

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
(Direktor: Prof. Dr. Markus Rodehutschord)  
der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

**„Analytische Untersuchungen  
zum Einfluss der Mykorrhizierung auf Ertrag,  
Inhaltsstoffzusammensetzung und Pathogentoleranz  
von Heil- und Gewürzpflanzen“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von  
Diplom-Ökotrophologin (FH)  
Jana Richter

geb. am 30.12.1977  
in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: Prof. Dr. habil. oec. troph. K. Eder  
Prof. Dr. rer. nat. I. Schellenberg  
PD Dr. H. Baltruschat

Verteidigung am: 29. Januar 2007

Halle/Saale 2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000011495**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011495>]

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis September 2006 unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Ingo Schellenberg am Institute of Bioanalytical Sciences (IBAS) des Center of Life Sciences der Hochschule Anhalt (FH) angefertigt.

## Danksagung

Herrn Prof. I. Schellenberg danke ich sehr herzlich für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit, sein ständiges Interesse und für wertvolle Anregungen in zahlreichen Gesprächen.

Herrn Prof. K. Eder und Frau Prof. G. Stangl möchte ich meinen Dank für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit und ihre hilfreiche Unterstützung aussprechen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. H. Baltruschat für die Übernahme der Gutachterrolle bedanken. Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. H. Baltruschat für die Unterstützung bei den Messungen von Enzymen und Antioxidantien am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (IPAZ) der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie für die wertvollen Anregungen zur Interpretation der Ergebnisse.

Herrn M. Stützer und den Mitarbeitern der AMykor GmbH danke ich für die Durchführung der Gewächshausversuche, die Anzucht und Bereitstellung der Mykorrhiza-Inokula sowie die Wurzeluntersuchungen zum Mykorrhizierungsgrad.

Mein Dank gilt Frau Dr. I. Reichardt, Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau (LLG), Bernburg, für die Durchführung der Feldversuche.

Bei Frau D. Franz, Hochschule Anhalt, Institute of Bioanalytical Sciences (IBAS), Bernburg, möchte ich mich für die Bestimmung der Hypericingehalte in Johanniskraut bedanken.

Herrn Dr. D. Waidelich, Applied Biosystems, Darmstadt, danke ich für die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF/TOF MS.

Bei Frau Dr. U. Gärber, Biologische Bundesanstalt (BBA), Kleinmachnow, möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung des Pathogen-Inokulums *Colletotrichum cf. gloeosporioides* bedanken.

Für die Bereitstellung von Johanniskrautsaatgut der „anfälligen Standardsorte“ bedanke ich mich bei Frau Dr. U. Kästner vom Institut für landwirtschaftliche Kulturen der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Quedlinburg.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Schmidt für die präzise und gewissenhafte Durchführung der 2-D-Elektrophoresen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Zielstellung</b> .....	<b>3</b>
<b>3 Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
3.1 Heil- und Gewürzpflanzen .....	5
3.2 Wertgebende Inhaltsstoffe .....	6
3.2.1 Hypericinverbindungen des Johanniskrauts.....	6
3.2.2 Ätherische Öle von Majoran und Thymian .....	7
3.3 Arbuskuläre Mykorrhiza.....	10
3.3.1 Formen, Aufbau und Wirkungen der Mykorrhiza.....	10
3.3.2 Mykorrhiza bei Heil- und Gewürzpflanzen.....	11
3.4 Pflanzliche Abwehr und Einfluss der Mykorrhizierung .....	14
3.4.1 Abwehrmechanismen der Pflanze .....	14
3.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Antioxidatives System.....	15
3.4.3 Einflüsse von Pathogenbefall und Mykorrhizierung auf pflanzliche Abwehrreaktionen .....	17
<b>4 Material</b> .....	<b>19</b>
4.1 Pflanzenmaterial.....	19
4.2 Mykorrhiza-Inokula .....	19
4.2.1 Kommerzielles Mykorrhiza-Inokulum .....	19
4.2.2 Mono-Inokula .....	19
4.2.3 Misch-Inokula .....	19
4.2.4 Autochthone Mykorrhiza-Mischungen .....	20
4.3 Pathogen-Inokulum .....	20
4.4 Referenzsubstanzen .....	20
4.4.1 Referenzsubstanzen für die Aromakomponentenbestimmung .....	20
4.4.2 Referenzsubstanzen für die Hypericinbestimmung.....	20
4.5 Chemikalien und Lösungsmittel .....	20
<b>5 Methoden</b> .....	<b>22</b>
5.1 Versuchsanordnungen und Durchführung .....	22
5.1.1 Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus.....	22
5.1.2 Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen .....	22
5.2 Ermittlung der Ernteerträge .....	23
5.2.1 Ermittlung von Ertragswerten der Gewächshausversuche .....	23
5.2.2 Ermittlung von Ertragswerten der Feldversuche .....	23
5.3 Ermittlung des Mykorrhizierungsgrades .....	24

5.3.1	Visualisierung von Mykorrhiza-Strukturen.....	24
5.3.2	Sporenisolierung .....	24
5.4	Bestimmung der Aromakomponenten.....	24
5.4.1	Probenvorbereitung.....	24
5.4.2	Wasserdampfdestillation der ätherischen Öle (WDD).....	24
5.4.3	Lösungsmittlextraktion der Aromakomponenten (LME) .....	25
5.4.4	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion der Aromakomponenten (ASE).....	25
5.4.5	Extraktion der Aromakomponenten mit überkritischem Kohlendioxid (SFE).....	25
5.4.6	Festphasenmikroextraktion der Aromakomponenten (SPME) .....	25
5.4.7	Gaschromatographische Bestimmung der Aromakomponenten.....	26
5.4.8	GC/MS zur Identifizierung der Aromakomponenten.....	26
5.5	Bestimmung der Hypericine aus Johanniskraut.....	26
5.5.1	Probenvorbereitung und Extraktion.....	27
5.5.2	Analytische Bestimmung der Hypericine.....	27
5.6	Bestimmung von Enzymen und Antioxidantien des Antioxidativen Systems und des Grades der Lipidperoxidation .....	27
5.6.1	Versuchsbeschreibung.....	27
5.6.2	Messung von Enzymen des Antioxidativen Systems.....	29
5.6.3	Messung von Antioxidantien des Antioxidativen Systems .....	30
5.6.4	Messung von Malondialdehyd als Parameter für die Lipidperoxidation .....	31
5.7	Detektion systemischer Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine mittels 2-D-Elektrophorese .....	32
5.7.1	Versuchsbeschreibung.....	32
5.7.2	Probenvorbereitung für die 2-D-Elektrophorese.....	32
5.7.3	Proteinbestimmung .....	33
5.7.4	Erste Dimension der 2-D-Elektrophorese: IEF .....	33
5.7.5	Zweite Dimension der 2-D-Elektrophorese: SDS-PAGE.....	33
5.7.6	Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele .....	34
5.7.7	Identifizierung von Proteinspots mittels MALDI-TOF/TOF MS.....	34
5.8	Deskriptive und auswertende Statistik, Ergebnisdarstellung .....	35
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
6.1	Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten .....	36
6.1.1	Vergleich von Extraktionsmethoden.....	36
6.1.2	Optimierung der SPME-Methode .....	41
6.1.2.1	Verwendung gefriergetrockneten bzw. frischen Pflanzenmaterials .....	42
6.1.2.2	Prüfung verschiedener Extraktionstemperaturen.....	43
6.1.2.3	Prüfung verschiedener Extraktionszeiten.....	44
6.1.2.4	Prüfung verschiedener Desorptionstemperaturen .....	45
6.1.2.5	Prüfung der Split- bzw. splitlosen Injektion und der Linergröße .....	45
6.1.2.6	Prüfung verschiedener Konditionierungszeiten.....	46
6.1.2.7	Mahlungsgrad des Pflanzenmaterials.....	46

6.1.2.8	Optimierte HS-SPME-Methode .....	46
6.2	Einflüsse der Mykorrhizierung auf Biomasse und Inhaltsstoffe.....	48
6.2.1	Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus.....	48
6.2.1.1	Thymian .....	49
6.2.1.2	Majoran.....	51
6.2.1.3	Johanniskraut .....	53
6.2.2	Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen .....	54
6.2.2.1	Thymian .....	55
6.2.2.2	Majoran.....	61
6.2.2.3	Johanniskraut .....	64
6.3	Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit <i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i> .....	68
6.3.1	Phänotypische Beurteilung der Schädigungen .....	68
6.3.2	Biomasseausbeuten in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Pathogenbefall .....	69
6.3.3	Ergebnisse der Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	70
6.3.3.1	Katalase-Aktivität .....	70
6.3.3.2	Ascorbat-Peroxidase-Aktivität .....	71
6.3.3.3	Monodehydroascorbat- und Dehydroascorbat-Reduktase- Aktivität .....	72
6.3.3.4	Glutathion-Reduktase-Aktivität .....	73
6.3.3.5	Glutathion-S-Transferase-Aktivität.....	74
6.3.4	Ergebnisse der Bestimmung von Antioxidantien.....	75
6.3.4.1	Ascorbinsäure.....	75
6.3.4.2	Glutathion .....	76
6.3.5	Ergebnisse der Bestimmung von Malondialdehyd als Parameter für die Lipidperoxidation .....	77
6.4	Aufbau und Optimierung einer 2-D-Elektrophorese-Methode.....	78
6.4.1	Aufarbeitung von Pflanzenmaterial für die 2-D-Elektrophorese .....	78
6.4.2	Lösen des gefällten Proteins .....	78
6.4.3	Rehydratisierung der IPG-Streifen .....	80
6.4.4	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	81
6.4.5	Äquilibrierung der IPG-Streifen .....	82
6.4.6	SDS-Elektrophorese .....	82
6.4.7	Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele .....	82
6.4.8	Optimierte 2-D-Elektrophorese-Methode .....	83
6.5	Systemische Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine .....	85
6.5.1	Majoran .....	85
6.5.2	Johanniskraut.....	87
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
7.1	Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten .....	92
7.1.1	Vergleich von Extraktionsmethoden.....	92
7.1.2	Optimierung der SPME-Methode .....	95

7.1.3	Schlussfolgerungen.....	97
7.2	Einflüsse der Mykorrhizierung auf Biomasse und Inhaltsstoffe.....	99
7.2.1	Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus.....	99
7.2.2	Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen.....	101
7.2.3	Schlussfolgerungen.....	104
7.3	Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit <i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i> .....	105
7.3.1	Katalase .....	106
7.3.2	Ascorbat-Zyklus .....	106
7.3.3	Glutathion-Zyklus .....	107
7.3.4	Lipidperoxidation .....	108
7.3.5	Schlussfolgerungen.....	109
7.4	Aufbau und Optimierung einer 2-D-Elektrophorese-Methode.....	110
7.4.1	Aufarbeitung von Pflanzenmaterial für die 2-D-Elektrophorese .....	110
7.4.2	Lösen des gefällten Proteins.....	111
7.4.3	Erste Dimension der 2-D-E: IEF.....	112
7.4.4	Zweite Dimension der 2-D-E: SDS-PAGE.....	114
7.4.5	Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele .....	115
7.4.6	Schlussfolgerungen.....	116
7.5	Systemische Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine .....	117
7.5.1	Regulation von an der Photosynthese beteiligten Enzymen.....	117
7.5.2	Regulation von stressrelevanten Enzymen.....	119
7.5.3	Regulation von Enzymen anderer Funktionen .....	121
7.5.4	Schlussfolgerungen.....	121
7.6	Fazit.....	122
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Summary .....</b>	<b>126</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Anlagenverzeichnis.....</b>	<b>XXIX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-D	zweidimensional
2-D-E	zweidimensionale Elektrophorese
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AMP	arbuskuläre Mykorrhizapilze
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APX	Ascorbat-Peroxidase
AsA	reduzierte Ascorbinsäure
ASE	Accelerated Solvent Extraction, Beschleunigte Lösungsmittelextraktion
ATP	Adenosintriphosphat
BAZ	Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Quedlinburg
BBA	Biologische Bundesanstalt, Kleinmachnow
C	Vernetzungsgrad im Acrylamidgel
CAT	Katalase
cf.	confer (lat.), vergleiche (ähnlich der genannten Art, aber nicht identisch)
Cfg	<i>Colletotrichum cf. gloeosporioides</i>
CoA	Coenzym A
Coll.	<i>Colletotrichum</i>
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
DAsA	oxidierte Ascorbinsäure
DAT	days after treatment, Tage nach der Behandlung
dest.	destilliert
DHAR	Dehydroascorbat-Reduktase
DTNB	5,5-Dithio-bis-(-2-nitro)benzoesäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
$\varepsilon$	molarer Absorptionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f.sp.	formae specialis (lat.), spezialisierte Form einer Erregerart auf eine/wenige Wirtspflanzen
FAH	Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V.
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
GC	Gaschromatographie
gloeosp.	<i>gloeosporioides</i>
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-rein	für die HPLC (Lösungsmittelqualität)
HS	Head Space, Dampfraum
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPAZ	Institut für Phytopathologie und Zoologie der Universität Gießen, Gießen
IPG	Immobilized pH gradient, Immobilisierter pH-Gradient
konv.	konventionell
LDL	low density lipoproteins, Lipoproteine niedriger Dichte
LJM	langjähriger Mittelwert (Klimadaten)
LJM, kum.	langjähriger Mittelwert, kumulativ (Klimadaten)

---

LLG	Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt, Bernburg
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
LME	Lösungsmittelextraktion
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
MDA	Malondialdehyd
MDHAR	Monodehydroascorbat-Reduktase
m-RNA	messenger-Ribonucleic Acid, Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl Versuchswiederholungen
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ökol.	ökologisch
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	per analysis, zur Analyse (Lösungsmittelqualität)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDA	Potato-Dextrose-Agar, Kartoffel-Dextrose-Agar
PDMS	Polydimethylsiloxan
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
POX	Peroxidase
PR	pathogenesis-related, mit der Pathogenese zusammenhängend
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RI	Retentionsindex
ROS	Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reversed Phase, Umkehrphase in der Chromatographie
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulphate, Natriumdodecylsulfat
SFE	Supercritical Fluid Extraction, Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten
SNA	synthetischer nährstoffarmer Agar
SOD	Superoxid-Dismutase
spec.	species, Arten
SPME	Solid Phase Microextraction, Festphasenmikroextraktion
SSL	Split/Splitlos-Injektor
SSP	Serial Spot Number, Software vergebene Spotnummer in PD Quest
ssp.	subspecies, Unterart
T	Acrylamidkonzentration im Acrylamidgel
TBA	2-Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of Flight, Flugzeit
VK	Variationskoeffizient, Relative Standardabweichung
WDD	Wasserdampfdestillation
WFR	Wiederfindungsrate

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Hypericine des Johanniskrauts .....	6
Abb. 2	Monoterpenkohlenwasserstoffe .....	7
Abb. 3	Oxygenierte Monoterpene.....	7
Abb. 4	Sesquiterpenkohlenwasserstoffe .....	8
Abb. 5	Oxygenierte Sesquiterpene.....	8
Abb. 6	Arbuskeln in mit AMykor <sup>®</sup> -Blättern mykorrhizierten Thymianwurzeln.....	10
Abb. 7	Ascorbat-Glutathion-Zyklus.....	16
Abb. 8	Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure zu nachweisbarem roten Farbstoff.....	31
Abb. 9	Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels WDD bzw. LME aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4) .....	37
Abb. 10	Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels LME, SFE bzw. ASE aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4) .....	38
Abb. 11	Gegenüberstellung der Chromatogramme einer gefriergetrockneten Majoranprobe nach WDD, SFE und ASE .....	38
Abb. 12	Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels WDD, LME bzw. SPME aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4) .....	39
Abb. 13	Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels verschiedener Extraktionsverfahren aus gefriergetrocknetem (g) bzw. frischem (f) Thymian extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4) .....	40
Abb. 14	Vergleich der Gaschromatogramme nach HS-SPME bzw. SFE einer gefriergetrockneten Majoranprobe .....	41
Abb. 15	Vergleich der ermittelten Peakflächen bei Verwendung von gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran bei der SPME (MW±SD, n=4) .....	42
Abb. 16	Vergleich der Peakflächen-Prozente von Terpinen-4-ol und Sabinenhydratacetat nach verschiedenen Extraktionsmethoden bei Verwendung von gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran bei der SPME (MW±SD, n=4) .....	43
Abb. 17	Vergleich der ermittelten Gesamtpeakflächen bei verschiedenen Extraktionstemperaturen bei der SPME (MW±SD, n=4) .....	43
Abb. 18	Vergleich der ermittelten Peakflächen-Prozente bei verschiedenen Extraktionstemperaturen bei der SPME (MW±SD, n=4) .....	44
Abb. 19	Vergleich der ermittelten Peakflächen-Prozente bei verschiedenen Extraktionszeiten bei der SPME, je zuzüglich 5 min Vorinkubation (MW±SD, n=4) .....	44
Abb. 20	Vergleich der ermittelten Peakflächen (absolut) bei verschiedenen Desorptionstemperaturen im Injektor nach der SPME (MW±SD, n=4) .....	45
Abb. 21	Vergleich der Gaschromatogramme nach splitloser bzw. Splitinjektion (1:20) bei der SPME/GC .....	45
Abb. 22	GC-Chromatogramm einer Majoranprobe nach der Optimierung des HS-SPME/GC-Verfahrens.....	47
Abb. 23	Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW±SD, n=3) .....	49
Abb. 24	Ätherische Ölgehalte nach WDD bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe) .....	50

Abb. 25	Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe) .....	50
Abb. 26	Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW±SD, n=3) .....	51
Abb. 27	Ätherische Ölgehalte nach WDD bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe) .....	52
Abb. 28	Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe) .....	52
Abb. 29	Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Johanniskraut (MW±SD, n=3) .....	53
Abb. 30	Hypericingehalte nach ASE/HPLC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Johanniskraut (MW±SD von vier analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe) .....	54
Abb. 31	Ernteerträge für den Thymiananbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamterträge, n=6) .....	56
Abb. 32	Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=6) .....	57
Abb. 33	Ernteerträge für den Thymiananbau 2004 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamterträge, n <sub>1</sub> =18 Kontrollen, n <sub>2</sub> =12 AMykor <sup>®</sup> 20 ml / lfd. m) .....	58
Abb. 34	Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2004 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n <sub>1</sub> =18 Kontrollen, n <sub>2</sub> =12 AMykor <sup>®</sup> 20 ml / lfd. m) .....	58
Abb. 35	Ernteerträge für den Thymiananbau 2005 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n <sub>1</sub> =30 Kontrollen, n <sub>2</sub> =15 AMykor <sup>®</sup> 20 ml / lfd. m, n <sub>3</sub> =15 AMykor <sup>®</sup> 40 ml / lfd. m) .....	59
Abb. 36	Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2005 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n <sub>1</sub> =30 Kontrollen, n <sub>2</sub> =15 AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m, n <sub>3</sub> =15 AMykor <sup>®</sup> 40 ml/lfd. m) .....	60
Abb. 37	Ernteerträge für den Majorananbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4) .....	62
Abb. 38	Ätherische Ölgehalte nach WDD für den Majorananbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4) .....	62
Abb. 39	Ernteerträge für den Johanniskrautanbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4) .....	64

Abb. 40	Hypericingehalte nach ASE/HPLC für den Johanniskrautanbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamtgehalte, n=4) .....	65
Abb. 41	Ernteerträge für den Johanniskrautanbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=6) .....	66
Abb. 42	Hypericingehalte nach ASE/HPLC für den Johanniskrautanbau 2003 in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung bei konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamtgehalte, n=6) .....	66
Abb. 43	Vergleich nicht mykorrhizierter Pflanzen (Bild links) und mykorrhizierter Pflanzen (Bild rechts) jeweils ohne (linke Pflanze) bzw. mit (rechte Pflanze) Erregerbeimpfung .....	68
Abb. 44	Biomasse (frisches Sprossgewicht in g/Topf) in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) 30 DAT (MW±SD, n=6).....	69
Abb. 45	Katalase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4).....	70
Abb. 46	Ascorbat-Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4).....	71
Abb. 47	Monodehydroascorbat-Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4) .....	72
Abb. 48	Glutathion-Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4).....	73
Abb. 49	Glutathion-S-Transferase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4).....	74
Abb. 50	Gehalte reduzierten (links) und oxidierten (rechts) Ascorbats in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4) .....	75
Abb. 51	Gehalte reduzierten (links) und oxidierten (rechts) Glutathions in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4) .....	76
Abb. 52	Malondialdehyd-Gehalte in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4).....	77
Abb. 53	2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit dem Ausgangspuffer zur Extraktion .....	79
Abb. 54	2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit dem optimierten Puffer zur Extraktion .....	79
Abb. 55	Coomassie gefärbtes 2-D-Gel bei 800 µg Proteinauftragung (Majoran).....	83
Abb. 56	Silber gefärbtes 2-D-Gel bei 150 µg Proteinauftragung (Majoran).....	83
Abb. 57	Flussschema der optimierten 2-D-Elektrophorese-Methode.....	84
Abb. 58	2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit der optimierten 2-D-E-Methode .....	84
Abb. 59	Lokalisation (rotes Kreuz) im 2-D-Mastergel und SSP-Nrn. der in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung in Majoran hoch- bzw. herunterregulierten Proteinspots.....	85
Abb. 60	Lokalisation (rotes Kreuz) im 2-D-Mastergel und SSP-Nrn. der in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung und/oder die Sorte in Johanniskraut hoch- bzw. herunterregulierten Proteinspots .....	88

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Allgemeine Versuchsparameter des Feldanbaus .....	23
Tab. 2	Versuchsplan zur Bestimmung des antioxidativen Status von Johanniskraut.....	28
Tab. 3	Lösungen für die Herstellung der Gradientengele .....	33
Tab. 4	Peakflächen-Prozente und Relative Standardabweichungen (VK) der aromagebenden Inhaltsstoffe von Majoran aus sieben Wiederholungsmessungen mittels HS-SPME/GC .....	47
Tab. 5	Mykorrhizierbarkeit von Thymian, Majoran und Johanniskraut mit verschiedenen AM-Inokula.....	48
Tab. 6	Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor <sup>®</sup> -Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Thymian .....	61
Tab. 7	Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor <sup>®</sup> -Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Majoran .....	63
Tab. 8	Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor <sup>®</sup> -Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Johanniskraut.....	67
Tab. 9	Ausgangs-Fokussierungsprogramm zur Optimierung der IEF .....	81
Tab. 10	Optimiertes Fokussierungsprogramm für Proteine von Majoran und Johanniskraut.....	81
Tab. 11	Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor <sup>®</sup> -Blähton-Einsatz in Majoran herauf- bzw. herunterregulierten Proteine .....	86
Tab. 12	Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor <sup>®</sup> -Blähton-Einsatz in beiden Johanniskrautsorten herunterregulierten Proteine <b>(a)</b> .....	89
Tab. 13	Identifizierung und detektierte Mengen der nicht durch AMykor <sup>®</sup> -Blähton-Einsatz aber in Abhängigkeit von der Johanniskrautsorte herauf- bzw. herunterregulierten Proteine <b>(b)</b> .....	90
Tab. 14	Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor <sup>®</sup> -Blähton-Einsatz nur in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrautes herauf- bzw. herunterregulierten Proteine <b>(c)</b> .....	91

## 1 Einleitung

Lebensmittel stellen für den Menschen mehr als nur eine biologische Notwendigkeit für das Überleben dar. Das Essen steht häufig im Mittelpunkt sozialer Interaktionen auf verschiedensten Ebenen: in der Familie, im Arbeits- und Berufsleben, zur Knüpfung und zur Pflege sozialer Kontakte oder auch bei Rendezvous. Lebensmittel können die verschiedensten psychologischen Funktionen auslösen und so als geschmacklicher Stimulus, Auslöser von Glücksgefühlen, gar als Aphrodisiakum oder aber Narkotikum fungieren, können einen ästhetischen Anreiz darstellen bzw. Abscheu und Ekel hervorrufen. Bis auf extreme Situationen - wie Hungersnöte oder schwerwiegende Krankheiten - ist die Fähigkeit der Lebensmittel diese menschlichen Forderungen zu erfüllen unabdingbar an die sensorischen Werte von Geschmack, Geruch und Textur gebunden. Unter anderem mit dieser Bedeutung der sensorischen Merkmale unserer Nahrungsmittel lässt sich die Verwendung einer Vielzahl unterschiedlichster Gewürze in der Nahrungszubereitung begründen. Gerade in den letzten Jahren haben auch in deutsche Küchen sowohl neuartige oder fremdländische Gewürze als auch wiederentdeckte heimische Gewürze Einzug gehalten.

Nicht nur die Beeinflussung des Geschmacks unserer Nahrung erfuhr besonders in der jüngsten Vergangenheit eine Renaissance, auch die Bedeutung der Lebensmittelinhaltsstoffe für unseren Ernährungs- und Gesundheitsstatus wurde und wird einer eingehenden Betrachtung unterzogen. Nachdem die Bedeutung der primären Inhaltsstoffe für die menschliche Ernährung weitestgehend geklärt ist, beschäftigt sich die Wissenschaft nun zunehmend mit den so genannten sekundären Lebensmittelinhaltsstoffen und ihren Einflüssen auf die Gesunderhaltung der Menschen. Auch in diesem Zusammenhang ist die Verwendung von Gewürzen oder Gewürzextrakten relevant. Zu den aromagebenden Substanzgruppen von Gewürzpflanzen zählen nicht selten auch Verbindungen, die neben ihren sensorischen Eigenschaften auch besondere gesundheitsfördernde Wirkungen besitzen. Hierzu zählen z.B. antioxidative, antimikrobielle, antikanzerogene oder cholesterinsenkende Eigenschaften. Antimikrobielle Inhaltsstoffe von Gewürzen haben auch eine Bedeutung in der Konservierung von Lebensmitteln. Ebenfalls von Interesse für die Beeinflussung des Gesundheitszustandes des Menschen sind Heilpflanzen, die aufgrund spezieller sekundärer Inhaltsstoffe direkte gesundheitsfördernde, prophylaktische oder gar heilende Wirkungen besitzen. Nicht selten finden die Pflanzenteile und Produkte einer Kultur sowohl im Gewürzbereich als auch in der pharmazeutischen Industrie Verwendung.

Vielseitige Einsatzmöglichkeiten ergeben sich z.B. für die Inhaltsstoffe des Thymians. Die frischen oder getrockneten oberirdischen Pflanzenteile werden als haushaltsübliche Gewürze eingesetzt. Die durch Destillation gewonnenen ätherischen Öle oder durch Extraktion gewonnenen Oleoresine finden in der Lebensmittelindustrie Gebrauch. Sowohl in Lebensmitteln als auch in der Medizin spielen die antimikrobiellen Eigenschaften der Inhaltsstoffe Thymol und Cavacrol eine bedeutende Rolle, wie z.B. zur Konservierung von Wurstwaren oder als Desinfektionsmittel in der Zahnmedizin. Im pharmazeutischen Sektor ist die Verwendung der Blätter und Blüten als Droge (*Thymi herba*) sowie des Thymianöls (*Thymi aetheroleum*) von Bedeutung. Als Qualitätsparameter von Thymian gilt der Gehalt an ätherischem Öl. Für Thymian sollte es in der Droge mindestens 1,2 % betragen, davon mindestens 0,5 % Thymol und Cavacrol. Für diese therapeutisch relevanten Inhaltsstoffe sind bronchospasmolytische, expektorierende und antibakterielle Wirkungen beschrieben. [BLUM, 1999; CZYGAN und HÄNSEL, 1993; GERHARDT, 1994; HÄNSEL und HÖLZL, 1996; HÄNSEL et al., 1999; ROTH und KORMANN, 1996]

Auch Majoran findet als Gewürz in Form der frischen oder getrockneten, gerebelten Blätter und Blüten Einsatz. In der Medizin setzt man Majoran in Form von Toniken, Bädern und Salben (Majoranbutter) als Stomachikum (appetit- und verdauungsanregend), Carminativum (blähungstreibend), Diuretikum (harntreibend) und Diaphoretikum (schweißtreibend) ein. Als qualitätsbestimmender Faktor wird auch in Majoran der Gehalt an ätherischem Öl definiert. Dabei sind mindestens 1 bis 1,2 % ätherisches Öl im Blatt gefordert, wovon der Gehalt an

cis-Sabinenhydrat über 25 % im Öl betragen sollte. [BLUM, 1999; GERHARDT, 1994; HÄNSEL et al., 1999; ROTH und KORMANN, 1996; TIETZ et al., 1991]

Zur Gruppe der reinen Heilpflanzen zählt z.B. das Johanniskraut, das aufgrund der beruhigenden, antidepressiven Wirkung seiner Inhaltsstoffe Hypericin und Pseudohypericin als Phytopharmaka Einsatz findet. Hier werden die frischen Blüten (*Hyperici flos recens*) oder das Kraut (*Hyperici herba*) sowie Zubereitungen, Tees oder Aufgüsse daraus bei verschiedenen psychischen Störungen und Erkrankungen, wie Ängsten, Nervosität, Depressionen, Schlafstörungen, Konzentrationsstörungen, Wechseljahresbeschwerden oder bei Wetterfühligkeit verwendet. Als Qualitätsparameter wird eine Extraktausbeute von mindestens 25 % angegeben mit einem Gehalt an Hypericinen von über 0,04 %. [HÄNSEL und HÖLZL, 1996; HÄNSEL et al., 1999; ROTH, 1990]

Neben dem erhöhten Bedarf an Kräutern und Gewürzen führen insbesondere auch das wachsende Gesundheitsbewusstsein und die fortschreitende Aufklärung über die gesundheitsfördernden Wirkungen sekundärer Inhaltsstoffe von Heil- und Gewürzpflanzen zu einer steigenden Nachfrage nach möglichst biologisch angebauten Produkten regionaler Herkunft. Eine Erhöhung der Anbaufläche erscheint sinnvoll, zumal 90 Prozent der in Deutschland verarbeiteten Sonderkulturen aus Importen gedeckt werden. Dabei stehen der wachsenden Nachfrage nach Heil- und Gewürzpflanzen und deren Produkten jedoch in vielen Fällen anbautechnische Schwierigkeiten, wie Nährstoffmangel, periodische Trockenheit oder Pathogenbefall, gegenüber.

Als biologischer Bodenhilfsstoff könnte der gezielte Einsatz arbuskulärer Mykorrhizapilze eine ganze Reihe von Anbauproblemen lösen. Unter Mykorrhiza wird die Symbiose von Pflanzen mit Bodenpilzen verstanden, wobei der Pilz mit seinen Pilzhyphen (Myzel) an der Pflanzenwurzel den Kontakt zwischen dem Boden, den Mikroorganismen und der Pflanze verbessert und durch sein weites Hyphennetz den Einzugsbereich der Pflanzenwurzel für die Nährstoffaufnahme aus dem Boden erweitert.

Die Bedeutung der Mykorrhiza für Wachstum und Entwicklung zahlreicher Nutzpflanzen beruht damit auf einer verbesserten Anpassung der Pflanzen an die vorherrschenden Standortbedingungen und einer erhöhten Toleranz der Pflanzen gegenüber Stressfaktoren, wie Nährstoffmangel und Trockenheit sowie gegenüber Pathogenen.

Dies führte seit einiger Zeit zu dem Bestreben, die Mykorrhizierung in der Landwirtschaft gezielter einzusetzen. An weit verbreiteten Kulturpflanzen, wie Weizen, Mais, Hirse, Gerste, Sojabohne oder Buschbohne konnten bereits Erfolge durch gezielte Inokulation mit arbuskulären Mykorrhizapilzen verzeichnet werden. Dabei führte die Mykorrhiza-Inokulation bei den genannten Pflanzen nicht nur zu höheren Erträgen, sondern es war außerdem eine verbesserte Pflanzengesundheit bei stark reduziertem Biozideinsatz zu verzeichnen.

Weiterhin sind auch Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Inhaltsstoffspektren der mykorrhizierten Kulturen beschrieben. Eine gezielte Beeinflussung der wertgebenden Inhaltsstoffe von Heil- und Gewürzpflanzen durch Mykorrhiza-Einsatz würde neben einer Ertragssteigerung somit gleichzeitig zur Ausbeuteerhöhung relevanter aromagebender oder gesundheitsfördernder Verbindungen führen.

## 2 Zielstellung

Zum Einfluss einer Mykorrhizierung auf Heil- und Gewürzpflanzen sind bisher kaum Ergebnisse bekannt. Im Rahmen der Promotion sollte daher die Untersuchung von Auswirkungen einer Mykorrhiza-Inokulation im Arznei- und Gewürzpflanzenanbau durchgeführt werden. Hierbei war insbesondere zu prüfen, ob durch die Inokulation mit arbuskulären Mykorrhizapilzen auch im Bereich des Heil- und Gewürzpflanzenanbaus Ertragssteigerungen, verbesserte Pflanzenqualitäten durch qualitative und quantitative Beeinflussung der wertgebenden Inhaltsstoffe sowie eine erhöhte Pflanzengesundheit erreicht werden können. Als Modellpflanzen wurden hierfür die Heil- und Gewürzpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut gewählt, da sie für den Anbau in Deutschland eine große Rolle spielen. Die Bedeutung dieser Pflanzen liegt in ihrem Einsatz im Gewürzbereich der Haushalte und der Lebensmittelindustrie sowie im Bereich der Phytopharmazeutika. Wie bereits geschildert ist hierfür der Gehalt ihrer wertgebenden Inhaltsstoffe, also der Hypericine im Falle von Johanniskraut (Einsatz als Heilpflanze) und der ätherischen Ölverbindungen im Falle von Majoran und Thymian (Einsatz als Heil- und Gewürzpflanzen) von besonderer Relevanz. Der Einfluss der Mykorrhizierung sollte für die genannten drei Modellpflanzen anhand der nachfolgend aufgeführten Parameter untersucht werden.

- Zunächst sollte sowohl in Gewächshaus- als auch in Feldversuchen der Einfluss einer Mykorrhizierung auf den Biomasseertrag der Pflanzen ermittelt werden.
- Daneben sollten gleichermaßen die Einflüsse auf die Pflanzenqualität und damit auf den Gehalt und die Zusammensetzung der wertgebenden Inhaltsstoffe bestimmt und bewertet werden. Für Johanniskraut waren hierfür die Hypericingehalte, für Majoran und Thymian die Gehalte und die Zusammensetzung der Aromakomponenten relevant. Während für die Bestimmung der Hypericine aus Johanniskraut eine bereits beschriebene Methode eingesetzt werden konnte, bestand für die Analytik der aromagebenden Inhaltsstoffe aus Majoran und Thymian noch Optimierungsbedarf. Voraussetzung für die Untersuchung der Inhaltsstoffspektren war deshalb zunächst der Aufbau und die Optimierung einer geeigneten Analysenmethode für Aromakomponenten aus Majoran und Thymian. Hierzu sollte insbesondere eine Gegenüberstellung der Wasserdampfdestillation (WDD) zu den Verfahren der einfachen Lösungsmittlextraktion (LME) sowie der Beschleunigten Lösungsmittlextraktion (ASE), der Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (SFE) sowie der Festphasenmikroextraktion (SPME) erfolgen und schließlich die vorteilhafteste Methode im Zusammenhang mit einer gaschromatographischen Bestimmung optimiert werden. Das optimierte Gesamtverfahren sollte dann eine weitgehend vollständige Extraktion relevanter Inhaltsstoffe gewährleisten, möglichst keine Umwandlungen genuiner Inhaltsstoffe hervorrufen und sich durch eine hohe Präzision und Routinesicherheit sowie gute Automatisierbarkeit auszeichnen.
- Um den Einfluss von arbuskulären Mykorrhizapilzen auf die Pflanzengesundheit in Heil- und Gewürzpflanzen zu ermitteln, sollte der antioxidative Status der Pflanzen am Beispiel des Johanniskrauts bei Befall mit dem Erreger der Johanniskrautwelke (*Colletotrichum cf. gloeosporioides*) untersucht werden. Dazu sollten die Aktivitäten von Enzymen und Antioxidantien des Ascorbat-Glutathion-Zyklus von gesunden und befallenen Pflanzen in Abhängigkeit von einer vorherigen Mykorrhizierung der Pflanzenwurzeln gegenübergestellt werden.
- Weiterhin war es eine Zielstellung der vorliegenden Arbeit, die systemische Wirkung der Mykorrhizierung auf den gesamten Proteinstoffwechsel zu untersuchen und zu diskutieren. Hierzu sollten am Beispiel der Modellpflanzen Majoran und Johanniskraut die durch die Mykorrhizierung herauf- oder herunterregulierten Proteine im oberirdischen Blattmaterial der Pflanzen detektiert und identifiziert werden. Dafür war es ebenfalls Ziel der Arbeit, eine 2-D-elektrophoretische Trennmethode für pflanzliche Proteine aufzubauen und

zu optimieren. Diese sollte am Beispiel von Majoran und Johanniskraut die hochauflösende Trennung eines möglichst großen Anteils der pflanzlichen Proteine aus dem oberirdischen Kraut ermöglichen. Mit Hilfe computerunterstützter Software wurde dann eine semi-quantitative Auswertung der getrennten Proteine in Abhängigkeit von einer Mykorrhizierung angestrebt, um schließlich durch die Mykorrhizierung in ihrer Expression beeinflusste Proteine mittels MALDI-TOF/TOF MS identifizieren zu können.

Zusammenfassend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von geeigneten analytischen Methoden eine umfassende Untersuchung und Diskussion der Wirkungen einer Inokulation mit arbuskulären Mykorrhizapilzen auf die Erträge, die wertgebenden Inhaltsstoffe und die Toleranz der Heil- und Gewürzpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut erfolgen. Die Arbeit sollte dazu neben der Kontrolle von Ertragswerten sowohl den Aufbau, die Optimierung und Validierung als auch die Durchführung und Bewertung der analytischen Untersuchungen der wertgebenden Inhaltsstoffe ausgewählter Heil- und Gewürzpflanzen sowie verschiedener biologischer Marker, die eine gesteigerte Toleranz der Pflanzen anzeigen können, beinhalten.

## 3 Grundlagen

### 3.1 Heil- und Gewürzpflanzen

Aromatische und heilende Pflanzen waren schon den Menschen der Frühzeit bekannt. An einer Vielzahl von Monographien der nationalen und internationalen Pharmakopöen zeigt sich noch heute die Bedeutung der heilenden Wirkung einiger Heil- und Gewürzpflanzen. Die Verwendung von Teilen dieser Pflanzen zur Aromatisierung von Speisen setzte dagegen erst im Altertum ein. [BLUM, 1999]

Anbautechnisch ist die Gruppe der Heil- und Gewürzpflanzen den Sonderkulturen zuzuordnen. Laut Angaben der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe [FNR, 2005] ist für die Anbauflächen von Heil- und Gewürzpflanzen in Deutschland eine steigende Tendenz zu beobachten. Für das Jahr 2005 wurden 10.000 Hektar Gesamtanbaufläche dokumentiert. Der Flächenanteil der unter ökologischen Gesichtspunkten erzeugten Kulturen nimmt einen verschwindend kleinen Teil der Gesamtanbaufläche für Heil- und Gewürzpflanzen ein und lag 2003 bei nur 704 ha [FRANKE und DEHE, 2003; RÖHRICHT et al., 2003].

Etwa 100 unterschiedliche Pflanzenarten werden zurzeit in Deutschland kultiviert [FNR, 2005]. Der Hauptschwerpunkt liegt bei Petersilie, Kamille, Majoran, Johanniskraut, Fenchel, Oregano, Thymian, Kümmel, Fingerhut, Bohnenkraut und Senfsamen. In Thüringen, Bayern, Hessen, Niedersachsen und Sachsen-Anhalt befinden sich die größten Anbauflächen [FAH, 2002; KROTH und LIERSCH, 2001 und 2002a; SACHSEN-ANHALT-NEWSLETTER, 2004].

Die Zunahme des Rohwarenbedarfs durch steigende Nachfrage der Bevölkerung im In- und Ausland, u.a. auch aufgrund neuer abgesicherter Erkenntnisse zur Wirksamkeit von Phytopharmaka, ist nur einer der Gründe für die wachsenden Anbauflächen für Heil- und Gewürzpflanzen in Deutschland. Auch wachsende Qualitätsansprüche, Nachfrage nach regionalen Produkten und die Forderung nach lückenloser Dokumentation des gesamten Produktionsprozesses sprechen für eine Steigerung der inländischen Heil- und Gewürzpflanzenproduktion [BOMME, 1998; KROTH und LIERSCH, 2002a].

Trotz der steigenden Nachfrage an Heil- und Gewürzpflanzen im Land werden 90 bis 95 % der in Deutschland verarbeiteten Sonderkulturen noch immer aus Importen gedeckt und maximal 10 % kommen aus heimischem Anbau. Im Jahr 2005 wurden allein 76.600 t Gewürze im Wert von ca. 161 Millionen Euro aus Ländern wie Brasilien, Indonesien, Vietnam, Indien, Niederlande, China, Ägypten, Ungarn, Polen oder Bulgarien importiert. Hinter den USA ist Deutschland weltweit größter Importeur von frischen und getrockneten Gewürzen, darunter v.a. Pfeffer, Paprika, Koriander, Kümmel und Muskat [AMTLICHE AUSSENHANDELSSTATISTIK, 2005]. Ursachen für den hohen Importanteil sind in erster Linie die günstigeren klimatischen Bedingungen im Ausland und die hohen Produktionskosten bei der Kultivierung in Deutschland. So zählen Unkrautunterdrückung und Schaderregerbekämpfung bei starker Begrenzung zugelassener chemischer Bekämpfungsmittel, pflanzen- und umweltgerechte Nährstoffversorgung, Schwermetallakkumulation sowie technische Schwierigkeiten bei Anbau, Ernte und Aufarbeitung zu den Hauptproblemen des einheimischen feldmäßigen Anbaus [BOMME, 1998; FRANKE und DEHE, 2003; KROTH und LIERSCH, 2002b].

Durch eine Erhöhung der Toleranz von Heil- und Gewürzpflanzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren könnten diese Anbauprobleme in unseren Regionen deutlich reduziert werden. Eine zusätzliche Steigerung der erzielbaren Ernteerträge sowie eine Erhöhung der Gehalte an wertgebenden Inhaltsstoffen wären weitere Entscheidungskriterien für einen Anbau dieser Kulturen in Deutschland. Die Beeinflussung dieser genannten Kriterien durch den Einsatz von Mykorrhizapilzen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der Kulturen Thymian (*Thymus vulgaris* L.), Majoran (*Origanum majorana* L.; *Majorana hortensis* MOENCH.) und Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) untersucht werden.

### 3.2 Wertgebende Inhaltsstoffe

Zu den primären Inhaltsstoffen der Pflanzen zählen neben Wasser und Salzen die lebenswichtigen Zellbestandteile, zu denen u.a. lösliche Zucker, Fettsäuren und Aminosäuren sowie unlösliche hoch molekulare Stoffe, wie Stärke, Zellulose oder Lignin gehören. Die in bestimmten Pflanzen jeweils unterschiedlichen sekundären Inhaltsstoffe sind nicht direkt am Grundstoffwechsel beteiligt, sondern werden aus den primären Stoffwechselprodukten gebildet. Hierzu zählen u.a. die ätherischen Öle, Alkaloide, Bitterstoffe, Farbstoffe, Gerbstoffe, Harze und Glykoside. [HÄNSEL et al., 1999]

Diese chemisch sehr unterschiedlichen Verbindungen werden von der Pflanze z.B. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe gebildet [TEUSCHER et al., 2004]. Sekundäre Pflanzenstoffe können einige Prozent des Trockengewichts der Pflanzen ausmachen. Etwa 1,5 g davon werden mit einer gemischten Kost täglich vom Menschen aufgenommen. 5.000 bis 10.000 verschiedene Substanzen sind als sekundäre Pflanzenstoffe bekannt. Als Duft- und Geschmacksstoffe beeinflussen sie die Nahrungsauswahl des Menschen und in der Pharmazie dienen sie als Basis für zahlreiche Arzneimittel. Hierbei werden ihre gesundheitsfördernden Wirkungen genutzt, wie z.B. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, immunmodulierende, entzündungshemmende, verdauungsfördernde und Blutdruck regulierende Eigenschaften. [WATZL und LEITZMANN, 1995]

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit das besondere Interesse den Hypericinverbindungen in Johanniskraut sowie den aromagebenden Inhaltsstoffen der Heil- und Gewürzpflanzen Thymian und Majoran galt, soll auf diese beiden Substanzklassen in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen werden.

#### 3.2.1 Hypericinverbindungen des Johanniskrauts

Zu den wichtigsten und charakteristischen Inhaltsstoffen des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum* L.) zählen die Naphthodianthrone Hypericin, Pseudohypericin sowie deren Protoverbindungen (0,1 bis 0,15 % der Droge) (Abb. 1). Daneben enthält Johanniskraut die antibiotisch wirksamen Phloroglucinderivate Hyperforin und Adhyperforin (2 bis 4 %) sowie Flavonoide (2 bis 4 %), wie Quercetinglykoside (Hyperosid, Rutosid, Quercitrin, Isoquercitrin), Flavonoidaglykone und Biflavone (Biapigenin, Amenthoflavon), weiterhin Procyanidine, ätherisches Öl, Sterole und Phenolcarbonsäuren. [HÄNSEL und HÖLZL, 1996; HÄNSEL et al., 1999; ROTH, 1990; WAGNER, 1999]

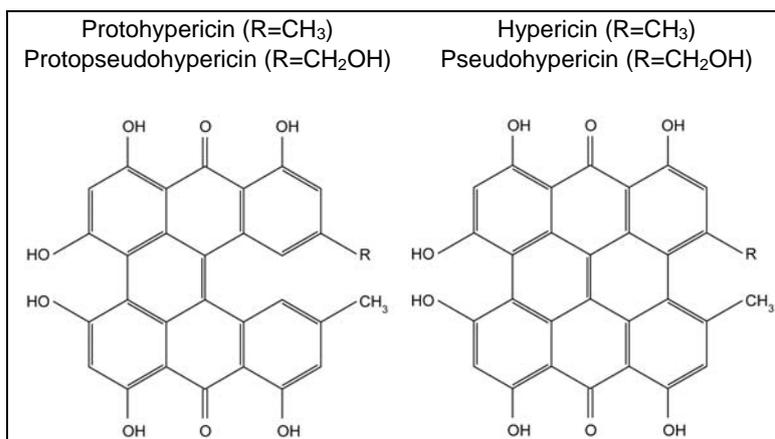


Abb. 1 Hypericine des Johanniskrauts

Johanniskrautextrakte besitzen antibakterielle, antivirale und antidepressive Wirkungen. Die antivirale Wirkung ist auf die wohl auffälligsten Inhaltsstoffe des Johanniskrauts, die Hypericine Hypericin und Pseudohypericin, zurückzuführen. Das Phloroglucinderivat Hyperforin hat eine ausgeprägte antibakterielle Wirkung. [HÄNSEL et al., 1999; ROTH, 1990]

Insbesondere die nachweislich antidepressive Wirkung der Johanniskrautextrakte steht noch immer im Mittelpunkt vielzähliger Studien. Es wird heute vermutet, dass eine Vielfalt an Mechanismen für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist. Dabei stellt die Hemmung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern den plausibelsten Wirkungsmechanismus dar. Offenbar spielt hierbei neben dem Hypericin auch das Hyperforin eine zentrale Rolle. Johanniskrautextraktpräparate werden bei psycho-vegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst und nervöser Unruhe eingesetzt. [HÄNSEL et al., 1999]

### 3.2.2 Ätherische Öle von Majoran und Thymian

Die in Thymian (*Thymus vulgaris* L.) und Majoran (*Origanum majorana* L.) enthaltenen Aromakomponenten gehören weitestgehend zur Gruppe der ätherischen Öle. Hierunter werden Gemische lipophiler, flüssiger, wasserdampfflüchtiger Verbindungen verstanden, die von Pflanzen gebildet werden und deren Siedepunkte zwischen 50 und 320 °C liegen. Aufgrund ihrer Flüchtigkeit hinterlassen sie im Gegensatz zu fetten Ölen auf Filterpapier keinen Fleck. Ätherische Öle werden auf technischem Wege gewonnen und zeigen für jede Pflanze einen charakteristischen Geruch und Geschmack. Weit über 3.000 chemische Verbindungen konnten bisher aus ätherischen Ölen isoliert werden. [BLUM, 1999; TEUSCHER, 2003; TEUSCHER et al., 2004]

Den Hauptbestandteil dieser Stoffgruppe bildet die Klasse der Terpene. Grundbaustein der Terpene ist das Isopren (2-Methyl-1,3-butadien), ein Molekül mit fünf Kohlenstoffatomen. Dabei sind die so genannten Monoterpene aus zwei Isoprenbausteinen, Sesquiterpene aus drei, Diterpene aus vier und Triterpene aus sechs Isopreneinheiten aufgebaut. Diese Moleküle können ring- oder kettenförmig angeordnet sein. [WATZL, 2002]

In den meisten Fällen zählen ätherische Öle zu den Verbindungsklassen der azyklischen, monozyklischen bzw. bicyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffe (Abb. 2) und deren sauerstoffhaltigen Derivaten (Abb. 3) bzw. der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (Abb. 4) und deren sauerstoffhaltigen Derivaten (Abb. 5). [BLUM, 1999]

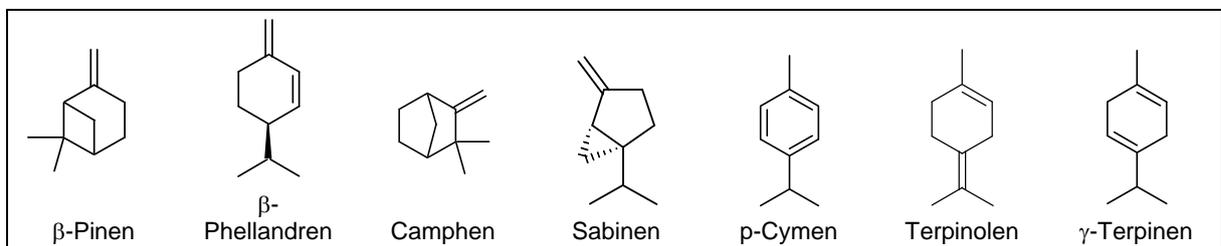


Abb. 2 Monoterpenkohlenwasserstoffe

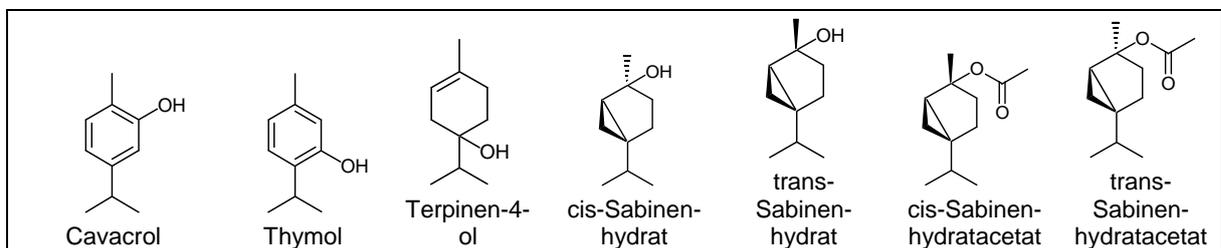


Abb. 3 Oxygenierte Monoterpene

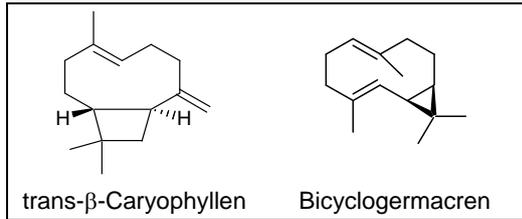


Abb. 4      Sesquiterpenkohlenwasserstoffe

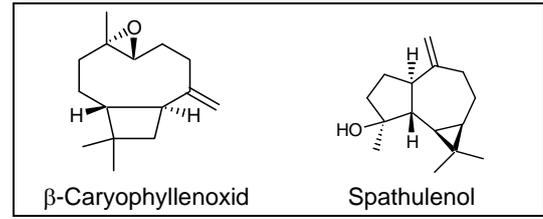


Abb. 5      Oxygenierte Sesquiterpene

Diterpene sind in ätherischen Ölen kaum noch enthalten, weil sie aufgrund ihrer Molekülgröße nicht mehr flüchtig sind. Es kommen jedoch auch flüchtige lipophile Produkte anderer Stoffwechselprodukte in ätherischen Ölen vor, wie Phenylpropane, Ketide sowie z.T. auch schwefel- oder stickstoffhaltige flüchtige Stoffe. [HÄNSEL et al., 1999]

Die Zusammensetzung des ätherischen Öls einer Pflanze ist genetisch determiniert, häufig organspezifisch und für den Entwicklungsstand der Pflanze charakteristisch. Ätherische Öle werden im Endoplasmatischen Retikulum und in den Plastiden von pflanzlichen Drüsenzellen produziert. Von dort werden sie dann entweder über den Golgiapparat in extrazelluläre Ölbehälter aus der Zelle heraus transportiert oder in der Zelle selbst gespeichert (Umwandlung der Zelle in eine Ölzelle). Extrazellulär lagern die Öle in Drüsenhaaren, Drüsenschuppen oder Papillen unter der Kutikula bzw. in interzellulär gebildeten Ölbehältern. Solche interzellulären Sekretbehälter sind kugelige Gebilde, die schizogener (entstanden durch Auseinanderweichen von Zellen), lysigener (entstanden durch Auflösen von Zellen) oder schizolysigener Art (Auseinanderweichen und Auflösen) sein können. [HÄNSEL et al., 1999; TEUSCHER, 2003; TEUSCHER et al., 2004]

Die Komponenten ätherischer Öle besitzen im pflanzlichen Organismus vielerlei Funktionen. Hierzu zählen die Hemmung von Samenkeimung und Wachstum konkurrierender Pflanzen, der Schutz vor Fraßschädlingen oder die Hemmung von Bakterien- und Pilzwachstum. Aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften dienen sie den Blütenpflanzen auch zur Fortpflanzung, indem Insekten zur Bestäubung angelockt werden. [GERHARDT, 1994]

Für den Menschen spielen Gewürzpflanzen beim Würzen von Speisen und somit auch in der Lebensmittelindustrie eine Rolle. Sie dienen aber nicht nur der bewussten Beeinflussung von Geruch und Geschmack unserer Speisen, sondern sind aufgrund antioxidativer und antimikrobieller Eigenschaften der ätherischen Öle auch in der Lage, die Haltbarkeit von Lebensmitteln zu verlängern. Hierzu zählen die Verzögerung des Fettverderbs durch die Hemmung der Lipidperoxidation sowie die Einschränkung des mikrobiellen Verderbs. Cavacrol wies in vitro die höchsten antimikrobiellen Wirkungen gegen lebensmittelrelevante pathogene Keime auf. [TEUSCHER, 2003; TEUSCHER et al., 2004; WATZL, 2002]

Auch pharmakologisch ist für die ätherischen Öle und Gewürzdrogen eine Vielzahl von Wirkungen beschrieben. Die Hauptwirkung der Gewürzdrogen besteht wohl in der Förderung der Enzymsekretion durch an der Verdauung beteiligte Drüsen. Eine blähungstreibende Wirkung ist außerdem auf die antimikrobielle Wirkung der ätherischen Öle gegen pathogene, gasbildende Bakterien im Darmtrakt zurückzuführen.

Antimikrobielle Wirkungen besitzen mehr oder weniger alle ätherischen Öle. Die lipophilen Komponenten ätherischer Öle lagern sich in die Zellmembranen der Mikroorganismen ein und hemmen dort den membrangebundenen Elektronenfluss und damit den Energiestoffwechsel. In hohen Konzentrationen kommt es mitunter auch zur Lyse der Plasmamembranen und zur Denaturierung der Zytoplasmaproteine. Die Radikalfängereigenschaften der Bestandteile ätherischer Öle hemmen u.a. die Bildung von kanzerogenen Stoffen, wie Nitrosaminen, die Oxidation von LDL (low density lipoprotein) und auch die Lipidperoxidation. So-

mit schützen sie vor Tumoren, arteriosklerotischen Ablagerungen in den Gefäßen oder oxidativen Veränderungen der Zellmembranen. [TEUSCHER, 2003; TEUSCHER et al., 2004] Antikancerogene Wirkungen ätherischer Ölverbindungen wurden am Beispiel von Limonen und Carvon im Tierversuch bewiesen. Durch orale Zufuhr dieser Verbindungen konnte die Magen-, Brust- und Lungenkrebsbildung gehemmt werden. Lokal appliziertes Limonen behinderte die Entwicklung chemisch induzierter Hauttumoren. Ein vermuteter Wirkungsmechanismus besteht in der Induktion von sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Enzymen. [WATZL, 2002]

Auch die leberschützenden Eigenschaften ätherischer Öle sind u.a. auf die antioxidativen Wirkungen zurückzuführen. Weiterhin sind in der Pharmakologie ätherische Öle wegen ihrer bronchospasmolytischen und sekretolytischen Wirkungen von besonderem Interesse [TEUSCHER, 2003; TEUSCHER et al., 2004].

Die Bioverfügbarkeit ätherischer Öle ist sehr hoch einzustufen. Sie werden nach oraler Verabreichung im Darmtrakt aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften gut resorbiert. Auch über die Haut werden die Verbindungen ätherischer Öle laut durchgeführter Tierversuche gut aufgenommen. Die inhalative Aufnahme von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen beträgt 60 %. [HÄNSEL et al., 1999; van RENSEN et al., 1999; WATZL, 2002]

### 3.3 Arbuskuläre Mykorrhiza

#### 3.3.1 Formen, Aufbau und Wirkungen der Mykorrhiza

Die meisten höheren Pflanzen bilden unter natürlichen Verhältnissen intensive Lebensgemeinschaften (Symbiosen) mit verschiedenen Wurzelpilzen aus. Die Wurzel-Pilz-Symbiose stellt in ihrer Erscheinung und ihrer Wirkungsweise eine eigene funktionelle Einheit dar und wird als Mykorrhiza bezeichnet. In Abhängigkeit von Pflanzenart, Bodenfaktoren und klimatischen Bedingungen treten verschiedene Mykorrhiza-Assoziationen auf. Man unterscheidet zwei grundsätzlich verschiedene Typen: die Ektomykorrhiza, die mit ihren Pilzhyphen zwar in das Rindengewebe der Pflanzen, aber nicht in die Zellen wächst (bei zahlreichen Bäumen), und die Endomykorrhiza, deren Hyphen bis in das Zelllumen der Pflanzen hineinwachsen. Als Unterform der Endomykorrhiza stellt die arbuskuläre Mykorrhiza die am weitesten verbreitete Mykorrhiza-Form dar. Sie zeichnet sich durch die Bildung von Vesikeln und büschelförmig verzweigten Gebilden (Arbuskeln) im pflanzlichen Zelllumen aus (Abb. 6). [JOHNE, 1998; STRACK et al., 2001]

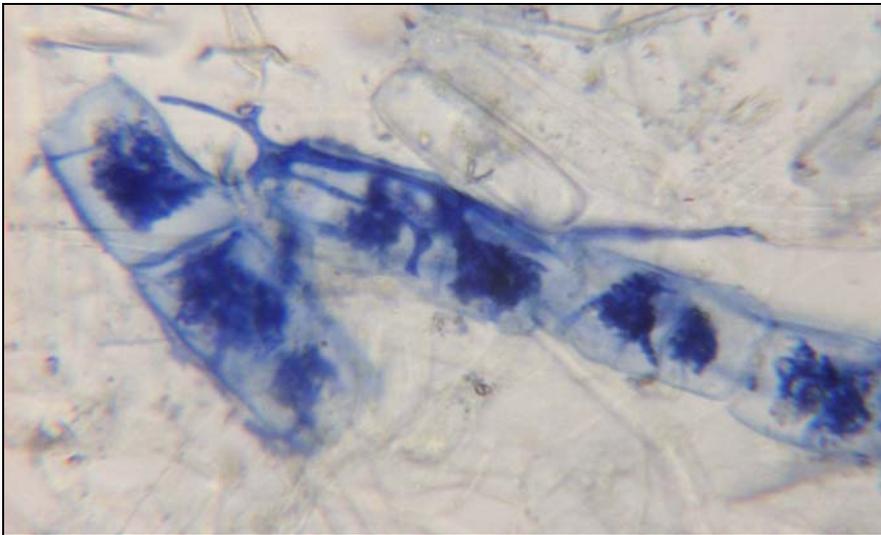


Abb. 6 Arbuskeln in mit AMykor®-Blähton mykorrhizierten Thymianwurzeln (Trypanblau-Färbung)

Die arbuskuläre Mykorrhiza kommt bei etwa 85 % aller Gefäßpflanzen vor. Nur in wenigen Pflanzenfamilien werden keine oder nur schwache Mykorrhizen gefunden (*Cyperaceae*, *Chenopodiaceae*, *Crucifereae*, *Brassicaceae*, *Juncaceae* und *Protaceae*). Zur Bildung einer arbuskulären Mykorrhiza sind nur wenige Pilzgattungen (*Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora* und *Scutellospora*) der Familie *Endogonaceae* befähigt. Die Pilze besiedeln dabei das Wurzelgewebe der Pflanzen und breiten ihr Hyphennetzwerk weit über den Wurzelbereich der Pflanzen hinaus aus. Mit Hilfe einer Penetrationshyphne dringen die Pilze über die Rindenzellen junger Pflanzenwurzeln ein und breiten sich intra- und interzellulär aus. Während der Besiedelung werden intrazelluläre Arbuskeln ausgebildet, über die der Stoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze erfolgt. Intra- und interzellulär bilden die Pilze durch terminale sackartige Anschwellungen von Hyphen außerdem die als Speicherorgane dienenden Vesikel. Über sein weit verzweigtes, feines Hyphensystem versorgt der Pilz die Pflanzen mit Nährstoffen (insbesondere Phosphat), Spurenelementen und Wasser, die Pflanzen stellen dem Pilz im Gegenzug ihre Photosyntheseprodukte zur Verfügung. [GOBENA, 1995; JOHNE, 1998; LAND, 1990; STRACK et al., 2001]

Aufgrund der außerordentlich weiten Verbreitung arbuskulärer Mykorrhizen im Pflanzenreich wird ihre Bedeutung für die Pflanzen schon seit langer Zeit untersucht. In zahlreichen Studien konnte eine Reihe von positiven Wirkungen der Mykorrhiza auf ihre Wirtspflanzen fest-

gestellt werden, wie verbesserte Wuchsleistung, ausgewogenere Ernährung und Erhöhung der Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren. FELDMANN (1998) hat eine Vielzahl wissenschaftlich abgesicherter Untersuchungen zusammengetragen, bei denen u.a.

- erhöhte Frisch- und Trockengewichte,
- höhere Ernteerträge,
- verbesserte Nährstoffaufnahmen,
- bessere Blüten- und Spross- sowie Wurzelentwicklungen und nicht zuletzt
- erhöhte Toleranzen gegenüber verschiedenen Stressfaktoren, wie Trockenheit, Stau-nässe, Salz- oder Schwermetallbelastung, Umpflanzungen und Krankheitserreger,

beobachtet wurden.

Die grundlegenden Wirkungen der Mykorrhiza beruhen dabei auf einer verstärkten Wasser- und Nährstoffaufnahme in die Pflanze, insbesondere von Phosphor, Stickstoff und Mikroelementen, auf der Beeinflussung des Phytohormonhaushaltes und der Regulation des Protein-stoffwechsels. Solche Einflüsse auf Primär- und Sekundärstoffwechsel der Wirtspflanzen führen zu Veränderungen in Entwicklung und Wachstum, häufig messbar durch eine Erhöhung von Biomasse und Ertrag mykorrhizierter Pflanzen gegenüber nicht mykorrhizierten [FELDMANN, 1998].

Eine zusätzliche Inokulation landwirtschaftlich wichtiger Kulturpflanzen mit arbuskulären Mykorrhizapilzen führt nachweislich u.a. zu Mehrerträgen, so z.B. bei Weizen, Mais, Hirse, Sojabohne oder Buschbohne, verbessert die Nährstoffversorgung insbesondere mit Phosphat oder erhöht die Stresstoleranz [BETHLENFALVAY und BAREA, 1994; CHANG, 1994; DEHNE, 1997; FELDMANN et al., 1996; FELDMANN, 1999; GOBENA, 1995; HAMEL, 1996; HELAL, 1997; JOHNE, 1998; SCHNITZLER et al., 1996; SIEVERDING, 1991].

Eine besondere Bedeutung, v.a. auch unter ökologischen Gesichtspunkten, kommt der Mykorrhizierung aufgrund ihrer Fähigkeit zu, die natürliche Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren und damit die Pflanzengesundheit zu erhöhen [SCHLEE, 1992]. Da dem Einsatz von Bioziden im Heil- und Gewürzpflanzenanbau sehr enge Grenzen gesetzt sind, besitzen biologische Methoden bei der Durchsetzung des Integrierten Pflanzenschutzes eine hohe Priorität. Die durch eine verstärkte Mykorrhizierung zu erreichende Toleranzerhöhung der Pflanzen gegenüber Phytopathogenen stellt deshalb eine gute Alternative zum bisherigen Biozideinsatz dar.

### 3.3.2 Mykorrhiza bei Heil- und Gewürzpflanzen

Die prinzipielle Besiedlungsfähigkeit verschiedener Heil- und Gewürzpflanzen mit arbuskulären Mykorrhizapilzen wurde bereits mehrfach beschrieben [CAMPRUBI et al., 1990; CAMPRUBI et al., 1992; GUPTA et al., 2000].

So inokulierten GIOVANETTI et al. (2001) Thymianpflanzen erfolgreich mit *Glomus mosseae*. LIOI und GIOVANETTI (1989) fanden an einer Thymianart *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. caledonicum*, *G. microcarpum* und *Sclerocystis* spec..

ABDUL-KHALIQ und JANARDHANAN (1994) untersuchten die Besiedlung verschiedener Minzearten mit Mykorrhizapilzen und stellten gute Mykorrhizierungen mit den AM-Pilzen *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. geosporum*, *G. aggregatum*, *Entrophospora* spec. und einer *Sclerocystis*-Art fest.

KOIDE et al. (1999) konnten durch Zusatz von Formononetin die Besiedlung mit AM-Pilzen bei Feuer-Salbei stimulieren. Den Einfluss des Lichtes auf die Mykorrhizierung von spanischem Salbei wiesen MUHAMMAD und HUSSAIN (1995) in ihrer Arbeit nach. Saisonale Schwankungen in der Mykorrhiza-Besiedlung stellten MAGO und MUKERJI (1994) bei Echtem Salbei, Grüner Minze und Basilikum fest. KULLMANN et al. (2003) ermittelten in ihren Untersuchungen einen Einfluss von Torfersatzstoffen im Substrat auf die Mykorrhiza-Symbiose, die Sporenkeimung und das extraradikale Hyphenwachstum von *Glomus intraradices* an Petersilie und Basilikum.

MUKHIN und BETEKHTINA (2006) stellten bei der Untersuchung zur Mykorrhizierbarkeit von 93 verschiedenen Kräutern fest, dass die Entwicklung von arbuskulären Mykorrhizen auch unter prinzipiell mykotrophen Pflanzenspezies noch stark variiert.

Die nach Mykorrhizierung bei Heil- und Gewürzpflanzen beschriebenen Effekte reichen von erhöhter Biomasseproduktion über größere Vitalität der Jungpflanzen bis hin zu höherer Toleranz gegenüber abiotischem Stress [FELDMANN et al., 1996; FELDMANN, 1998; FELDMANN, 1999; FELDMANN et al., 1999; JOHNE, 1998].

MOORA und ZOBEL (1998) stellten bei Sämlingspflanzen von Johanniskraut nach AM-Inokulation ein deutlich besseres Wachstum fest. CAMPRUBI et al. (1990) erhöhten durch Inokulation mit *Glomus mosseae* bei Salbei, Thymian und Basilikum die Spross- und Wurzel-trockenmasse. An Chilipflanzen konnten mit Hilfe der Mykorrhizierung das Wachstum, die Blütenbildung und die Erträge erfolgreich gesteigert werden [BAGYARAJ und SREERMULU, 1982; SREERAMULU und BAGYARAJ, 1986]. Bei Feuer-Salbei zeigten sich zwar keine nennenswerten Zuwächse durch Mykorrhizierung [WANG et al., 1997], jedoch blühten die inokulierten Pflanzen 17 Tage früher als die nicht inokulierten Vergleichspflanzen. Die Bergamotminze reagierte auf eine Inokulation mit *Glomus intraradices* mit einem gesteigerten Nährstoffgehalt in den Blättern sowie mit gesteigerter Grünmasse [KOTHARI et al., 1999].

ABDUL-KALIQ und JANARDHANAN (1997) verwendeten verschiedene *Glomus*-Arten (*G. aggregatum*, *G. fasciculatum* und *G. mosseae*) für die Besiedelung sechs verschiedener Minzearten. Alle drei Mykorrhizapilz-Arten erhöhten den Grünmasseertrag, die Zusammensetzung des Öls wurde durch die Mykorrhizierung hier aber nicht geändert. Doch auch eine Erhöhung des Gehaltes pflanzlicher Inhaltsstoffe nach Inokulation von AM-Pilzen wurde schon mehrfach beschrieben [z.B. FREITAS et al., 2004; GUPTA et al., 2002; KAPOOR et al., 2002a, 2002b und 2004].

GUPTA et al. (2002) inokulierten verschiedene Kulturformen der Acker-Minze in Feldversuchen mit *Glomus fasciculatum*. Sie konnten einen positiven Einfluss der Mykorrhizierung auf die Pflanzenhöhe, auf das Krautfrisch- und das Krauttrockengewicht feststellen sowie weiterhin auf den Gehalt und den Ertrag an ätherischen Ölen. Auch bei Oregano führte eine Mykorrhizierung zu erhöhten ätherischen Ölgehalten, hatte aber keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls [KHAOSAAD et al., 2006].

FREITAS et al. (2004) dagegen ermittelten einen Einfluss verschiedener AMP (*Glomus etunicatum*, *G. clarum*, *Gigaspora margarita*, *Acaulospora scrobiculata*) auf den Ertrag und die Qualität des ätherischen Öls in der Minze. Bei unterschiedlichen Phosphorgehalten des Bodens (0, 50, 100 bzw. 200 mg/kg) zeigten die Ernteergebnisse nach 65 Tagen, dass ohne Phosphat-Zugabe mit *Gigaspora margarita* und *G. clarum* eine Erhöhung der Frischmasse auf 206 % bzw. 198 % im Vergleich zur entsprechenden Kontrollvariante erreicht wurde. In den phosphatfreien Versuchstöpfen war auch der Gehalt an ätherischen Ölen und an Menthol in der mykorrhizierten Variante höher als in der nicht mykorrhizierten. Bei Erhöhung der Phosphat-Konzentration im Boden wurde bei zusätzlicher Mykorrhizierung jedoch keine Abstufung im Öl- und Mentholgehalt mehr festgestellt und auch die Frischmasse war nur noch geringfügig erhöht.

Bei Ajowan und Dill stellten KAPOOR et al. (2002a) mit *Glomus macrocarpum* und *G. fasciculatum* ein verbessertes Pflanzenwachstum fest. Außerdem stieg der Gehalt an ätherischen Ölen in Ajowan um bis zu 72 %, in Dill sogar um bis zu 90 %. Mit *Glomus fasciculatum* wurde insbesondere ein höherer Thymolgehalt in Ajowan erzielt. *G. macrocarpum* steigerte die Limonen- und Carvongehalte in Dill. Auch in Koriander untersuchten KAPOOR et al. (2002b) den Einfluss von Mykorrhizapilzen auf den Ölgehalt und dessen Zusammensetzung. Die Samen der mit *Glomus macrocarpum* inokulierten Pflanzen enthielten 28 % mehr Öl im Vergleich zur nicht mykorrhizierten Kontrolle. Nach Inokulation mit *Glomus fasciculatum* erhöhte sich der Gehalt sogar um 43 %. Weiterhin stellten sie, je nach Art des eingesetzten Mykorrhizapilzes, unterschiedliche Einflüsse auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe fest. So steigerte die Inokulation mit *G. macrocarpum* die Gehalte an Geraniol, während durch *G.*

*fasciculatum*-Inokulation die Linaloolgehalte erhöht wurden. Signifikante Steigerungen des Wachstums, der Phosphoraufnahmen sowie der ätherischen Ölgehalte konnten KAPOOR et al. (2004) auch in Fenchel nach Inokulation mit *G. macrocarpum* oder *G. fasciculatum* ermitteln. Außerdem führte die Mykorrhizierung zu erhöhten Gehalten an Anethol im ätherischen Öl.

COPETTA et al. (2006) ermittelten bei *Gigaspora rosea*-Inokulation von Basilikum neben erhöhten Biomasseerträgen und verbesserter Wurzelbildung ebenfalls erhöhte Gehalte an ätherischem Öl sowie eine Verschiebung der ätherischen Ölinhaltsstoffe zugunsten von Eugenol.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mykorrhizierung der Pflanzen einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung und damit auf die Qualität der Inhaltsstoffe hat. KAPOOR et al. (2002a und 2004) führen die erhöhten ätherischen Ölgehalte und auch die Beeinflussung der Zusammensetzung der ätherischen Ölinhaltsstoffe v.a. auf die durch die Mykorrhizierung geförderte Aufnahme von Phosphaten aus dem Boden zurück. Da es sich bei ätherischen Ölverbindungen in vielen Fällen um Terpene (aufgebaut aus Isoprenuntereinheiten) handelt, für deren Biosynthese Acetyl-CoA, ATP und NADPH benötigt werden, stellen die Bodengehalte an anorganischen Phosphaten einen limitierenden Faktor für die Synthese dar. Über das weit ausgebreitete Netz feiner Hyphensysteme können Mykorrhiza-Symbiosen die Wirtspflanzen mit Phosphaten aus tieferen, dichteren Bodenschichten weit über den Einzugsbereich der Pflanzenwurzeln hinaus versorgen [SMITH und READ, 1997]. Außerdem können Mykorrhizapilze auch die Aufnahme von mineralisiertem Phosphat aus dem Boden erhöhen [CUI und CALDWELL, 1996; GEORGE et al., 1992].

Wie bereits erwähnt, liegt eine weitere Bedeutung der Mykorrhiza in der Erhöhung der Toleranz der Wirtspflanzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren. Diese Beobachtung trifft auch für Gewürzpflanzen zu. WHITFIELD et al. (2004) untersuchten beispielsweise den Einfluss von arbuskulärer Mykorrhiza auf das Wachstum von behaartem Thymian auf einem schwermetallbelasteten Boden entlang des South Tyne Flusses in Großbritannien. Sie stellten fest, dass mykorrhizierte Pflanzen auf diesem zinkhaltigen Boden bei Phosphormangel wüchsiger waren als nicht mykorrhizierte. Der Phosphorgehalt im mykorrhizierten Thymian war zudem höher als in der nicht mykorrhizierten Kontrolle. Auch auf einer polnischen, schwermetallbelasteten Fläche wurde Feld-Thymian mykorrhiziert mit *Glomus aggregatum*, *G. constrictum*, *G. fasciculatum*, *G. pansihalos* sowie *Entrophospora spec.* gefunden [PAWLOWSKA et al., 1996]. READER (1998) verglich das Vorkommen von verschiedenen Kräutern in Abhängigkeit von den Mykorrhizierungsgraden und fand dabei unter den schwierigen Wachstumsbedingungen in Gebirgslagen in mykorrhizierten Gebieten ein deutlich größeres Artenspektrum. Am Beispiel der Mykorrhizierung von Basilikum wurde außerdem eine Verbesserung der Toleranz gegenüber Trockenstress gezeigt [KUBIKOVA, 2001].

In Anbetracht des vielfältigen Artenspektrums der großen Gruppe von Heil- und Gewürzpflanzen sind bisher nur verhältnismäßig wenige Ergebnisse zum Einfluss einer Mykorrhizierung auf diese Pflanzengruppe bekannt geworden. Bemerkenswert ist, dass bei den aufgeführten Arbeiten nur sehr selten Untersuchungen an Heil- und Gewürzpflanzen unter Feldbedingungen stattfanden, sondern meist nur Ergebnisse zu Labor- und Gewächshausversuchen vorliegen.

### 3.4 Pflanzliche Abwehr und Einfluss der Mykorrhizierung

#### 3.4.1 Abwehrmechanismen der Pflanze

Auch Pflanzen verfügen über ein sehr breites Spektrum an Abwehrmechanismen gegenüber abiotischen und biotischen Stressoren. Zur Abwehr von Pflanzenpathogenen kommt eine Vielzahl von konstitutiven und induzierbaren Mechanismen zum Einsatz, die eine große Effektivität und teilweise auch hohe Spezifität aufweisen [KOGEL et al., 1998].

