

HPLC-Analyse von Phytoalexinen zur Differenzierung von
***Camelina sativa* (L.) Crtz.- Sorten**

Dem
Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität-Gesamthochschule-Paderborn

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

vorgelegte Dissertation

von
Michael Henneken
aus Warburg

Paderborn, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 1995 bis Juni 2001 im Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung im Fachbereichs Agrarwirtschaft und im Fachbereich Chemie und Chemietechnik der Universität – Gesamthochschule - Paderborn angefertigt.

1 Referent: Prof. Dr. K. Krohn
2 Referent: Prof. Dr. V. H. Paul
3 Referent: Prof. Dr. G. Masuch
Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Grote

Publikationen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit

Henneken, M.; Föller, I.; Paul V.H.

Untersuchungen zur Phytoalexinproduktion von *Camelina sativa* (L) Crtz zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Präsentation : 52. Deutsche Pflanzenschutztagung in Freising-Weihenstephan 9. -12.10.2000, Heft 376: 211.

Henneken, M.; Föller, I.; Paul V.H.; Krohn, K.

The influence of temperature on the production of Camalexin and Methoxycamalexin in *Camelina sativa* (L) Crtz. In Press

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Abwehrreaktionen zwischen Pflanze und Pathogen	1
1.1.1	Pflanze–Pathogenbeziehungen.....	1
1.1.2	Abwehrmechanismen bei Pflanzen.....	2
1.2	Elicitoren	3
1.3	Messen von induzierbaren Abwehrmechanismen	5
1.3.1	RP-Proteine.....	5
1.3.2	Phytoalexine.....	5
1.3.2.1	Phytoalexine der <i>Brassicaceae</i>	6
1.3.2.2	Nachweis von Phytoalexinen (Indolverbindungen)	7
1.3.2.3	Nachweis der Phytoalexine über die biologische Aktivität	8
1.4	Die Pflanze <i>Camelina sativa</i>	9
2	AUFGABENSTELLUNG.....	11
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	Pflanzen und Phytopathogene	13
3.1.1	Pflanzen	13
3.1.2	Phytopathogene	14
3.2	Geräte	14
3.3	Chemikalien und Stammlösungen	15
3.4	Anzucht von <i>C. sativa</i> - Pflanzen.....	16
3.5	Untersuchungen zum Nachweis der Induzierbarkeit der Phytoalexinproduktion mit BION®	16
3.6	Optimierung eines Analysenverfahrens zur quantitativen Bestimmung von Camalexin und Methoxycamalexin im Spross von <i>C. sativa</i>	18
3.6.1	HPLC-Analysen.....	19

3.6.1.1	Ermittlung der Emissionswellenlänge von Methoxycamalexin.....	19
3.6.2	Probenvorbereitung	20
3.6.2.1	Aufschluss der Pflanzen	20
3.6.2.2	Untersuchung von unterschiedlichen Festphasen zur Aufbereitung der Primärextrakte	21
3.6.2.3	Optimierung der Festphasenextraktion mit C-18 Material	22
3.6.3	Durchführung des Analysenverfahrens	23
3.6.3.1	Ohne Pflanzenmatrix.....	24
3.6.3.2	Mit Pflanzenmatrix.....	24
3.6.4	Kalibrierung des Analysenverfahrens.....	24
3.6.4.1	Kalibrierfunktionen	24
3.6.4.2	Wiederfindungsfunktion	26
3.7	Untersuchungen auf weitere induzierbare bioaktive Substanzen in	
	<i>C. sativa</i>	27
3.7.1	Erstellen eines Rohextraktes und Auftrennung	28
3.7.2	Weitere Auftrennung der biowirksamen Fraktionen	30
3.7.2.1	Auftrennung mit DC	30
3.7.2.2	Auftrennung mit Flash-System (Si-60).....	31
3.7.2.3	Auftrennung mit RP-HPLC (C-18).....	31
3.8	Anwendung des optimierten Analysenverfahrens zur qualitativen	
	und quantitativen Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin	32
3.8.1	Vergleichende Untersuchung von BION[®], anorganischen Salzen und <i>Botrytis cinerea</i> zur Induktion der Phytoalexinproduktion	32
3.8.2	Ermittlung der Phytoalexinproduktion zu verschiedenen Pflanzenstadien	32
3.8.3	Messung der Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin	33
3.8.4	Messung der Phytoalexinproduktion zur Differenzierung von 13 <i>C. sativa</i>-Sorten zu drei unterschiedlichen Temperaturregimen.....	33

3.9 Statistische Auswertung	34
4 ERGEBNISSE	35
4.1 Optimierung des Analysenverfahrens zur quantitativen Bestimmung von Camalexin und Methoxycamalexin im Spross von <i>C. sativa</i>	35
4.1.1 HPLC Analysenmethode	35
4.1.1.1 Normal Phase HPLC Methode (NP-HPLC) mit SI-60 Material.....	35
4.1.1.2 Revers Phase HPLC Methode (RP-HPLC) mit C-18 Material.....	36
4.1.1.3 Emissionswellenlänge von Methoxycamalexin	37
4.1.2 Probenvorbereitung	37
4.1.2.1 Aufschluss der Pflanzen.....	37
4.1.2.2 Effektivität der Aufbereitung der Primärextrakte mit unterschiedlichen Festphasen	38
4.1.2.3 Optimierung der Festphasenextraktion mit C-18 Material	40
4.1.3 Durchführung und Modifizierung des Analysenverfahrens	42
4.1.4 Durchführung des optimierten Analysenverfahrens	43
4.2 Induktion der Phytoalexinproduktion in <i>C. sativa</i> mit BION®	46
4.3 Weitere induzierbare bioaktive Metabolite in <i>C. sativa</i>	49
4.4 Anwendung des optimierten Analysenverfahrens zur Analyse von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS im Spross von <i>C. sativa</i>	51
4.4.1 Induktion der Phytoalexinproduktion mit BION®, anorganischen Salzen und <i>B. cinerea</i>	51
4.4.2 Induktion der Phytoalexinproduktion von <i>C. sativa</i> mit dem Pflanzenaktivator BION® zu verschiedenen Entwicklungsstadien.....	55
4.4.3 Akkumulation von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS in <i>C. sativa</i> nach der Behandlung mit BION®	57
4.4.4 Differenzierung von 13 <i>C. sativa</i>-Sorten anhand von unterschiedlichen Phytoalexinkonzentrationen bei drei Temperaturregimen.....	60

4.4.4.1	Ermittelte Konzentrationen	60
4.4.4.2	Differenzierung der 13 Sorten anhand der ermittelten Phytoalexin-Konzentrationen	64
5	DISKUSSION	74
5.1	Induktion der Phytoalexinproduktion mit BION [®] und anderen Elicitoren	74
5.2	Optimierung eines Analysenverfahrens zur Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin	76
5.3	Anwendung des optimierten Analyseverfahrens zur Quantifizierung von Camalexin und Methoxycamalexin	82
5.3.1	Induktion der Phytoalexinproduktion von <i>C. sativa</i> mit dem Pflanzenaktivator BION [®] zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien	83
5.3.2	Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin in <i>C. sativa</i> nach der Induktion mit dem Pflanzenaktivator BION [®]	85
5.3.3	Untersuchungen auf weitere bioaktive Metabolite in <i>C. sativa</i>	89
5.3.4	Differenzierung von 13 <i>C. sativa</i> Sorten	89
5.4	Abschließende Betrachtung der Untersuchung und Ausblick	93
6	ZUSAMMENFASSUNG	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	101
8	ANHANG	110

Abkürzungen

BTH	1,2,3-Benzothiadiazol-7-carbothiolsäure-S-methylester
Em	Emmission
Ex	Extinktion
FM	Frischmasse
IND	2,6-Dichlorisonikotinsäure
k'	Kapazitätsfaktor
LAR	lokal aktivierte Resistenz
MPT	Multitopfplatte (0,2 m ²)
n.a	nicht analysiert
n.n	nicht nachweisbar
n.v	nicht vorhanden
PDA	potato-dextrose-agar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
PR-Proteine	pathogenic related Proteins
SA	Salicylic acid
SAR	systemisch aktivierte Resistenz
TLC/DC	thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TM	Trockenmasse
UTS	unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt

1 Einleitung

1.1 Abwehrreaktionen zwischen Pflanze und Pathogen

Im Verlauf der Entwicklungsgeschichte von Gefäßpflanzen und den von Gefäßpflanzen lebenden, parasitierenden oder pathogenen Organismen (wie Mikroorganismen, Insekten, Aschelminthen, Landwirbeltiere, Viren und Viruide) hat sich ein vielschichtiges System von Wechselwirkungen entwickelt. Im Pflanzenreich haben sich eine Vielzahl verschiedener Strategien entwickelt, mit denen der durch schädigende Organismen entstehende Schaden eingeschränkt oder verhindert werden kann. Zu diesen Mechanismen gehören z.B. spezielle Bildungen an der Pflanzenoberfläche (Modifizierungen von Epidermiszellen zu Drüsenzellen und Dornen, Ausbildung von Stacheln, usw.). Weiter werden verschiedenste chemische Verbindungen gebildet, die z.B. toxisch auf Parasiten oder Pathogene wirken und somit eine Schädigung einschränken bzw. verhindern (Strasburger, et al. 1993). Im Gegenzug zu den Abwehrmechanismen der Pflanzen entwickelten die schädigenden Organismen Mechanismen, um die Abwehrmechanismen der Pflanzen zu überwinden. Dies geschieht z.B. durch die enzymatische Umwandlung von toxischen von der Pflanze gebildeten Substanzen in unschädliche Verbindungen. Die Anpassung der Pathogene an die Abwehrmechanismen der Pflanze bedingt wiederum eine Reaktion der Pflanze usw.

