b>Abb. 49:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>Glomus intraradices</i> und Zeitpunkte der Fungizid-Applikation .....	95

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> In der Arbeit verwendete Fungizide .....	11
<b>Tab. 2:</b> Wirkorte der Sterolbiosynthese-Inhibitoren (Hallmann <i>et al.</i> , 2007) .....	16
<b>Tab. 3:</b> Zusammenfassung von publizierten Ergebnissen zum Einfluss von Fungiziden auf arbuskuläre Mykorrhizapilze .....	18
<b>Tab. 4:</b> Fungizid-Aufwandmengen (g a.i./dt) für die Saatgutbehandlung von Gerste .....	22
<b>Tab. 5:</b> Nährstoffkonzentration des M-Mediums zur <i>in vitro</i> Kultivierung von Chicorée-Wurzelkulturen und <i>Glomus intraradices</i> Sporen (Declerck <i>et al.</i> , 1998, modifiziert nach Strullu & Romand, 1986) .....	24
<b>Tab. 6:</b> Nährstoffversorgung der Gerstenpflanzen in Gewächshausversuchen mit Hoagland-Lösung (modifiziert nach Arnon & Hoagland, 1940) .....	27
<b>Tab. 7:</b> Endkonzentration (ppm) der Wirkstoffe im Nährmedium (M-Medium) .....	28
<b>Tab. 8:</b> Boniturschema zur Beschreibung der analysierten Wurzelstücke .....	38
<b>Tab. 9:</b> Spezifische Primersequenzen und ihre Annealingtemperaturen .....	41
<b>Tab. 10:</b> PCR-Reaktionsansatz .....	43
<b>Tab. 11:</b> qPCR Reaktionsansatz zur Quantifizierung von <i>GintERG11</i> .....	45
<b>Tab. 12:</b> Verwendete Software .....	49
<b>Tab. 13:</b> Relative Sporenkeimrate und Sporenvitalität (%) der unter Fungizideinfluss nicht ausgekeimten Sporen (Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchseinheiten) .....	53
<b>Tab. 14:</b> Sporenanzahl von <i>Glomus intraradices</i> im Pilzkompartiment des Wurzelkultur-Systems in Ab- bzw. Anwesenheit von Lösungsmittel und Wirkstoff .....	58
<b>Tab. 15:</b> Relative Sporenkeimung (%) von <i>Glomus intraradices</i> nach viertägiger Inkubation auf M-Medium in der Anwesenheit eines mit Wirkstoff behandelten Saatguts (Entfernung der Sporen vom Saatkorn: 1 cm) .....	62
<b>Tab. 16:</b> Aufwandmenge (g a.i./dt; µg a.i./Saatkorn) zur Saatgutbehandlung von Gerste und Versuchsansatzzeitpunkte der Gewächshausuntersuchungen .....	66
<b>Tab. 17:</b> Wurzelparameter acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden .....	67
<b>Tab. 18:</b> Entwicklung des Mykorrhizierungsgrades (%) von Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchseinheiten mit Standardabweichung ±) .....	68
<b>Tab. 19:</b> Relativer Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden .....	70
<b>Tab. 20:</b> Relativer und absoluter Mykorrhizierungsgrad (%) acht Wochen alter Gerstenwurzeln inokuliert mit <i>Glomus intraradices</i> in drei verschiedenen Wurzelabschnitten nach Saatgutbehandlung mit NMP, Triadimenol und Prothioconazol .....	73
<b>Tab. 21:</b> Witterungsverlauf in den Vegetationsperioden Sommer und Winter am Standort Monheim am Rhein .....	77

<b>Tab. 22:</b> Mykorrhizierungsgrad (%) von Gerstenwurzeln nach Anzucht in Ackererde unter Freilandbedingungen und Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparate) .....	78
<b>Tab. 23:</b> Anzahl der Mykorrhizasporien pro Liter Ackererde in Großcontainern unter Freilandbedingungen nach Saatgutbehandlung mit Fungiziden (Handelspräparate).....	79
<b>Tab. 24:</b> Vergleich der <i>Glomus intraradices-ERG11</i> -Aminosäuresequenz mit der Sequenz von <i>Mycosphaerella graminicola</i> sowie anderen Pilzen und Angabe der bekannten Azol-Resistenz-Mutationen von <i>Mycosphaerella graminicola</i> .....	90
<b>Tab. 25:</b> Zusammenfassung aller Ergebnisse .....	96