Zwei Arten pflanzlicher Resistenzreaktionen gegenüber potentiellen Pathogenen werden diskutiert: die Nicht-Wirt-Resistenz (die Pflanze ist kein Wirt für das potenzielle Phytopathogen), bei der mechanische Barrieren oder chemische Komponenten eine Rolle spielen, und die Wirtsresistenz, die sich im Laufe der Koevolution von Pflanzen und Phytopathogenen entwickelt hat [ECKEY, 2002]. Bei der Wirtsresistenz wird weiterhin unterschieden zwischen der nicht-rassenspezifischen Resistenz (häufig) und der rassenspezifischen Resistenz (vergleichsweise selten), auch als Gen-zu-Gen-Wechselwirkungen bezeichnet. Von rassenspezifischer Resistenz spricht man, wenn ein Pflanzengen ein Genprodukt des attackierenden Organismus erkennt und diesen mit einer Kaskade biochemischer Reaktionen bekämpft. Unspezifische Wechselwirkungen beschreiben dagegen eine allgemeine Abwehrreaktion, die von einer Pflanzenspezies gegenüber nahezu allen Rassen einer Pathogenspezies ausgelöst wird, ohne tatsächliche Genkombinationen. Unabhängig von dieser Einteilung laufen in rassenspezifischen und nicht-rassenspezifischen Abwehrreaktionen nahezu die gleichen biochemischen Prozesse ab. [ECKEY, 2002; SOMSSICH und HAHLBROCK, 1998]

Zu den Abwehrbarrieren von Pflanzen zählen zunächst präformierte Komponenten der Verteidigung, die schon vor dem Angriff eines Pathogens vorhanden sind. Hierzu gehören z.B. strukturelle Barrieren (Zellwand) oder die Einlagerung von antimikrobiellen Stoffen [ECKEY, 2002]. Erst wenn diese ersten Hürden vom Pathogen überwunden werden, treten induzierte Abwehrreaktionen der Pflanzen ein. Zu den ersten sichtbaren Reaktionen der Pflanzen im Falle eines Angriffes durch Krankheitserreger gehört der Aufbau zusätzlicher physikalischer und chemischer Barrieren. Infolge der Vernetzung freier pflanzlicher Zellwandproteine mit niedermolekularen und polymeren Phenolen kommt es zu lokalen Zellwandverdickungen, sog. Papillen, die ein Eindringen der Krankheitserreger verhindern sollen. Können diese Barrieren vom Angreifer dennoch überwunden werden, hält die Pflanze für diesen Fall weitere Abwehrmechanismen bereit. Pilzlichen Erregern wird z.B. durch das gezielte, schnelle Absterben der befallenen Pflanzenzelle zunächst die Nahrungsgrundlage entzogen. Dieses Abwehrverhalten der Pflanzen beschreibt der Begriff „programmierter Zelltod“ oder „hypersensitive Reaktion“. Schließlich werden Barrierebildung und „programmierter Zelltod“ durch chemische Abwehrkomponenten ergänzt. In benachbarten Zellregionen kommt es u.a. zur Bildung niedermolekularer antimikrobieller Substanzen, den sog. Phytoalexinen. Gleichzeitig werden verstärkt abwehrrelevante Gene aktiviert, in dessen Folge entsprechende Abwehrproteine gebildet werden. Diese in der Reaktion auf Pathogenbefall exprimierten Proteine werden als „pathogenesis-related proteins“, sog. PR-Proteine, bezeichnet. PR-Proteine sind Enzyme, die nach der Infektion mit pflanzenpathogenen Viren, Bakterien und Pilzen oder nach Behandlung mit abiotischen Elicitoren in den Zellen verschiedener Pflanzenarten induziert werden. Es handelt sich hierbei um basische oder saure, säurelösliche, proteinaseresistente, niedermolekulare (10 bis 20 kDa) Proteine [van LOON, 1985; RIGDEN und COUTTS, 1988]. Im Falle von pilzlichen Angreifern werden hier z.B. häufig Chitinasen und Glukanasen beobachtet, die in der Lage sind, die Zellwände der Pilzhyphen zu lysieren. [BOLWELL und WOJTASZEK, 1997; KOGEL et al., 1998; KOGEL, 1999]

Eine zentrale Rolle bei der pflanzlichen Abwehr spielen reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS, reactive oxygen species), wie das Superoxid-Radikal ( $O_2^{\cdot -}$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Diese kurzlebigen und in großen Mengen zelltoxischen Verbindungen werden innerhalb kür-

zester Zeit nach dem Auftreten von biotischem oder abiotischem Stress verstärkt gebildet und sind in eine Vielzahl von Abwehrprozessen, wie den hypersensitiven Zelltod, die Phytoalexinsynthese oder die oxidative Vernetzung von Zellwandproteinen, involviert. [ECKEY, 2002; KUZNIAK et al., 1999]

Durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird der lokal begrenzte hypersensitive Zelltod eingeleitet und so dem Pathogen zunächst das Nährmedium entzogen. Jedoch führt dieser Abwehrmechanismus nur bei biotrophen Pathogenen zum Erfolg. Bei nekrotrophen Pilzen, wie *Botrytis cinerea* oder *Sclerotinia sclerotiorum*, werden sogar gegenteilige Effekte beobachtet. Da sich nekrotrophe Erreger von abgestorbenem Gewebe ernähren, können sie sich auf dem toten Pflanzengewebe besonders gut entwickeln. [GOVRIN und LEVINE, 2000; MAYER et al., 2001]

### 3.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Antioxidatives System

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden bei verschiedenen Redoxreaktionen, unvollständiger Reduktion von Sauerstoff oder Oxidation von Wasser in den Elektronentransferketten der Mitochondrien oder Chloroplasten gebildet. Die Bildung von singularem Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) regt die Entstehung weiterer ROS, wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxid- ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), Hydroxyl- ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) und Perhydroxy-Radikalen ( $\text{O}_2\text{H}^{\bullet}$ ) an. Durch ROS ausgelöste Autoxidationsreaktionen können Lipide, Nukleinsäuren und Proteine zerstören. Sie führen zur Lipidperoxidation und damit zu Schädigungen der Zellmembranen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Lipidperoxide können die DNA angreifen oder Thiol-haltige Enzyme deaktivieren.

Andererseits ist insbesondere  $\text{H}_2\text{O}_2$  für die Pflanzenabwehr erforderlich.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dient als Substrat für oxidative Vernetzungsreaktionen der Zellwand (Lignifikation) zur Bildung von Papillen und als Signalstoff zur Regulation abwehrrelevanter Genexpressionen [ALSCHER et al., 1997; ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000; LAMB und DIXON, 1997; MEHDY et al., 1996]. Die zentrale Rolle von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Signalübermittlung und Regulation im normalen pflanzlichen Metabolismus, aber v.a. auch in Stresssituationen der Pflanze, wurde in der Literatur bereits umfassend diskutiert [LALOI et al., 2004; NEILL et al., 2002; PASTORI und FOYER, 2002; WOJTASZEK, 1997].

Doch ROS besitzen auch toxische Wirkungen auf die Zellen der Pflanze und deren Kompartimente. Wie bereits erwähnt, sind sie ursächlich beteiligt am Auftreten von abiotischem und biotischem Stress und auch an der Seneszenz von Pflanzen. Oxidativer Stress wird durch Umweltfaktoren (Luftverschmutzungen, Herbizide, Schwermetalle, Trockenheit, Hitze oder Kälte, UV-Strahlungen) sowie durch Pathogenbefall oder Seneszenz verursacht. Als Ursachen für oxidativen Stress kommen unkontrollierte Generierung oder auch unzureichender Abbau von ROS in Frage. [BUCHANAN et al., 2000]

Zur Regulation der ROS besitzen Pflanzen deshalb effektive antioxidative Abwehrsysteme, die für den Abbau erhöhter Konzentrationen dieser zelltoxischen Moleküle verantwortlich sind. Das antioxidative Abwehrsystem der Pflanzen besteht aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien, die spezifisch auf die verschiedenen Zellkompartimente verteilt sind. Zu den vorrangigen nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Ascorbinsäure (Vitamin C), reduziertes Glutathion,  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide sowie teilweise auch Polyamine und Flavonoide. Der bedeutendste antioxidative Stoffwechselkreislauf ist der Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Abb. 7). [BUCHANAN et al., 2000; KUZNIAK et al., 1999]

Im Ascorbat-Glutathion-Zyklus werden zunächst  $\text{O}_2^{\bullet -}$ -Radikale mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) zu molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgebaut. Verschiedene Isoenzyme der Superoxid-Dismutase (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Fe-SOD) sind in nahezu allen Zellkompartimenten lokalisiert: Mitochondrien, Peroxisomen, Zytosol und Chloroplasten. Dies ist erforderlich, da  $\text{O}_2^{\bullet -}$ -Radikale überall dort entstehen, wo Elektronentransportketten existieren. Gleichzeitig sind die Phospholipidmembranen jedoch nicht permeabel für die geladenen  $\text{O}_2^{\bullet -}$ -Radikale. Das von der SOD gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  dagegen kann durch die Membranen dif-

fundieren und so auch als Botenstoff fungieren. [ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000; GRENE, 2002]

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wiederum wird entweder durch die Katalase (CAT) zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> umgewandelt (Zytoplast, Glyoxisome, Peroxisome) oder von der Ascorbat-Peroxidase über die Oxidation von Ascorbinsäure zu H<sub>2</sub>O reduziert (Zytoplast und Chloroplasten). Für die Regeneration der Ascorbinsäure gibt es zwei Mechanismen. In den Plastiden der pflanzlichen Zelle wird Monodehydroascorbat enzymatisch von der Monodehydroascorbat-Reduktase (MDHAR) unter Oxidation von NADPH wieder reduziert. Alternativ wird Monodehydroascorbat spontan zu Dehydroascorbat umgewandelt, welches durch die Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR) mit reduziertem Glutathion (GSH) zu reduziertem Ascorbat (AsA) und oxidiertem Glutathion (GSSG) reagiert. Die Glutathion-Reduktase (GR) reduziert GSSG wieder, unter Oxidation von NADPH. Dies findet in den Chloroplasten, Mitochondrien sowie im Zytoplast statt. Singulärer Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) und Hydroxyl-Radikale (HO<sup>\*</sup>) werden ebenfalls im Glutathion-Zyklus eliminiert. Auch nicht-enzymatische Antioxidantien, wie Vitamin E oder Carotinoide können <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und HO<sup>\*</sup> entgiften. [ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000]

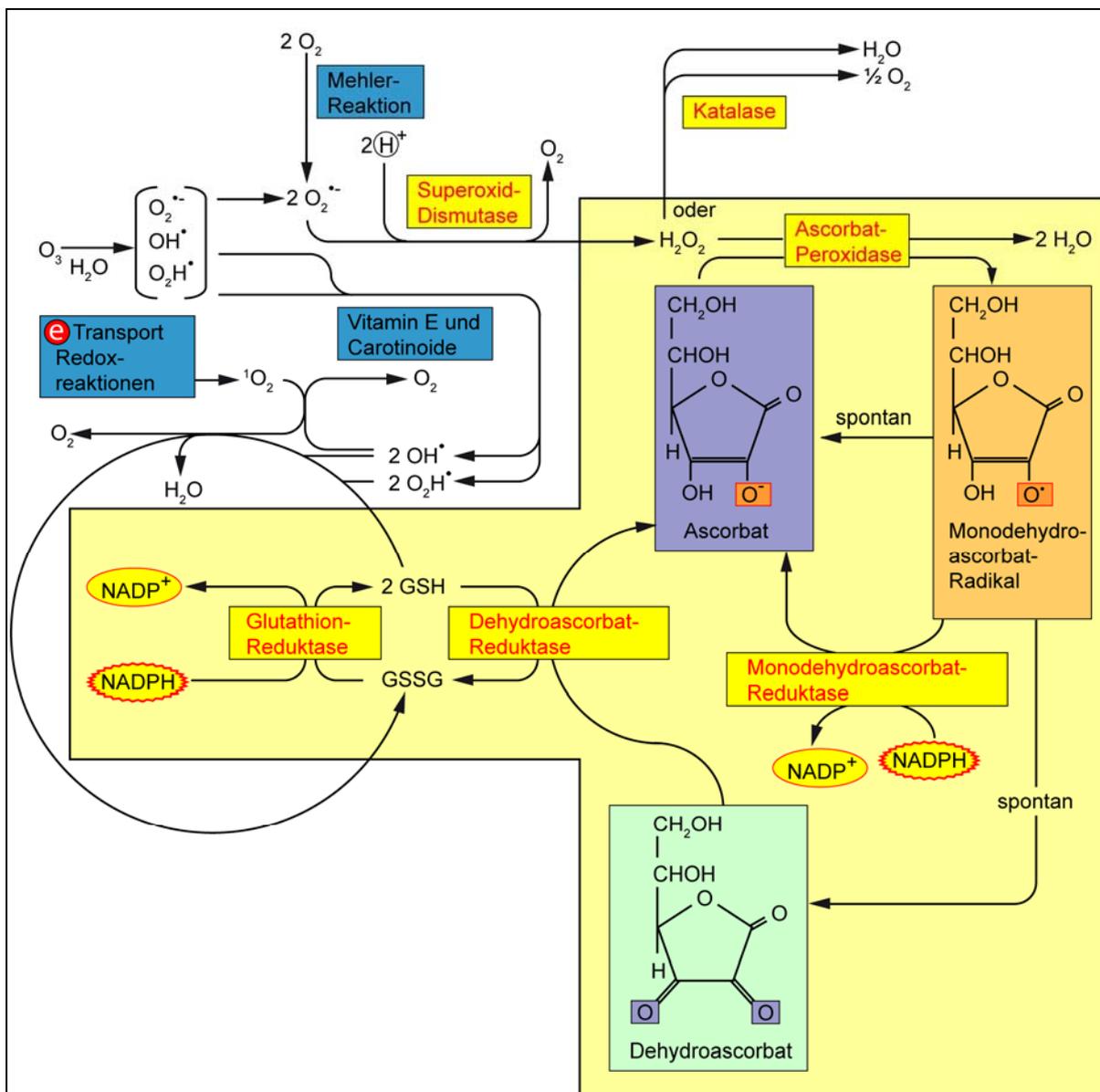


Abb. 7 Ascorbat-Glutathion-Zyklus  
[nach BUCHANAN et al., 2000]

In vielen Pflanzen führt oxidativer Stress zur Erhöhung antioxidativer Enzymaktivitäten und zur Bildung antioxidativer Metabolite. Tolerante Pflanzen könnten somit erhöhte Konzentrationen antioxidativer Faktoren aufweisen und Schäden durch ROS minimieren. Da antioxidative Aktivitäten jedoch stark an die entsprechenden Zellkompartimente gebunden sind, führen erhöhte Aktivitäten einzelner antioxidativer Enzyme nicht zwangsläufig zu erhöhter Stresstoleranz - so z.B. wenn andere Radikalfängermechanismen eingeschränkt sind oder die Überexpression bestimmter Enzyme gerade zu erhöhter Produktion oder reduziertem Abbau von ROS führt. Um eine tatsächliche Steigerung der Stresstoleranz zu bewirken, müssen daher vermutlich verschiedene Komponenten des antioxidativen Systems zugleich gesteigert werden. In bestimmten Konstellationen kann aber die erhöhte Expression eines oder mehrerer antioxidativer Enzyme einen erhöhten Schutz vor oxidativem Stress hervorrufen. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei vermutlich die Lokalisation der Enzyme in den Zellkompartimenten sowie die Koordination zwischen den Zellorganellen. [ALSCHER et al., 1997; BUCHANAN et al., 2000; FOYER et al., 1994]

Da Pflanzen die Interaktion mit Sauerstoff, wie schon beschrieben, auch positiv nutzen, ist der Auf- und Abbau von ROS tief verbunden mit Prozessen wie der hypersensitiven Reaktion und der Regulation photosynthetischer Elektronenflüsse. Die Aktivität der antioxidativen Abwehrsysteme muss deshalb gleichwirksam beim Abbau ROS in normalem Metabolismus wie auch in Stresssituationen ablaufen. Die Kapazität des antioxidativen Abwehrsystems von Pflanzen ist daher in Stresssituationen schnell erreicht, da die Aktivitäten vieler antioxidativer Enzyme und auch die Konzentrationen von Antioxidantien in Stresssituationen gegenüber normalen Bedingungen meist nur verdoppelt sind. Drastische Aktivitätssteigerungen antioxidativer Enzyme zum Abbau ROS würden zudem gleichzeitig die Signalübermittlung durch diese Substanzen verhindern und damit weitere Abwehrreaktionen unterbinden. [FOYER et al., 1994]

### 3.4.3 Einflüsse von Pathogenbefall und Mykorrhizierung auf pflanzliche Abwehrreaktionen

Pathogen- oder Elicitor-induzierte Wirkungen auf ROS sowie Enzyme und Antioxidantien des antioxidativen Systems wurden in letzter Zeit ausführlich untersucht [z.B. KUZNIAK et al., 1999; KUZNIAK, 2001; PATYKOWSKY und URBANEK, 2003; WU und von TIEDEMANN, 2002].

Die Rolle symbiotischer Wurzelendophyten bei der Stresstoleranz gegenüber abiotischen und biotischen Faktoren war in den letzten Jahren ebenfalls Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei wurden die positiven Wirkungen der arbuskulären Mykorrhiza auf die Toleranz von Pflanzen in einigen Fällen auch auf die Induktion der detoxifizierenden Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus und die zugehörigen Antioxidantien zurückgeführt [BLILOU et al., 2000; GARMENDIA et al., 2004a].

Der Einfluss einer Mykorrhizierung auf die Aktivität von Enzymen, die auch im Falle von Abwehrreaktionen der Pflanze bei Pathogenbefall eine Rolle spielen, wurde schon des Öfteren beschrieben [BESTEL-CORRE et al., 2002a; DUMAS-GAUDOT et al., 1992]. So wurde die Bestimmung der Aktivität von Chitinasen oder der  $\alpha$ -Mannosidase auch zum Nachweis einer Mykorrhizierung verschiedener Pflanzen vorgeschlagen [ALBRECHT et al., 1996; DUMAS-GAUDOT et al., 1992].

Die vermeintliche Rolle von PR-Proteinen im Zusammenhang mit einer gesteigerten Resistenz bei mykorrhizierten Pflanzen wurde bisher u.a. in Tomatenpflanzen festgestellt [CORDIER et al., 1998; DASSI et al., 1998].

Grundsätzlich sind die positiven Eigenschaften der arbuskulären Mykorrhiza (AM) im Hinblick auf toleranzinduzierende Eigenschaften in Kulturpflanzen in der Literatur bereits vielfach diskutiert worden [ABDEL-FATTAH und SIIABANA, 2002; AZCÓN-AGUILAR und BAREA, 1996; BODKER et al., 1998; BOROWICZ, 2001; CORDIER et al., 1996; DIÉDHIOU, 2001; DUGASSA et al., 1996; FRITZ et al., 2006; LINDERMAN, 2000; LINGUA et al., 2002; POZO

et al., 2002; SLEZACK et al., 2000; THYGESEN et al., 2004; ZHENG et al., 2004]. Eine gezielte Nutzung von AM-Pilzen für die Förderung der Pflanzengesundheit in der landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Praxis steht dagegen bisher noch eher am Anfang [WHIPPS, 2004]. Aufgrund der Fähigkeit von AM-Pilzen, die Toleranz von Kulturpflanzen gegenüber biotischem Stress, insbesondere wurzelbürtigen Pilzkrankheiten, zu erhöhen [HARRIER und WATSON, 2004], sollte nach Lösungswegen gesucht werden, dieses Potential auch für die Erhaltung und Förderung der pflanzenbaulichen Praxis verfügbar zu machen [WHIPPS, 2004].

## 4 Material

### 4.1 Pflanzenmaterial

Für die Feld- und Gewächshausversuche zur Bestimmung der Ernteerträge und der wertgebenden Inhaltsstoffe (jeweils mit bzw. ohne den Einfluss der Mykorrhizierung) kamen die Sorten ‚Marcelka‘ (Majoran), ‚Deutscher Winter‘ (Thymian) und ‚Topaz‘ (Johanniskraut) zum Einsatz.

Für die Bestimmung der Proteinmuster mittels 2-D-Elektrophorese und der Enzyme und Antioxidantien des Antioxidativen Systems an Johanniskraut wurden die Sorten ‚Topaz‘ und eine anfälligerere Standardsorte (zur Verfügung gestellt vom BAZ, Quedlinburg) gegenübergestellt.

Das bezüglich der Inhaltsstoffe zu untersuchende oberirdische Pflanzenmaterial von Majoran und Johanniskraut wurde zur Vollblüte, Thymian zu Blühbeginn (10 % des Bestandes blühen) geerntet und bis zur analytischen Untersuchung je nach dem sich anschließenden Analysenverfahren bei -20 °C tiefgefroren gelagert oder sofort gefriergetrocknet.

Zur Vermeidung von Verlusten an ätherischem Öl bedingt durch die hohe Flüchtigkeit dieser Substanzen bzw. zur Vermeidung von Umwandlungs- und Oxidationsprozessen labiler Verbindungen wurden die Pflanzenmaterialien erst direkt vor der Extraktion zu Partikelgrößen < 0,5 mm gemahlen.

Die zur 2-D-Elektrophorese verwendeten Pflanzenmaterialien wurden im Gewächshaus aufgezogen und das Kraut direkt vor der Proteinextraktion geerntet.

Für die Bestimmung der Aktivitäten von Enzymen bzw. der Antioxidantien des Antioxidativen Systems kamen die Wurzeln der im Gewächshaus in Topfkulturen herangezogenen Pflanzen zum Einsatz. Die Wurzeln wurden direkt vor der Extraktion von Erde befreit, gewaschen und anschließend trocken getupft.

### 4.2 Mykorrhiza-Inokula

#### 4.2.1 Kommerzielles Mykorrhiza-Inokulum

Für die Gewächshaus- und Feldversuche kam ein kommerzielles Mykorrhiza-Inokulum der AMykor GmbH, Wolfen, zum Einsatz. Als Trägermaterial für das Standardprodukt AMykor® wird Blähton eingesetzt. *Glomus intraradices* ist als aktiver Hauptbestandteil enthalten.

#### 4.2.2 Mono-Inokula

Im Rahmen von Gewächshausversuchen zum Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula wurden neben dem kommerziellen AMykor®-Blähton auch die Mono-Inokula *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Glomus diaphanum* und *Glomus geosporum* eingesetzt:

#### 4.2.3 Misch-Inokula

Ebenfalls im Rahmen der Gewächshausversuche zum Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula wurden die folgenden Misch-Inokula verwendet:

- „Thailand - *Scutellospora* spec.“
- „Thailand - *Acaulospora* spec.“
- „Thailand - KN“ (interne Bezeichnung)
- „Thailand - D3“ (interne Bezeichnung)
- AMykor®-Blähton (AMykor GmbH, Wolfen)
- AMykor®-Perlit (AMykor GmbH, Wolfen)

#### 4.2.4 Autochthone Mykorrhiza-Mischungen

In das Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula in den Gewächshausversuchen wurden auch autochthone Mykorrhizapilz-Populationen einbezogen. Dazu wurden aus bestehenden Pflanzungen in Strenzfeld Boden- und Pflanzenproben entnommen und die vorhandenen arbuskulären Mykorrhiza-Sporen isoliert. Dieses natürlich (autochthon) vorkommende Mykorrhizapilz-Konsortium wurde im Gewächshaus an Petersilie als Wirtspflanze vermehrt und später in den Versuchen im Gewächshaus eingesetzt.

Folgende autochthone Mykorrhizapilz-Populationen kamen zur Anwendung:

- autochthone Mykorrhiza von Weizen
- autochthone Mykorrhiza von Thymian

#### 4.3 Pathogen-Inokulum

Für die Untersuchungen eines Einflusses der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskrautpflanzen kam als Pathogen-Inokulum *Colletotrichum cf. gloeosporioides*, zum Einsatz.

Der Erreger der Johanniskrautwelke (Stamm 100) wurde von der Biologischen Bundesanstalt (BBA, Frau Dr. Gärber) zur Verfügung gestellt und auf PDA-Agar sowie SNA-Agar (gemäß Vorgaben der BBA) kultiviert.

Die Inokulation der Topfkulturen mit dem Erreger erfolgte dabei in verschiedenen Konzentrationen:

- › nicht inokulierte Kontrolle,
- › Inokulation mit 25 ml Erregersuspension einer Konidiendichte von  $10^3$  / ml,
- › Inokulation mit 25 ml Erregersuspension einer Konidiendichte von  $10^5$  / ml

Dabei wurde die Erregersuspension unmittelbar an den Stängelgrund der Pflanze ausgebracht.

#### 4.4 Referenzsubstanzen

##### 4.4.1 Referenzsubstanzen für die Aromakomponentenbestimmung

Als Kalibriersubstanzen für das Verfahren der Wasserdampfdestillation kamen Cumol und n-Tetradecan der VWR International GmbH, Darmstadt, zum Einsatz.

Die Referenzsubstanzen für die gaschromatographische Bestimmung der Aromakomponenten wurden von der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, bezogen. DL- $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Myrcen, 1,4-Cineol,  $\delta$ -3-Caren,  $\alpha$ -Terpinen, p-Cymol, (+)-Limonen,  $\gamma$ -Terpinen, Terpinolen, Linalool,  $\alpha$ -Thujon, DL-Campher, Citronellal, (-)-Borneol,  $\alpha$ -Terpineol, (+)- $\beta$ -Citronellol, (+)-Carvon, Nerol, Thymol, Isobornylacetat,  $\beta$ -Caryophyllen, (-)-Thujopsen und  $\alpha$ -Humulen wurden in einer Konzentration von 1 mg / 10 ml n-Hexan (HPLC-rein) eingesetzt.

##### 4.4.2 Referenzsubstanzen für die Hypericinbestimmung

Als Referenzsubstanzen für die Hypericinbestimmung kamen Pseudohypericin und Hypericin der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, zum Einsatz.

#### 4.5 Chemikalien und Lösungsmittel

Für die Wasserdampfdestillation (WDD), die Lösungsmittlextraktion (LME), die Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE) und die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (SFE) von Aromakomponenten wurde n-Hexan, HPLC-rein, der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, eingesetzt. Flüssiger Kohlendioxid stammte von der Messer Group GmbH, Sulzbach. Natriumsulfat (LME) und Seesand (SFE) wurden ebenfalls von der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, bezogen. Bei der ASE der Aromakomponenten kam Diatomenerde der Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen, zum Einsatz.

Auch zur Extraktion der Hypericine wurde Diatomenerde der Separtis GmbH, Grenzach-Wyhlen, verwendet. Lösungsmittel und Chemikalien zur Extraktion (Dichlormethan, stabilisiert, p.a. und Methanol, p.a.) sowie zur HPLC-Bestimmung der Hypericine (Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, p.a.; Ethylacetat, HPLC-rein; Methanol, HPLC Gradient Grade; Phosphorsäure, 85 %, zur pH-Einstellung) stammten von der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe.

Für die Bestimmung der Enzyme und Antioxidantien sowie des Grades der Lipidperoxidation wurden TRIS (Ultra Qualität), di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (p.a.), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (p.a.), Wasserstoffperoxid (30 %, p.a.), reduziertes 1-L-Glutathion (> 98 %), oxidiertes 1-L-Glutathion (> 98 %), Ethanol (p.a.), Eisen(III)chlorid Hexahydrat (p.a.), ortho-Phosphorsäure (85 %, p.a.), 1,4-Dithiothreit (p.a.), Trichloressigsäure (p.a.), Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.), di-Kaliumhydrogenphosphat (p.a.), 5,5-Dithio-bis(-2-nitro)benzoesäure (p.a.) und Ethylendiamintetraessigsäure (p.a.) von der Carl Roth GmbH + Co. KG in Karlsruhe verwendet. Weiterhin wurden Salzsäure (rauchend, 37 %), L(+)-Ascorbinsäure, Metaphosphorsäure und Triethanolamin in Analysequalität der VWR International GmbH in Darmstadt sowie Polyvinylpyrrolidon K 25 (reinst), reduziertes NADH, Dinatriumsalzhydrat (~ 98 %), Ascorbatoxidase (1,000–3,000 units/mg protein), Dehydro-L-Ascorbinsäure Dimer (> 80 %), 1-Chlor-2,4-dinitrobenzen (> 99 %), N-Ethylmaleimid (Sigma Ultra), 2,2-Bipyridyl (> 99 %, Reagent Plus), 2-Vinylpyridin (> 97 %, technisch), Glutathion-Reduktase (100–300 units/mg protein) und 2-Thiobarbitursäure (> 98 %) der Sigma-Aldrich Chemie GmbH in München eingesetzt.

Für die Proteinextraktion kamen Chemikalien der Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, (Trichloressigsäure, p.a.; 2-Mercaptoethanol, p.a.; Aceton, p.a.) zur Anwendung. Flüssiger Stickstoff wurde von der Messer Group GmbH in Sulzbach bezogen.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem 2-D Quant Kit der GE Healthcare Europe GmbH, München, durchgeführt.

Für die IEF wurden Proteo Gel IPG-Streifen (18 cm, pH 3-10 L) der Sigma-Aldrich Chemie GmbH in München eingesetzt. Mineralöl, Cleaning Concentrate und Electrode Wicks wurden von der Bio-Rad Laboratories GmbH in München bezogen. Lösungsmittel und Chemikalien für die 2-D-Elektrophorese stammten von der Carl Roth GmbH + Co. KG in Karlsruhe (Harnstoff, p.a.; Thioharnstoff, reinst; 1,4-Dithiothreit, p.a.; Rotiphorese Gel 30; TRIS, Ultra Qualität; TEMED, p.a.; Ammoniumperoxodisulfat, p.a.; Glycerin, wasserfrei, p.a.; SDS, > 99 %, Ultra Pure; Glycin, p.a.; Agarose, MEE0, Ultra Qualität), der Sigma-Aldrich Chemie GmbH in München (C7BzO; Iodacetamid, > 99 %, Sigma Ultra), der VWR International GmbH in Darmstadt (Salzsäure, rauchend, 37 %), von der SERVA Electrophoresis GmbH in Heidelberg (Bromphenol Blue, Research Grade) sowie von der Bio-Rad Laboratories GmbH in München (Bio-Lyte 3/10 Ampholytlösung, 40 %).

Die Reagenzien für die Färbelösungen Brillant Blau R250, Methanol (HPLC Gradient Grade), Ethanol (p.a.), Essigsäure (100 %, p.a.), Natriumthiosulfat-Pentahydrat (p.a.), Silbernitrat (p.a.), Natriumcarbonat (wasserfrei, p.a.), Formaldehyd (37 %, p.a.) und Glycin (p.a.) wurden von der Carl Roth GmbH + Co. KG in Karlsruhe bezogen.

Sequencing Grade Modified Trypsin für den Proteinverdau stammte von der Promega Corporation, Madison, USA. Sämtliche weiteren Chemikalien und Lösungsmittel für die Identifizierung der Proteinspots mittels MALDI-TOF/TOF MS wurden von der Carl Roth GmbH + Co. KG in Karlsruhe bezogen: Ammoniumbicarbonat (p.a.), Acetonitril (HPLC Gradient Grade), Trifluoressigsäure (0,1 %, p.a.) sowie  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (p.a.).

Wasser für alle Analysen wurde in reinst-Qualität (MilliQ Plus 185, MILLIPORE GmbH, Schwalbach) verwendet.

## 5 Methoden

### 5.1 Versuchsanordnungen und Durchführung

#### 5.1.1 Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus

Im Gewächshaus wurden unter kontrollierten Bedingungen die Wirkungen verschiedener Mykorrhiza-Stämme bzw. Mischpopulationen an den Pflanzenspezies Majoran, Thymian und Johanniskraut untersucht.

Die Versuchsanlage wurde auf den Mitteltischen eines temperierten Gewächshauses (Temperaturminimum: 6 °C) angelegt, so dass für alle Versuchstöpfe weitestgehend gleiche natürliche Lichtverhältnisse gesichert wurden (ohne zusätzliche Beleuchtung). Von jeder Variante (Pflanze - Inokulum) wurden drei Wiederholungen angelegt. Das Johanniskraut wurde als Jungpflanze in die Töpfe (11 cm Rundtöpfe) eingepflanzt. Majoran und Thymian wurden ausgesät und anschließend in die vorbereiteten Töpfe pikiert. Als Substrat diente ein Gemisch aus 1/3 Sand und 2/3 handelsüblicher Blumenerde (Blomenborg Blumenerde, EGN Birkhoff GmbH, Wesel). Um Fremdfektionen weitestgehend auszuschließen, wurden die Substrate vor der Verwendung gedämpft. Für die Varianten mit Mykorrhizierung wurden pro Topf je 10 ml Inokulum eingemischt. Gedüngt wurde wöchentlich mit 10 ml einer 0,1 % Wuxal Top N-Lösung (N/P/K: 12/4/6, Aglukon Spezialdünger GmbH & Co. KG, Düsseldorf). Nach einer Kultivierungsphase von 8 Monaten wurde ein Teil der Pflanzen in entsprechend größere Töpfe verpflanzt.

Nach vollständiger Entwicklung erfolgte die Ernte der Pflanzen zur Vollblüte (Majoran, Johanniskraut) bzw. zu Blühbeginn (Thymian) durch Schneiden der Grünmasse und eine schonende Trocknung im Trockenschrank bei 50 °C für die spätere Bestimmung der Trockenmasse.

Die Pflanztöpfe wurden für eine zweite Ernte weiter gepflegt, zur zweiten Blüte im folgenden Jahr erneut die Grünmasse jeder Pflanze geerntet und für die Bestimmung der Inhaltsstoffe sofort tiefgefroren. Parallel wurden Wurzelproben für die mikroskopische Bewertung des Mykorrhizierungsstatus entnommen.

#### 5.1.2 Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen

Die Versuchsdurchführung erfolgte auf den Freiflächen der Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt (LLG) in Bernburg, Strenzfeld. Die Böden gehören zu den besten in Deutschland und haben Ackerzahlen zwischen 85 und 96.

Die Versuche fanden auf zwei verschiedenen Schlägen statt, die sich in den Anbauverfahren unterscheiden. Die Anlage an der „Kohlenstraße“ wurde nach konventionellen Richtlinien bewirtschaftet und die Fläche an der „Bockwiese“ unter ökologischen Bedingungen.

Die Anlage der beiden Versuchsflächen erfolgte nach den Grundsätzen der „Guten Fachlichen Praxis“ in einer randomisierten Blockanlage mit Nullvariante. Die Feldversuchswiederholungen sind in Parzellen der Größe 1,6 m Breite und 5 m Länge im ökologischen Anbau bzw. 1,6 m Breite und 7,75 m Länge in der konventionellen Variante angelegt worden. Jeweils drei Parzellen wurden zu Blöcken zusammengefasst, die von Randleihen umschlossen waren. Zum Zweck einer besseren Trennung zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Flächen wurde ab dem zweiten Versuchsjahr von einer Randomisierung der Blockanlagen abgesehen. In Vorbereitung der Feldflächen für die Versuchsjahre 2004 und 2005 erfolgte auf den dafür vorgesehenen Flächenabschnitten die Aussaat von Raps. Da Raps keine Mykorrhiza-Symbiose eingeht, sollte mit dieser Vorkultur die natürlich vorkommende Mykorrhizapilz-Population zurückgedrängt werden. Eine genaue Anordnung der Varianten auf den Versuchsflächen für die Versuchsjahre 2002 bis 2005 ist der Anlage 1 zu entnehmen.

Die Applikation des AMykor®-Blähtongranulates erfolgte für die Kulturen Majoran und Thymian mit der Drillmaschine sofort im Anschluss an die Aussaat in die gleiche Reihe. Johan-

niskraut wurde als Palettenware mit 20 ml Wurzelballenvolumen gepflanzt. Dabei wurde der AMykor<sup>®</sup>-Blähton direkt in die Pflanzlöcher hinzu gegeben.

Die allgemeinen Anbauparameter der Versuchsfelder sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Tab. 1 Allgemeine Versuchsparameter des Feldanbaus

Parameter	Versuchsjahr	ökologischer Anbau	konventioneller Anbau
Flächenbezeichnung		Bockwiese	Kohlenstraße
Parzellengröße	2002 - 2005	8,0 m <sup>2</sup>	12,4 m <sup>2</sup>
Varianten	2002	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 35 ml/lfd. m AMykor <sup>®</sup> 65 ml/lfd. m	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 35 ml/lfd. m AMykor <sup>®</sup> 65 ml/lfd. m
	2003	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m
	2004	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m
	2005	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m AMykor <sup>®</sup> 40 ml/lfd. m	Kontrolle AMykor <sup>®</sup> 20 ml/lfd. m AMykor <sup>®</sup> 40 ml/lfd. m
Kulturen (Anzahl Wiederholungen)	2002	Majoran (4) Johanniskraut (4)	Majoran (4) Johanniskraut (4)
	2003	Thymian (6) Johanniskraut (6)	Thymian (6) Johanniskraut (6)
	2004	Thymian (12) Majoran (6)	Thymian (12) Majoran (6)
	2005	Thymian (30 Kontrollen; 15 x 20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m; 15 x 40 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m)	Thymian (30 Kontrollen; 15 x 20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m; 15 x 40 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m)

Jede Kultur wurde zum phänologisch optimalen Termin geerntet. Die Blatt- bzw. Krautdrogen Majoran, Thymian und Johanniskraut wurden maschinell mit einem Grünguternter abgeerntet. Die Ernte des Majorans sowie des Johanniskrautes erfolgte zur Vollblüte der Pflanzen, die Thymianernte zu Blühbeginn (ca. 10 % des Bestandes blühten zu diesem Zeitpunkt). Die vollständigen versuchstechnischen Daten der Feldversuche für die Versuchsjahre 2002 bis 2005 sind in der Anlage 2 zu finden.

## 5.2 Ermittlung der Ernteerträge

### 5.2.1 Ermittlung von Ertragswerten der Gewächshausversuche

Die Ertragsermittlung bei den Gewächshausversuchen erfolgte für die Kulturen Majoran, Thymian und Johanniskraut durch das Abschneiden des Krautes und Auswiegen der Grünmasse bzw. der Trockenmasse nach der Trocknung bei vier Pflanzen pro Topf.

### 5.2.2 Ermittlung von Ertragswerten der Feldversuche

Im Feldanbau wurden Majoran, Thymian und Johanniskraut maschinell mit einem Grünguternter abgeerntet und die Krauterträge pro Parzelle ausgewogen. Da im ökologischen und konventionellen Versuchsanbau verschiedene Parzellengrößen verwendet wurden, erfolgte zum besseren Vergleich der Werte untereinander sowie mit praxisüblichen Ertragswerten die Angabe des Krautertrags der getrockneten Pflanzendroge umgerechnet in dt/ha.

Um Parzellenerträge mit Ernteerträgen unter praxisüblichen Bedingungen vergleichen zu können, müssten erfahrungsgemäß 10 bis 20 % von den ermittelten Parzellenwerten abgezogen werden.

### 5.3 Ermittlung des Mykorrhizierungsgrades

Die Bestimmung der Mykorrhiza-Strukturen führte die AMykor GmbH durch.

Zur Untersuchung der Besiedlung mit arbuskulärer Mykorrhiza wurden Wurzelproben von jeder Versuchsvariante und Wiederholung sowohl in den Feld- als auch in den Gewächshausversuchen entnommen und nach der Probenaufbereitung der Mykorrhizierungsgrad abgeschätzt.

#### 5.3.1 Visualisierung von Mykorrhiza-Strukturen

Die Mykorrhiza bildet in den äußeren Zellbereichen der Wurzeln Arbuskeln, Vesikeln, Hyphen und teilweise auch Sporen aus. Diese werden nur durch Anfärben mikroskopisch sichtbar. Nach der Ernte wurden die Wurzeln dazu durch gründliches Waschen von Erdresten befreit. Das Bleichen der Wurzeln erfolgte über 12 bis 14 Stunden bei Raumtemperatur in 2 %-iger Kalilauge. Anschließend wurden die Wurzeln gewaschen, mit 3,7 %-iger Salzsäure neutralisiert und nochmals gewaschen. Zur Färbung kam 0,05 %-ige Trypanblau-Färbelösung (250 mg Trypanblau, 165 ml dest. Wasser, 165 ml Milchsäure, 165 ml Glycerin) über maximal 12 h zum Einsatz. Nach nochmaligem Waschen wurde überschüssige Farbe in 50 %-iger Milchsäure abgelöst.

Die so vorbereiteten Wurzelproben wurden unter dem Mikroskop betrachtet und die Stärke der Mykorrhizierung in den Wurzeln sowie die Verteilung von Arbuskeln, intrazellulären Hyphen und Vesikeln im Wurzelabschnitt beurteilt.

Zur Vereinfachung des Bewertungsverfahrens wurde ein Schlüssel angewendet, der die Mykorrhizierung der Pflanzenwurzeln in verschiedene Stufen (0 bis 3) einteilt. Dabei bedeutet die Stufe 0, dass keine erkennbaren Mykorrhiza-Strukturen vorhanden sind und die Stufe 3 eine sehr gute durchgängige Mykorrhizierung der beobachteten Wurzelabschnitte.

#### 5.3.2 Sporenisolierung

Für die Bestimmung der Mykorrhiza-Sporenzahlen und deren taxonomische Zuordnung mussten die Sporen aus dem Boden isoliert werden. Die Sporen wurden dazu aus einer Erdprobe über eine Siebkaskade zuerst grob abgetrennt, anschließend die Fraktionen auf dem 45 µm und dem 125 µm Sieb mit wenig Wasser aufgenommen, mit einer konzentrierten Zuckerlösung unterschichtet und zentrifugiert. Die auf dem Zuckergradienten gebildete Schicht wurde abgesaugt, gewaschen und in eine Petrischale überführt. Die Sporen wurden nun unter einem Mikroskop ausgezählt.

Für die taxonomische Identifizierung wurden die Sporen selektiv aufgenommen und auf einem Objektträger permanent fixiert, um sie unter einem Lichtmikroskop nach ihrer Morphologie taxonomisch zu identifizieren.

### 5.4 Bestimmung der Aromakomponenten

#### 5.4.1 Probenvorbereitung

Die Gefriertrocknung von Pflanzenmaterial erfolgte an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) mit Chemie Hybridpumpe RC5 (Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim).

Frisches oder gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial wurde mit der Analysenmühle Yellow Line A10 mit Kühllanschluss (IKA Werke GmbH, Staufen) für 5 min bei 12 °C gemahlen und anschließend auf Korngrößen < 0,5 mm gesiebt.

#### 5.4.2 Wasserdampfdestillation der ätherischen Öle (WDD)

Jeweils 10 g frisches Pflanzenmaterial wurden in Wasser (reinst) suspendiert, mit einem Labormixer 7010G (Waring Commercial, Torrington, USA) für 1 min homogenisiert und dann einer 2-stündigen Wasserdampfdestillation (WDD) an einer Destillationsapparatur zur Be-

stimmung der ätherischen Öle in Drogen nach DAB 10 (1991) (Klaus Hofmann GmbH, Staudt) unter Verwendung einer WM-Heizhaube (MOHR & Co. Laborhandelsgesellschaft mbH, Leimen) unterzogen. Aus dem abgelesenen Volumen des ätherischen Öles wurde der Gehalt an ätherischem Öl in ml/100g Pflanzenmaterial berechnet. Von jeder vorhandenen biologischen Wiederholung wurden jeweils zwei analytische Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend die Mittelwerte bestimmt.

Für eine nachfolgende gaschromatographische Bestimmung wurde das gewonnene ätherische Öl in 2 ml n-Hexan aufgenommen und anschließend 1:10 mit n-Hexan verdünnt.

#### **5.4.3 Lösungsmittlextraktion der Aromakomponenten (LME)**

In einem 100 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 g der gemahlene gefriergetrocknete bzw. 10 g der gemahlene frische Pflanzenprobe mit 2 g Natriumsulfat und 50 ml n-Hexan (p.a.) am Ultra-Turrax T25 (IKA Werke GmbH, Staufen) homogenisiert und anschließend für 5 min bei 5.000 U/min zentrifugiert (Heraeus Sepatech Megafuge 2.0, Kendro Laboratory Products GmbH, Berlin). Die Extraktion wurde mit weiteren 30 ml n-Hexan wiederholt, die Extrakte in einem 100 ml Rundkolben vereinigt und am Rotationsverdampfer Rotavapor 114 mit Waterbath B-480 und Vacuum Controller V-513 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen) bei 35 °C unter Vakuum eingeengt. Lösungsmittelreste wurden mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 2 ml n-Hexan (HPLC-rein) aufgenommen und für die Gaschromatographie 1:10 mit n-Hexan verdünnt.

#### **5.4.4 Beschleunigte Lösungsmittlextraktion der Aromakomponenten (ASE)**

5 g des gemahlene gefriergetrocknete Pflanzenmaterials bzw. 10 g des gemahlene frische Pflanzenmaterials wurden mit 5 g Diatomenerde vermischt und die Aromakomponenten aus 33 ml ASE-Zellen mit n-Hexan (p.a.) in 60 ml ASE-Vials an der ASE 200 (Dionex GmbH, Idstein) extrahiert. Die Extraktion erfolgte in einem Zyklus nach 5-minütiger Heizzeit für 5 min statisch bei 100 °C und 14 MPa mit 60 % Spülvolumen bei 200 s Spülzeit. Die gewonnenen Extrakte wurden in einen 100 ml Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer Rotavapor 114 mit Waterbath B-480 und Vacuum Controller V-513 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen) bei 35 °C unter Vakuum eingeengt. Reste an Lösungsmittel wurden mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 2 ml n-Hexan (HPLC-rein) aufgenommen und für die gaschromatographische Bestimmung 1:10 mit n-Hexan verdünnt.

#### **5.4.5 Extraktion der Aromakomponenten mit überkritischem Kohlendioxid (SFE)**

In eine 9 ml Polymerkartusche für die SFE wurden zunächst 2 g Seesand (Siebeffekt: hält fein gemahlene Material zurück und schützt damit vor dem Verstopfen der Restriktorgänge) und darauf jeweils 7,5 g gemahlene frische Majoran bzw. 2,5 g gemahlene gefriergetrocknete Majoran eingewogen. Dann wurden die Aromakomponenten am SFX 220 SFE Extractor mit 100DX Syringe Pump, SFX 200 Controller Extraktor und Restrictor Temperature Controller (ISCO Inc., Lincoln, USA) mit überkritischem Kohlendioxid bei einem Fluss von 1 ml/min bei 40 °C und 210 bar für 2 min statisch und anschließend 20 min dynamisch extrahiert. Zum Auffangen des Extraktes wurde der Restriktor bei 30 °C temperiert und 8 ml n-Hexan (HPLC-rein) vorgelegt. Der in n-Hexan aufgefangene Extrakt wurde anschließend auf 5 ml aufgefüllt und so gaschromatographisch analysiert.

#### **5.4.6 Festphasenmikroextraktion der Aromakomponenten (SPME)**

50 mg gefriergetrocknete und anschließend bei 12 °C auf Korngrößen < 0,5 mm gemahlene Pflanzenmaterial wurden in ein 20 ml HS-SPME Vial eingewogen. Die Festphasenmikroextraktion und anschließende Desorption der Analyten im Injektor des Gaschroma-

tographen wurden mit Hilfe des CombiPAL Probengebers mit zugehöriger Cycle Composer Software (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) voll automatisiert durchgeführt. Dabei wurde eine PDMS (Polydimethylsiloxan) 100 µm Faser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) für die Head Space (HS) Extraktion eingesetzt. Nach 5-minütiger Vorinkubation bei 40 °C erfolgte die Extraktion unter Schütteln (500 U/min) für 10 min bei gleicher Temperatur. Die Analyten wurden im Split/Splitlos-Injektor (SSL) des Gaschromatographen bei 200 °C für 1 min bei einem Split von 1:20 von der Faser desorbiert. Anschließend wurde die SPME-Faser für die nächste Extraktion für 15 min rekonditioniert.

#### **5.4.7 Gaschromatographische Bestimmung der Aromakomponenten**

Die gaschromatographische Bestimmung der SPME-extrahierten flüchtigen Inhaltsstoffe der Pflanzen erfolgte an einem TRACE GC mit Flammenionisationsdetektion (FID) (Thermo Finnigan, Dreieich) mit Hilfe der Chrom Perfect Software (Axel Semrau GmbH + Co. KG, Sprockhoevel). Die Trennung erfolgte dabei an einer DB-5 MS oder einer DB-1 MS GC-Kapillarsäule (je 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm; Agilent Technologies, Böblingen) bei einem Temperaturgradienten von 80 °C (2 min) / 10 °C/min / 270 °C (10 min). Als Trägergas wurde Helium bei einem Fluss von 1 ml/min eingesetzt. Die Flüssiginjektion von Extraktlösungen oder Standardlösungen erfolgte im SSL bei 200 °C mit 1 µl bei einem Split von 1:100. Bei HS-SPME/GC wurde die Faser, wie oben beschrieben, im Injektor bei 200 °C desorbiert. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID) bei 280 °C. Zur quantitativen Auswertung wurde die Zusammensetzung der Aromakomponenten als Peakflächen-Prozent bestimmt. Von jeder vorhandenen biologischen Wiederholung wurden jeweils zwei analytische Doppelbestimmungen inklusive Extraktion durchgeführt und nach der gaschromatographischen Analyse die Mittelwerte bestimmt.

#### **5.4.8 GC/MS zur Identifizierung der Aromakomponenten**

Die Identifizierung der Aromakomponenten erfolgte stets zweidimensional durch Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren von Probenkomponenten mit den Retentionszeiten und Massenspektren von kommerziell erwerblichen Referenzsubstanzen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) sowie von Datenbankeinträgen. Die Datenbank „Terpenoids and Related Compounds in Essential Oils“ (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg) ermöglichte dabei mit Hilfe der MassFinder Software 2.3 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg) ebenfalls eine zweidimensionale Identifizierung aufgrund von Massenspektrum und Retentionsindex. Des Weiteren wurden umfangreiche Literaturdaten [ADAMS, 1995; BARAZANDEH, 2001; BLUM, 1999; CZYGAN und HÄNSEL, 1993; FISCHER et al., 1987; HUDAIB et al., 2002; KOMAITIS, 1992; OSZAGYAN et al., 1996; PEREIRA, 2000; VERA und CHANE-MING, 1999], ebenfalls in Form von Retentionsindices und soweit vorhanden auch Massenspektren, in die Identifizierung einbezogen.

GC/MS wurde dazu am GCQ (GC/MS mit Ionenfalle) mit zugehöriger GCQ Software (Axel Semrau GmbH + Co. KG, Sprockhoevel) durchgeführt. Die gaschromatographischen Bedingungen entsprachen den Bedingungen der GC/FID. Die Transfer Line wurde bei 275 °C temperiert, die Ionenquelle bei 180 °C. Die Massenspektren wurden nach positiver EI (Electron Impact)-Ionisierung bei einer Scanrate von 0,8 s/scan im Full Scan Modus von 35 bis 300 Dalton aufgenommen.

### **5.5 Bestimmung der Hypericine aus Johanniskraut**

Für die Bestimmung von Hypericinverbindungen wurde das frisch geerntete oder nach der Ernte sofort tiefgefroren gelagerte Kraut des Johanniskrauts aus Gewächshaus- und Feldversuchen eingesetzt. Das Pflanzenmaterial musste zunächst in einer Vorextraktion von Chlorophyll befreit werden, bevor anschließend die Hypericinverbindungen extrahiert wurden. Durch definierte Lichtbestrahlung wurden vorhandene Protonenverbindungen in den Extrakt-

ten dann in ihre Produkte umgewandelt, um diese anschließend mittels HPLC als Hypericin und Pseudohypericin zu bestimmen.

### 5.5.1 Probenvorbereitung und Extraktion

1 g luftgetrocknete, gemahlene Probe wurde gemeinsam mit ca. 2,2 g Diatomenerde in eine 11 ml Extraktionszelle gegeben. Zur Abtrennung des störenden Chlorophylls erfolgte an der ASE 200 (Dionex GmbH, Idstein) eine Vorextraktion mit Dichlormethan in ein 40 ml Vial. Die Extraktion erfolgte dazu nach 5-minütigem Vorheizen für 5 min statisch bei 100 °C und 10 MPa in einem Zyklus bei 200 s Spülzeit und 60 % Spülvolumen. Der hieraus resultierende Chlorophyllextrakt wurde verworfen.

Angelehnt an die von MORF et al. (1998) beschriebene Methode erfolgte danach die eigentliche Extraktion der Hypericinverbindungen an der ASE 200 (Dionex GmbH, Idstein) mit Methanol in 4 Zyklen. Dabei wurde nach 5 minütigem Vorheizen für 5 min statisch bei 100 °C und 10 MPa bei 100 s Spülzeit und 150 % Spülvolumen in ein 60 ml Vial extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde auf 50 ml mit Methanol aufgefüllt. Dabei wurden alle Arbeiten unter Lichtschutz durchgeführt.

Zur Umwandlung der Protoverbindungen Protohypericin und Protopseudohypericin in ihre Endprodukte Hypericin und Pseudohypericin wurden die Extrakte einer 30-minütigen Bestrahlung mit Kunstlicht (NARVA LT 58 W/020, cool white; 2 Röhren) unterzogen.

### 5.5.2 Analytische Bestimmung der Hypericine

Die lichtbestrahlte Extraktlösung wurde 1:5 mit Methanol verdünnt und die Verbindungen Hypericin und Pseudohypericin wurden, wie von KRÄMER und WIARTALLA (1992) beschrieben, analytisch mittels HPLC mit Gradientenpumpe GP50, Autosampler AS 40, Photodiodenarray-Detektor 100 und zugehöriger Software Chromeleon (Dionex GmbH, Idstein) bei 590 nm bestimmt. Nach Injektion von 25 µl der Extraktlösungen erfolgte die Trennung an einer DISCOVERY C8 Säule (25 cm, 4,6 mm, 5 µm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) isokratisch bei einem Fluss von 0,8 ml/min. Der Eluent bestand aus 1893,4 g Methanol, 526,0 g Ethylacetat und 618,4 g 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 2,1). Die quantitative Bestimmung erfolgte nach Kalibration mit den Standardsubstanzen Hypericin und Pseudohypericin. Von jeder biologischen Wiederholung wurden jeweils zwei Extraktionen durchgeführt, die Extrakte jeweils doppelt mittels HPLC analysiert und schließlich die Mittelwerte aus allen Messungen berechnet.

## 5.6 Bestimmung von Enzymen und Antioxidantien des Antioxidativen Systems und des Grades der Lipidperoxidation

### 5.6.1 Versuchsbeschreibung

Zur Bestimmung von Enzymen und Antioxidantien des Antioxidativen Systems wurden im Gewächshaus Topfkulturen von zwei verschiedenen Johanniskrautsorten angelegt. Dies war zum einen die auch in den anderen Feld- und Gewächshausversuchen eingesetzte Sorte ‚Topaz‘, bei der es sich um eine häufig eingesetzte Kultursorte handelt. Zum anderen wurde eine von der BAZ (Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen) in Quedlinburg zur Verfügung gestellte und gegen den Erreger der Johanniskrautwelke anfälligerere Sorte eingesetzt (im Folgenden „anfälliger Standard“ genannt).

Zur Anzucht der Johanniskrautpflanzen beider Sorten wurde oberflächensterilisiertes Saatgut auf Gewebekultur-Medium (Murashige + Skoog-Agar, Duchefa Biochemie, Haarlem; Niederlande) mit Saccharose sowie Vitaminen ausgelegt und nach der Keimung der Pflanzen in Multitopfpaletten pikiert. Alternativ erfolgte die Aussaat der Johanniskrautsamen direkt in das Pflanzsubstrat. Als Pflanzsubstrat wurde eine 1:1-Mischung aus Oil Dri (Oil Dri Chem Sorb Typ III R, Damolin Mettmann GmbH, Mettmann) und Seramis (Masterfoods GmbH, Verden) verwendet. Etwa 3 Wochen nach dem Auflaufen wurden die Pflänzchen in Multitopfpaletten

pikiert. Die Hälfte der Pflanzen beider Sorten wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zumischung von 20 % AMykor<sup>®</sup>-Blähton zum Pflanzsubstrat mykorrhiziert, der andere Teil diente als nicht mykorrhizierte Kontrolle. Nach weiteren 4 Wochen Wachstum wurden die Pflanzen in 13 cm Töpfe ausgepflanzt. Für mykorrhizierte Pflanzen wurde dem Pflanzsubstrat nochmals 20 % AMykor<sup>®</sup>-Blähton zugemischt. Gedüngt wurde einmal wöchentlich mit 20 ml 0,05 % Wuxal Top N (N/P/K: 12/4/6, Aglukon Spezialdünger GmbH & Co. KG, Düsseldorf).

Nach insgesamt etwa 10-wöchiger Kulturdauer wurde je ein Teil der mykorrhizierten und der nicht mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen beider Sorten mit dem Erreger der Johanniskrautwelke, *Colletotrichum cf. gloeosporioides*, inokuliert. Die Inokulation der Topfkulturen mit dem Erreger erfolgte in drei verschiedenen Konzentrationen:

- nicht inokulierte Kontrolle,
- Inokulation mit einer Konidiendichte von  $10^3$  Konidien / ml und
- Inokulation mit einer Konidiendichte von  $10^5$  Konidien / ml

Dabei wurden je 25 ml Erregersuspension unmittelbar an den Stängelgrund der Pflanze ausgebracht.

Insgesamt ergaben sich 12 Varianten für die Gewächshausanzucht und Behandlung der Topfkulturen (siehe Tab. 2)

Tab. 2 Versuchsplan zur Bestimmung des antioxidativen Status von Johanniskraut

Prüfglied	Johanniskrautsorte	AM-Behandlung	<i>Coll. cf. gloeosp.</i>	Messung (DAT)
1	„anfälliger Standard“	Kontrolle	Kontrolle	10, 20 und 30
2	„anfälliger Standard“	Kontrolle	$10^3$	10, 20 und 30
3	„anfälliger Standard“	Kontrolle	$10^5$	10, 20 und 30
4	„anfälliger Standard“	AMykor	Kontrolle	10, 20 und 30
5	„anfälliger Standard“	AMykor	$10^3$	10, 20 und 30
6	„anfälliger Standard“	AMykor	$10^5$	10, 20 und 30
7	„Topaz“	Kontrolle	Kontrolle	10, 20 und 30
8	„Topaz“	Kontrolle	$10^3$	10, 20 und 30
9	„Topaz“	Kontrolle	$10^5$	10, 20 und 30
10	„Topaz“	AMykor	Kontrolle	10, 20 und 30
11	„Topaz“	AMykor	$10^3$	10, 20 und 30
12	„Topaz“	AMykor	$10^5$	10, 20 und 30

Von jeder Variante wurden zu drei Zeitpunkten, jeweils 10, 20 bzw. 30 Tage nach der Inokulation mit dem Erreger, die Enzyme und Antioxidantien des Antioxidativen Systems gemessen. Davon erfolgte die Bestimmung folgender Parameter:

- CAT (Katalase)
- APX (Ascorbat-Peroxidase)
- MDHAR (Monodehydroascorbat-Reduktase)
- DHAR (Dehydroascorbat-Reduktase)
- GR (Glutathion-Reduktase)
- GST (Glutathion-S-Transferase)
- Glutathion-Gehalte (reduziert, oxidiert, total)
- Ascorbat-Gehalte (reduziert, oxidiert, total)
- Malondialdehyd (als Parameter für den Grad der Lipidperoxidation)

Der gesamte Versuchsansatz laut Tab. 2 wurde je zweimal an der Sorte „Topaz“ und einmal an der „anfälligen Standardsorte“ durchgeführt. Pro Pflanze erfolgten jeweils weitere vier Wiederholungsmessungen. Die Ergebnisse aller durchgeführten Testreihen unterschieden sich grundsätzlich nicht, so dass im Ergebnisteil jeweils nur eine Versuchsreihe exemplarisch dargestellt und ausgewertet wird.

### 5.6.2 Messung von Enzymen des Antioxidativen Systems

0,5 g Wurzel wurden zur Extraktion der Enzyme mit etwas Seesand in 3 ml kaltem Extraktionspuffer (0,1 M TRIS/HCl, pH=7,8; 0,1 mM EDTA; 7,5 % w/v PVPP) unter Eiskühlung im Mörser gemahlen und homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension bei 10.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Centrifuge 541712, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde bis zur endgültigen enzymkinetischen Bestimmung der einzelnen Parameter auf Eis gehalten. Pro Pflanze erfolgten jeweils vier Extraktionswiederholungen.

Die Messungen der Enzymaktivitäten erfolgten enzymkinetisch mittels spektrophotometrischer Detektion der bei der jeweiligen Reaktion abgebauten Substrate bzw. der gebildeten Reaktionsprodukte über einen Zeitraum von 3 min am Photometer UV-DW 7400 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld). Dabei wurde dest. Wasser als Blank eingesetzt und jeweils eine enzym- bzw. substratfreie chemische Kontrolle mitgeführt.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität der **Katalase** (E.C. 1.11.1.6) wurde in Anlehnung an AEBI (1984) die photometrische Messung des Abbaus von Wasserstoffperoxid bei 240 nm ( $\epsilon = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) herangezogen. Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  Wurzelextrakt in 2 ml  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Puffer (0,1 M, pH 6,5) mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,75 %) versetzt und enzymkinetisch gegen dest. Wasser vermessen.

Die Aktivität der **Ascorbat-Peroxidase** (E.C. 1.11.1.11) wurde über die Abnahme der Extinktion bei enzymatischer Oxidation von Ascorbinsäure ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) photometrisch bei 290 nm bestimmt [ASADA, 1992; NAKANO und ASADA, 1981]. 50  $\mu\text{l}$  Wurzelextrakt wurden dabei in 2 ml TRIS-Puffer (0,05 M, pH 7,8) mit 100  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäure (0,1 %) und 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 %) versetzt und enzymkinetisch gegen dest. Wasser vermessen. Die Extinktionsänderung einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -freien Kontrollmessung wurde für die Berechnung der Enzymaktivität abgezogen.

Die **Monodehydroascorbat-Reduktase**-(E.C. 1.6.5.4.)-Aktivität wurde als Abnahme der Absorption bei 340 nm infolge der Oxidation von NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ermittelt [HOS-SAIN et al., 1984]. Der Messansatz für die Enzymkinetik bestand dazu aus 2 ml TRIS-HCl-Puffer (0,2 M, pH 7,8), 100  $\mu\text{l}$  Ascorbinsäure (24 mM, in 0,2 M TRIS-HCl-Puffer, pH 7,8), 100  $\mu\text{l}$  NADH (2,4 mM in 0,2 M TRIS-HCl-Puffer, pH 7,8), 100  $\mu\text{l}$  Ascorbatoxidase (4,8 units/mol, in 0,2 M TRIS-HCl-Puffer, pH 7,8) und 100  $\mu\text{l}$  Wurzelextrakt. Parallel erfolgte eine enzymfreie Kontrollmessung.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität der **Dehydroascorbat-Reduktase** (E.C. 1.8.5.1) wurde die Absorptionssteigerung bei der Bildung von reduzierter Ascorbinsäure ( $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) photometrisch bei 265 nm vermessen [KLAPHECK et al., 1990]. Dabei bildeten 100  $\mu\text{l}$  Wurzelextrakt in 2 ml  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Puffer (0,05 M, pH 6,5) mit 100  $\mu\text{l}$  Dehydroascorbinsäure (0,2 %, in 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,5) und 100  $\mu\text{l}$  reduziertem Glutathion (0,7 %, in 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,5) den Messansatz. Die Absorptionsänderung einer extraktfreien chemischen Kontrolle wurde parallel dokumentiert.

Über die photometrische Messung bei 340 nm des durch Oxidation verursachten Abbaus von NADPH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) wurde die Aktivität der **Glutathion-Reduktase** (E.C. 1.6.4.2.) bestimmt [KLAPHECK et al., 1990; SMITH et al., 1989]. Dazu erfolgte die enzymkinetische Vermessung des Testansatzes aus 100  $\mu\text{l}$  Wurzelextrakt in 2 ml TRIS/HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,8) mit 300  $\mu\text{l}$  oxidiertem Glutathion (0,3 %, in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7,8) und 100  $\mu\text{l}$  NADPH (0,2 %, in 0,05 M TRIS/HCl-Puffer, pH 7,8). Als chemische Kontrolle wurde die Messung zusätzlich ohne Glutathion durchgeführt.

Für die Bestimmung der Aktivität der **Glutathion-S-Transferase** (E.C. 2.5.1.18.) wurde die Bildung des Konjugates S-2,4-Dinitrophenylglutathion ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) aus 1-Chloro-2,4-

dinitrobenzen und reduziertem Glutathion photometrisch bei 340 nm nachvollzogen [MARRS, 1996; MAUCH und DUDLER, 1993]. Der Messansatz enthielt dazu 50 µl Wurzel-extrakt in 2 ml Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (0,1 M, 1 mM EDTA, pH 6,5) mit 150 µl 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (0,377 %, in Ethanol) und 500 µl reduziertes Glutathion (0,62 %, in 0,1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer + 1 mM EDTA, pH 6,5). Parallel erfolgte die Messung der Absorptionsänderung einer extraktfreien chemischen Kontrolle.

Die **Berechnung der Enzymaktivitäten** erfolgte in µmol Substrat bzw. Produkt pro g Wurzelmaterial und min auf der Basis der gemessenen Extinktionsänderungen abzüglich der Messwerte der mitgeführten chemischen Kontrolle.

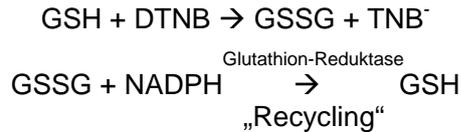
### 5.6.3 Messung von Antioxidantien des Antioxidativen Systems

Die Bestimmung der Antioxidantien Ascorbinsäure und Glutathion jeweils in reduzierter und in oxidiert Form erfolgte in Anlehnung an die von KNÖRZER et al. (1996) beschriebenen Methoden. 0,5 g Wurzel wurden zur Extraktion von Ascorbat und Glutathion mit Hilfe von etwas Seesand in 2,5 ml kaltem Extraktionspuffer (5 % Metaphosphorsäure) unter Eiskühlung im Mörser gemahlen und homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension bei 10.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Centrifuge 541712, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde bis zur endgültigen Bestimmung der einzelnen Parameter auf Eis gehalten. Pro Pflanze fanden jeweils vier Extraktionswiederholungen statt.

**Ascorbinsäure** wurde nach KNÖRZER et al. (1996) in der reduzierten Form als reduziertes Ascorbat (AsA) bestimmt sowie als Gesamt-Ascorbat (AsA + DAsA). Für die Bestimmung des AsA wurden 125 µl Wurzelextrakt mit 25 µl Triethanolamin (1,5 M) neutralisiert, gut gemischt, dann mit 150 µl Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (150 mM, pH 7,4) und 150 µl reinst Wasser versetzt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bestimmung des Gesamt-Ascorbats wurden zur Reduktion des enthaltenen oxidierten Ascorbats (DAsA) anstelle von Wasser 75 µl DTT (10 mM) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges DTT wurde anschließend durch 75 µl N-Ethylmaleimid (0,5 %) entfernt.

Anschließend wurden beide Proben identisch weiterbehandelt. Nacheinander wurden 300 µl TCA (10 %), 300 µl Phosphorsäure (44 %), 300 µl Dipyridil (4 %, in 70 % Ethanol) und 150 µl FeCl<sub>3</sub> (2 %) zugegeben, bevor für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Es wurde jeweils eine extraktfreie chemische Kontrolle mitgeführt. Darauf folgte die photometrische Vermessung von AsA am Photometer UV-DW 7400 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) bei 525 nm. Zur Kalibration wurde eine Standardkurve von AsA im Bereich von 10 bis 200 µmol/l in 5 % Metaphosphorsäure angelegt. Die Konzentration an DAsA wurde als Differenz aus dem Gesamtascorbatgehalt und dem Gehalt an AsA berechnet.

Für **Glutathion** erfolgte die Bestimmung in Form des Gesamtgehaltes an Glutathion (reduziert, GSH und oxidiert, GSSG) sowie des Gehaltes an oxidiertem Glutathion (GSSG) [GRIFFITH, 1980; KNÖRZER et al., 1996]. GSH wurde dann als Differenz des Gesamt-Glutathions und des GSSG berechnet. Zur Bestimmung des Gesamt-Glutathions wurden zunächst 100 µl Wurzelextrakt mit 24 µl Triethanolamin (1,5 M) neutralisiert und mit 16 µl reinst Wasser versetzt. Für die Bestimmung des GSSG wurde GSH in einem parallelen Testansatz mittels 4 µl 2-Vinylpyridin (ersetzte 4 µl des Wassers im ersten Inkubationsschritt) blockiert und die Probe nach gutem Mischen für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Messung von Glutathion erfolgte dann für beide Testansätze enzymkinetisch nach Mischung von 700 µl K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (50 mM + 2,5 mM EDTA, pH 7,5), 100 µl 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, 10 mM, in K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer), 100 µl NADPH (2 mM, in K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer) und 100 µl Glutathion-Reduktase (2 units pro Probe, in K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer) mit 20 µl des vorbereiteten Extrakts. Dabei wurde am Photometer UV-DW 7400 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) über 3 min bei 412 nm die Absorptionsänderung während der Bildung eines farbigen Anions (5-Thio-2-nitrobenzoat-Anion, TNB<sup>-</sup>) nach folgender Reaktionskette nachvollzogen:



Die Kalibration der Gehalte erfolgte ebenfalls enzymkinetisch mit GSH-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .

#### 5.6.4 Messung von Malondialdehyd als Parameter für die Lipidperoxidation

Malondialdehyd (MDA) ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation, das ausschließlich aus mehrfach ungesättigten Lipiden entsteht. Nach SCHÖNFELDER (1999) entsteht im Laufe der Oxidation von Lipidketten mit mehrfach isolierten Doppelbindungen ein Peroxyl-Radikal. Dieses stabilisiert sich zu einem zyklischen Peroxid, aus dem ein bicyklisches Endoperoxid hervorgeht. Im sauren Milieu und bei hohen Temperaturen wird aus den Endoperoxiden MDA freigesetzt. Bei der im Rahmen der Untersuchungen angewandten Bestimmungsmethode des MDA wird es durch seine Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBA) als roter Farbstoff nachgewiesen (siehe Abb. 8) [HEITKAMP, 1999].

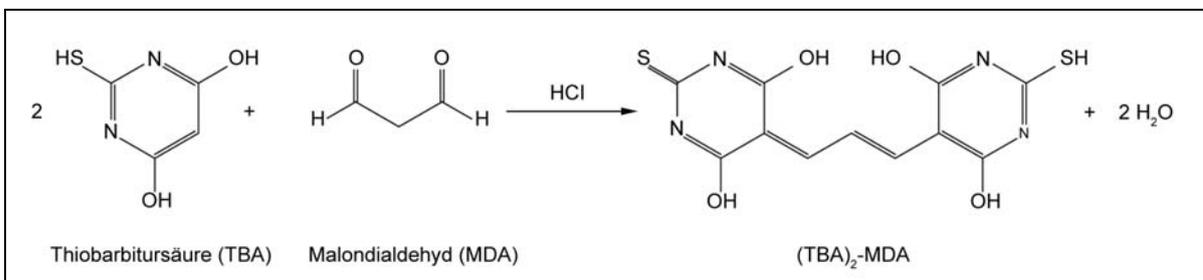


Abb. 8 Reaktion von Malondialdehyd mit 2-Thiobarbitursäure zu nachweisbarem roten Farbstoff  
[nach SCHÖNFELDER, 1999]

Die Bestimmung des Status der Lipidperoxidation anhand des MDA wurde in Anlehnung an PEEVER und HIGGINS (1989) durchgeführt. Dabei wurden zunächst 0,5 g Wurzelmaterial mit etwas Seesand in 2 ml Extraktionspuffer (0,1 M TRIS-Puffer, pH 7,8; 1 mM EDTA; 7 % PVPP K-25) unter Eiskühlung durch Mörsern extrahiert und anschließend bei 10.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Centrifuge 541712, Eppendorf AG, Hamburg). 400  $\mu\text{l}$  der Extraktlösung wurden dann mit 800  $\mu\text{l}$  TBA-Lösung (15 % Trichloressigsäure; 0,25 mol/l HCl; 0,375 % TBA) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden 1200  $\mu\text{l}$  TBA-Lösung ohne Enzymextrakt mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lösungen 20 min in kochendem Wasser mit Hilfe des Heizblocks HBT 131-1 (HLC – Haep Labor Consult, Bovenden) erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15.000 U/min wurden die Lösungen in Küvetten überführt und am Photometer UV-DW 7400 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) bei 535 nm gegen Wasser vermessen.

Die Berechnung der molaren MDA-Konzentration in mmol/l erfolgte nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit dem molaren Absorptionskoeffizienten für MDA von  $\varepsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die Daten berechnet als Konzentration an MDA in der Frischmasse (Wurzel) angegeben.

## 5.7 Detektion systemischer Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine mittels 2-D-Elektrophorese

### 5.7.1 Versuchsbeschreibung

Für die Bestimmung der Proteinmuster von **Majoran** wurden jeweils zwei Pflanzen mykorrhizierten und drei Pflanzen nicht mykorrhizierten Majorans im Gewächshaus kultiviert und für die 2-D-Elektrophorese der Proteine des oberirdischen Pflanzenmaterials (Kraut) herangezogen. Von jeder dieser Pflanzen wurden die Proteine extrahiert und in jeweils 8 Wiederholungen die 2-D-Elektrophorese durchgeführt. Damit stand eine ausreichende Anzahl an Gelen für eine gesicherte Aussage über die durch die Mykorrhizierung hoch- oder herunterregulierten Proteine zur Verfügung.

Bei den Proteinuntersuchungen des **Johanniskrauts** wurden zwei Johanniskrautsorten in die Betrachtungen einbezogen. Diese waren eine auf gesteigerte Resistenz gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* gezüchtete Sorte „Topaz“, die auch in den sonstigen Feldanbau- und Gewächshausversuchen innerhalb des Forschungsprojektes zum Einsatz kam, sowie eine von der BAZ, Quedlinburg, zur Verfügung gestellte anfälligere Johanniskrautsorte (im Folgenden „anfälliger Standard“). Von beiden Sorten wurden jeweils zwei Pflanzen mykorrhiziert und je zwei Pflanzen nicht mykorrhiziert im Gewächshaus kultiviert und für die 2-D-Elektrophorese der Proteine des oberirdischen Pflanzenmaterials herangezogen. Auch hier wurden die Proteine extrahiert und die 2-D-Elektrophorese in jeweils 7 bis 10 Wiederholungen durchgeführt. Damit stand auch für die Proteinuntersuchungen von Johanniskraut eine ausreichende Anzahl an Gelen für eine gesicherte Aussage über die durch die Mykorrhizierung bzw. auch durch die Johanniskrautsorte unterschiedlich regulierten Proteine zur Verfügung.

Mit Hilfe der Software PDQuest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden schließlich jeweils für Majoran bzw. für Johanniskraut alle Gele ausgewertet, um statistisch gesichert alle die Proteinspots zu detektieren, die nur bei Behandlung mit dem Mykorrhiza-Inokulum bzw. im Falle von Johanniskraut auch in Abhängigkeit von der untersuchten Sorte in ihrer Quantität erhöht oder verringert waren.

### 5.7.2 Probenvorbereitung für die 2-D-Elektrophorese

Für die Proteintrennung mittels 2-D-Elektrophorese kamen je 3 g des aus Gewächshauskulturen frisch geernteten, von den Stängeln befreiten Krautes von Majoran und Johanniskraut zum Einsatz. Die Zellwände des Pflanzenmaterials wurden durch Zerreiben in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und die enthaltenen Proteine mit 10 ml TCA-Aceton-Lösung (1 g TCA auf 10 ml Aceton, 6,3 µl 2-Mercaptoethanol) gefällt. Die Fällung erfolgte in sechs Aliquoten in Eppendorf-Tubes über 2 Stunden bei -20 °C. Nach Zentrifugation (Centrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg) wurden die Überstände mit Hilfe der Vakuumpumpe XF 54 230 50 (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) abgesaugt und das Proteinpellet mindestens dreimal mit Waschlösung (10 ml Aceton, 6,3 µl 2-Mercaptoethanol) gewaschen, dabei tiefgekühlt über 30 min erneut gefällt und die Überstände zwischen den Waschschrritten jeweils nach Zentrifugation abgesaugt. Daran schloss sich eine Trocknung des Proteinpellets mittels Vakuumzentrifugation am Concentrator 5301 (Eppendorf AG, Hamburg) an. Das so gewonnene Proteinpellet wurde sofort in den Lösungspuffer aufgenommen oder in dieser Form bei -80 °C im Gefrierschrank MDF U52V, VIP series -86 °C (EWALD Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf) gelagert.

20 bis 30 mg gefälltes Protein sind dann in 1 ml Rehydratisierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % C7BzO, 50 mM DTT, 1 % Ampholyte, 0,005 % Bromphenolblau) aufgenommen worden, indem die Lösung nach kurzem Vortexen (Minishaker MS2, IKA Werke GmbH, Staufen) und Lösen im Ultraschallbad Elma Transsonic 310 (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen) 1 h bei 37 °C unter Schütteln im Schüttelinkubator Thermomixer

comfort (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert wurde. Die Inkubation wurde nach nochmaligem Vortexen wiederholt und die Proteinlösung nach abschließender Zentrifugation abgenommen. Falls die Probe nicht unmittelbar analysiert werden sollte, ließ sie sich in dieser Form bei -80 °C lagern.

### 5.7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem 2-D Quant Kit (GE Healthcare Europe GmbH, München) entsprechend der Kit-zugehörigen Arbeitsvorschrift am Photometer Specord 200 (Analytik Jena AG, Jena) durchgeführt. Dabei wurde das in der Lösung vorhandene Protein zunächst selektiv und quantitativ gefällt. Das gefällte Protein wurde danach in einer Kupferlösung resuspendiert, wobei Proteine an das in der Lösung enthaltene Kupfer bunden. Über eine colorimetrische Bestimmung des ungebundenen Kupfers war der Proteingehalt der Lösung in Form einer indirekten Kalibration bestimmbar.

### 5.7.4 Erste Dimension der 2-D-Elektrophorese: IEF

Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 17 cm IPG-Streifen, pH 3-10, zunächst durch In-Gel-Rehydratisierung mit 330 µl der hergestellten Proteinlösung (verdünnt auf eine Endkonzentration von 2,4 mg Protein/ml entsprechend 800 µg Protein pro IPG-Streifen) für 16 Stunden über Nacht bei 20 °C rehydratisiert. Unmittelbar nach der Rehydratisierung erfolgte die Fokussierung mit der Protean IEF-Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit einem linearen Spannungsanstieg in drei Stufen auf zunächst 150 V in einer Stunde, dann 300 V in der nächsten Stunde und auf 600 V in einer weiteren Stunde, gefolgt von einem schnellstmöglichen Anstieg auf 8.000 V in der vierten Stufe bei einer Gesamtentwicklung von 24.000 Vh.

Falls sich die SDS-PAGE nicht direkt anschließen sollte, wurden die fokussierten IPG-Streifen auch in Folie bei -80 °C gelagert.

### 5.7.5 Zweite Dimension der 2-D-Elektrophorese: SDS-PAGE

Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden vor der SDS-PAGE für 15 min in der ersten Äquibrierungslösung (50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % SDS; 0,002 % Bromphenolblau; 1 % DTT) und anschließend für 15 min in der zweiten Äquibrierungslösung (50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % SDS; 0,002 % Bromphenolblau; 2,6 % IAA) äquilibriert.

Für die SDS-PAGE wurden TRIS-HCl-Gradientengele mit einem Acrylamidkonzentrations-Gradienten von T = 8-16 % der Größe 20 x 20,5 cm mit Hilfe des Gradientenmischers Model 495 und der Protean plus Multi-Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit Gelgießkassetten 20 x 20,5 cm für 1,5 mm Gelstärke aus den in Tab. 3 aufgeführten Lösungen gegossen. TEMED und APS wurden dabei zur Polymerisation erst kurz vor dem Gießen zugegeben. Die Gele wurden dann mit 0,1 %-iger SDS-Lösung durch Besprühen überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von etwa 4 Stunden.

Tab. 3 Lösungen für die Herstellung der Gradientengele

	8 %-ige Gellösung	16,5 %-ige Gellösung
30 % Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid	142,55 ml	288,20 ml
1,5M TRIS-HCl Puffer, pH 8.8	133,83 ml	130,71 ml
Glycerol	-	52,36 ml
dest. H <sub>2</sub> O	258,16 ml	52,36 ml
TEMED	133,83 µl	130,71 µl
10 % APS	2,67 ml	2,62 ml
Gesamtvolumen	535 ml	525 ml

Die Oberfläche der vorbereiteten Gele wurde danach von der Übersichtungslösung befreit und trocken getupft. Anschließend wurden die äquilibrierten IPG-Streifen luftblasenfrei aufgelegt und mit heißer Agarose fixiert.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte in der Elektrophoresekammer Protean plus Dodeca Cell mit der Spannungsquelle Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter Kühlung bei 20 °C zunächst für einen langsamen Probeneintritt 90 min bei 50 Volt und dann für 5 bis 6 Stunden bei 200 V bis die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte.