1.1.1 Pflanze–Pathogenbeziehungen

Werden in diesem Zusammenhang ausschließlich die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Pathogenen betrachtet, steht dem Pathogen ein umfangreiches von den Pflanzen ausgebildetes Abwehrsystem zur Einschränkung bzw. Verhinderung von Krankheitsbefall gegenüber (Baily & Mannsfield, 1982; Dudler, 1997; Elstner et al., 1996; Schlösser, 1997; Hammerschmidt, 1999; Lucas, 1999). Bei der Wirt-Erreger-Beziehung kann es sich um ein kompatibles oder inkompatibles System handeln. Von einem kompatiblen System wird dann gesprochen, wenn eine Pflanze von einem Pathogen besiedelt werden kann. Wird das Pathogen in seiner Entwicklung frühzeitig gehemmt oder abgetötet, so wird dies als inkompatible Wirt-Pathogen-Beziehung bezeichnet. Zwischen diesen beiden Extremen sind alle denkbaren Wirt-Pathogen-Beziehungen ausgebildet.

1.1.2 Abwehrmechanismen bei Pflanzen

Grundsätzlich können nach Elstner et al. (1996) und Schlösser (1997) bei einer inkompatiblen Wirt-Erreger-Interaktion die präinfektionellen und die postinfektionellen Abwehrmechanismen unterschieden werden. Zu den präinfektionellen Abwehrmechanismen gehören die strukturelle Resistenz, die z.B. auf lipophile Wachsauflagerungen oder eine spezielle Struktur der Spaltöffnungen beruhen kann und präformierte antimikrobiell wirkende Abwehrsubstanzen. Bei den präformierten Abwehrsubstanzen handelt es sich meist um Glukosinulate, die meist in Vakuolen gespeichert und bei einem Befall mit einem Pathogen in das Cytoplasma gelangen, wo sie dann durch das Enzym β -Glukosidase, welches die Glukosinulate stets begleitet (Fenwick et al., 1983), in die freien, aktiven Aglycone umgewandelt werden. Derzeit sind über 100 verschiedene Glucosinulate aus verschiedenen Pflanzenfamilien bekannt.

Unter der postinfektionellen Abwehrreaktion sind mechanische und chemische Abwehrmechanismen zusammengefasst, die erst durch den Befall mit einem Pathogen und dem dadurch entstehenden Reiz aktiviert werden. Die Abwehrmechanismen sind zuvor nicht oder nur sehr schwach in der Pflanze nachweisbar. Zu diesen Abwehrmechanismen gehören die Hypersensitivitätsreaktion (oxidative Ausbruch) (HR-Reaktion), die Bildung von pathogenesis-relevated Proteins (PR-Proteine), die Papillenbildung, die Lignifizierung, die Suberinbildung, die Bildung von Phytoalexinen, die Bildung von Melanin und Tannin, und die Bildung von hydroxyprolinreichen Glycoproteinen (Schlösser, 1997; Elstner et al., 1996). Zur Verdeutlichung der Bedeutung der verschiedenen Abwehrmechanismen bei der Abwehr von Mikroorganismen spricht Schlösser (1997) von einer Kaskade multipler Abwehrvorgänge.

Die Abwehrvorgänge verlaufen nach Schlösser (1997) grundsätzlich so, dass eine Pflanze zuerst den Angriff eines Pathogens erkennt (Reizerkennung) und dann eine Kaskade multipler Abwehrvorgänge auslöst (Reizweiterleitung). Das Erkennen des Befalls erfolgt über exogene Signale, die als Elicitoren (Induktoren) bezeichnet werden (vgl. 1.2). Als Elicitoren dienen Produkte und Zellwandbestandteile der Pathogene (Chitinfragmente und Glucane) sowie mikrobielle Toxine. Die Induktoren binden an Rezeptoren der Plasmamembran, wodurch über eine Signalkette mit Verstärkerwirkung die Bildung von Genprodukten zur Ausbildung der Abwehrkaskade in der Pflanze ausgelöst wird. Die Kaskade wird bei fast allen Wirt-Pathogen-Beziehungen ausgelöst. Bei den kompatiblen Systemen wird der Ablauf der Kaskade und somit die Abwehrreaktion von dem Pathogen unterdrückt oder das Pathogen hat vor der Ausbildung der Resistenzmechanismen die Pflanze bereits besiedelt. Bei den

inkompatiblen Systemen werden die entsprechenden Abwehrmechanismen frühzeitig aktiviert und führen früher oder später zur endgültigen Hemmung des Erregers.

Bei der Abwehrreaktion ist zwischen lokal (LAR) und systemisch aktivierter Resistenz (SAR) zu unterscheiden. Bei der LAR werden die Abwehrmechanismen (Resistenzfaktoren) durch endogene Signale (Botenstoffe) nur in den Zellen aktiviert, die sich in unmittelbarer Nähe der Befallsstelle befinden. Bei der SAR wird der Reiz von dem Ort des Befalls (Aktivierung) über endogene Signale in weiter entfernte, befallsfreie Pflanzenteile geleitet und löst dort die entsprechenden Abwehrmechanismen aus, die zu einer Immunisierung der Pflanze gegen einen weiteren Befall mit Pathogenen führt. Die SAR ist mit der Bildung von pathogenesis-related Proteins (PR-Proteine) assoziiert (Ryals et al., 1996; Van Loon et al., 1997). Demnach kann die SAR anhand gebildeter PR-Proteine und weiter mit dem Nachweis der Aktivierung des PR-1 Gens nachgewiesen werden (Unkes et al., 1993; Pieterse et al., 1996).

1.2 Elicitoren

Sowohl die LAR als auch die SAR können durch abiotische und biotische Elicitoren (Elicitoren, Induktoren) ausgelöst werden. Diese Elicitoren haben eine große Bedeutung bei der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen. Viele Untersuchungen zum Verständnis der Abwehrreaktionen von Pflanzen wurden an dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. So konnten Delaney et al. (1994) an transgenem Tabak und *A. thaliana* die essentielle Bedeutung von Salicylsäure bei der Expression der Abwehrkaskade nachweisen. Über die Salicylsäure (SA) können fast alle induzierbaren Abwehrreaktionen induziert werden (Ryals et al., 1995; Ryals et al., 1996; Zaho & Last, 1996; Thulke & Conrath, 1998; Zaho, et al. 1998). Eine weitere wichtige Verbindung in diesem Zusammenhang ist der 1,2,3-Benzothiadiazol-7-carbothiolsäure-S-methylester (BTH), welcher von Forschern der Firma Ciba-Geigy entdeckt wurde (Métraux et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Görlach et al., 1996; Lawton et al., 1996) und derzeit als Pflanzenaktivator mit dem Handelsnamen BION[®] in verschiedenen Kulturen zur Bekämpfung von Pathogenen erfolgreich eingesetzt wird (Laun, 1997; Leadbeater et al., 1997). Die Wirkung von BTH soll darin bestehen, dass die Funktion der Salicylsäure nachgeahmt wird. In der Abb. 1 sind verschiedene Resistenzinduktoren dargestellt.