## Danksagung

Mein besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-W. Dehne vom Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz der Universität Bonn für die Überlassung des überaus interessanten und vielseitigen Themas sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen und den großen Freiraum, der mir bei der Durchführung der Arbeit gewährt wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. Jens Léon vom Institut für Pflanzenzüchtung der Universität Bonn möchte ich mich ganz herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Dr. Klaus Tietjen von der Bayer CropScience AG danke ich besonders für die intensive wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie seine unermüdliche Bereitschaft zur Beantwortung von Fragen und stets gewährte Diskussionsbereitschaft. Ganz herzlich bedanke ich mich bei ihm für die kritische Durchsicht der Arbeit und die aufmunternden Worte.

Für ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die vielfältigen Anregungen und vielen Vorschläge während meiner gesamten Tätigkeit in der Abteilung „Research & Development Disease Control Monheim“ der Bayer CropScience AG gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Daniela Portz. Insbesondere bedanke ich mich für all die unterstützenden Worte sowie die abwechslungsreichen Gespräche zwischendurch.

Mein Dank gilt der Bayer CropScience AG für die finanzielle Unterstützung des Projektes sowie die Möglichkeit der praktischen Versuchsdurchführung in der Abteilung „Research & Development Disease Control“ in Monheim am Rhein. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Anne Suty-Heinze und Frau Isolde Häuser-Hahn, die mir durch ihr Vertrauen und ihre Unterstützung diesen Weg geebnet haben.

Für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe danke ich ganz herzlich Prof. Paola Bonfante und Prof. Luisa Lanfranco aus Turin. Für die sehr gute Betreuung, die vielen Vorschläge und hilfreichen Diskussionen zu meiner Arbeit bin ich sehr dankbar. Ein besonderer Dank gilt Valentina Fiorilli. Ferner danke ich Mara, Giulia, Veronica und Claudia sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung im Labor sowie die spannende und unvergessliche Zeit in der wunderbaren Stadt. Grazie mille!

Für das Bereitstellen des Hefestammes YUG37::*ERG11* danke ich Herrn Prof. Dr. Steven Kelly von der Universität Swansea in England.

Herrn PD Dr. Joachim Hamacher sowie Frau Inge Neukirchen vom Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz der Universität Bonn möchte ich ganz herzlich für die Erstellung der histologischen Präparate und elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

Ein ganz großer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung „Research & Development Disease Control Monheim“ der Bayer CropScience AG für ihre stets zuverlässige Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. Danke an alle „Portzis“ für eure Unterstützung und die schönen Zeiten außerhalb des Labors. Ganz besonders danken möchte ich Ute Kaliebe, die mich tatkräftig und zuverlässig bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat. Ebenso danke ich Britta Kunze für ihre vielfältigen Anregungen und ihre Zeit und Mühe, die sie in die Korrektur meiner Arbeit investiert hat. Vielen Dank auch für die seelische Unterstützung und die offenen Ohren. Wolfgang und Ute danke ich ganz besonders für ihre moralische und motivierende Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Nicht zu vergessen sind natürlich auch Anja, Dietmar, Mario, Gisela, die „kleine“ Ute, Kathy, Torsten, Ulf, Simone, Gabi und Anna, die guten Seelen, sowie die „Feld-Jungs“ Sven, Roland und Ralf, die mich alle auf unterschiedliche Weise immer wieder motiviert und unterstützt haben. Un grand merci aussi á Arnaud!

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und Freunden für die liebevolle Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für alles!

Unschätzbare Dank gilt meinem Freund Gabriel, der mir so manchen Stein aus dem Weg geräumt hat.



# Erklärung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Abteilung „Research & Development Disease Control Monheim“ der Bayer CropScience AG durchgeführt. Ferner wurde ein Teil der praktischen Untersuchungen am „Dipartimento di Biologia Vegetale“ der Universität Turin in Italien durchgeführt.

Ich versichere, dass ich die Arbeit: „Untersuchungen zur Wirkung von Fungiziden auf den arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus intraradices*“ selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht wurde.

Leverkusen, den 15.08.2013

---

Julia Wilde