### 5.7.6 Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele

Für die Coomassiefärbung wurden jeweils 2 Gele in einer Färbeschale mit 500 ml Färbelösung (0,1 % Brillant Blau R 250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) ca. 4 Stunden unter leichtem Schütteln (Schüttler DE 24 Sarstedt-Gruppe, DESAGA GmbH, Wiesloch) gefärbt. Anschließend sind die Gele in die Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) überführt worden. Die Entfärbung erfolgte über einen Zeitraum von etwa 4 Stunden unter Schütteln bis der Gelhintergrund entfärbt war. Die Entfärbelösung wurde dabei mindestens alle 2 Stunden gewechselt.

Für die Silberfärbung [nach BLUM et al., 1987] mussten die Proteine im Gel fixiert werden. Dazu wurden sie zunächst für 4 Stunden in der Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) auf dem Schüttler leicht bewegt. Danach folgten drei 20-minütige Waschschriffe in 30 %-iger Ethanolösung. Für genau eine Minute wurde das Gel dann in 0,02 %-ige Thiosulfatlösung gegeben und dann dreimal für 20 s in reinst Wasser gespült. Es folgten 20 min in einer 0,2 %-igen Silbernitratlösung an die sich weitere zwei Waschschriffe mit reinst Wasser für je 20 s anschlossen. In der Entwicklerlösung (3 % Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd, 0,0004 % Natriumthiosulfat) wurden die Gele dann für 5 min leicht bewegt. Nach weiteren zwei Waschschriffen für je 1 min in reinst Wasser wurde die Farbentwicklung in 0,5 %-iger Glycinlösung (5 min) gestoppt. Schließlich erfolgte ein letzter Waschschriff in reinst Wasser für 30 min.

Die semi-quantitative Auswertung der Proteinmuster von Majoran und Johanniskraut fand nach der Coomassiefärbung statt. Coomassiegefärbte Gele wurden mit einem Densitometer (GS-800, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gescannt und anschließend mit Hilfe der Software PD Quest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) semi-quantitativ ausgewertet. So konnten statistisch gesichert Proteinspots detektiert werden, die bei Behandlung mit dem Mykorrhiza-Inokulum (bzw. für Johanniskraut auch in Abhängigkeit von der Sorte) in ihrer Expression erhöht oder verringert waren.

### 5.7.7 Identifizierung von Proteinspots mittels MALDI-TOF/TOF MS

Durch die Mykorrhizierung mindestens 2-fach hoch- oder herunterregulierte Proteine, die mittels 2-D-Elektrophorese getrennt und mit der PD Quest Software detektiert wurden, sollten mittels MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie identifiziert werden. Dies erforderte in einem ersten Schritt den Verdau der relevanten Proteinspots.

Für einen In-Gel-Verdau wurden diese Spots aus dem Gel ausgestochen und in einem Eppendorf-Tube zunächst mit 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,0) gewaschen, um grobe Verunreinigungen oder Staub zu entfernen. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Gelstücke zweimal für je 30 min mit 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer : Acetonitril (1:1, v/v). Die entfärbten Gelstücke wurden dann mit 100 µl Acetonitril 15 min inkubiert und schließlich in der Vakuumentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet. Für den Verdau der Proteine wurden nun 15 µl einer Trypsinlösung (10 µg Trypsin /ml 25 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,0) zu den getrockneten Gelstücken gegeben und die Gelstücke mit 25 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,0) gerade überdeckt. So wurden die Gelstücke für 16 Stunden über Nacht bei 37 °C im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke noch zweimal für je 15 min mit 30 µl Acetonitril : 0,1 % TFA (1:1; v/v) extrahiert. Die Extrakte wurden mit dem Überstand vereinigt und in der Vakuumentrifuge getrocknet.

Die Identifizierung erfolgte im Anschluss an den Verdau mittels MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie am 4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer mit zugehöriger 4000 Series Explorer™ Software (Applied Biosystems, Darmstadt). Als Matrix kam  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (5 mg/ml) zum Einsatz. Der so vorbereitete, getrocknete Proteinverdau wurde in 3  $\mu$ l Acetonitril : 0,1 % TFA (1:1; v/v) gelöst im Ultraschallbad Elma Transsonic 310 (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen). Jeweils 0,7  $\mu$ l der Probelösung und 0,7  $\mu$ l der Matrixlösung wurden auf eine MALDI-Platte gegeben und gemischt. Im Anschluss erfolgte die massenspektrometrische Untersuchung. Von den größten Fragmentmassen des erhaltenen Massenspektrums wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Die dabei erhaltenen Peptidfragmentmassen wurden zur Datenbanksuche mit Hilfe der GPS Explorer™ Software (Applied Biosystems, Darmstadt) in Swiss-Prot, NCBI, MSDB und CDS Plant verwendet.

## 5.8 Deskriptive und auswertende Statistik, Ergebnisdarstellung

Im Ergebnisteil sind die arithmetischen Mittelwerte (MW) der jeweils angegebenen Anzahl an durchgeführten Wiederholungen angegeben. Zur deskriptiven Statistik wurden bei allen durchgeführten Untersuchungen neben dem arithmetischen Mittelwert die Standardabweichungen (SD) berechnet. Diese sind in allen graphischen Darstellungen als Maß für die Streuung der Analysenwerte um den Mittelwert eingezeichnet bzw. in tabellarischen Darstellungen in Form ihrer relativen Werte als Variationskoeffizient (VK) angegeben.

Die statistische Auswertung der ermittelten Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software STATGRAPHICS Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA).

Die Daten wurden je nach dem Aufbau und der Struktur des Datenmaterials

- bei nur zwei gegenüberzustellenden, normalverteilten Datenreihen mit Hilfe des Student-t-Tests bzw.
- bei nur zwei gegenüberzustellenden, nicht normalverteilten Datenreihen mit dem Mann-Whitney-U-Test,
- bei mehr als zwei zu vergleichenden Datenreihen und nur einem Einflussparameter mittels einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA) bzw.
- bei mehr als zwei zu vergleichenden Datenreihen und mehr als einem Einflussparameter mit der multifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)

ausgewertet.

Nach Varianzanalyse erfolgten

- die multiplen Mittelwertsvergleiche bei normalverteilten Stichproben mit dem Fisher-LSD (least significant difference)-Test.
- Bei negativem Ausgang des Tests auf Normalverteilung wurde ein Vergleich der Mediane mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit mit einem p-Wert von  $< 0,05$  stellte bei allen Tests die Grenze zur Identifizierung und Annahme eines signifikanten Unterschieds dar.

Als signifikant identifizierte Unterschiede werden im Text erläutert und in Graphiken und Tabellen mit \* bzw. durch nicht übereinstimmende Kleinbuchstaben (a, b, c, ...) gekennzeichnet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

#### 6.1.1 Vergleich von Extraktionsmethoden

Für die Untersuchungen der Einflüsse einer Mykorrhizierung auf die Pflanzenqualität war die Bestimmung der wertgebenden Inhaltsstoffe der Modellpflanzen erforderlich. Für die Bestimmung der aromagebenden Inhaltsstoffe aus Majoran und Thymian waren zunächst der Aufbau und die Optimierung einer geeigneten Analysemethode eine zwingende Voraussetzung. Hierbei galt es insbesondere eine geeignete Methode zur Extraktion mit anschließender analytischer Bestimmung dieser Komponenten zu finden und zu optimieren. Diese sollte schließlich eine weitgehend vollständige Extraktion relevanter Inhaltsstoffe gewährleisten, möglichst keine Umwandlungen genuiner Inhaltsstoffe hervorrufen und sich durch eine hohe Präzision und Routinesicherheit sowie gute Automatisierbarkeit auszeichnen.

Folgende für die Extraktion von Aromakomponenten übliche Verfahren wurden bezüglich ihrer Eignung zur schonenden und zeitsparenden Probenvorbereitung von aromagebenden Verbindungen in Majoran und Thymian vergleichend gegenübergestellt:

- Wasserdampfdestillation (WDD)
- Lösungsmittlextraktion mit n-Hexan (LME)
- Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (Accelerated Solvent Extraction, ASE)
- Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (Supercritical Fluid Extraction, SFE)
- Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction, SPME)

Diese fünf Extraktionsmethoden wurden an allen beiden Kulturen anhand von je vier Proben frisch tiefgefrorenen Materials und je drei Proben gefriergetrockneten Materials durchgeführt. Die erhaltenen Extrakte wurden anschließend gaschromatographisch getrennt, mittels Peakflächen-Prozent-Methode ausgewertet und die Ergebnisse aller Methoden gegenübergestellt.

Da die Inhaltsstoffe des Majorans im Vergleich zu denen aus Thymian deutlich empfindlicher gegenüber thermo- und hydrolysebedingten Veränderungen sind, werden die mit verschiedenen Extraktionsverfahren erhaltenen Ergebnisse anhand dieser Kultur im Folgenden beispielhaft erläutert. Abb. 9 zeigt dazu zunächst eine vergleichende Darstellung der Zusammensetzung der extrahierten Verbindungen aus jeweils gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran nach WDD bzw. nach LME.

Verluste leicht flüchtiger Verbindungen infolge der Gefrier Trocknung wurden, wie die Abb. 9 zeigt, grundsätzlich nicht festgestellt, da sich die Inhaltsstoffzusammensetzung weder nach WDD noch nach LME bei gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial zugunsten der schwer flüchtigen Komponenten verschoben hatte (Abb. 9).

Die pH- und temperaturempfindlichen Substanzen Sabinenhydratacetat und cis-Sabinenhydrat wurden in den Wasserdampfdestillaten zu deutlich geringeren Anteilen gefunden als in den Lösungsmittlextrakten. Dafür waren in den Wasserdampfdestillaten die Gehalte an Terpinen-4-ol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Terpinen deutlich erhöht.

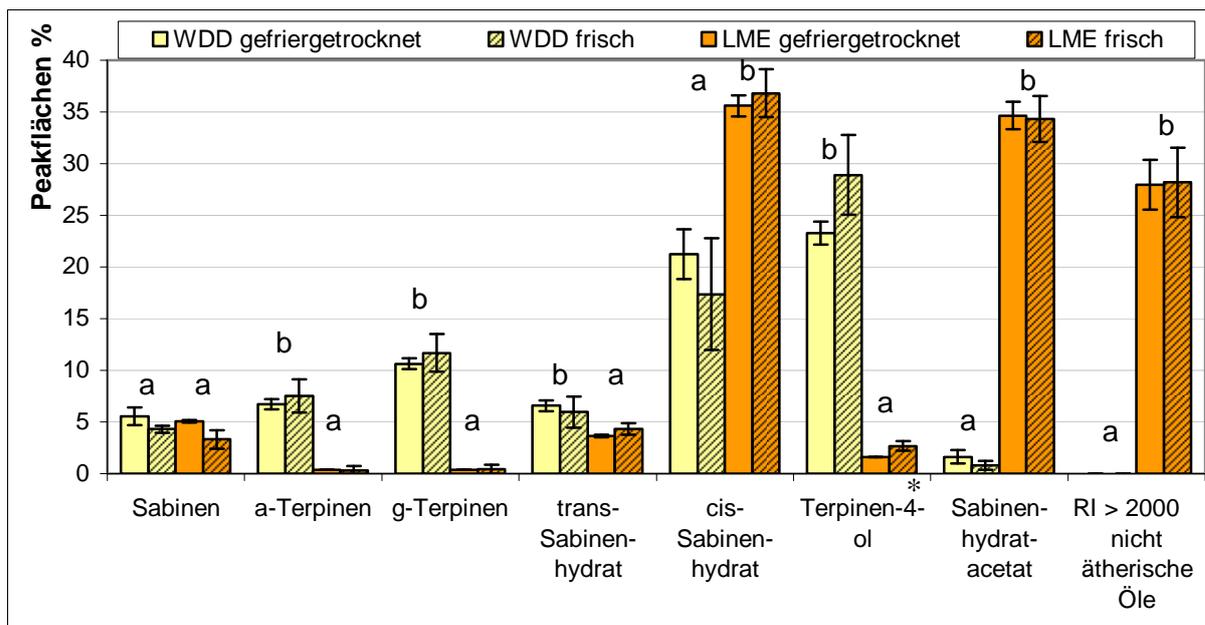


Abb. 9 Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels WDD bzw. LME aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch

gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied zwischen WDD und LME

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Vergleicht man die LME, die SFE und die ASE (Abb. 10), so sind kaum Unterschiede zu erkennen. Gegenüber der WDD enthalten damit alle drei Verfahren deutlich größere Anteile der natürlichen empfindlichen Inhaltsstoffe Sabinenhydrat-acetat und cis-Sabinenhydrat (vgl. Abb. 9).

Ein weiterer Unterschied lässt sich beim Vergleich der ASE- und SFE-Extrakte von gefriergetrocknetem und frischem Material feststellen (Abb. 10). Die Extrakte aus frischem Majoran enthalten deutlich weniger Sabinenhydrat-acetat, dafür aber erhöhte Anteile an cis- und trans-Sabinenhydrat sowie an Terpinen-4-ol. Umwandlungsprozesse während der Tiefkühlage-rung des frischen Pflanzenmaterials bis zur Analyse sind als Ursache für diese Effekte auszuschließen, da diese Unterschiede zwischen frischem und gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial nicht bei gleicher Behandlung nach der WDD und auch nicht nach der LME auftraten (vgl. Abb. 9).

Substanzen mit einem Retentionsindex (RI) über 2000 (je letzte Balkengruppe auf der Abszisse in Abb. 9 und Abb. 10) wurden hier nicht weiter aufgegliedert. Hierbei handelte es sich v.a. um Wachse, Fettsäuren und höhere Terpene, die für den Geruch und Geschmack nur von untergeordneter Bedeutung sind. Substanzen mit einem Retentionsindex  $> 2000$  sind aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit in den Wasserdampfdestillaten nicht enthalten (Abb. 9) und werden deshalb im Folgenden auch als „nicht ätherische Ölverbindungen“ bezeichnet. Solche nicht wasserdampf-flüchtigen Komponenten waren nur in den Extrakten der Lösungsmittel-extraktionen (LME, ASE) bzw. der Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid (SFE) zu finden (Abb. 10). Der Anteil von nicht wasserdampf-flüchtigen Verbindungen ist bei der SFE im Vergleich dieser drei Extraktionsverfahren am geringsten.

6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

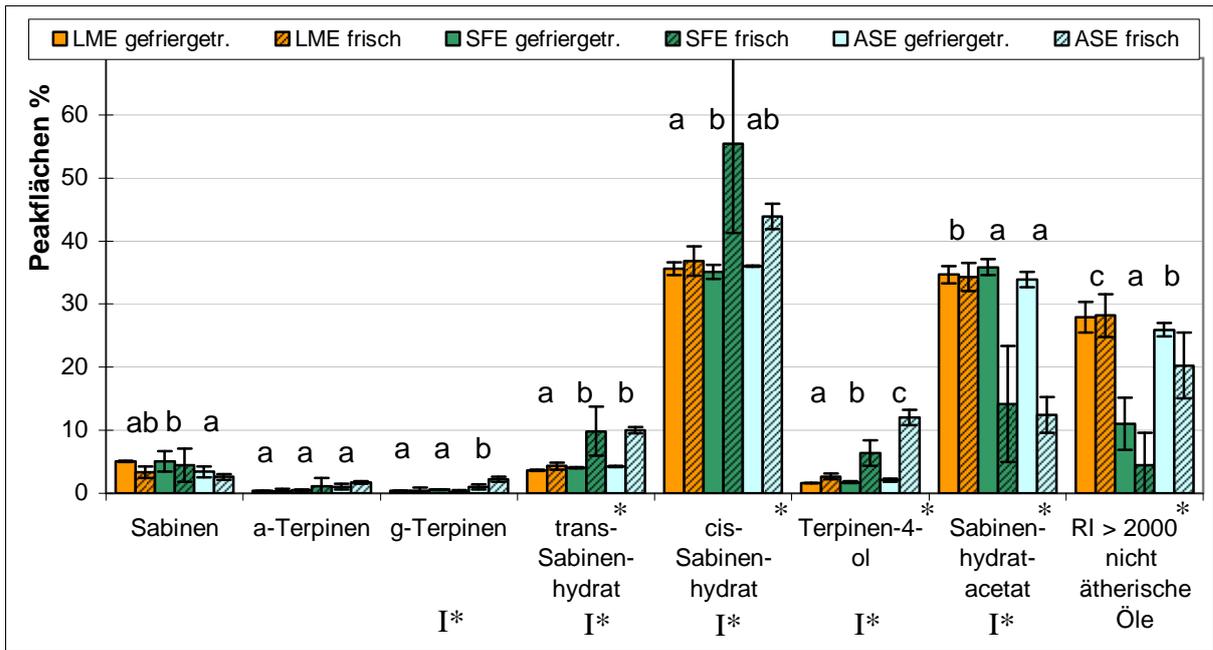


Abb. 10 Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels LME, SFE bzw. ASE aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch

gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied zwischen LME, SFE und ASE

I\* = signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

In der Abb. 11 sind zur besseren Veranschaulichung der bisher getroffenen Aussagen die Gaschromatogramme nach WDD, SFE und ASE von einer gefriergetrockneten Majoranprobe übereinander gelegt dargestellt.

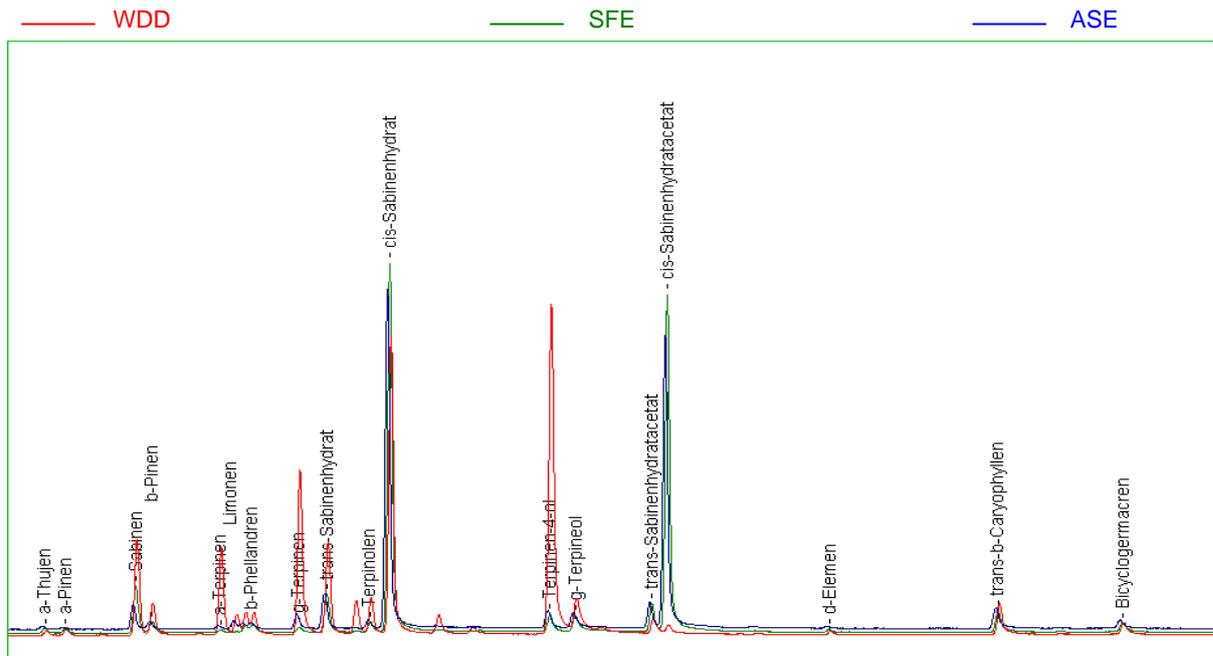


Abb. 11 Gegenüberstellung der Chromatogramme einer gefriergetrockneten Majoranprobe nach WDD, SFE und ASE

## 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

Auch im Chromatogramm ist deutlich zu erkennen, dass im Wasserdampfdestillat kaum noch cis-Sabinenhydratacetat und deutlich weniger cis-Sabinenhydrat nachzuweisen waren. Die Gehalte an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Terpinen sowie Terpinen-4-ol waren dagegen nach WDD im Vergleich zu SFE und ASE deutlich erhöht.

Die zunächst gut geeignete SFE-Methode erwies sich während der durchgeführten Routineanalytik mit der vorhandenen SFE-Anlage jedoch als unzureichend stabil. So kam es häufig zum Verstopfen der Restriktorgänge, obwohl Seesand zum Schutz eingesetzt wurde und weniger feines frisches Pflanzenmaterial zur Anwendung kam. Dies führte schließlich auch zu nicht akzeptablen hohen Standardabweichungen bei der gaschromatographischen Analyse.

Als deutlich stabilere Extraktionsmethode mit sogar noch geringerem Zeit- und Arbeitsaufwand stellte sich die SPME mit einer Reihe von Vorteilen für die Extraktion aromagebender Inhaltsstoffe der Gewürzpflanzen heraus.

Wie die Wasserdampfdestillate waren auch die mittels HS-SPME gewonnenen flüchtigen Extrakte frei von nicht flüchtigen und für das Aroma kaum oder nicht relevanten Verbindungen mit RI > 2000 (Abb. 12).

Weiterhin wurden die genuinen Verbindungen cis-Sabinenhydrat und Sabinenhydratacetat in den SPME-Extrakten in ähnlichen bzw. gleichen Konzentrationen gefunden wie im Lösungsmittel-extrakt (Abb. 12). Der größte Vorteil der SPME liegt jedoch in der Automatisierbarkeit. Im besten Fall wird die manuelle Probenvorbereitung auf das Mahlen und Einwiegen der Pflanzenmaterialien reduziert.

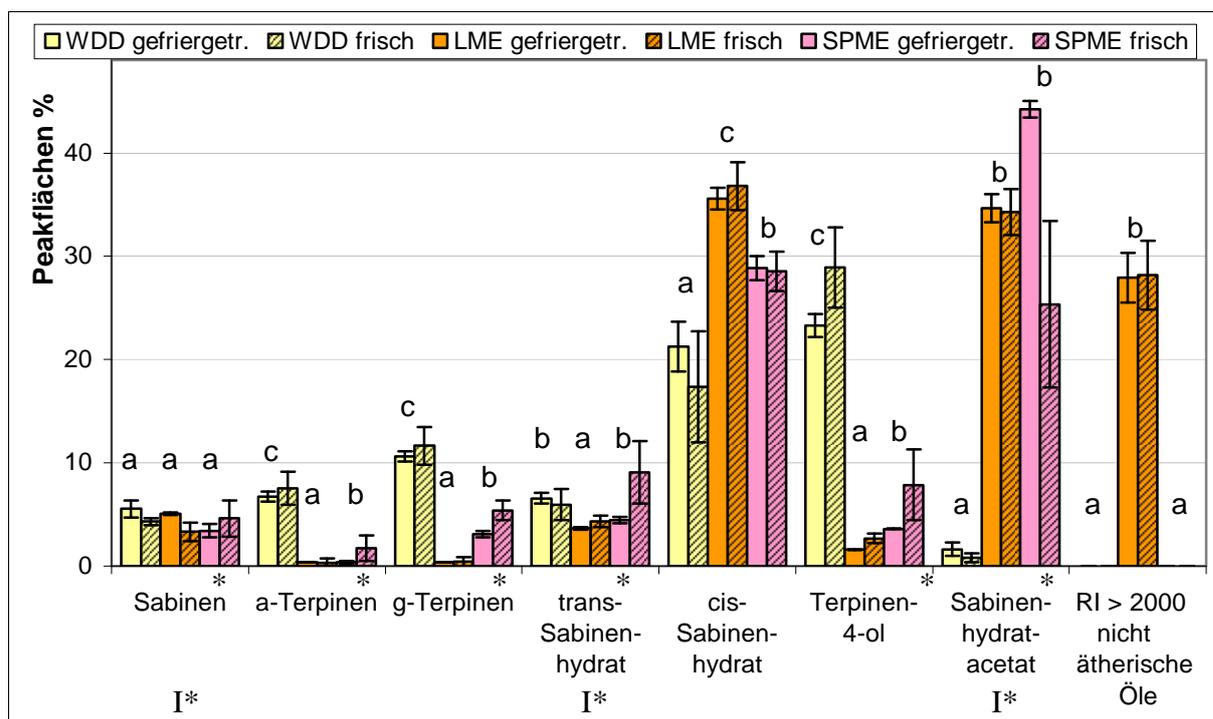


Abb. 12 Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels WDD, LME bzw. SPME aus gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran extrahierten Aromakomponenten (MW $\pm$ SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch

gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied zwischen WDD, LME und SPME

I\* = signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Für Thymian wurden in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren nicht so deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Aromakomponenten wie bei Majoran detektiert (Abb.

## 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

13). Das liegt v.a. darin begründet, dass diese Kultur weniger empfindliche Aromakomponenten enthält. Auch am Beispiel von Thymian war aber wie bei Majoran der Anteil nicht ätherischer Ölverbindungen (RI > 2000) nach SFE am geringsten und keine dieser nicht flüchtigen Verbindungen wurden auch hier nur nach WDD und SPME detektiert (Abb. 13).

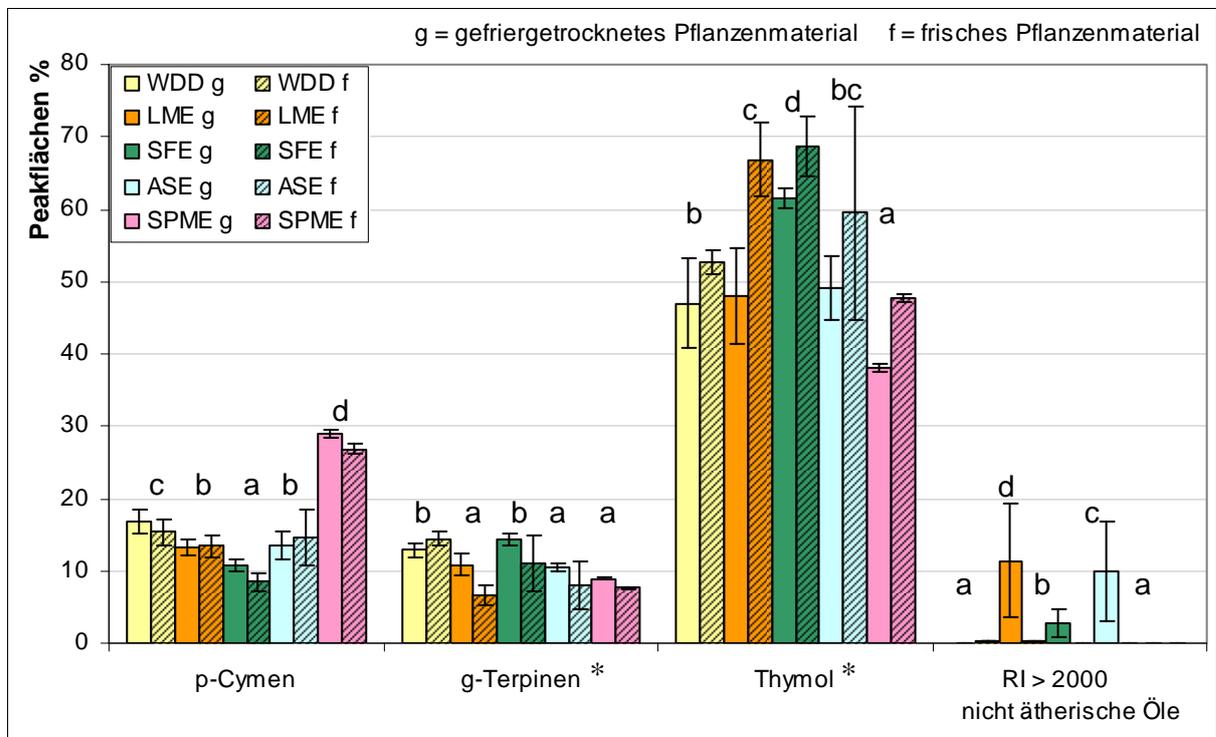


Abb. 13 Peakflächen-Prozente der wichtigsten mittels verschiedener Extraktionsverfahren aus gefriergetrocknetem (g) bzw. frischem (f) Thymian extrahierten Aromakomponenten (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch

gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Extraktionsverfahren

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Da die SPME als die vorteilhafteste Methode zur Extraktion aromaaktiver Verbindungen aus Majoran und Thymian befunden wurde, sollte sie schließlich für die hohe Probenanzahl der Inhaltsstoffuntersuchungen für die beiden Kulturen im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit optimiert und etabliert werden.

### 6.1.2 Optimierung der SPME-Methode

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Anwendungen der SPME-GC zur Bestimmung von Aromakomponenten erfolgte die Optimierung - ausgehend von den nachfolgend aufgeführten Methodenparametern - vollautomatisiert mit Hilfe des CombiPAL Probengebers (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz).

Vorinkubation:	5 min
Temperatur:	40 °C
Schütteln:	500 U/min
Extraktionszeit:	10 min
Desorption:	GC-Injektor, SSL, splitlos
Injektortemperatur:	200 °C
Desorptionszeit:	1 min
Faserkonditionierung:	15 min

Bei aromaaktiven Substanzen handelt es sich in den meisten Fällen um flüchtige Verbindungen. Die SPME sollte daher im Head Space (HS)-Modus betrieben werden. Aufgrund von Literaturempfehlungen wurde die PDMS 100 µm Faser für die HS-SPME der Aromakomponenten verwendet. [BICCHI et al., 2000; COLEMAN und LAWRENCE, 2000; CORNU et al., 2001; CZERWINSKY et al., 1996; JORGENSEN, 2000; LIGOR et al., 2000; MINDRUP, 2000; NAMIESNIK und GÓRECKI, 2000; ROHLOFF, 1999; ROHLOFF et al., 2000; SCHÄFER et al., 1995]

Die HS-SPME mit den oben aufgeführten Methodenparametern wurde mit 50 mg einer gefriergetrockneten Majoranprobe durchgeführt und erbrachte im Vergleich zu den anderen angewandten Extraktionsmethoden schon mit dieser Ausgangsmethode gut vergleichbare Ergebnisse. Die folgende Abbildung zeigt dazu gegenübergestellt die Gaschromatogramme nach HS-SPME und nach SFE (Abb. 14).

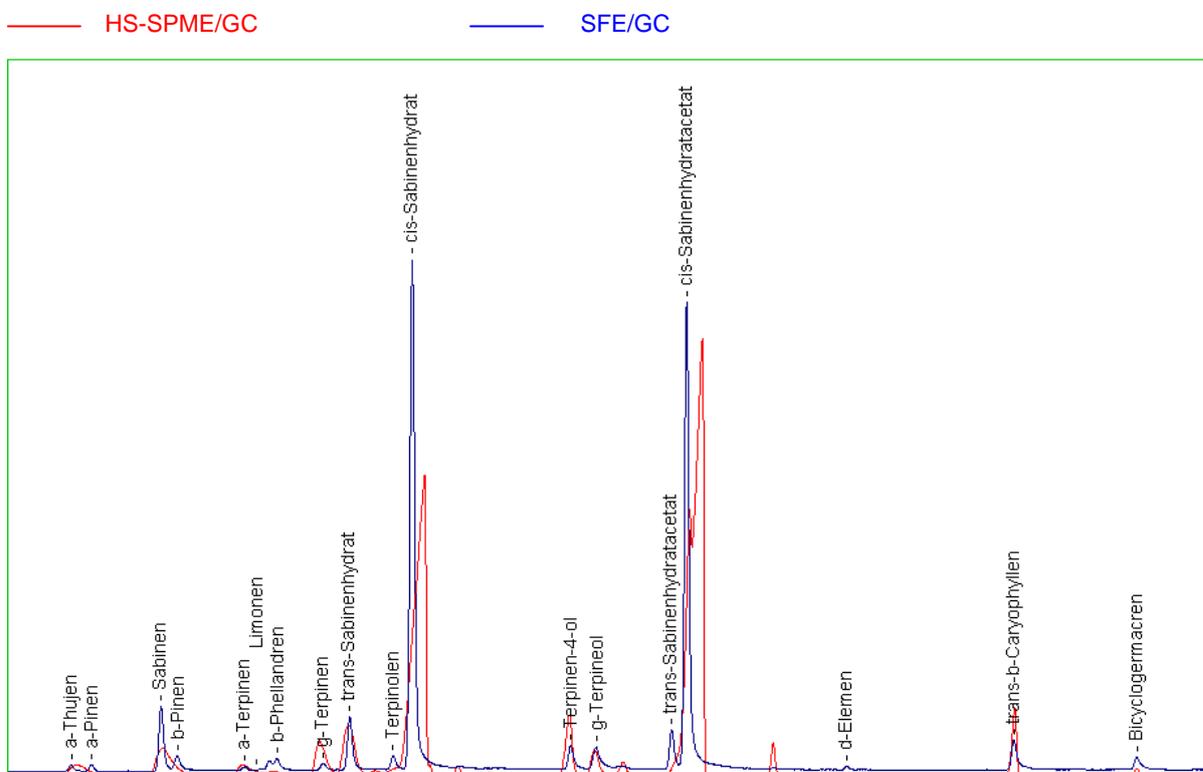


Abb. 14 Vergleich der Gaschromatogramme nach HS-SPME bzw. SFE einer gefriergetrockneten Majoranprobe

## 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

Das Gaschromatogramm enthielt zunächst die gleichen Substanzpeaks wie das nach anderen Extraktionsverfahren erhaltene Chromatogramm. Das heißt, es konnten alle mit den anderen Extraktionsverfahren gewonnenen Verbindungen auch nach HS-SPME nachgewiesen werden. Insbesondere die Auflösung und die Peakschärfen des Chromatogramms waren jedoch noch nicht zufriedenstellend.

Die HS-SPME-Methode wurde daher diesbezüglich anhand der folgenden Methodenparameter weiter optimiert:

- Verwendung gefriergetrockneten bzw. frischen Pflanzenmaterials
- Prüfung verschiedener Extraktionstemperaturen
- Prüfung verschiedener Extraktionszeiten
- Prüfung verschiedener Desorptionstemperaturen (Injektortemperatur)
- Prüfung der splitlosen bzw. Splitinjektion
- Prüfung verschiedener Linergrößen
- Prüfung verschiedener Konditionierungszeiten
- Mahlungsgrad des Pflanzenmaterials

Die für jeden Optimierungsschritt erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

## 6.1.2.1 Verwendung gefriergetrockneten bzw. frischen Pflanzenmaterials

Die SPME von 200 mg frischem Pflanzenmaterial erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die Extraktion von 50 mg gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial (bei ca. 20 % Trockensubstanzgehalt) (Abb. 15).

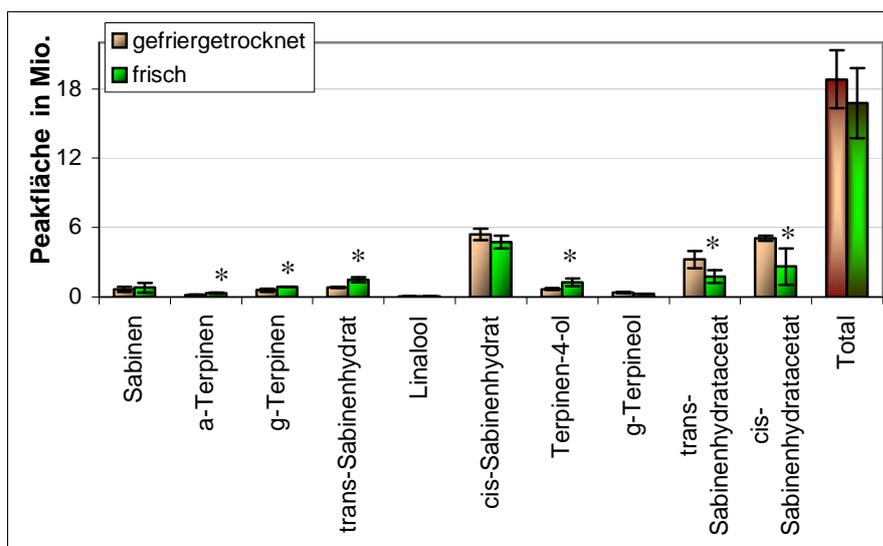


Abb. 15 Vergleich der ermittelten Peakflächen bei Verwendung von gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran bei der SPME (MW±SD, n=4)

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch (ANOVA,  $p < 0,05$ )

Die Abb. 15 zeigt aber, dass gerade bei der SPME von frischem Pflanzenmaterial geringere Anteile der empfindlichen Inhaltsstoffe cis- und trans-Sabinenhydrat und dafür leicht erhöhte Gehalte an Terpinen-4-ol zu finden waren. Ähnliche Ergebnisse waren auch schon mit den Verfahren ASE und SFE, jedoch nicht mit der kalten LME zu beobachten (Abb. 16), weshalb hier von Umwandlungsprozessen thermolabiler Verbindungen im Zusammenhang mit dem Eigenwassergehalt frischen Pflanzenmaterials auszugehen ist.

## 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

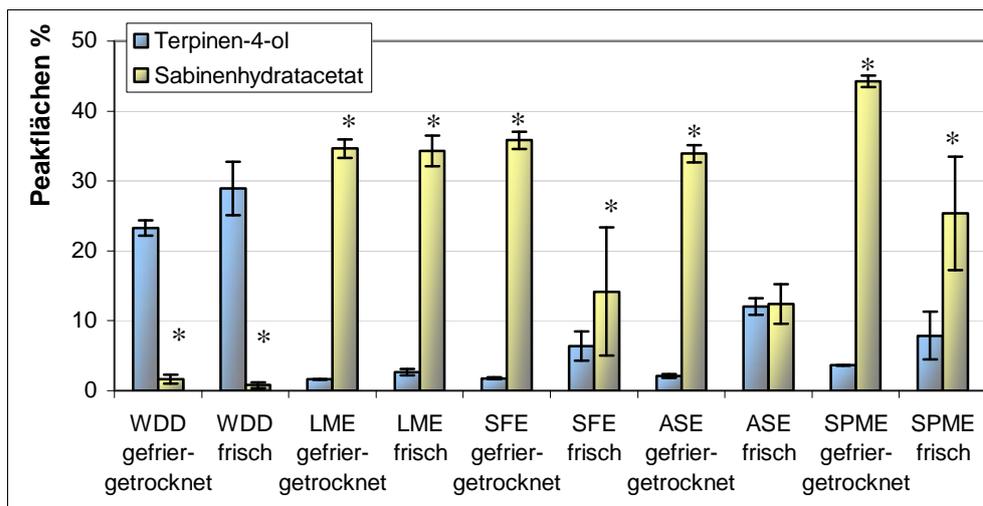


Abb. 16 Vergleich der Peakflächen-Prozente von Terpinen-4-ol und Sabinenhydratacetat nach verschiedenen Extraktionsmethoden bei Verwendung von gefriergetrocknetem bzw. frischem Majoran bei der SPME (MW±SD, n=4)

\* bedeutet signifikanten Unterschied zwischen gefriergetrocknet und frisch (ANOVA,  $p < 0,05$ )

Die Verwendung von gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial war damit für die weiteren Untersuchungen besser geeignet als frisches Pflanzenmaterial.

### 6.1.2.2 Prüfung verschiedener Extraktionstemperaturen

Die Extraktion bei höheren Temperaturen führte, wie erwartet, zu höheren Gesamtpeakflächen und damit zu höheren Ausbeuten bei der Extraktion (Abb. 17).

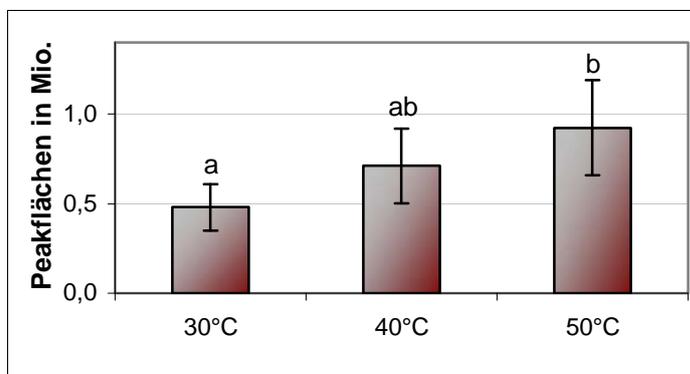


Abb. 17 Vergleich der ermittelten Gesamtpeakflächen bei verschiedenen Extraktionstemperaturen bei der SPME (MW±SD, n=4)

gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (ANOVA,  $p < 0,05$ )

Betrachtet man allerdings die ermittelten Peakflächen-Prozente der extrahierten Aromakomponenten (Abb. 18), so lässt sich feststellen, dass die leichter flüchtigen Verbindungen cis- und trans-Sabinenhydrat bei höheren Extraktionstemperaturen diskriminiert wurden. Der Anteil der höherflüchtigen Komponente cis-Sabinenhydratacetat dagegen stieg mit erhöhter Extraktionstemperatur. Um auch leichter flüchtige Verbindungen noch nachweisen zu können, wurde daher für die folgenden Untersuchungen eine mittlere Extraktionstemperatur von 40 °C angewendet.

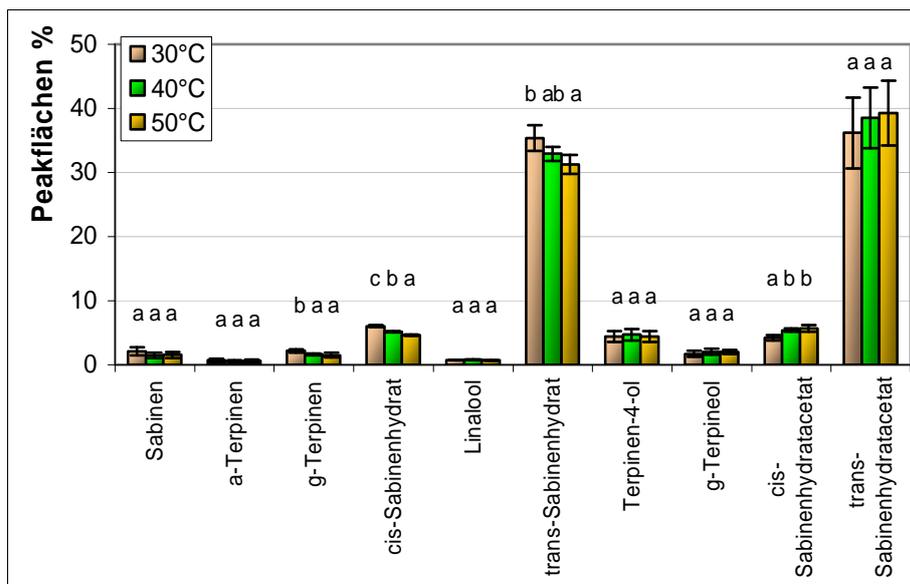


Abb. 18 Vergleich der ermittelten Peakflächen-Prozente bei verschiedenen Extraktionstemperaturen bei der SPME ( $MW \pm SD$ ,  $n=4$ )  
gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (ANOVA,  $p < 0,05$ )

### 6.1.2.3 Prüfung verschiedener Extraktionszeiten

Die Prüfung verschiedener Extraktionszeiten im Anschluss an eine 5-minütige Vorinkubation erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Auch mit steigender Extraktionszeit wurden, wie erwartet, höhere Ausbeuten erzielt (ohne Abbildung). Der Vergleich der Peakflächen-Prozente der extrahierten Aromakomponenten zeigte jedoch auch hier bei längerer Extraktionsdauer vermehrt schwerer flüchtige Komponenten (trans-Sabinenhydratacetat) und eine Diskriminierung der leichtflüchtigen Verbindungen  $\gamma$ -Terpinen, Linalool sowie trans- und cis-Sabinenhydrat (Abb. 19). Eine vollständige Gleichgewichtseinstellung bei der Festphasenmikroextraktion war nicht erforderlich, da die SPME mit Hilfe des CombiPAL Probengebers voll automatisiert und damit sehr gut reproduzierbar durchgeführt wurde. Deshalb wurde eine mittlere Extraktionszeit von 10 min bevorzugt.

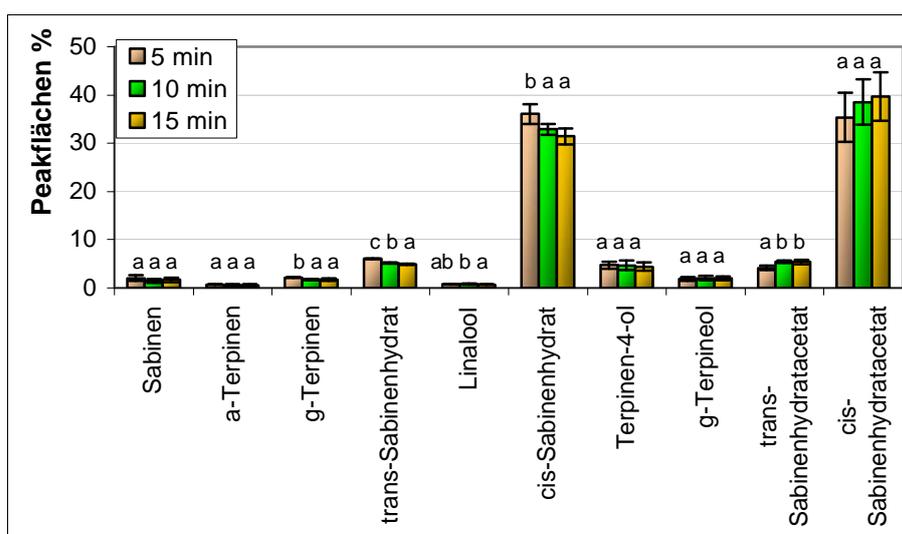


Abb. 19 Vergleich der ermittelten Peakflächen-Prozente bei verschiedenen Extraktionszeiten bei der SPME, je zuzüglich 5 min Vorinkubation ( $MW \pm SD$ ,  $n=4$ )  
gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (ANOVA,  $p < 0,05$ )

### 6.1.2.4 Prüfung verschiedener Desorptionstemperaturen

Erhöhte Desorptionstemperaturen am GC-Injektor führten nicht zu einer Steigerung der Ausbeute (Abb. 20). Bei einem Einsatz höherer Injektionstemperaturen bestand dagegen auch eine erhöhte Gefahr für den Abbau temperaturempfindlicher Substanzen. Für die Hauptkomponenten cis-Sabinenhydrat und cis-Sabinenhydratacetat deuteten sich bei 240 °C Injektionstemperatur bereits geringere Peakflächen an. Um trotzdem eine vollständige Probenaufgabe von der Faser auch bei eventuell auftretenden höheren Gehalten an Aromakomponenten zu garantieren, wurde eine mittlere Desorptionstemperatur von 200 °C beibehalten.

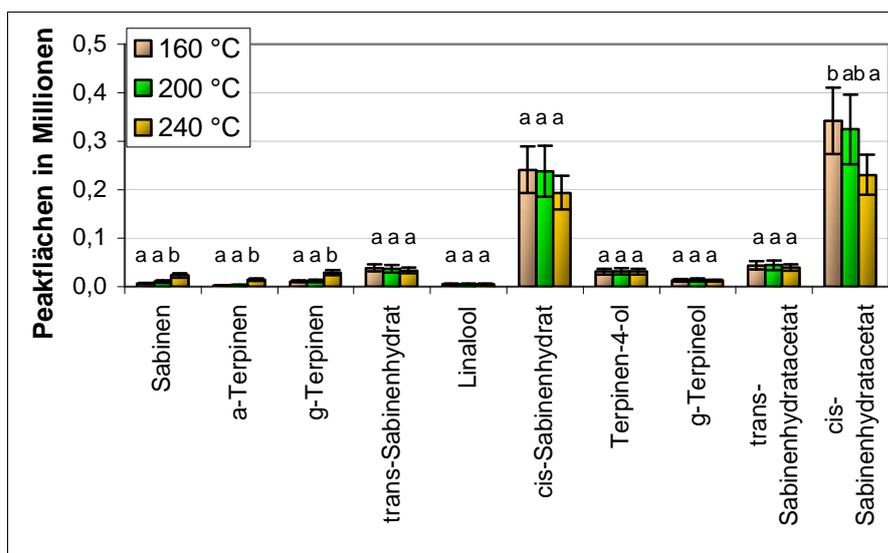


Abb. 20 Vergleich der ermittelten Peakflächen (absolut) bei verschiedenen Desorptionstemperaturen im Injektor nach der SPME (MW±SD, n=4) gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (ANOVA,  $p < 0,05$ )

### 6.1.2.5 Prüfung der Split- bzw. splitlosen Injektion und der Linergröße

Der Problematik von breiten Peaks und ungenügender Auflösung der anfangs eingesetzten SPME-Methode im Vergleich zu anderen Extraktionsmethoden (vgl. Abb. 14) sollte durch den Einsatz einer Splitinjektion bei der Gaschromatographie entgegengewirkt werden.

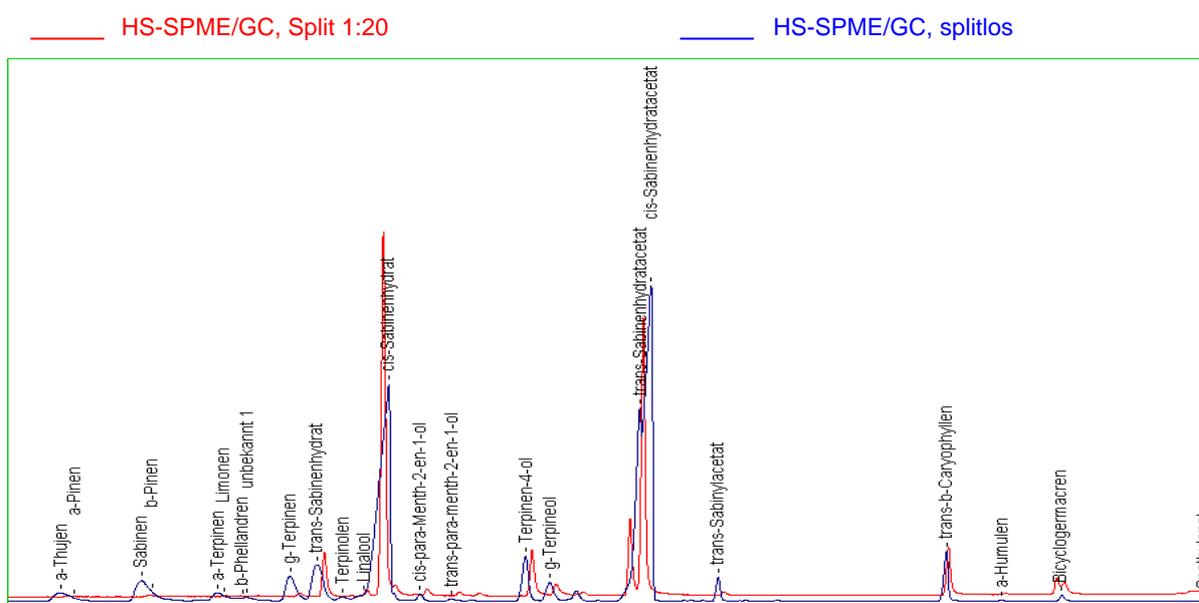


Abb. 21 Vergleich der Gaschromatogramme nach splitloser bzw. Splitinjektion (1:20) bei der SPME/GC

**6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten**

Wie die übereinander gelegten Chromatogramme in Abb. 21 zeigen, führte die Anwendung eines Splits von 1:20 während der Injektion zu einem deutlichen Trennvorteil.

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein Splitverhältnis von 1:20 daher beibehalten.

Die Verwendung eines engeren speziellen SPME-Liners führte zu keiner sichtbaren Verbesserung der Trennergebnisse, jedoch auch zu keiner Verschlechterung (ohne Abbildung).

**6.1.2.6 Prüfung verschiedener Konditionierungszeiten**

Zur Sicherstellung einer vollständigen Rekonditionierung der SPME-Faser wurden nach einem Analysenlauf 5-, 10- bzw. 15-minütige Konditionierungszeiten der Faser geprüft. Dazu wurde im Anschluss an die Faserkonditionierung ein probenfreier Kontrolllauf der GC-Methode durchgeführt. Schon nach 5-minütiger Konditionierung wurden hierbei keine Aromakomponenten mehr nachgewiesen. Sicherheitshalber wurden 10 min für die Konditionierung gewählt.

**6.1.2.7 Mahlungsgrad des Pflanzenmaterials**

Die Mahlung des gefriergetrockneten Pflanzenmaterials erfolgte anfangs mit einem 1 l Labormixer 7010G (Waring Commercial, Torrington, USA), wobei Korngrößen von durchschnittlich etwa 3 mm entstanden. Von einer feineren Vermahlung mit dieser Mühle wurde zur Vermeidung entstehender Hitze abgesehen. Eine Analysenmühle mit Kühlanschluss (A10 Yellow Line, IKA, Staufen) mit Edelstahlschläger bot die bessere Lösung. Das Probenmaterial wurde mit der genannten Mühle für 3 min unter Kühlung (12 °C) gemahlen und anschließend gesiebt, so dass nur Korngrößen < 0,5 mm bei der anschließenden SPME zum Einsatz kamen. Tatsächlich wurde hierdurch anhand je sieben nacheinander durchgeführter Messungen eine Verbesserung der erhaltenen relativen Verfahrensstandardabweichung von 7 % (Labormixer) auf 1 bis 2 % (Analysenmühle) erreicht.

**6.1.2.8 Optimierte HS-SPME-Methode**

Nach Prüfung der verschiedenen Probenvorbereitungsmethoden und Optimierung der SPME, wie oben beschrieben, erfolgte die gaschromatographische Bestimmung der Aromakomponenten mittels HS-SPME/GC vollautomatisiert mit Hilfe des CombiPAL Probengebers nach Einwaage von 50 mg gefriergetrocknetem, auf Korngrößen unter 0,5 mm gemahlenem Pflanzenmaterial in ein 20 ml HS-SPME-Vial mit einer PDMS 100 µm Faser unter folgenden Bedingungen im Head Space Modus:

Vorinkubation:	5 min
Temperatur:	40 °C
Schütteln:	500 U/min
Extraktionszeit:	10 min
Desorption:	GC-Injektor, SSL, split 1:20
Injektortemperatur:	200 °C
Desorptionszeit:	1 min
Faserkonditionierung:	10 min

Die relativen Standardabweichungen der gesamten HS-SPME/GC-Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung aromagebender Inhaltsstoffe am Beispiel von Majoran variierten bei sieben durchgeführten Wiederholungsmessungen für 15 identifizierte Inhaltsstoffe zwischen 1 und 15 % (Tab. 4). Bezüglich der mengenmäßigen Hauptkomponenten Sabinenhydrat (41,5 %) und Sabinenhydratacetat (39,6 %) wurden nur Standardabweichungen zwischen 1 und 3 % ermittelt. Die relative Standardabweichung für die Gesamtpeakfläche lag sogar bei nur 1 %.

## 6.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

Tab. 4 Peakflächen-Prozente und Relative Standardabweichungen (VK) der aromagebenden Inhaltsstoffe von Majoran aus sieben Wiederholungsmessungen mittels HS-SPME/GC

Inhaltsstoff	Peakflächen% (MW, n=7)	VK (%)
$\alpha$ -Thujen (%)	0,9	14,3
Sabinen (%)	1,9	7,7
$\alpha$ -Terpinen (%)	0,6	15,4
$\gamma$ -Terpinen (%)	1,1	10,3
trans-Sabinenhydrat (%)	3,6	2,7
Linalool (%)	0,3	14,0
cis-Sabinenhydrat (%)	37,9	1,0
cis-p-Menth-2-en-1-ol (%)	0,9	9,1
trans-p-Menth-2-en-1-ol (%)	0,6	4,8
Terpinen-4-ol (%)	5,2	3,2
$\gamma$ -Terpineol (%)	2,0	3,8
trans-Sabinenhydratacetat (%)	4,0	2,6
cis-Sabinenhydratacetat (%)	35,6	1,8
trans-Sabinylacetat (%)	1,3	8,9
trans- $\beta$ -Caryophyllen (%)	4,1	9,6
Gesamtpeakfläche (absolut)	249.400,0	1,0

Ein mit dieser optimierten Methode erhaltenes Gaschromatogramm einer Majoranprobe ist in der Abb. 22 dargestellt.

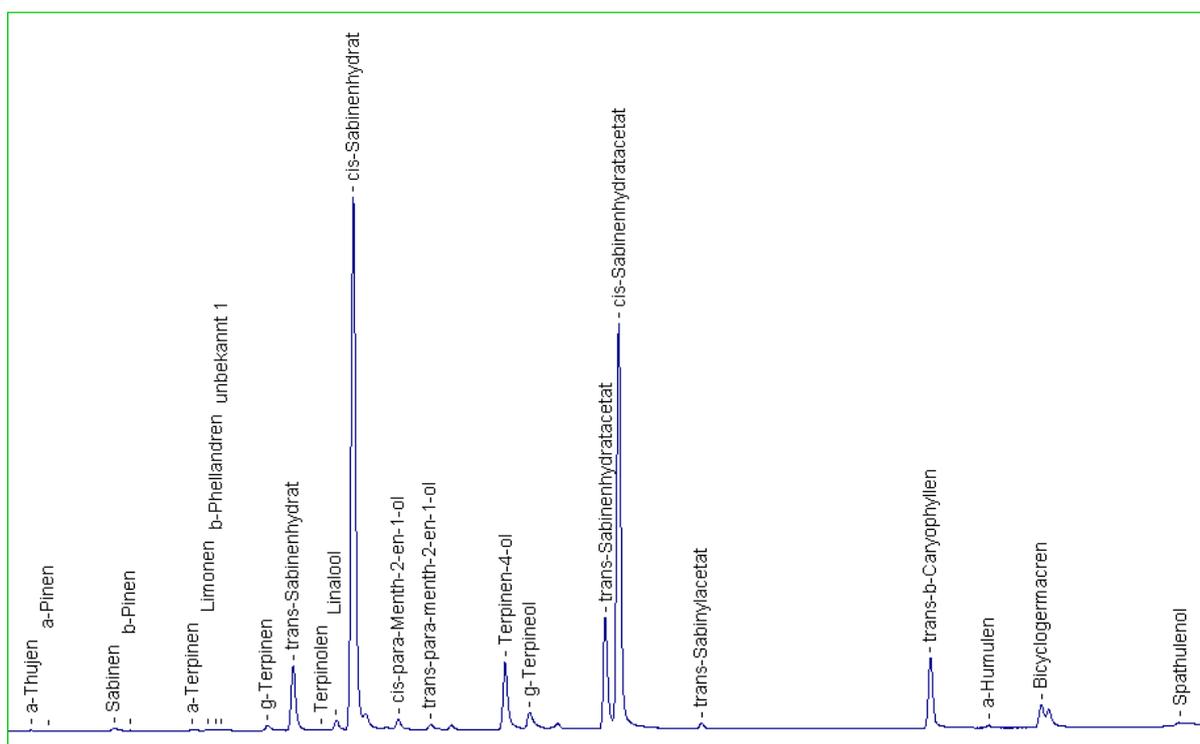


Abb. 22 GC-Chromatogramm einer Majoranprobe nach der Optimierung des HS-SPME/GC-Verfahrens

## 6.2 Einflüsse der Mykorrhizierung auf Biomasse und Inhaltsstoffe

### 6.2.1 Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus

Verschiedene AM-Inokula wurden in Gewächshausversuchen auf ihre Eignung zur Mykorrhizierung der Heil- und Gewürzpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut geprüft. Die dazu eingesetzten Mykorrhiza-Inokula umfassten kommerzielle Misch-Inokula (AMykor<sup>®</sup>-Blähton, AMykor<sup>®</sup>-Perlit), verschiedene Mono-Inokula der Gattung *Glomus*, mehrere Misch-Inokula, die in Thailand isoliert wurden, sowie die von Weizen bzw. Thymian isolierten autochthonen Misch-Inokula. Die mit den verschiedenen Inokula an den Heil- und Gewürzpflanzen erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Mykorrhizierbarkeit sowie Effekten auf Biomasse- und Inhaltsstoffproduktion werden im Folgenden dargestellt.

Die Ergebnisse der Bewertung der Mykorrhizierung von Thymian, Majoran und Johanniskraut bei Anwendung der verschiedenen arbuskulären Mykorrhiza-Inokula sind in der Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Mykorrhizierbarkeit von Thymian, Majoran und Johanniskraut mit verschiedenen AM-Inokula

Mykorrhiza-Inokulum		Bewertung der Mykorrhizierung*		
komplette Bezeichnung	Abkürzung	Thymian	Majoran	Johanniskraut
Kontrolle	K	0	0	0
AMykor <sup>®</sup> -Blähton	AM-B	2	2	1
AMykor <sup>®</sup> -Perlit	AM-P	2	1	1
<i>Glomus mosseae</i>	Gm	1	1	1
<i>Glomus clarum</i>	Gc	1	1	1
<i>Glomus diaphanum</i>	Gd	2	1	0
<i>Glomus etunicatum</i>	Ge	3	1	1
<i>Glomus intraradices</i>	Gi	2	1	1
<i>Glomus geosporum</i>	Gg	3	2	2
Thailand - <i>Scutellospora</i> spec.	T-Sc	1	1	1
Thailand - <i>Acaulospora</i> spec.	T-Ac	1	1	1
Thailand - KN	T-KN	1	1	1
Thailand - D3	T-D3	1	1	1
autochthone Mykorrhiza - Weizen	aM-W	1	1	1
autochthone Mykorrhiza - Thymian	aM-T	1	1	0

\* 0 = keine Mykorrhiza-Strukturen; 1 = geringe Mykorrhizierung; 2 = gute Mykorrhizierung; 3 = sehr gute Mykorrhizierung

**Thymian** stellte sich bei diesen Untersuchungen als eine grundsätzlich sehr gut mykorrhizierbare Kultur heraus. Die Pflanzen entwickelten bei allen untersuchten Varianten eine Mykorrhiza-Symbiose, die meist gut bis sehr gut ausgebildet war. Besonders hervorzuheben waren die Varianten mit *Glomus geosporum* und *Glomus etunicatum*. Gute Mykorrhizierungen wurden auch mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton ermittelt.

**Majoran** wies im Vergleich zu Thymian nur eine geringe Neigung zur Mykorrhizierung auf. Gute Mykorrhizierungen wurden nur nach Inokulation mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton sowie mit *Glomus geosporum* erreicht.

**Johanniskraut** zeigte mit den meisten Mykorrhiza-Inokula ebenfalls nur eine schwach ausgeprägte Mykorrhizierung. Nach Inokulation mit *Glomus diaphanum* sowie mit dem von Thymian isolierten autochthonen Mykorrhiza-Inokulum wurden keine Mykorrhiza-Strukturen gefunden. Die besten Mykorrhizierungserfolge wurden mit *Glomus geosporum* erzielt.

### 6.2.1.1 Thymian

Die Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Biomasseerträge von Thymian (angegeben in Masse an getrocknetem Kraut pro Topf) sind für die verschiedenen Mykorrhiza-Inokula in der Abb. 23 graphisch gegenübergestellt.

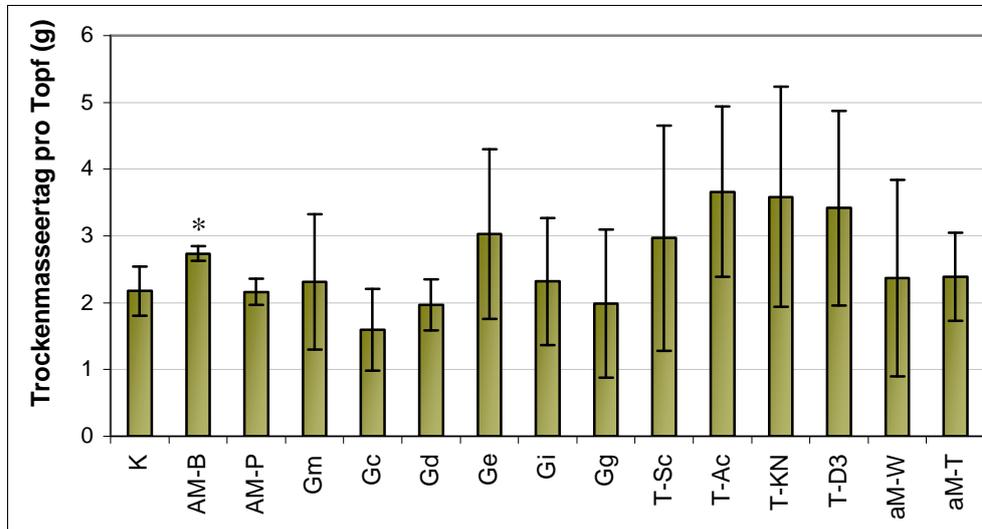


Abb. 23 Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW±SD, n=3)

Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ )

Aus der Abb. 23 ist zu erkennen, dass verschiedene Mykorrhiza-Inokula unterschiedliche Auswirkungen auf den Kräuterertrag haben. Gegenüber der Kontrollvariante ohne Mykorrhizierung bewirkte aber nur der AMykor®-Blähton signifikante Ertragssteigerungen. Eine tendenzielle Ertragserhöhung wurde auch mit den thailändischen Mischpopulationen (*Acaulospora*:  $p < 0,10$ ; KN:  $p < 0,15$ ; D3:  $p < 0,2$ ) erzielt. Auffällig sind auch die positiven Wirkungen des *Glomus etunicatum* Mono-Inokulums auf den Thymianertrag. Aufgrund der deutlichen Schwankungen der Erträge aus den je drei untersuchten Töpfen handelt es sich jedoch auch hierbei nicht um signifikante Ertragssteigerungen.

Für die Bestimmung der aromagebenden Inhaltsstoffe aus Thymian wurden aufgrund des wenigen zur Verfügung stehenden Materials Mischproben aus den drei Töpfen für jede Inokulationsvariante hergestellt und diese mittels WDD auf den Gesamtgehalt an ätherischem Öl und mittels SPME/GC auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten untersucht. Die Abb. 24 zeigt die an Thymian mit verschiedenen Mykorrhiza-Inokula erhaltenen ätherischen Ölgehalte nach WDD.

Insgesamt sind aus der Abb. 24 deutliche Unterschiede der ätherischen Ölgehalte in Abhängigkeit von den verschiedenen eingesetzten Mykorrhiza-Inokula zu erkennen. Die Kontrolle besitzt einen ätherischen Ölgehalt von 0,21 %. Ein ähnlicher Gehalt wurde mit *Glomus clarum*-Inokulum erzielt. Durch Inokulation mit *Glomus etunicatum* wurden deutlich erhöhte Gehalte an ätherischem Öl gefunden. Einige AM-Inokula führten aber auch zu einer Senkung der ätherischen Ölgehalte in den Pflanzen.

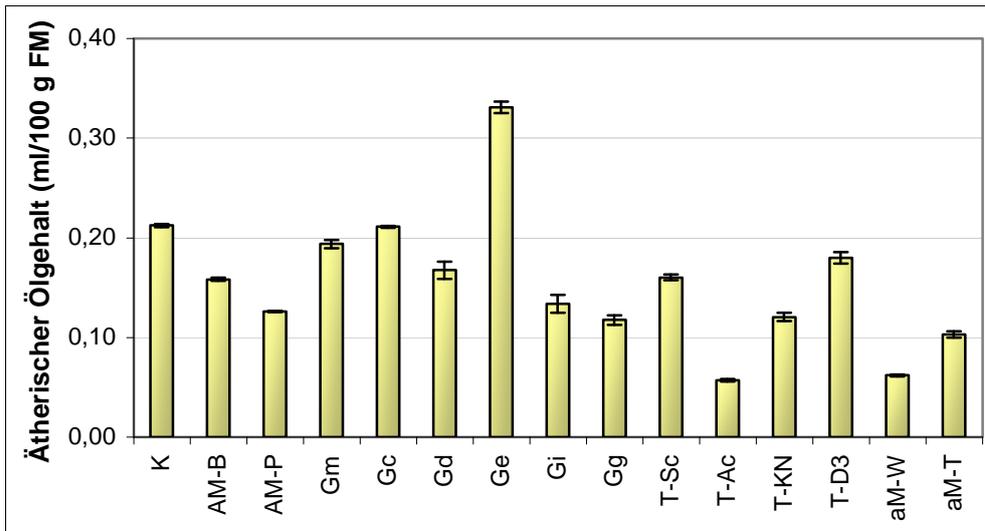


Abb. 24 Ätherische Ölgehalte nach WDD bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW $\pm$ SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe)  
Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

Nicht nur die Gesamtgehalte an ätherischem Öl standen unter dem Einfluss der Mykorrhizierung. Auch die Anteile der verschiedenen Aromakomponenten wiesen bei unterschiedlichen Inokula große Differenzen auf. Abb. 25 stellt hierzu die in Abhängigkeit vom AM-Inokulum mittels HS-SPME/GC ermittelten Zusammensetzungen der Hauptaromakomponenten auszugswise für die AM-Inokula mit auffälligen Wirkungen dar. Für die auf diesen Parameter weniger wirksamen Inokula wurde auf die Darstellung der Inhaltsstoffzusammensetzung in der Abbildung verzichtet.

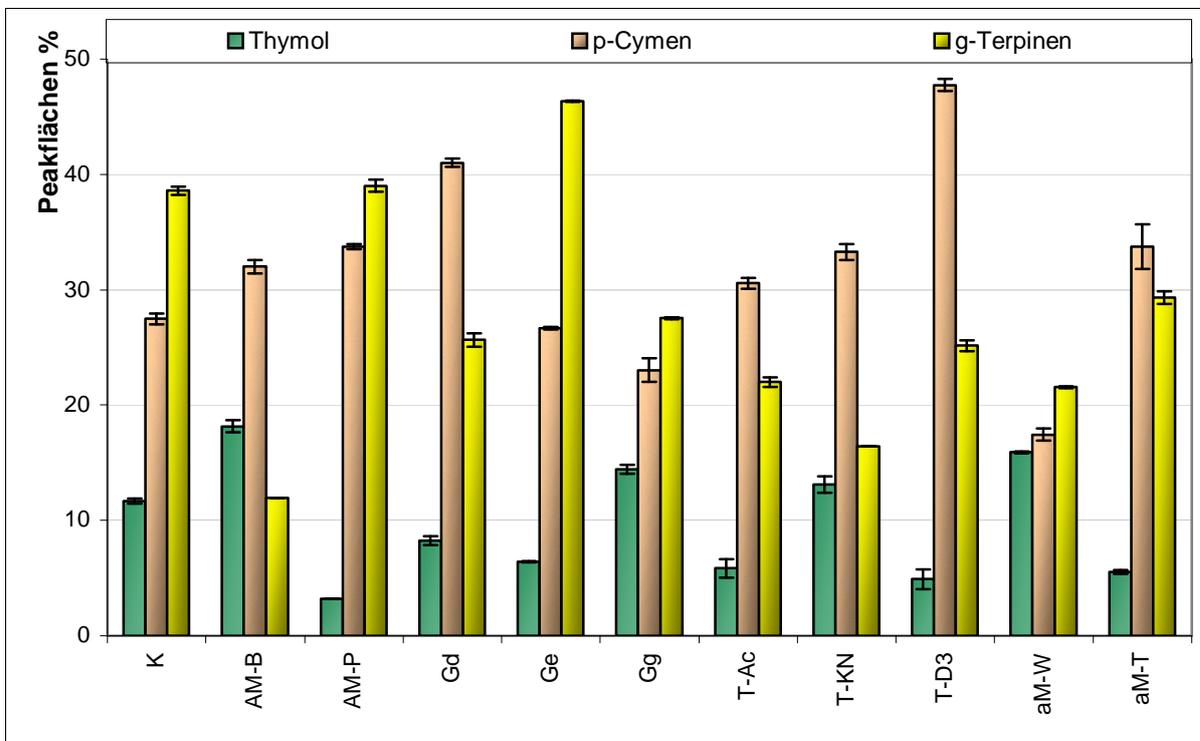


Abb. 25 Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Thymian (MW $\pm$ SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe)  
Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

Die Abb. 25 verdeutlicht, dass die höchsten Thymolgehalte unter dem Einfluss einer Mykorrhizierung mit AMYkor®-Blähton, *Glomus geosporum* und autochthoner Mykorrhiza von Weizen erzielt wurden. *Glomus etunicatum* dagegen erhöhte in erster Linie die Gehalte des  $\gamma$ -Terpinens und verringerte die Gehalte der thymiantypischen Inhaltsstoffe Thymol und p-Cymen sogar noch.

Statistisch gesicherte Aussagen sind aber nicht möglich, da aufgrund der geringen Menge an Untersuchungsmaterial nur eine Mischprobe aus drei biologischen Wiederholungen analysiert wurde.

### 6.2.1.2 Majoran

An Majoranpflanzen führte auch eine vergleichsweise geringfügige Mykorrhizierung noch zu Einflüssen auf die Biomasseerträge (Abb. 26). So kam es zu tendenziellen Ertragssteigerungen bei Einsatz der thailändischen Mischpopulationen KN ( $p < 0,15$ ) und D3 ( $p < 0,10$ ). Auch mit dem kommerziellen AMYkor®-Blähton sowie mit *Glomus geosporum* wurden aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungsversuchen nur tendenzielle Ertragssteigerungen für Majoran beobachtet ( $p < 0,20$ ).

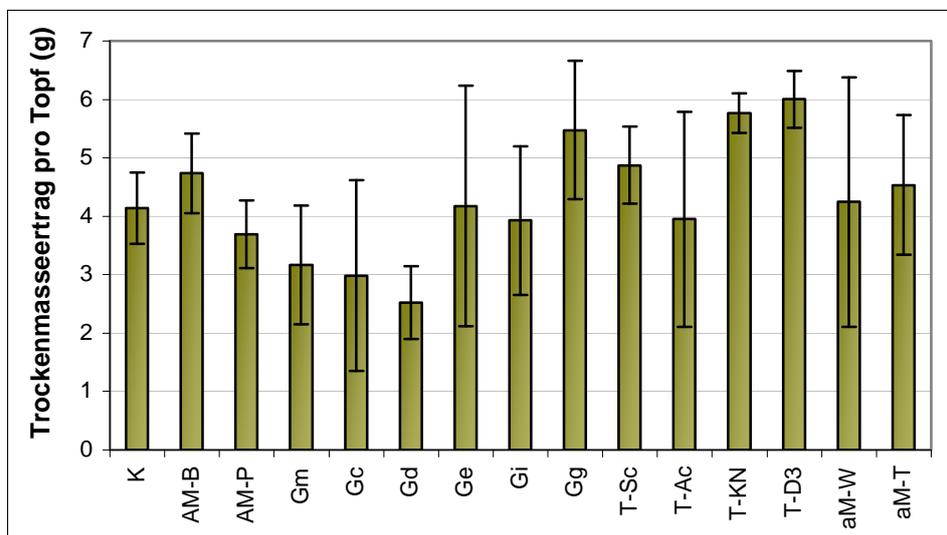


Abb. 26 Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW $\pm$ SD, n=3)

Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (ANOVA,  $p < 0,05$ )

In der Abb. 27 sind die mit verschiedenen Mono-Inokula bei Majoran erhaltenen ätherischen Ölgehalte gegenübergestellt (Mittelwert aus je 2 Bestimmungen). Hier ist zu erkennen, dass die Gesamtgehalte an ätherischem Öl der Kontrolle nur von dem mit *Acaulospora spec.* (Thailand) mykorrhizierten Majoran erreicht wurden. Alle anderen Inokulumversuche erbrachten geringere oder nur gleichwertige Gehalte. Insgesamt wurden auch bei Majoran deutliche Unterschiede der ätherischen Ölgehalte in Abhängigkeit von den verschiedenen Mykorrhiza-Inokula detektiert.

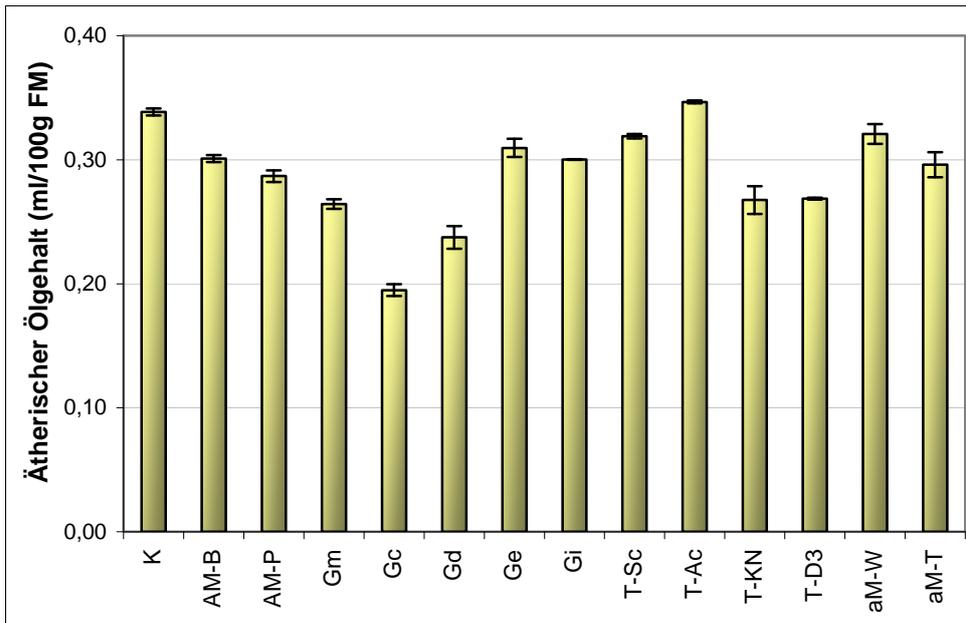


Abb. 27 Ätherische Ölgehalte nach WDD bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe)  
Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

Die Abb. 28 stellt den Einfluss der verschiedenen Inokula auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten der Majoranpflanzen auch hier nur am Beispiel der AM-Inokula mit auffälligen Wirkungen dar.