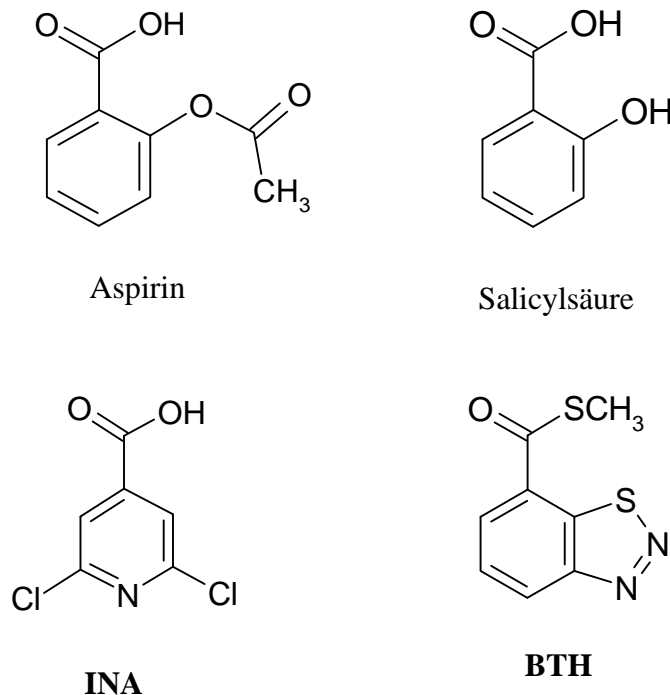


Abb. 1: Strukturen von Resistenzinduktoren. Acetylsalicylsäure (Aspirin), INA: 2,6-Dichlorisonicotinsäure, BTH: 1,2,3-Benzothiadiazol-7-carbonylsäure-S-methylester (Pflanzenaktivator BION®)

Ein weiterer Aspekt der sich aus diesem Zusammenhang ergibt, ist die Luftübertragbarkeit von Stoffen, welche die SAR bei Pflanzen auslösen können (Schlösser, 1997; Shulaev et al., 1997). So konnte nachgewiesen werden, dass über gasförmige Methylsalicylsäure (o-Hydroxybenzoesäure-methylester), die von *Nicotinia tabaccum* gebildet wird, über einen Luftstrom eine SAR in benachbarten Pflanzen induziert werden kann.

Zhao & Last (1996) konnten mit Hilfe von Induktoren nachweisen, dass ein regulativer Zusammenhang zwischen der Bildung des Phytoalexins Camalexin in *A. thaliana* und dem Tryptophan-Stoffwechselweg besteht. So konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* oder mit Silbernitrat sowohl die Enzyme des Tryptophan-Stoffwechsels als auch die Camalexinakkumulation induziert wurden. Zook & Hammerschmidt (1997) konnten die Beteiligung von Cystein bei der Bildung von Camalexin in *A. thaliana* nachweisen.

Nach Aktivierung der Abwehrkaskade durch Elicitoren in verschiedenen Stoffwechselmutanten, wurde die Beteiligung und die Koordination vieler Gene von *A. thaliana* für Abwehrmechanismen gegen verschiedene Pathogene erforscht (Pieterse et al., 1996; Rogers et al., 1996; Adam & Summerville, 1996; Reuber et al., 1998; Volko et al., 1998).

1.3 Messen von induzierbaren Abwehrmechanismen

Zur Beurteilung der induzierbaren Abwehrreaktion von Pflanzen gegenüber Pathogenen ist es erforderlich, die Abwehrreaktionen in Abhängigkeit von bestimmten Parametern nachzuweisen und zu messen. Anhand der Abwehrkaskade stehen verschiedene Messparameter zur Verfügung; so kann ein Nachweis der Abwehrreaktion über einen reduzierten Befall nach Inokulation mit einem Pathogen geführt werden. Weiter kann ein Nachweis über die Aktivität von Genen und Genprodukten (Pieterse et al., 1998; Zhao & Last, 1998), über PR-Proteine (Woloshuk et al., 1991; Alexander et al., 1993; Zhang et al., 1998) und über Phytoalexine (Tsuji et al., 1992; Higuera, 1996; Jeandet et al., 1997) erfolgen. Wird die Resistenzreaktion über gebildete Produkte nachgewiesen, die gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen haben, bietet dieses den Vorteil, dass die Produkte mit physikalisch-chemischen Methoden und entsprechenden Biotests nachgewiesen werden können (Slusarenko et al., 1989; Browne et al., 1991). Hierfür eignen sich PR-Proteine und Phytoalexine.

Ein Ziel solcher Untersuchungen besteht darin, Unterschiede zwischen Pflanzen bezüglich freilandrelevanter Resistenzen unter Laborbedingungen zu messen um dadurch zusätzliche Kriterien zur Beurteilung von Resistenzen zu bekommen. Weiter sollen die Zusammenhänge zwischen der Aktivierung der Abwehrmechanismen und der identifizierten Resistenzgene aufgeklärt werden.

1.3.1 RP-Proteine

PR-Proteine können bereits Minuten bis Stunden nach dem Auslösen der Abwehrkaskade nachgewiesen werden. Als bekannte PR-Proteine sind u.a. die Chitinasen und die β -1,3-Glucanasen (Kauffmann et al., 1987; Legrand et al., 1987) zu nennen. Diese Enzyme bauen als Substrat Chitin bzw. β -1,3-Glucan ab, die als wichtige strukturelle Zellwandbestandteile bei allen Pilzen vorkommen. Nach Elstner et al. (1996) werden die PR-Proteine in 11 verschiedene Familien mit zum Teil mit noch unbekannten Funktionen eingeteilt.

1.3.2 Phytoalexine

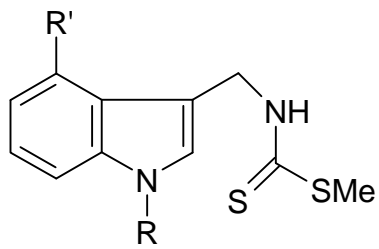
Phytoalexine können meist erst zum Ende der Abwehrkaskade nach Stunden oder Tagen in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Bildung der Phytoalexine erfolgt um das Wachstum von eingedrungenen Pathogenen zu stoppen (Elstner et al., 1996). Nach Schlösser (1997) sind Phytoalexine definiert als:

„niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Substanzen in Pflanzen, die infolge von Wirt-Pathogen-Interaktionen in der Nähe eines Infektionsortes entstehen und nicht in befallsfreie Pflanzenteile weitergeleitet werden“.

Seit der ersten Beschreibung von Phytoalexinen durch Müller & Börger (1940) wurde eine Vielzahl von Phytoalexinen aus verschiedenen Pflanzenfamilien isoliert. Damit verbunden waren Untersuchungen über den Stoffwechsel, zur Toxizität, über die Rolle bei der Krankheitsresistenz und den Induktionsbedingungen. Eine Zusammenfassung findet sich u.a. bei Baily & Mansfield (1982), Dudler (1997), Harborne (1999), Osbourn (1999). Heute sind eine Vielzahl von Phytoalexinen aus verschiedenen Pflanzenfamilien bekannt, die zu unterschiedlichen Stoffklassen gehören.

1.3.2.1 Phytoalexine der *Brassicaceae*

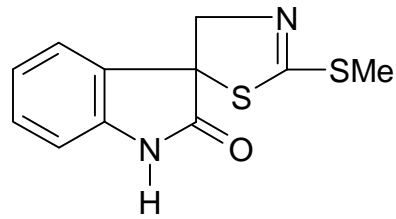
Charakteristisch für die Pflanzenfamilie der *Brassicaceae* sind Phytoalexine wie Brassinin, Cyclobraassinin und Brassilexin, die zur Gruppe der Indolverbindungen gehören (Abb. 2). In diese Gruppe gehören auch die Phytoalexine von *Camelina sativa*, das Camalexin und das Methoxycamalexin (Abb. 3), die von Browne et al. (1991) nach der Behandlung mit *Alternaria brassicae* von *C. sativa* isoliert und identifiziert werden konnten. An *Arabidopsis thaliana* konnte ebenfalls Camalexin als Reaktion auf eine Inokulation mit *Pseudomonas syringae* nachgewiesen werden (Tsuji et al., 1992). Die an *C. sativa* gefundenen Phytoalexine spielen bei der Krankheitsresistenz eine entscheidende Rolle. Nach Tewari (1991) und Conn et al. (1991) besteht zwischen der Resistenz von *C. sativa* gegenüber *Alternaria brassicae*, ein in der Familie der *Brassicaceae* weit verbreitetes Pathogen, und den gefundenen Phytoalexinen ein direkter Zusammenhang. Zusätzlich konnte Conn et al. (1994) noch zwei weitere antifungal aktive Substanzen aus der Wurzel von *C. sativa* isolieren, das 10-Methylsulfinyldecylisothiocyanat (Glykosid) und das 1-Methylindol-3-methylcarboxylat (Abb. 3). Im Spross von *C. sativa* konnten diese Verbindungen nicht nachgewiesen werden.