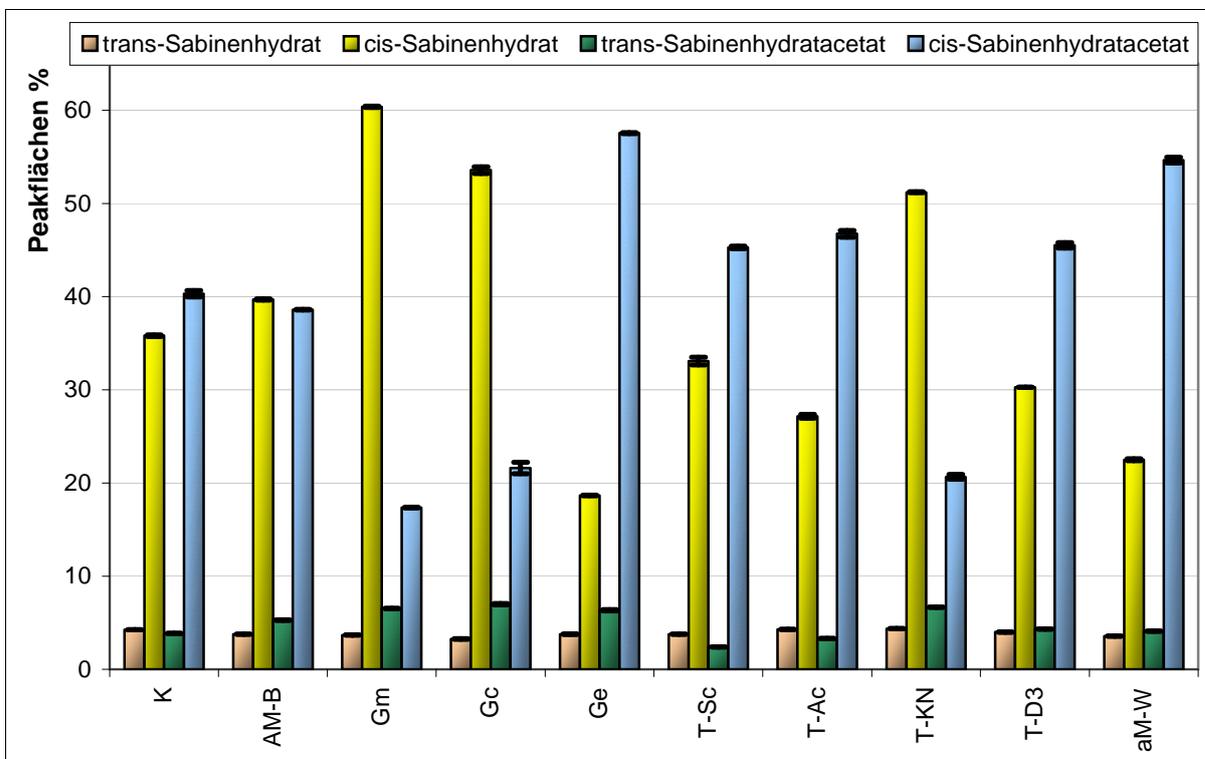


Abb. 28 Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Majoran (MW±SD von zwei analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe)  
Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

Die Abb. 28 zeigt deutlich, dass auch beim Majoran große Unterschiede in der Zusammensetzung der Aromakomponenten in Abhängigkeit vom eingesetzten Mykorrhiza-Inokulum festgestellt wurden. *Glomus etunicatum* wie auch die thailändischen Varianten *Scutellospora spec.*, *Acaulospora spec.* und D3 sowie die von Weizen isolierte autochthone Mykorrhiza können den Anteil der majorantypischen Komponente Sabinenhydratacetat im ätherischen Öl erhöhen. Insbesondere nach Inokulation mit *Glomus mosseae* oder *Glomus clarum* ist diese Komponente dagegen zugunsten der nicht acetylierten Form Sabinenhydrat erniedrigt. Da es sich aufgrund des wenigen verfügbaren Pflanzenmaterials jedoch auch hier nur um analytische Wiederholungen aus je einer Mischprobe aus je drei Töpfen handelt, sind die Ergebnisse für statistisch sichere Aussagen nicht geeignet.

### 6.2.1.3 Johanniskraut

Die auch für Johanniskraut nur wenig ausgeprägte Mykorrhizierung ging einher mit geringen Auswirkungen der Inokulation mit verschiedenen Mykorrhiza-Populationen auf die Biomasseerträge (Abb. 29).

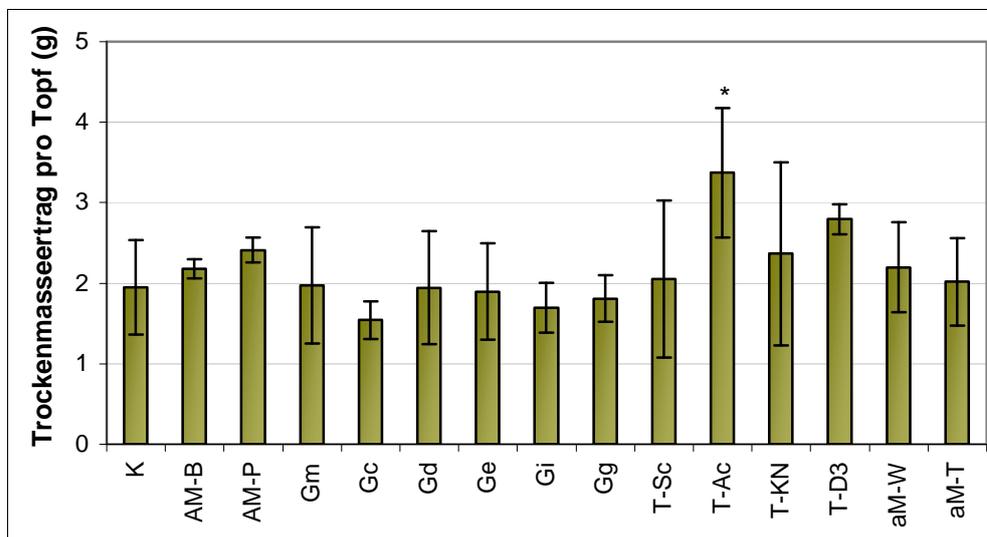


Abb. 29 Trockenmasseerträge pro Topf bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Johanniskraut (MW±SD, n=3)

Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ )

Ein Erhöhung der Biomasseerträge deutete sich nach Inokulation mit AMYkor<sup>®</sup>-Blähton sowie mit AMYkor<sup>®</sup>-Perlit an. Deutlich gesteigerte Krauterträge wurden wiederum bei Einsatz der thailändischen Mykorrhiza-Mischungen erhalten. Hier sind insbesondere die Mischpopulationen *Acaulospora spec.* ( $p < 0,05$ ) und D3 ( $p < 0,10$ ) hervorzuheben.

Die Inhaltsstoffuntersuchungen in Abhängigkeit vom eingesetzten Mykorrhiza-Inokulum bezogen sich bei Johanniskraut auf die Phloroglucinderivate Hypericin und Pseudohypericin. Die für Johanniskraut im Rahmen der Inokulumversuche ermittelten Gehalte dieser Verbindungen sind in der Abb. 30 dargestellt.

Hier wurden mit AMYkor<sup>®</sup>-Blähton und AMYkor<sup>®</sup>-Perlit die höchsten Hypericingehalte induziert. Auch *Glomus clarum* und *Glomus etunicatum* scheinen noch eine geringfügig steigernde Wirkung auf die Hypericingehalte zu haben. Bei Verwendung von anderen Mykorrhiza-Inokula war die Hypericinproduktion in Johanniskraut dagegen eher unterdrückt. Statistisch sichere Aussagen konnten bezüglich der Inhaltsstoffdaten auch für die Gewächshausversuche mit Johanniskraut nicht getroffen werden, da es auch hier nur um analytische Wiederholungen aus je einer Mischprobe aus drei Töpfen handelt.

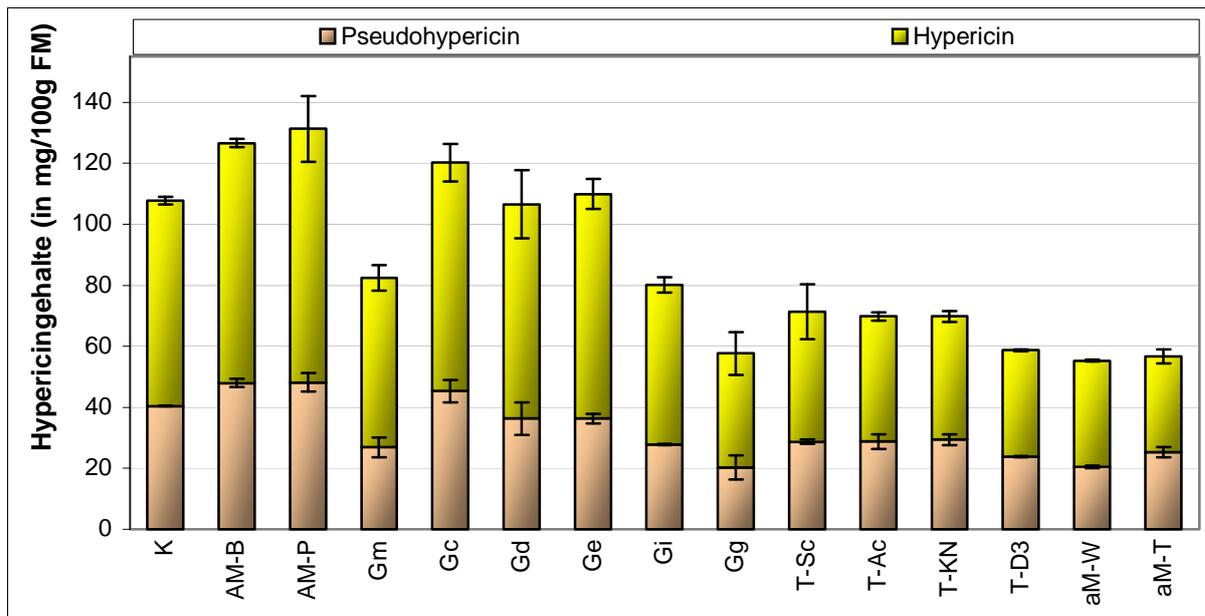


Abb. 30 Hypericingehalte nach ASE/HPLC bei Einsatz verschiedener Mykorrhiza-Inokula an Johanniskraut (MW±SD von vier analytischen Wiederholungen, n=1, Mischprobe)

Abkürzungen der verwendeten Mykorrhiza-Inokula wie in Tab. 5, S. 48

### 6.2.2 Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen

Insbesondere der kommerzielle AMYkor®-Blähton hatte sich in den Gewächshausversuchen als gut geeignet zur Mykorrhizierung der Heil- und Gewürzpflanzen Thymian, Majoran und Johanniskraut herausgestellt. Er zeichnete sich außerdem durch die Möglichkeit zur kostengünstigen Produktion aus. Dieses Inokulum sollte nun an diesen Kulturen in praxisnahen Feldversuchen mit dem Ziel eingesetzt werden, deutliche Ertragssteigerungen sowie eine Erhöhung bzw. qualitative Verbesserung der wertgebenden Inhaltsstoffe zu erreichen.

Die Feldversuche wurden über die vier Versuchsjahre 2002 bis 2005 mit den Kulturen Majoran, Thymian und Johanniskraut durchgeführt, um jahresbedingte Witterungseinflüsse in die Bewertung der Ergebnisse einbeziehen zu können. Die Wetterbedingungen der vier Versuchsjahre gestalteten sich erwartungsgemäß recht unterschiedlich und können in den Klimatabellen in Anlage 3 vollständig nachvollzogen werden.

Das Versuchsjahr 2002 prägten hohe Niederschläge, insbesondere in den Monaten Juli und August, die sich positiv auf die Entwicklung der Pflanzen und damit auch deren Krauterträge auswirkten. Die Temperaturen lagen zudem im August auch deutlich über dem langjährigen Durchschnitt, wodurch die Pflanzen im Zusammenhang mit den feuchten Bedingungen insbesondere in der letzten Entwicklungsphase vor der Ernte einen deutlichen Wachstumsschub erhielten.

Im zweiten Versuchsjahr 2003 fehlten dagegen im Vergleich zum langjährigen Mittel von April bis August insgesamt 62 mm Niederschlag. Die negativen Auswirkungen auf den Pflanzenwuchs ließen sich mit den späten Niederschlägen im September nicht mehr beeinflussen. Zudem war das Jahr 2003 geprägt von sehr hohen Temperaturen. Die extrem trockenen und heißen klimatischen Bedingungen im Jahr 2003 führten zu einer deutlich verzögerten Entwicklung der Pflanzen und zu drastisch reduzierten Ernteerträgen.

2004 war ein vergleichsweise kühles Anbaujahr. Die Temperaturen lagen bis zum Juli durchschnittlich 1 °C unter dem monatlichen langjährigen Mittelwert. Die Niederschlagsmengen waren während der Vegetationszeit von April bis Juni am Standort Bernburg zunächst mit 122 mm im Vergleich zum langjährigen Mittel (143 mm) nur wenig verringert. Der Juli war dann aber regenreich. Der Aufgang der Kulturen verzögerte sich durch die kühlen Temperaturen und geringen Niederschläge zunächst. Aufgrund der hohen Niederschläge im Juli und

des Temperaturanstiegs im August entwickelten sich die Bestände bis zur Ernte dann aber normal.

Auch das Versuchsjahr 2005 gestaltete sich bezüglich der Witterungsbedingungen nahezu optimal für den Pflanzenwuchs. Besonders hohe Niederschläge gab es im Mai mit 180 % (im Vergleich zum monatlichen langjährigen Mittelwert) und im Juli mit 202 %. Diese konnten die trockenen Monate April, Juni und August gut ausgleichen. Trockenschäden im August traten außerdem durch vergleichsweise niedrige Temperaturen in diesem Monat nicht ein.

Insgesamt boten die Jahre 2002, 2004 und 2005 recht gute Witterungsbedingungen für die Entwicklung der Pflanzen. Das heiße und trockene Versuchsjahr 2003 stellte dagegen recht hohe Anforderungen an die Toleranz der Pflanzen.

### 6.2.2.1 Thymian

Thymian wurde in den Versuchsjahren 2003, 2004 und 2005 auf den Versuchsfeldern angebaut. Die Mykorrhizierung der Feldversuche ist für Thymian im Versuchsjahr 2003 besonders erfolgreich verlaufen. Eine Beprobung und Wurzeluntersuchung der jeweiligen Parzellen des Feldversuches ergab im konventionellen Anbau für alle Kontrollflächen tatsächlich keine vorhandenen Mykorrhiza-Strukturen, wohingegen auf den mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelten Flächen eine leichte bis mittlere Mykorrhizierung (Bewertungsstufe 1 bis 2) festgestellt wurde. Auf den ökologischen Versuchsfeldern wiesen die Kontrollflächen bereits eine leichte Mykorrhizierung auf (Bewertungsstufe 1), die mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton inokulierten Flächen waren aber deutlich stärker mykorrhiziert (Bewertungsstufe 2). Die Ergebnisse der Mykorrhizierungsbewertung sind in Anlage 4 vollständig aufgeführt.

Die Ertragsergebnisse des Versuchsanbaujahres 2003 sind in der Abb. 31 graphisch dargestellt. Die Abbildung zeigt die jeweils unter ökologischen und konventionellen Bedingungen erzielten frischen Krauterträge, geteilt nach den Ernteerträgen beim Schnitt im ersten Standjahr sowie dem ersten und zweiten Schnitt im zweiten Standjahr.

Die Ernteerträge für Thymian im Anbaujahr 2003 fielen laut Abb. 31 vergleichsweise niedrig aus. Dies war auf die heiße und trockene Vegetationsperiode in diesem Jahr zurückzuführen. Aus diesem Grund kam es im ökologischen Anbau auch zu deutlich niedrigeren Erträgen als im konventionellen Anbau.

Durch Behandlung der Flächen mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton zum Zeitpunkt der Aussaat wurden im ökologischen Anbau von Thymian im ersten Standjahr Ertragszuwächse von 26 % im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Kontrollen erzielt. Im konventionellen Anbau betragen die Ertragszuwächse auf den mykorrhizierten Flächen immer noch 9 % gegenüber den Kontrollen. Diese Ertragssteigerungen konnten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von < 5 % als signifikant bewertet werden.

Die positiven Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Erträge wurden auch im zweiten Standjahr der Thymianflächen festgestellt und führten im konventionellen Anbau bei beiden Folgernten zu weiteren signifikanten Ertragssteigerungen. Im ökologischen Anbau wurden tendenziell ebenfalls höhere Erträge bei beiden Ernten im zweiten Standjahr erzielt ( $p < 0,10$ ). Bezogen auf den Gesamtertrag aller Krauternten der 2003 angelegten Thymianflächen waren durch den Einsatz von AMykor<sup>®</sup>-Blähton im ökologischen Anbau schließlich Ertragssteigerungen von 11 % erzielt worden und die Ertragssteigerungen im konventionellen Anbau wurden sogar auf 15 % erhöht. Das Signifikanzniveau lag dabei für beide Anbauvarianten deutlich über 99 %.

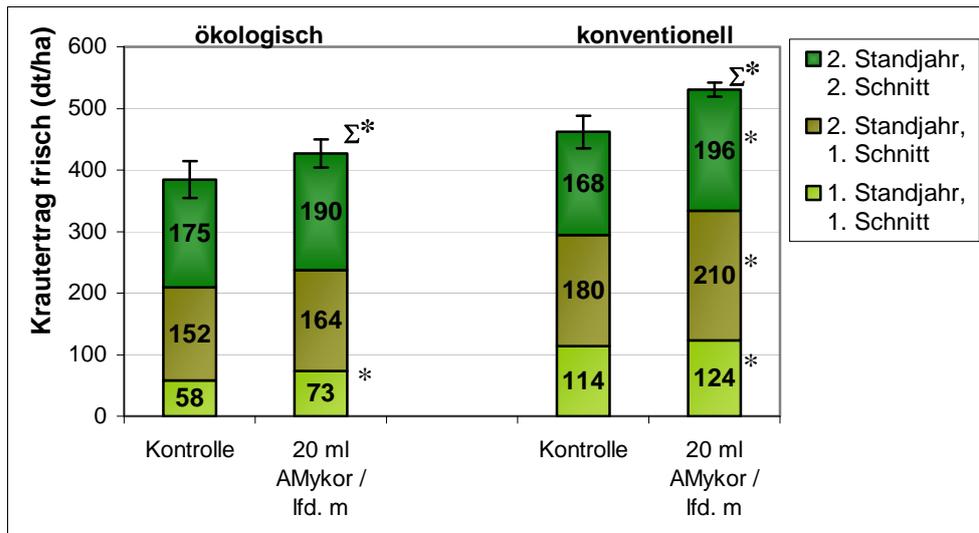


Abb. 31 Ernteerträge für den Thymiananbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamterträge, n=6)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied der Einzelerträge im Vergleich zur Kontrolle

Σ\* bedeutet signifikanten Unterschied der Gesamterträge im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,01$ )

signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Die Inhaltsstoffbestimmung erfolgte in Abhängigkeit von der vorgenommenen Mykorrhizierung der Anbauflächen und dem Anbauverfahren (ökologisch oder konventionell). Die ermittelten Peakflächen-Prozente für die Hauptaromakomponenten (Thymol,  $\gamma$ -Terpinen und p-Cymen) nach HS-SPME/GC sowie die ätherischen Ölgehalte nach WDD sind in Abb. 32 dargestellt. Dabei sind jeweils die Mittelwerte aus sechs Versuchswiederholungen im Feldanbau sowie davon aus je zwei analytischen Bestimmungen für die mykorrhizierten (mit 20 ml AMykor®/ld. m) bzw. nicht mykorrhizierten (Kontrolle) Pflanzen gegenübergestellt.

Die aus der Abb. 32 erkennbaren höheren ätherischen Ölgehalte bei Mykorrhiza-Einsatz im ökologischen Anbau 2003 erwiesen sich als signifikant. Im konventionellen Anbau wiesen die mykorrhizierten Pflanzen dagegen sogar geringere ätherische Ölgehalte auf, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Der Vergleich der Inhaltsstoffzusammensetzung (Peakflächen-Prozente) im ökologischen Anbau von Thymian (Abb. 32) zeigt einen signifikant positiven Einfluss des Mykorrhiza-Einsatzes auf den Anteil der thymiantypischen Aromakomponente Thymol. Im konventionellen Anbau von Thymian 2003 ist die Wirkung der Mykorrhizierung auf den Thymolgehalt dagegen nicht signifikant. Jedoch wurden im konventionellen Anbau bei den mykorrhizierten Pflanzen signifikant höhere Anteile der ebenfalls für das Thymianaroma verantwortlichen Aromakomponente p-Cymen und dafür niedrigere Anteile an  $\gamma$ -Terpinen gefunden (Abb. 32). Eine Beeinflussung der Inhaltsstoffzusammensetzung von Thymian durch die Mykorrhizierung findet damit auch im feldmäßigen Anbau statt.

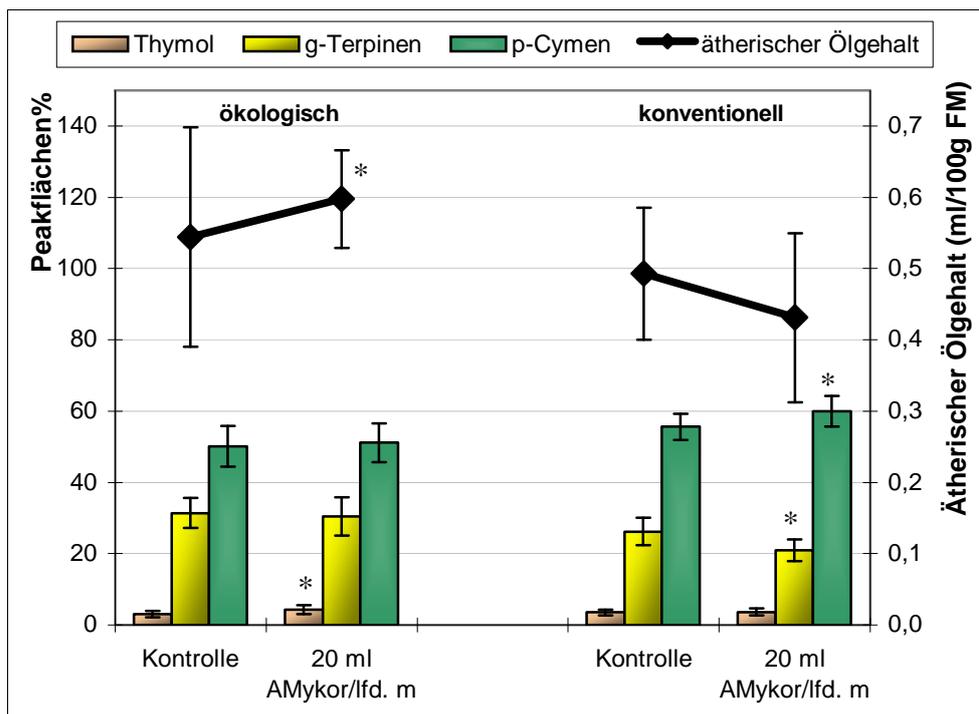


Abb. 32 Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=6)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell nur für den ätherischen Ölgehalt

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Im nächsten Anbaujahr wurden die Feldversuche auf den zur Verdrängung autochthoner Mykorrhiza mit nicht mykorrhizierendem Raps als Vorfrucht vorbereiteten Versuchsfeldern durchgeführt, um deutlichere Unterschiede im Mykorrhizierungsgrad zu erhalten und deutlichere Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Inhaltsstoffdaten zu detektieren. Die Versuchswiederholungen der Feldversuche (ökologisch und konventionell) für Thymian im Anbaujahr 2004 wurden zur Erhöhung der statistischen Sicherheit außerdem auf 18 Kontrollparzellen und 12 Parzellen mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton erhöht.

Die Ergebnisse der Wurzeluntersuchungen der Thymiananbauflächen 2004 zeigten jedoch während der Thymianvegetation auch auf nicht mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelten Flächen vorhandene Mykorrhiza-Strukturen (Anlage 4). Trotz der vorherigen Verdrängung von Mykorrhizapilzen durch den Einsatz von Raps als Vorfrucht, konnte sich die autochthone Mykorrhiza während der Vegetationsperiode von Thymian schnell wieder regenerieren. Die zum Zeitpunkt der Thymianaussaat mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelten Parzellen wiesen zwar höhere Mykorrhizierungsgrade (Bewertungsstufen 1 bis 3) auf als die Kontrollflächen, jedoch hatte sich auch auf den meisten unbehandelten Parzellen bis zur Thymianernte wieder eine stabile Mykorrhiza-Kultur etabliert (Bewertungsstufe 0 bis 2).

Die Biomasseerträge wurden demzufolge im Anbaujahr 2004 auch deutlich weniger von der gezielten Mykorrhiza-Behandlung der Versuchsfeldern beeinflusst (Abb. 33). Zwar deuteten sich im konventionellen Anbauversuch 2004 Ertragssteigerungen auf den mykorrhizierten Flächen an, jedoch wurde im ökologischen Versuch der gegenteilige Effekt beobachtet.

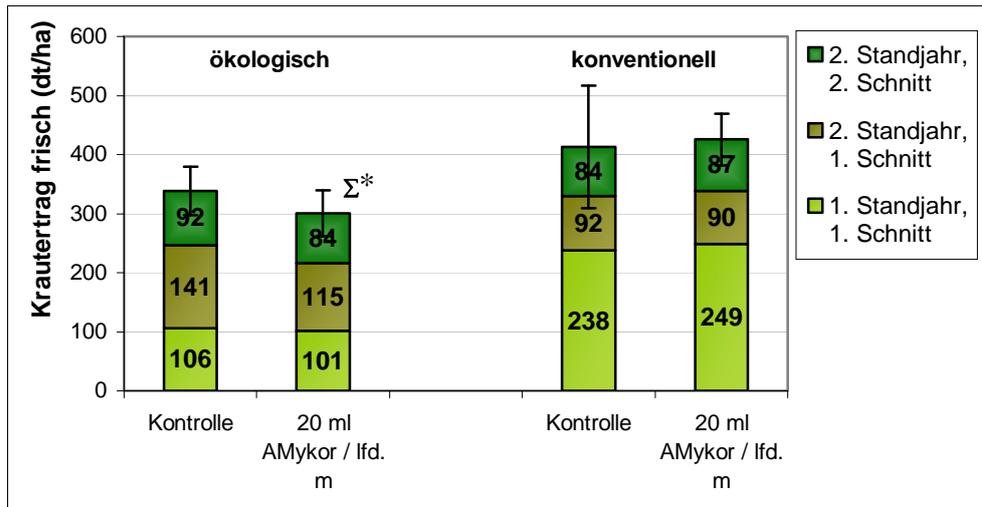


Abb. 33 Ernteerträge für den Thymiananbau 2004 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamterträge,  $n_1=18$  Kontrollen,  $n_2=12$  AMykor® 20 ml / lfd. m)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

$\Sigma^*$  bedeutet signifikanten Unterschied der Gesamterträge im Vergleich zur Kontrolle  
signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell  
tendenzielle Interaktion beider Einflussfaktoren ( $p < 0,10$ )

Die Abb. 34 lässt aber einen Einfluss der Ausbringung des AMykor®-Blähtons auf den ätherischen Ölgehalt im Anbaujahr 2004 erkennen.

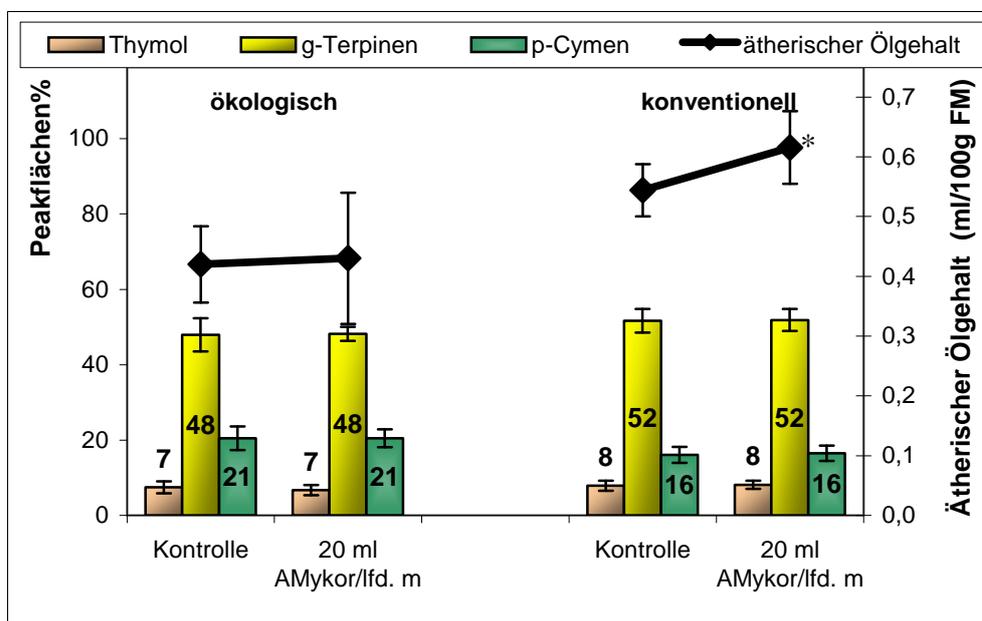


Abb. 34 Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2004 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD,  $n_1=18$  Kontrollen,  $n_2=12$  AMykor® 20 ml / lfd. m)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle  
signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell für Thymol, p-Cymen,  $\gamma$ -Terpinen sowie für den ätherischen Ölgehalt  
keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Im konventionellen Anbau des Thymians in Bernburg wurde eine signifikante Steigerung der ätherischen Ölgehalte auf den mit AMykor® behandelten Flächen festgestellt. Im ökologischen Anbau führte die Ausbringung des AMykor®-Blähtons allerdings zu keiner signifikanten Beeinflussung der ätherischen Ölgehalte. Die Zusammensetzung der Aromakomponenten wurde durch die Ausbringung der beiden Blähtonvarianten ebenfalls nicht signifikant beeinflusst.

Im letzten Versuchsjahr des Thymiananbaus 2005 wurden die Feldversuche für Thymian weiter ausgedehnt, so dass für den ökologischen als auch für den konventionellen Landbau je 30 Wiederholungen der Kontrollflächen (ohne Blähton-Ausbringung) vorlagen und je 15 Wiederholungen von mykorrhizierten Flächen mit 20 bzw. 40 ml AMykor®-Blähton / lfd. m. Die Wurzeluntersuchungen auf den vorhandenen Mykorrhizierungsgrad (Anlage 4) ergaben aber auch in diesem Versuchsjahr deutliche Mykorrhizierungen auf den Kontrollflächen. Der Rapsanbau in der Vorfrucht konnte die autochthone Mykorrhiza zwar auch für den Anbauversuch 2005 zunächst verdrängen, doch hatte sich die Mykorrhiza innerhalb der Vegetationsperiode des Thymians auch in diesem Jahr auf den nicht inokulierten Kontrollflächen schnell wieder etabliert. Mit AMykor®-Blähton behandelte Parzellen wiesen zwar durchschnittlich höhere Mykorrhizierungsgrade auf, aber auch die Kontrollflächen waren zum Teil mykorrhiziert (Anlage 4).

Signifikante Effekte auf die Biomasseerträge durch den Einsatz des AMykor®-Blähtons konnten daher in den Feldversuchen 2005 aufgrund der hohen Schwankungen der Parzellenerträge erneut nicht ermittelt werden (Abb. 35).

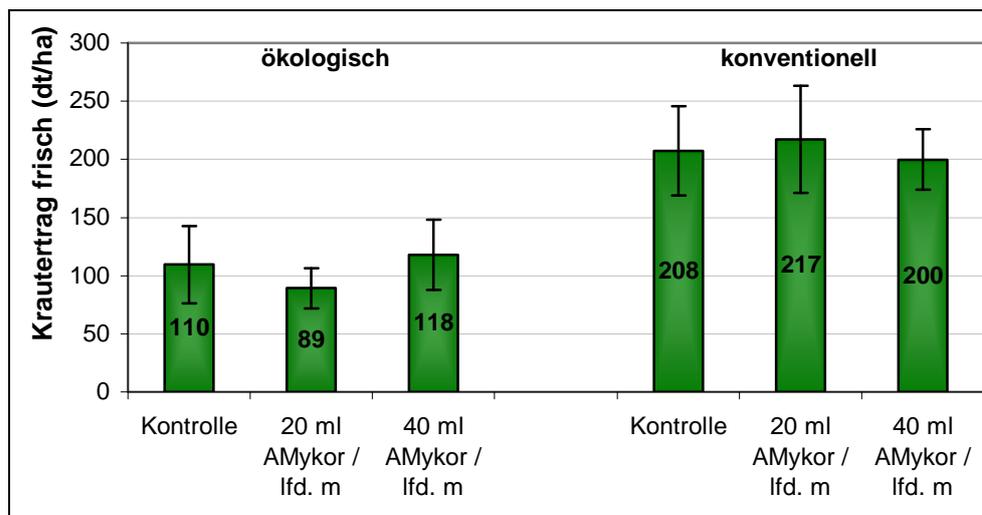


Abb. 35 Ernteerträge für den Thymiananbau 2005 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD,  $n_1=30$  Kontrollen,  $n_2=15$  AMykor® 20 ml / lfd.m,  $n_3=15$  AMykor® 40 ml / lfd. m)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle  
 signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell  
 signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Auch die Auswertung der ätherischen Ölgehalte zeigte keine signifikanten Einflüsse der Mykorrhizierung (Abb. 36).

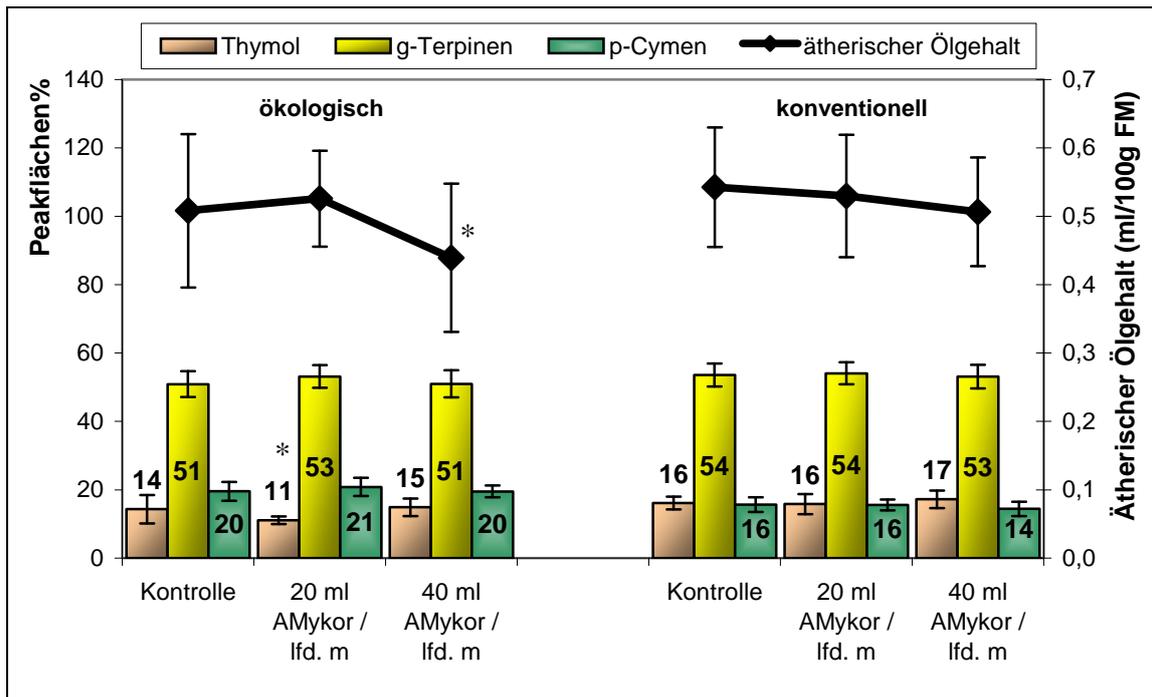


Abb. 36 Peakflächen-Prozente der Hauptaromakomponenten nach HS-SPME/GC und ätherische Ölgehalte nach WDD für den Thymiananbau 2005 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD,  $n_1=30$  Kontrollen,  $n_2=15$  AMykor<sup>®</sup> 20 ml/lfd. m,  $n_3=15$  AMykor<sup>®</sup> 40 ml/lfd. m)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell für Thymol, p-Cymen und  $\gamma$ -Terpinen

kein signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell für ätherischen Ölgehalt

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Betrachtet man die Zusammensetzung der Aromakomponenten (Peakflächen-Prozente nach HS-SPME/GC), so wurden für p-Cymen und  $\gamma$ -Terpinen weder im ökologischen noch im konventionellen Feldversuch signifikante Einflüsse der Mykorrhizierung festgestellt. Der Gehalt an Thymol wurde allerdings im ökologischen Anbau bei leichter Mykorrhizierung zunächst signifikant gesenkt, konnte bei stärkerer Mykorrhizierung dann aber wieder gesteigert werden (Abb. 36).

Der Einfluss der Mykorrhizierung auf Ertragswerte und Inhaltsstoffe von Thymian wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der guten Mykorrhizierbarkeit dieser Kultur am umfassendsten betrachtet. Die Einflüsse einer Mykorrhizierung mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton auf die Erträge und die aromagebenden Inhaltsstoffe für Thymian wurden daher für alle durchgeführten Untersuchungen anhand der Gewächshaus- und Feldversuche in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst (Tab. 6). Die Auswertung in der Tabelle zeigt zunächst einen positiven Einfluss der Mykorrhizierung mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton auf den Krautertrag im Thymiananbau. Insbesondere im Gewächshausversuch sowie im Feldversuch 2003 führte die Anwendung des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons zu signifikanten Steigerungen der Krauterträge. Nur im ökologischen Anbau der Versuchsjahre 2004 und 2005 deuteten sich niedrigere Ernteerträgen nach Mykorrhizierung an. Da in diesen Jahren jedoch auch auf den Kontrollflächen gut etablierte Mykorrhiza-Symbiosen an den Thymianwurzeln detektiert wurden, sind diese Versuchsergebnisse nicht zu verallgemeinern.

Auch der Gesamtgehalt an ätherischem Öl in Thymian wurde insbesondere bei leichter Mykorrhizierung (20 ml / lfd. m) meist positiv beeinflusst. Erhöhte Mengen an Inokulum hatten im Vergleich zu den Kontrollflächen allerdings keinen Einfluss auf den Gesamtgehalt

oder führten sogar zu einer Senkung der Gehalte an ätherischem Öl im Vergleich zur Kontrolle. Bezüglich der Zusammensetzung der Aromakomponenten kam es bei Mykorrhiza-Anwendung häufig zu einer Steigerung der p-Cymen-Gehalte und im Gegenzug zu niedrigeren Gehalten an  $\gamma$ -Terpinen. Die Thymolgehalte wurden bei Mykorrhizierung oft gesteigert. Dieser Effekt wurde bei höherem Mykorrhiza-Einsatz eher noch unterstützt.

Tab. 6 Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Thymian

Parameter	Gewächshausversuche mit AMykor <sup>®</sup> -Blähton	Feldversuche						Aufwandmenge AMykor <sup>®</sup>
		ökologisch			konventionell			
		2003	2004	2005	2003	2004	2005	
Krautertrag	↑↑↑*	↑↑*	↓↓*	↓↓	↑↑*	—	—	20 ml / lfd. m
				↑			—	40 ml / lfd. m
Ätherischer Ölgehalt	↓↓↓	↑↑*	—	—	↓↓	↑↑*	—	20 ml / lfd. m
				↓↓*			↓	40 ml / lfd. m
Zusammensetzung der Aromakomponenten (%)	p-Cymen	↑↑	—	—	—	↑*	—	20 ml / lfd. m
					—			↓
	$\gamma$ -Terpinen	↓↓↓↓	—	—	—	↓↓↓*	—	20 ml / lfd. m
					—			—
Thymol	↑↑↑↑	↑↑↑↑*	↓↓	↓↓*	—	—	20 ml / lfd. m	
				↑			↑	40 ml / lfd. m

↑ - erhöht mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↑ (5 - 10 %), ↑↑ (10 - 20 %), ↑↑↑ (20 - 30 %), ↑↑↑↑ (> 30 %);

↓ - gesenkt mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↓ (5 - 10 %), ↓↓ (10 - 20 %), ↓↓↓ (20 - 30 %), ↓↓↓↓ (> 30 %);

— - unbeeinflusst von Mykorrhizierung (Abweichung von der Kontrolle < 5 %);

\* - signifikante Änderung ( $p < 0,05$ )

### 6.2.2.2 Majoran

Feldversuche mit Majoran wurden in den Jahren 2002, 2003 und 2004 durchgeführt. Die extrem heißen und trockenen Witterungsbedingungen im Versuchsjahr 2003 (siehe Kap. 6.2.2 und Anlage 3) führten jedoch zu deutlich lückenhaften Beständen und damit hohen Ernteverlusten, so dass dieser Anbauversuch nicht ausgewertet werden konnte.

Die Wurzeluntersuchungen zum Mykorrhizierungsgrad ergaben für die beiden übrigen Jahre erfolgreiche Mykorrhizierungsergebnisse auf den mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelten Versuchsflächen, dagegen meist keine bzw. nur gering ausgebildete Mykorrhiza-Strukturen auf den Kontrollflächen (Anlage 4).

Die Krauterträge von Majoran konnten im Versuchsjahr 2002 durch Einsatz des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons nicht signifikant gesteigert werden. Eine Tendenz zu höheren Ernteerträgen gab es allerdings 2002 im konventionellen Anbau von Majoran nach Mykorrhiza-Behandlung ( $p < 0,15$ , vgl. Abb. 37).

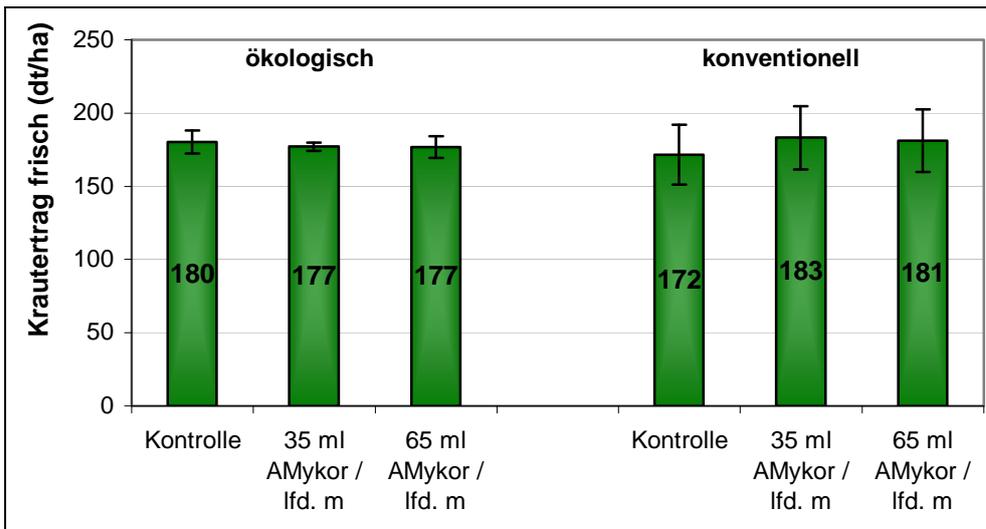


Abb. 37 Ernteerträge für den Majorananbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle

keine signifikanten Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Die mittels Wasserdampfdestillation (WDD) ermittelten Gesamtgehalte an ätherischem Öl der Majoranpflanzen aus dem Feldversuch 2002 sind in der Abb. 38 graphisch dargestellt.

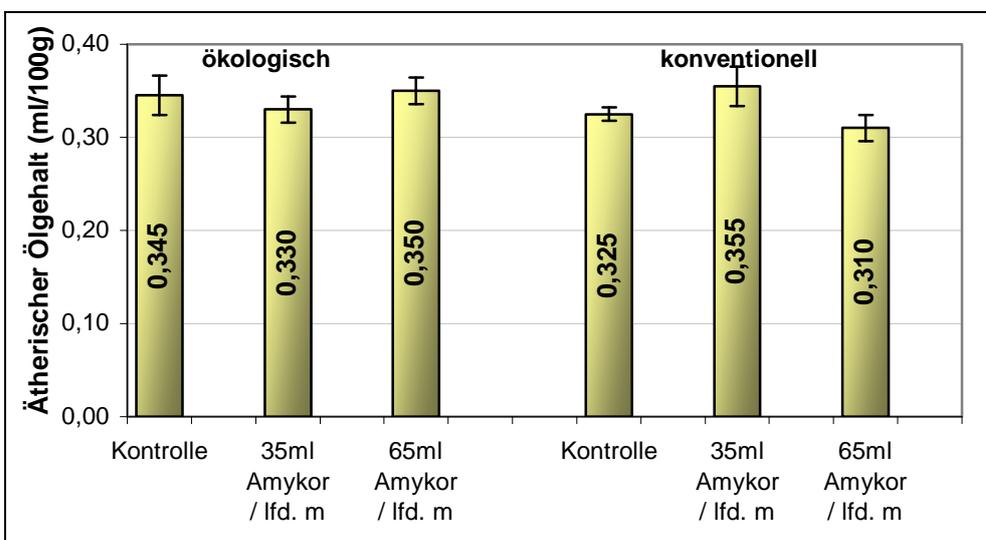


Abb. 38 Ätherische Ölgehalte nach WDD für den Majorananbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ): keine signifikanten Unterschiede

Auch bezüglich der ätherischen Ölgehalte wurden tendenziell höhere Werte nur bei der mykorrhizierten Variante des konventionellen Anbaus ermittelt ( $p < 0,15$ ). Signifikante Unterschiede gab es jedoch auch bei den ätherischen Ölgehalten weder in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung noch in Abhängigkeit vom konventionellen oder ökologischen Anbau.

Im Jahr 2003 wurden die Versuchsflächen für 2004 mit nicht mykorrhizierendem Raps als Vorkultur vorbereitet, wodurch die autochthone Mykorrhiza verdrängt werden sollte. Außer-

dem wurden die Versuchswiederholungen pro Variante von im Jahr 2002 vier auf sechs in den Folgejahren erhöht. Schließlich erwies sich die Mykorrhizierung im ersten Versuchsjahr 2002 mit Aufwandmengen von 35 bzw. 65 ml / lfd. m außerdem als zu hoch und wurde für die nächsten Versuchsjahre auf 20 ml / lfd. m festgelegt.

Signifikante Unterschiede der Krauterträge oder auch der Gehalte an ätherischem Öl und der Zusammensetzungen der Aromakomponenten wurden bei Majoran zwischen Kontrollflächen und mit Blähton behandelten Flächen aber auch im Versuchsjahr 2004 nicht detektiert (ohne Abb.).

Die für Majoran in den Gewächshaus- und Feldversuchen ermittelten Daten zum Einfluss der Mykorrhizierung mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton auf die Erträge und Aromastoffgehalte werden in der Tab. 7 nochmals zusammengefasst dargestellt.

Tab. 7 Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Majoran

Parameter	Gewächshaus- versuche mit AMykor <sup>®</sup> -Blähton	Feldversuche				Aufwand- menge AMykor <sup>®</sup>	
		ökologisch		konventionell			
		2002	2004	2002	2004		
Krautertrag	↑↑		↑		—	20 ml / lfd. m	
		—		↑		35 ml / lfd. m	
		—		↑		65 ml / lfd. m	
Ätherischer Ölgehalt	↓↓		↓↓		↑	20 ml / lfd. m	
		—		↑		35 ml / lfd. m	
		—		—		65 ml / lfd. m	
Zusammensetzung der Aromakomponenten (%)	Sabinen	↓↓↓↓		—		↑↑↑	20 ml / lfd. m
	trans-Sabinenhydrat	↓↓		↑↑		↑	20 ml / lfd. m
	cis-Sabinenhydrat	↑↑		↑↑		—	20 ml / lfd. m
	trans-Sabinenhydratacetat	↑↑↑↑		↓↓↓		↓↓↓	20 ml / lfd. m
	cis-Sabinenhydratacetat	—		↓↓		↓	20 ml / lfd. m

- ↑ - erhöht mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↑ (5 - 10 %), ↑↑ (10 - 20 %), ↑↑↑ (20 - 30 %), ↑↑↑↑ (> 30 %);  
 ↓ - gesenkt mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↓ (5 - 10 %), ↓↓ (10 - 20 %), ↓↓↓ (20 - 30 %), ↓↓↓↓ (> 30 %);  
 — - unbeeinflusst von Mykorrhizierung (Abweichung von der Kontrolle < 5 %);  
 \* - signifikante Änderung (p < 0,05)

Die zusammenfassende Darstellung in der Tabelle macht deutlich, dass die Wirkungen der gezielten Inokulation von Majoranpflanzen mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton deutlich geringer ausfielen als die für Thymian beobachteten Effekte. Eine tendenzielle Steigerung der Krauterträge bei Inokulation mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton wurde zwar im Rahmen der Gewächshausversuche festgestellt werden, doch konnte diese Beobachtung nur im konventionellen Feldversuch 2002 bestätigt werden (p < 0,15). Signifikante Ertragssteigerungen wurden in keinem Versuch ermittelt. Auch bezüglich der Gehalte und Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe waren keine reproduzierbaren Effekte im Zusammenhang mit der Blähtonanwendung detektiert worden. Eine Tendenz zur Steigerung des ätherischen Ölgehaltes lässt sich nur im konventionellen Landbau erkennen (p < 0,15).

### 6.2.2.3 Johanniskraut

Mit Johanniskraut wurden Feldversuche in den Jahren 2002 und 2003 durchgeführt. Bei den Wurzeluntersuchungen zum Mykorrhizierungsgrad der Versuchspartellen wurden meist deutliche Unterschiede zwischen den gezielt inokulierten Flächen und den Kontrollflächen ermittelt. Nicht mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelte Kontrollflächen waren zwar meist auch leicht mykorrhiziert, auf den gezielt inokulierten Versuchsfeldern wurden aber deutlich stärker ausgebildete Mykorrhiza-Strukturen gefunden. Keine höhere Mykorrhiza-Ausbildung als auf den Kontrollflächen war an den mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton inokulierten Pflanzen aber im ökologischen Feldversuch des Anbaujahres 2002 festgestellt worden. (Anlage 4)

Die für Johanniskraut im Feldversuch 2002 ermittelten Erträge werden in der folgenden Abbildung dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden hier weder in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung noch in Abhängigkeit vom ökologischen bzw. konventionellen Anbau ermittelt (Abb. 39).

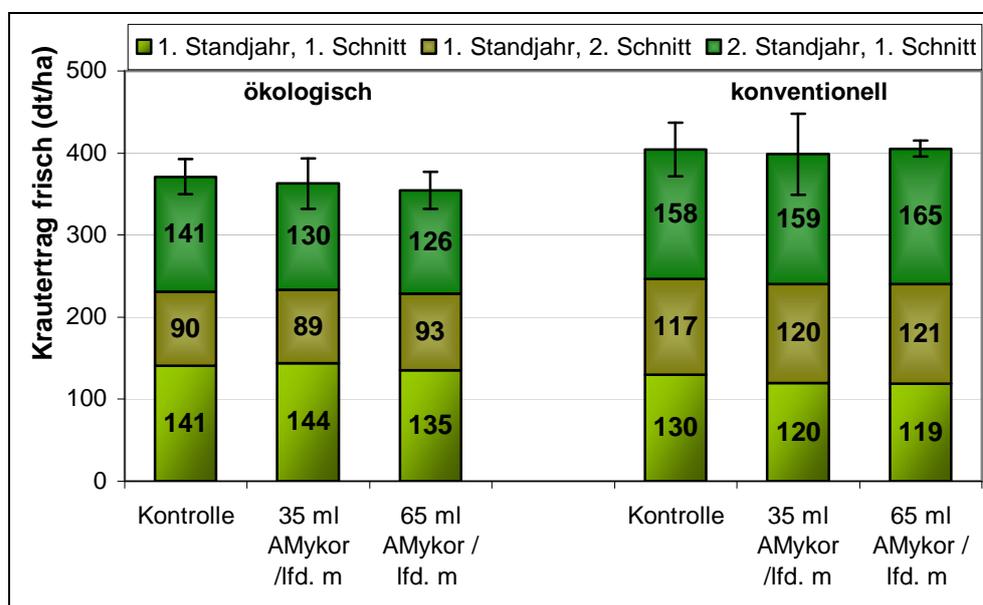


Abb. 39 Ernteerträge für den Johanniskrautanbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle

signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell

keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Die Ergebnisse der Bestimmung der Hypericinverbindungen für das Johanniskraut aus dem Anbaujahr 2002 wiesen dagegen deutlichere Veränderungen in Abhängigkeit vom Mykorrhiza-Einsatz auf. Die Abb. 40 zeigt dazu die ermittelten Hypericingehalte des ersten und zweiten Schnittes im Versuchsjahr 2002 jeweils für die ökologische und konventionelle Anbauvariante.

Im konventionellen Anbau wurden, wie hier zu sehen, signifikant höhere Gehalte der beiden Hypericinverbindungen Hypericin und Pseudohypericin in den mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen gefunden. Bei den Johanniskrautpflanzen aus ökologischem Anbau waren die Hypericingehalte bereits auf den nicht mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton mykorrhizierten Flächen sehr hoch. Wie oben beschrieben, hatte die zusätzliche Ausbringung des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons außerdem zu keiner besseren Mykorrhiza-Ausbildung als auf den Kontrollflächen geführt (vgl. Anlage 4). Demzufolge wurde auch keine weitere Steigerung der Hypericingehalte auf den AMykor<sup>®</sup>-Flächen erzielt.

Die Hypericingehalte des Johanniskrauts aus der zweiten Ernte waren in beiden Anbauvarianten gegenüber den Gehalten aus der ersten Ernte deutlich gesenkt. Auch hier war wieder ein positiver Einfluss der Mykorrhiza-Anwendung auf den Hypericingehalt in der konventionellen Variante festzustellen.

Weiterhin war zu beobachten, dass eine niedrigere Dosierung des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons zu stärkeren Effekten führte als die höhere Dosierung.

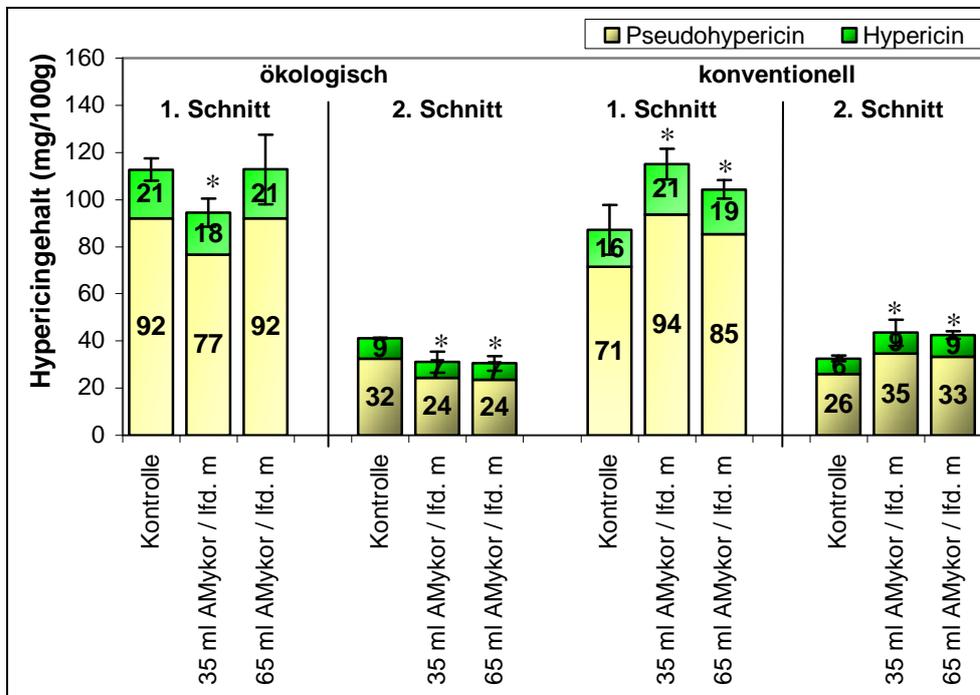


Abb. 40 Hypericingehalte nach ASE/HPLC für den Johanniskrautanbau 2002 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamtgehalte, n=4)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle

kein signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell

signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Wie schon für Majoran beschrieben, hatte auch das Johanniskraut im Anbaujahr 2003 deutlich unter den heißen Temperaturen und den fehlenden Niederschlägen zu leiden. Die Pflanzen waren unvollständig aufgegangen, was zu großen Bestandslücken, geringem Pflanzenwuchs und insgesamt hohen Ernteaussfällen führte. Auch die Auswertung der Ernteerträge (Abb. 41) führte deshalb zu deutlichen Schwankungen der einzelnen Parzellen, so dass keine Unterschiede der Krauterträge in Abhängigkeit von der Anwendung des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons ermittelt wurden. Bei der Folgernte im zweiten Standjahr wurden zwar wieder höhere Ernteerträge erhalten, signifikante Ertragsunterschiede in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung traten aber auch hier nicht auf.

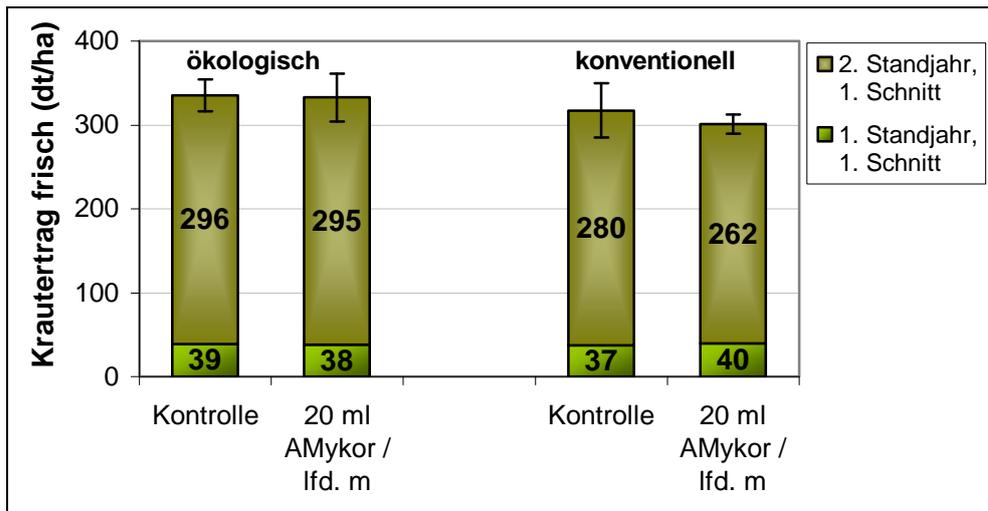


Abb. 41 Ernteerträge für den Johanniskrautanbau 2003 in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und ökologischem bzw. konventionellem Anbauverfahren (MW±SD, n=6)

Zweifaktorielle ANOVA ( $p < 0,05$ ):

- keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle
- signifikanter Unterschied zwischen ökologisch und konventionell
- keine signifikante Interaktion beider Einflussfaktoren

Die Hypericingehalte wurden aufgrund des sehr ungleichmäßigen und sehr lückenhaften Bestandes der ökologischen Flächen beim ersten Schnitt im Anbaujahr 2003 nur für den konventionellen Feldversuch ermittelt und sind in der Abb. 42 dargestellt.

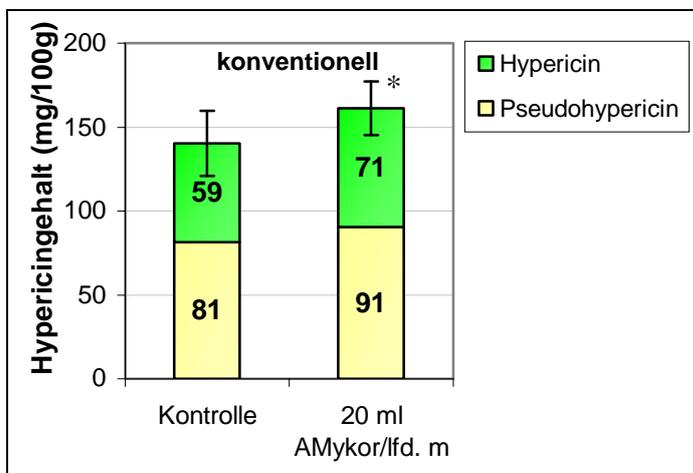


Abb. 42 Hypericingehalte nach ASE/HPLC für den Johanniskrautanbau 2003 in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung bei konventionellem Anbauverfahren (MW±SD der Gesamtgehalte, n=6)

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (t-test,  $p < 0,05$ )

Die Abb. 42 zeigt, dass zumindest für den konventionellen Anbau auch im Anbaujahr 2003 signifikante Steigerungen der Hypericingehalte bei den mykorrhizierten Pflanzen festgestellt wurden.

Eine Zusammenfassung aller für Johanniskraut ermittelten Einflüsse einer Mykorrhizierung mit AMykor®-Blähton auf die Erträge und Hypericingehalte in den durchgeführten Gewächshaus- und Feldversuchen wird in der Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8 Zusammenfassende Übersicht aller ermittelten Einflüsse der Mykorrhizierung mit AMykor®-Blähton auf Ertrag und Inhaltsstoffe von Johanniskraut

Parameter	Gewächshausversuche mit AMykor®-Blähton	Feldversuche				Aufwandmenge AMykor®
		ökologisch		konventionell		
		2002	2003	2002	2003	
Krautertrag	↑↑		—		—	20 ml / lfd. m
		—		—		35 ml / lfd. m
		—		—		65 ml / lfd. m
Hypericin	↑↑		n.a.		↑↑↑*	20 ml / lfd. m
		↓↓*		↑↑↑↑*		35 ml / lfd. m
		—		↑↑↑*		65 ml / lfd. m
Pseudohypericin	↑↑		n.a.		↑↑*	20 ml / lfd. m
		↓↓*		↑↑↑↑*		35 ml / lfd. m
		—		↑↑*		65 ml / lfd. m

↑ - erhöht mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↑ (5 - 10 %), ↑↑ (10 - 20 %), ↑↑↑ (20 - 30 %), ↑↑↑↑ (> 30 %);  
 ↓ - gesenkt mit AM im Vergleich zur Kontrolle: ↓ (5 - 10 %), ↓↓ (10 - 20 %), ↓↓↓ (20 - 30 %), ↓↓↓↓ (> 30 %);  
 — - unbeeinflusst von Mykorrhizierung (Abweichung von der Kontrolle < 5 %);  
 \* - signifikante Änderung ( $p < 0,05$ );  
 n.a. - nicht analysiert (zu geringe Probenmengen);  
 - Mykorrhizierung durch AMykor®-Blähton nicht erfolgreich

Im Gewächshausversuch wurden für die Mykorrhizierung mit AMykor®-Blähton tendenziell steigernde Effekte auf den Ertrag und die Inhaltsstoffe Hypericin und Pseudohypericin festgestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchswiederholungen waren diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant. Eine ertragsteigernde Wirkung der Mykorrhizierung ließ sich in den Feldversuchen aber nicht bestätigen.

Dagegen waren auch in den Feldversuchen deutliche Änderungen der Inhaltsstoffgehalte (Hypericine) nach der Anwendung des AMykor®-Blähtons zu beobachten. Dabei fand im Anbaujahr 2002 im ökologischen Anbau bei niedriger Anwendungskonzentration des Mykorrhiza-Inokulums eine Reduzierung der Gehalte der Hypericinverbindungen in Johanniskraut statt. Aufgrund der fehlenden Unterschiede im Mykorrhizierungsgrad von inokulierten Versuchsflächen und Kontrollflächen ist für diesen Effekt aber nicht der Einsatz des AMykor®-Blähtons verantwortlich. Die ökologischen Feldversuche des nächsten Anbaujahres konnten nicht analysiert werden, so dass die Effekte im ökologischen Anbau insgesamt nicht auswertbar sind.

Im konventionellen Anbau wurden aber in beiden Anbaujahren für alle Anwendungskonzentrationen des Inokulums signifikante Steigerungen der Inhaltsstoffe Hypericin und Pseudohypericin ermittelt. Dabei führte eine niedrigere Dosierung des AMykor®-Blähtons zu stärkeren Effekten auf die Hypericingehalte als eine höhere Dosierung.

Zusammenfassend wurde auch für Johanniskraut ein deutlicher Einfluss der Mykorrhiza-Behandlung auf die Entwicklung der wertgebenden Inhaltsstoffe der Pflanze festgestellt.

## 6.3 Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides*

### 6.3.1 Phänotypische Beurteilung der Schädigungen

Nach Mykorrhiza-Inokulation war bei gesunden, nicht mit dem Erreger beimpften Johanniskrautpflanzen im Gewächshaus äußerlich kein Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen zu beobachten. Die Abb. 43 zeigt das Ergebnis der Beimpfung mit dem Erreger am Beispiel nicht mykorrhizierter und mykorrhizierter Pflanzen der „anfälligen Standardsorte“.

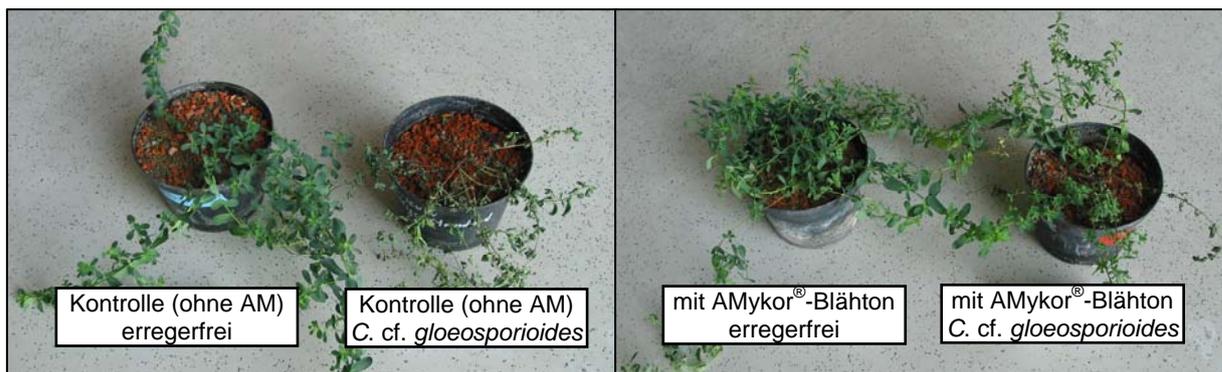


Abb. 43 Vergleich nicht mykorrhizierter Pflanzen (Bild links) und mykorrhizierter Pflanzen (Bild rechts) jeweils ohne (linke Pflanze) bzw. mit (rechte Pflanze) Erregerbeimpfung

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle (linkes Bild), AMykor®-Blähton (rechtes Bild)

Erreger: ohne Erreger (je linke Pflanze), *C. cf. gloeosporioides*  $10^3$  Konidien/ml (je rechte Pflanze)

Zeitpunkt: 10 DAT

Bereits 10 Tage nach der Inokulation mit 25 ml einer Konidien suspension von *Colletotrichum cf. gloeosporioides* einer Konidien dichte von  $10^3$ /ml waren in der nicht mykorrhizierten Pflanze deutliche Welkesymptome bei der behandelten Variante (rechte Pflanze im linken Bild) zu erkennen. Die Ausbringung von 25 ml Erregersuspension einer Konidien dichte von  $10^3$ /ml führte demnach bei der nicht mykorrhizierten Kontrolle der „anfälligen Standardsorte“ schon nach 10 Tagen zu den bekannten Krankheitssymptomen, die schließlich auch das Absterben der Pflanzen nach sich zogen.

Betrachtet man dagegen die zuvor mit dem AMykor®-Blähton mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen der „anfälligen Standardsorte“, so führte der Befall mit dem Erreger längst nicht zu den eben beschriebenen Ergebnissen (Abb. 43, rechtes Bild). Im Vergleich zur nicht mykorrhizierten Variante (Abb. 43, linkes Bild) hielt die mykorrhizierte Pflanze (Abb. 43, rechtes Bild) dem Befall mit dem Erreger deutlich besser stand und wies auch nach der Beimpfung nahezu keine Welkesymptome auf.

Die dargestellten Ergebnisse ließen sich mit den weiteren durchgeführten Versuchen regelmäßig reproduzieren. Auch bei der Sorte ‚Topaz‘ wurden in nicht zuvor mykorrhizierten Pflanzen Welkesymptome beobachtet, die allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt die entsprechende Ausprägung erlangten. Bei vorheriger Mykorrhizierung blieben die Welkesymptome auch bei dieser Johanniskrautsorte aus oder waren deutlich schwächer ausgeprägt (ohne Abbildung).

Phänotypisch wurde damit ein positiver Einfluss der Mykorrhizierung auf die Toleranz der Johanniskrautpflanzen gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* ermittelt.

### 6.3.2 Biomasseausbeuten in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Pathogenbefall

Die Bestimmung der Biomasse in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Töpfen jeweils 30 Tage nach der Inokulation mit dem Erreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* führte zu den in Abb. 44 dargestellten Ergebnissen.

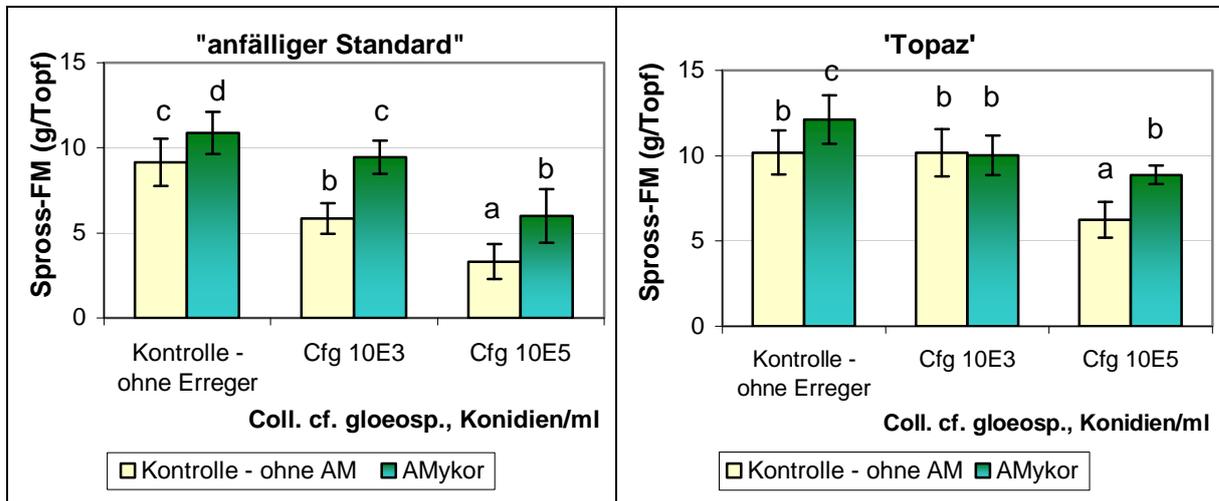


Abb. 44 Biomasse (frisches Sprossgewicht in g/Topf) in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) 30 DAT (MW±SD, n=6)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“ (Bild links), „Topaz“ (Bild rechts)

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erreger: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

Zeitpunkt: 30 DAT

\* bedeutet signifikanten Unterschied im Vergleich zur nicht mykorrhizierten Kontrolle (t-test, p < 0,05)

Bei der „anfälligen Standardsorte“ (Bild links) hatte die Mykorrhizierung bereits anhand der gesunden Kontrollvariante (ohne Erreger) zu leicht erhöhten Biomasseerträgen geführt. Die durch den Erregerbefall im Wachstum beeinträchtigten Töpfe wiesen in den mykorrhizierten Varianten ebenfalls deutlich höhere Erträge auf.

Auch bei der toleranten Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ (Bild rechts) war schon anhand der gesunden Pflanzen bei Mykorrhizierung ein besseres Wachstum, gemessen an der Biomasse, zu erkennen. In den nicht mykorrhizierten Pflanzen dieser Sorte führte eine Beimpfung mit der geringeren Erregerkonzentration von 10<sup>3</sup> Konidien pro ml noch nicht zu Ertragsverlusten. Bei höherer Erregerkonzentration von 10<sup>5</sup> Konidien pro ml dagegen wiesen auch die nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen der Sorte ‚Topaz‘ ein beeinträchtigtes Wachstum auf. Die Mykorrhizierung hatte aber auch bei der Sorte ‚Topaz‘ die Wachstumshemmung unterdrückt. Die Behandlung mit AMykor®-Blähton hat damit am Beispiel des Johanniskrauts im Gewächshausversuch einen positiven Effekt auf die Biomasseerträge gesunder Pflanzen, v.a. aber auch auf die mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* befallenen kranken Pflanzen gezeigt.

## 6.3.3 Ergebnisse der Bestimmung von Enzymaktivitäten

## 6.3.3.1 Katalase-Aktivität

Die Abb. 45 zeigt die Reaktion der „anfälligen Standardsorte“ am Beispiel der Katalase (CAT)-Aktivität auf die Beimpfung der Johanniskrautpflanzen mit dem Erreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides*.

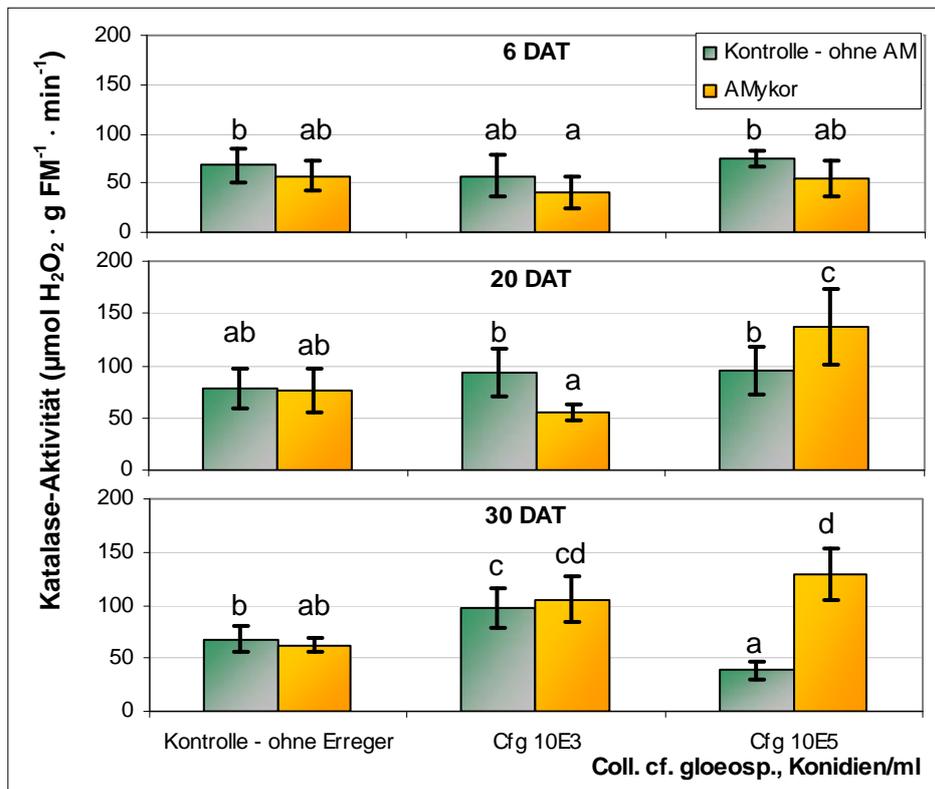


Abb. 45 Katalase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

Die Mykorrhizierung hatte keinen Einfluss auf die CAT-Aktivität in den erregerefreien Pflanzen.

Die Beimpfung mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* führte in der niedrigeren Erregerkonzentration kaum zu Veränderungen der Aktivität der CAT in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. In den mit höheren Erregerkonzentrationen beimpften nicht mykorrhizierten Pflanzen ergab sich nach 30 Tagen jedoch ein deutlicher Abfall der CAT-Aktivität.

In den zuvor mit AMykor®-Blähton inokulierten Pflanzen kam es zu abweichenden Effekten insbesondere bei der höheren Erregerkonzentration. Bei den mit 10<sup>5</sup> Konidien/ml des Erregers beimpften Pflanzen zeigte sich bereits nach 20 Tagen eine Steigerung der CAT-Aktivität und nach 30 Tagen war die CAT-Aktivität gegenüber nicht mykorrhizierten Pflanzen mit gleichem Infektionsgrad wie auch gegenüber der unbeimpften Kontrolle deutlich erhöht. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit der Sorte ‚Topaz‘ erhalten (ohne Abb.).

## 6.3.3.2 Ascorbat-Peroxidase-Aktivität

Die Aktivität der ebenfalls  $H_2O_2$  abbauenden Ascorbat-Peroxidase (APX) wurde von der Mykorrhizierung bei zusätzlichem Pathogenbefall noch deutlicher beeinflusst. Die Abb. 46 zeigt dies am Beispiel einer Versuchsreihe mit der „anfälligen Standardsorte“.

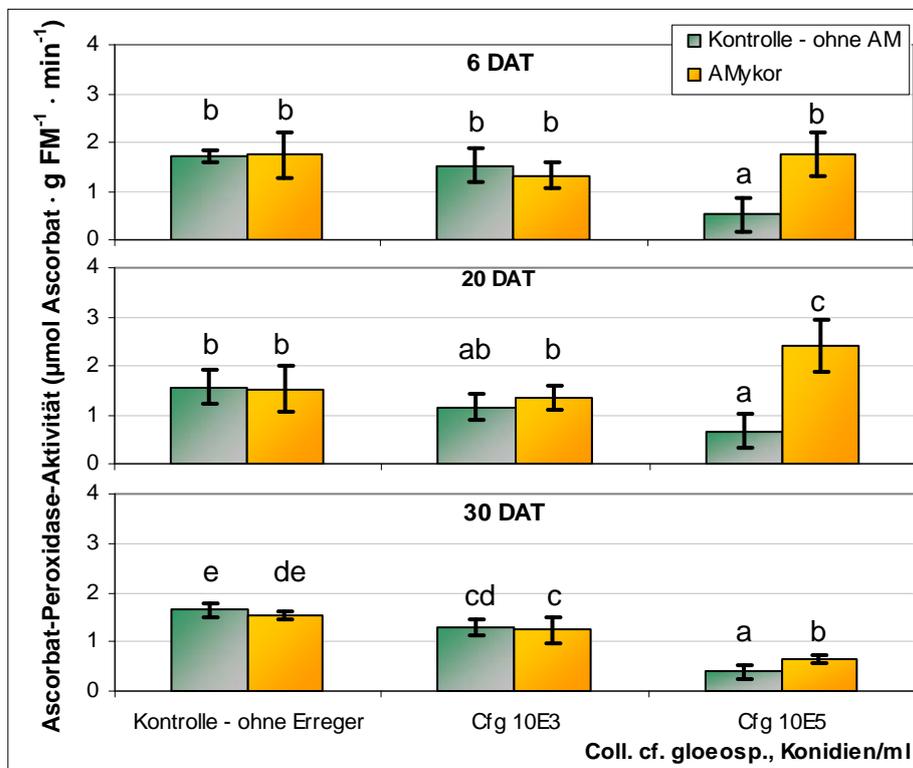


Abb. 46 Ascorbat-Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 /  $10^3$  /  $10^5$  Konidien/ml)

ANOVA ( $p < 0,05$ ): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

Auch auf die Aktivität der APX hatte die Mykorrhizierung keinen Einfluss in den erregerfreien Pflanzen. Die niedrige Erregerkonzentration zeigte in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen zunächst noch keine nennenswerten Wirkungen auf die APX-Aktivität der Pflanzen. Nach 30 Tagen kam es jedoch in den mit  $10^3$  Konidien/ml des Erregers beimpften Pflanzen zu einer Senkung der APX-Aktivität. Hohe Erregerkonzentrationen wirkten sich bereits nach 6 Tagen anhaltend negativ auf die APX-Aktivität aus.

Bei den geringen Effekten der niedrigen Erregerkonzentration zeigten mykorrhizierte Pflanzen noch keinen Unterschied der APX-Aktivität zu nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Die vorherige Mykorrhizierung wies aber insbesondere bei der durch starken Erregerbefall beeinträchtigten Aktivität der APX deutliche Wirkungen auf. Bei Beimpfung mit  $10^5$  Konidien/ml konnte schon 6 Tage nach der Erregerbeimpfung im Vergleich zur nicht mykorrhizierten Kontrolle die Aktivität der APX aufrecht gehalten werden. Nach 20 Tagen zeigte sie sich sogar erhöht gegenüber der nicht befallenen Kontrolle. Auch 30 Tage nach Pathogenbefall war die APX-Aktivität der mykorrhizierten Pflanzen gegenüber der nicht mykorrhizierten Kontrolle noch stabilisiert worden.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch an der Sorte ‚Topaz‘ erhalten (ohne Abb.).

## 6.3.3.3 Monodehydroascorbat- und Dehydroascorbat-Reduktase-Aktivität

Auch die Aktivität der **Monodehydroascorbat-Reduktase** (MDHAR) wurde, wie in der folgenden Abbildung am Beispiel der „anfälligen Standardsorte“ dargestellt, im Falle des Pathogenbefalls von der Mykorrhizierung positiv beeinflusst (Abb. 47).

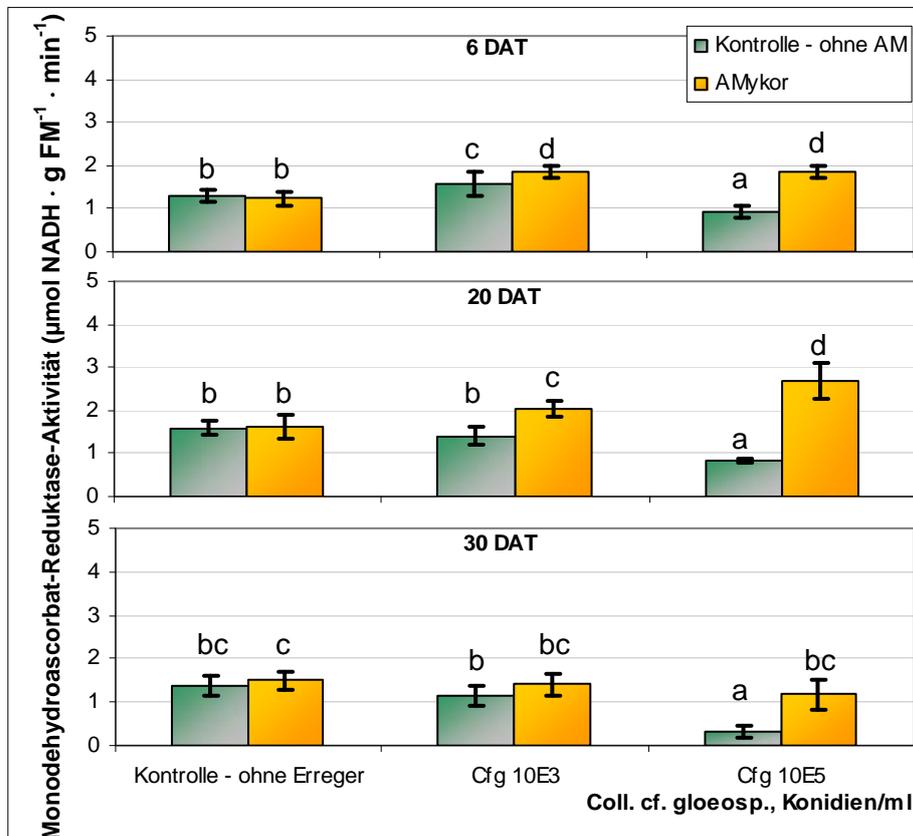


Abb. 47 Monodehydroascorbat-Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

Die Mykorrhizierung zeigte auch auf die MDHAR keinen Einfluss in den erregerfreien Pflanzen.

Die Beimpfung mit der niedrigen Erregerkonzentration führte außerdem zu keinen Unterschieden der MDHAR-Aktivität in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Erst bei hohem Erregerbefall wurde die Aktivität der MDHAR in den Kontrollpflanzen zu allen Messzeitpunkten deutlich gesenkt.

Bei vorheriger Mykorrhizierung war bereits bei niedriger Erregerkonzentration, und besonders bei hoher Erregerkonzentration, eine Steigerung der MDHAR-Aktivität nach 6, 20 und 30 Tagen zu beobachten. Insbesondere bei starkem Befall mit dem Erreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* wurde die Aktivität des Enzyms in den zuvor mykorrhizierten Pflanzen zu allen Messzeitpunkten stabilisiert.

Die durchgeführten Parallelversuche zeigten vergleichbare Ergebnisse.

### 6.3 Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides*

Die **Dehydroascorbat-Reduktase** zeigte bei allen durchgeführten Versuchen deutlich schwankende Werte. Dabei wurden keine eindeutigen Effekte des Erregerbefalls bzw. der Mykorrhizierung auf die Aktivität dieses Enzyms ermittelt (ohne Abb.).

#### 6.3.3.4 Glutathion-Reduktase-Aktivität

Die Beeinflussung der Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) durch Pathogenbefall und Mykorrhizierung wird in der folgenden Abb. 48 am Beispiel einer Versuchsreihe mit der Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ dargestellt.

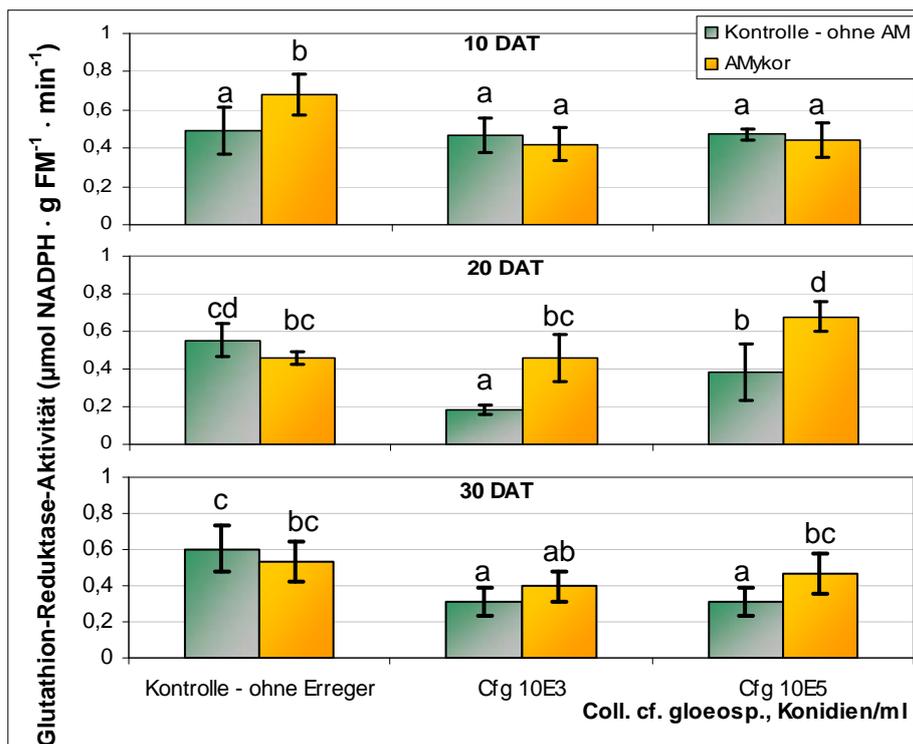


Abb. 48 Glutathion-Reduktase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: ‚Topaz‘

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

In den erregerfreien Pflanzen hatte die Mykorrhizierung keinen bedeutenden Einfluss auf die Aktivität der GR.

10 Tage nach Erregerbeimpfung zeigte sich ebenfalls noch kein Effekt auf die Enzymaktivität.

Dagegen war die GR-Aktivität nach Pathogenbefall mit beiden Erregerkonzentrationen in der nicht mykorrhizierten Kontrolle nach 20 und 30 Tagen deutlich herabgesetzt.

Mykorrhizierte Pflanzen dagegen konnten die Aktivität der GR 20 und 30 Tage nach Erregerbeimpfung auf zumindest Ausgangsniveau, teilweise sogar auf erhöhtem Niveau, stabilisieren und damit den fortschreitenden Abbau der durch den Welkeerreger vermehrt auftretenden Radikale sicherstellen.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in den Parallelversuchen mit beiden Johanniskrautsorten erhalten.

## 6.3.3.5 Glutathion-S-Transferase-Aktivität

Die Abb. 49 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der Glutathion-S-Transferase (GST) in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Pathogenbefall bei einem Versuchsdurchlauf mit der „anfälligen Standardsorte“.

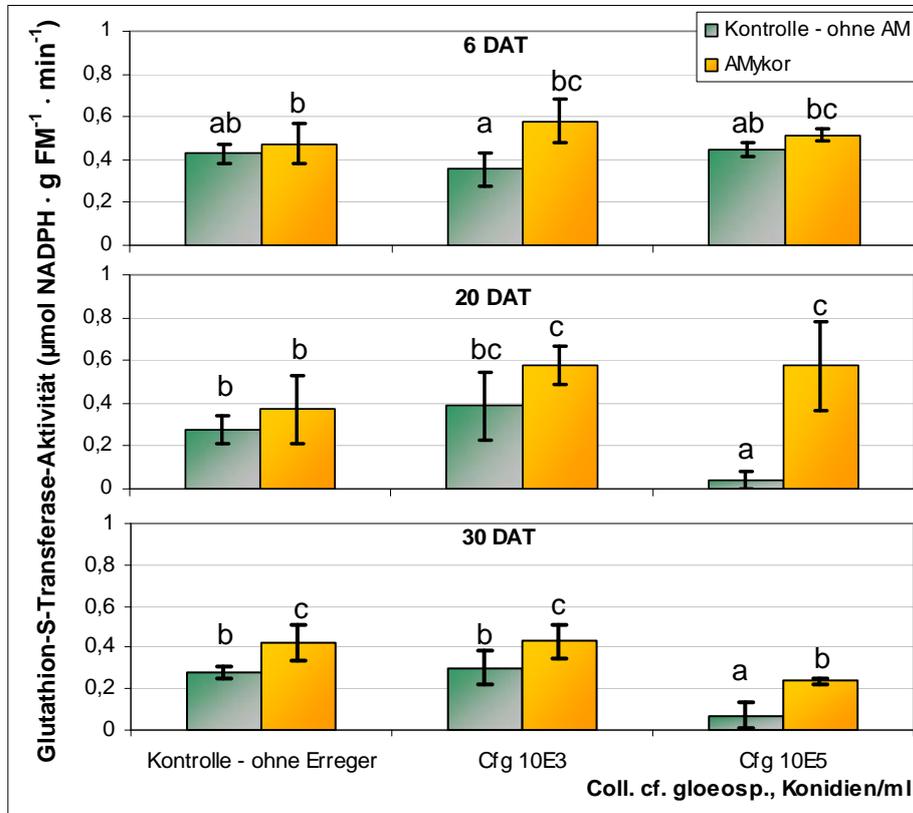


Abb. 49 Glutathion-S-Transferase-Aktivität in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 6, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

Auch auf die Aktivität der GST hatte die Mykorrhizierung keinen bedeutenden Einfluss in den erregerfreien Pflanzen.

Die Erregerbeimpfung mit 10<sup>3</sup> Konidien/ml zeigte ebenfalls noch keinen Effekt auf die Enzymaktivität in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Jedoch kam es in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen bei hoher Erregerkonzentration nach 20 und 30 Tagen zu einem deutlichen Aktivitätsabfall der GST.

In mykorrhizierten Pflanzen wurde schon bei niedrigerer Erregerkonzentration eine Aktivitätssteigerung gegenüber der Kontrolle hervorgerufen und auch bei starkem Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* blieben die Enzymaktivitäten erhöht oder aber zumindest stabil im Vergleich zu den gesunden Kontrollpflanzen.

Die dargestellten Ergebnisse wurden in den Parallelversuchen bestätigt.

## 6.3.4 Ergebnisse der Bestimmung von Antioxidantien

## 6.3.4.1 Ascorbinsäure

Die am Beispiel der „anfälligen Standardsorte“ jeweils 10, 20 bzw. 30 Tage nach Pathogeninokulation ermittelten Ergebnisse sind der folgenden Abb. 50 zu entnehmen.

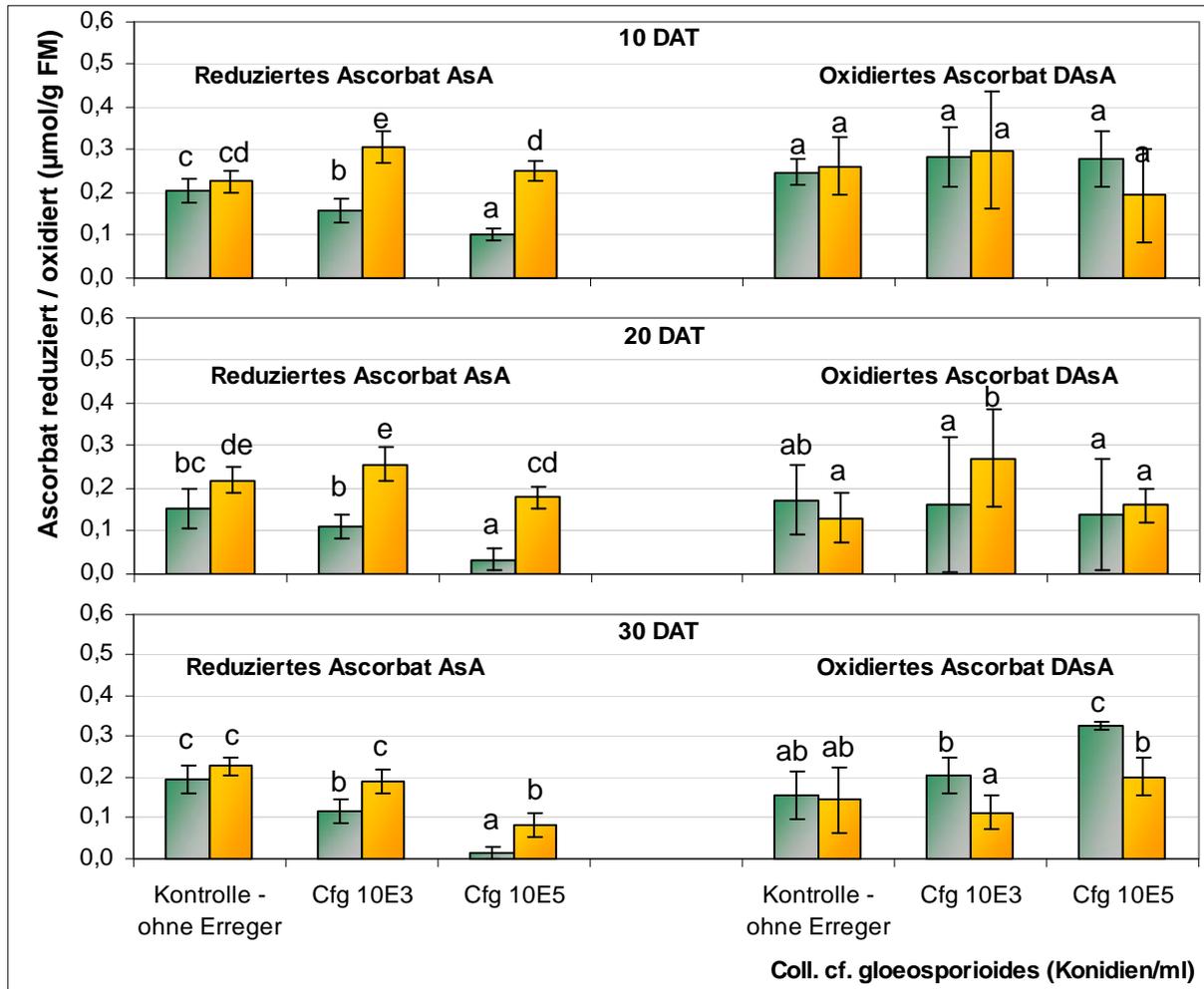


Abb. 50 Gehalte reduzierten (links) und oxidierten (rechts) Ascorbats in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (AsA bzw. DAsA)

Die Mykorrhizierung führte in den erregerfreien Pflanzen zu keinen nennenswerten Effekten auf die Gehalte an reduziertem und oxidiertem Ascorbat.

Die Messwerte des reduzierten Ascorbats (AsA) waren in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen zu allen Messzeitpunkten nach Erregerbefall deutlich gesunken. Dabei war bei der hohen Erregerkonzentration eine noch stärkere Reduktion der AsA-Konzentration zu verzeichnen als bei der niedrigeren Erregerkonzentration.

In den mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen blieben die AsA-Gehalte dagegen auch bei Erregerbefall nach 10 und 20 Tagen noch stabil. Nach 30 Tagen hatten die Gehalte an AsA in den mit hoher Erregerkonzentration beimpften Pflanzen ebenfalls abgenommen, lagen aber immer noch deutlich höher als in den nicht mykorrhizierten Pflanzen.

Die Messwerte für oxidiertes Ascorbat (DAsA) wiesen sowohl bei den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen als auch bei den zuvor mykorrhizierten Pflanzen insbesondere nach 10 und

### 6.3 Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides*

20 Tagen noch deutliche Schwankungen der Einzelmessungen auf. Nach 30 Tagen hatte sich dann aber bei der nicht mykorrhizierten Kontrolle besonders bei der hohen Erregerkonzentration das Gleichgewicht deutlich zugunsten des DAsA verschoben. In den mykorrhizierten Pflanzen dagegen konnte das Gleichgewicht AsA/DAsA, wie aus der Abbildung abzuschätzen ist, zumindest bei der niedrigeren Erregerkonzentration noch sehr gut aufrecht erhalten werden und auch bei der hohen Erregerkonzentration war es nur leicht zugunsten des DAsA verschoben.

#### 6.3.4.2 Glutathion

Die Abb. 51 zeigt die ermittelten Ergebnisse der Glutathion-Bestimmung für die „anfällige Standardsorte“ des Johanniskrauts.

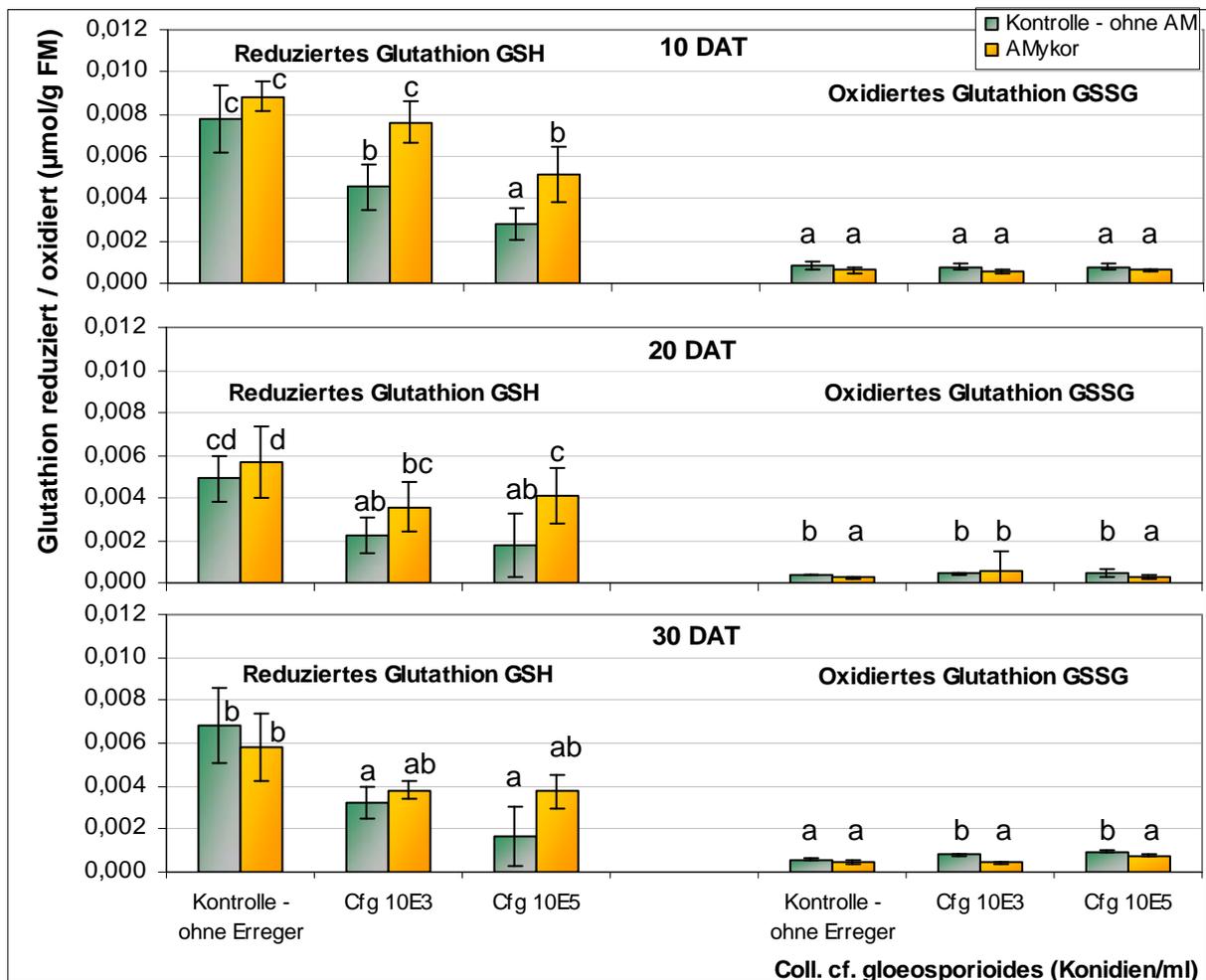


Abb. 51 Gehalte reduzierten (links) und oxidierten (rechts) Glutathions in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cfg) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied (GSH bzw. GSSG)

Durch die Mykorrhizierung kam es zu keinen nennenswerten Wirkungen auf die Gehalte des reduzierten bzw. oxidierten Glutathions in den erregerfreien Pflanzen.

Die Inokulation mit dem Erreger führte in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen zwar zu einer Absenkung der Gehalte der reduzierten Form des Glutathions (GSH), allerdings kam es nicht zu einem auffälligen Anstieg der Gehalte an oxidiertem Glutathion (GSSG). Eine

Verschiebung zugunsten des GSSG war deutlich zu erkennen, zeigte aber nicht das für den Ascorbat-Kreislauf beobachtete bedrohliche Ausmaß (vgl. Kap. 6.3.4.1).

In den mykorrhizierten Pflanzen wurde jedoch auch bezüglich des Glutathions eine Neigung zu höheren Gehalten an GSH festgestellt. Das Verhältnis an GSH zu GSSG pegelte sich damit in diesen Pflanzen ebenfalls auf einem höheren Niveau ein.

### 6.3.5 Ergebnisse der Bestimmung von Malondialdehyd als Parameter für die Lipidperoxidation

Die Ergebnisse der Messungen der Malondialdehyd (MDA)-Konzentration als Endprodukt der Lipidperoxidation in den Wurzeln der Johanniskrautsorte „anfälliger Standard“ bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* und in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung sind in der Abb. 52 dargestellt.

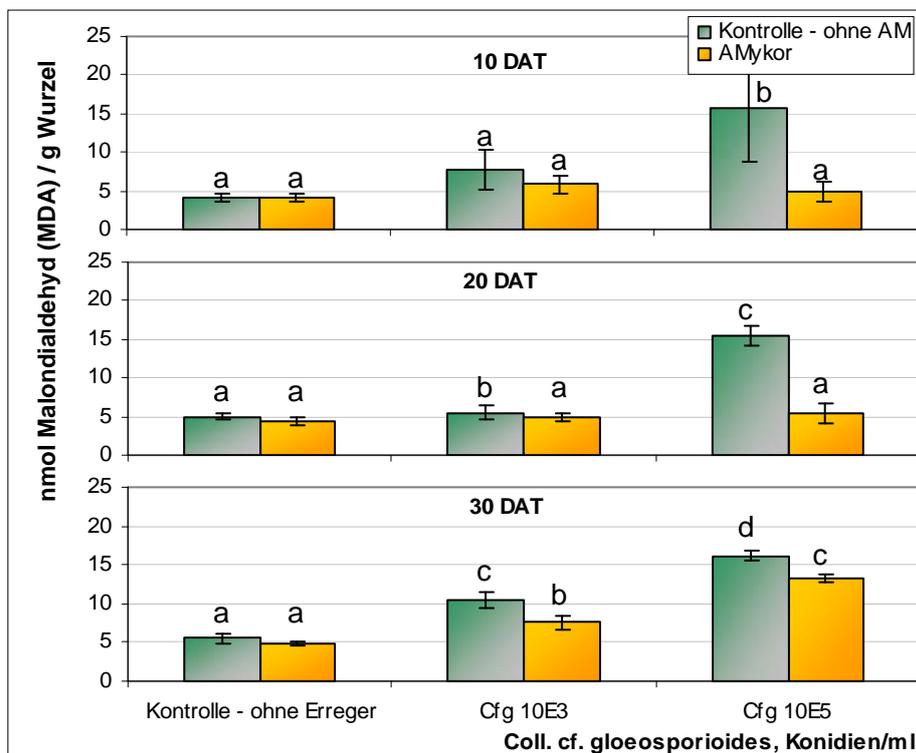


Abb. 52 Malondialdehyd-Gehalte in Abhängigkeit von Mykorrhizierung und Erregerbeimpfung (Cf g) jeweils 10, 20 und 30 DAT (MW±SD, n=4)

Johanniskrautsorte: „anfälliger Standard“

Mykorrhizierung: nicht mykorrhizierte Kontrolle bzw. AMykor®-Blähton

Erregersuspension: *Colletotrichum cf. gloeosporioides* (0 / 10<sup>3</sup> / 10<sup>5</sup> Konidien/ml)

ANOVA (p < 0,05): gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied

Die Mykorrhizierung hatte keinen Einfluss auf die Lipidperoxidation in den gesunden Pflanzen. In den nicht mykorrhizierten Kontrollen war bei der geringen Erregerkonzentration nach 20 und 30 Tagen ein Anstieg der MDA-Konzentration messbar. Bei der hohen Erregerkonzentration von 10<sup>5</sup> Konidien pro ml war schon nach 10 Tagen ein starker Fortschritt der Lipidperoxidation in den Wurzelzellen zu beobachten.

In den mykorrhizierten Pflanzen dagegen war nach 10 und 20 Tagen auch bei starkem Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* kein Anstieg des MDA zu beobachten und auch nach 30 Tagen nahm die Lipidperoxidation noch langsamer zu als in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Eine Zunahme des MDA und damit der Lipidperoxidation ließ sich jedoch auch bei den mykorrhizierten Pflanzen nicht vollständig vermeiden.

## 6.4 Aufbau und Optimierung einer 2-D-Elektrophorese-Methode

### 6.4.1 Aufarbeitung von Pflanzenmaterial für die 2-D-Elektrophorese

Für die Entwicklung der 2-D-Elektrophorese-Methode zur Trennung von Majoran- und Johanniskrautproteinen wurde als Ausgangsmethode die zuerst von DAMERVAL und seinen Mitarbeitern (1986) beschriebene und von GÖRG et al. (1988) verbesserte Methode zur Pflanzenaufarbeitung eingesetzt, zunächst entsprechend für Majoran angepasst und optimiert und später auf Johanniskraut übertragen.

Als Ausgangsmethode zur Probenvorbereitung wurde dazu 1 g des von den Stängeln befreiten Majorankrauts mit flüssigem Stickstoff gemörsert, um die Zellwände aufzubrechen. Die fein zerkleinerte Probe wurde dann mit 10 ml einer 10 %-igen TCA-Aceton-Lösung mit 0,07 % 2-Mercaptoethanol versetzt und in ein 15 ml Probenröhrchen überführt. Nach schneller Abkühlung der Gefäße in flüssigem Stickstoff fand die Fällung der Proteine dann bei -20 °C für etwa 2 h statt. Dabei wurden die Proben nach je 5, 10 und 15 min nochmals mit dem Vortexer gemischt und nach Zentrifugation die Überstände vorsichtig abgesaugt. Die Proteinpellets wurden anschließend zweimal in 1,5 ml Aceton mit 0,07 % 2-Mercaptoethanol für 5 min im Ultraschallbad gewaschen, um störendes TCA (pH) wieder aus der Probe zu entfernen, und die Proteine anschließend erneut für 30 min bei -80 °C ausgefällt. Die Überstände nach der Zentrifugation wurden dann erneut abgesaugt. Nach dem letzten Waschschritt erfolgte die Trocknung des Proteinpellets in der Vakuumzentrifuge.

Insbesondere aus den im Gewächshaus herangezogenen Pflanzen waren die mit der von DAMERVAL et al. (1986) beschriebenen Ausgangsmethode erhaltenen Proteinausbeuten viel zu gering für eine spätere Detektion getrennter Proteine auf dem 2-D-Gel. Daher wurde eine Erhöhung des eingesetzten Pflanzenmaterials von ursprünglich 1 g auf 3 g erforderlich. Eine weitere Verbesserung der Proteinausbeute wurde durch die Verteilung der Probensuspension in TCA/Aceton-Lösung auf mehrere Gefäße erzielt. Die Probenmischung wurde dazu am Vortexer gut suspendiert und gleichmäßig auf sechs 2,2 ml Safe-Seal-Tubes verteilt. Die daraus resultierende stärkere mechanische Beanspruchung der Proben führte außerdem zu weißeren, reineren Proteinpellets. Die Anzahl der Waschschritte musste von 2 auf 3 oder sogar mehr erhöht werden, woraus ebenfalls reinere Proteinpellets resultierten und damit eine störungsärmere Durchführung der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) gegeben war.

### 6.4.2 Lösen des gefällten Proteins

Als Ausgangsmethode zur Lösung des gefällten Proteins wurde das Proteinpellet anfangs in einem 8 M Harnstoffpuffer aufgenommen [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998]: 8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 20 mM DTT, 0,5 % Ampholyte pH 3-10, 0,002 % Bromphenolblau. Das getrocknete Proteinpellet wurde im Verhältnis 50 µl Puffer pro mg Probe in dem Puffer resuspendiert und durch Vortexen, Ultraschallbehandlung und anschließende Inkubation unter Schütteln für 1 Stunde bei 37 °C bestmöglich gelöst. Anschließend wurden nicht lösliche Bestandteile nochmals durch Zentrifugation abgetrennt.

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen der gelösten Probe erfolgte mit Hilfe des 2-D-Quant Kits (GE Healthcare Europe GmbH, München) über eine indirekte Kalibration.

Anfängliche Probleme beim Spannungsaufbau während der IEF ließen zunächst auf Unreinheiten der Proteinprobe schließen. Versuche, die gelöste Proteinprobe dagegen nochmals zu filtrieren (Micro Spin Tube, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) führten jedoch nicht zu den erwarteten Verbesserungen. Ein Teil der Proteine ging hierbei sogar wieder verloren. Die Proteinbestimmungen der filtrierten Proteinlösungen ergaben niedrigere Werte (maximal 1 mg/ml) als die unfiltrierten Proben. Bei Versuchen ohne diesen Filtrationsschritt wurden die gelösten Proteinmengen mit reinem Harnstoff-Lösungspuffer um etwa ein Drittel erhöht.

Die Wiederholung der physikalischen Arbeitsschritte Vortexen, Ultraschallbehandlung und Inkubation unter Schütteln bei 37 °C (1 Stunde) führte ebenfalls zu einer verbesserten Aufnahme der Proteine in den Lösungspuffer.

Die Verwendung des Harnstoff-Lösungspuffers (8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 20 mM DTT, 0,5 % Ampholyte 3-10, 0,002 % Bromphenolblau) führte auch mit den oben aufgeführten mechanischen Veränderungen noch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Mit dieser Pufferzusammensetzung wurden beim Lösen von 20 mg aufgereinigter Probe in 1 ml Lösungspuffer nur Proteinkonzentrationen von 500 bis 900 µg/ml erreicht. Eine Erhöhung der Konzentrationen an DTT und Ampholyte im Puffer bis auf 50 mM DTT und 1 % Ampholyte führte zu etwas höheren Proteinkonzentrationen in der Lösung bis etwa 1 mg/ml und einem sichtbar geringeren Anteil nicht löslicher Bestandteile nach der Zentrifugation.

Die gelöste Proteinmenge konnte weiterhin erhöht werden, indem ein Puffer mit Thioharnstoff verwendet wurde. Dabei wurde die Proteinkonzentration mehr als verdoppelt, so dass im Ergebnis deutlich mehr Proteinspots im 2-D-Gel dargestellt werden konnten.

Eine deutliche Verbesserung der Trennergebnisse v.a. in der ersten Dimension brachte schließlich noch die Verwendung eines anderen Detergenzes im Lösungspuffer. Der Austausch von CHAPS im Lösungspuffer gegen 1 % C7BzO führte zu einer weiteren Verdoppelung der Proteinkonzentration in der Lösung sowie auch zu besseren Trennerfolgen in der IEF, woraus auch schärfere 2-D-Bilder resultierten.

Der optimierte Lösungspuffer bestand somit aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % C7BzO, 50 mM DTT, 1 % Ampholyte und 0,005 % Bromphenolblau.

Die Abb. 53 und Abb. 54 zeigen zum Nachweis der Optimierung des Lösungspuffers gegenübergestellt zwei 2-D-Bilder von Majoranprotein nach Aufnahme des Proteinpellets mit dem ursprünglichen Lösungspuffer bzw. dem optimierten Puffer. Bei Verwendung des optimierten Lösungspuffers wurden deutlich mehr Proteinspots auf dem 2-D-Gel sichtbar. Der optimierte Puffer war demnach für die Darstellung möglichst vieler Proteine des Pflanzenkrautes besser geeignet.

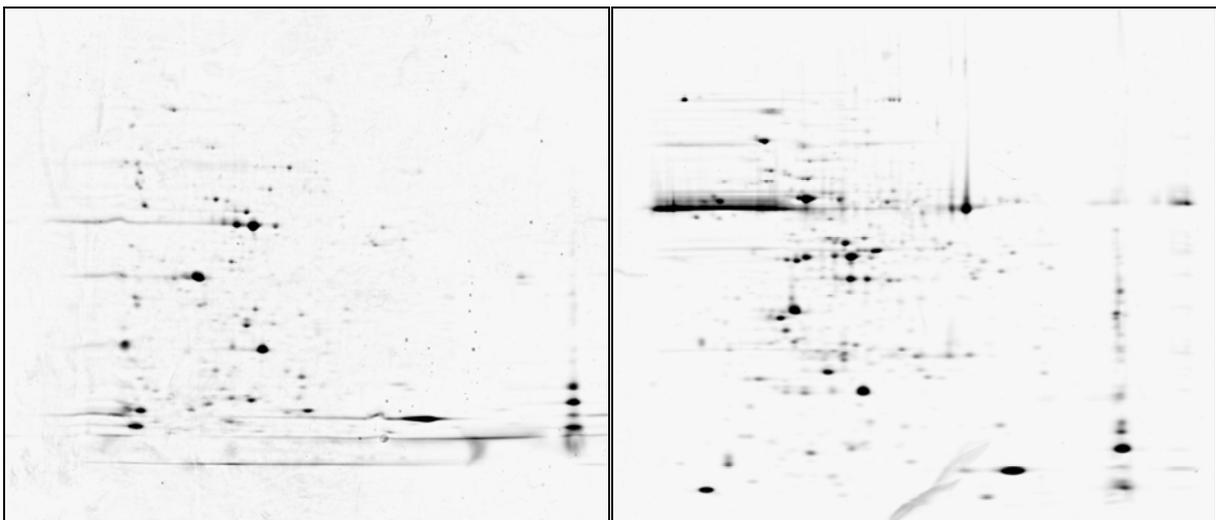


Abb. 53 2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit dem Ausgangspuffer zur Extraktion  
Puffer: 8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 20 mM DTT, 0,5 % Ampholytlösung  
20 x 20 cm; SDS-PAGE 8-16 % T; IPG 3-10; Coomassiefärbung

Abb. 54 2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit dem optimierten Puffer zur Extraktion  
Puffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % C7BzO, 50 mM DTT, 1 % Ampholytlösung  
20 x 20 cm; SDS-PAGE 8-16 % T; IPG 3-10; Coomassiefärbung

Im Resultat aller durchgeführten Optimierungsschritte konnten die Proteinkonzentrationen im Lösungspuffer bei gleichem Einsatzverhältnis der Probe schließlich vervierfacht werden und Proteinkonzentrationen von über 4 mg/ml erreicht werden. Diese Konzentrationen waren erforderlich, um die Probenauftragung bei der IEF mit einer In-Gel-Rehydratisierung in ausreichender Nachweisempfindlichkeit durchführen zu können. Die gelöste Proteinprobe stand damit für die IEF bereit.

### 6.4.3 Rehydratisierung der IPG-Streifen

Um ein möglichst komplexes Bild von der Proteinzusammensetzung der Pflanzenproben zu erhalten, wurden für die Entwicklung einer Methode zur Trennung von Majoran- und Johanniskrautprotein im Rahmen der Untersuchungen 17 cm IPG-Streifen über einen weiten pH-Bereich von 3 bis 10 eingesetzt.

Der Rehydratisierungspuffer entsprach dabei dem Lösungspuffer für die Proteine (siehe Kap. 6.4.2). Der Schwerpunkt der Verbesserung der Rehydratisierung beruhte darauf, das Volumen sowie die Aufnahme der Rehydratisierungslösung zu optimieren und damit die Voraussetzungen für ein optimales Ergebnis der anschließenden Fokussierung zu schaffen.

Die Rehydratisierung der IPG-Streifen wurde dazu anfangs mit passiver In-Gel-Rehydratisierung durchgeführt und die Rehydratisierungszeit zunächst auf 12 h begrenzt. Die von den Herstellern angegebenen Volumina der Rehydratisierungsflüssigkeiten (ca. 340 µl für 17 cm IPG-Streifen) sind dabei nicht komplett aufgenommen worden. Die Erhöhung der Rehydratisierungsdauer auf 16 h führte schließlich zu einer verbesserten Aufnahme der Probelösung in den IPG-Streifen und damit auch zu einer besseren Fokussierung. Die Proteine konnten durch die längere Rehydratisierungsdauer besser in die Gelmatrix eintreten. Es verblieb keine Restpufferlösung außerhalb des IPG-Streifens und der Spannungsaufbau während der IEF erfolgte schneller. Als optimales Rehydratisierungsvolumen für einen 17 cm langen IPG-Streifen wurde mit 330 µl schließlich ein etwas niedrigeres Volumen als vom Hersteller angegeben ermittelt.

Versuche mit aktiver Rehydratisierung zeigten im Vergleich zur passiven Rehydratisierung keine Verbesserung für den Erfolg der Fokussierung.

Auch das Cup Loading nach der Rehydratisierung wurde als Probenauftragung versuchsweise eingesetzt. So konnten zunächst erfolgreiche Isoelektrische Fokussierungen durchgeführt werden. Allerdings gestaltete sich die alternativ durchführbare In-Gel-Rehydratisierung weniger aufwendig und praktikabler. Da mit In-Gel-Rehydratisierung auch größere Probenmengen auf den IPG-Streifen aufgebracht werden können, wurde diese Variante für die weitere Optimierung vorgezogen.

Bei optimalem Probeneintritt während der In-Gel-Rehydratisierung in die Gelmatrix der IPG-Streifen kann die darauf folgende IEF direkt an die Rehydratisierung angeschlossen werden. Dies ist nicht immer gegeben. Auch hier führte diese Vorgehensweise bei der darauf folgenden Fokussierung zu Problemen beim Spannungsaufbau. Dagegen wurden die IPG-Streifen nach der Rehydratisierung zunächst zwischen feuchtem Filterpapier geblottet, wobei anhaftende, nicht in das Gel eingetretene Proteine und Rehydratisierungspuffer sowie andere Störkomponenten (z.B. Reste an Mineralöl oder auskristallisiertem Harnstoff) nochmals entfernt wurden.

Auch die für die Rehydratisierung zu lösende Proteinmenge musste optimiert werden. Dazu wurde die Proteinlösung im Rehydratisierungspuffer verdünnt, um Überladungseffekten in der IEF vorzubeugen. Zu hohe Proteinkonzentrationen führten zu einem stark verzögerten Spannungsaufbau und verschlechterten damit den Verlauf der IEF und so auch das Ergebnis der 2-D-Elektrophorese. Für einen 17-18 cm langen IPG-Streifen pH 3-10 stellte sich für eine spätere Coomassiefärbung eine gelöste Proteinmenge von 800 µg als optimal heraus. Bei anschließender Silberfärbung genügte die Auftragung von ca. 150 µg Protein pro Gel. Diese niedrigere Konzentration bei der Probenauftragung begünstigte auch den Verlauf der IEF.

Die optimierte Rehydratisierung erfolgte schließlich an 17 cm IPG-Streifen pH 3-10 in Form einer passiven In-Gel-Rehydratisierung bei 20 °C für 16 h (über Nacht) mit 330 µl Rehydratisierungspuffer, der die Proteinprobe gelöst enthält. Für Coomassiefärbung wurden 800 µg Protein pro Gel, für Silberfärbung 150 µg pro Gel aufgetragen. Zur Rehydratisierung wurden die Streifen mit Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden.

#### 6.4.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Auf der Grundlage von Literaturdaten [BERKELMANN und STENSTEDT, 1998; GARFIN und HEERDT, 2004; POSCH, 1994] war ein erstes Fokussierungsprogramm für die 1. Dimension entsprechend Tab. 9 aufgestellt worden.

Tab. 9 Ausgangs-Fokussierungsprogramm zur Optimierung der IEF

Ablauf	Voltzahl	Zeit	Spannungsanstieg
Stufe 1	200 V	1 h	Linear
Stufe 2	500 V	1 h	Linear
Stufe 3	10.000 V	1 h	Linear
Stufe 4	10.000 V	30.000 Vh	Rapid

Die darin angegebenen Gesamtvoltstunden für die 17 cm IPG-Streifen, pH 3-10 wurden anfangs nicht erreicht. Zu hohe Stromflüsse während der Fokussierung stellten dabei den limitierenden Faktor dar. Mögliche Ursachen hierfür können zu hohe Salzkonzentrationen in der Probe, das Vorhandensein anderer störender Bestandteile und Unreinheiten, wie z.B. unlösliche Feststoffe, Phenole oder Lipide, sowie unvollständig gelöste oder wieder ausgefallene Proteine auf dem Gel gewesen sein.

Neben Optimierungen der Probenvorbereitung, des Lösungspuffers (vgl. Kap. 6.4.2) und der Rehydratisierung (vgl. Kap. 6.4.3) waren schließlich auch Veränderungen bei der IEF erforderlich, um eine zufriedenstellende Fokussierung der Pflanzenproteine zu erzielen.

Um eventuell noch vorhandene Verunreinigungen, Salze oder überschüssiges DTT während der Fokussierung aufzunehmen, wurden hierbei zunächst feuchte Filterpapierstreifen zwischen IPG-Gel und Elektroden gelegt. Dies führte schon zu einer leichten Verkürzung der Fokussierdauer. Ein mehrfacher Wechsel dieser Filterpapierstreifen aller 2 h konnte den Spannungsaufbau aber nicht weiter beschleunigen. Da hierfür nach jedem Wechsel die Spannungen neu aufgebaut werden mussten, ergab sich auch ein inakzeptabler Zeitaufwand für die Fokussierung (mindestens 12 h).

Der Spannungsaufbau im Fokussierungsprogramm wurde in einem nächsten Optimierungsschritt in den ersten beiden Stufen etwas verzögert, um einen langsameren Probeneintritt zu gewährleisten. Damit wurden die Spannungen dieser beiden Stufen zunächst in der vorgegebenen Zeit erreicht. Schließlich wurden auch die Endstufen im Spannungsaufbau heruntergesetzt, um mit niedrigeren Voltzahlen, dafür allerdings höherem Zeitaufwand, den Fokussierungseffekt zu erzielen.

Eine abschließend durchgeführte Fokussierungskinetik (Überprüfung der Trennergebnisse der Fokussierung nach 9.000, 15.000, 21.000 und 24.000 Vh) zeigte, dass eine optimale Auftrennung der Majoranproteine bei einer Voltstundenzahl von 24.000 erreicht wurde. Das in Tab. 10 dargestellte Fokussierungsprogramm führte schließlich zu dem gewünschten Fokussierungserfolg für die Proteine des Majorans bzw. des Johanniskrauts.

Tab. 10 Optimiertes Fokussierungsprogramm für Proteine von Majoran und Johanniskraut

Ablauf	Voltzahl	Zeit	Spannungsanstieg
Stufe 1	150 V	1 h	Linear
Stufe 2	300 V	1 h	Linear
Stufe 3	600 V	1 h	Linear
Stufe 4	8.000 V	24.000 Vh	Rapid

Die optimierte Methode zur IEF der Pflanzenproteine wurde schließlich mit diesem Fokussierungsprogramm durchgeführt. Befeuchtete Filterpapierstreifen zur Aufnahme störender Substanzen wurden zwischen Elektroden und IPG-Gelstreifen positioniert. Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden mit Mineralöl überschichtet fokussiert, um ein Austrocknen der Streifen zu verhindern. Nach erfolgreicher Fokussierung wurden die IPG-Streifen entnommen, nochmals zwischen feuchtem Filterpapier geblottet und eventuell bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefroren gelagert.

#### 6.4.5 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Für die Äquilibrierung der IPG-Streifen wurden verschiedene Zeiten getestet, in denen die Streifen in den einzelnen Lösungen verweilen. 15 min in beiden Lösungen wurden dabei als geeignete Äquilibrierzeiten ermittelt. Die Äquilibrierung erfolgte dabei in 50 mM TRIS-HCl Puffer pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau mit der ersten Lösung (enthält 1 % DTT) und der zweiten Lösung (enthält 2,5 % IAA) für je 15 min unter Schütteln.

Nach dem Äquilibrieren wurden die Streifen nochmals geblottet, um restliche Lösung zu entfernen.

#### 6.4.6 SDS-Elektrophorese

Nach der Äquilibrierung erfolgte die vertikale SDS-PAGE-Elektrophorese der auf den IPG-Streifen fokussierten Proteine in den selbst gegossenen 20 x 20,5 cm Gradientengelen ( $T = 8-16\%$ ). Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden dazu auf die seitliche Oberfläche eines Gradientengeles gelegt und mit heißer Agarose fixiert.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit TRIS-HCl-Puffer in der Dodeca Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), der Elektrophoresekammer, in einem Zeitraum von 5 bis 16 h. Nachdem der Probeneintritt der Proteine vom IPG-Streifen auf das Gradientengel in den ersten 90 min langsam bei niedriger Stromspannung von maximal 50 V stattfand, konnte die Spannung gesteigert werden und die Trennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgen, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront das Gelende an der Anode erreicht hatte. Je höher die angelegte Stromspannung war, umso schneller erfolgte der Durchlauf. Maximal wurden 200 V angelegt, wobei sich die Versuchsdauer dann auf 5 h belief. Es wurden verschiedene Spannungen und Zeiten geprüft, dabei wurden keine Unterschiede der Trennqualität festgestellt. Die Stromspannung konnte demzufolge nach dem Probeneintritt im Bereich zwischen 50 und 200 V beliebig den gewünschten Zeitverhältnissen angepasst werden. Der Stromfluss wurde gegen eine Überhitzung der Gele auf 20 mA pro Gel limitiert und die Gele während der Trennung bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert.

#### 6.4.7 Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele

Um sowohl eine zur Quantifizierung geeignete als auch eine für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung relevanter Proteinspots direkt kompatible Färbemethode zu nutzen [PATTON, 2002], wurde für die Methodenentwicklung im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit der Einsatz einer Coomassiefärbung angestrebt. Zum Erreichen einer höheren Nachweisempfindlichkeit ist zu Vergleichszwecken auch eine Silberfärbung nach BLUM et al. (1987) nachvollzogen worden. Die Abb. 55 und Abb. 56 zeigen eine Gegenüberstellung der 2-D-Gele der jeweils gleichen Probe mit verschiedenen Proteinkonzentrationen nach Coomassie- und Silberfärbung.

Das Silber gefärbte 2-D-Gel zeigt viele der Spots deutlicher und stärker als das Coomassie gefärbte Gel. Die Sensibilität der Silberfärbung lag nachweislich deutlich höher. Die erhöhte Nachweisempfindlichkeit der Silberfärbung erforderte eine entsprechend verringerte Proteinauftragmenge bei der In-Gel-Rehydratisierung. Die geringe Probenkonzentration ließ bei gleicher oder sogar erhöhter Spotanzahl in den 2-D-Gelen v.a. auch die IEF in kürzerer Zeit ablaufen, da die Spannungen schneller erreicht wurden.

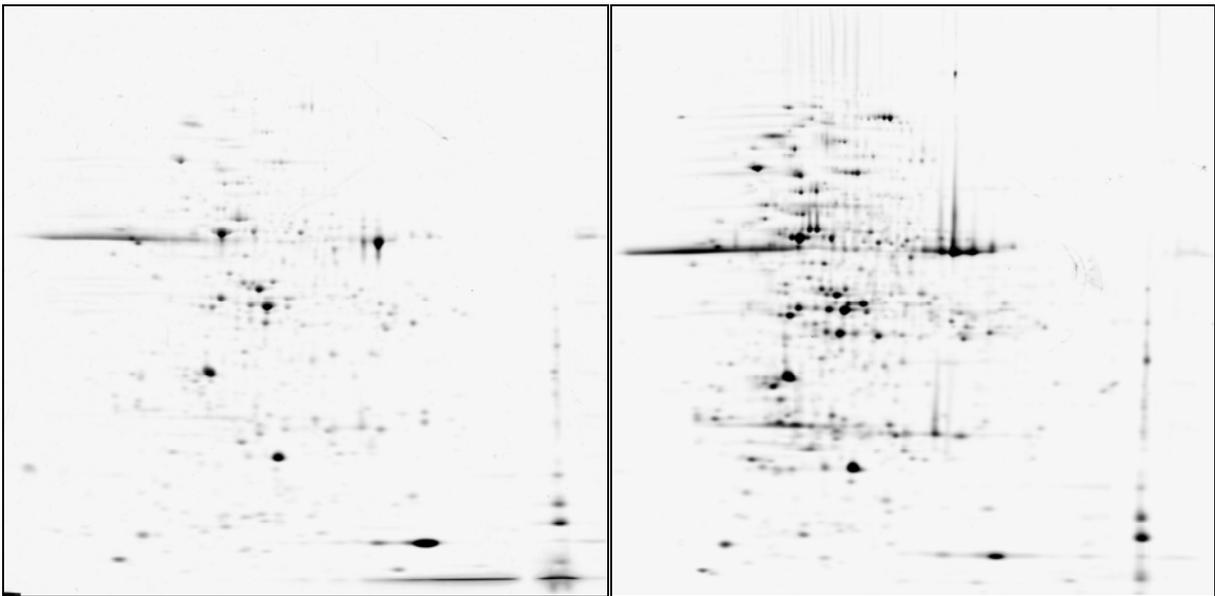


Abb. 55 Coomassie gefärbtes 2-D-Gel bei 800  $\mu$ g Proteinauftragung (Majoran)  
20 x 20 cm; SDS-PAGE 8-16 % T; IPG 3-10

Abb. 56 Silber gefärbtes 2-D-Gel bei 150  $\mu$ g Proteinauftragung (Majoran)  
20 x 20 cm; SDS-PAGE 8-16 % T; IPG 3-10

Nach der erfolgreichen Optimierung der 2-D-Methode und damit höherer möglicher Proteinauftragungsmengen stellte sich auch die Coomassiefärbung als ausreichend empfindliche Färbemethode heraus. Grundsätzlich waren beide Färbemethoden unter Berücksichtigung der aufzutragenden Proteinmenge als einsetzbar zu beurteilen.

Allerdings kam es besonders bei silbergefärbten Gelen vermehrt zur Streifenbildung. Ein weiteres Problem stellt die Praktikabilität der Silberfärbung von gleichzeitig zwölf Gelen dar. Die Zeiten für die einzelnen Färbe- und Entwicklungsschritte bei der Silberfärbung müssen präzise eingehalten werden, um reproduzierbar und gleichmäßig gefärbte Gele zu erhalten. Da dies bei vielen parallel zu färbenden Gelen nicht immer einfach zu realisieren war, waren Schwierigkeiten bei der späteren Gegenüberstellung und quantitativen Auswertung der Gele geradezu vorprogrammiert. Da die Coomassiefärbung deutlich unsensibler auf geringere Abweichungen von den vorgeschriebenen Einwirkzeiten reagierte, war diese für eine spätere quantitative Gegenüberstellung verschiedener 2-D-Gele vorzuziehen und wurde im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen dann auch erfolgreich eingesetzt.

Die gefärbten Gele waren in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur einige Tage lagerfähig. Coomassiegefärbte Gele erwiesen sich dabei als länger haltbar, während silbergefärbte Gele schnell aufquollen.

#### 6.4.8 Optimierte 2-D-Elektrophorese-Methode

Die Abb. 57 zeigt ein Flusschema über den optimierten Ablauf der im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit entwickelten 2-D-Elektrophorese-Methode zur Trennung der Proteine aus Majoran und aus Johanniskraut. Ein mit der optimierten Methode erstelltes 2-D-Gel einer Majoranprobe ist in der Abb. 58 dargestellt.

Die optimierte 2-D-Elektrophorese-Methode war in dieser Form gut für eine softwareunterstützte semi-quantitative Auswertung der Proteinmuster von Majoran wie auch von Johanniskraut geeignet.

## 6.4 Aufbau und Optimierung einer 2-D-Elektrophorese-Methode

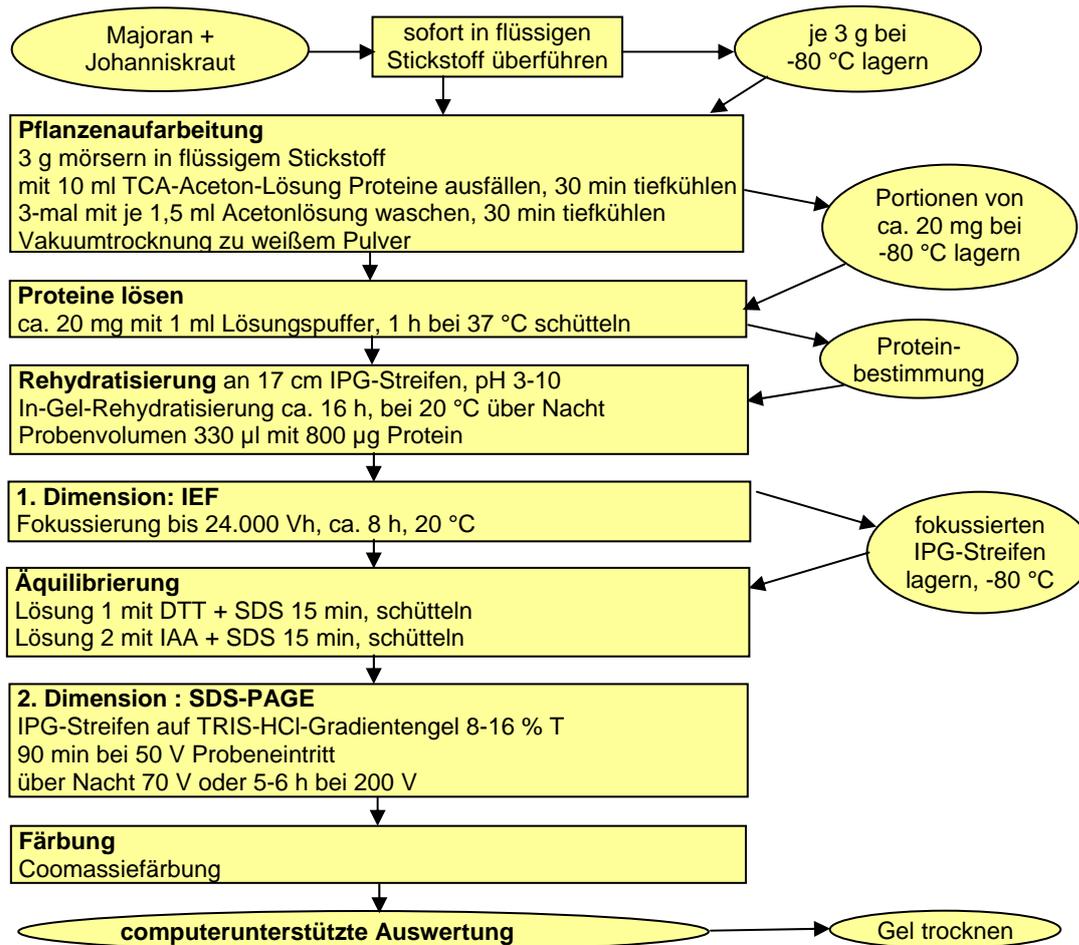
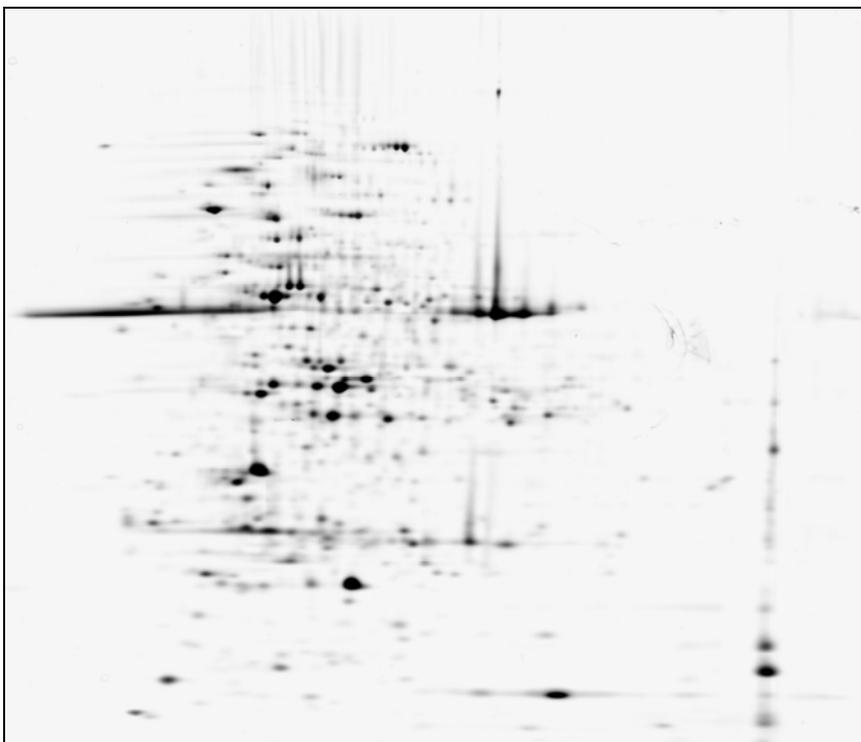


Abb. 57 Flussschema der optimierten 2-D-Elektrophorese-Methode

Abb. 58 2-D-Gel von 800 µg Majoranprotein mit der optimierten 2-D-E-Methode  
20 x 20 cm; IPG pH 3-10; SDS-PAGE Gradient 8-16 % T; Coomassiefärbung

## 6.5 Systemische Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine

### 6.5.1 Majoran

Jeweils zwei Pflanzen mykorrhizierten und drei Pflanzen nicht mykorrhizierten Majorans wurden für die 2-D-Elektrophorese der Proteine des oberirdischen Pflanzenmaterials (Kraut) herangezogen. Pro Pflanze wurden acht 2-D-Gele angefertigt.

Mit Hilfe der 2-D-Elektrophorese und anschließender computerunterstützter Auswertung wurden 487 Proteine im oberirdischen Blattmaterial von Majoran detektiert. Nach dem Matching-Prozess aller Gelwiederholungen von mykorrhiziertem und nicht mykorrhiziertem Majoran konnten schließlich noch 173 dieser Proteine allen Gelen zugeordnet werden.

Die anschließende computerunterstützte semi-quantitative Auswertung der 2-D-Gele von mykorrhiziertem und nicht mykorrhiziertem Majoran ergab insgesamt 15 Proteinspots, die durch die Mykorrhizierung eine mindestens 2-fach veränderte Expression erfahren hatten.

Anhand des so genannten Mastergels sind in der Abb. 59 die 15 in mykorrhizierten Pflanzenproben quantitativ beeinflussten Spots mit den von der Software vergebenen Nummern (SSP) bezeichnet und ihre Lokalisation im 2-D-Gel durch rote Kreuze markiert. Das Mastergel entspricht dabei einem softwareerstellten Gel, das alle Spots, die in irgendeinem der analysierten Gelvarianten auftreten in einem Gel enthält.

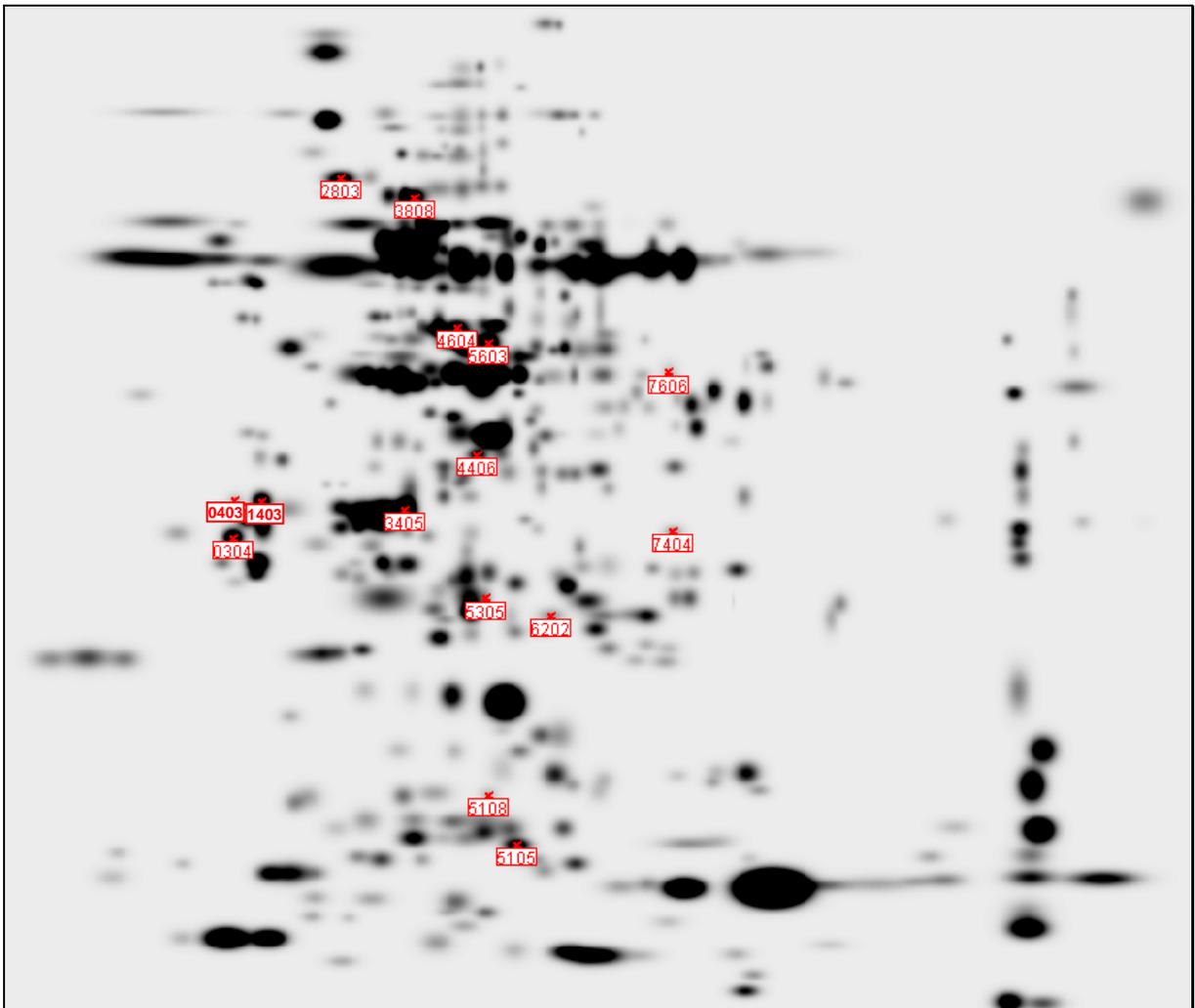


Abb. 59 Lokalisation (rotes Kreuz) im 2-D-Mastergel und SSP-Nrn. der in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung in Majoran hoch- bzw. herunterregulierten Proteinspots  
Mastergel: softwareerstelltes Gel, das alle Spots aller analysierten Gelvarianten in einem Bild enthält

Die Identifizierung dieser insgesamt 15 hoch- bzw. herunterregulierten Proteine mittels MALDI-TOF/TOF MS war im Falle von Majoran für 13 Proteine erfolgreich verlaufen. Die identifizierten Proteine sind in der Tab. 11 unter Angabe der SSP-Nummern, der Score-Werte der Datenbanksuche und der in den Gelen der mykorrhizierten Pflanzen und der Kontrollpflanzen detektierten Proteinmengen aufgeführt.

Tab. 11 Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor®-Blähton-Einsatz in Majoran herauf- bzw. herunterregulierten Proteine

SSP <sup>1</sup>	Proteinname / vermeintliche Funktion	Score <sup>2</sup>	Proteinmenge (ng/Gel) <sup>3</sup>		Verhältnis <sup>4</sup>
			Kontrolle (n=16)	mit AMykor® (n=24)	
5108	Cytochrom b <sub>6</sub> f Komplex - Eisen-Schwefel-Untereinheit (E.C. 1.10.99.1)	87	70 a	351 b	5,00
7606	RuBisCo große Untereinheit (E.C. 4.1.1.39)	586	283 a	895 b	3,16
7404	RuBisCo große Untereinheit (E.C. 4.1.1.39)	449	291 b	135 a	-2,15
0403	RuBisCo große Untereinheit (E.C. 4.1.1.39)	125	487 b	202 a	-2,41
5105	RuBisCo große Untereinheit (E.C. 4.1.1.39)	530	2387 b	937 a	-2,55
3808	Chaperonin 60 alpha-Untereinheit	671	2853 b	1144 a	-2,49
2803	Chaperonin 60 alpha-Untereinheit	316	2792 b	1371 a	-2,04
3405	Photosystem II Sauerstoff freisetzender Komplex Protein 1 (Ca <sup>2+</sup> -Bindung)	540	5509 b	1479 a	-3,72
6202	Carboanhydrase (Isoform) (E.C. 4.2.1.1)	108	2053 b	917 a	-2,24
5305	Carboanhydrase (E.C. 4.2.1.1)	102	1224 b	478 a	-2,56
4604	Aktin	636	3132 b	1605 a	-1,95
4406	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (E.C. 4.1.2.13) Vorstufe, Chloroplast	390	2288 b	902 a	-2,54
5603	Glutamin-Synthetase (E.C. 6.3.1.2)	269	2691 b	646 a	-4,17
1403	nicht identifiziert	-	3971 b	670 a	-5,93
0304	nicht identifiziert	-	1480 b	15 a	-100,67

<sup>1</sup> SSP-Nummer entsprechend der Bezeichnung in Abb. 59

<sup>2</sup> Trefferquote in Mascot bzw. CDS Plant

<sup>3</sup> Mittelwerte der angegebenen Wiederholungen, gleiche Buchstaben in den Zeilen bedeuten keinen signifikanten Unterschied

<sup>4</sup> gepaartes Verhältnis auf der Basis der angegebenen Wiederholungen; AMykor® / Kontrolle bei hochregulierten Proteinen; Kontrolle / AMykor® bei herunterregulierten Proteinen; negatives Vorzeichen gibt eine gesenkte Proteinexpression in mykorrhizierten Varianten an

 durch Mykorrhizierung heraufreguliert

 durch Mykorrhizierung herunterreguliert

 Protein-Fragment, Hinweis auf degradierte Proteine

Die Tabelle zeigt nur bei zwei der quantitativ veränderten Proteine eine Steigerung der Expression in mykorrhiziertem Majoran (in Tab. 11 **hellgrün** hinterlegt; SSP 5108 und 7606). Die Expression der weiteren aufgeführten Proteine wurde in der Folge der Mykorrhizierung in den Majoranpflanzen mindestens 2-fach herunterreguliert (in Tab. 11 **orange** hinterlegt). Grundsätzlich lässt sich anhand dieser Ergebnisse zunächst feststellen, dass die Mykorrhizierung einen Einfluss auf den Proteinstoffwechsel der Majoranpflanzen ausübt. Insbesondere an der Photosynthese beteiligte Proteine wurden durch die Mykorrhizierung verstärkt exprimiert. Sie wurden als eine große Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo)-Untereinheit (SSP 7606) und als Cytochrom b<sub>6</sub>f Komplex in Form der Eisen-Schwefel-Untereinheit (SSP 5108) identifiziert. Mehrere herunterregulierte Proteinspots wurden ebenfalls als große RuBisCo Untereinheit identifiziert (SSP 7404, 0403, 5105). Da es sich hierbei aber um Fragmente (in Tab. 11 **orange gestreift**) der großen RuBisCo-Untereinheit handelte, deren Molekulargewichte im 2-D-Gel (15, 30 und 32 kDa) deutlich

unter dem theoretischen Molekulargewicht (51,5 kDa) lagen, waren dies Produkte einer Proteinspaltung. Da die Fragmente in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen reproduzierbar detektiert wurden, hatte der Proteinabbau schon in der lebenden Pflanzenzelle stattgefunden und war nicht auf die Probenaufarbeitung zurückzuführen. Die niedrigeren Gehalte dieser Spaltprodukte in mykorrhizierten Pflanzen belegen damit einen geringeren Abbau dieses photosyntheserelevanten Proteins in mykorrhizierten Pflanzen.

Ebenfalls an der Photosynthese beteiligte Enzyme, wie Chaperonin 60 (SSP 3808, 2803) und der Sauerstoff freisetzende Komplex des Photosystems II (SSP 3405) wurden dagegen nach Mykorrhizierung tatsächlich in reduzierten Mengen gefunden. Zu weiteren nach Mykorrhizierung in ihrer Expression gesenkten Proteinen zählten in Majoran außerdem nur indirekt über das Kohlendioxid-Gleichgewicht an der Photosynthese beteiligte Enzyme (Carboanhydrasen in verschiedenen Isoformen, SSP 6202, 5305), der Zellwandstrukturbaustein Aktin (SSP 4604) sowie am Kohlenhydratstoffwechsel (Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase, SSP 4406) und am Proteinstoffwechsel (Glutamin-Synthetase, SSP 5603) beteiligte Enzyme.

### 6.5.2 Johanniskraut

Die Proteinuntersuchungen für Johanniskraut wurden an den zwei Johanniskrautsorten ‚Topaz‘ und der gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* „anfälligen Standardsorte“ durchgeführt. Von beiden Sorten wurden jeweils zwei mykorrhizierte Pflanzen und je zwei nicht mykorrhizierte Pflanzen für die 2-D-Elektrophorese der Proteine des oberirdischen Pflanzenmaterials herangezogen. Die 2-D-Elektrophorese wurde in jeweils sieben bis zehn Wiederholungen durchgeführt, damit eine ausreichende Anzahl an Gelen für eine gesicherte Aussage über die durch die Mykorrhizierung bzw. durch die Johanniskrautsorte unterschiedlich regulierten Proteine zur Verfügung stand.

Mit Hilfe der Software PDQuest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden auch für Johanniskraut alle Gele ausgewertet, um statistisch gesichert alle die Proteinspots zu detektieren, die bei Behandlung mit dem Mykorrhiza-Inokulum bzw. in Abhängigkeit von der untersuchten Johanniskrautsorte in ihrer Expression erhöht oder verringert waren.

Nach 2-D-Elektrophorese und anschließender computerunterstützter Auswertung wurden im oberirdischen Krautmaterial von Johanniskraut 463 Proteine detektiert. Nachdem alle Gelwiederholungen von mykorrhiziertem und nicht mykorrhiziertem Johanniskraut der Sorte ‚Topaz‘ und der „anfälligen Standardsorte“ gematcht waren, konnten schließlich noch 237 dieser Proteine von der Software in allen Gelen zugeordnet werden.

Mit Hilfe der computerunterstützten semi-quantitativen Auswertung der 2-D-Gele wurden für die Johanniskraut-2-D-Gele alle die Proteine detektiert, die

- a) in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung mindestens 2-fach hoch- bzw. herunterreguliert worden waren (in beiden Johanniskrautsorten),
- b) in Abhängigkeit von der Johanniskrautsorte mindestens 2-fach differenziert reguliert worden waren bzw.
- c) einer Schnittmenge aus a) und b) entsprachen. Hierunter fielen alle Proteine, die zwar in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung unterschiedlich exprimiert wurden, aber nur in einer Johanniskrautsorte.

Diese Auswertung ergab insgesamt 29 Proteine, die in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung und/oder von der eingesetzten Johanniskrautsorte mindestens 2-fach quantitativ verändert exprimiert waren. Diese 29 Proteinspots und ihre Lokalisation im 2-D-Gel sind anhand des Mastergels in der Abb. 60 durch rote Kreuze markiert und mit der SSP-Nummer bezeichnet.

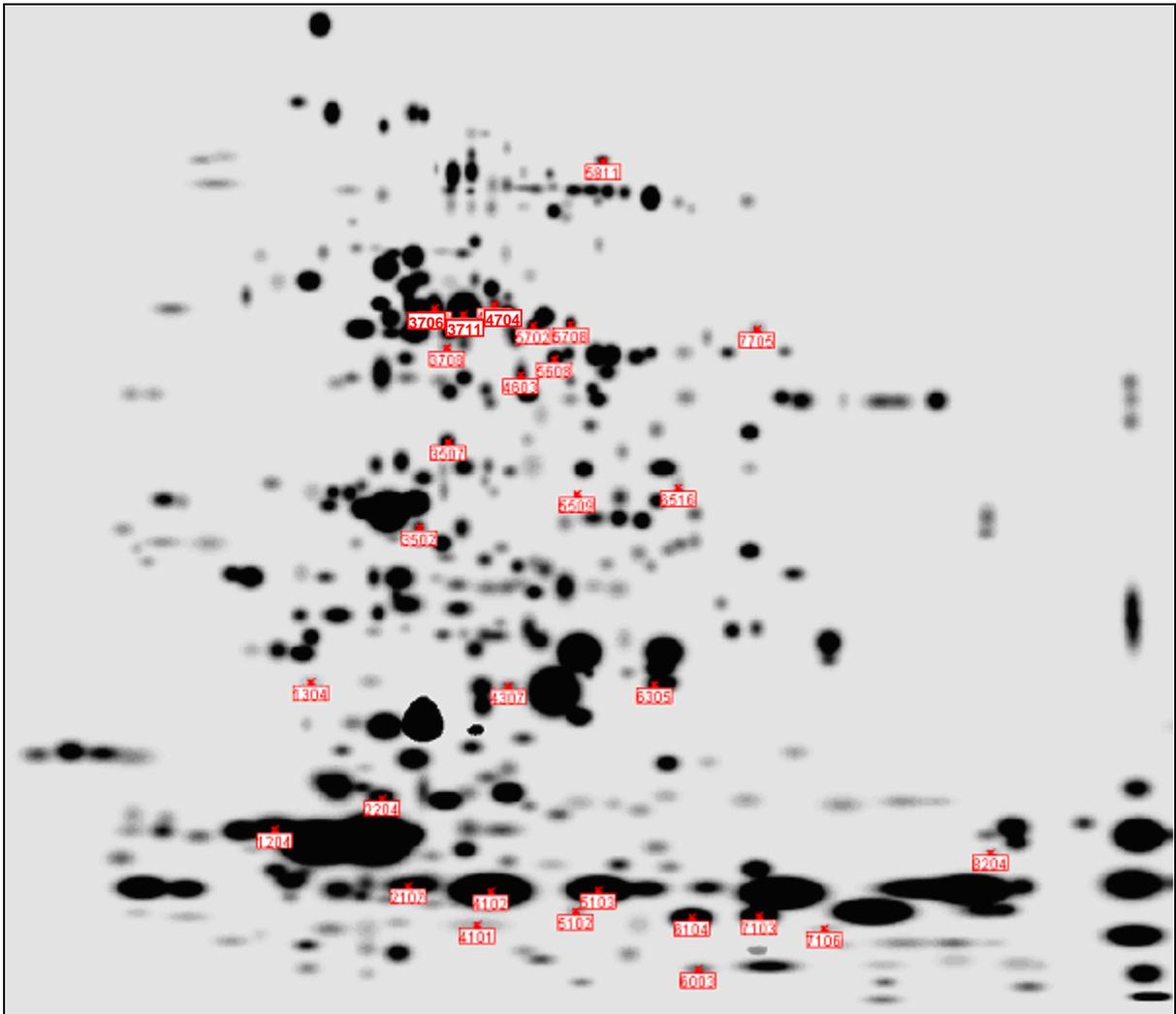


Abb. 60 Lokalisation (rotes Kreuz) im 2-D-Mastergel und SSP-Nrn. der in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung und/oder die Sorte in Johanniskraut hoch- bzw. herunterregulierten Proteinspots  
Mastergel: softwareerstelltes Gel, das alle Spots aller analysierten Gelvarianten in einem Bild enthält

Von den quantitativ mindestens 2-fach veränderten Proteinen waren

- a) 5 Proteinspots in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung in beiden Sorten,
- b) 8 Proteinspots nur in Abhängigkeit von der untersuchten Johanniskrautsorte und
- c) 16 Proteinspots aufgrund der Mykorrhizierung in nur einer Johanniskrautsorte mindestens 2-fach hoch- oder herunterreguliert worden.

Auch für Johanniskraut wurden von diesen 29 Proteinen bis auf zwei Proteine alle mittels MALDI-TOF/TOF MS und anschließender Datenbanksuche identifiziert.

**a) Durch die Mykorrhizierung in ihrer Expression beeinflusste Proteine (in beiden Sorten)**

Die fünf unabhängig von der Johanniskrautsorte durch die Mykorrhizierung in Johanniskraut herunterregulierten Proteinspots und ihre Bezeichnung sind unter Angabe der SSP-Nummern und der Proteinmengen in allen Untersuchungsvarianten in Tab. 12 aufgelistet.