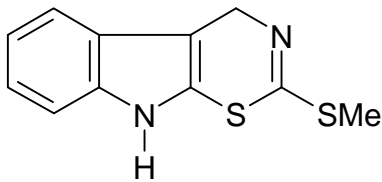
R=R'=H Brassinin

R=OMe; R'=H 1-Methoxybrassinin

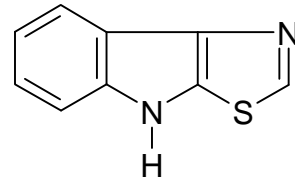
R=H; R'=OMe 4-Methoxybrassinin



Spirobrassinin

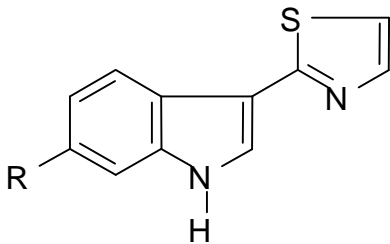


Cyclobrassinin



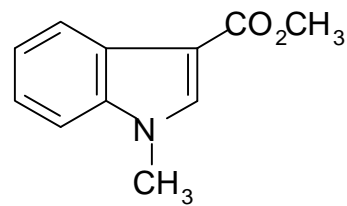
Brassilexin

Abb. 2: Auswahl an Phytoalexinen von Brassicaceae nach Gross (1993)



R=H Camalexin

R=OMe Methoxycamalexin



1-Methylindol-3-methylcarboxylat

Abb. 3: Strukturformeln der an *C. sativa* vorkommenden Phytoalexine nach Browne et al. 1991, Conn et al. 1994

1.3.2.2 Nachweis von Phytoalexinen (Indolverbindungen)

Zur Isolierung und Anreicherung von indolischen Phytoalexinen aus *Brassicaceae* (Senf, *Brassica juncea* und Raps, *B. napus*) wurde von Kollmann et al. (1989) eine Versuchsreihe mit verschiedenen Festphasen durchgeführt. Die mit Methanol bei 80 °C extrahierten Proben wurden in Hexan überführt und mit verschiedenen Festphasen gereinigt. Die Wiederfindungsraten lagen je nach Phytoalexin bei der Verwendung von C-8 und C-18 Material zwischen 67 und 83 %. Die quantitative Analyse erfolgte mit Hilfe der HPLC mit C-18 Säulenmaterial und einem Methanol-Wasser Gradienten.

Zur Festphasenextraktion von Thiabendazolen aus Muskelgewebe des Rindes verwendete Barker et al. (1989) C-18 Material. Das Zerkleinern des Gewebes erfolgt in Anwesenheit von C-18 Material. Die anschließende Extraktion erfolgte mit Ethylacetat. Die quantitative Analyse wurde mit der HPLC unter Verwendung von C-18 Säulenmaterial durchgeführt. Als mobile Phase wurde Phosphorsäure-Acetonitril verwendet, wobei die Wiederfindungsraten über 99 % lagen.

Eine weitere Möglichkeit, Thiabendazole aus pflanzlichem Gewebe (Tomate, *Lycopersicon esculentum*) quantitativ nachzuweisen, wird von Jamieson & Duncan (1989) beschrieben. Hier wurde für die Festphasenextraktion 2-OH Material verwendet. Die mit Dichlormethan aus dem Pflanzengewebe extrahierten Thiabendazole wurden auf eine Kartusche mit 2-OH Material gegeben. Eluiert wurde mit Methanol/12 mM Phosphorsäure. Die quantitative Analyse erfolgte mit der HPLC. Als stationäre Phase wurde Nitril verwendet. Als mobile Phase wurde Acetonitril/3,5 mM Phosphorsäure, 0,3 mM NaCl verwendet. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 91 und 97 %.

Von Zook et al. (1998) wurde Camalexin aus *A. thaliana* analysiert. Die Extraktion erfolgte mit Hexan aus Sporensuspensionstropfen von der Blattoberfläche. Die Reinigung der Extrakte erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Si-60 Material. Als Laufmittel wurde Chloroform/Methanol (9/1 v/v) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit der HPLC. Als stationäre Phase wurde Si-60 Material verwendet, die mobile Phase bestand aus Hexan/Isopropanol (93/7 v/v).

1.3.2.3 Nachweis der Phytoalexine über die biologische Aktivität

Neben dem quantitativen Nachweis über die HPLC ist es möglich, die Phytoalexine aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften qualitativ nachzuweisen. Pflanzenextrakte können mit Hilfe der DC-Technik aufgetrennt werden. Nachdem die zur Entwicklung notwendigen organischen Lösungsmittel abgedampft sind, kann die DC-Platte z.B. mit einer *Pseudomonas syringae* Suspension (Slusaenko et al., 1989) oder einer Sporensuspension von *Cladosporium spec.* (Conn et al. 1991) beschichtet und bei 25–35 °C inkubiert werden. Die biowirksamen Substanzen sind an einer Hemmung des Wachstums der Mikroorganismen zu erkennen. Weiter kann die antimikrobielle Aktivität mit Hilfe eines Objektträgertestes nachgewiesen werden (Kim & Matsuyama 1998).

1.4 Die Pflanze *Camelina sativa*

C. sativa gehört zur Familie der *Brassicaceae*. Der Anbau ist in Europa (z.B. Deutschland, Dänemark, Niederlande, Schweiz, Italien, Ungarn, Tschechien, Polen, Russland und Türkei) bis in die Bronze- und Eisenzeit (2000 v. Chr.) nachgewiesen (Grigson, 1960; Schultze-Motel, 1979; Mansfeld, 1986). *C. sativa* wird auch als Leindotter, Leindottersaat, Dottersaat, Dotter, Flachsdotter, Butterreps und Deutscher Sesam bezeichnet. Der *C. sativa*-Anbau in Deutschland war während des 19. Jahrhunderts rückläufig. Im 20. Jahrhundert erfolgte nur noch ein vereinzelter Anbau (Knörzer, 1978; Schultze-Motel, 1979). In Kriegszeiten wurde der Leindotter aufgrund der Nachfrage nach Öl vermehrt angebaut (Ebhardt, 1925; Regel, 1940). In der heutigen Zeit wird im Rahmen von nachwachsenden Rohstoffen für industrielle Zwecke ein Leindotteranbau wieder diskutiert (Bramm et al., 1990; Zubr, 1992; Friedt et al., 1994; Honermeier & Agegnehu, 1994a; Strasil & Skala, 1995; Zubr, 1997; Zubr, 1998). Das aus *C. sativa* gewonnene Öl kann zur Herstellung von Bodenbelägen, Farben und Lacke sowie Kitten verwendet werden (Wellie-Stephan, 1995; Friedt et al., 1994; Schuster & Friedt, 1994). Weiter kann das Öl nach einer Desodorierung für die Ernährung genutzt werden (Zubr, 1997). Zudem wird derzeit, wie schon erwähnt, ein zukünftiger Anbau von *C. sativa* als nachwachsender Ölorohstoff diskutiert.

Agronomisch interessant ist der Leindotter durch verschiedene Eigenschaften wie z.B. Ertragsstabilität an Extremstandorten, geringer Krankheitsbefall, gute Ernteeigenschaften und gute Unkrautunterdrückung. Durch Züchtung soll u.a. der Ölgehalt im Samen erhöht, die Ölqualität optimiert und das Tausendkorngewicht (TKG) erhöht werden (Schuster, 1997). Gleichzeitig sollte parallel zur Züchtung ertragsrelevanter Parameter auch eine Züchtung auf Krankheitsresistenz erfolgen, da sich nach Untersuchungen von Brinker (1999) und Föller (2000) der Leindotter als krankheitsanfälliger erwies als in der älteren Literatur beschrieben.

Sollen analytische Untersuchungen der Abwehrmechanismen an Pflanzen unter Laborbedingungen durchgeführt werden, so sollten diese Pflanzen über ein leicht induzierbares Abwehrsystem verfügen, welches anhand von Messparametern nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Weiter müssen die Kultivierungsbedingungen entsprechend einfach und die Vegetationsdauer möglichst kurz sein. Diese Eigenschaften weist u.a. *C. sativa* auf. Die Kultivierung kann bei verschiedenen Temperaturen in Gewächshaus und Klimakammer ohne größeren Aufwand erfolgen. Die Keimung erfolgt unter Klimakammerbedingungen bereits 2-5 Tage nach der Aussaat. Eine spezielle Behandlung des

Saatguts ist nicht erforderlich. Weiter ist keine Vernalisation der Pflanzen zur Induktion des Schossens bei den Sommerformen erforderlich. Die an *C. sativa* beschriebenen Phytoalexine können als Parameter zum Nachweis der Aktivierung der Abwehrmechanismen verwendet werden. Untersuchungen über weitere induzierbare Abwehrreaktionen bzw. deren Gene liegen nicht vor. Sollten diesbezüglich Untersuchungen durchgeführt werden, so kann hier berücksichtigt werden, dass *C. sativa* viele Parallelen zur gut untersuchten Modellpflanze *A. thaliana* aufweist.

2 Aufgabenstellung

Bei dem Vorgang der Züchtung von Pflanzen auf bestimmte Merkmale z.B. Ertrags-, Qualitätsparameter, usw. ist oft eine erhöhte Anfälligkeit der gezüchteten Pflanzen gegenüber Krankheiten zu beobachten (Becker 1993), da die Züchtung auf Resistenzen oft nicht genügend berücksichtigt wird. Auf dieses Defizit muss bei dem späteren Anbau dieser Sorten mit einem erhöhten Aufwand an Bekämpfungsmaßnahmen reagiert werden, um gleichbleibend hohe Erträge zu sichern.