Tab. 12 Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor®-Blähton-Einsatz in beiden Johanniskrautsorten herunterregulierten Proteine (a)

SSP <sup>1</sup>	Proteinname / vermeintliche Funktion	Score <sup>2</sup>	Proteinmenge (ng/Gel) <sup>3</sup>				Verhältnis <sup>4</sup>
			"anfälliger Standard"		„Topaz“		
			Kontrolle (n=8)	mit AMykor® (n=7)	Kontrolle (n=9)	mit AMykor® (n=10)	
8204	Photosystem I Reaktionszentrum Untereinheit IV A, Chloroplasten-Vorstufe (PSI-E A)	87	112 b	18 a	285 c	159 b	-2,02
7705	Glycin-Dehydrogenase (decarboxylierend), Mitochondrien-Vorstufe (E.C. 1.4.4.2)	159	218 c	46 a	209 c	142 b	-2,08
6305	Germin-like Protein 1 Vorstufe	80	913 c	376 ab	437 b	187 a	-2,49
1304	Putative Immunophilin = FKBP-Typ Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase	208	182 b	20 a	271 c	152 b	-2,35
4603	beta-Cyanoalanin-Synthase	202	742 c	93 a	200 b	97 a	-4,75

<sup>1</sup> SSP-Nummer entsprechend der Bezeichnung in Abb. 60

<sup>2</sup> Trefferquote in Mascot bzw. CDS Plant

<sup>3</sup> Mittelwerte der angegebenen Wiederholungen, gleiche Buchstaben in den Zeilen bedeuten keinen signifikanten Unterschied

<sup>4</sup> gepaartes Verhältnis auf der Basis der angegebenen Wiederholungen; MW AMykor® / MW Kontrolle bei hochregulierten Proteinen; MW Kontrolle / MW AMykor® bei herunterregulierten Proteinen; negatives Vorzeichen gibt eine gesenkte Proteinexpression in mykorrhizierten Varianten an

 durch Mykorrhizierung heraufreguliert

 durch Mykorrhizierung herunterreguliert

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich auch für Johanniskraut ein Einfluss der Mykorrhizierung auf den Proteinstoffwechsel feststellen. Für diese fünf aufgeführten Proteine führte die Mykorrhizierung zu einer geringeren Expression (in Tab. 12 orange hinterlegt) in beiden Johanniskrautsorten. Hiervon waren in mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen z.B. Photosyntheseprozesse (Photosystem I Reaktionszentrum, SSP 8204), die Proteinfaltung (FKBP-Typ Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase, SSP 1304) oder die Cyanidentgiftung ( $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase, SSP 4603) betroffen. Außerdem waren eine Glycin-Dehydrogenase (SSP 7705) und ein als Germin-like Protein identifiziertes Protein (SSP 6305) in mykorrhiziertem Johanniskraut beider Sorten herunterreguliert worden.

### b) In Abhängigkeit von der Johanniskrautsorte in ihrer Expression beeinflusste Proteine

Wie bereits erwähnt, wurden beim Vergleich der beiden Johanniskrautsorten auch deutliche Unterschiede der Proteinmuster allein in Abhängigkeit von der eingesetzten Sorte festgestellt. Die Daten der acht Proteinspots, die nicht durch die Mykorrhizierung beeinflusst wurden, aber mindestens 2-fache Unterschiede in ihrer Regulation in den zwei gegenübergestellten Johanniskrautsorten aufwiesen, sind in Tab. 13 aufgeführt.

Unabhängig von der Mykorrhizierung war in der toleranten Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ insbesondere eine Glutamin-Synthetase (SSP 5708) deutlich verstärkt exprimiert (in Tab. 13 hellgrün hinterlegt), weshalb ein gesteigerter Aminosäure- und Proteinstoffwechsel in dieser Sorte zu vermuten ist. Für eine gesteigerte Translation von Proteinen spricht die in der Sorte ‚Topaz‘ erhöhte Expression eines vermeintlichen m-RNA bindenden Proteins (SSP 5608). Ein ebenfalls in der Sorte ‚Topaz‘ verstärkt exprimiertes Protein wurde als SHOOT 1 Protein identifiziert (SSP 3507). Auch photosyntheserelevante Proteine waren in der Sorte ‚Topaz‘ höher reguliert als in der „anfälligen Standardsorte“, so zwei Formen der RuBisCo-Aktivase (SSP 4704, 3706) sowie eine Form der kleinen Untereinheit der RuBisCo (SSP 5103). Ein

weiteres Isoenzym der kleinen RuBisCo-Untereinheit war dagegen in der „anfälligen Standardsorte“ erhöht (SSP 3507; in Tab. 13 orange hinterlegt).

Tab. 13 Identifizierung und detektierte Mengen der nicht durch AMykor®-Blähton-Einsatz aber in Abhängigkeit von der Johanniskrautsorte herauf- bzw. herunterregulierten Proteine (b))

SSP <sup>1</sup>	Proteinname / vermeintliche Funktion	Score <sup>2</sup>	Proteinmenge (ng/Gel) <sup>3</sup>				Verhältnis <sup>4</sup>
			"anfälliger Standard"		„Topaz“		
			Kontrolle (n=8)	mit AMykor® (n=7)	Kontrolle (n=9)	mit AMykor® (n=10)	
5708	Glutamin-Synthetase (E.C. 6.3.1.2)	312	26 a	14 a	661 b	603 b	31,18
5608	vermeintliches m-RNA bindendes Protein	307	221 a	234 a	967 b	939 b	4,20
3507	SHOOT1 Protein	348	895 b	577 a	1513 c	1499 c	2,02
4704	RuBisCo-Aktivase	405	743 ab	296 a	1024 b	1530 c	2,41
3706	RuBisCo-Aktivase	485	2632 a	1830 a	4356 b	5432 c	2,18
5103	RuBisCo kleine Untereinheit	197	20146 a	18859 a	48407 b	52939 c	2,60
2107	RuBisCo kleine Untereinheit, Chloroplasten-Vorstufe (E.C. 4.1.1.39)	307	2625 b	3174 b	1061 a	1377 a	-2,35
4102	nicht identifiziert		-45278 b	44738 b	20042 a	22690 a	-2,10

<sup>1</sup> SSP-Nummer entsprechend der Bezeichnung in Abb. 60

<sup>2</sup> Trefferquote in Mascot bzw. CDS Plant

<sup>3</sup> Mittelwerte der angegebenen Wiederholungen, gleiche Buchstaben in den Zeilen bedeuten keinen signifikanten Unterschied

<sup>4</sup> gepaartes Verhältnis auf der Basis der angegebenen Wiederholungen; MW „Topaz“ / MW „anfälliger Standard“ bei höher regulierten Proteinen in „Topaz“; MW „anfälliger Standard“ / MW „Topaz“ bei geringer regulierten Proteinen in „Topaz“; negatives Vorzeichen gibt eine geringere Proteinexpression in „Topaz“ an

 in der Sorte „Topaz“ stärker exprimiert als in der „anfälligen Standardsorte“

 in der „anfälligen Standardsorte“ stärker exprimiert als in der Sorte „Topaz“

### c) Nur in der „anfälligen Standardsorte“ durch die Mykorrhizierung in ihrer Expression beeinflusste Proteine

Weitere 16 Proteine reagierten wiederum auf die Mykorrhizierung mit einer mindestens 2-fachen Hoch- bzw. Herunterregulation, allerdings nur in der „anfälligen Standardsorte“. Diese 16 nur in der „anfälligen Standardsorte“ infolge der Mykorrhizierung hoch- bzw. herunterregulierten Proteinspots sind in Tab. 14 mit analogem Aufbau zu den vorherigen Tabellen zusammengefasst.

Nur in der „anfälligen Standardsorte“ waren in erster Linie an der Photosynthese (Chlorophyll a/b bindendes Protein, SSP 4307; kleine und große Untereinheiten der RuBisCo, SSP 5102, 5509; ATP-Synthase, SSP 3708) bzw. am Energiestoffwechsel (Malat-Dehydrogenase, SSP 6516) beteiligte Proteine in mykorrhizierten Pflanzen deutlich stärker gebildet worden (in Tab. 14 hellgrün hinterlegt). Allerdings waren auch die Spaltprodukte der großen RuBisCo-Untereinheit in den mykorrhizierten Pflanzen der „anfälligen Standardsorte“ deutlich erhöht reguliert (in Tab. 14 hellgrün gestreift; SSP 1204, 4101, 7106, 6003, 6104, 7103).

Reduzierte Proteinexpressionen (in Tab. 14 orange hinterlegt) wurden insbesondere bei stressrelevanten Enzymen gefunden (Superoxid-Dismutase, SSP 2204; Aldehyd-Dehydrogenase, SSP 5811), deren Expressionen durch Mykorrhizierung auf das Niveau der toleranten Johanniskrautsorte „Topaz“ herabgesenkt wurden. Außerdem waren ein am Proteinstoffwechsel (Glutamin-Synthetase, SSP 5702) beteiligtes Protein und ein als vermeintlicher ABC-Transporter identifiziertes Protein (SSP 3502) in ihrer Expression gemindert.

Tab. 14 Identifizierung und detektierte Mengen der durch AMykor®-Blähton-Einsatz nur in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrautes herauf- bzw. herunterregulierten Proteine (c)

SSP <sup>1</sup>	Proteinname / vermeintliche Funktion	Score <sup>2</sup>	Proteinmenge (ng/Gel) <sup>3</sup>				Verhältnis <sup>4</sup>
			"anfälliger Standard"		„Topaz“		
			Kontrolle (n=8)	mit AMykor® (n=7)	Kontrolle (n=9)	mit AMykor® (n=10)	
3708	ATP-Synthase gamma-Kette, Chloroplasten-Vorstufe (E.C. 3.6.3.14)	114	167 a	992 b	148 a	159 a	5,92
4307	Chlorophyll a/b bindendes Protein Typ I Vorstufe	529	438 a	1524 b	297 a	187 a	3,48
6516	NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)	157	223 ab	648 c	237 b	98 a	2,90
5102	RuBisCo kleine Untereinheit (E.C. 4.1.1.39) Vorstufe	130	220 a	1367 b	269 a	143 a	6,20
5509	RuBisCo große Untereinheit (E.C. 4.1.1.39)	246	41 a	625 b	131 a	36 a	15,26
1204	RuBisCo große Untereinheit	440	721 a	5920 c	2577 b	1562 ab	8,22
4101	RuBisCo große Untereinheit	112	274 b	883 c	125 ab	72 a	3,22
7106	RuBisCo große Untereinheit	398	216 ab	1089 c	261 b	143 a	5,04
6003	RuBisCo große Untereinheit	94	326 a	1076 b	378 a	312 a	3,31
6104	RuBisCo große Untereinheit	356	5672 a	15424 b	5467 a	3887 a	2,72
7103	RuBisCo große Untereinheit	382	4611 b	10511 c	4058 ab	3300 a	2,28
3502	vermeintlicher ABC-Transporter	258	354 c	158 b	88 a	101 a	-2,24
5702	Glutamin-Synthetase (E.C. 6.3.1.2)	365	762 b	328 a	246 a	214 a	-2,32
5811	Aldehyd-Dehydrogenase 1 Vorstufe (E.C. 1.2.1.3)	205	257 b	78 a	108 a	89 a	-3,28
2204	Superoxid-Dismutase [Cu-Zn], (E.C. 1.15.1.1.)	430	1943 c	329 b	92 a	37 a	-5,90
3711	nicht identifiziert		-15958 b	5927 a	24172 c	27367 d	-2,69

<sup>1</sup> SSP-Nummer entsprechend der Bezeichnung in Abb. 60

<sup>2</sup> Trefferquote in Mascot bzw. CDS Plant

<sup>3</sup> Mittelwerte der angegebenen Wiederholungen, gleiche Buchstaben in den Zeilen bedeuten keinen signifikanten Unterschied

<sup>4</sup> gepaartes Verhältnis auf der Basis der angegebenen Wiederholungen nur bezogen auf die „anfällige Standardsorte“; AMykor® / Kontrolle bei hochregulierten Proteinen bei Mykorrhizierung; Kontrolle / AMykor® bei herunterregulierten Proteinen bei Mykorrhizierung; negatives Vorzeichen gibt eine geringere Proteinexpression in mykorrhizierten Varianten an

 durch Mykorrhizierung heraufreguliert (nur in der „anfälligen Standardsorte“)

 durch Mykorrhizierung herunterreguliert (nur in der „anfälligen Standardsorte“)

 Protein-Fragment, Hinweis auf degradierte Proteine

## 7 Diskussion

### 7.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

#### 7.1.1 Vergleich von Extraktionsmethoden

Die Methodensammlungen der Arzneibücher [DAB 10, 1991; DAC, 2000; Ph. Eur., 2002] und des LMBG (1995) legen bei der Gehaltsbestimmung des ätherischen Öls die Gewinnung über eine Wasserdampfdestillation (WDD) zugrunde, womit in erster Linie eine Gesamtgehaltsbestimmung erreicht werden soll.

Bei der WDD werden jedoch nur die flüchtigen, eventuell aromaaktiven Inhaltsstoffe aus den Gewürz- und Heilpflanzen extrahiert. Entscheidend für diese Methode ist nur die Wasserdampflichkeit der Komponenten. Aus diesem Grund sind die geschmacksaktiven Substanzen mit diesem Verfahren nur teilweise extrahierbar [BLUM, 1999; LÄNGER et al., 1996; MALDAO-MARTINS et al., 2000; MALDAO-MARTINS et al., 2002; NITZ et al., 1992; OSZAGYAN et al., 1996; RONYAI et al., 1999]. Hoch flüchtige Komponenten dagegen oder auch wasserlösliche Verbindungen können bei diesem Verfahren verloren gehen und werden damit ebenfalls bei der anschließenden gaschromatographischen Bestimmung nicht erfasst. [BLUM, 1999; NITZ et al., 1992]

Die bei der Destillation wirkenden Einflüsse von erhöhter Temperatur, Wasserdampf und pH-Wert sind für die Interpretation von Ergebnissen der gaschromatographischen Bestimmung im Anschluss an die WDD ebenfalls problematisch. Bei den reaktiven Verbindungsklassen ätherischer Öle kommt es hierbei häufig zu chemischen Veränderungen der nativ in den Pflanzen vorliegenden Verbindungen. Gerade bei Majoran wurden durch die WDD herbeigeführte Veränderungen der Inhaltsstoffspektren schon mehrfach belegt [BLUM, 1999; de CASTRO et al., 1999; CORNWELL et al., 1999; FISCHER et al., 1987; FISCHER et al., 1988; JIMÉNEZ-CARMONA et al., 1999; KOEDAM und LOOMAN, 1980; NITZ et al., 1992; OSZAGYAN et al., 1996; TIETZ et al., 1991; VERA und CHANE-MING, 1999].

Auch im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden so in Majoran die thermo- und hydrolyselabilen Substanzen Sabinenhydratacetat und cis-Sabinenhydrat in den Wasserdampfdestillaten zu deutlich geringeren Anteilen gefunden als in den Extrakten (vgl. Abb. 9). Unter dem Einfluss von hohen Temperaturen und saurem pH-Wert kam es zu Umwandlungen dieser Verbindungen in Terpinen-4-ol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Terpinen, deren Gehalte folglich in den Wasserdampfdestillaten deutlich erhöht waren. Aufgrund dieser Umwandlungen erlaubt die WDD keine Aussage über die tatsächlich genuin in den Pflanzen enthaltenen aromagebenden Inhaltsstoffe.

Somit ist die Zusammensetzung eines ätherischen Öls von der Isolierungsart aus den ätherische Öle produzierenden Pflanzen abhängig. Unter diesem Aspekt gestaltet sich auch der quantitative Nachweis von möglicherweise durch die Mykorrhizierung hervorgerufenen Veränderungen anhand des Inhaltsstoffspektrums der ätherischen Öle der Pflanzen schwierig. Darüber hinaus handelt es sich bei der WDD um eine sehr zeitaufwendige Methode mit hohem manuellen Arbeitsaufwand, die deshalb für das Screening einer großen Anzahl an Pflanzenproben zur Bestimmung der Aromakomponenten nur bedingt geeignet ist. Daher wurden zur Probenvorbereitung neben der üblichen WDD auch andere Extraktionsmethoden eingesetzt, um die Verfahren miteinander vergleichen zu können und letztendlich die vorteilhafteste Methode zu finden. Zu den üblichen Verfahren zur Gewinnung aromaaktiver Pflanzeninhaltsstoffe zählen neben der WDD Lösungsmittelextraktionen mit oder ohne die Anwendung hoher Temperaturen oder Drücke [BLUM, 1999; de CASTRO et al., 1999; LÄNGER et al., 1996] sowie die Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid [BAYSAL und STARMANS, 1999; MALDAO-MARTINS et al., 2000; MALDAO-MARTINS et al., 2002; NITZ et al., 1992; OSZAGYAN et al., 1996; RODRIGUES et al., 2003; SOVAVA et al., 1994; STAHL et al., 1984; TIETZ et al., 1991].

Für die Extraktion der Aromakomponenten mit Hilfe organischer Lösungsmittel wird in Laboratorien nicht selten die Soxhlet-Extraktion angewandt [BLUM, 1999]. Da die Extrakte hierbei jedoch erhöhten Temperaturen ausgesetzt werden und somit Veränderungen der Inhaltsstoffe auftreten können, wurde im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen eine Kaltextraktion mittels n-Hexan am Ultra-Turrax durchgeführt (LME, Lösungsmittlextraktion).

Die Lösungsmittlextraktion beruht allein auf der Löslichkeit der Inhaltsstoffe im verwendeten Lösungsmittel. Da hierbei alle im eingesetzten Lösungsmittel löslichen Komponenten extrahiert werden, enthält der Extrakt neben flüchtigen Komponenten ätherischer Öle auch schwerer oder nicht flüchtige Di- und Triterpene, die z.T. ebenfalls aromaaktiv sind, aber auch Harze, Fette und Fettsäuren, Wachse oder Farbstoffe. Die Zusammensetzung der gewonnenen Extrakte muss aber nicht dem Verhältnis der Inhaltsstoffe im Ausgangsmaterial entsprechen, da das Löslichkeitsverhalten der einzelnen Komponenten im verwendeten Lösungsmittel ihren Anteil im Extrakt verändern kann. [BLUM, 1999; de CASTRO et al., 1999; LÄNGER et al., 1996]

Was bei der Lösungsmittlextraktion nur durch die Wahl des Lösungsmittels beeinflusst wird, lässt sich bei der SFE (Supercritical Fluid Extraction, Extraktion mit überkritischen Flüssigkeiten) v.a. durch Veränderung von Temperatur und Druck variieren [BAYSAL und STARMANS, 1999; MALDAO-MARTINS et al., 2000; MALDAO-MARTINS et al., 2002; NITZ et al., 1992; OSZAGYAN et al., 1996; RODRIGUES et al., 2003; SOVAVA et al., 1994; STAHL et al., 1984; TIETZ et al., 1991]. Kohlendioxid im überkritischen Zustand wirkt dabei wie ein organisches Lösungsmittel. Bei Anwendung relativ niedriger Temperaturen und Drücke ist es möglich, Selektivextrakte zu gewinnen, die hauptsächlich aus ätherischen Ölen bestehen und nur geringe Anteile an nicht flüchtigen Verbindungen enthalten [BLUM, 1999]. Dies wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt (vgl. Abb. 10, Abb. 13). Durch Erhöhung von Temperatur und Druck lassen sich dagegen auch höhere Terpene, freie Fettsäuren, fette Öle, Wachse, Harze und Farbstoffe extrahieren [GERHARDT, 1994].

Aber auch bei einer Lösungsmittlextraktion können Veränderungen von Temperatur und Druck das Löslichkeitsverhalten von Inhaltsstoffen beeinflussen. Die von der Dionex GmbH entwickelte ASE (Accelerated Solvent Extraction, Beschleunigte Lösungsmittlextraktion) extrahiert unter hohem Druck und hoher Temperatur. Die dadurch erreichte Löslichkeitssteigerung für die jeweiligen Komponenten verkürzt die notwendige Extraktionszeit und verringert den Lösungsmittelverbrauch. Der Einfluss der zwar ebenfalls hohen Extraktionstemperaturen (100 °C) aber dafür geringeren Extraktionszeit (10 min) führt dabei nicht zu den starken Veränderungen der Inhaltsstoffspektren wie die WDD (100 °C, 2 Std.) [BLUM, 1999; DIONEX, 1995]. Das konnte auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen bestätigt werden (vgl. Abb. 9 und Abb. 10).

Beim Vergleich von LME, SFE und ASE wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kaum Unterschiede im Inhaltsstoffmuster der extrahierten Aromakomponenten aus Majoran festgestellt. Gegenüber der WDD waren jedoch alle drei Verfahren als deutlich schonender für die Inhaltsstoffe einzustufen. Die Extrakte enthielten größere Anteile der natürlichen Inhaltsstoffe Sabinenhydratacetat und cis-Sabinenhydrat, die demzufolge in geringerem Ausmaß zu Terpinen-4-ol,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Terpinen umgewandelt wurden (vgl. Abb. 10).

Die Gegenüberstellung der ASE- und SFE-Extrakte von gefriergetrocknetem und frischem Material zeigte dagegen Unterschiede in der Komponentenzusammensetzung (vgl. Abb. 10). Bei der Extraktion aus dem noch wasserhaltigen frischen Majoran werden erhöhte Anteile an cis- und trans-Sabinenhydrat sowie an Terpinen-4-ol, dafür aber deutlich weniger Sabinenhydratacetat detektiert. Da diese Unterschiede zwischen frischem und gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial jedoch nicht bei der WDD und bei der kalten LME auftraten, fand die Umwandlung nicht während Gefrier- und Auftauprozessen statt. Vielmehr sind die Umwandlungsprozesse labiler Verbindungen während der Temperatureinwirkung in den Extraktions-

zellen bei der SFE und ASE bereits im Zusammenhang mit dem Eigenwassergehalt frischen Pflanzenmaterials zu vermuten.

Wie bereits erläutert, sind LME, SFE und ASE nur auf das Löslichkeitsverhalten aller Komponenten zurückzuführen, die WDD dagegen allein auf deren Wasserdampflichkeit. Deshalb ist selbstverständlich, dass mittels Extraktion auch andere, nicht flüchtige, bzw. nicht ätherische Öl-Verbindungen, gewonnen werden. Hierzu zählen nicht oder nur schwer flüchtige Verbindungen, wie Wachse, Fettsäuren oder höhere Terpene, die im Falle von Majoran und Thymian nur von untergeordneter Bedeutung für die sensorischen Eigenschaften sind. Unter den Extraktionsverfahren LME, ASE und SFE hob sich die SFE mit dem geringsten Anteil dieser nicht wasserdampflichen Verbindungen ( $RI > 2000$ ) in den Extrakten von Majoran (vgl. Abb. 10) und Thymian (vgl. Abb. 13) hervor.

Für Thymian wurden im Vergleich zu Majoran deutlich schwächere Unterschiede in der Zusammensetzung der Aromakomponenten mit den verschiedenen Extraktionsverfahren festgestellt (vgl. Abb. 13). Dies ist in erster Linie auf das weniger empfindliche Inhaltsstoffspektrum dieser Kulturen gegenüber pH- und Temperatureinwirkungen zurückzuführen. Der Anteil nicht ätherischer Öle ( $RI > 2000$ ) gestaltete sich aber auch bei Thymian mittels SFE am geringsten.

Unter Beachtung des erforderlichen manuellen Zeitaufwandes für die Extraktionsverfahren bieten die automatisierten Techniken der SFE und ASE gegenüber manueller LME oder WDD deutliche Vorteile. Da ein weiteres Einengen der Extrakte nach der SFE zur gaschromatographischen Bestimmung nicht mehr nötig war, bot die SFE gegenüber der ASE einen weiteren Zeitvorteil. Schließlich wird durch den Wegfall des Einengens außerdem der Verlust leicht flüchtiger Komponenten vermieden.

Insbesondere die SFE erwies sich daher als inhaltsstoffschonende Extraktionsmethode (hohe Anteile thermo- und hydrolyselabiler genuiner Verbindungen im Extrakt), ergab die geringsten Anteile nicht aromagebender Komponenten im Extrakt und bot weiterhin ein vergleichsweise zeitsparendes Verfahren. Die verwendete SFE-Anlage zeigte sich während der Routineanalytik jedoch als unzureichend stabil, was zu inakzeptabel hohen Standardabweichungen bei der gaschromatographischen Analyse führte.

Ein qualitativer Nachweis der Zusammensetzung der aromagebenden Inhaltsstoffe von Gewürzpflanzen wurde in den letzten Jahren verstärkt auch im Anschluss an eine Festphasenmikroextraktion (SPME, Solid Phase Microextraction) durchgeführt [BICCHI et al., 2000; COLEMAN und LAWRENCE, 2000; CORNU et al., 2001; CZERWINSKY et al., 1996; JORGENSEN, 2000; LIGOR et al., 2000; MINDRUP, 2000; NAMIESNIK und GÓRECKI, 2000; ROHLOFF, 1999; ROHLOFF et al., 2000; SCHÄFER et al., 1995]. Bei der SPME handelt es sich um eine lösungsmittelfreie, voll automatisierbare Probenvorbereitungsmethode für die routinemäßige Laboranalytik organischer Verbindungen. Eine beschichtete Kieselgelfaser wird dabei in die Probe oder in den Dampfraum über der Probe geführt, wobei organische Analyten an die jeweilige Faserbeschichtung adsorbiert werden. Bei der anschließenden Gaschromatographie werden die Analyten durch das beheizte Injektionssystem desorbiert und gelangen so auf die Trennsäule [SUPELCO, 1999 und 2000]. Der Vorteil dieser Methode besteht in erster Linie in der hohen Automatisierbarkeit, was sie für das Screening vieler Pflanzenproben besonders attraktiv erscheinen lässt [O'REILLY et al., 2005; VAS und VÉKEY, 2004].

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) übertraf die Vorteile der SFE in einigen Fällen sogar noch und stellte sich außerdem als sehr stabile Extraktionsmethode heraus. Auch die SPME erwies sich als vergleichsweise schonend gegenüber thermo- und hydrolyselablen aromaaktiven Verbindungen (vgl. Abb. 12). Die genuinen Verbindungen cis-Sabinenhydrat und Sabinenhydratacetat wurden in den SPME-extrahierten Chromatogrammen zu ähnlichen Kon-

zentrationenanteilen detektiert wie in den schonenden Lösungsmittel- und Kohlendioxidextrakten. Nur die mittels HS-SPME gewonnenen flüchtigen Extrakte waren wie die Wasserdampfdestillate vollkommen frei von nicht flüchtigen und für das Aroma kaum oder nicht relevanten Verbindungen mit  $RI > 2000$  (vgl. Abb. 12, Abb. 13). Dies liegt im Verfahren der Extraktionsmethode begründet, bei dem die Extraktion der flüchtigen Komponenten nach der Gleichgewichtseinstellung aus dem Dampfraum (Head Space) über der Probe erfolgt. Von besonderer Bedeutung für die Aufarbeitung einer Vielzahl von Proben zur Routineanalytik ist jedoch die hohe Automatisierbarkeit des Gesamtverfahrens der SPME/GC. Im besten Fall wird die manuelle Probenvorbereitung auf das Mahlen und Einwiegen der Pflanzenmaterialien beschränkt, was insbesondere zu einer hohen Routinesicherheit und Reproduzierbarkeit und damit geringen Verfahrensstandardabweichungen der Methode führt. Damit stellt die SPME außerdem die zeitsparendste Methode zur Extraktion aromagebender Komponenten mit anschließender gaschromatographischer Bestimmung ihrer Zusammensetzung dar. Insgesamt erwies sich die Festphasenmikroextraktion somit als vorteilhafteste Methode zur Extraktion aromaaktiver Verbindungen aus Majoran und Thymian und wurde deshalb für die Inhaltsstoffuntersuchungen aus diesen Kulturen optimiert und etabliert.

### 7.1.2 Optimierung der SPME-Methode

Als Probenvorbereitungsmethode zur anschließenden gaschromatographischen Bestimmung aromagebender Verbindungen wurde die SPME schon oft beschrieben. Für die flüchtigen Terpene ist eine Extraktion im Dampfraum über der Probe (HS-SPME) der direkten Extraktion aus der Probe vorzuziehen. Die PDMS 100  $\mu\text{m}$  Faser (100  $\mu\text{m}$  Polydimethylsiloxanschicht) wird dabei am häufigsten verwendet. Diese Faser ist für die Extraktion von Aromakomponenten gut geeignet und zeichnet sich weiterhin durch eine hohe Stabilität aus. [BICCHI et al., 2000; COLEMAN und LAWRENCE, 2000; CORNU et al., 2001; CZERWINSKY et al., 1996; DISTLER und SCHULZ, 2003; JORGENSEN, 2000; LIGOR et al., 2000; MINDRUP, 2000; NAMIESNIK und GÓRECKI, 2000; ROHLOFF, 1999; ROHLOFF et al., 2000; SCHÄFER et al., 1995]

Um den Vorteil der Automatisierbarkeit bestmöglich zu nutzen, wurde die SPME mit Hilfe des Probengebers CombiPAL vollautomatisiert und Software gesteuert durchgeführt. Damit wurden eine hohe Robustheit der Methode, eine sehr gute Routinesicherheit, bestmögliche Reproduzierbarkeit und damit geringe Verfahrensstandardabweichungen sowie ein minimaler manueller Arbeits- und Zeitaufwand gewährleistet.

Weitere Methodenparameter wurden schließlich am Beispiel des Majorans erfolgreich optimiert.

Bei der Gegenüberstellung der SPME von frischem und gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial von Majoran bestätigten sich die schon bei der ASE und SFE ermittelten Ergebnisse. Die Gaschromatogramme nach SPME aus frischem Pflanzenmaterial wiesen auch hier verminderte Gehalte an cis- und trans-Sabinenhydratacetat und dafür erhöhte Anteile an Terpinen-4-ol auf (vgl. Abb. 15). Mit diesem Ergebnis ließ sich die bereits aufgestellte Vermutung von Veränderungen thermolabiler Inhaltsstoffe im Zusammenhang mit dem Eigenwassergehalt frischer Proben noch verstärken (vgl. Abb. 16). Bei der SPME werden die gemahlene Proben in einem dicht verschlossenen SPME-Vial zunächst erhitzt, um den Übertritt flüchtiger Verbindungen in den Dampfraum und die Gleichgewichtseinstellung der Komponenten zwischen Probe und Dampfraum zu unterstützen [VAS und VÉKEY, 2004]. Trotz der relativ niedrigen Temperaturen von 40 °C während der Extraktion kam es hierbei, wie auch für die ASE und SFE schon beschrieben, in wasserhaltigem Probenmaterial bereits zu Substanzumlagerungen. Andererseits waren nach der Gefrierdrying im Vergleich zu frischem Pflanzenmaterial keinerlei Verluste leichter flüchtiger Verbindungen zu verzeichnen (vgl. Abb. 15). Somit war gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial für die SPME von genuinen aromaaktiven Inhaltsstoffen aus Gewürzpflanzen besser geeignet als frisches Pflanzenmaterial.

Die Extraktion mittels SPME setzt sich aus zwei Gleichgewichtseinstellungen zusammen. Zunächst erfolgt die oben erwähnte Gleichgewichtseinstellung zwischen Probe und Dampfraum im dicht verschlossenen Probenglas. Während einer zweiten Gleichgewichtseinstellung erfolgt bei der SPME der Übertritt der Analyten aus dem Dampfraum in das PDMS-Material der SPME-Faser. Durch Schütteln des Probengläschens im Agitator werden die Gleichgewichtseinstellungen unterstützt. Die Temperatur spielt bezüglich beider Gleichgewichtseinstellungen eine entscheidende Rolle. Hohe Temperaturen unterstützen den Übergang der flüchtigen Verbindungen aus der Probe in den Dampfraum während der ersten Gleichgewichtseinstellung, wohingegen sie die Aufnahme insbesondere der leicht flüchtigen Analyten aus dem Dampfraum in das Beschichtungsmaterial der SPME-Faser während der zweiten Gleichgewichtseinstellung selektiv unterdrücken können. [SCHÄFER et al., 1995; VAS und VÉKEY, 2004]

Dies konnte im Rahmen dieser Untersuchungen bestätigt werden. Auch hier führte die Extraktion bei höheren Temperaturen erwartungsgemäß zu höheren Gesamtextraktionsausbeuten (vgl. Abb. 17). Leichter flüchtige Verbindungen wurden aber bei höheren Extraktionstemperaturen diskriminiert (vgl. Abb. 18), da sie sich bei der Gleichgewichtseinstellung vermehrt im Dampfraum anreicherten und weniger im Beschichtungsmaterial der Faser. Eine mittlere Extraktionstemperatur von 40 °C erwies sich letztlich als optimal, um auch leichter flüchtige Verbindungen noch nachweisen zu können.

Eine Vorinkubationszeit von 5 min erschien für die erste Gleichgewichtseinstellung ausreichend. Erst während der sich anschließenden eigentlichen Extraktionszeit wird die Faserbeschichtung den Analyten im Dampfraum ausgesetzt. Dann laufen beide Gleichgewichtseinstellungen parallel ab. Obwohl zumindest für leicht flüchtige Monoterpene Gleichgewichtseinstellungen innerhalb von nur 90 s beschrieben sind [SCHÄFER et al., 1995], führten höhere Extraktionszeiten zu höheren Gesamtausbeuten. Bei längerer Extraktionszeit deutete sich jedoch ebenfalls die Anreicherung schwerer flüchtiger Verbindungen am Fasermaterial an und leicht flüchtige Komponenten wurden diskriminiert (vgl. Abb. 19). Da die SPME mit Hilfe des CombiPAL Probengebers voll automatisiert und damit sehr gut reproduzierbar durchgeführt wurde, war eine vollständige Gleichgewichtseinstellung auch nicht zwingend erforderlich [COLEMAN und LAWRENCE, 2000; COLEMAN et al., 2004; CZERWINSKY et al., 1996; ROHLOFF, 1999; VAS und VÉKEY, 2004]. Demzufolge wurde auch eine mittlere Extraktionszeit von 10 min gewählt.

Die Überführung der Komponenten aus dem Beschichtungsmaterial der SPME-Faser in den Gaschromatographen erfolgt durch Ausheizen der Faser im heißen GC-Injektor und einer damit einhergehenden Desorption der Analyten [VAS und VÉKEY, 2004]. Für eine schnelle und quantitative Desorption sollten die höchst möglichen Desorptionstemperaturen für Fasermaterial und Analyten eingesetzt werden [SCHÄFER et al., 1995]. Höhere Desorptionstemperaturen (240 °C) dagegen können zum Abbau thermolabiler Verbindungen führen. Auch im Rahmen dieser Untersuchungen deuteten sich bei hohen Injektionstemperaturen bereits Verluste thermolabiler Verbindungen, wie cis-Sabinenhydrat und cis-Sabinenhydratacetat, während der Injektion an (vgl. Abb. 20). Eine quantitativ reproduzierbare Probenaufnahme von der SPME-Faser ließ sich bei einer Desorptionstemperatur von 200 °C optimal durchführen.

Direkt nach der Desorption der Analyten im Injektor werden diese mit dem Trägergasfluss auf die Trennsäule überführt [VAS und VÉKEY, 2004]. Die durch die Methode der Desorption verzögerte Probenaufnahme in vergleichsweise hoher Konzentration führte bei der splitlosen Heißinjektion im Vergleich zur Splitinjektion der Extraktlösungen zu breiten Peaks und nicht zufriedenstellender Auflösung (vgl. Abb. 14). Eine entsprechend weitere Verringerung der Probenmenge (50 mg) schon bei der Einwaage wäre nicht mit der nötigen Reproduzierbarkeit zu realisieren gewesen und hätte zumindest das Problem der langsamen Desorption der Analyten nicht gelöst. Eine Fokussierung der Analyten am Anfang der Trennsäule kann nur

durch Temperatureffekte hervorgerufen werden. Die dazu für die flüchtigen Zielkomponenten erforderlichen Anfangstemperaturen sind jedoch nur mit entsprechender Ofenkühlung zu realisieren. Da auch fokussierende Kaltaufgabetechniken mit anschließender Aufheizung des Injektors nicht zur Verfügung standen, wurde alternativ die Splitinjektion eingesetzt. Das Splitverhältnis von 1:20 führte dabei zu einer deutlichen Verbesserung der Trennergebnisse (vgl. Abb. 21).

Insbesondere für leicht flüchtige Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit zu den vorrangigen Zielanalyten gehörten, werden besonders enge Liner für die SPME empfohlen. Mit diesen wird eine schnelle Desorption und ein schneller Übergang der Probenkomponenten aus dem Liner auf die Trennsäule und damit eine bessere Peakschärfe und Auflösung insbesondere für leicht flüchtige Verbindungen zu erreicht [O'REILLY et al., 2005; VAS und VÉKEY, 2004]. Obwohl die Verwendung eines speziellen SPME-Liners zu keinen weiteren sichtbaren Verbesserungen der Trennergebnisse führte, wurde der enge SPME-Liner für die hier durchgeführten Untersuchungen bevorzugt.

Nach jeder Extraktion wird die SPME-Faser für die nächste Extraktion durch Ausheizen konditioniert [VAS und VÉKEY, 2004]. Die Konditionierung, wie auch die Vorbereitung der nächsten Probenextraktion bis zum Injektionsschritt, erfolgt bei Einsatz der entsprechenden Software (CTC) jeweils während des GC-Laufes der vorherigen Probe. Die Konditionierzeit der SPME-Faser wurde deshalb im Zeitrahmen des GC-Laufes zur Trennung der Aromakomponenten von 31 min zuzüglich Abkühlzeit ohne Zeitverlust auf sichere 10 min eingestellt.

Das Mahlen und Einwiegen des Pflanzenmaterials in Vorbereitung auf die SPME/GC-Analyse stellt unter den automatisierten Bedingungen der CombIPAL-Probengeber gesteuerten SPME/GC-Methode einen minimalen manuellen Arbeitsaufwand dar. Die Wichtigkeit und Genauigkeit dieser Arbeitsschritte ist dennoch von großer Bedeutung. Eine große Oberfläche des Probenmaterials und der Aufschluss möglichst vieler ölhaltiger Zellen und Zellkompartimente sind die Grundvoraussetzung für eine nahezu vollständige und damit reproduzierbare Gewinnung der Zielanalyten. Feinere Mahlgrade führen dabei zu einer besseren Zugänglichkeit der Analyten während der SPME-Analyse, die entstehende Hitze beim Mahlprozess dagegen kann den Verlust leicht flüchtiger Verbindungen hervorrufen. So führte eine feinere Mahlung des Pflanzenmaterials auf Korngrößen unter 0,5 mm (unter zusätzlichem Einsatz einer Kühlung zur Vermeidung von Verlusten leicht flüchtiger Verbindungen während des Mahlvorgangs) zu Verbesserungen der Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens. Die relativen Standardabweichungen bezüglich der Gesamtpeakflächen wurden dabei anhand von sieben nacheinander durchgeführten Analysen von vorher 7 % (bei Korngrößen unter 3 mm, ohne Kühlung) auf 1 % (Korngröße < 0,5 mm, mit Kühlung) gesenkt. Von besonderer Bedeutung ist außerdem eine präzise Einwaage des gemahlten Probenmaterials in ein dicht zu verschließendes Probengefäß, die zur Vermeidung leicht flüchtiger Verbindungen direkt auf den Mahlprozess folgen sollte. Schließlich muss sich die Analyse der vorbereiteten Proben schnellstmöglich anschließen.

### 7.1.3 Schlussfolgerungen

Die Optimierung der HS-SPME/GC-Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung aromagebender Inhaltsstoffe von Heil- und Gewürzpflanzen führte am Beispiel von Majoran zu sehr niedrigen relativen Standardabweichungen des Gesamtverfahrens und damit zu hoher Routinesicherheit (vgl. Tab. 4).

Das optimierte Gesamtverfahren war damit für die Bestimmung der Zusammensetzung der aromagebenden Inhaltsstoffe der Gewürzpflanzen Majoran und Thymian sehr gut geeignet. Die Zielstellung, eine möglichst inhaltsstoffschonende Methode mit hohem Automatisierungsgrad sowie geringsten manuellen Zeit- und Arbeitsaufwand zu etablieren und zu opti-

### 7.1 Aufbau und Optimierung von Analysemethoden zur Bestimmung der Aromakomponenten

---

mieren, die sich weiterhin durch eine sehr gute Routinesicherheit, Robustheit und außerordentliche Reproduzierbarkeit auszeichnet, wurde damit erreicht. Damit ist die optimierte HS-SPME/GC-Methode insbesondere für das Screening auf wertgebende Inhaltsstoffe besonders großer Probenzahlen geeignet und konnte erfolgreich für die Analyse und den qualitativen und quantitativen Vergleich der aromagebenden Inhaltsstoffe mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter Pflanzenproben der Kulturen Majoran und Thymian eingesetzt werden.

## 7.2 Einflüsse der Mykorrhizierung auf Biomasse und Inhaltsstoffe

### 7.2.1 Screening verschiedener Mykorrhiza-Inokula im Gewächshaus

Etwa 85 % aller Pflanzenarten gehen mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (AMP) eine Symbiose ein [BALTRUSCHAT, 1993]. Dabei ist eine unterschiedliche Besiedlungsfähigkeit aller mykorrhizierbaren Pflanzen mit arbuskulären Mykorrhizapilzen in Abhängigkeit von Pflanzen- und Pilzspezies unumstritten. Auch für Pflanzen der Gruppe der Heil- und Gewürzpflanzen wurde eine differenzierte Mykorrhiza-Ausbildung bei verschiedenen Pflanzenspezies mehrfach beschrieben [CAMPRUBI et al., 1990; O'CONNOR et al., 2002; GORSI, 2002; KOIDE et al., 1999; MUKHIN und BETEKHTINA, 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zunächst eine Studie zur prinzipiellen Mykorrhizierbarkeit der untersuchten Pflanzenkulturen mit verschiedenen verfügbaren AM-Inokula durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Mykorrhizierbarkeit der Kulturen Thymian, Majoran und Johanniskraut im Gewächshaus ergaben insbesondere für Thymian gute Erfolge (vgl. Tab. 5). Diese Ergebnisse decken sich mit den von CAMPRUBI et al. (1990) für Thymian mit *Glomus mosseae* erhaltenen Mykorrhizierungsergebnissen. Auch GIOVANETTI et al. (2001) sowie TISSERANT et al. (1998) gelang es, Thymian mit verschiedenen *Glomus spec.* erfolgreich zu mykorrhizieren. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gewächshausversuchen entwickelte Thymian mit allen eingesetzten Mykorrhiza-Inokula eine gut ausgebildete Symbiose (vgl. Tab. 5). Besonders gute Mykorrhizierungsergebnisse wurden mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton sowie mit den Mono-Inokula *Glomus etunicatum* und *G. geosporum* erhalten.

Wie bereits von ABDUL-KHALIQ und JANARDHANAN (1997) sowie von FREITAS und seinen Mitarbeitern (2004) am Beispiel mehrerer Minzearten gezeigt, hat die Inokulation mit verschiedenen AM-Pilzen sowohl unterschiedliche Auswirkungen auf die Biomasse als auch auf die Inhaltsstoffe der Pflanzen. Auch CAMPRUBI et al. (1990) erzielten durch gezielte Mykorrhizierung Krautertragssteigerungen an Thymian. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten die verschiedenen eingesetzten Mykorrhiza-Inokula an Thymian ebenfalls zu unterschiedlichen Beeinflussungen der Biomasseerträge (vgl. Abb. 23). Signifikante Ertragssteigerungen wurden mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton erzielt. Eine Inokulation mit den aus Thailand stammenden Mischpopulationen bewirkte zumindest auch tendenziell höhere Krauterträge (*Acaulospora*:  $p < 0,10$ ; KN:  $p < 0,15$ ; D3:  $p < 0,20$ ). Diese Mischpopulationen stammen aus Feldflächen, die schon lange Zeit ökologisch bewirtschaftet werden. Eine Vermehrung dieser Mischpopulationen wäre jedoch sehr aufwendig und ökonomisch nicht effektiv. Außerdem deutete sich für das Mono-Inokulum *Glomus etunicatum* eine Ertragssteigerung in Thymian an.

Ein positiver Einfluss der Mykorrhizierung auf den Gehalt an ätherischem Öl wurde im Vergleich zur Kontrolle nur nach Inokulation mit *Glomus etunicatum* beobachtet (vgl. Abb. 24). Die Zusammensetzung der Aromakomponenten wurde durch Inokulation mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton, mit *Glomus geosporum* sowie mit der von Weizen isolierten autochthonen Mykorrhiza zugunsten des therapeutisch wirksamen Inhaltsstoffes Thymol beeinflusst (vgl. Abb. 25). Mit dem auf den Gesamtgehalt an Aromakomponenten wirksamen *Glomus etunicatum*-Mono-Inokulum wurden die thymiantypischen Inhaltsstoffe Thymol und p-Cymen dagegen negativ beeinflusst, währenddessen der Gehalt an  $\gamma$ -Terpinen erhöht wurde. Auch wenn statistisch gesicherte Aussagen aufgrund der geringen Menge an Untersuchungsmaterial nicht möglich waren, wurde mit den Gewächshausversuchen doch die Tendenz für einen speziesabhängigen Einfluss verschiedener Mykorrhiza-Inokula auf die Inhaltsstoffzusammensetzung von Thymian deutlich gemacht.

Für Majoran waren bisher keine Untersuchungen zur Mykorrhizierbarkeit bekannt. Bei den hier durchgeführten Versuchen zeigte Majoran im Vergleich zu Thymian eine geringere Nei-

gung zur Mykorrhizierung. Zwar wurden bei allen eingesetzten Pilzkulturen Mykorrhiza-Strukturen detektiert, jedoch wurde eine gute Mykorrhizierung nur mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton sowie mit *Glomus geosporum* erzielt (vgl. Tab. 5).

Trotz der gering ausgeprägten Mykorrhizierung wurden auch für Majoran tendenzielle Ertragssteigerungen insbesondere bei Inokulation mit einzelnen thailändischen Mischpopulationen beobachtet (KN:  $p < 0,15$ ; D3:  $p < 0,10$ ; vgl. Abb. 26). Tendenziell erhöhte Krauterträge erzielten auch Inokulationen mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton bzw. *Glomus geosporum* ( $p < 0,20$ ).

Der ätherische Ölgehalt wurde bei Majoran nur nach Inokulation mit *Acaulospora spec.* beeinflusst (vgl. Abb. 27). Die majorantypische Aromakomponente Sabinenhydratacetat war insbesondere nach Inokulation mit *Glomus etunicatum*, *Scutellospora spec.*, *Acaulospora spec.* und D3 (Thailand) sowie mit der von Weizen isolierten autochthonen Mykorrhiza erhöht (vgl. Abb. 28). Grundsätzlich lässt sich schlussfolgern, dass auch bei Majoran verschiedene Mykorrhizapilze unterschiedliche Wirkungen auf die Menge wertgebender Inhaltsstoffe (vgl. Abb. 27) sowie die Inhaltsstoffzusammensetzung (vgl. Abb. 28) haben.

Johanniskraut wies bei vergleichenden Untersuchungen zum Mykorrhizierungsstatus von 76 Heilpflanzen eine mittlere Mykorrhizierung auf [GORSI, 2002]. MOORA und ZOBEL (1998) beschreiben für Johanniskraut sogar hohe Mykorrhizierungsraten (90 %). In den hier durchgeführten Experimenten zeigte das Johanniskraut mit den meisten Mykorrhiza-Inokula nur eine schwach ausgeprägte Mykorrhizierung (vgl. Tab. 5). Die besten Mykorrhizierungsergebnisse wurden nach Inokulation mit *Glomus geosporum* erhalten und auch das kommerzielle AMykor<sup>®</sup>-Blähton-Inokulum führte wieder zu einer guten Mykorrhizierung.

Nach Inokulation mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton und AMykor<sup>®</sup>-Perlit deuteten sich für Johanniskraut erhöhte Biomasseerträge an (vgl. Abb. 29). Tendenziell gesteigerte Krauterträge wurden wiederum bei Einsatz der thailändischen Mykorrhiza-Mischungen ermittelt (*Acaulospora spec.*:  $p < 0,05$ ; D3:  $p < 0,10$ ).

Die wertgebenden Inhaltsstoffe des Johanniskrautes, Hypericin und Pseudohypericin, wurden nach Inokulation mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton und AMykor<sup>®</sup>-Perlit am deutlichsten gesteigert (vgl. Abb. 30). Dagegen wurde von anderen Mykorrhiza-Inokula die Hypericinproduktion in Johanniskraut eher unterdrückt. Somit wurde insgesamt für Johanniskraut ein Einfluss der Mykorrhizierung auf die Hypericingehalte in Abhängigkeit vom eingesetzten Mykorrhiza-Inokulum aufgezeigt.

In der Literatur werden die Präferenz von Pflanzen für bestimmte Mykorrhizapilze [ABDULKHALIQ und JANARDHANAN, 1994; GUPTA et al., 2000] sowie unterschiedliche Effekte auf Ertrag und Inhaltsstoffe in Abhängigkeit vom eingesetzten Mykorrhiza-Inokulum [ABDULKHALIQ und JANARDHANAN, 1997; COPETTA et al., 2006; FREITAS et al., 2004; SREERAMULU und BAGYARAJ, 1986] beschrieben. Mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen der Gewächshausversuche zur Eignung verschiedener Mykorrhiza-Inokula zur Mykorrhizierung der drei untersuchten Kulturen wurden diese Berichte bestätigt. Das kommerzielle Mykorrhizapilz-Inokulum AMykor<sup>®</sup>-Blähton führte jedoch in den Gewächshausversuchen bei allen Kulturen zu einer erfolgreichen Mykorrhizierung und brachte auch bei allen Kulturen vergleichsweise gute bis sehr gute Ergebnisse bezüglich Ertragssteigerungen und Inhaltsstoffsynthese. Eine langwierige Prozedur zur Isolierung, Vermehrung und Produktion sehr spezieller Mykorrhizapilz-Stämme für jede Pflanzenart erschien somit nicht notwendig. Aufgrund der hohen Kosten für die Entwicklung solcher Spezialprodukte wäre eine Produktion für die kleinen relevanten Anbauflächen im Heil- und Gewürzpflanzensektor wirtschaftlich auch nicht vertretbar.

Der bereits kommerziell erwerbliche AMykor<sup>®</sup>-Blähton dagegen erwies sich in den Gewächshausversuchen als universell einsetzbar und lässt sich vergleichsweise kostengünstig produzieren. Sein Einsatz im landwirtschaftlichen Anbau dieser Kulturen sollte in den Feldversuchen mit diesem Inokulum geprüft werden.

### 7.2.2 Prüfung geeigneter Mykorrhiza-Inokula in Feldversuchen

Zur Mykorrhizierung von Heil- und Gewürzpflanzen wurde bisher grundsätzlich nur wenig publiziert. Bei den veröffentlichten Untersuchungen handelt es sich häufig auch nur um im Gewächshaus und in Topfkulturen durchgeführte Experimente [ABDUL-KHALIQ und JANARDHANAN, 1997; CAMPRUBI et al., 1990 und 1992; COPETTA et al., 2006; FREITAS et al., 2004; KAPOOR et al., 2002b; KHAOSAAD et al., 2006; KOIDE et al., 1999; MOORA und ZOBEL, 1998]. Feldversuche zum Einfluss einer Mykorrhizierung von Heil- und Gewürzpflanzen auf Erträge oder Inhaltsstoffe wurden nur selten durchgeführt. Von den Autoren BAGYARAJ und SREERAMULU wurden 1982 und 1986 im Feldversuch mit Chili Ertragssteigerungen durch Mykorrhizierung erzielt. GUPTA und seine Mitarbeiter (2002) haben durch Inokulation mit *Glomus fasciculatum* im Feldversuch die Erträge und auch die ätherischen Ölausbeuten von Minze erhöht. Auch bei Dill, Ajowan und Fenchel führte die Inokulation mit *Glomus fasciculatum* sowie *G. macrocarpum* im Feldversuch zu besserem Pflanzenwachstum und zu deutlich gesteigerten ätherischen Ölgehalten [KAPOOR et al., 2002a und 2004]. Gleichzeitig wurde die Zusammensetzung der ätherischen Ölkomponenten durch die Mykorrhizierung beeinflusst. Für Thymian, Majoran und Johanniskraut sind bisher keine Ergebnisse über Feldversuche mit Mykorrhiza-Einsatz bekannt geworden.

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden insbesondere an Thymian deutliche Effekte auf die Biomasse und die wertgebenden Inhaltsstoffe durch die Mykorrhizierung erzielt. Bei der Versuchsdurchführung im Jahr 2003 ließen sich die frischen Krauterträge durch Ausbringen des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons im ökologischen Anbau um 26 % steigern, im konventionellen Anbau immer noch um 9 %. Weitere Ertragssteigerungen waren bei den Folgeernten im gleichen und im nächsten Standjahr zu verzeichnen. Über beide Standjahre ergaben sich für den 2003 ausgesäten Thymian schließlich 11 % unter ökologischen Anbaubedingungen und sogar 15 % unter konventionellen Bedingungen (vgl. Abb. 31).

Im Aussaatjahr 2004 deuteten sich nach der Mykorrhiza-Behandlung nur auf den konventionellen Flächen erhöhte Krauterträge an (vgl. Abb. 33). Auch 2005 waren durch die Mykorrhizierung keine signifikanten Einflüsse auf die Biomasse zu verzeichnen (vgl. Abb. 35).

Die ätherischen Ölgehalte wurden teilweise durch die Mykorrhizierung beeinflusst. Im Anbaujahr 2003 waren die ätherischen Ölgehalte nur im ökologischen Anbau bei mykorrhiziertem Thymian erhöht (vgl. Abb. 32). Im Anbaujahr 2004 fanden sich dagegen nach Mykorrhizierung nur auf den konventionell bewirtschafteten Flächen Thymianpflanzen mit höheren Gehalten an ätherischem Öl (vgl. Abb. 34). Die ätherischen Ölgehalte für die Feldversuche 2005 zeigten dagegen keine signifikanten Einflüsse einer Mykorrhizierung (vgl. Abb. 36). Insgesamt waren die ätherischen Ölgehalte bei moderater Mykorrhizierung (niedriger Blähtoneinsatz) meist positiv beeinflusst worden, wohingegen erhöhte Mengen an Inokulum keine oder sogar negative Effekte auf den ätherischen Ölgehalt hatten (vgl. Tab. 6). Eine gezielte Mykorrhizierung mit AMP erhöht somit den Gehalt an wertgebenden Inhaltsstoffen in Thymian. Dadurch wird die Qualität des Pflanzenmaterials sowohl für den Einsatz als Gewürz als auch für den Einsatz als Phytopharmaka gesteigert.

Außerdem war ein Zusammenhang der Mykorrhizierung und der Zusammensetzung der Aromakomponenten bei fast allen Versuchen festzustellen. Nach Inokulation der Versuchsfelder wurden häufig erhöhte Gehalte der für das Thymianaroma typischen Inhaltsstoffe p-Cymen und Thymol in den Thymianpflanzen und dagegen niedrigere Gehalte an  $\gamma$ -Terpinen detektiert (vgl. Tab. 6). Dies führt zu einer zusätzlichen qualitativen Aufwertung der Pflanzen für die Lebensmittelindustrie sowie auch für die Pharmazie.

Deutlich geringere Unterschiede der Mykorrhizierungsgrade von Kontrollflächen und mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton behandelten Flächen (vgl. Anlage 4) waren mit Sicherheit ein Grund für die in den Versuchsjahren 2004 und 2005 weniger auffälligen Effekte des Mykorrhiza-Einsatzes auf die Biomasseerträge sowie Inhaltsstoffgehalte und -zusammensetzungen der Thymianpflanzen. Die Mykorrhizierung von Kontrollflächen wurde auch durch den Einsatz von Raps als Vorkultur nicht vollständig unterdrückt. Zwar waren danach zu Beginn der Vegetationspe-

riode des Thymians zunächst kaum Mykorrhiza-Strukturen an den Wurzeln zu finden, doch hatte sich die Symbiose bis zum Erntezeitpunkt schnell wieder etabliert und erschwerte damit die gezielte Gegenüberstellung von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Flächen.

Eine weitere Erklärung der deutlich geringeren Einflüsse der gezielten Mykorrhiza-Behandlung im Thymiananbau 2004 und 2005 wird in den günstigen Witterungsbedingungen in diesen Anbaujahren gesehen (vgl. Anlage 3).

Grundsätzlich wurde ein Einfluss der Mykorrhizierung auf die Krauterträge sowie die Gesamtgehalte und die Zusammensetzung der Aromakomponenten in Thymian festgestellt. Durch eine Mykorrhizierung wurden damit sowohl positive Effekte auf die quantitativen Ernteerträge als auch auf qualitative Eigenschaften erreicht. Dabei wurde nicht nur der Gesamtgehalt an wertgebenden Inhaltsstoffen, den ätherischen Ölen, gesteigert, sondern außerdem die Zusammensetzung der Aromasubstanzen verbessert. Gesteigerte Thymolgehalte führen zu einer qualitativen Aufwertung mykorrhizierter Thymianpflanzen für den Einsatz als Phytopharmaka. Die verstärkte Bildung von Thymol und p-Cymen erhöht die Qualität des Thymians für seine Verwendung als Gewürz.

Die Feldversuche mit Majoran waren von deutlich weniger auffälligen Effekten des Mykorrhiza-Einsatzes geprägt. Eine Tendenz zu gesteigerten Krauterträgen wurde nur im konventionellen Feldversuch des Anbaujahres 2002 beobachtet ( $p < 0,15$ , vgl. Abb. 37).

Die ätherischen Ölgehalte wurden zwar unter konventionellen Anbaubedingungen in beiden Versuchsjahren zumindest tendenziell gesteigert ( $p < 0,15$ ), doch war unter ökologischen Bedingungen eher der gegenteilige Effekt zu beobachten (vgl. Tab. 7).

Obwohl die Mykorrhizierung mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton in allen Feldversuchen erfolgreich verlaufen war (vgl. Anlage 4), ließ sich innerhalb der Untersuchungen kein signifikanter Einfluss der Mykorrhizierung auf die Krauterträge und das ätherische Öl in Majoran feststellen (vgl. Tab. 7). Für Majoran wurde damit infolge der Mykorrhizierung weder eine quantitative Ertragssteigerung noch eine qualitative Verbesserung durch erhöhte Gehalte an ätherischem Öl bzw. verbesserte Inhaltsstoffzusammensetzung ermittelt.

Für Johanniskraut wurde im Gewächshausversuch eine ertragsteigernde Tendenz der Mykorrhiza-Behandlung beobachtet. Dies ließ sich in den durchgeführten Feldversuchen allerdings nicht bestätigen (vgl. Abb. 39, Abb. 41).

Dagegen waren deutliche Einflüsse der AMykor<sup>®</sup>-Inokulation auf die wertgebenden Inhaltsstoffe Hypericin und Pseudohypericin zu beobachten. In beiden konventionell durchgeführten Feldversuchen wurden die Gehalte der Pflanzen an Hypericin und Pseudohypericin signifikant gesteigert (vgl. Abb. 40, Abb. 42).

Im ökologischen Anbau im ersten Versuchsjahr (2002) waren die Hypericingehalte bereits in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen sehr hoch. Die Wurzeluntersuchungen auf Mykorrhiza-Strukturen zeigten in diesem Jahr für den ökologischen Versuch außerdem keine Unterschiede zwischen mit Blähton behandelten Flächen und Kontrollflächen (vgl. Anlage 4). Da ökologische Flächen häufig schon gut ausgebildete autochthone Mykorrhiza-Strukturen aufweisen, ist der Nachweis weiterer Effekte durch die zusätzliche Inokulation mit einem weiteren Inokulum natürlich schwierig. Tatsächlich konnte auf den mit AMykor<sup>®</sup>-Blähton mykorrhizierten Flächen keine Verbesserung der Mykorrhizierung von Johanniskrautwurzeln im Vergleich zu den Kontrollflächen erzielt werden. Demzufolge wurden auch keine Steigerungen der Gehalte an Hypericinverbindungen auf den inokulierten Flächen detektiert (vgl. Abb. 40). Die ökologischen Flächen des Versuchsjahres 2003 waren aufgrund großer Bestandslücken und deutlicher Ernteverluste nicht auswertbar, so dass zum Einfluss der Mykorrhizierung unter ökologischen Bedingungen keine Aussagen getroffen werden können.

Johanniskraut zählt, wie in den Gewächshausversuchen mit unterschiedlichen Mykorrhiza-Inokula gezeigt wurde (siehe Kap. 6.2.1), zu den weniger gut mykorrhizierbaren Kulturen. Die Ausbringung des AMykor<sup>®</sup>-Inokulums auf den Versuchsflächen führte auch zu keinen signifikanten Ertragssteigerungen. Dennoch wurde ein deutlicher Einfluss der Mykorrhiza-Behandlung auf die Entwicklung der wertgebenden Inhaltsstoffe der Pflanze zumindest unter

konventionellen Anbaubedingungen festgestellt (vgl. Tab. 8). Diese Erhöhung der Hypericin-gehalte führt zu einer deutlichen Steigerung der Qualität des Pflanzenmaterials und ist damit für den Einsatz des Johanniskrauts als Phytopharmaka von großer Bedeutung.

Obwohl die Anwesenheit von Mykorrhizapilzen auch auf nährstoffreichen Böden schon von BALTRUSCHAT (1993) gezeigt werden konnte, wird in der Literatur weiterhin beschrieben, dass eine Mykorrhizierung auf Böden mit ausreichender Phosphatversorgung keine positiven Einflüsse auf das Pflanzenwachstum hat. So ermittelten auch FREITAS et al. (2004) im Gewächshausversuch mit Minze bei erhöhter Phosphatdüngung keine Effekte mehr auf die Gehalte und die Zusammensetzung des ätherischen Öls. Die Autoren BAGYARAJ und SREERAMULU fanden bei Feldversuchen 1982 und 1986 dagegen auch mit Phosphatdüngung zusätzliche ertragsteigernde Effekte durch Mykorrhizierung bei Chilipflanzen. Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren bei moderater Phosphatzufuhr unter konventionellen Anbaubedingungen vergleichbare Wirkungen einer Mykorrhizierung auf Ertrag und Inhaltsstoffe ermittelt worden wie im ökologischen Anbau.

Die Witterungsbedingungen der Versuchsjahre 2002, 2004 und 2005 beschafften den Pflanzen mit moderaten Temperaturen und vergleichsweise hohen Niederschlagsmengen optimale Wachstumsbedingungen (vgl. Anlage 3). Das Versuchsjahr 2003 stellte dagegen recht hohe Anforderungen an die Toleranz der Pflanzen. Insbesondere am Beispiel von Thymian wurden in diesem Jahr die deutlichsten Effekte der Mykorrhizierung auf den Krautertrag, die ätherischen Ölgehalte und auch die Aromakomponenten-Zusammensetzung beobachtet (vgl. Tab. 6). Das lässt vermuten, dass Ertragssteigerungen und Inhaltsstoffsynthese nicht allein durch die wachstumsfördernden Effekte der Mykorrhiza-Symbiose beeinflusst werden, sondern v.a. durch eine Steigerung der Toleranz gegenüber wirkenden Stressfaktoren. Diese Vermutung deckt sich mit der von MOORA und ZOBEL (1998) aufgestellten Hypothese. Auch die positive Beeinflussung der Toleranz von Pflanzen gegenüber Trockenstress durch Mykorrhizapilze ist bereits bekannt [FELDMANN, 1998; STRACK et al., 2001].

Insgesamt wurden bei allen durchgeführten Untersuchungen an den drei Pflanzenarten nur teilweise Ertragssteigerungen oder quantitative bzw. qualitative Beeinflussungen wertgebender Inhaltsstoffe nach Einsatz des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons beobachtet.

Auch andere Autoren mussten feststellen, dass die Mykorrhizierung nicht in jedem Fall zu positiven Wachstumseffekten führt [O'CONNOR et al., 2002; WANG et al., 1997]. Aus einer eingehenden Untersuchung von 93 Kräutern zogen MUKHIN und BETEKHTINA (2006) den Schluss, dass es keinerlei grundsätzlich signifikanten Zusammenhänge zwischen Mykorrhizierungsgrad und Pflanzenentwicklung gibt. Aufgrund der Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen muss diese Aussage aber differenziert diskutiert werden.

So hat eine Mykorrhizierung zwar nicht in jedem Falle Einfluss auf die Pflanzenentwicklung, sie kann aber trotzdem andere positive Wirkungen auf die Pflanze haben. Johanniskraut bildete in den Gewächshausversuchen nur eine moderate Mykorrhiza-Symbiose aus und zeigte auch in den Feldversuchen nur geringe Unterschiede im Mykorrhizierungsgrad zwischen inokulierten Flächen und Kontrollflächen. Trotzdem wurden zumindest die Hypericin-gehalte durch die Anwendung des AMykor<sup>®</sup>-Blähtons deutlich gesteigert. Ein Einfluss der Mykorrhizierung auf den Krautertrag war bei Johanniskraut dagegen nicht zu verzeichnen. Dies bestätigt die von FELDMANN (1998) vertretene Meinung, dass die Mykorrhiza-Symbiose sehr unterschiedliche Effekte auf die jeweilige Wirtspflanze besitzt und nicht jeder Effekt in jedem Pflanze-Pilz-System wieder zu finden ist.

Majoran zeigte sich in den Gewächshausversuchen mit verschiedenen AM-Inokula zwar allgemein nur geringfügig mykorrhizierbar, mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton wurden jedoch sowohl im Gewächshausversuch als auch in den durchgeführten Feldversuchen gute Mykorrhizierungen erreicht. Dennoch hatte die Mykorrhizierung an dieser Kultur keinen wesentlichen Einfluss auf Biomasseerträge und Aromastoffsynthese. Positive Effekte der Mykorrhizierung auf

andere, hier nicht untersuchte Parameter, wie z.B. eine gesteigerte Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren, sind aber trotzdem nicht auszuschließen.

Außerdem sind die Mykorrhiza-Wirkungen offensichtlich auch von einer Vielzahl von äußeren Einflüssen abhängig. So reagierte Thymian am deutlichsten auf die Mykorrhizierung, was sowohl anhand von Ertragssteigerungen als auch anhand von Änderungen der Aromastoffgehalte und –zusammensetzungen messbar war. Aufgrund der besonders ausgeprägten Effekte im trockenen und heißen Anbaujahr 2003 ließ sich hier ebenfalls eine Abhängigkeit der Wirksamkeit der Mykorrhizierung von Witterungseinflüssen feststellen.

### 7.2.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend wurde mit dieser Arbeit auch anhand der hier untersuchten Heil- und Gewürzpflanzenkulturen Thymian, Majoran und Johanniskraut gezeigt, dass die Wirksamkeit der Mykorrhiza-Symbiose zu einem Großteil von der Präferenz einer Wirtspflanze für bestimmte AM-Inokula abhängig ist.

Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten wurden im Gewächshaus- und Feldversuch insbesondere für Thymian positive Effekte auf den Ertrag an verwertbarem Pflanzenmaterial ermittelt. Zusätzlich führte die Mykorrhizierung von Thymian im Gewächshaus- und im Feldversuch zu erhöhten Gehalten an ätherischem Öl und damit zu einer qualitativen Aufwertung für Lebensmittelindustrie und Pharmazie. Eine weitere Qualitätssteigerung wurde durch die infolge der Mykorrhizierung erzielte Verbesserung der Zusammensetzung dieser wertgebenden Inhaltsstoffe erreicht.

Auch bei Johanniskraut wurde eine steigernde Wirkung der Mykorrhizierung auf die Hypericingehalte und damit auf die Qualität des Pflanzenmaterials zum Einsatz als Phytopharmaka festgestellt.

Anhand der über mehrere Versuchsjahre durchgeführten Untersuchungen wurde auch für die hier untersuchten Pflanzen bestätigt, dass die Wirksamkeit der arbuskulären Mykorrhiza insbesondere auch von einer Vielzahl von Umweltbedingungen abhängig ist. Besonders deutliche Effekte der Mykorrhizierung sind damit v.a. unter Stressbedingungen zu erzielen.

### 7.3 Einflüsse der Mykorrhizierung auf das Antioxidative System von Johanniskraut bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides*

Trotz des massiven Einsatzes von chemischen Pflanzenschutzmaßnahmen betragen die relativen Ernteverluste für die meisten Kulturpflanzen noch heute etwa ein Drittel der gesamten Welternte [OERKE, 1994]. Für viele Sonderkulturen, wie auch für Heil- und Gewürzpflanzen, ist die Auswahl zugelassener Pflanzenschutzmittel zudem stark eingeschränkt. Für die Vermeidung von Schäden und Ausfällen durch Pflanzenkrankheiten stehen damit im Wesentlichen nur vorbeugende Maßnahmen zur Verfügung. Solche Maßnahmen umschließen z.B. die Bereitstellung gesunden Saat- und Pflanzengutes, die strikte Einhaltung hygienischer Maßnahmen und eine optimale stressfreie Kulturführung. [BOMME, 1998; FRANKE und DEHE, 2003; KROTH und LIERSCH, 2002b; LLG, 2004]

Im Heilpflanzenbau ist der Anbau von Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) pharmakologisch von besonderem Interesse. Allerdings ist das Auftreten der Johanniskrautwelke durch den Pilz *Colletotrichum cf. gloeosporioides* in den letzten Jahren ein ernstzunehmendes Problem geworden, zumal chemische Bekämpfungsmaßnahmen dieses Erregers nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung stehen. [GÄRBER, 2003; SCHOLZE et al., 2001]

Vor dem Hintergrund, dass arbuskuläre Mykorrhizapilze die Toleranz einiger Kulturpflanzen gegenüber verschiedenen Welkeerregern, wie *Fusarium spec.* [DEENE et al., 2004; DUGASSA et al., 1996], *Verticillium spec.* [GARMENDIA et al., 2004a und b] und anderen Arten [AZCÓN-AGUILAR und BAREA, 1996; AZCÓN-AGUILAR et al., 2002; HARRIER und WATSON, 2004; WHIPPS, 2004], erhöhen können, erschien der Aspekt, die durch *Colletotrichum cf. gloeosporioides* verursachte Johanniskrautwelke durch gezielte Mykorrhizierung zu vermindern, als besonders interessant.

Das antioxidative System der Pflanzen stand zuletzt häufig im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen. Insbesondere den Reaktionen von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Enzymen und Antioxidantien des antioxidativen Systems auf Pathogen- oder Elicitor-Induktionen wurde dabei besonderes Interesse gewidmet. KUZNIAK et al. (1999) wiesen beispielsweise an Tomatenblättern eine vermehrte Bildung von Superoxid ( $O_2^{\bullet -}$ )-Radikalen und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) nach Behandlung mit Fusarinsäure, einem unspezifischen Fusariumtoxin, nach. Gleichfalls führte die Fusarinsäure-Behandlung zunächst zu einem Aktivitätsrückgang der  $H_2O_2$ -abbauenden Enzyme Katalase (CAT) und Ascorbat-Peroxidase (APX), deren Aktivitäten sich nach 2 und 3 Tagen aber allmählich wieder auf den ursprünglichen Kontrollwert einpegelten. Die Aktivität der zellwandgebundenen Peroxidasen (POX), die an der Vernetzung der Zellwandproteine beteiligt sind, stieg zusammen mit  $O_2^{\bullet -}$  und  $H_2O_2$  schnell und anhaltend an. Damit wurde die Beteiligung von ROS und ihrer detoxifizierenden Enzyme am Blatt belegt.

PATYKOWSKY und URBANEK (2003) infizierten zwei Tomatenkulturen unterschiedlicher Anfälligkeit mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* und führten die erhöhte Toleranz auf eine frühere und schnellere Umwandlung ROS zu  $H_2O_2$  durch erhöhte Aktivitäten von SOD und NADH-Peroxidase zurück. Auch WU und von TIEDEMANN (2002) stellten bei resistenten Gerstesorten ein höheres antioxidatives Potential in Form von erhöhten SOD- und CAT-Aktivitäten, bei gleichzeitig verringertem Auftreten von  $O_2^{\bullet -}$ -Radikalen und Lipidperoxidationen fest.

In jüngster Zeit befasste sich die Phytopathologie auch mit dem Einfluss der Mykorrhizasymbiose auf die Toleranz von Pflanzen gegenüber abiotischen und biotischen Stressoren. In Tomaten wurden so nach Infektion mit dem Welkeparasiten *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* erhöhte  $O_2^{\bullet -}$ -Produktion, membranschädigende Lipidperoxidation sowie niedrige

re Enzymaktivitäten des ROS-detoxifizierenden Ascorbat-Glutathion-Zyklus beobachtet. Bei Anwesenheit symbiotischer Wurzelendophyten konnten die Auswirkungen von oxidativem Stress nach *Fusarium*-Befall deutlich vermindert werden. [BALTRUSCHAT, 2006]

Auch in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen anhand des Pathosystems Johanniskraut – *Colletotrichum cf. gloeosporioides* wurden im Gewächshausversuch infolge einer Mykorrhizierung zunächst phänotypisch positive Effekte auf die Toleranz der Pflanzen gegenüber dem Welkeerregere beobachtet (vgl. Abb. 43). Außerdem wurde bei zwei Johanniskrautsorten unterschiedlicher Toleranzstufen das Krautgewicht durch vorherige Mykorrhizierung mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton sowohl bei gesunden als auch bei befallenen Pflanzen signifikant gesteigert (vgl. Abb. 44). Diese äußerlich sichtbaren Merkmale einer gesteigerten Toleranz gegenüber *Colletotrichum cf. gloeosporioides* wurden durch die Messung von Enzymen und Antioxidantien des antioxidativen Systems der Pflanzen analytisch untermauert.

### 7.3.1 Katalase

Wie in Kap. 3.4.2 bereits erläutert, baut die CAT zuvor durch die SOD aus  $O_2^{\bullet -}$  generiertes  $H_2O_2$  direkt zu molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasser ( $H_2O$ ) ab und beugt so einer schädigenden Wirkung des  $H_2O_2$  bei übermäßiger Produktion infolge von Stresssituationen vor (vgl. Abb. 7) [ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000].

WU und von TIEDEMANN (2002) zeigten bei anfälligen Gerstelinien nur leicht verringerte Aktivitäten der CAT gegenüber toleranten Gerstelinien. Auch PATYKOWSKI und URBANEK (2003) stellten nach Infektion zweier Tomatenkulturen mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* nur leichte Aktivitätssteigerungen der CAT jeweils 48 und 72 Stunden nach der Inokulation fest und schlussfolgerten daraus zwar eine vorhandene aber nicht entscheidende Beteiligung dieses Enzyms am Abbau von  $H_2O_2$  nach Pathogenbefall. Auch die in den hier an zwei Johanniskrautsorten ermittelten Enzymaktivitäten der CAT waren nur in geringem Ausmaß von dem Welkeerregere *Colletotrichum cf. gloeosporioides* beeinflusst worden (vgl. Abb. 45). Infolge der Krankheit verstärkt auftretendes  $H_2O_2$  in der Zelle wird offensichtlich auch im Falle des Pathosystems *Hypericum perforatum* – *Colletotrichum cf. gloeosporioides* nicht vorrangig über die CAT entgiftet. Jedoch war bei hoher Erregerkonzentration nach 30 Tagen ein deutlicher Aktivitätsverlust der CAT zu beobachten. Bei vorheriger Inokulation der Pflanzen mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton kam es 20 bzw. 30 Tage nach der Pathogenbeimpfung dagegen zu gesteigerten Enzymaktivitäten, insbesondere bei hoher Erregerkonzentration, wodurch ein verstärkter Abbau von  $H_2O_2$  gegeben war (vgl. Abb. 45). Dies deckt sich mit den von GARMENDIA et al. (2004a) publizierten Ergebnissen zur *Verticillium dahliae*-Infektion an Pfeffer, bei denen besser abgestimmte SOD-, CAT- und POX-Aktivitäten in Blättern mykorrhizierter Pflanzen beobachtet wurden und dabei deren Photosyntheseraten länger aufrecht gehalten werden konnten als die von nicht mykorrhizierten Pflanzen. Auch am Beispiel von Tabakpflanzen wurde gezeigt, dass die Inokulation mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* die Enzymaktivitäten der am Abbau ROS beteiligten Enzyme, wie CAT oder APX, steigert, womit eine verstärkte Toleranz gegenüber Pathogenen induziert werden dürfte [BLILOU et al., 2000].

Eine vorrangige Rolle in der Abwehrreaktion der Johanniskrautpflanzen auf den Welkeerregere scheint die CAT-Aktivität aber grundsätzlich nicht zu spielen.

### 7.3.2 Ascorbat-Zyklus

Alternativ zur CAT wird verstärkt aus reaktivem  $O_2^{\bullet -}$  gebildetes  $H_2O_2$  von der Pflanzenzelle bekanntlich in erster Linie über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus detoxifiziert (vgl. Kap. 3.4.2 und Abb. 7).  $H_2O_2$  wird hier durch Oxidation von Ascorbinsäure mit Hilfe der APX zu  $H_2O$  reduziert. Das dabei oxidierte Ascorbat wird anschließend mit Hilfe von NADPH von der Monodehydroascorbat-Reduktase (MDHAR) wieder zur reduzierten Form umgewandelt. [ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000]

Insbesondere der Ascorbat-Kreislauf zeigte sich in Johanniskraut deutlich vom Befall mit dem Welkeerreger beeinflusst. So wurden die Aktivitäten der APX (vgl. Abb. 46) sowie der MDHAR (vgl. Abb. 47) nach Pathogen-Inokulation deutlich gesenkt.

Eine pathogeninduzierte Senkung der APX-Aktivität wurde auch von VANACKER et al. (1998) an Weizenblättern beobachtet. Nach Fusarinsäure-Applikation von Tomatenblättern beobachteten KUZNIAC et al. (1999) ebenfalls einen Aktivitätsabfall der APX.

Von dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Aktivitätsrückgang der Enzyme des Ascorbat-Zyklus war gleichermaßen das beteiligte Antioxidanz Ascorbinsäure betroffen (vgl. Abb. 50). Die Konzentration an reduziertem Ascorbat (AsA) sank im Verlauf der Abwehrreaktion der Johanniskrautpflanzen stetig ab und das Redoxgleichgewicht zeigte sich nach 30 Tagen deutlich zugunsten des oxidierten Ascorbats (DAsA) verschoben. Vergleichbare Ergebnisse erhielt KUZNIAC (2001) bei seinen Untersuchungen zum Einfluss der Fusarinsäure auf Tomatenzellkulturen. KNÖRZER et al. (1996) zeigten auch nach Stressinduktion in Soja-zellkulturen durch Herbizidbehandlung die Verlagerung des Redoxgleichgewichtes zugunsten DAsA. Nach *Blumeria graminis*-Inokulation von Gersteszellkulturen fanden VANACKER et al. (1998) eine deutliche Abnahme des Gesamt-Ascorbats.

Auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ließen sich in den Kontrollpflanzen für das Pathosystem *Hypericum perforatum* – *Colletotrichum cf. gloeosporioides* negative Effekte auf die Aktivitäten der Enzyme APX (vgl. Abb. 46) und MDHAR (vgl. Abb. 47) sowie das Redoxverhältnis von AsA zu DAsA (vgl. Abb. 50) feststellen. Diese reduzierten Enzymaktivitäten und die Verschiebung des Redoxverhältnisses konnten aber durch vorherige Inokulation mit dem AMykor<sup>®</sup>-Blähton eingedämmt bzw. sogar vermieden werden. So wurden die APX- (vgl. Abb. 46) und die MDHAR-Aktivität (vgl. Abb. 47) sowie das Redoxverhältnis der Ascorbinsäure (vgl. Abb. 50) in zuvor mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen deutlich stabilisiert, während der Ascorbat-Zyklus in nicht mykorrhizierten Pflanzen zumindest bei hoher Erregerkonzentration nach 30 Tagen nahezu vollständig zum Erliegen kam.

Auch bei durch Methylviologen induziertem photooxidativem Stress [MURGIA et al., 2004] spielt die APX-Aktivität eine bedeutende Rolle. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit überexprimierter APX-Aktivität waren weniger anfällig gegenüber oxidativem Stress. YABUTA et al. (2002) wiesen an Tabakpflanzen mit transgener APX-Überexpression ebenfalls erhöhte Toleranzen gegenüber photooxidativem Stress nach Methylviologenbehandlung nach. Durch Mykorrhizierung erzielte Aktivitätssteigerungen der APX sind somit wahrscheinlich auch eine Erklärung für die häufig für mykorrhizierte Pflanzen beschriebene Verbesserung der allgemeinen Stresstoleranz.

Offensichtlich spielt der Ascorbat-Zyklus eine entscheidende Rolle in der Abwehr der Johanniskrautpflanzen gegenüber dem Erreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides*. Bei Erregerbefall wird der Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und damit von ROS über den Ascorbat-Weg zunächst beeinträchtigt und schließlich völlig eingestellt. Die vorherige Mykorrhizierung der Pflanzen ermöglicht den weiteren Abbau von ROS durch die Aufrechterhaltung des Enzymsystems und verbessert damit deutlich den Gesundheitszustand der Johanniskrautpflanzen.

### 7.3.3 Glutathion-Zyklus

Wie in Kap. 3.4.2 bereits erläutert, katalysiert auch die Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR) die Reduktion oxidiertes Ascorbinsäure nach ihrer spontanen Umwandlung in Dehydroascorbat (vgl. Abb. 7). Da dabei gleichzeitig Glutathion oxidiert wird, greift hier der Ascorbat-Kreislauf in den Glutathion-Kreislauf über [ARORA et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000]. Der DHAR scheint aufgrund deutlich schwankender Ergebnisse bei den durchgeführten Parallelversuchen keine herausragende Bedeutung in der Entgiftung von ROS bei der Krankheitsabwehr der Johanniskrautpflanzen zuzukommen.

Auch die Entgiftung anderer ROS, wie Hydroxyl- und Perhydroxy-Radikale sowie singularen Sauerstoffs, über die Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) spielt wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle. Zwar war auch in diesem Redoxsystem eine Verschiebung zu-

gunsten des oxidierten Glutathions (GSSG) zu erkennen (vgl. Abb. 51), wenn auch nicht in dem für den Ascorbat-Kreislauf (vgl. Abb. 50) beschriebenen Ausmaß. Das entspricht der von KNÖRZER et al. (1996) nach Herbizidbehandlung in Sojazzellkulturen ebenfalls festgestellten Verlagerung des Redoxgleichgewichtes zugunsten GSSG. In mykorrhizierten Pflanzen pegelte sich aber auch das Verhältnis an GSH zu GSSG auf einem höheren Niveau ein als in nicht mykorrhizierten Pflanzen (vgl. Abb. 51).

Auch auf die Enzyme des Glutathion-Kreislaufs wurden in den durchgeführten Versuchen in Abhängigkeit von Pathogenbefall und Mykorrhizierung deutliche Einflüsse ermittelt. Die zur Regeneration von GSSG nötige Glutathion-Reduktase (GR) zeigt nach Pathogenbefall verringerte Aktivitäten in nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen (vgl. Abb. 48). Im Gegensatz zu der von KNÖRZER et al. (1996) ermittelten Aktivitätssteigerung dieses Enzyms bei toleranten Pflanzen wird der Abbau von ROS über den Glutathion-Kreislauf des Johanniskraut bei Befall mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* somit unterdrückt. Stabilisierte oder gar erhöhte GR-Aktivitäten wurden dagegen in zuvor mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen gefunden (vgl. Abb. 48). Damit wird für diese Pflanzen der Abbau von stressbedingt auftretenden Radikalen im Glutathion-Zyklus sichergestellt.

Die Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein anderes GSH-abhängiges Enzym in Pflanzen. Durch Konjugation an GSH spielt sie ebenfalls eine Rolle bei der Detoxifizierung von Elektrophilen [CHEN et al., 2004]. Auch bei diesem Enzym führte die Beimpfung mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* in nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen zu einem Aktivitätsabfall, in mykorrhizierten Pflanzen dagegen zu einer Aktivitätssteigerung der GST (vgl. Abb. 49). KNÖRZER et al. (1996) führten den erfolgreichen Abbau von ROS und damit die pflanzlichen Abwehrreaktionen ebenfalls u.a. auf den beobachteten Anstieg der GST-Aktivität nach Stressinduktion mit Herbiziden in Sojazzellkulturen zurück. Sie unterstrichen hierbei die bedeutende Rolle dieses Enzyms in der Reaktion der Pflanzenzelle auf oxidativen Stress. In Tabakpflanzen mit transgener GST-Überexpression wurden die Stoffwechselaktivitäten nach Salzstressinduktion ebenfalls besser aufrecht gehalten als in den Wildtypen und Lipidperoxidationen und oxidative Schäden waren reduziert [ROXAS et al., 2000]. Vergleichbare Ergebnisse erhielten YU et al. (2003) an transgenen GST-überexprimierenden Tabakpflanzen bei Methylviologen-induziertem photooxidativem Stress. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Aktivitätssteigerung der GST in mykorrhizierten Pflanzen nach Pathogenbefall führt demnach vermutlich auch in anderen Stresssituationen zu einer erhöhten Toleranz der Pflanzen.

#### 7.3.4 Lipidperoxidation

ROS sind Motoren der Lipidperoxidation, die letztendlich zu strukturellen Modifikationen komplexer Lipid-Protein-Gebilde, wie Biomembranen und Lipoproteinen führt. Während der Lipidperoxidation werden Hydroperoxidgruppen in die unpolaren Ketten ungesättigter Fettsäuren eingebaut, wodurch einerseits die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen in den Membranen aufgehoben werden. Andererseits sind Hydroperoxidlipide selbst Quellen für die Bildung von Radikalen, die ihrerseits wiederum Membranschädigungen hervorrufen. [KÜHN und BORCHERT, 2002]

Insbesondere in den Johanniskrautpflanzen, die mit hohen Erregerkonzentrationen beimpft wurden ( $10^5$  Konidien / ml), war ein fortschreitender Prozess der Lipidperoxidation zu verzeichnen (vgl. Abb. 52). In den mykorrhizierten Pflanzen dagegen wurde die Lipidperoxidation deutlich verzögert. Allerdings wurde auch in mykorrhizierten Pflanzen 30 Tage nach Erregerbeimpfung eine Zunahme an Malondialdehyd (MDA) festgestellt, jedoch in geringerem Ausmaß als in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen. Das deckt sich mit den Ergebnissen von WU und von TIEDEMANN (2002), die in anfälligeren Gerstenkulturen stärker ausgeprägte Lipidperoxidation in Form von MDA ermittelten als in toleranten Kulturen. Die Mykorrhizierung erhöht damit die Toleranz der Pflanzen gegenüber oxidativem Stress und schränkt das Fortschreiten der Lipidperoxidation zumindest zu einem gewissen Grad ein.

### 7.3.5 Schlussfolgerungen

In den durchgeführten Untersuchungen wurde bewiesen, dass die Mykorrhizierung den Gesundheitsstatus der mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* befallenen Johanniskrautpflanzen unterstützt, wodurch die Pflanzen auch starkem Erregerbefall über eine gewisse Zeit standhalten. In nahezu allen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Enzymsysteme der mykorrhizierten Pflanzen über einen längeren Zeitraum stabil arbeiten oder ROS-detoxifizierende Enzyme in ihrer Aktivität gesteigert werden. Auch das Redoxsystem der Pflanzen, dargestellt am Verhältnis reduzierter und oxidierter Antioxidantien, verhielt sich in den mykorrhizierten Pflanzen selbst bei hohen Erregerkonzentrationen deutlich stabiler. Und schließlich zeigten auch die Messungen zum Status der Lipidperoxidation in mykorrhizierten Pflanzen deutlich verzögerte Schädigungen durch *Colletotrichum cf. gloeosporioides* als in den nicht mykorrhizierten Kontrollen.

Grundsätzlich stellten sich die in einem früheren Wachstumsstadium mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* inokulierten Pflanzen als eindeutig empfindlicher gegenüber dem Erreger heraus. Deutliche Unterschiede wurden aber v.a. zwischen den beiden untersuchten Johanniskrautsorten festgestellt. Die Sorte ‚Topaz‘ erwies sich erwartungsgemäß als widerstandsfähiger gegen den Erreger als die parallel geprüfte „anfällige Standardsorte“. Positive Effekte auf den antioxidativen Status durch die Mykorrhizierung wurden jedoch bei beiden Sorten ermittelt.

Eine gut etablierte Mykorrhizierung erhöht somit die Toleranz von Johanniskrautpflanzen gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* und bewahrt die Pflanzen vor stärkeren Schädigungen.

Der im Rahmen der Zielstellung angestrebte Nachweis eines positiven Einflusses der Mykorrhizierung auf den antioxidativen Status von Johanniskrautpflanzen bei Befall mit dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* wurde damit eindeutig erbracht.

## 7.4 Aufbau und Optimierung einer 2-D-Elektrophorese-Methode

### 7.4.1 Aufarbeitung von Pflanzenmaterial für die 2-D-Elektrophorese

Bevor Pflanzenproteine mit elektrophoretischen Methoden charakterisiert werden können, müssen die Zellen des Untersuchungsmaterials aufgeschlossen und aus dem daraus resultierenden Homogenat die Proteine extrahiert werden. Bereits an die Probenaufarbeitung für die 2-D-Elektrophorese werden somit besondere Anforderungen gestellt, da hiervon der Erfolg der elektrophoretischen Auftrennungen der Proteine abhängt [ISLAM et al., 2004]. Im Ergebnis der Probenvorbereitung sollten möglichst alle Proteine des Ausgangsmaterials komplett gelöst, deaggregiert, denaturiert und reduziert vorliegen. Sämtliche Inhaltsstoffe, die die elektrophoretische Trennung behindern, sollten entfernt worden sein [RABILLOUD und CHEVALLET, 2000].

Die Isolation der Proteine aus Pflanzengewebe für die 2-D-Elektrophorese bereitet besondere Probleme. Pflanzenzellen besitzen im Gegensatz zu tierischen Zellen starke Zellwände und unlösliche Membranproteine. Dieses stabile Zellmaterial muss in geeigneter Weise aufgeschlossen werden, um die Proteine extrahieren zu können [TSUGITA und KAMO, 1999]. Das Homogenisieren durch Mörsern mit flüssigem Stickstoff, Ultraschallanwendungen, der Einsatz von Enzymen, osmotischer Schock, wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder einer Kombination dieser Methoden dienen dem Aufschluss von Zellen und Geweben. Beim Mörsern mit Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff können außerdem durch die extrem niedrige Temperatur von  $-196\text{ °C}$  Proteasen inaktiviert werden. Die Homogenisation in flüssigem Stickstoff stellt daher für Pflanzenmaterial die Methode der Wahl dar [GÖRG und WEISS, 2000; ISLAM et al., 2004]. Auch im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde das Pflanzenmaterial zum Zellaufschluss deshalb in flüssigem Stickstoff durch Mörsern homogenisiert.

Anschließend müssen die Proteine schnell aus dem Homogenat extrahiert werden, um eine Reaktion mit anderen reaktiven Zellbestandteilen weitestgehend zu vermeiden. Besondere Komplikationen gibt es bei der Proteinextraktion aus reifen Pflanzenmaterialien, weshalb hierzu bisher auch nur sehr wenig publiziert wurde [CARPENTIER et al., 2005; GIAVALISCO, 2003; ISLAM et al., 2004]. In ausgewachsenen Pflanzen konnten sich besonders viele für die anschließende 2-D-Elektrophorese störende Inhaltsstoffe entwickeln, die Proteine selbst liegen dagegen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Zu den störenden Inhaltsstoffen zählen neben Salzen und Nukleinsäuren je nach Pflanzenart Lipide, Polysaccharide, Alkaloide, Quinone und insbesondere die große Gruppe phenolischer Verbindungen. Reaktive Verbindungen führen zu Modifikationen von Proteinen. So bilden Proteasen niedermolekulare Artefakte, während Phenole sich mit den Proteinen zu schwer löslichen Komplexen verbinden. [GÖRG und WEISS, 2000; GÖRG et al., 2003; POSCH, 1994]

Die Isolierung der Proteine aus pflanzlichen Zellen wird aufgrund der Vielzahl störender und reaktiver Inhaltsstoffe und der sehr niedrigen Proteingehalte noch heute bevorzugt mit Fällungsmethoden durchgeführt. Dabei werden Verluste hydrophober Proteine, die anschließend nur schwer wieder in Lösung gebracht werden können, sowie die Denaturierung einzelner Proteine durch die Verwendung organischer Lösungsmittel zugunsten einer Aufkonzentrierung von Proteinen und einer Abtrennung störender Pflanzeninhaltsstoffe in Kauf genommen. Für die 2-D-Elektrophorese von pflanzlichen Proteinen wird zur Probenaufarbeitung am häufigsten die TCA-Acetonfällung angewendet. [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998; CARPENTIER et al., 2005; GÖRG, 1999; GÖRG et al., 2000; GÖRG und WEISS, 2000; GRANIER, 1988; SARAVANAN und ROSE, 2004; TSUGITA et al., 1996; TSUGITA und KAMO, 1999]

Auch im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen wurde die zuerst von DAMERVAL und seinen Mitarbeitern (1986) beschriebene und von GÖRG et al. (1988) verbesserte TCA-

Acetonfällung zur Pflanzenaufarbeitung als Ausgangsmethode eingesetzt um sie entsprechend für das Probenmaterial Majoran und Johanniskraut anzupassen und zu optimieren.

Grundsätzlich erwies sich die TCA-Acetonfällung nach DAMERVAL et al. (1986) als geeignet. Jedoch waren insbesondere die mit dieser Methode erhaltenen Proteinausbeuten aus den im Gewächshaus herangezogenen Pflanzen viel zu gering für eine spätere Detektion getrennter Proteine auf dem 2-D-Gel. Eine Erhöhung des eingesetzten Pflanzenmaterials von ursprünglich 1 g auf 3 g führte zu einer ersten Steigerung der Proteingehalte in den herzustellenden Pufferlösungen. Durch die Verteilung der Probensuspension in TCA/Aceton-Lösung auf mehrere Gefäße und damit in erster Linie einer stärkeren physikalischen Behandlung beim Kontakt der Reagenzien mit der Probe wurde eine weitere Verbesserung der Proteinausbeute erzielt und dadurch auch reinere Proteinpellets erhalten. Schließlich führte auch die Erhöhung der Anzahl der Waschschrte von einem [DAMERVAL et al., 1986] auf drei oder sogar mehr zu reineren Proteinpellets und damit einer störungsfreieren Durchführung der sich anschließenden IEF. ISLAM et al. (2004) erzielten vergleichbare Ergebnisse: Unterstützende Ultraschallbehandlung bei der Proteinfällung, das Zerkleinern des Proteinpellets und zusätzliche Waschschrte führten zu erhöhten Proteinausbeuten und besseren Trennergebnissen.

Mit den aufgeführten Verbesserungen konnte die Methode zur Proteingewinnung aus dem Pflanzengewebe sowohl für Majoran als auch für Johanniskraut erfolgreich angepasst und optimiert werden.

#### 7.4.2 Lösen des gefällten Proteins

Die Lösbarkeit des gewonnenen Pflanzenproteins ist ein weiteres Problem, das schon während der Probenaufarbeitung berücksichtigt werden muss. Dies erfordert die Zerstörung aller nicht kovalenten Bindungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrückenbindungen zwischen den Proteinen, durch Denaturieren, Reduzieren und Lösen [GÖRG und WEISS, 2000; GÖRG et al., 2003]. Insbesondere nach der Ausfällung von Proteinen gestaltet sich die Wiederaufnahme in einen Lösungspuffer oft schwierig. Sehr hydrophobe Proteine bereiten beim Lösen die größten Probleme [WESTERMEIER und NAVEN, 2002].

Die Effizienz der Lösbarkeit hängt von der Art der Zellerstörung ab, weiterhin von der Proteinkonzentration, der Lösungsmethode, der Chemikalienart und weiteren Zusätzen in der Probenlösung. Nicht jede Anwendung eignet sich für jedes Proteingemisch [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998]. Somit besteht insbesondere für die Anpassung des Lösungspuffers und des Lösungsverfahrens bei neuen Probenmaterialien stets hoher Optimierungsbedarf.

Bei dem für die Methodenentwicklung eingesetzten Ausgangspuffer handelte es sich um einen 8 M Harnstoffpuffer nach BERKELMAN und STENSTEDT (1998) mit 2 % CHAPS, 20 mM DTT und 0,5 % Ampholyten (vgl. Abb. 53). Erste Versuche mit diesem Lösungspuffer führten jedoch noch zu keinem erfolgreichen Fokussierungsergebnis. Vermutete Unreinheiten der Proteinprobe sollten deshalb mit einer Micro Spin Tube (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) abfiltriert werden. Jedoch wurde hierbei auch ein Teil der Proteine abgetrennt, weshalb mit diesem zusätzlichen Schritt die Proteinausbeute in der Lösung um etwa ein Drittel verringert war. Deshalb musste auf diesen Filtrationsschritt verzichtet werden.

Durch zusätzliche mechanische Behandlung zur Unterstützung des Lösevorgangs in Form von erneuter Ultraschallbehandlung und Inkubation (37 °C, 1 h) wurde die Aufnahme der Proteine in den Lösungspuffer nochmals deutlich verbessert. Das entspricht den von ISLAM et al. (2004) beschriebenen Beobachtungen, die ebenfalls deutlich bessere Ergebnisse bei reifem Pflanzenmaterial durch stärkere mechanische Bearbeitung während der Extraktion und Lösung der Proteine erzielten.

Reduzierendes DTT im Lösungspuffer dient dem Brechen der Disulfidbrückenbindungen der Proteine [RABILLOUD, 1999]. Ampholytlösungen verbessern die Löslichkeit der Proteine und die Auflösung der IEF [GARFIN und HEERDT, 2004]. Die Erhöhung der Konzentration dieser beiden Chemikalien bis auf 50 mM DTT und 1 % Ampholyte erhöhte die Proteinkonzentrationen in der Lösung auf etwa 1 mg/ml und verminderte damit den Anteil nicht gelöster Proteine nach der Zentrifugation.

Harnstoff und Thioharnstoff werden im Lösungspuffer zum Brechen der sekundären und tertiären Proteinstrukturen durch die Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen eingesetzt. Thioharnstoff zeigt dabei eine noch stärker denaturierende Wirkung. Besonders für hydrophobe Proteine ist der Zusatz von Thioharnstoff deshalb empfehlenswert [RABILLOUD, 1998; WESTERMEIER und NAVEN, 2002]. Durch den Zusatz von Thioharnstoff zum Lösungspuffer wurde die Proteinkonzentration auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen mehr als verdoppelt und damit auch deutlich mehr Spots im 2-D-Gel nachgewiesen. Die Anwendung eines Lösungspuffers mit Thioharnstoff stellte sich damit für die zu trennenden Pflanzenproteine als vorteilhaft heraus.

Der Ersatz des zwitterionischen Detergenzes CHAPS durch das Sulfobetain Detergenz C7BzO führte v.a. in der ersten Dimension zu einer weiteren deutlichen Verbesserung der Trennergebnisse. C7BzO ist ein Sulfobetain Detergenz, für das besondere Löslichkeits- und damit Extraktionseigenschaften für pflanzliche Membranproteine beschrieben werden [HERICK, 2004; LUCHE et al., 2003; RABILLOUD et al., 1999]. Die Verwendung von 1 % C7BzO im Lösungspuffer erzielte auch in den hier durchgeführten Untersuchungen tatsächlich eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration in der Lösung und führte schließlich zu besseren Trennerfolgen in der IEF und damit auch zu schärferen 2-D-Bildern.

Mit dem optimierten Lösungspuffer (vgl. Abb. 54) bestehend aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % C7BzO, 50 mM DTT, 1 % Ampholyte und 0,005 % Bromphenolblau konnten die Proteinkonzentrationen bei gleichem Einsatzverhältnis der Probe schließlich vervierfacht werden und Proteinkonzentrationen von über 4 mg/ml erreicht werden. Diese Konzentrationen waren bei der Probenauftragung ausreichend für eine entsprechende Nachweisempfindlichkeit der 2-D-Elektrophorese bei Anwendung der mit der Massenspektrometrie kompatiblen Coomassiefärbung.

### 7.4.3 Erste Dimension der 2-D-E: IEF

Bei der Isoelektrische Fokussierung (IEF) werden dipolare, zwitterionische und amphotere Substanzen, wie Peptide und Proteine, in Abhängigkeit von ihrer Ladung aufgetrennt. Proteine, deren Bestandteile die Peptide und deren Bausteine wiederum die Aminosäuren sind, wandern im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten. Von der Nettoladung des jeweiligen wandernden Moleküls resultiert eine Triebkraft. Dadurch gelangt jedes Proteinfragment zu der Stelle im pH-Gradienten, die seinem isoelektrischen Punkt (Nettoladung = 0) entspricht, bei dem es fokussiert ist. [MICHOV, 1996; WESTERMEIER, 1990]

Heute vorrangig verwendete fertige getrocknete IPG-Streifen müssen vor der Fokussierung rehydratisiert werden. Die Rehydratisierung kann entweder allein zur Rückquellung der IPG-Streifen in entsprechendem Volumen an Pufferlösung mit anschließender Probenaufgabe erfolgen oder aber in Form der so genannten In-Gel-Rehydratisierung gleichzeitig mit der Probenauftragung. Im Falle der In-Gel-Rehydratisierung kann zwischen aktiver (unter Gleichstrom bei 30 bis 50 Volt) und passiver (ohne Strom) Durchführung gewählt werden. [WESTERMEIER und NAVEN, 2002]

Bei den hier durchgeführten Arbeiten wurde die Isoelektrische Fokussierung (IEF) an 17 cm IPG-Streifen über einen weiten pH-Bereich von 3 bis 10 durchgeführt, um ein möglichst komplexes Bild von der Proteinzusammensetzung der Pflanzenmaterialien zu erhalten.

Zur Rehydratisierung der IPG-Streifen erwies sich die In-Gel-Rehydratisierung mit gleichzeitiger Probenauftragung als vorteilhafter gegenüber einem späteren Cup-Loading der Probe.

Das im Anschluss an die Rehydratisierung durchzuführende Cup-Loading erlaubt ein maximales Probenauftragevolumen von 150  $\mu\text{l}$  [GÖRG und WEISS, 1999]. Andere Autoren [GARFIN und HEERDT, 2004] sprechen sogar nur von 100  $\mu\text{l}$ . Proteine mit isoelektrischen Punkten nahe dem Auftragungsort drohen bei dieser Form der Probenauftragung außerdem nochmals auszufallen [WESTERMEIER und NAVEN, 2002]. Bei der In-Gel-Rehydratisierung ist das Probenauftragevolumen nur durch die Aufnahmekapazität des IPG-Streifens bei der Rehydratisierung begrenzt. Ein 17 cm IPG-Streifen sollte mit etwa 340  $\mu\text{l}$  Puffer rehydratisiert werden [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998]. Dabei sind Probenlösungspuffer und Rehydratisierungspuffer in ihrer Zusammensetzung identisch [WESTERMEIER und NAVEN, 2002]. Aufgrund der geringen erhaltenen Proteinkonzentrationen im Lösungspuffer nach der Pflanzenextraktion und der angestrebten Coomassiefärbung (Quantifizierbarkeit und Kompatibilität zur Massenspektrometrie [PATTON, 2002]) war im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen eine In-Gel-Rehydratisierung deutlich besser geeignet, da so größere Volumina aufgetragen werden konnten.

Auch die Menge an Rehydratisierungsflüssigkeit muss genau abgestimmt werden. Sie muss ausreichend sein, um den Streifen vollständig zu rehydratisieren und damit die ursprüngliche Porengröße der Gelstreifen wieder herzustellen. Andererseits muss die Probelösung komplett aufgenommen werden, damit Reste an nicht aufgenommener Probelösung nicht die spätere Fokussierung behindern und vor allem auch eine vergleichbar definierte Proteinmenge und -komposition im 2-D-Bild dargestellt wird. [WESTERMEIER und NAVEN, 2002] Für einen 17 cm langen IPG-Streifen wurden als optimales Rehydratisierungsvolumen 330  $\mu\text{l}$  ermittelt. Bei einer Rehydratisierungsdauer von 16 h wurde das gesamte Puffervolumen vom Streifen aufgenommen, die Proteine konnten gut in die Gelmatrix eintreten. Damit erfolgte auch der Spannungsaufbau während der IEF schneller und die Fokussierung führte zu guten Ergebnissen.

Um Problemen beim Spannungsaufbau während der Fokussierung entgegenzuwirken, wurden Reste an Mineralöl, eventuell auskristallisierter Harnstoff oder wiederausgefallene Proteine nach der Rehydratisierung durch Blotten zwischen feuchtem Filterpapier nochmals entfernt.

Die Probenauftragemenge wurde in Abhängigkeit von der Sensitivität der Färbemethode im Falle der Coomassiefärbung mit 800  $\mu\text{g}$  Protein pro Gel und im Falle einer anschließenden Silberfärbung der Gele mit 150  $\mu\text{g}$  pro Gel ermittelt. Diese Proteinmengen liegen im Konzentrationsbereich der von anderen Autoren für diese Gelgröße angegebenen Mengen [GIAVALISCO, 2003; GÖRG et al., 2000; POSCH, 1994].

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Fokussierungsprogrammen [BERKELMANN und STENSTEDT, 1998; GARFIN und HEERDT, 2004; POSCH, 1994] sollte auch im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen ein geeignetes Programm für die IEF entwickelt und optimiert werden. Der limitierende Faktor für das Erreichen des Spannungsgradienten während der IEF ist ein maximal vorgegebener Stromfluss von 50 bis 70  $\mu\text{A}$  pro Gelstreifen, um Überhitzungen und lokale Verbrennungen im Gelgradienten zu vermeiden [WESTERMEIER und NAVEN, 2002]. Dass die im anfänglich verwendeten Fokussierungsprogramm (vgl. Tab. 9) angestrebten Spannungen aufgrund zu hoher Stromflüsse im Rahmen des Methodenaufbaus zunächst nicht oder nur sehr langsam erreicht wurden, war möglicherweise auf zu hohe Salzkonzentrationen in der Probe, das Vorhandensein anderer störender Bestandteile bzw. Unreinheiten (z.B. unlösliche Feststoffe, Phenole oder Lipide), aber v.a. auf das Wiederausfallen schwer löslicher Proteine im jeweiligen Lösungspuffer zurückzuführen [POSCH, 1994]. Insbesondere Optimierungen des Verfahrens der Probenvorbereitung und des Lösungspuffers führten deshalb auch zu einem besseren Verlauf und besseren Ergebnissen der IEF. Außerdem wurden feuchte Filterpapierstreifen zwischen IPG-Gel und

Elektroden gelegt, um eventuell noch vorhandene Verunreinigungen, Salze, wiederausgefällene Proteine oder überschüssiges DTT während der Fokussierung aufzunehmen.

Durch einen v.a. in der Anfangsphase verzögerten Spannungsanstieg für langsamere Probeneintritt konnten die Fokussierungsergebnisse weiter verbessert werden. Eine optimale Fokussierung der Pflanzenproteine wurde nach 24.000 Vh im Rahmen einer Fokussierungskinetik ermittelt (vgl. Tab. 10).

#### 7.4.4 Zweite Dimension der 2-D-E: SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine nach ihren Molekulargewichten auf. Mit Hilfe von SDS, einem anionischen Detergenz, werden die Eigenladungen der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit entstehen. Diese zeichnen sich durch ein konstantes Verhältnis von etwa 1,4 g SDS pro Gramm Protein aus. Die SDS-Protein-Komplexe unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix diese Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. [MICHOV, 1996; WESTERMEIER, 1990]

Für die Proteintrennung in der SDS-PAGE werden überwiegend SDS-Gele mit dem Puffersystem nach LAEMMLI (1970) verwendet. Die SDS-PAGE wird dabei bevorzugt in Porengradientengelen durchgeführt mit denen sehr scharfe Banden erzielt werden können, da diese Gradientengele einen starken Siebeffekt aufweisen. Porengradientengele haben außerdem einen weiteren Trennbereich als Gele mit konstanten Porendurchmessern [GARFIN und HEERDT, 2004; POSCH, 1994]. Auch die SDS-Gelelektrophorese im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte zur Auftrennung über einen möglichst weiten Molekulargewichtsbe- reich an selbst gegossenen 20 x 20,5 cm TRIS-HCl-Gradientengelen [LAEMMLI, 1970] mit einem Acrylamidkonzentrations-Gradienten zwischen 8 und 16 %.

Die fokussierten IPG-Streifen der ersten Dimension müssen zur Beladung der Proteine mit SDS vor der SDS-Gelelektrophorese äquilibriert werden. Dabei werden die hydrophoben Wechselwirkungen und die Wasserstoffbrückenbindungen in den Proteinen gespalten, was zur Auflösung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine führt. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen können durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, wie 2-Mercaptoethanol oder DTT, gespalten werden. DTT wird dazu der ersten Äquilibrationslösung hinzugefügt. Häufig werden die freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste der Proteine sowie die Thiolgruppen des überschüssigen DTT dann noch durch eine Alkylierung, z.B. mit Iodacetamid in der zweiten Äquilibrationslösung, geschützt. [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998; GARFIN und HEERDT, 2004; WALSH und HERBERT, 1999; WESTERMEIER und NAVEN, 2002]

Da bei der Äquilibration v.a. in den ersten Minuten ein Auswascheffekt entsteht, bei dem ein kleiner Teil des fokussierten Proteins vom Streifen in die Äquilibrationslösung austritt, ist ein geringer Verlust an Probenprotein nicht auszuschließen. Andererseits muss auch gewährleistet sein, dass die fokussierten Proteine vollständig mit SDS beladen sind und mit DTT und IAA kontaktiert werden. Dennoch sollte die Äquilibrationszeit auf je 15 min pro Lösung begrenzt sein, um den Auswascheffekt der Proteine zu minimieren [WESTERMEIER und NAVEN, 2002]. Die besten Ergebnisse wurden auch in den hier beschriebenen Untersuchungen bei je 15 min Äquilibrationszeit erhalten.

In der vertikalen Dodeca Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) konnte schließlich die eigentliche elektrophoretische Trennmethode für die 2. Dimension mit TRIS-HCl-Puffer über 5 bis 16 h optimiert werden. Der Probeneintritt der Proteine vom IPG-Streifen auf das Gradientengel wurde in den ersten 90 min langsam bei niedriger Stromspannung von maximal

50 V durchgeführt, um später bei erhöhter Spannung die Trennung der Proteine nach ihren Molekulargewichten durchzuführen.

Wie in der Literatur beschrieben [BERKELMAN und STENSTEDT, 1998; WALSH und HERBERT, 1999; WESTERMEIER und NAVEN, 2002], wurde der Stromfluss gegen eine Überhitzung der Gele auf 20 mA pro Gel limitiert und die Gele bei 20 °C temperiert. Die Untersuchung verschiedener Spannungen bis maximal 200 V während der Trennung führte zwar zu unterschiedlichen Trennzeiten, jedoch zu keinen Veränderungen der Trennergebnisse.

#### 7.4.5 Färbung, Dokumentation und Auswertung der 2-D-Gele

Es existiert eine Vielzahl an Färbemethoden für Proteinspots nach der Elektrophorese. Diese unterscheiden sich in erster Linie bezüglich ihrer Sensibilität und Färbeintensität gegenüber verschiedenen Proteinen. [PATTON, 2002; RABILLOUD und CHARMONT, 2000]

Häufige Anwendung in der Elektrophorese finden Coomassiefarbstoffe [GÖRG und WEISS, 2000]. Coomassie Brilliant Blau R 250 weist Proteinspots von 40 ng nach und wird am häufigsten eingesetzt. Die Färbelösung fixiert die meisten Proteinspots im Gel. Kolloidale Coomassiefärbungen, wie Coomassie Brilliant Blau G 250, können bis zu 10 ng Protein sichtbar machen und auch größere Kontraste schaffen. [GARFIN und HEERDT, 2004]

Eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze für Proteine wird mit Silberfärbungen erreicht. Die Sensibilität von Silberfärbungen liegt dabei 10- bis 100-mal über der von Coomassiefärbungen [GÖRG und WEISS, 2000]. Allerdings sind die Färbemethoden deutlich aufwendiger und die Kontaktzeiten der Lösungen mit den Gelen müssen v.a. bei angestrebter Quantifizierung exakt reproduziert werden. Vor allem bei zu langer Farbentwicklung können sich schnell störende Hintergrundfärbungen ausbilden. Auch für eine Quantifizierung ist die Silberfärbung nicht geeignet, da einzelne Proteine mit unterschiedlicher Intensität gefärbt werden. [GARFIN und HEERDT, 2004; PATTON, 2002]

Im Gegensatz zur zwar deutlich sensitiveren Silberfärbung ist nur die Coomassiefärbung direkt kompatibel mit der Massenspektrometrie. Zwar wurden auch schon MS-kompatible Silberfärbungen beschrieben, diese sind allerdings durch einen deutlichen Verlust der Nachweisempfindlichkeit und eine die Quantifizierung störende ungleichmäßige Hintergrundfärbung gekennzeichnet [PATTON, 2002]. Häufig sind auch zusätzliche Entfärbeschritte erforderlich. Ein weiterer Vorteil der Coomassiefärbung liegt in der Einfachheit und Schnelligkeit ihrer Durchführung.

Da sowohl eine semi-quantitative Auswertung von Gelunterschieden in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung als auch eine massenspektrometrische Untersuchung relevanter Proteinspots angestrebt wurde, war eine Coomassiefärbung im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vorzuziehen.

Beim Vergleich von Coomassiefärbung (vgl. Abb. 55) und Silberfärbung (vgl. Abb. 56) wurde die höhere Sensitivität der Silberfärbung gegenüber der Coomassiefärbung deutlich nachgewiesen. Die Silberfärbung erforderte eine deutlich geringere Probenauftragung bei der In-Gel-Rehydratisierung, wodurch die Spannungen bei der IEF deutlich schneller erreicht wurden. Allerdings kommt es besonders bei silbergefärbten Gelen vermehrt zur Streifenbildung [WESTERMEIER und NAVEN, 2002], die trotz Anwendung von Iodacetamid in der 2. Äquilibrierungslösung auch in den hier durchgeführten Untersuchungen Probleme bei der Gelauswertung bereiteten. Die routinemäßig parallele Entwicklung und anschließende Färbung von zwölf 2-D-Gelen stellte ein weiteres Problem dar. Die Zeiten für die einzelnen Färb- und Entwicklungsschritte bei der Silberfärbung ließen sich nicht für alle zwölf Gele gleichzeitig präzise genug einhalten, um reproduzierbare und gleichmäßig gefärbte Gele zu erhalten. Eine quantitative Gegenüberstellung verschiedener Gele war nach Silberfärbung somit nicht realisierbar.

Nach der erfolgreichen Optimierung der 2-D-Methode und insbesondere der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials wiesen die Proteinlösungen auch für eine Coomassiefärbung ausrei-

chende Proteinkonzentration auf. Die Coomassiefärbung reagierte aber deutlich unsensibler auf geringere Abweichungen von den vorgeschriebenen Einwirkzeiten der Lösungen und war damit für eine spätere quantitative Gegenüberstellung verschiedener 2-D-Gele deutlich besser geeignet. Ein weiterer Vorteil ist die uneingeschränkte Kompatibilität von Coomassiefärbungen mit der Massenspektrometrie [PATTON, 2002]. Außerdem erwiesen sich Coomassie gefärbte Gele bei Aufbewahrung in destilliertem Wasser als länger haltbar, wodurch die erst nach vollständiger Auswertung der Gele als unterschiedlich exprimiert detektierten Proteinspots noch vom frischem Originalgel für die massenspektrometrische Bestimmung ausgestochen werden konnten.

#### 7.4.6 Schlussfolgerungen

Insgesamt gelang es im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit entsprechend der Zielstellung eine 2-D-Elektrophorese-Methode zur Trennung der Proteine aus Majoran zu etablieren (vgl. Abb. 57). Diese 2-D-E-Trennung konnte uneingeschränkt auf die Proteine des Johanniskrauts übertragen werden. Dabei handelt es sich nach dem Kenntnisstand der Autorin um die erste beschriebene 2-D-elektrophoretische Trennung von Proteinen aus diesen beiden Pflanzen und um eine von nur sehr wenigen für ausgewachsenes Pflanzengewebe beschriebenen Methoden [CARPENTIER et al., 2005; GIAVALISCO, 2003; ISLAM et al., 2004]. Besondere Bedeutung kommt dabei der Anpassung des Proteinfällungsverfahrens sowie des Lösungspuffers zu. Verbesserungen wurden insbesondere durch Kombination von für andere Anwendungen bereits beschriebenen Pufferbestandteilen [z.B. HERICK, 2004; RABILLOUD, 1998] sowie durch verstärkte physikalisch-mechanische Behandlung während der Fällung, Extraktion und Wiederaufnahme der Proteine [vgl. ISLAM et al., 2004] erzielt. Die optimierte 2-D-Gelelektrophorese-Methode (vgl. Abb. 58) konnte schließlich im Rahmen der Arbeit für den Vergleich der Proteinmuster der oberirdischen Pflanzenmaterialien mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter Majoran- und Johanniskrautpflanzen eingesetzt werden, um eventuelle Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteinexpression zu untersuchen.

## 7.5 Systemische Einflüsse der Mykorrhizierung auf die Proteine

Untersuchungen von äußeren Einflüssen auf Pflanzen, wie biotische oder abiotische Stressfaktoren, Rhizobien und auch arbuskuläre Mykorrhizapilze, sind in der Vergangenheit vorrangig auf der Ebene der Genexpression bzw. -transkription durchgeführt worden [BRECHENMACHER et al., 2004; DOLL et al., 2003; HOHNJEC et al., 2005; WULF et al., 2003; YAMADA et al., 2000]. Die Daten solcher Studien sind jedoch für das Verständnis pflanzlicher Stoffwechselfvorgänge nicht immer ausreichend: Einigen Gensequenzen kann keine konkrete Funktion zugewiesen werden und auch bei erfolgreich abgeleiteten Genprodukten fehlen direkte Informationen über die Translation sowie co- und posttranslationale Modifikationen.

Mit der stetigen Entwicklung elektrophoretischer und auch chromatographischer Protein-Trennverfahren sind daher in den letzten Jahren vermehrt vergleichende Untersuchungen der Proteinexpression pflanzlicher Organe und Organellen in Abhängigkeit von verschiedenen Behandlungen vorgenommen worden. Obwohl Einträge pflanzlicher Proteine in verfügbaren Datenbanken noch immer nur sehr langsam wachsen, ermöglichen insbesondere die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Massenspektrometrie nun auch eine vergleichsweise einfache Identifizierung differenziert regulierter Proteine.

Neben stress- und elicitorinduzierten Einflüssen auf Enzyme und Proteine verschiedenster Pflanzen [AMME et al., 2006; CASADO-VELA et al., 2005; CHIVASA et al., 2006; COLDITZ et al., 2004; DANI et al., 2005; PARKER et al., 2006; YAN et al., 2005 und 2006] sind auch Untersuchungen zu den Auswirkungen der Mykorrhiza-Symbiose auf der Proteinebene durchgeführt worden. Diese beschränken sich bisher aber auf AM-induzierte Veränderungen an der Angriffsstelle der Mykorrhiza-Strukturen, der Pflanzenwurzel [BESTEL-CORRE et al., 2002b sowie 2004a +b; MUSSA et al., 2000; REPETTO et al., 2003; TIMONEN und SMITH, 2005; VALOT et al., 2005]. Systemisch induzierte Einflüsse auf die Expression von Enzymen und Proteinen im Blatt und Kraut der mykorrhizierten Pflanzen sind bisher jedoch nicht bekannt geworden.

### 7.5.1 Regulation von an der Photosynthese beteiligten Enzymen

Die Effekte der in dieser Arbeit untersuchten Mykorrhiza-Symbiose auf Enzyme und Proteine des oberirdischen Blattmaterials von Majoran und Johanniskraut betrafen in vielen Fällen photosyntheserelevante Enzyme. So führte die Mykorrhizierung zu einer Herunterregulation des Sauerstoff freisetzenden Komplexes des Photosystems II (PS II) in Majoran (Tab. 11, SSP 3405) sowie des Reaktionszentrums des Photosystems I (PS I) in Johanniskraut (Tab. 12, SSP 8204). Damit wird jeweils eine Stufe der Primärreaktion der Photosynthese, der Photophosphorylierung, unterdrückt.

Eine gesteigerte Expression des Sauerstoff freisetzenden Komplexes des PS II wurde dagegen von KOMATSU et al. (2006) nach Behandlung mit der wachstumsfördernden Substanz Gibberellin in den Blättern der Reispflanze ermittelt. HOHNJEC et al. (2005) fanden auf der Genebene in den Wurzeln von *Medicago truncatula* einen positiven Effekt der AM auf dieses Protein. Durch Chlorophyll a Fluoreszenzmessung konnten auch PINIOR et al. (2005) an Rosen einen stabilisierenden Effekt der AM bei Trockenstress auf den Sauerstoff freisetzenden Komplex des PS II und auf die Elektronentransportkette zwischen PS II und PS I ermitteln. Dies deckt sich zumindest teilweise mit den hier ermittelten Ergebnissen einer erhöhten Expression des Cytochrom  $b_6/f$  Komplexes in mykorrhiziertem Majoran (Tab. 11, SSP 5108) Der Cytochrom  $b_6/f$  Komplex transferiert bekanntlich die Elektronen zwischen den beiden Reaktionszentren des PS I und PS II und ist auch am Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt. Die Verringerung der Aktivität des PS I und des PS II in mykorrhizierten Pflanzen lässt sich aber im Kontext mit der Literatur nicht erklären.

In mykorrhiziertem Johanniskraut der „anfälligen Standardsorte“ war die gamma-Kette der ATP-Synthase hoch reguliert worden (Tab. 14, SSP 3708). Eine Erhöhung von ATP-

Synthase-Untereinheiten war auch in verschiedenen Untersuchungen von mykorrhizierten Pflanzenwurzeln festgestellt worden [MUSSA et al., 2000; REPETTO et al., 2003; VALOT et al., 2005]. Wachstumsfördernde Gibberellin-Induktion führte in Reis zu einer erhöhten Proteinexpression [KOMATSU et al., 2006], wohingegen bei Kältestress der Abbau der ATP-Synthase und damit eine verringerte ATP-Produktion durch Photophosphorylierung zu verzeichnen waren [YAN et al., 2006]. PARKER und seine Mitarbeiter (2006) fanden in Reispflanzen eine erhöhte Regulation dieses Proteins assoziiert mit erhöhten Photosyntheseraten sowie gesteigerten Konzentrationen des Chlorophyll a/b bindenden Proteins und der großen Untereinheit der RuBisCo. Die Detektion erhöhter Expressionen in der Kombination eben dieser drei genannten Proteine im Rahmen dieser Arbeit (Tab. 14, SSP 3708, 4307, 5509) lässt insofern auch auf höhere Photosyntheseraten in den mykorrhizierten Pflanzen der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrauts schließen.

Das bedeutendste Protein der Sekundärreaktion der Photosynthese, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCo), war nicht nur in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrautes (s.o.), sondern auch in Majoranpflanzen nach Mykorrhizierung erhöht worden (Tab. 11, SSP 7606). Dagegen traten kleinere Fragmente und Abbauprodukte der RuBisCo in mykorrhizierten Majoranpflanzen in deutlich geringeren Mengen auf als in den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen (Tab. 11, SSP 7404, 0403, 5105). Dies ist zusätzlich ein Zeichen für die verminderte Degradation dieses wichtigen Proteins in mykorrhizierten Pflanzen. Für die Abbauprodukte wurden dabei deutlich niedrigere Molekulargewichte im 2-D-Gel nachgewiesen. YAN et al. (2006) führten hochregulierte Fragmente der großen RuBisCo Untereinheit in Blättern der Reispflanze auf einen Abbau des Enzyms infolge des induzierten Kältestresses zurück. Die Einwirkung von Hitzestress führte in Weizen (Blatt) zu verminderter Expression der RuBisCo und infolge dessen zur Seneszenz der Pflanzen [DEMIREVSKA-PEKOVA et al., 2005]. Die gesteigerte Expression in mykorrhiziertem Majoran zusammen mit der Herunterregulation von Enzymfragmenten zeugt deshalb von einer verstärkten Aktivität der Sekundärreaktion der Photosynthese.

Dagegen waren zwei Formen des RuBisCo-bindenden Proteins Chaperonin 60 in mykorrhiziertem Majoran gesenkt (Tab. 11, SSP 3808, 2803). Dies entspricht der Beobachtung von DEMIREVSKA-PEKOVA et al. (2005) nach Hitzestress.

Unabhängig von der Mykorrhizierung wies die gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* tolerantere Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ erhöhte regulierte RuBisCo-Aktivase-Isoformen sowie eine kleine Untereinheit der RuBisCo auf (Tab. 13, SSP 4704, 3706, 5103). Während DEMIREVSKA-PEKOVA et al. (2005) bei einer Minderung dieser beiden Enzyme nach Hitzestress in Weizen den Beginn der Seneszenz beobachten, ist hier also von einer erhöhten Vitalität dieser Sorte gegenüber der „anfälligen Standardsorte“ auszugehen. Das entspricht auch den Ergebnissen von PARKER et al. (2006), die bei erhöhten RuBisCo-Aktivase-Mengen eine erhöhte Toleranz gegenüber Salzstress beschreiben.

Die Carboanhydrase katalysiert die Gleichgewichtsreaktion zwischen gelöstem Kohlendioxid und Bicarbonat und ist damit nur indirekt an der Photosynthese beteiligt [KINDL, 1994]. In mykorrhiziertem Majoran waren zwei Formen dieses Enzyms herunterreguliert worden (Tab. 11, SSP 6202, 5305). SIEDLECKA et al. (1997) beobachteten zwar in den Blättern der Garten-Bohne bei moderatem Cadmium-Stress eine Erhöhung der Carboanhydrase-Aktivität, schrieben dem Enzym aber unter optimalen Wachstumsbedingungen keine bedeutende Rolle zu.

Insgesamt waren photosyntheserelevante Proteine in den mykorrhizierten Pflanzen von Majoran und Johanniskraut meist hochreguliert worden. Damit ist im Allgemeinen von gesteigerten Photosyntheseraten in mykorrhizierten Pflanzen auszugehen. Dies könnte zumindest einen Faktor für die für mykorrhizierte Pflanzen häufig beobachteten Effekte, wie eine erhöhte Vitalität, verbesserte Pflanzenentwicklung und gesteigertes Wachstum darstellen.

### 7.5.2 Regulation von stressrelevanten Enzymen

Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert bekanntlich die Reaktion von Superoxid ( $O_2^{\bullet -}$ ) zu Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und ist damit ein wichtiges Enzym der antioxidativen Abwehrreaktionen in allen Organismen (vgl. Abb. 7). In Reis zeigte sich die SOD bei Salzstress erhöht [PARKER et al., 2006] und die durch Kalziummangel verursachte Blütenendfäule führte in Tomaten zu geringeren Gehalten dieses Enzyms [CASADO-VELA et al., 2005]. Auch bei Trockenstress war die Enzymaktivität der SOD in Wacholder [ALGUACIL et al., 2006] sowie in Myrthe und Steinlinde [CARAVACA et al., 2005] erhöht, jedoch führte eine Mykorrhizierung der Pflanzen zu geringeren Aktivitäten des Enzyms bei gleichzeitig verbessertem Pflanzenwachstum. MARTIN et al. (1998) beobachteten an Rotklee eine Zunahme der Enzymaktivität mit dem Pflanzenalter, die von der Mykorrhizierung aber zunächst unterdrückt werden konnte, und schlussfolgerten daraus eine Verzögerung der Seneszenz aufgrund einer besseren Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen durch die arbuskuläre Mykorrhiza. Die hier in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrautes detektierte Minderung der SOD in mykorrhizierten Pflanzen (SSP 2204, Tab. 14) dürfte somit ebenfalls ein Zeichen für eine durch die Mykorrhiza-Symbiose induzierte Erhöhung der allgemeinen Stresstoleranz darstellen.

Die Aldehyd-Dehydrogenase ist involviert in die Detoxifizierung von aus der Lipidperoxidation resultierenden Aldehyden [KIRCH et al., 2005]. Dabei spielt die Gruppe der Aldehyd-Dehydrogenasen offensichtlich auch eine bedeutende Rolle bei der Stresstoleranz von Pflanzen. Arabidopsis-Pflanzen mit transgener Überexpression einer Aldehyd-Dehydrogenase wiesen verbesserte Toleranzen gegenüber Trockenstress, Salzstress auf sowie gegenüber durch Schwermetalle, Methylviologen oder Wasserstoffperoxid induziertem Stress. Dabei korrelierte die Toleranz transgener Pflanzen mit einer verminderten Akkumulation von aus der Lipidperoxidation stammenden reaktiven Aldehyden. Bei Salz- und Trockenstress an Gerste fanden auch ISHITANI et al. (1995) erhöhte Genexpressionen der Aldehyd-Dehydrogenase. Eine erhöhte Salztoleranz wurde ebenfalls von KUMAR et al. (2004) an Möhren bei erhöhter Genexpression der Aldehyd-Dehydrogenase beobachtet.

Über die Interaktionen der Aldehyd-Dehydrogenase mit Pathogenen ist dagegen bisher nur wenig bekannt. Bei Untersuchungen von CHIVASA et al. (2006) an *Arabidopsis*-Zellkulturen wurde das Protein nach Behandlung mit einem Pathogen-Elicitor verstärkt gebildet.

Positive Einflüsse auf die Stresstoleranz von Pflanzen werden auch den AMP zugeschrieben [FELDMANN, 1998]. Die eigenen Untersuchungen ergaben in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrauts nach Mykorrhizierung eine Herunterregulation der Aldehyd-Dehydrogenase auf das Niveau der toleranteren Sorte ‚Topaz‘ (Tab. 14, SSP 5811). Ob dies einen Einfluss auf die Stresstoleranz dieser Sorte hat, ist anhand der bisherigen Ergebnisse nicht schlüssig.

In beiden Johanniskrautsorten wurden durch die Mykorrhizierung u.a. eine  $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase und ein Germin-like Protein herunterreguliert (Tab. 12, SSP 4603, 6305).

Die Cyanoalanin-Synthase ist ein bedeutender Faktor bei der Cyanidentgiftung. Bei Trockenstress in Tabakblättern wurden um ein Vielfaches erhöhte Cyanidgehalte ermittelt, auf die erhöhte Enzymaktivitäten der Cyanoalanin-Synthase folgten [LIANG, 2003]. Herunterregulierte Mengen dieses Proteins in Johanniskraut sollten somit ein Indiz für eine geringere Stressempfindlichkeit der mykorrhizierten Pflanzen sein.

Germin-like Proteine sind an der Keimung beteiligt und gleichermaßen involviert in Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress. Für die große Gruppe der Germin-like Proteine sind u.a. Oxalat-Oxidase- und Superoxid-Dismutase-Aktivitäten beschrieben. Die Zunahme eines Germin-like Proteins wurde z.B. bei Salzstress in Tabak beobachtet [DANI et al., 2005].

CHRISTENSEN et al. (2004) identifizierten ein Germin-like Protein außerdem als bedeutenden Resistenzfaktor für die Mehltauinfektion in Weizen und Gerste. Wie für Blattpathogene

häufig beobachtet wurde, wird auch gegen den Mehltauerreger in mykorrhizierten Pflanzen eine erhöhte Anfälligkeit beschrieben [GERRNS et al., 2001]. Die verminderte Expression eines Germin-like Proteins in mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen könnte somit eine Erklärung für die erhöhte Mehltauanfälligkeit von AM-Pflanzen darstellen.

Für verschiedene Germin-like Proteine waren erhöhte Genexpressionen auch bei Einsatz von AM-Pilzen zu verzeichnen [BRECHENMACHER et al., 2004; WULF et al., 2003; DOLL et al., 2003]. Da die genaue Funktion des in den eigenen Untersuchungen detektierten Germin-like Proteins jedoch ungeklärt ist, können in diesem Zusammenhang keine endgültigen Aussagen über die hier stattfindende Mykorrhiza-Wirkung getroffen werden.

In mykorrhiziertem Majoran war die Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase herunterreguliert worden (Tab. 11, SSP 4406), ein an der Glykolyse im Kohlenhydratstoffwechsel beteiligtes Enzym. CHIVASA et al. (2006) detektierten in einer *Arabidopsis*-Zellkultur nach Behandlung mit einem Pathogen-Elicitor erhöhte Gehalte des Proteins und YAMADA et al. (2000) fanden eine erhöhte Genexpression des Enzyms nach Salzstress-Induktion. Auch die verringerten Expressionen dieses Enzyms in mykorrhiziertem Majoran deuten somit auf eine Reaktion der Pflanze auf eine mykorrhizabedingte Stressminderung hin.

Eine Form der Glutamin-Synthetase, die der Nitrat- und Ammonium-Assimilation dient [KINDL, 1994], lag sowohl in Majoran (Tab. 11, SSP 5603) als auch in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrauts (Tab. 14, SSP 5702) nach Mykorrhizierung in geringeren Mengen vor. Ein anderes Isoenzym der Glutamin-Synthetase war unabhängig von der Mykorrhizierung in der toleranten Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ gegenüber der „anfälligen Standardsorte“ stark erhöht (Tab. 13, SSP 5708).

YAN et al. (2005) beobachteten nach Anwendung von Salzstress in Reis herunterregulierte Gehalte der Glutamin-Synthetase. Dagegen ging eine erhöhte Kältetoleranz in Reis mit erhöhter Expression dieses Proteins einher [YAN et al., 2006]. Eine erhöhte Genexpression der cytosolischen Glutamin-Synthetase scheint sich ebenfalls positiv auf die Toleranz gegenüber Trockenstress auszuwirken [BAUER et al., 1997]. Damit ist die erhöhte Expression des Enzyms in der toleranten Johanniskrautsorte vermutlich ein Merkmal für eine allgemein erhöhte Stresstoleranz dieser Sorte gegenüber der anfälligen Standardsorte.

Nach Mykorrhizierung wurde unter Trockenstress eine erhöhte Aktivität des Enzyms in den Wurzeln von Zwiebeln [AZCÓN und TOBAR, 1998] und damit eine erhöhte Stresstoleranz ermittelt. Demnach scheint eine durch AM-Pilze erhöhte Aktivität der Glutamin-Synthetase einen positiven Einfluss auf die Toleranz der Pflanzen unter verschiedenen Stressbedingungen zu haben. Unter optimalen Bedingungen zeigt sich die Enzymaktivität dagegen nicht von der Mykorrhizierung beeinflusst [AZCÓN und TOBAR, 1998; BOUCHER et al., 1999]. Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete Herunterregulation der Glutamin-Synthetase in mykorrhizierten, nicht gestressten Pflanzen, kann mit dem derzeitigen Kenntnisstand nicht endgültig geklärt werden.

Die Glycin-Dehydrogenase war in beiden Johanniskrautsorten in AM-Pflanzen herunterreguliert worden (SSP 7705, Tab. 11). Eine Herunterregulation für dieses Enzym sowie eine erhöhte Degradation dieses Proteins wurde auch von YAN et al. (2006) in Reis bei Kältestress beobachtet. Da eine Stressinduktion in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht stattfand, kann auch hier zurzeit keine endgültige Aussage zu dem beobachteten Effekt der Mykorrhizierung getroffen werden.

Zusammenfassend waren mehrere stressrelevante Proteine zwar nicht regelmäßig, aber doch häufig in den mykorrhizierten Pflanzen differenziert zu den nicht mykorrhizierten Kontrollpflanzen reguliert. Denkbar ist, dass es sich bei einigen dieser Proteinregulationen um eine Reaktion der Pflanze auf den Angriff der Mykorrhizapilze handelt. Da die AM-Pilze die Pflanze aber an den Wurzeln angreifen, sind systemische Proteinregulationen im Pflanzenkraut eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte die differenzierte Regulation stressrelevanter

Proteine einen Hinweis auf die allgemein für mykorrhizierte Pflanzen beschriebene erhöhte Stresstoleranz geben. Da in den durchgeführten Untersuchungen jedoch auf zusätzliche Stressbehandlung verzichtet wurde, sind die genauen Wirkungen dieser Proteine in mykorrhizierten Pflanzen zum derzeitigen Kenntnisstand nicht endgültig geklärt. Weitere Untersuchungen mit definierter Stressinduktion sind deshalb zukünftig von besonderem Interesse.

### 7.5.3 Regulation von Enzymen anderer Funktionen

Der Zellwandbaustein Aktin zeigte sich in den eigenen Untersuchungen in mykorrhizierten Majoranblättern herunterreguliert (Tab. 11, SSP 4604). Zwar wurde in den Wurzeln der Tomatenpflanze nach Mykorrhizierung die gleiche Beobachtung gemacht [TIMONEN und SMITH, 2005], jedoch kann die hierfür diskutierte Erklärung einer Öffnung der Wurzelzellwandstrukturen für die Mykorrhizahyphen nicht auf das in dieser Arbeit untersuchte oberirdische Blattmaterial zutreffen. Eine Begründung für diesen Effekt im Blattmaterial von Majoran bleibt daher zum derzeitigen Kenntnisstand noch offen.

Nur in der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrauts war die NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase in AM-Pflanzen erhöht (Tab. 14, SSP 6516). Dies geht mit den Ergebnissen von FRIES et al. (1996) sowie TISSERANT et al. (1998) konform, die in verschiedenen Pflanzenwurzeln nach Mykorrhizierung erhöhte Aktivitäten der Malat-Dehydrogenase detektierten. BESTEL-CORRE et al. (2002b) fanden bei Rhizobien-Nodulierung, aber nicht bei der AM-Symbiose, höhere Gehalte des Enzyms in *Medicago*-Wurzeln und vermuteten, erhöhte Malat-Dehydrogenase-Expressionen sind für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Oxalacetat-Konzentration zur Synthese von Aminosäuren für den Transport des zusätzlich fixierten Stickstoffs erforderlich. Die hier detektierte verstärkte Expression in mykorrhizierten Johanniskrautpflanzen der „anfälligen Standardsorte“ deutet somit ebenfalls auf eine bessere Stickstoffversorgung mykorrhizierter Pflanzen hin.

### 7.5.4 Schlussfolgerungen

Insgesamt wurden mit diesen Untersuchungen sehr deutlich erstmals auch systemische Wirkungen der Mykorrhizierung mit einem kommerziellen AM-Blähton auf das Proteinmuster und damit insbesondere auch auf stoffwechselrelevante Enzyme in Majoran und zwei Johanniskrautsorten nachgewiesen. Diese Zielstellung wurde damit erreicht.

Insbesondere die Photosynthese war in Folge der Mykorrhizierung in erster Linie positiv beeinflusst, worin die erhöhten Vitalitäten und das verbesserte Wachstum mykorrhizierter Pflanzen begründet liegen könnten. Außerdem wurden mehrere stressrelevante Enzyme in mykorrhizierten Pflanzen unterschiedlich reguliert, was einen Hinweis auf eine allgemein erhöhte Stresstoleranz in mykorrhizierten Pflanzen darstellen könnte.

Eine vollständige Klärung der konkreten Funktionen aller differenzierten Proteinregulationen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden. Für eine weitere Diskussion der AM-Wirkung auf den Pflanzenstoffwechsel sind in der Zukunft insbesondere Untersuchungen der Proteinregulation in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung im Zusammenhang mit verschiedenen Stresssituationen erforderlich.

## 7.6 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die Zielstellung erreicht worden, positive Einflüsse einer arbuskulären Mykorrhizierung im Heil- und Gewürzpflanzenanbau am Beispiel der Modellpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut mittels eigens etablierter, ausreichend spezifischer und sensitiver Analysenmethoden zu belegen.

Mykorrhizabedingte Ertragssteigerungen wurden besonders deutlich im Falle von Thymian nachgewiesen.

Gleichermaßen wurden Verbesserungen der Qualität der Heil- und Gewürzpflanzen durch AM-Inokulation aufgezeigt. An Thymian führte die Mykorrhizierung zu erhöhten Gehalten an ätherischem Öl und damit zu einer qualitativen Aufwertung des Pflanzenmaterials für Lebensmittelindustrie und Pharmazie. Eine weitere Qualitätssteigerung wurde durch die infolge der Mykorrhizierung erzielte Steigerung der Thymol- und p-Cymen-Gehalte im ätherischen Öl erreicht. In diesem Zusammenhang wurde eine geeignete Extraktions- und Analysenmethode zur Bestimmung der Zusammensetzung aromagebender Inhaltsstoffe von Heil- und Gewürzpflanzen etabliert und optimiert.

Positive Wirkungen hatte die Mykorrhizierung auch auf die Pflanzenqualität von Johanniskraut. Hier wiesen mykorrhizierte Pflanzen erhöhte Hypericingehalte auf, was für ihre Verwendung als Phytopharmaka von großer Bedeutung ist.

Die deutlichsten Effekte der arbuskulären Mykorrhiza auf den Ertrag und die Pflanzenqualität waren anhand der über mehrere Versuchsjahre durchgeführten Untersuchungen v.a. unter ungünstigen Witterungsbedingungen erzielt worden.

Im Rahmen der Arbeit wurde außerdem der Nachweis erbracht, dass eine gut etablierte Mykorrhizierung die Toleranz von Johanniskrautpflanzen gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* erhöht und die Pflanzen somit vor stärkeren Schädigungen bewahrt. In mykorrhizierten Pflanzen arbeiteten die antioxidativen Enzyme über einen längeren Zeitraum stabil. ROS-detoxifizierende Enzyme wiesen erhöhte Aktivitäten auf, Antioxidantien wurden regeneriert und auch das Vorschreiten der Lipidperoxidation wurde in mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Pflanzen gehemmt.

Schließlich wurden erstmals auch systemische Wirkungen einer Mykorrhizierung auf die Proteinexpression im oberirdischen Pflanzenmaterial der Modellpflanzen Majoran und Johanniskraut nachgewiesen. Hierzu wurde erfolgreich eine 2-D-Elektrophorese-Methode zur Trennung der Proteine des Blattmaterials ausgewachsener Majoran- und Johanniskrautpflanzen etabliert und optimiert.

Unter den in mykorrhizierten Majoran- und Johanniskrautpflanzen differenziert regulierten Proteinen wurden insbesondere die Photosynthese betreffende Proteine als positiv beeinflusst identifiziert, aber auch stressrelevante Enzyme wurden in mykorrhizierten Pflanzen unterschiedlich zu nicht mykorrhizierten reguliert.

Für eine vollständige Klärung der AM-Wirkung auf die Proteinregulation und deren konkrete Funktionen sind weiterführende Untersuchungen in Abhängigkeit von der Mykorrhizierung im Zusammenhang mit verschiedenen Stresssituationen erforderlich.

Eine Mykorrhizierung wäre damit für die Produktion von Gewürzen für den Einsatz in Lebensmitteln sowie von Phytopharmaka von Vorteil. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führt der Einsatz arbuskulärer Mykorrhizapilze im Heil- und Gewürzpflanzenanbau zu

- Ertragssteigerungen des verwertbaren Pflanzenmaterials,
- erhöhter Pflanzenqualität durch erhöhte Gehalte und / oder verbesserte Zusammensetzung der wertgebenden Inhaltsstoffe und schließlich zu
- verbesserter Pflanzengesundheit und erhöhter Stresstoleranz.

## 8 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Heil- und Gewürzpflanzen liegt in ihrer Verwendung als würzende Zutat von Lebensmitteln sowie in ihrem Einsatz als Phytopharmaka. Einer wachsenden Nachfrage an möglichst biologisch angebauten Gewürzen sowie pflanzlichen Wirkstoffen der Pharmakologie mit regionaler Herkunft stehen jedoch oftmals anbautechnische Schwierigkeiten gegenüber.

Aufgrund der Fähigkeit von arbuskulären Mykorrhizapilzen, ihren Wirtspflanzen eine bessere Anpassung an die vorherrschenden Standortbedingungen zu ermöglichen und den Pflanzen damit einen erhöhten Gesundheitsstatus zu vermitteln, könnte die Mykorrhizierung den derzeitigen Anbauproblemen in vielerlei Hinsicht entgegenwirken. Durch Unterstützung bei der Wasser- und Nährstoffaufnahme in die Pflanze, die Beeinflussung des Phytohormonhaushaltes und die Regulation des Proteinstoffwechsels führt eine Mykorrhizierung nicht selten zu Ertragssteigerungen, Veränderungen der Inhaltsstoffgehalte und -zusammensetzungen wie auch zu einer verbesserten Pflanzengesundheit [FELDMANN, 1988].

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit Hilfe von geeigneten analytischen Methoden die Wirkung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf den Ertrag und die Inhaltsstoffqualität sowie auf die Pflanzengesundheit zu untersuchen und auszuwerten bzw. zu diskutieren.

Die Arbeit beinhaltete dazu folgende Teilziele:

- die Bestimmung und Interpretation von Ertragswerten mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter Pflanzen sowie
- die Analyse und Auswertung der wertgebenden Inhaltsstoffe der Heil- und Gewürzpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut als Parameter für die Pflanzenqualität, wozu der Aufbau und die Optimierung einer analytischen Methode zur Bestimmung der Aromakomponenten in Majoran und Thymian erforderlich war, weiterhin
- die Bestimmung von Enzymaktivitäten und Antioxidantien des Antioxidativen Systems und des Grades der Lipidperoxidation zur Charakterisierung der durch Mykorrhiza-Einfluss hervorgerufenen Verbesserung der Toleranz von Johanniskrautpflanzen gegenüber dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* sowie
- die Etablierung und Optimierung einer zweidimensionalen Elektrophoresemethode zur Trennung von Proteinen aus dem oberirdischen Pflanzenmaterial ausgewachsener Majoran- und Johanniskrautpflanzen und deren Einsatz für den Vergleich von Proteinexpressionen in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen zur Diskussion eines systemischen Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza auf den Stoffwechsel und die Toleranz der Pflanzen.

Zur Bestimmung der aromagebenden Inhaltsstoffe aus Majoran und Thymian wurde aus den Probenvorbereitungsverfahren Wasserdampfdistillation, Lösungsmittlextraktion, Beschleunigte Lösungsmittlextraktion, Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid und Festphasenmikroextraktion die zuletzt genannte Methode als vorteilhaftestes Verfahren ermittelt. Die Festphasenmikroextraktion stellte sich als besonders schonend gegenüber den genuinen Aromainhaltsstoffen der Pflanzen heraus, extrahierte den geringsten Anteil nicht aromagebender nicht flüchtiger Verbindungen und war weiterhin durch eine besonders hohe Automatisierbarkeit, Robustheit und Routinesicherheit gekennzeichnet. Die Festphasenmikroextraktion wurde im Rahmen der Arbeit für die Extraktion der aromagebenden Verbindungen in Majoran und Thymian mit anschließender gaschromatographischer Bestimmung der Peakflächen-Prozente erfolgreich optimiert.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zum Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza auf die Biomasse und die Inhaltsstoffe belegten schon in den Gewächshausversuchen die bereits in der Literatur beschriebene Präferenz von Pflanzen für bestimmte ar-

buskuläre Mykorrhiza-Inokula sowie die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener arbuskulärer Mykorrhizapilze auf Ertrag und Inhaltsstoffsynthese bei den Pflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut. Der kommerziell erwerbliche AMykor®-Blähton zeigte bei allen drei untersuchten Kulturen gute Mykorrhizierungsergebnisse und wurde deshalb auch in den durchgeführten Feldversuchen eingesetzt.

Thymian erwies sich im Vergleich zu Majoran und Johanniskraut als die am besten mykorrhizierbare Kultur. Auch die erzielten Ertragssteigerungen sowie die Erhöhung der ätherischen Ölgehalte waren für diese Kultur am deutlichsten. Die Inhaltsstoffzusammensetzung von Thymian wurde durch die Mykorrhizierung häufig zugunsten der thymiantypischen Aromakomponenten p-Cymen und Thymol verschoben. Für Majoran wurden keine reproduzierbaren Effekte von arbuskulären Mykorrhizapilzen auf Ertrag und Inhaltsstoffe detektiert. Bei Johanniskraut zeigte sich eine Erhöhung der wertgebenden Inhaltsstoffe Hypericin und Pseudohypericin durch die Mykorrhizierung. Damit wurde neben der Ertragssteigerung insbesondere auch eine erhöhte Qualität der mykorrhizierten Pflanzen in Form erhöhter Anteile und verbesserter Zusammensetzung wertgebender Inhaltsstoffe nachgewiesen.

Diese positiven Effekte der Mykorrhizierung wurden sowohl unter ökologischen als auch unter konventionellen Feldanbaubedingungen bestätigt.

Eine deutliche Beeinflussung von Erträgen und Inhaltsstoffen wurde besonders im trockenen Anbaujahr 2003 beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Mykorrhizierungseffekte in den Pflanzen nicht nur durch eine wachstumsfördernde Wirkung der arbuskulären Mykorrhiza hervorgerufen wurden, sondern vor allem auch durch die Erhöhung der Toleranz der mykorrhizierten Pflanzen gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen.

Der Befall von Johanniskraut mit dem Welkeerreger *Colletotrichum cf. gloeosporioides* führte im Falle einer vorherigen Mykorrhizierung phänotypisch sichtbar zu deutlich geringeren Welkesymptomen zweier Johanniskrautsorten unterschiedlicher Toleranzstufen. Außerdem wurde das Krautgewicht der mykorrhizierten Pflanzen gegenüber nicht mykorrhizierten sowohl bei gesunden als auch bei befallenen Pflanzen gesteigert.

Bei Untersuchungen von Enzymen und Antioxidantien des Antioxidativen Systems wurden am Beispiel des Pathosystems Johanniskraut - *Colletotrichum cf. gloeosporioides* außerdem deutliche Effekte der Mykorrhizierung auf den Ascorbat-Glutathion-Zyklus gezeigt. Insbesondere der Ascorbat-Weg war dabei zunächst von dem Befall mit dem Erreger betroffen und kam bei starkem Befall beinahe zum Erliegen. Durch vorherige Mykorrhizierung wurden aber insbesondere die Enzymaktivitäten des Ascorbat-Kreislaufs sowie das Redoxgleichgewicht der reduzierten und oxidierten Form der Ascorbinsäure stabilisiert. Auch das Voranschreiten der Lipidperoxidation nach Pathogenbefall zeigte sich durch vorherige Mykorrhizierung eingeschränkt.

Die tolerantere Sorte ‚Topaz‘ erwies sich in den Versuchen erwartungsgemäß als widerstandsfähiger als die „anfällige Standardsorte“. Positive Effekte der Mykorrhizierung auf den antioxidativen Status der Pflanzen bei Pathogenbefall wurden aber bei beiden Sorten festgestellt. Die Toleranz der Pflanzen gegenüber dem Welkeerreger wird somit durch die Beeinflussung der abwehrrelevanten Enzyme und Antioxidantien der Pflanzen bei vorheriger Mykorrhizierung deutlich gesteigert.

Für die Untersuchung der durch Mykorrhizierung beeinflussten Proteinexpressionen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelungen, eine zweidimensionale Elektrophoresemethode zur Trennung der Proteine des oberirdischen Pflanzenmaterials ausgewachsener Majoran- und Johanniskrautpflanzen zu etablieren und zu optimieren. Dabei wurden die bekannten Probleme bei der Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe insbesondere durch physikalisch-mechanische Verbesserungen der Fällungsmethode für die Proteine sowie durch die Anpassung und Optimierung des Lösungspuffers zur Wiederaufnahme der gefällten Proteine gelöst. Diese Arbeit zeigt damit erstmals eine zweidimensionale elektrophoretische Trennung der Proteine des oberirdischen Pflanzengewebes von Majoran und Johanniskraut. Im Rahmen der Arbeit wird außerdem eine verbesserte Methode zur Extraktion von Proteinen aus-

gewachsener Pflanzen vorgestellt. Die optimierte Methode konnte erfolgreich zum Vergleich der Proteinexpressionen von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Johanniskraut- und Majoranpflanzen eingesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt am Beispiel von Majoran und Johanniskraut erstmals den Vergleich der Proteinmuster von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Pflanzen am oberirdischen Pflanzenmaterial und ist damit der erste Beleg für die systemische Wirkung der Mykorrhizierung auf die Proteinexpression in Pflanzen.

Insbesondere photosyntheserelevante Proteine wurden durch eine Mykorrhizierung mit dem kommerziellen AMykor<sup>®</sup>-Blähton in den meisten Fällen heraufreguliert.

In der „anfälligen Standardsorte“ des Johanniskrauts wurde zudem die Expression stressrelevanter Enzyme, wie der Superoxid-Dismutase oder der Aldehyd-Dehydrogenase, auf das Niveau der toleranten Johanniskrautsorte ‚Topaz‘ gesenkt. Das legt die Vermutung nahe, durch die Mykorrhizierung stressrelevante Enzyme beeinflussen zu können und damit die Toleranz dieser Sorte – eventuell sogar gegenüber verschiedenen Stressfaktoren - zu erhöhen.

Die Funktionen aller in mykorrhizierten Pflanzen als differenziert regulierten Proteine konnten dabei noch nicht geklärt werden. Um die durch arbuskuläre Mykorrhizapilze hervorgerufene Beeinflussung der Proteinexpression und deren Effekt auf die Pflanze genauer zu verstehen, sollten in der Zukunft auch Untersuchungen zur Proteinexpression mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter Pflanzen unter verschiedenen Stresssituationen durchgeführt werden.

Zusammenfassend wurde die Zielstellung erreicht, positive Einflüsse einer arbuskulären Mykorrhizierung

- auf die Biomasseerträge und
- auf die Pflanzenqualität in Bezug auf den Gehalt und die Zusammensetzung wertgebender Inhaltsstoffe der Heil- und Gewürzpflanzen Majoran, Thymian und Johanniskraut,
- auf den antioxidativen Status des Johanniskrauts am Beispiel des Pathosystems Johanniskraut - *Colletotrichum cf. gloeosporioides* sowie
- auf die systemische Proteinexpression im oberirdischen Pflanzenmaterial von Majoran und Johanniskraut

mittels eigens etablierter, ausreichend spezifischer und sensitiver Analysenmethoden zu belegen.

## 9 Summary

The importance of herbal and medicinal plants is determined by their use as flavouring ingredients in food as well as their application in phytopharmaceuticals. However, meeting the growing demand for biologically cultivated spices and plant active agents for pharmacology of regional origin is often faced by technical difficulties during cultivation.

Arbuscular mycorrhizal fungi can improve their host's adaptation to the prevailing local conditions and they can therefore increase the state of health of plants. That is why mycorrhization could antagonise a lot of actual cultivation problems. Mycorrhization supports water- and nutrient uptake to the plant, influences the balance of phytohormones and controls protein metabolism. Therefore mycorrhization often causes yield increases, changes the amount and composition of valuable ingredients and improves plant health [FELDMANN, 1988].

Therefore, the aim of the present work was to analyse, to evaluate and to discuss the effects of an arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant yield, quality of plant ingredients and plant state of health with the help of appropriate analytical methods.

The aim of this paper was divided into the following parts:

- the determination and interpretation of yield values of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants as well as
- the analyses of valuable ingredients and evaluation of the results of the herbal and medicinal plants marjoram, thyme and St. John's wort, therefore the establishment and optimisation of an analytical method for the determination of the aroma components of marjoram and thyme as a parameter for the plant quality, furthermore
- the determination of enzyme activities and antioxidants of the antioxidative system and the degree of lipidperoxidation to characterise an improvement of the tolerance of St. John's wort to the wilt inducing pathogen *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* after mycorrhization as well as
- the establishment and optimisation of a two-dimensional electrophoresis method for the separation of proteins from the aerial plant material of adult marjoram and St. John's wort plants and its use for the comparison of the protein expressions of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants to discuss a systemic influence of arbuscular mycorrhiza on plant metabolism and tolerance.

For the determination of the aroma-active ingredients of marjoram and thyme, it became apparent that out of the extraction methods steam distillation, solvent extraction, accelerated solvent extraction, supercritical fluid extraction and solid phase microextraction the last technique was the most advantageous method for the following gas chromatographic analysis. Solid phase microextraction was especially gentle to the genuine aromatic ingredients of the plants, extracted the smallest part of non-aroma-active and non-volatile substances and was also characterised by high degrees of automation, robustness and routine safety.

In the context of the investigations described here, solid phase microextraction was successfully optimised for the extraction of the aroma-active ingredients of marjoram and thyme with subsequent gas chromatographic determination of the peak area portions.

The preference of plants for special arbuscular mycorrhiza inocula and the different effects of various inocula on yield and ingredients of plants had already been outlined in literature. Some of these results had been proven within greenhouse experiments by the results presented in this paper regarding the impact of arbuscular mycorrhiza on biomass and ingredients of the plants marjoram, thyme and St. John's wort. The commercially available AMykor<sup>®</sup> expanded clay showed good mycorrhization results for all the three cultures investigated and was therefore also used in the established field experiments.

Thyme has been shown to be the best mycorrhizable culture in comparison to marjoram and St. John's wort. Also the yield increases obtained and the increases of essential oil yields

were most evident for this culture. The composition of the valuable ingredients of thyme was often regulated in favour of the thyme-typical ingredients p-cymene and thymol. No reproducible impact of arbuscular mycorrhizal fungi on yield and ingredients could be detected for marjoram. An increase of the valuable ingredients hypericin and pseudohypericin was indicated in St. John's wort. Thus, besides yield increases, especially an improved quality of mycorrhizal plants through increased amounts and enhanced composition of valuable ingredients, could be proven.

The positive effects of mycorrhization were confirmed under ecological as well as conventional cultivation conditions.