Ein Problem der Resistenzzüchtung ist der hohe Aufwand, der zum Auffinden und Beurteilen von Resistenzfaktoren erforderlich ist. Weiter wird die auf einen Resistenzfaktor begründete Resistenz (vertikale Resistenz) relativ schnell überwunden, wobei eine auf mehreren Faktoren beruhende Resistenz (horizontale Resistenz) im allgemeinen nicht überwunden wird. Eine denkbare Lösung könnte darin liegen, dass die induzierbaren Abwehrmechanismen der Pflanzen (PR-Proteine, Phytoalexine, HR-Reaktion, usw.), welche u.a. die Resistenzen hervorrufen, quantitativ durch ein einfaches und schnelles Verfahren erkannt und beurteilt werden. Damit könnten die induzierbaren Abwehrmechanismen als zusätzliches Kriterium bei der Resistenzzüchtung berücksichtigt werden.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Untersuchung ein einfaches und schnell durchzuführendes Analysenverfahren zur Analyse der in *C. sativa* vorkommenden Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin entwickelt werden, mit dem Ziel, anhand der Phytoalexinkonzentration eine Sortendifferenzierung von *C. sativa* durchzuführen. Um dies realisieren zu können, sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden.

- Es sollte ein Analysenverfahren zur Analyse der an *C. sativa* bekannten Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin optimiert werden, mit dem beide Phytoalexine gleichzeitig in Serienuntersuchungen qualitativ und quantitativ analysiert werden können.
- Zunächst sollten verschiedene Induktoren bezüglich der Anwendbarkeit unter Laborbedingungen zur Aktivierung der Phytoalexinproduktion bei *C. sativa* untersucht werden.
- Zur Ermittlung des optimalen Entwicklungsstadiums für die Sortendifferenzierung sollte die Phytoalexinkonzentrationen zu verschiedenen Entwicklungsstadien in *C. sativa* bestimmt werden.
- Es sollten Untersuchungen zur Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin zu entsprechenden Entwicklungsstadien durchgeführt werden.

-
- Neben den bekannten Phytoalexinen Camalexin und Methoxycamalexin sollten Untersuchungen auf weitere biologisch aktive Substanzen in oberirdischen Pflanzenteilen von *C. sativa* durchgeführt werden, die potentiell zur Sortendifferenzierung herangezogen werden können.
 - Aufbauend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Untersuchungen sollte eine Sortendifferenzierung von *C. sativa* anhand von Unterschieden bezüglich der Phytoalexinproduktion bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzen und Phytopathogene

3.1.1 Pflanzen

Von *Camelina sativa* (L) Crtz. standen 13 Sorten/Linien zur Verfügung. Die Sorten/Linien sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Sorten/Linien mit den Nummer 1 bis 10 wurden von der Deutschen Saatveredelung (DSV) zur Verfügung gestellt. Die Sorten/Linien mit den Nummern 11-13 waren dänisches Zuchtmaterial und wurde von Dr. Zubr von der Universität Rossgilde, Dänemark zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden die *C. sativa* Sorten/Linien als Sorten bezeichnet.

Tab. 1: Verwendete Sorten / Linien von *Camelina sativa*

Nummer	Sorte/Linie	Herkunft
1	Lindo	DSV
2	Bavaria	DSV
3	Soledo	DSV
4	Licella	DSV
5	Limaga	DSV
6	Ligena	DSV
7	WIR 2/92 Genbank St. Petersburg	DSV
8	WIR 3/92 Genbank St. Petersburg	DSV
9	92/055 25/87 Genbank Gattersleben	DSV
10	92/063 28/81 Genbank Gattersleben	DSV
11	Zuchtlinie aus Dänemark	Dr. Zubr
12	Zuchtlinie aus Dänemark	Dr. Zubr
13	Zuchtlinie aus Dänemark	Dr. Zubr

3.1.2 Phytopathogene

Es wurde drei Phytopathogene verwendet. *Alternaria brassicae* (Erreger der Rapsschwärze) und *Cladosporium spec.* wurden von *Brassica napus* isoliert. *Botrytis cinerea* (Erreger der Grauschimmelfäule) wurde von *C. sativa* isoliert. Die Pathogene wurden auf PDA- Medium (Fertigmedium von Merck) in Plastikpetrischalen (Ø 90 mm) bei Raumtemperatur kultiviert. Zur Anregung der Sporulation wurde *B. cinerea* bei 18 °C inkubiert, sobald die Wachstumsfront die Peripherie der Petrischale erreicht hatte. *A. brassicae* wurde bei Raumtemperatur unter UV-Licht inkubiert.

3.2 Geräte

HPLC

Es wurde ein HPLC-System der Firma Merck Hitachi verwendet (Pumpe L6200A, Fluoreszenzdetektor F 1080F, Dioden Array Detektor (DAD) L 4500, Autosampler AS 4000A). Auswertungssoftware: Merck Hitachi Model 6000, Chromatographie Data Station Software, HPLC Manager Version 2.

Weiter wurde der Fluoreszenzdetektor RF-2000 der Firma Gynkotek verwendet.

Flashchromatographie

Flash 12i LCTech, Kartuschen: 1,2 x 7,5 cm, Si-6032-63 µm.

Mikroskop

Forschungsmikroskop DMRB der Firma Leica

Dünnschichtchromatographie (TLC)

DC-Platten Si-60, 20 x 20 cm auf Aluminiumfolie mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ von Merck.

Festphasenextraktion:

C-18 und 2-OH RP Material wurde in Einmalextraktionskartuschen von der Firma Varian mit 3 ml Reservoir und 3 g Materialfüllung bezogen.

Als Diatomeenmaterial wurde Extrelut[®]NT-Material von Merck Darmstadt in Verbindung mit einem Kartuschen-Fertigsystem verwendet. Eine Kartuschefüllung des Extrelut[®]-Materials hatte eine potentielle Wasseraufnahmekapazität von 20 ml.

Beleuchtung der Pflanzen

Beleuchtung der Pflanzen im Gewächshaus: SON 400 Na-Dampflampe (400 W).

Belichtung der Pflanzen in der Klimakammer: Neonröhren (Flora der Firma Osram) (52 bzw. 36 W).

pH-Meter

pH-Meter 766 Calimatic der Firma Knick

3.3 Chemikalien und Stammlösungen

Camalexinstammlösung

Von Prof. Dr. Ayer (University of Alberta, Edmonton, Alberta Canada T6G 2E1) wurden ca. 2 mg reines Camalexin zur Verfügung gestellt. Es wurde eine methanolische Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml erstellt, die als Stammlösung verwendet und bei –21 °C gelagert wurde.

Puffer (nach Jamieson & Dukan 1989)

Phosphatpuffer (basisch): 3,5 mM Phosphorsäure, 0,3 mM Natriumchlorid pH 8.

Phosphatpuffer (sauer): 12 mM Phosphorsäure, 0,3 mM Natriumchlorid, pH 4.

Zum Einstellen des pH-Wertes der Puffer wurden Natronlauge und Phosphorsäure verwendet. Die HPLC Puffer wurden zur Konservierung mit 0,5 % Natriumacid versetzt, aus HPLC-Grad-Wasser hergestellt und filtriert (0,45 µm).

Chemikalien und Nährmedien

Acetonitril (Chromatographie Grade > 99,9 %, Merck Darmstadt)

Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothionsäure-S-metyleste (BTH, BION[®]) : Zugelassenes Pflanzenstärkungsmittel der Firma Novatis

Dichlormethan (zur Analyse > 99,5 %, Merck, Darmstadt)

n-Hexan (Chromatographie Grade > 98,0 %, Merck, Darmstadt)

Methanol (zur Analyse > 99,8 %, Merck, Darmstadt)

Natriumacid (reinst > 99 %, Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid (zur Analyse > 99,5 %, Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid (Plätzchen zur Analyse > 99 %, Merck, Darmstadt)

2-Propanol (Chromatographie Grade > 99,9 % Merck, Darmstadt)

ortho-Phosphorsäure (zur Analyse > 85 %, Merck, Darmstadt)

Salzsäure (reinst > 32 %, Merck, Darmstadt)

Tetrahydrofuran (Chromatographie Grade > 99,9 %, Merck, Darmstadt)

Wasser (Chromatographie Grade, Merck, Darmstadt)

Potato Glucose Agar (PDA) Fertigmedium (Merck, Darmstadt)

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle wässrigen Lösungen mit hauseigenem demineralisierten Wasser angesetzt und die angegebenen Chemikalien direkt, ohne weitere Vorbereitung eingesetzt.