A clear influence on yield and plant ingredients could especially be observed in the dry cultivation year 2003. It is therefore suggested that the impacts of mycorrhization on the plants are not only due to a growth promoting effect of the arbuscular mycorrhizal fungi but particularly due to an increase of the plants' tolerance to several stressors.

After mycorrhization, the attack of St. John's wort with the wilt disease pathogen *Colletotrichum cf. gloeosporioides* led to phenotypically clearly reduced wilt symptoms of two St. John's wort cultivars with different tolerance levels. Furthermore, the herb yield in mycorrhizal plants was increased in comparison to non-mycorrhizal plants of healthy as well as of pathogen-infected plants.

Using the example of the pathosystem St. John's wort – *Colletotrichum cf. gloeosporioides*, a clear impact of mycorrhization on the ascorbate-glutathione-cycle was shown with the help of investigations of enzymes and antioxidants of the antioxidative system. Especially the ascorbate cycle was first affected by the attack of the pathogenic fungus and was nearly succumbed at increased infestation. However, an early established mycorrhiza especially stabilised the enzyme activities of the ascorbate cycle as well as the redox status of reduced and oxidised ascorbate. The development of lipidperoxidation after pathogen attack was also reduced in mycorrhizal plants.

As expected, the more tolerant cultivar 'Topaz' was shown to be more resistant than the „susceptible standard“ cultivar. Positive effects of mycorrhization, however, could be determined with both cultivars. The tolerance of plants to the wilt disease inducing pathogen can therefore clearly be increased through the impact of mycorrhization on defence-related enzymes and antioxidants of the plants.

In the scope of the present work a two-dimensional electrophoresis method for the separation of proteins of the aerial plant material of adult marjoram and St. John's wort plants was successfully established and optimised for the determination of the protein expressions affected by mycorrhization. The well-known problems of protein extraction out of plant tissue were overcome particularly through physical-mechanical improvements of the precipitation method of the proteins as well as through the adaptation and optimisation of the solvent buffer for the resolubilisation of the precipitated proteins. Hence, for the first time, this work presents a two-dimensional electrophoretic separation of proteins of the aerial plant tissue of marjoram and St. John's wort. Furthermore, this paper introduces an improved method for the extraction of proteins of adult plant tissues. The optimised method was successfully used for the comparison of protein expressions of mycorrhizal and non-mycorrhizal St. John's wort and marjoram plants.

Using the examples of marjoram and St. John's wort, this paper presents for the first time the comparison of the protein patterns of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of the aerial plant material and is therefore the first prove of a systemic effect of mycorrhization on protein expressions in plants.

In particular, photosynthesis-related proteins have been upregulated in most cases in response to mycorrhization with the commercial AMykor<sup>®</sup> expanded clay.

Moreover, stress-related enzymes of the „susceptible standard“ cultivar of St. John's wort, as superoxide dismutase or aldehyde dehydrogenase, were downregulated to the level of the

more tolerant cultivar ,Topaz'. This supports the assumption that stress-related enzymes can be influenced by mycorrhization and that therefore the tolerance of this cultivar – possibly even to several stress situations – can be increased.

The functions of all the proteins, which were differentially regulated in mycorrhizal plants, could not yet be explained. In order to understand the protein expression of plants influenced by arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on the plant more clearly, further investigations of protein expression in the future should also include mycorrhizal and non-mycorrhizal plants in various stress situations.

In conclusion, with the help of self-established analysis methods of sufficient specificity and sensitivity, the aim of proving possible impacts of arbuscular mycorrhization

- on biomass yield and
- on plant quality with regard to the content and composition of valuable ingredients of the herbal and medicinal plants marjoram, thyme and St. John's wort,
- on the antioxidative status of St. John's wort using the example of the pathosystem St. John's wort – *Colletotrichum cf. gloeosporioides* as well as
- on the protein expressions of the aerial plant material of marjoram and St. John's wort was achieved.

---

## Literaturverzeichnis

- Abdel-Fattah, G. M.; Siibana, Y. M.** (2002): Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root pathogen *Rhizoctania solani*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 109, 207-215
- Abdul-Khaliq, K.; Janardhanan, K. K.** (1994): Variation of native VA-mycorrhizal association on cultivated species of mint. Symbiosis 16, 75-82
- Abdul-Khaliq, K.; Janardhanan, K. K.** (1997): Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the productivity of cultivated mints. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 19, 7-10
- Adams, R. P.** (1995): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation Carol Stream
- Aebi, H.** (1984): Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105, 121-126
- Albrecht, H.; Redeker, D.; Thierfelder, H.; Werner, D.** (1996): Increases in  $\alpha$ -mannosidase activity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis of *Allium schoenoprasum*. Mycorrhiza 6, 31-34
- Alguacil, M.; Caravaca, F.; Díaz-Vivancos, P.; Hernández, J. A., Roldán, A.** (2006): Effect of arbuscular mycorrhizae and induced drought stress on antioxidant enzyme and nitrate reductase activities in *Juniperus oxycedrus* L. grown in a composted sewage sludge-amended semi-arid soil. Plant and Soil 279, 209-218
- Alscher, R. G.; Donahue, J. L.; Cramer, C. L.** (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiologia Plantarum 100, 224-233
- Amme, S.; Matros, A.; Schlesier, B.; Mock, H.-P.** (2006): Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. Journal of Experimental Botany 57, 1537-1546
- Amtliche Außenhandelsstatistik** (2005): Marktentwicklung 2005. In: [www.gewuerz-industrie.de/presse/pdfs/Marktentwicklung2005.pdf](http://www.gewuerz-industrie.de/presse/pdfs/Marktentwicklung2005.pdf), 03.05.2006
- Arora, A.; Sairam, R. K.; Srivastava, G. C.** (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82, 1227-1238
- Asada, K.** (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum 85, 235-241
- Azcón, R.; Tobar, R. M.** (1998): Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa* effect of drought stress. Plant Science 133, 1-8
- Azcón-Aguilar, C.; Barea, J. M.** (1996): Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6, 457-464
- Azcón-Aguilar, C.; Jaizme-Vega, M. C.; Calvet, C.** (2002): The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. Gianinazzi, S.; Schüepp, H.; Barea, J. M.; Haselwandter, K. (Hrsg.): Mycorrhizal technology in agriculture. Switzerland: Birkhäuser-Verlag, 187-197
- Bagyaraj, D. J.; Sreeramulu, K. R.** (1982): Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. Plant and Soil 69, 375-381
- Baltruschat, H.** (1993): Zur ökosystemaren Bedeutung der VA Mykorrhiza in Agrarökosystemen und Möglichkeiten der praktischen Nutzung dieser Symbiose. Fachbereich 17 Agrarwissenschaften und Umweltsicherung, Justus-Liebig-Universität Gießen, Habilitation
- Baltruschat, H.** (2006): Mündliche Mitteilung. Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Barazandeh, M. M.** (2001): Essential oil composition of *Origanum majorana* L. from Iran. Journal of Essential Oil Research 13, 76-77

- Bauer, D.; Biehler, K.; Fock, H.; Carrayol, E.; Hirel, B.; Migge, A.; Becker, T. W.** (1997): A role of cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum* 99, 241-248
- Baysal, T.; Starmans, D. A. J.** (1999): Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene of caraway seed. *Journal of Supercritical Fluids* 14, 225-234
- Berkelman, T.; Stenstedt, T.** (1998); mit Kontribution von: Bjellqvist, B.; Laird, N.; McDowell, M; Olsson, I; Westermeier, R: 2-D electrophoresis using immobilized gradients. Principles and methods. Firmenschrift Amersham Biosciences
- Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S.** (2002a): Mycorrhiza-related chitinase and chitosanase activity isoforms in *Medicago truncatula* Gaertn. *Symbiosis* 32, 173-194
- Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Poinot, V.; Dieu, M.; Dierick, J.-F.; van Tuinen, D.; Remacle, J.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S.** (2002b): Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 23, 122-137
- Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.** (2004a): Proteomics as a tool to monitor plant-microbe endosymbiosis in the rhizosphere. *Mycorrhiza* 14, 1-10
- Bestel-Corre, G.; Gianinazzi, S.; Dumas-Gaudot, E.** (2004b): Impact of sewage sludges on *Medicago truncatula* symbiotic proteome. *Phytochemistry* 65, 1651-1659
- Bethlenfalvay, G. J.; Barea, J.-M.** (1994): Mycorrhizae in sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 9, 157
- Bicchi, C.; Drigo, S.; Rubiolo, P.** (2000): Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatography analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 892, 469-485
- Blilou, I.; Bueno, P.; Ocampo, J. A.; Garcia-Garrido, J. M.** (2000): Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 104, 722-725
- Blum, C.** (1999): Analytik und Sensorik von Gewürzextrakten und Gewürzölen. Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharmazeutische Biologie, Universität Hamburg, Dissertation
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J.** (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438
- Bodker, L.; Kjoller, R.; Rosendahl, S.** (1998): Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* 8, 169-174
- Bolwell, G. P.; Wojtaszek, P.** (1997): Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 347-366
- Bomme, U.** (1998): Situation und Zukunftsperspektiven des Feldanbaues von Heil- und Gewürzpflanzen in Deutschland. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 3, 155-161
- Borowicz, V. A.** (2001): Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen interactions? *Ecology* 82, 3057-3068
- Boucher, A.; Dalpé, Y.; Charest, C.** (1999): Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological response of maize. *Journal of Plant Nutrition* 22, 783-797
- Brechenmacher, L.; Weidmann, S.; van Tuinen, D.; Chatagnier, O.; Gianinazzi, S.; Franken, P.; Gianinazzi-Pearson, V.** (2004): Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interaction. *Mycorrhiza* 14, 253-262
- Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L.** (2000): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists

- Camprubi, A.; Estaun, V.; Calvet, C.; Pera, J.** (1990): Infectivity and effectivity of *Glomus mosseae* mycorrhizae in four different species of medicinal plants. *Symbiosis* 9, 305-308
- Camprubi, A.; Estaun, V.; Calvet, C.** (1992): Effect of aromatic plant species on vesicular-arbuscular mycorrhizal establishment. *Plant and Soil* 139, 299-301
- Caravaca, F.; Alguacil, M. M.; Hernández, J. A.; Roldán, A.** (2005): Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. *Plant Science* 169, 191-197
- Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P.; Swennen, R.; Panis, B.** (2005): Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5, 2479-2507
- Casado-Vela, J.; Sellés, S.; Martínez, R. B.** (2005): Proteomic approach to blossom-end rot in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* M.): Antioxidant enzymes and the pentose-phosphate pathway. *Proteomics* 5, 2488-2496
- de Castro, M. D. L.; Jiménez-Carmona, M. M.; Fernandez-Perez, V.** (1999): Towards more rationable techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry* 18, 708-716
- Chang, D. C. N.** (1994): What is the potential for management of vesicular – arbuscular mycorrhizae in horticulture? Robson, A. D.; Abbott, L. K.; Malajczuk, N. (Hrsg.): Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, 187
- Chen, K.-M.; Gong, H.-J.; Chen, G.-C.; Wang, S.-M.; Zhang, C.-L.** (2004): Gradual drought under field conditions influences the glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. *Journal Plant Growth Regulation* 23, 20-28
- Chivasa, S.; Hamilton, J. M.; Pringle, R. S.; Ndimba, B. K.; Simon, W. J.; Lindsey, K.; Slabas, A. R.** (2006): Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 57, 1553-1562
- Christensen, A. B.; Thordal-Christensen, H.; Zimmermann, G.; Gjetting, T.; Lyngkjær, M. F.; Dudler, R.; Schweizer, P.** (2004): The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *MPMI* 17, 109-117
- Colditz, F.; Nyamsuren, O.; Niehaus, K.; Eubel, H.; Braun, H.-P.; Krajinski, F.** (2004): Proteomic approach: Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology* 55, 109-120
- Coleman, W. M., Lawrence, B. M.** (2000): Examination of the enantiomeric distribution of certain monoterpene hydrocarbons in selected essential oils by automated solid-phase microextraction-chiral gas chromatography-mass selective detection. *Journal Chromatographic Science* 38, 95-99
- Coleman, W. M.; Lawrence, B. M.; Craven, S. H.** (2004): The use of a non-equilibrated solid phase microextraction method to quantitatively determine the off-notes in mint and other essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1223-1228
- O'Connor, P. J.; Smith, S. E.; Smith, F. A.** (2002): Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in semiarid herbland. *New Phytologist* 154, 209-218
- Copetta, A.; Lingua, G.; Berta, G.** (2006): Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* 16, 485-494
- Cordier, C.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.** (1996): Colonisation patterns of root tissue by *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil* 185, 223-232

- Cordier, C.; Pozo, M. J.; Barea, J. M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.** (1998): Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 1017-1028
- Cornu, A.; Carnat, A.-P.; Martin, B.; Coulon, J.-B.; Lamaison, J.-L.; Berdagué, J.-L.** (2001): Solid-phase microextraction of volatile compounds from natural grassland plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 203-209
- Cornwell, C. P.; Leach, D. N.; Wyllie, S. G.** (1999): The origin of terpinen-4-ol in the steam distillates of *Melaleuca argentea*, *M. dissitiflora*, *M. linariifolia*. *Journal of Essential Oil Research* 11, 49-53
- Cui, M.; Caldwell, M. M.** (1996): Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. I. Roots and hyphae exploiting the same soil volume. *New Phytologist* 133, 453-460
- Czerwinsky, J.; Zygmunt, B.; Namiesnik, J.** (1996): Head-space solid phase microextraction for the GC-MS analysis of terpenoids in herb based formulations. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 356, 80-83
- Czygan, F.-C.; Hänsel, R.** (1993): Thymian und Quendel – Arznei- und Gewürzpflanzen. *Zeitschrift für Phytotherapie* 14, 104-110
- DAB 10** (1991): Deutsches Arzneibuch. 10. Ausgabe vom 17.12.1991, Stuttgart: Deutscher Apotheker-Verlag
- DAC** (2000): Deutscher Arzneimittel Codex. Monographie Eisenkraut 1997. Stuttgart: Deutscher Apotheker-Verlag
- Damerval, C.; de Vienne, D.; Zivy, M.; Thiellement, H.** (1986): Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54
- Dani, V.; Simon, W. J.; Duranti, M.; Croy, R. R. D.** (2005): Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics* 5, 737-745
- Dassi, B.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.** (1998): Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 167-183
- Deene, S.; Garampalli, R.; Reddy, C. N.** (2004): Influence of dual inoculation with vesicular arbuscular mycorrhiza (*Glomus aggregatum*) and *Fusarium udum* on plant vigour and wilt disease incidence of pigeonpea. *Phytomorphology* 54, 23-29
- Dehne, H.-W.** (1997): Arbuskuläre Mykorrhizapilze als Faktoren im Integrierten Pflanzenbau. Backhaus, G. F.; Feldmann, F. (Hrsg.): Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. Berlin-Dahlem: Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 332, 8
- Demirevska-Pekova, K.; Hölzer, R.; Simova-Stoilova, L.; Feller, U.** (2005): Heat stress effects on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCo binding protein and RuBisCo activase in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 49, 521-525
- Diédhiou, P. M.** (2001): Untersuchungen zum Auftreten und zur Bedeutung der arbuskulären Mykorrhizapilze für die Pflanzengesundheit und –vitalität. Institut für Pflanzenkrankheiten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation
- Dionex** (1995): ASE™ 200 für die beschleunigte Lösemittelextraktion. Sunnyvale, Idstein, Olten, Wien: Firmenschrift der Dionex Corporation
- Distler, D.; Schulz, H.** (2003): SPME-GC-Bestimmung flüchtiger Wertkomponenten in Medizinaldrogen und Phytopharmaka. *Lebensmittelchemie* 57, 21-22
- Doll, J.; Hause, B.; Demchenko, K.; Pawlowski, K.; Krajinski, F.** (2003): A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. *Plant and Cell Physiology* 44, 1208-1214

- Dugassa, G. D.; von Alten, H.; Schönbeck, F.** (1996): Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant and Soil* 185, 173-182
- Dumas-Gaudot, E.; Grenier, J.; Furlan, V.; Asselin, A.** (1992): Chitinase, Chitosanase and beta-1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. *Plant Science* 84, 17-24
- Eckey, C.** (2002): Isolierung und Charakterisierung pathogen-induzierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Markerentwicklung für den Mlg Resistenzlocus mittels cDNA-AFLP. Fachbereich Biologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation
- FAH** (2002); Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V.: Chancen und Potential des deutschen Arzneipflanzenanbaus. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) (Hrsg.): Gülzower Fachgespräche, Band 20
- O'Farrell, P. H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021
- Feldmann, F.; Weritz, J.; Boyle, C.; Backhaus, G. F.** (1996): Symbiontische Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. *Deutscher Gartenbau* 1, 10-13
- Feldmann, F.** (1998): Symbiontententechnologie in der Praxis: Arbuskuläre Mykorrhiza im Gartenbau. Braunschweig: Thalacker-Medien
- Feldmann, F.** (1999): Mykorrhizaeinsatz im Pflanzenbau. *Deutscher Gartenbau* 17, 24-26
- Feldmann, F.; Hutter, I.; Niemann, P.; Weritz, J.; Grotkass, C.; Boyle, C.** (1999): Einbindung der Mykorrhizatechnologie in die Heil- und Zierpflanzenproduktion sowie den Endverkauf. Backhaus, G. F.; Feldmann, F. (Hrsg.): Arbuskuläre Mykorrhiza in der Pflanzenproduktion: Praxisbeispiele und Perspektiven. Berlin-Dahlem: Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 363, 6-38
- Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F.** (1987): Original flavour compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench.). *Flavour and Fragrance Journal* 2, 55-61
- Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F.** (1988): Original composition of marjoram flavour and its changes during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 998-1003
- FNR** (2005); Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (Hrsg.): Anbauflächen in Deutschland. In: <http://www.fnr-server.de/cms35/64.0.html>, 03.05.2006
- Foyer, C. H.; Decourvières, P.; Kunert, K. J.** (1994): Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17, 507-523
- Franke, R.; Dehe, M.** (2003): Ökologischer Anbau von Arznei- und Gewürzpflanzen in Deutschland – Stand und Probleme. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 8, 17-26
- Freitas, M. S. M.; Martins, M. A.; Vieira, E. I. J. C.** (2004): Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 39, 887-894
- Fries, L. L. M.; Pacovsky, R. S.; Safir, G. R.** (1996): Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and Formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 981-988
- Fritz, M.; Jakobsen, I.; Lyngjaer, M. F.; Thordal-Christensen, H.; Pons-Kühnemann, J.** (2006): Arbuscular Mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16, 413-419
- Gärber, U.** (2003): Johanniskrautwelke, *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*, Ergebnisse mehrjähriger Forschungsarbeiten im Überblick. *Drogenreport* 16, 23-28
- Garfin, D.; Heerdt L.** (2004); mit Kontribution von: Castle, L.; Dale, E.; Harbers, A.; Sadownick, B.; Strong, W.; Whitman, C.; Zhu, M.: 2-D electrophoresis for proteomics: A method and product manual. Bio-Rad Laboratories, Inc. In: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), 01.09.2004

- Garmendia, I.; Goicoechea, N.; Aguirreolea, J.** (2004a): Antioxidant metabolism in asymptomatic leaves of *Verticillium*-infected pepper associated with an arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Phytopathology* 152, 593-599
- Garmendia, I.; Goicoechea, N.; Aguirreolea, J.** (2004b): Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against *Verticillium* wilt. *Biological Control* 31, 296-305
- George, E.; Haussler, K. U.; Vetterlien, D., Gorgus, E.; Marschner, H.** (1992): Water and nutrient translocation of *Glomus mosseae*. *Canadian Journal of Botany* 70, 2130-2137
- Gerhardt, U.** (1994): Gewürze in der Lebensmittelindustrie: Eigenschaften – Technologien – Verwendung. Hamburg: Behr-Verlag, 2. Aufl.
- Gernns, H.; von Alten, H.; Poehling, H.-M.** (2001): Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11, 237-243
- Giavalisco, P.** (2003): Proteomanalyse von Pflanzen. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, Dissertation
- Giovanetti, M.; Fortuna, P.; Citerinesi, A. S.; Morini, S.; Nuiti, M. P.** (2001): The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151, 717-727
- Gobena, D. D.** (1995): Zum Einfluss der vesikulären-arbuskulären Mykorrhiza auf Wachstum, Entwicklung und Gesundheit von Lein (*Linum usitatissimum* L.). Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover, Dissertation
- Görg, A.; Postel, W.; Günther, S.** (1988): Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546
- Görg, A.** (1999): IPG-Dalt of very alkaline proteins. Link, A.J. (Hrsg.): *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Görg, A.; Weiss, W.** (1999): Analytical IPG-Dalt methods in molecular biology. Link, A.J. (Hrsg.): *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W.** (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053
- Görg, A.; Weiss, W.** (2000): Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Rabilloud, Th. (Hrsg.): *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag
- Görg, A.; Boguth, G.; Harder, A.; Obermaier, B.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W.** (2003): Two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients. Technische Universität München. In: [www.weihenstephan.de/blm/deg/manual/manfrm.htm](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/manual/manfrm.htm), 27.02.2003
- Gorsi, M. S.** (2002): Studies on mycorrhizal association in some medicinal plants of Azad Jammu and Kashmir. *Asian Journal of Plant Sciences* 1, 383-387
- Govrin, E. M.; Levine, A.** (2000): The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757
- Granier, F.** (1988): Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9, 712-718
- Grene, R.** (2002): Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book* 49, 1-20
- Griffith, O. W.** (1980): Determination of glutathion and glutathion disulfide using glutathion reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106, 207-212

- Gupta, M. L.; Khaliq, A.; Pandey, R.; Shukla, R. S.; Singh, H. N.; Kumar, S.** (2000): Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ocimum basilicum* spp.. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 7, 57-63
- Gupta, M. L.; Prasad, A.; Ram, M.; Kumar, S.** (2002): Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology 81, 77-79
- Hamel, C.** (1996): Prospects and problems pertaining to the management of arbuscular mycorrhizae in agriculture. Agriculture Ecosystems & Environment 60, 197
- Hänsel, R.; Hölzl, J.** (1996): Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag, 1. Aufl.
- Hänsel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E.** (1999): Pharmakognosie-Phytopharmazie. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag, 6. Aufl.
- Harrier, L. A.; Watson, C. A.** (2004): The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. Pest Management Science 60, 149-157
- Heitkamp, K.** (1999): Entwicklung von Detektionssystemen für die HPLC-Bestimmung von Lipidhydroperoxiden. Fachbereich Chemie, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal, Dissertation
- Helal, H. M.** (1997): Zur Bedeutung der Mykorrhiza in einer umweltschonenden Landwirtschaft. Backhaus, G. F.; Feldmann, F. (Hrsg.): Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. Berlin-Dahlem: Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 332, 47
- Herick, K.** (2004): Sample preparation for 2D-gel electrophoresis. The power of detergents: If you can not solubilise, you can not analyse! A new innovative detergent: C7B7O-solubilisation of membrane proteins. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen: Origins 15, Juni 2004, 27-30
- Hohnjec, N.; Vieweg, M. F.; Pühler, A.; Becker, A.; Küster, H.** (2005): Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology 137, 1283-1301
- Hossain, M. A.; Nakano, Y.; Asada, K.** (1984): Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. Plant and Cell Physiology 25, 385-395
- Hudaib, M.; Speroni, E.; di Pietra, A. M.; Cavrini, V.** (2002): GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29, 691-700
- Ishitani, M.; Nakamura, T.; Han, S. Y.; Takabe, T.** (1995): Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. Plant Molecular Biology 27, 307-315
- Islam, N.; Lonsdale, M.; Upadhyaya, N. M.; Higgins, T. J.; Hirano, H.; Akhurst, R.** (2004): Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. Proteomics 4, 1903-1908
- Jiménez-Carmona, M. M.; Ubera, J. L.; de Castro, M. D. L.** (1999): Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. Journal of Chromatography A 855, 625-632
- Johne, S.** (1998): Besseres Pflanzenwachstum durch Mykorrhiza. Gartenpraxis 5, 56-60
- Jorgensen, E. E.** (2000): Emission of volatile compounds by seeds under different environmental conditions. The American Midland Naturalist 145, 419-422

- Kapoor, R.; Giri, B.; Mukerji, K. G.** (2002a): *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in dill (*Anethum graveolens* L.) and carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 459-463
- Kapoor, R.; Giri, B.; Mukerji, K. G.** (2002b): Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to enhance the concentration and quality of essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 339-342
- Kapoor, R.; Giri, B.; Mukerji, K. G.** (2004): Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology* 93, 307-311
- Khaosaad, T.; Vierheilig, H.; Nell, M.; Zitterl-Eglseer, K.; Novak, J.** (2006): Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16, 443-446
- Kindl, H.** (1994): *Biochemie der Pflanzen*. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag, 4. Aufl.
- Kirch, H.-H.; Schlingensiepen, S.; Kotchoni, S.; Sunkar, R.; Bartels, D.** (2005): Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57, 315-332
- Klapheck, S.; Zimmer, I.; Cosse, H.** (1990): Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 31, 1005-1013
- Knörzer, O. C.; Durner, J.; Böger, P.** (1996): Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 97, 388-396
- Koedam, A.; Looman, A.** (1980): Effect of pH during distillation on the composition of the volatile oil from *Juniperus sabina*. *Planta Medica, Suppl.* 22-28
- Kogel, K.-H.; Beckhove, U.; Jarosch, B.; Hückelhoven, R.; Schiffer, R.; Beßer, K.; Langen, G.; Korell, M.** (1998): Die Pflanze wehrt sich selbst. Resistenzaktivierung bei Kulturpflanzen. *Spiegel der Forschung* 15, 54-61
- Kogel, K.-H.** (1999): Perspektiven für die Nutzung der Induzierten Resistenz bei Kulturpflanzen. *Vorträge zu Pflanzenzüchtung* 46, 239-302
- Koide, R. T.; Landherr, L. L.; Besmer, Y. L.; Detweiler, J. M.; Holcomb, E. J.** (1999): Strategies for mycorrhizal inoculation of six annual bedding plant species. *Hortscience* 34, 1217-1220
- Komaitis, M. E.** (1992): Composition of the essential oil of marjoram (*Oreganum majorana* L.). *Food Chemistry* 45, 117-118
- Komatsu, S.; Zang, X.; Tanaka, N.** (2006): Comparison of two proteomic techniques used to identify proteins regulated by gibberellin in rice. *Journal of Proteome Research* 5, 270-276
- Kothari, S. K.; Singh, S.; Singh, U. B.; Kumar, S.** (1999): Response of bergamot mint (*Mentha citrata*) to vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus supply. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 21, 990-995
- Krämer, W.; Wiartalla, R.** (1992): Bestimmung von Naphtodianthronen (Gesamthypericin) in Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). *Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft* 5, 137
- Kroth, E.; Liersch, R.** (2001): Chancen und Potenzial des deutschen Arzneipflanzenanbaus – 1. Mitteilung. Erhebung und Bewertung des Status Quo – 1999 – des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus in Deutschland auf Seiten des Anbaus. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 6, 195-201

- Kroth, E.; Liersch, R.** (2002a): Chancen und Potenzial des deutschen Arzneipflanzenanbaus – 2. Mitt.. Erhebung und Bewertung des Status Quo – 1999 – des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus in Deutschland auf Seiten der verarbeitenden Industrie. Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen 7, 20-24
- Kroth, E.; Liersch, R.** (2002b): Chancen und Potenzial des deutschen Arzneipflanzenanbaus – 3. Mitt.. Erhebung und Bewertung des Status Quo – 1999 – des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus in Deutschland. Notwendige Aktivitäten im Bereich Forschung und Entwicklung. Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen 7, 315-318
- Kubikova, E.** (2001): Foliar drought tolerance of mycorrhizal and nonmycorrhizal cowpea, soybush, bush bean and basil. Institute of Agriculture, University of Tennessee, Dissertation
- Kühn, H.; Borchert, A.** (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radical Biology & Medicine 33, 154-172
- Kullmann, F.; Makas, M.; Heuberger, H.; Schnitzler, W. H.; Windfelder, E.; Wegener, G.** (2003): Influence of wood fibre substrates from different wood species on plant growth and the root colonising capability of arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Applied Botany 77, 90-94
- Kumar, S.; Dhingra, A.; Daniell, H.** (2004): Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. Plant Physiology 136, 2843-2854
- Kuzniak, E.; Patykowski, J.; Urbanek, H.** (1999): Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment. Journal of Phytopathology 147, 385-390
- Kuzniak, E.** (2001): Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. Journal of Phytopathology 149, 575-582
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- Laloi, C.; Apel, K.; Danon, A.** (2004): Reactive oxygen signalling: the latest news. Current Opinion in Plant Biology 7, 323-328
- Lamb, C.; Dixon, R. A.** (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48, 251-275
- Land, S.** (1990): Auftreten und Charakterisierung der vesikulär-arbuskulären (VA) Mykorrhiza in intensiv genutzten Ackerböden. Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover, Dissertation
- Länger, R.; Mechtler, C.; Jurenitsch, J.** (1996): Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. Phytochemical Analysis 7, 289-293
- Liang, W.-S.** (2003): Drought stress increases both cyanogenesis and b-cyanoalanine synthase activity in tobacco. Plant Science 165, 1109-1115
- Ligor, M.; Szumski, M.; Buszewski, B.** (2000): Isolation and determination of flavour and fragrance compounds from natural products by SPME-GC and SFE-GC methods. International Laboratory 1, 22-25
- Linderman, R. G.** (2000): Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. Kapulnik, Y.; Douds, Jr., D. D. (Hrsg.): Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, 345-365
- Lingua, G.; D'Agostino, G.; Massa, N.; Antosiano, M.; Berta, G.** (2002): Mycorrhiza-induced differential response to a yellow disease in tomato. Mycorrhiza 12, 191-198
- Lioi, L.; Giovanetti, M.** (1989): Vesicular-arbuscular mycorrhizae and species of the *Endogonaceae* in an Italian serpentine soil. Geo-Botanica Italia 123, 1-8

- LLG** (2004); Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau Sachsen-Anhalt, Unterarbeitskreis Lückenindikation Arznei- und Gewürzpflanzen: Möglichkeiten des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln in Arznei- und Gewürzpflanzen. Stand 28.06.2004. In: <http://lsa-st23.sachsen-anhalt.de/lpsa/72.htm>, 08.02.2005
- LMBG** § 35 (1995): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. L 53.00-5: Untersuchung von Lebensmitteln. Untersuchung von Gewürzen und würzenden Zutaten. Bestimmung des ätherischen Ölgehaltes. Destillationsverfahren. (Übernahme der gleichnamigen Deutschen Norm DIN 10228, Ausg. Dez. 1995)
- van Loon, L. C.** (1985): Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4, 111-116
- Luche, S.; Santoni, V.; Rabilloud, T.** (2003): Evaluation of non-ionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3, 249-253
- Mago, P.; Mukerji, K. G.** (1994): Vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Lamiaceae*: I. Seasonal variation in some members. *Phytomorphology* 44, 43-51
- Maldao-Martins, M.; Bernardo-Gil, M.; da Costa, B. G.** (2002): Sensory and chemical evaluation of *Thymus zygis* L. essential oil and compressed CO<sub>2</sub> extracts. *European Food Research and Technology* 214, 207-211
- Maldao-Martins, M.; Palavra, A.; da Costa, B. G.; Bernardo-Gil, M.** (2000): Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *Journal of Supercritical Fluids* 18, 25-34
- Marriot, P. J.; Shellie, R.; Cornwell, C.** (2001): Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A* 936, 1-22
- Marrs, K. A.** (1996): The functions and regulations of glutathione-S-transferases in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 127-158
- Martin, J.; Garcia-Romera, I.; Ocampo, J. A.; Palma, J. M.** (1998): Superoxide dismutase and arbuscular mycorrhizal fungi: Relationship between the isoenzyme pattern and the colonizing fungus. *Symbiosis* 24, 247-258
- Mauch, F.; Dudler, R.** (1993): Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiology* 102, 1193-1201
- Mayer, A. M.; Staples, R. C.; Gil-ad, N. L.** (2001): Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58, 3-41
- Mehdy, M. C.; Sharma, Y. K.; Sathisvan, K.; Bays, N. W.** (1996): The role of oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum* 98, 365-374
- Michov, B.** (1996): *Elektrophorese Theorie und Praxis*. Berlin, New York: Walter de Gruyter
- Mindrup, R. F.** (2000): Recent applications of SPME for monitoring flavor components in foods. *Food Testing and Analysis* 2, 17-19
- Moora, M.; Zobel, M.** (1998): Can arbuscular mycorrhiza change the effect of root competition between conspecific plants of different ages? *Canadian Journal of Botany* 76, 613-619
- Morf, S.; Debrunner, B.; Meier, B.; Kurth, H.** (1998): Automatische Probenvorbereitung von pflanzlichen Arzneimitteln. Ein Vergleich mit der konventionellen Methode am Beispiel Johanniskraut. *Laborpraxis* 56-62
- Muhammad, Z.; Hussain, F.** (1995): Effect of light on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) association in *Salvia hispanica* L.. *Sarhad Journal of Agriculture* 11, 527-533
- Mukhin, V. A.; Betekhtina, A. A.** (2006): Adaptive significance of endomycorrhizas for herbaceous plants. *Russian Journal of Ecology* 37, 1-6

- Murgia, I.; Tarantino, D.; Vannini, C.; Bracale, M.; Carravieri, S.; Soave, C.** (2004): *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal* 38, 940-953
- Mussa, H. J.; Sumner, L. W.; Harrison, M. J.** (2000): The use of proteomics to elucidate the changes in cellular behavior in *Medicago truncatula* in response to colonization by *Glomus versiforme*. Quebec, Canada: Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Conference of Plant Molecular Biology
- Nakano, Y.; Asada, K.** (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880
- Namiesnik, J.; Górecki, T.** (2000): Sample preparation for chromatographic analysis of plant material. *JPC* 13, 404-413
- Neill, S.; Desikan, R.; Hancock, J.** (2002): Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 388-395
- Nitz, S.; Kollmannsberger, H.; Punkert, M.** (1992): CO<sub>2</sub>-Hochdruckextraktion von Gewürzen. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 14, 108-116
- Oerke, E.-C.** (1994): Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. Oerke, E.-C.; Dehne, H.-W.; Schönbeck, F.; Weber, A. (Hrsg.): *Crop Production and Crop Protection. Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Amsterdam: Elsevier, 72-741
- Oszagyan, M.; Simandi, B.; Sawinsky, J.** (1996): Supercritical fluid extraction of volatile compounds from lavender and thyme. *Flavour and Fragrance Journal* 11, 157-165
- Otto, M.** (2000): *Analytische Chemie*. Weinheim u.a.: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2. Aufl.
- Parker, R.; Flowers, T. J.; Moore, A. L.; Harpham, N. V. J.** (2006): An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany* 57, 1109-1118
- Pastori, G. M.; Foyer, C. H.** (2002): Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129, 460-468
- Patton, W. F.** (2002): Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B* 771, 3-31
- Patykowski, J.; Urbanek, H.** (2003): Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 151, 153-161
- Pawlowska, T. E.; Blaszkowski, J.; Rueling, A.** (1996): The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in Southern Poland. *Mycorrhiza* 6, 499-505
- Peever, L.; Higgins, V.** (1989): Electrolyte leakage, lipoxygenase and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and non-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiology* 90, 867-875
- Pereira, S. I.** (2000): Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry* 55, 241-246
- Ph. Eur.** (2002): *European Pharmacopoeia*. Council of Europe, Strasbourg Codex, 4<sup>th</sup> ed.
- Pinior, A.; Grunewaldt-Stöcker, G.; van Alten, H.; Strasser, R. J.** (2005): Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. *Mycorrhiza* 15, 596-605
- Posch, A.** (1994): Hochauflösende zwei-dimensionale Elektrophorese von Pflanzenproteinen mit computerunterstützter Bildauswertung. *Methodische Arbeiten und deren Anwendung in der Züchtungsgenetik und Pflanzenpathologie*. Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwirtschaft, Technische Universität München, Dissertation

- Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J. M.; Azcón-Aguilar, C.** (2002): Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 525-534
- Rabilloud, T.** (1998): Use of thiourea to increase solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 758-760
- Rabilloud, T.** (1999): Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. Link, A.J. (Hrsg.): *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Rabilloud, T.; Blisnick, T.; Heller, M.; Luche, S.; Aebersold, R.; Lunardi, J.; Braun-Breton, C.** (1999): Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* 20, 3603-3610
- Rabilloud, T.; Charmont, S.** (2000): Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. Rabilloud, T. (Hrsg.): *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag
- Rabilloud, T.; Chevallet, M.** (2000): Solubilisation of proteins in two-dimensional electrophoresis. Rabilloud, T. (Hrsg.): *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Berlin, Heidelberg, New York u.a.: Springer-Verlag
- Reader, R. J.** (1998): Relationship between species relative abundance and plant traits for an infertile habitat. *Plant Ecology* 134, 43-51
- O'Reilly, J.; Wang, Q.; Setkova, L.; Hutchinson, J. P.; Chen, Y.; Lord, H. L.; Linton, C. M.; Pawliszyn, J.** (2005): Automation of solid phase micro-extraction. *Journal of Separation Science* 28, 2010-2022
- van Rensen, I.; Kohlert, C.; März, R.; Veit, M.** (1999): Ätherisch-Öl-haltige Zubereitungen. Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik. *Zeitschrift für Phytotherapie* 20, 72-74
- Repetto, O.; Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Berta, G.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S.** (2003): Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus moosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist* 157, 555-567
- Rigden, J.; Coutts, R.** (1988): Pathogenesis-related proteins in plants. *Trends in Genetics* 4, 87-89
- Rodrigues, M. R. A.; Caramao, E. B.; dos Santos, J. G.; Dariva, C.; Oliviera, J. V.** (2003): The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction of *Majorana hortensis* Moench. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 453-456
- Rohloff, J.** (1999): Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3782-3786
- Rohloff, J.; Skagen, E. B.; Steen, A. H.; Iversen, T.-H.** (2000): Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: Essential oil content and quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6205-6209
- Röhricht, C.; Karte, T.; Schubert, M.** (2003): Analyse der ökologischen Produktionsverfahren von Heil- und Gewürzpflanzen in Deutschland. Abschlussbericht, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung in Sachsen, FKZ 02OE156
- Ronyai, E.; Simandi, B.; Veress, T.; Lemberkovics, E.; Patiaka, D.** (1999): Comparison between the essential oil and supercritical fluid extract of *Salvia fructosa* Mill. *Journal of Essential Oil Research* 11, 499-502

- Roth, L.** (1990): *Hypericum, Hypericin: Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung.* Landsberg, Lech: ecomed, 1. Aufl.
- Roth, L.; Kormann, K.** (1996): *Duftpflanzen, Pflanzendüfte: Ätherische Öle und Riechstoffe.* Landsberg: ecomed, 1. Aufl.
- Roxas, V. P.; Lodhi, S. A.; Garrett, D. K.; Mahan, J. R.; Allen, R. D.** (2000): Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41, 1229-1234
- Sachsen-Anhalt-Newsletter** (2004): *Gesund, schön und vital durch Arznei- und Gewürzkräuter aus Sachsen-Anhalt.* Vertretung des Landes Sachsen-Anhalt beim Bund (Hrsg.) (2004): Neues aus Berlin. Newsletter der Landesvertretung Sachsen-Anhalt in Berlin. Ausgabe 10/2004, 11.06.2004
- Saravanan, R. S.; Rose, J. K. C.** (2004): A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4, 2522-2532
- Schäfer, B.; Hennig, P.; Engewald, W.** (1995): Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid phase microextraction. *Journal of High Resolution Chromatography* 18, 587-592
- Schlee, D.** (1992): *Ökologische Biochemie.* Jena: Gustav Fischer Verlag, 1. Auflage
- Scholze, P.; Pank, F.; de Garcia, E. F.; Blüthner, W.-D.; Dehe, M.; Schneider, E.** (2001): Bewertung der Anfälligkeit von Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) gegenüber der Johanniskrautwelke (*Colletotrichum cf. gloeosporioides*). *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 6, 209-215
- Schönfelder, U.** (1999): *Der Einfluss von Cholesterol auf die UV-induzierte Peroxidation der Lipide der menschlichen Stratum corneum.* Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation
- Schnitzler, W. H.; Michalsky, F.; Gruda, N.** (1996): Mykorrhiza zur Kulturverbesserung, *Deutscher Gartenbau* 17, 1030
- Siedlecka, A.; Krupa, Z.; Samuelsson, G.; Öquist, G.; Gardeström, P.** (1997): Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 35, 951-957
- Sieverding, E.** (1991): *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems.* Eschborn: GTZ
- Slezack, S.; Dumas-Gaudot, E.; Paynot, M.; Gianinazzi, S.** (2000): Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 238-241
- Smith, S. E.; Read, D. J.** (1997): *Mycorrhizal Symbiosis.* United Kingdom: Academic Press
- Smith, I. K.; Vierheller, T. L.; Thorne, C. A.** (1989): Properties and function of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum* 77, 449-456
- Somssich, I. E.; Hahlbrock, K.** (1998): Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3, 86-90
- Sovava, H.; Komers, R.; Kucera, J.; Jez, J.** (1994): Supercritical carbone dioxide extraction of caraway essential oil. *Chemical Engineering Science* 49, 2499-2505
- Sreeramulu, K. R.; Bagyaraj, D. J.** (1986): Field response of chilli to VA mycorrhiza on black clayey soil. *Plant and Soil* 93, 299-302
- Stahl, E.; Quirin, K. W.; Glatz, A.; Garard, D.; Rau, G.** (1984): New developments in the field of high-pressure extraction of natural products with dense gases. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie* 88, 900-907
- Stahl-Biskup, E.** (1998): Qualitätssicherung ätherischer Öle. Was leisten die Europäischen Arzneibücher? *Journal Suisse de Phamacie* 7
- Strack, D.; Fester, T.; Hause, B.; Walter, M. H.** (2001): Die arbuskuläre Mykorrhiza. Eine unterirdische Lebensgemeinschaft. *Biologie in unserer Zeit* 31, 286-295

- Sunkar, R.; Bartels, D.; Kirch, H.-H.** (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* 35, 452-464
- Supelco** (1999): Bulletin 923A. Solid phase microextraction: Theory and optimization of conditions. Sigma-Aldrich Co.
- Supelco** (2000): Product information. Solid phase microextraction. Sigma-Aldrich Co.
- Tarjan, G.; Bitter, I.; Strasser, B.; Szatmary, M.** (2002): Data for the gas-liquid chromatographic analysis of essential oils. Determination of the composition of the essential oil of marjoram. *Chromatographia* 56, 155-163
- Teuscher, E.** (2003): *Gewürzdrogen. Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer ätherischen Öle.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1. Aufl.
- Teuscher, E.; Melzig, M. F.; Lindequist, U.** (2004): *Biogene Arzneimittel. Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 6. Aufl.
- Thygesen, K.; Larsen, J.; Bodker, L.** (2004): Arbuscular mycorrhizal fungi reduce development of pea-root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using oospores as pathogen inoculum. *European Journal of Plant Pathology* 110, 411-419
- Tietz, U.; Thomann, R.; Förstner, S.** (1991): Hochdruckextraktion von Majoran. 1. Mitt. Sensorische Charakterisierung von Majoranoleoresin mittels Profilanalyse. *Die Nahrung* 35, 1013-1021
- Timonen, S.; Smith, S. E.** (2005): Effect of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on expression of cytoskeletal proteins in tomato roots. *Canadian Journal of Botany* 83, 176-182
- Tisserant, B.; Brenac, V.; Requena, N.; Jeffries, P.; Dodd, J. C.** (1998): The detection of *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) forming mycorrhizas in three plants, at different stages of seedling development, using mycorrhiza-specific isoenzymes. *New Phytologist* 138, 225-239
- Tsugita, A.; Kamo, M.; Kawakami, T.; Ohki, Y.** (1996): Two-dimensional electrophoresis of plant proteins and standardization of gel patterns. *Electrophoresis* 17, 855-865
- Tsugita, A.; Kamo, M.** (1999): 2-D electrophoresis of plant proteins. Link, A. J. (Hrsg.): *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Valot, B.; Dieu, M.; Recorbet, G.; Raes, M.; Gianinazzi, S.; Dumas-Gaudot, E.** (2005): Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Molecular Biology* 59, 565-580
- Vanacker, H.; Carver, T. L. W.; Foyer, C. H.** (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117, 1103-1114
- Vas, G.; Vékey, K.** (2004): Solid-phase micro extraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 39, 233-254
- Vera, R. R.; Chane-Ming, J.** (1999): Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry* 66, 143-145
- Wagner, H.** (1999): *Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 6. Aufl.
- Walsh, B. J. and Herbert, B. R.** (1999): Casting and running vertical slab-gel electrophoresis for 2D-PAGE. Link, A. J. (Hrsg.): *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Wang, C. L.; Chen, R. K.; Chen, C. Y.** (1997): Effect of different microbial fertilizers on growth and flowering of *Salvia splendens*. *Journal of the Agricultural Association of China* 179, 125-136

- Watzl, B.; Leitzmann, C.** (1995): Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1. Aufl.
- Watzl, B.** (2002): Monoterpene. Ernährungsumschau 49, 322-324
- Westermeier, R.** (1990) unter Mitwirkung von: Gronau-Czybulka, S.; Habeck, C.; Schach, H.; Schickle, H.; Theßeling, G.; Wiesner, P.: Elektrophorese-Praktikum. Weinheim u.a.: Wiley-VCH Verlag GmbH
- Westermeier, R.; Naven, T.** (2002): Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis. Weinheim u.a.: Wiley-VCH Verlag GmbH
- Whipps, J. M.** (2004): Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Canadian Journal of Botany 82, 1198-1227
- Whitfield, L.; Richards, A. J.; Rimmer, D. L.** (2004): Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonization in *Thymus polytrichus* in northern England. Mycorrhiza 14, 55-62
- Wojtaszek, P.** (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochemical Journal 322, 681-692
- Wu, Y.-X.; von Tiedemann, A.** (2002): Evidence for oxidative stress involved in physiological leaf spot formation in winter and spring barley. Phytopathology 92, 145-155
- Wulf, A.; Manthey, K.; Doll, J.; Perlick, A. M.; Linke, B.; Bekel, T.; Meyer, F.; Franken, P.; Küster, H.; Krajinski, F.** (2003): Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in model plant *Medicago truncatula*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16, 306-314
- Yabuta, Y.; Motoki, T.; Yoshimura, K.; Takeda, T.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S.** (2002): Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. The Plant Journal 32, 915-925
- Yamada, S.; Komori, T.; Hashimoto, A.; Kuwata, S.; Imaseki, H.; Kubo, T.** (2000): Differential expression of plastidic aldolase genes in *Nicotiana* plants under salt stress. Plant Science 154, 61-69
- Yan, S.-P.; Tang, Z.-C.; Su, W.-A.; Sun, W.-N.** (2005): Proteomic analysis of salt-stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 5, 235-244
- Yan, S.-P.; Zhang, Q.-Y.; Tang, Z.-C.; Su, W.-A.; Sun, W.-N.** (2006): Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress response in rice. Molecular & Cellular Proteomics 5, 484-496
- Yu, T.; Li, Y. S.; Chen, X. F.; Hu, J.; Chang, X.; Zhu, Y. G.** (2003): Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione-S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. J. Plant Physiol. 160, 1305-1311
- Zheng, H.-Z.; Kim, Y.-W.; Lee, H.-J.; Park, R.-D.; Jung, W.-J.; Kim, Y.-C.; Lee, S.-H.; Kim, T.-H.; Kim, K.-Y.** (2004): Quantitative changes of PR-proteins and antioxidative enzymes in response to *Glomus intraradices* and *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Journal of Microbiology and Biotechnology 14, 553-562

## Anlagenverzeichnis

<b>Anlage 1</b>	Feldversuchsanlagen 2002 bis 2005, konventionell und ökologisch .....	XXX
<b>Anlage 2</b>	Technische Daten zur Versuchsdurchführung des Feldanbaus .....	XXXII
<b>Anlage 3</b>	Klimadiagramme der Versuchsjahre 2002 bis 2005 .....	XXXIV
<b>Anlage 4</b>	Bewertung der Mykorrhizierung der Feldversuche .....	XXXVI

**Anlage 1** Feldversuchsanlagen 2002 bis 2005, konventionell und ökologisch

Versuchsanlage 2002:

M	M	M	J	J	J
65	0	35	65	0	35
d	d	d	d	d	d

M	M	M	J	J	J
35	65	0	35	65	0
c	c	c	c	c	c

M	M	M	J	J	J
65	0	35	65	0	35
b	b	b	b	b	b

M	M	M	J	J	J
0	35	65	0	35	65
a	a	a	a	a	a

**M** Majoran                      **J** Johanniskraut

Erläuterung: 1. Buchstabe = Pflanzenart (M=Majoran, J=Johanniskraut),  
 Zahl = Mykorrhiza-Aufwandmenge (0, 35 oder 65 ml AMykor®-Blähton / lfd. m),  
 2. Buchstabe = Wiederholung  
 z.B. M 0 a = Majoran – Kontrolle – Wiederholung a  
 J 35 d = Johanniskraut – 35 ml AMykor® / lfd. m – Wiederholung d

Versuchsanlage 2003:

J	J	J	T	T	T	M	M	M
0	0	0	0	0	0	20	20	20
d	e	f	d	e	f	d	e	f

J	J	J	T	T	T	M	M	M
20	20	20	20	20	20	0	0	0
d	e	f	d	e	f	d	e	f

J	J	J	T	T	T	M	M	M
20	20	20	20	20	20	0	0	0
a	b	c	a	b	c	a	b	c

J	J	J	T	T	T	M	M	M
0	0	0	0	0	0	20	20	20
a	b	c	a	b	c	a	b	c

**J** Johanniskraut                      **T** Thymian                      **M** Majoran

Erläuterung: 1. Buchstabe = Pflanzenart (M=Majoran, T=Thymian, J=Johanniskraut),  
 Zahl = Mykorrhiza-Aufwandmenge (0 oder 20 ml AMykor®-Blähton / lfd. m),  
 2. Buchstabe = Wiederholung  
 z.B. J 0 a = Johanniskraut – Kontrolle – Wiederholung a  
 T 20 d = Thymian – 20 ml AMykor® / lfd. m – Wiederholung d

Versuchsanlage 2004:

T 20 d	T 20 e	T 20 f	T 0 d	T 0 e	T 0 f	M 0 d	M 0 e	M 0 f
T 0 d	T 0 e	T 0 f	T 20 d	T 20 e	T 20 f	M 20 d	M 20 e	M 20 f
T 0 a	T 0 b	T 0 c	T 20 a	T 20 b	T 20 c	M 20 a	M 20 b	M 20 c
T 20 a	T 20 b	T 20 c	T 0 a	T 0 b	T 0 c	M 0 a	M 0 b	M 0 c

**T** Thymian

**M** Majoran

Erläuterung: 1. Buchstabe = Pflanzenart (J=Johanniskraut, M=Majoran, T=Thymian)  
 Zahl = Mykorrhiza-Aufwandmenge (0 oder 20 ml AMykor®-Blähton / lfd. m),  
 2. Buchstabe = Wiederholung  
 z.B. T 0 a = Thymian – Kontrolle – Wiederholung a  
 T 20 d = Thymian – 20 ml AMykor® / lfd. m – Wiederholung d

Versuchsanlage 2005:

T 40 d	T 40 e	T 40 f	T 0 d	T 0 e	T 0 f	T 20 d	T 20 e	T 20 f	T 0 d	T 0 e	T 0 f	T 40 d	T 40 e	T 40 f
T 0 d	T 0 e	T 0 f	T 40 d	T 40 e	T 40 f	T 0 d	T 0 e	T 0 f	T 20 d	T 20 e	T 20 f	T 0 d	T 0 e	T 0 f
T 0 a	T 0 b	T 0 c	T 40 a	T 40 b	T 40 c	T 0 a	T 0 b	T 0 c	T 20 a	T 20 b	T 20 c	T 0 a	T 0 b	T 0 c
T 40 a	T 40 b	T 40 c	T 0 a	T 0 b	T 0 c	T 20 a	T 20 b	T 20 c	T 0 a	T 0 b	T 0 c	T 20 a	T 20 b	T 20 c

**T** Thymian

Erläuterung: 1. Buchstabe = Pflanzenart (T=Thymian)  
 Zahl = Mykorrhiza-Aufwandmenge (0, 20 oder 40 ml AMykor®-Blähton / lfd. m),  
 2. Buchstabe = Wiederholung  
 z.B. T 0 a = Thymian – Kontrolle – Wiederholung a  
 T 20 f = Thymian – 20 ml AMykor® / lfd. m – Wiederholung f

## Anlage 2 Technische Daten zur Versuchsdurchführung des Feldanbaus

Anbaujahr 2002:

Parameter	Majoran	Johanniskraut
Datum der Aussaat	10.04.02	-
Saatstärke [kg/ha]	8	-
Datum der Pflanzung	-	09.10.01
Reihenabstand [cm]	28	50
Abstand in der Reihe [cm]	-	25
Applikationsform von AMykor®	vor der Aussaat mit Kreiselegge	direkt ins Pflanzloch, per Hand
Thermische Unkrautbekämpfung (Abflammen – Handgerät)	23.04.02	-
Mechanische Unkrautbekämpfung (Maschinenhacke)	17.05.02 03.06.02	28.03.02 14.05.02
N-Düngung, 60 kg KAS/ha (nur konventionelle Variante)	17.06.02	23.06.02
Ernte	07.08.02 (ökol.) 16.08.02 (konv.)	1.Schnitt: 19.07.02 (ökol.) 22.07.02 (konv.) 2.Schnitt: 12.09.02 (ökol.) 12.09.02 (konv.)

Anbaujahr 2003:

Parameter	Johanniskraut	Thymian	Majoran
Datum der Aussaat		10.04.03	10.04.03
Saatstärke [kg/ha]		8	8
Datum der Pflanzung	19.4.03	-	-
Reihenabstand [cm]	50	28	28
Abstand in der Reihe [cm]	25	-	-
Applikationsform von AMykor®	direkt ins Pflanzloch per Hand	vor der Aussaat mit Drillmaschine A 215 (170 kg/ha)	
Thermische Unkrautbekämpfung (Abflammen – Handgerät)		28.04.03	28.04.03
Mechanische Unkrautbekämpfung (Maschinenhacke)	25.05.03 16.06.03	14.05.03 23.06.03	9.05.03 23.06.03
N-Düngung, 60 kg KAS/ha (nur konventionelle Variante)	4.06.03 22.08.03	17.06.03	17.06.03
Ernte	01.09.03 (ökol.) 20.08.03 (konv.)	30.09.03	24.07.03

## Anbaujahr 2004:

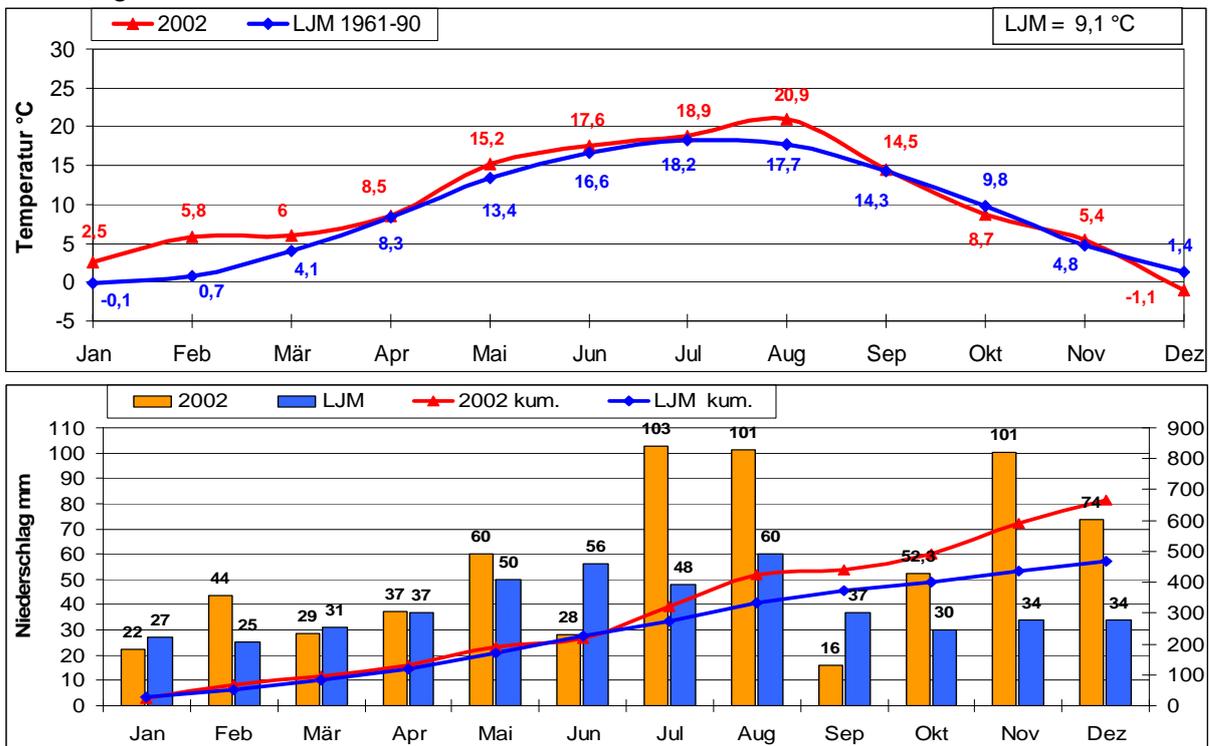
Parameter	Thymian	Majoran
Datum der Aussaat	15.04.04	15.04.04
Saatstärke [kg/ha]	8	12
Datum der Pflanzung	-	-
Reihenabstand [cm]	28	28
Abstand in der Reihe [cm]	-	-
Applikationsform von AMykor®	vor der Aussaat mit Drillmaschine A 215 (170 kg/ha)	
Chemische Unkrautbekämpfung (nur konventionelle Variante)	15.05.04	15.05.04
	22.06.04	22.06.04
Mechanische Unkrautbekämpfung (Maschinenhacke)	14.05.04	14.05.04
	29.06.04	29.06.04
	13.04.05	
N-Düngung, 60 kg KAS/ha (nur konventionelle Variante)	28.06.04	28.06.04
	12.04.05	
Ernte	1. Standjahr: 30.09.04 2. Standjahr: 1.Schnitt: 27.05.05 (ökol.) 01.06.05 (konv.) 2.Schnitt: 25.07.05 (ökol.) 27.07.05 (konv.)	18.08.04

## Anbaujahr 2005:

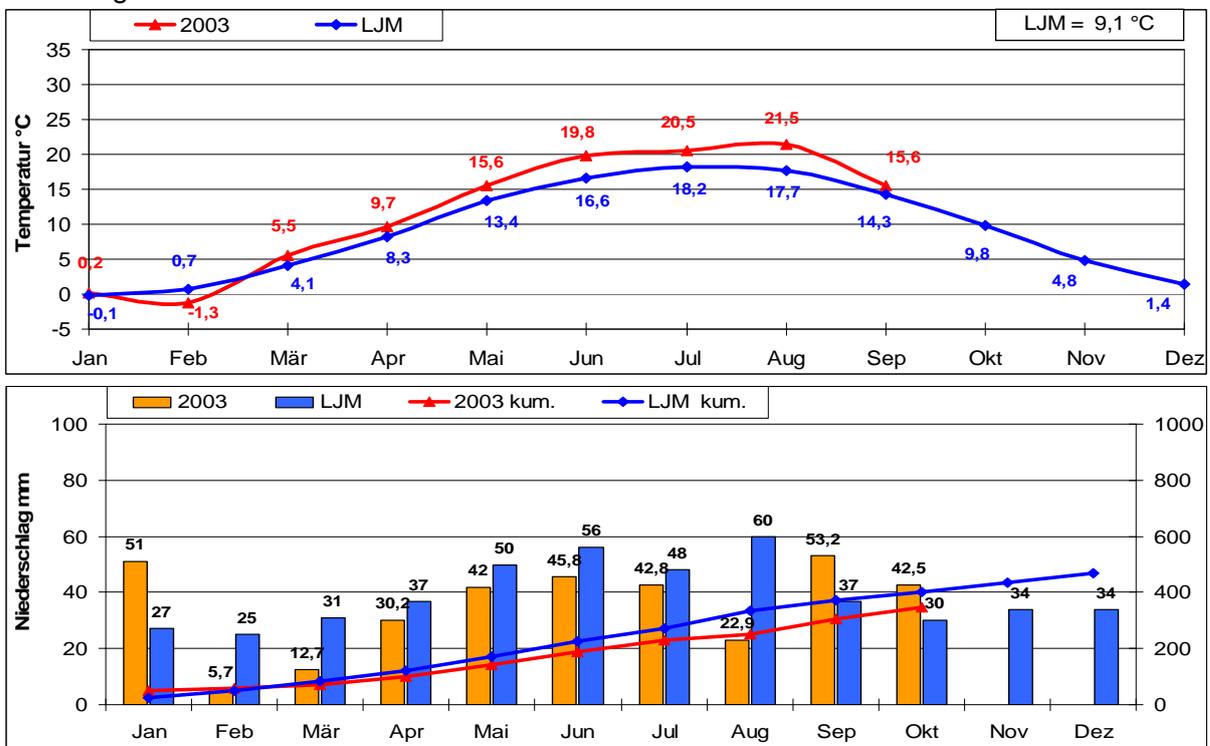
Parameter	Thymian (ökologisch)	Thymian (konventionell)
Datum der Aussaat	13.04.2005	12.04.2005
Saatstärke [kg/ha]	8	8
Datum der Pflanzung	-	-
Reihenabstand [cm]	28	28
Abstand in der Reihe [cm]	-	-
Applikationsform von AMykor®	vor der Aussaat mit Drillmaschine A 215 (170 kg/ha)	
Chemische Unkrautbekämpfung (nur konventionelle Variante)	-	-
Mechanische Unkrautbekämpfung (Maschinenhacke)	29.04.05	02.05.05
	20.05.05	13.06.05
	06.06.05	
N-Düngung, 60 kg KAS/ha (nur konventionelle Variante)	-	09.06.05
Pflanzenschutz (nur konventionelle Variante)		
Ernte	05.09.05	24.08.05

Anlage 3 Klimadiagramme der Versuchsjahre 2002 bis 2005

Klimadiagramme 2002:

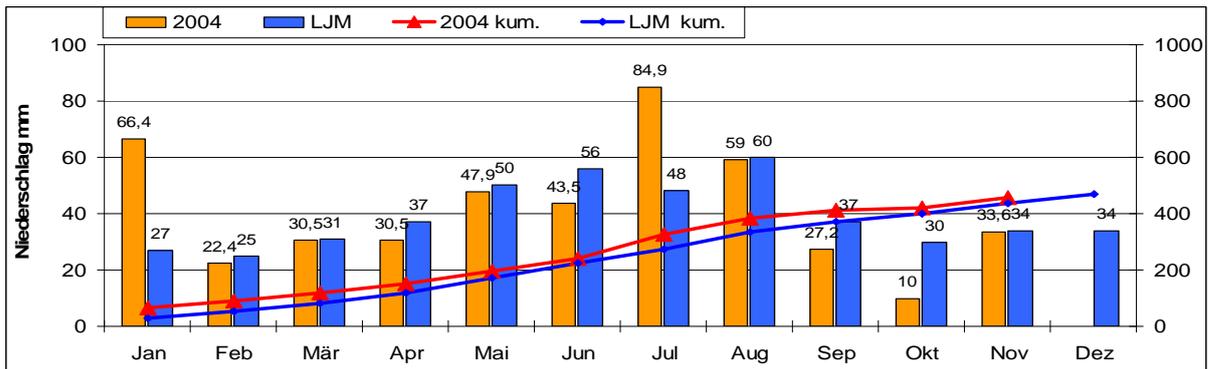
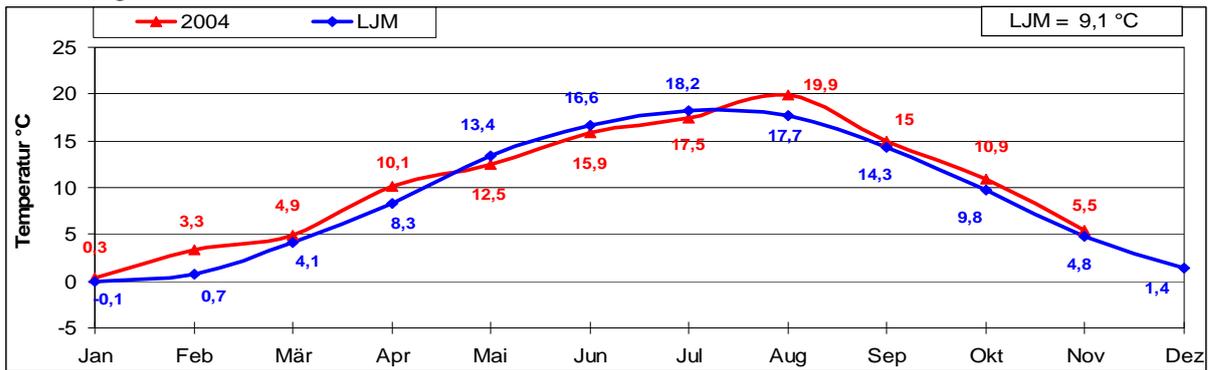


Klimadiagramme 2003:

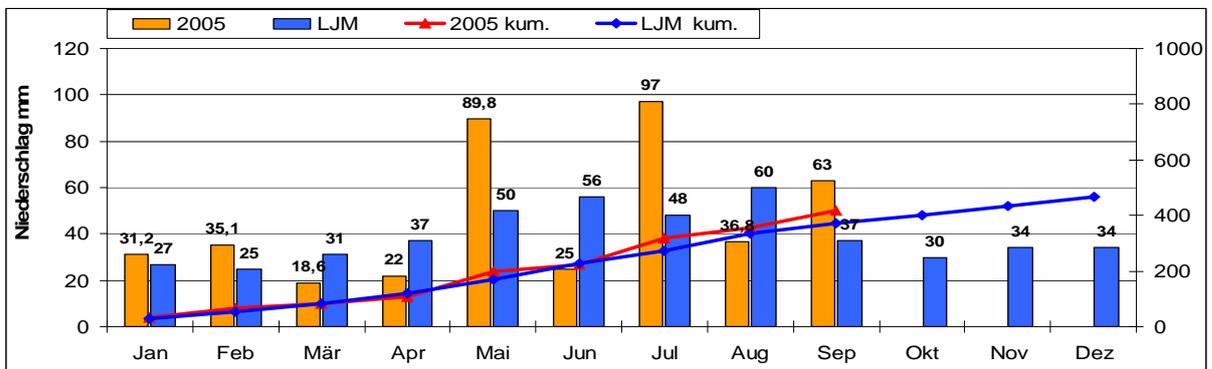
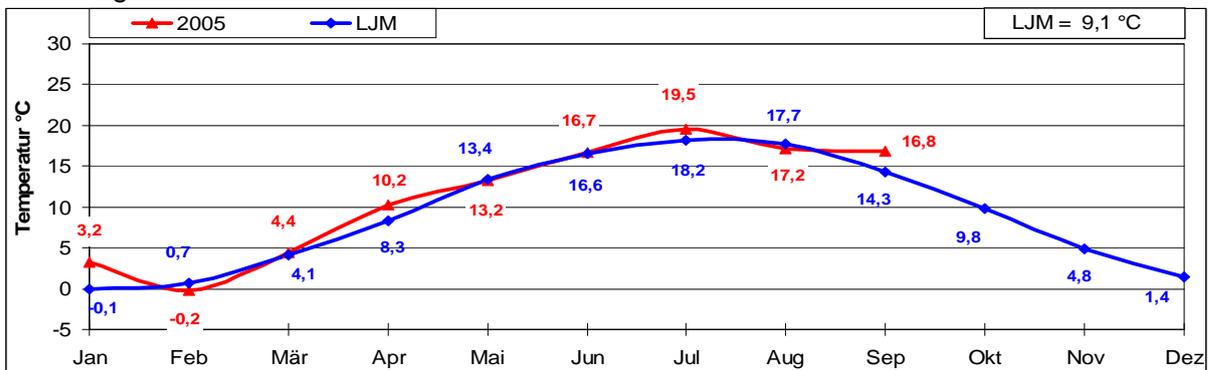


LJM - langjähriger Mittelwert  
 LJM kum. - langjähriger Mittelwert, kumulativ

Klimadiagramme 2004:



Klimadiagramme 2005:



LJM - langjähriger Mittelwert  
 LJM kum. - langjähriger Mittelwert, kumulativ

**Anlage 4** Bewertung der Mykorrhizierung der Feldversuche

Thymian – Feldversuch 2003:

Pflanze	Thymian			
Anbaujahr	2003			
Beprobung	30.09.2003			
Anbauverfahren	ökologisch		konventionell	
Wiederholung	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m
1	1	1	0	1
2	1	2	0	1
3	1	2	0	1
4	1	2	0	1
5	1	2	0	2
6	1	2	0	1
Durchschnitt	1	1,83	0	1,17

Thymian – Feldversuch 2004:

Pflanze	Thymian			
Anbaujahr	2004			
Beprobung	04.10.2004			
Anbauverfahren	ökologisch		konventionell	
Wiederholung	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> /lfd. m
1	0	2	1	2
2	1	2	1	1
3	0	2	1	3
4	1	1	2	3
5	0	3	2	3
6	1	2	2	3
7	0	2	1	3
8	0	1	2	2
9	1	2	1	1
10	1	1	2	2
11	0	1	1	3
12	2	1	1	2
13	1		0	
14	2		1	
15	1		1	
16	0		2	
17	0		1	
18	1		0	
Durchschnitt	0,67	1,67	1,22	2,33

**Bewertung:**  
 0 = keine Mykorrhiza-Strukturen  
 1 = geringe Mykorrhiza-Strukturen vorhanden  
 2 = gute Mykorrhizierung  
 3 = sehr gute Mykorrhizierung

## Thymian – Feldversuch 2005:

Pflanze	Thymian					
Anbaujahr	2005					
Beprobung	28.09.2005					
Anbauverfahren	ökologisch			konventionell		
Wiederholung	Kontrolle	20 ml AMykor®/ lfd. m	40 ml AMykor®/ lfd. m	Kontrolle	20 ml AMykor®/ lfd. m	40 ml AMykor®/ lfd. m
1	1	1	0	2	1	3
2	1	0	1	2	2	2
3	1	0	0	2	2	2
4	0	1	2	1	2	2
5	0	1	0	2	0	2
6	0	1	0	2	1	2
7	1	2	0	3	1	2
8	1	0	0	3	3	2
9	0	1	2	0	1	3
10	1	0	2	1	2	2
11	1	1	1	2	2	2
12	1	1	0	2	0	2
13	1	1	2	2	1	2
14	0	2	0	1	1	2
15	0	0	0	2	3	2
16	0			2		
17	1			3		
18	1			3		
19	0			0		
20	1			1		
21	1			2		
22	1			2		
23	1			2		
24	0			1		
25	0			2		
26	0			2		
27	1			3		
28	1			3		
29	0			0		
30	1			1		
Durchschnitt	0,60	0,80	0,67	1,80	1,47	2,13

**Bewertung:**  
0 = keine Mykorrhiza-Strukturen  
1 = geringe Mykorrhiza-Strukturen vorhanden  
2 = gute Mykorrhizierung  
3 = sehr gute Mykorrhizierung

## Majoran – Feldversuch 2002:

Pflanze	Majoran					
Anbaujahr	2002					
Beprobung	30.08.2002					
Anbauverfahren	ökologisch			konventionell		
Wiederholung	Kontrolle	35 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m	65 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m	Kontrolle	35 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m	65 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m
1	0	2	1	0	3	2
2	2	1	1	0	3	3
3	0	2	0	1	2	1
4	2	2	3	1	1	3
Durchschnitt	1,00	1,75	1,25	0,5	2,25	2,25

## Majoran – Feldversuch 2004:

Pflanze	Majoran			
Anbaujahr	2004			
Beprobung	19.10.2004		20.10.2004	
Anbauverfahren	ökologisch		konventionell	
Wiederholung	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m	Kontrolle	20 ml AMykor <sup>®</sup> / lfd. m
1	0	1	0	1
2	0	3	0	3
3	1	2	0	1
4	1	1	0	1
5	1	3	0	1
6	1	3	2	2
Durchschnitt	0,67	2,17	0,33	1,50

**Bewertung:** 0 = keine Mykorrhiza-Strukturen  
 1 = geringe Mykorrhiza-Strukturen vorhanden  
 2 = gute Mykorrhizierung  
 3 = sehr gute Mykorrhizierung

## Johanniskraut – Feldversuch 2002:

Pflanze	Johanniskraut					
Anbaujahr	2002					
Beprobung	30.08.2002					
Anbauverfahren	ökologisch			konventionell		
Wiederholung	Kontrolle	35 ml AMykor®/ lfd. m	65 ml AMykor®/ lfd. m	Kontrolle	35 ml AMykor®/ lfd. m	65 ml AMykor®/ lfd. m
1	1	0	1	2	2	2
2	0	1	1	1	2	2
3	1	1	1	1	2	2
4	1	0	1	1	2	1
Durchschnitt	0,75	0,50	1	1,25	2	1,75

## Johanniskraut – Feldversuch 2003:

Pflanze	Johanniskraut			
Anbaujahr	2003			
Beprobung	08.09.2003			
Anbauverfahren	ökologisch		konventionell	
Wiederholung	Kontrolle	20 ml AMykor®/ lfd. m	Kontrolle	20 ml AMykor®/ lfd. m
1	2	3	1	3
2	1	2	1	2
3	1	2	1	1
4	1	2	1	3
5	1	2	1	1
6	1	2	2	3
Durchschnitt	1,17	2,17	1,17	2,17

**Bewertung:** 0 = keine Mykorrhiza-Strukturen  
 1 = geringe Mykorrhiza-Strukturen vorhanden  
 2 = gute Mykorrhizierung  
 3 = sehr gute Mykorrhizierung

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Richter, Jana  
Geburtsdatum: 30. Dezember 1977  
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland

### Schulbildung:

09/1984 – 08/1991 Polytechnische Oberschule „Thomas Müntzer“, Klöden  
09/1991 – 06/1996 Gymnasium Jessen  
*Schulabschluss:* Abitur

### Hochschulausbildung:

10/1996 – 11/2000 Studium der Ökotrophologie an der Hochschule Anhalt (FH), Bernburg, Fachbereich Landwirtschaft / Ökotrophologie / Landespflege  
*Diplomarbeit:* „Entwicklung einer dünnenschichtchromatographischen Trennmethode für Gerbstoffe aus Rhabarberwurzeln unter besonderer Berücksichtigung der AMD-Technik“  
*Abschluss:* Diplom-Ökotrophologin (FH)

### Berufserfahrung:

02/1998 – 07/1998 Praktikum bei der Himmelsberger Mineralbrunnen GmbH, Jessen, Bereich Labor und Qualitätssicherung  
*Praktikumsthema:* Erarbeitung eines HACCP-Konzeptes  
12/2000 – 12/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmitteltechnik und Qualitätssicherung e.V. (ILTQ), Köthen  
01/2002 – 03/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Anhalt (FH), Institute of Bioanalytical Sciences (IBAS), Bernburg  
03/2004 – 07/2004 Wissenschaftliche Assistentin am Prof.-Hellriegel-Institut e.V., Bernburg  
04/2006 – 08/2006 Wissenschaftliche Assistentin am Prof.-Hellriegel-Institut e.V., Bernburg  
09/2006 – 10/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Anhalt (FH), Institute of Bioanalytical Sciences (IBAS), Bernburg  
seit 11/2006 Laborleiterin, Validierung, Labor L+S AG, Bad Bocklet / Großenbrach

## Liste der Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Originalbeiträge

Richter, J.; Schellenberg, I.: Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential-Oil Related Compounds of Aromatic Plants and Optimization of Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *in print*

Richter, J.; Stützer, M.; Schellenberg, I.: Impact of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) on Essential Oil Amount and Aroma Compounds Composition of Marjoram (*Origanum majorana* L.), Caraway (*Carum carvi* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Lebensmittelchemie*, *in print*

### Buchbeiträge

Richter, J.; Stützer, M.; Kabrodt, K.; Schellenberg, I.: Effects of Mycorrhization on Amount and Composition of Essential Oils of Marjoram (*Majorana hortensis*), Caraway (*Carum carvi* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Kozłowski, R.; Zaikov, G. E.; Pudel, F. (Eds.): *Renewable Resources and Plant Biotechnology*. Nova Science Publishers, Inc., USA

### Veröffentlichungen ohne Begutachtung

Richter, J.; Schellenberg, I.: Einsatz von arbuskulären Mykorrhizapilzen (AMP) zur Ertrags-erhöhung und Qualitätssicherung im konventionellen und ökologischen Gewürz- und Heil-pflanzenanbau Sachsen-Anhalts. Schlussbericht FKZ 03i0618B, 2006

### Vorträge

Richter, J.; Franz, D.; Schellenberg, I.: Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss einer Mykorrhizierung auf Gehalt und Zusammensetzung der ätherischen Öle von Majoran, Thymian, Salbei und Kümmel. Vortrag, International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology (NAROSSA), Juni 2004, Magdeburg

Richter, J.; Franz, D.; Schellenberg, I.: Effect of Mycorrhization on Amount and Composition of Essential Oils in Marjoram, Sage, Thyme and Caraway. Lecture, 35th International Symposium on Essential Oils (ISEO), September 2004, Messina, Italy

Richter, J.; Kabrodt, K.; Franz, D.; Schellenberg, I.; Stützer, M.: Effects of Mycorrhization on Amount and Composition of Essential Oils of Marjoram (*Majorana hortensis*), Caraway (*Carum carvi* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Lecture, 11th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology (NAROSSA), June 2005, Poznan, Poland

Richter, J.; Baltruschat, H.; Schellenberg, I.: Improvement of the Resistance Behavior of the Medicinal Plant St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by Mycorrhization. Lecture, 12th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology (NAROSSA), June 2006, Magdeburg

### Posterpräsentationen

Richter, J.; Stützer, M.; Schellenberg, I.: Effects of Mycorrhization on the Essential Oil Content and Composition of Aroma Components of Marjoram (*Majorana hortensis*), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Caraway (*Carum carvi* L.). Poster, 36th International Symposium on Essential Oils (ISEO), September 2005, Budapest, Hungary

Richter, J.; Stützer, M.; Kabrodt, K.; Schellenberg, I.: Impact of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) on Essential Oil Amount and Aroma Compounds Composition of Marjoram (*Origanum majorana* L.), Caraway (*Carum carvi* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Poster, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, September 2006, Dresden

## Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema *„Analytische Untersuchungen zum Einfluss der Mykorrhizierung auf Ertrag, Inhaltsstoffzusammensetzung und Pathogentoleranz von Heil- und Gewürzpflanzen“* selbständig angefertigt, und diese in gleicher oder ähnlicher Fassung nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Ferner versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Quellen und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Halle/Saale, den 20.10.2006

.....  
Jana Richter