3.4 Anzucht von *C. sativa*- Pflanzen

Die Aussaat von *C. sativa* erfolgte in Pikier-Einheitserde der Firma Balster. Zur Aussaat wurden Multitopfplatten (M 50) der Firma Meyer verwendet. In jedes mit Boden gefülltes Töpfchen wurden 3-4 Samen gelegt und mit Erde bedeckt (0,3-0,5 cm). Unter Gewächshausbedingungen wurden die Pflanzen bis zum Gebrauch bei einer Tageslänge von mindestens 14 h inkubiert. Bei Bedarf wurde künstlich beleuchtet. In der Klimakammer wurden die Pflanzen, soweit in den speziellen Versuchen nichts anderes angegeben wurde, bei einer Temperatur von 18/10 °C und einem Tag/Nachtrhythmus von 14/10 h bis zum Gebrauch inkubiert. Bewässert wurde nach Bedarf. Bei Bedarf wurden Insektizide (Tamaron, Pirimor) eingesetzt. Fungizide wurden nicht verwendet, obgleich teilweise echter Mehltau (*Erysiphe* spp.) an den Pflanzen auftrat. Maßnahmen zur Verbesserung der Nährstoffsituation der Pflanzen wurden nicht durchgeführt.

3.5 Untersuchungen zum Nachweis der Induzierbarkeit der Phytoalexinproduktion mit BION®

Da nicht bekannt war, ob der Pflanzenaktivator BION® zur Induktion der Phytoalexinbildung in *C. sativa* verwendet werden konnte, wurde eine vergleichende Untersuchung mit *A. brassicae* durchgeführt. Browne et al. (1991) konnten mit *A. brassicae* die Phytoalexinproduktion in *C. sativa* induzieren.

C. sativa-Pflanzen der Sorte 13 wurden unter Gewächshausbedingungen bis zum Rosettenstadium angezogen (vgl. 3.4). Zu diesem Stadium wurden die Pflanzen wie in Tab. 2

dargestellt behandelt. Die Verteilung der Behandlungsflüssigkeiten erfolgte mit einem handelsüblichen Pumpzerstäuber. 12 Tage nach der Behandlung (Produktinformation von BION[®]) wurde der Spross (mit einer Rasenschere) abgeschnitten und direkt bei –21 °C gelagert.

Tab. 2: Induktion der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* mit *A. brassicae* und BION[®]

Induktor	<i>A. brassicae</i>	BION[®]	Kontrolle
Konidiendichte, Konzentration	Sporensuspension 10 ³ Konidien / ml	4,5 mg / 100 ml in Leitungswasser	Leitungswasser
ml / MTP	20	20	20
Anzahl MTP	10	10	10

MTP= Multitopfplatte

Zum Nachweis der Phytoalexine wurden zunächst aus 100 g Pflanzenmaterial jeder Variante ein Primärextrakt durch Inkubation in 100 ml 80 °C heißem Methanol gewonnen (nach Kollmann et al. 1989). Der Primärextrakt wurde mittels DC an Si-60 mit CHCl₃/CH₃OH 49/1 (v/v) aufgetrennt. Nach dem Trocknen der TLC wurden diese mit Dragendorff's Reagenz oder mit einer Sporensuspension (1 Mill. Konidien/ml) von *Cladosporium spec.* besprüht und bei 25 °C für 24 Stunden inkubiert (nach Browne et al. 1991).

Zusätzlich wurde ein Objektträgertest angewendet. Für diesen Test wurden Objektträger mit einer Vertiefung benutzt. Von dem Primärextrakt wurden 2 mal 70 µl in die Vertiefung gegeben und in der Sterilbank verdampft. Dann wurden 70 µl einer *A. brassicae*-Sporensuspension (100 Konidien/ml) mit 1 % Glucose in die Vertiefung gegeben und die Objektträger in einer dichtschießenden Keimbox, die mit befeuchtetem saugfähigem Papier (Papiertücher) ausgelegt war, bei Raumtemperatur inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Keimung der Konidien und das Wachstum des auswachsenden Myzels unter dem Lichtmikroskop bei 100 x, bzw. bei 200 x anhand des in Tab. 3 dargestellten Boniturschemas beurteilt.

Tab. 3: Boniturschema zur Beurteilung des Myzelwachstums von *A. brassicae* im Objektträgertest.

Note	Kriterium
1	keine Keimung, keine Hyphen
2	Keimung, die auswachsenden Keimhyphen sind bis zu 2 mal so lang wie die Konidien
3	ausgewachsene Keimhyphen sind bis zu 10 mal so lang wie die Konidien
4	ausgewachsene Hyphen zum Myzel verzweigt
5	Sporulation des Myzels

Das aus dieser Untersuchung erhaltene Pflanzenmaterial wurde direkt bei –21 °C eingefroren und für die Entwicklung des Analysenverfahrens verwendet (vgl. 3.6.2.2).

3.6 Optimierung eines Analysenverfahrens zur quantitativen Bestimmung von Camalexin und Methoxycamalexin im Spross von *C. sativa*

Die in der Literatur beschriebenen Analysenverfahren zur Analyse von indolischen Phytoalexinen aus Pflanzenmatrizes (Kollmann et al., 1989) waren ebenso wie die Analysenverfahren zur Analyse von Camalexin aus *C. sativa* und *A. thaliana* (Jejelowo et al., 1991; Zook et al., 1998) für Serienuntersuchungen nicht geeignet. Weiter konnte mit den beschriebenen Analysenverfahren Camalexin und Methoxycamalexin nicht gleichzeitig analysiert werden. Es sollte deshalb anhand der vorhandenen Analysenverfahren ein Analysenverfahren optimiert werden, mit dem Camalexin und Methoxycamalexin gleichzeitig in Serienuntersuchungen quantifiziert werden konnten.

Zur Klassifikation eines Analysenverfahrens werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten beschrieben (Funke et al., 1992; Schwedt, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Klassifikation nach Schwedt (1995) gewählt. Ein Analysenverfahren setzt sich demnach zusammen aus der Analysenmethode (Probenvorbereitung, Messung, Auswertung) mit dem Analysenprinzip (Messprinzip). Im Folgenden wird die Analysenmethode als HPLC-Analyse bezeichnet, da immer eine HPLC-Analyse mit Fluoreszenzdetektion angewandt wurde.

Zuerst wurden zwei verschiedenen HPLC-Analysen (Normal Phase und Revers Phase HPLC) optimiert, um die verschiedenen Fraktionen, die aus den unterschiedlichen Probenvorbereitungen resultierten, direkt analysieren zu können (Tab. 4).

Zur Optimierung der Probenvorbereitung wurden jeweils drei verschiedene Methoden zum Pflanzenaufschluss und drei verschiedene Materialien für die Festphasenextraktion miteinander verglichen. Beide Verfahren wurden zuerst einzeln und danach die gesamte Analysenmethode optimiert.

3.6.1 HPLC-Analysen

Tab. 4: Bedingungen der HPLC-Analysen (optimiert)

	Normal Phase (NP) HPLC	Reverse Phase (RP) HPLC
Säulenkartusche	250 x 4 mm	250 x 4 mm
Stationäre Phase	Si-60 Material, 5 µ	C-18 Material, 5 µ
Mobile Phase	*Hexan / Isopropanol 90 / 10 (v / v)	**Phosphatpuffer pH 4 / Acetonitril / Tetrahydrofuran 60 / 35 / 5 (v/v)
Flussrate	1 ml / min	1 ml / min
Detektion	DAD- bzw. Fluoreszenzdetektor (Ex 318, Em 384 nm)	DAD- bzw. Fluoreszenzdetektor (Ex 318, Em 384 nm)
Literatur	Optimiert nach Zook et al. (1997)	Optimiert in Anlehnung an Jamieson & Dukan (1989); Long et al. (1989); Browne et al. (1991)

*Eluentenkonzentration verändert, **Laufmittelzusammensetzung verändert

3.6.1.1 Ermittlung der Emissionswellenlänge von Methoxycamalexin

Zur Fluoreszenzanalyse von Camalexin wurde von Turk et al. (1998) eine Extinktionswellenlänge von 318 nm und eine Emissionswellenlänge von 384 nm verwendet. Da neben Camalexin auch Methoxycamalexin mit dem Fluoreszenzdetektor analysiert werden sollte, wurden die Emissionswellenlängen vom Methoxycamalexin bei einer Extinktionswellenlänge von 318 nm und 324 nm gemessen. Die Messung wurde am Fachbereich Chemie und Chemietechnik (Fluoreszenzdetektor der Firma GynkoteK) durchgeführt. Für die Messungen wurde das Methoxycamalexin mit Hilfe der NP-HPLC Methode (vgl. 4.1.1.1) abgetrennt.

3.6.2 Probenvorbereitung

Um beim Pflanzenaufschluss (Extraktion) und der Festphasenextraktion von homogenem Ausgangsmaterial ausgehen zu können, wurden jeweils 200 g Pflanzenmaterial von mit BION[®] behandelten Pflanzen bzw. Kontrollpflanzen aus den Vorversuchen (vgl. 3.5) gemischt. Alle Versuche wurden in 3facher Wiederholung durchgeführt.

3.6.2.1 Aufschluss der Pflanzen

Für den Aufschluss wurden jeweils 3 g gefrorenes Pflanzenmaterial von mit BION[®] behandelten Pflanzen verwendet. Es wurden drei unterschiedliche Verfahren vergleichend untersucht. Die Versuchsbedingungen sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Vergleich der drei verwendeten Verfahren zum Aufschluss der Pflanzen.

Verfahren	Zerstören des Zellgewebes	Extraktion
Waschen mit Methanol bzw. Isopropanol	-	5 malignes waschen mit 20 ml MeOH bzw. Isopropanol
Aufschluss mit Flüssigstickstoff	Zermörsern in Flüssigstickstoff	in 60 ml Methanol 2 min rühren
Erhitzen in Methanol	Mikrowellenbehandlung (1000 Watt) in Methanol	in 40 ml 60 sek. behandelt in 20 ml 30 sek. behandelt mit 10 ml waschen

Die aus den jeweiligen Verfahren erhaltenen Primärextrakte wurden vereinigt, filtriert und bei einer Badtemperatur von 42 °C bis fast zur Trockne eingengt. Der wässrige Rückstand wurde in 3 x 5 ml H₂O aufgenommen. Die vereinigten Phasen wurden mit NaOH (5 %ig) auf pH 8 eingestellt, mit Extrelut[®]-Material gereinigt (3.6.2.2) und mit der RP-HPLC quantitativ analysiert.

Um die Effektivität der drei Verfahren vergleichen zu können, wurden die Pflanzenproben nach der jeweiligen Behandlung auf noch mit MeOH extrahierbares Camalexin bzw. Methoxycamalexin überprüft.

Die Pflanzenreste wurden hierzu nach der Extraktion in 30 ml Methanol 24 h im Kühlschrank bei 10 °C inkubiert und dann 1 min im Mikrowellengerät gekocht (bei Wiederholung dieser Behandlung konnte kein weiteres Camalexin bzw. Methoxycamalexin aus den Pflanzenproben extrahiert werden). Das erhaltene Primärextrakt wurde wie zuvor eingengt,

mit Extrelut[®]-Material gereinigt, mit der RP-HPLC quantitativ analysiert und als interner Standard in Bezug auf die Extrahierbarkeit mit Methanol verwendet.

Weiter konnte durch eine 5 minütige Dauerbehandlung von Camalexin und Methoxycamalexin bei 1000 W in der Mikrowelle eine Veränderung der Phytoalexine, bedingt durch die Mikrowellenbehandlung, ausgeschlossen werden.

3.6.2.2 Untersuchung von unterschiedlichen Festphasen zur Aufbereitung der Primärextrakte

Erwartungsgemäß musste aufgrund der enthaltenen Matrixreste in den Primärextrakten eine weitere Aufarbeitung zur HPLC-Analyse erfolgen. Zur Extraktion von Indolverbindungen wurden in der Literatur drei unterschiedliche Festphasen verwendet: C-18 RP-Material (C-18 Material) mit unpolarem Charakter, 2-OH RP-Material (2-OH Material) und Si-60 Material (Extrelut[®]-Material der Firma Merk) mit polarem Charakter.

Um die Rückgewinnungsrate bei der Verwendung der verschiedenen Materialien zu überprüfen, wurden zunächst Versuche nur mit Camalexinstandard in MeOH (ohne Pflanzenmaterial) durchgeführt. Nur wenn hier die Rückgewinnungsrate höher als 80 % lag, wurde das Verfahren weiter verfolgt.

Als nächster Schritt wurde Camalexinstandard mit eingeeengten wässrigen methanolischen Primärextrakten (entsprechend 3 g Pflanzenmaterial) von Kontrollpflanzen, deren Gehalt an Camalexin bzw. Methoxycamalexin unterhalb der Detektionsgrenze lag, gemischt und entsprechend der jeweiligen Festphasenextraktionsvorschrift aufbereitet.

Die erhaltenen Fraktionen wurden soweit erforderlich bei 42 °C eingeeengt und für die RP-HPLC Analyse in MeOH aufgenommen.

Zur Bestimmung der Rückgewinnungsraten wurde entsprechend konzentrierter Camalexinstandard in MeOH als Kontrollstandard verwendet. Die für die Festphasenextraktionen verwendeten Bedingungen sind in der Tab. 6 dargestellt. Alle Versuche wurden in 3facher Wiederholung durchgeführt.

Tab. 6: Vergleich der Extraktionsbedingungen der drei verwendeten Festphasen (n=3).

	2-OH Material	C-18 Material	Extrelut® Material
Konditionierung	10 ml Hexan bzw. CH ₂ Cl ₂	10 ml Methanol 3 ml Puffer pH 8	entfällt
Aufgeben von Camalexinstandard	4 ml Hexan bzw. CH ₂ Cl ₂	3 ml H ₂ O pH 8	15 ml H ₂ O pH 4
Aufgeben von Camalexin in Pflanzenmatrix	unter den gewählten Umständen nicht möglich	3 ml wässriges Primärextrakt	15 ml wässriges Primärextrakt, 20 min quellen lassen
Waschen der Kartusche	10 ml Hexan bzw. CH ₂ Cl ₂	10 ml Puffer pH 8	entfällt
Trocknen der Kartusche	5 min im Luftstrom	entfällt	entfällt
Eluieren	5 ml Puffer pH 4 / Methanol 50/50 (v/v)	5 ml Puffer pH 4 / Acetn. 30/70 (v/v)	100 ml CH ₂ Cl ₂
Literatur	Jamieson & Dukan (1989)	Barker et al. (1989), Long et al. (1989), Kollmann et al. (1989)	Browne et al. (1991)

Acetn. = Acetonitril, Puffer pH 4, pH 8 = Phosphatpuffer pH 4, pH 8

Durch Anlegen eines Unterdrucks (Vacuum-Manifold, Restek) bei der Extraktion mit 2-OH und C-18 Material wurde die Durchlaufzeit erheblich verringert. Bei der Extraktion mit C-18 Material sollte ein Trockenlaufen der Kartusche vermieden werden. Die jeweils erhaltenen Fraktionen (Waschfraktionen und Eluate) der unterschiedlichen Extraktionen wurden bis zur Trockne bei 42 °C eingengt, in 1,5 ml Methanol aufgenommen und mit Hilfe der RP-HPLC analysiert.

3.6.2.3 Optimierung der Festphasenextraktion mit C-18 Material

Als Lösungsmittel wurden Methanol und Acetonitril verwendet. Die Optimierung erfolgte hinsichtlich der Eluentenzusammensetzung bei pH 8 und pH 4. Zuerst wurde mit Camalexinstandard ohne Pflanzenmatrix optimiert. Mit den optimierten Bedingungen wurde dann Camalexinstandard in Anwesenheit von Pflanzenmatrix extrahiert.

In Vorversuchen wurde ermittelt, ob sich das Camalexin in einer 15 %igen wässrigen Acetonitrillösung bzw. einer 20 %igen Methanollösung lösen ließ. Weiter wurde ermittelt, ob

das Camalexin bei 20-30 %igen wässrigen Lösungen an Acetonitril bzw. Methanol bei pH 8 nicht von der C-18 Kartusche eluiert werden konnte.

a) Optimierung ohne Pflanzenmaterial

Es wurde die Eluentenzusammensetzung bezüglich ihrer Elutionskraft zum Aufgeben und zum Eluieren von Camalexin verändert. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 3.6.2.2 für C-18 Material beschreiben. Die veränderten Bedingungen sind in Tab. 7 dargestellt. Die erhaltenen Fraktionen wurden nach entsprechender Vorbereitung (vgl. 3.6.2.2) mit der RP-HPLC analysiert.

Tab. 7: Veränderte Extraktionsbedingungen zur Optimierung des Aufgebens und Eluierens von Camalexin mit C-18 Material.

		Acetonitril in % (v/v), pH 8	Methanol in % (v/v) pH 8
Zusammensetzung	zum	20, 25, 30, 35, 40, 50	40, 50, 60, 70
Aufgabevolumen		10 ml	10 ml
		Acetonitril in % (v/v), pH 4	Methanol in % (v/v) pH 4
Zusammensetzung	zum	60, 70, 75, 80	75, 95
Eluieren mit		3 x 1,5 ml	3 x 1,5 ml

b) Eluieren von Camalexin unter den optimierten Bedingungen mit Pflanzenmaterial

Nachdem die Bedingungen der Festphasenextraktion von Camalexin mittels C-18 Material ohne Pflanzenmatrix optimiert waren, wurden diese Bedingungen gewählt, um Camalexinstandard in Anwesenheit von Pflanzenmatrix zu extrahieren. Für den eingengten Primärextrakt von Kontrollpflanzen wurde ein pH von 5,3-5,5 ermittelt. Mit NaOH (1 %ig) wurde der pH auf 8 eingestellt. Camalexinstandard wurde mit 3 ml wässriger Pflanzenmatrix direkt in dem Reservat der C-18 Kartusche gemischt. Die Pflanzenmatrix wurde bei pH 8 mit 5 ml Methanollösung (50 % v/v) bzw. Acetonitrillösung (30 % v/v) in die Kartusche eingewaschen.

3.6.3 Durchführung des Analysenverfahrens

Ziel des Analysenverfahrens ist nach Frehse H. & Thier H.P. (1991) eine Wiederfindungsrate von mindestens 70 %. Es wurden die zuvor optimierten Bedingungen der Einzelschritte (Primärextraktion, Festphasenextraktion) angewandt. Hier wurde auch wie unter 3.6.2.2 beschrieben, zunächst mit Camalexinstandard und dann mit Pflanzenmatrix aus

Kontrollpflanzen, zu der Camalexinstandard gegeben wurde, bzw. Pflanzenmaterial von mit BION[®] behandelten Pflanzen durchgeführt. Alle Versuche wurden in 3facher Wiederholung angelegt.

3.6.3.1 Ohne Pflanzenmatrix

Camalexinstandard wurde mit Leitungswasser gemischt. Es wurde eine Mikrowellenbehandlung als Pflanzenaufschluss durchgeführt (3.6.2.1). Das Primärextrakt wurde eingeeengt und in 3 ml Puffer pH 8 aufgenommen. Für die anschließende Festphasenextraktion wurde C-18 Material verwendet (3.6.2.2). Die daraus resultierende Fraktion wurde mit der RP-HPLC analysiert (4.1.1.2).

3.6.3.2 Mit Pflanzenmatrix

Camalexinstandard wurde zu 2 g *C. sativa*-Kontrollpflanzen gegeben, oder es wurde Pflanzenmaterial von mit BION[®] behandelten Pflanzen verwendet. Zum Pflanzenaufschluss wurde eine Mikrowellenbehandlung durchgeführt (3.6.2.1). Der Primärextrakt wurde eingeeengt und in 3 ml Acetonitril aufgenommen. Für die anschließende Festphasenextraktion wurde C-18 Material verwendet (3.6.2.2) Die daraus resultierende Fraktion wurde mit der RP-HPLC analysiert (4.1.1.2).

3.6.4 Kalibrierung des Analysenverfahrens

Die Kalibrierung des Analysenverfahrens erfolgte nach Funke et al. (1992). Zunächst wurde eine Grundkalibrierung der RP-HPLC Methode durchgeführt, bei der Camalexinstandard in reinem Lösungsmittel analysiert wurde. Anhand der gewonnenen Daten wurde die Kalibrierfunktion der HPLC-Methode erstellt. Danach erfolgte die Überprüfung der Varianzhomogenität, die Absicherung des Arbeitsbereichs, die Berechnung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze. Es war davon auszugehen, dass ein Teil der zu analysierenden Substanzen bei der Probenvorbereitung verloren gehen würden. Demnach wurde auch die Kalibrierfunktion des Analysenverfahrens erstellt.

3.6.4.1 Kalibrierfunktionen

Zum Erstellen der Kalibrierfunktion des Standards wurden 0,25, 0,5, 0,75 1, 1,5 und 2,5 µg Camalexin in 1 ml Methanol gelöst und auf der RP-HPLC quantifiziert. Da vom Methoxycamalexin keine Reinsubstanz vorlag, war es nicht möglich auch für

Methoxycamalexin eine Eichgerade zu erstellen. Die Gehalte an Methoxycamalexin wurden mit Hilfe der „Camalexineichgeraden“ ermittelt.

Zur Erstellung der Kalibrierfunktion der Wiederfindungsrate wurde Camalexin in verschiedenen Mengen zu 2 g Pflanzenmaterial von Kontrollpflanzen (keine BION® Behandlung, vgl. 3.5) gegeben. Das Pflanzenmaterial wurde danach entsprechend des entwickelten Analysenverfahrens (vgl. 3.6.3) aufbereitet. Das Analysenverfahren wurde mit 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 und 2,5 µg Camalexin in 3facher Wiederholung durchgeführt. Die beiden Kalibrierfunktionen sind in Abb. 4 dargestellt.

Bei der visuellen Beurteilung der beiden Kalibrierungsgeraden ergab sich eine hohe Linearität. Dementsprechend konnte auf eine rechnerische Prüfung der Linearität verzichtet werden (Funke et al. 1992).

Zur Überprüfung der Präzision, bei der von einer homogenen Unpräzision der Messwerte (Varianz der Messwerte) über den Arbeitsbereich ausgegangen wurde, wurden für die Konzentration 0,25 und 1,5 µg / 1 ml jeweils 10 Standardproben gemessen. Die Varianz der beiden Messreihen wurde mit dem F-Test auf Homogenität überprüft. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, womit die Varianzhomogenität der Kalibrierungsfunktion bestätigt wurde.

Für die Nachweisgrenze wurde ein Fläche von 0,15398 mV*S berechnet. Die entsprechende Konzentration betrug 8,47 µg/kg. Für den relativen Vertrauensbereich der Bestimmungsgrenze wurde ein Wert von $VB_{rel} = 22,47 \%$ und die Bestimmungsgrenze mit einer Fläche von 1,05 mV*S berechnet, was einer Konzentration von 57,7 µg/kg entsprach.

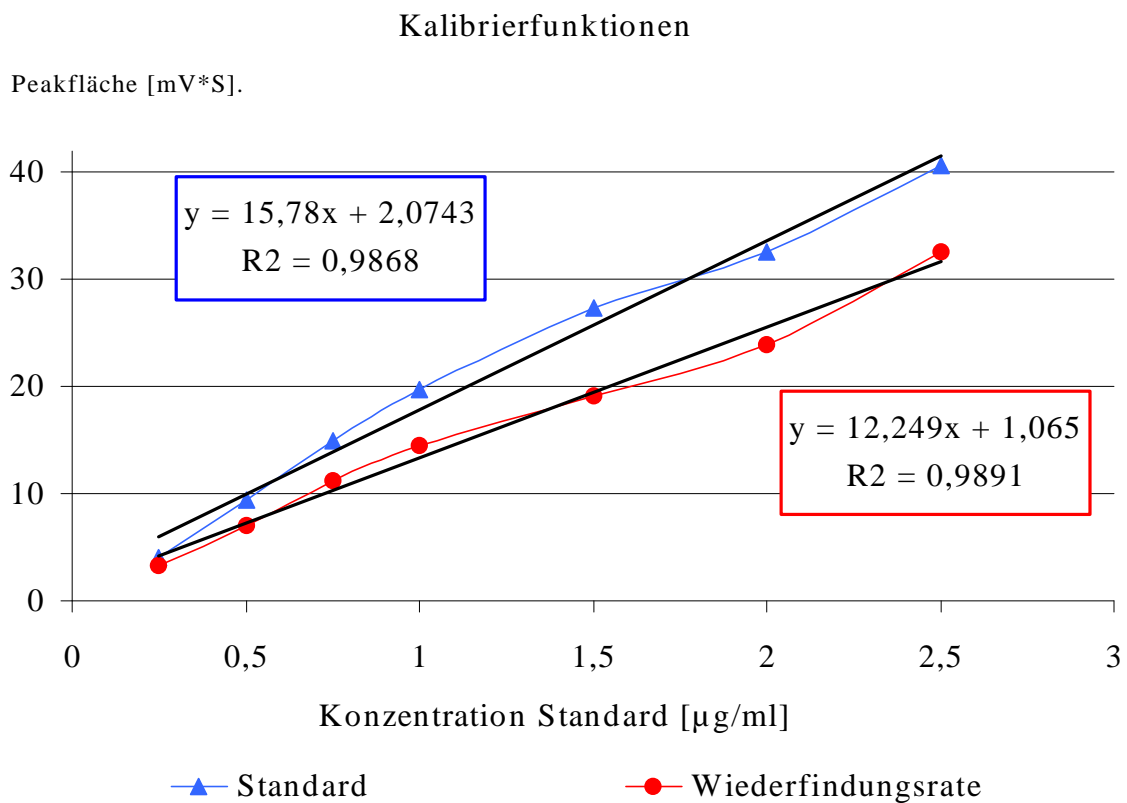


Abb. 4: Kalibriergerade des Standards und Kalibriergerade der Wiederfindungsrate mit den dazugehörigen Funktionen und dem Bestimmtheitsmaß R^2 (nach Funke et al. 1992).

3.6.4.2 Wiederfindungsfunktion

Nachdem die Kalibrierung der HPLC-Methode mit Camalexinstandard durchgeführt worden war, wurde der Einfluss der Probenmatrix auf die Wiederfindungsrate bestimmt. Hierfür wurde die Wiederfindungsfunktion erstellt. Zum Erstellen der Wiederfindungsfunktion wurden anhand der ermittelten Peakflächen der Kalibrierfunktion der Wiederfindungsrate die entsprechenden Konzentrationen berechnet. Die berechneten Konzentrationen wurden gegen die Kalibrierkonzentrationen des Standards aufgetragen (Abb. 5). Aus der Steigung der Wiederfindungsfunktion wurde die Wiederfindungsrate berechnet, die 77,6 % betrug.

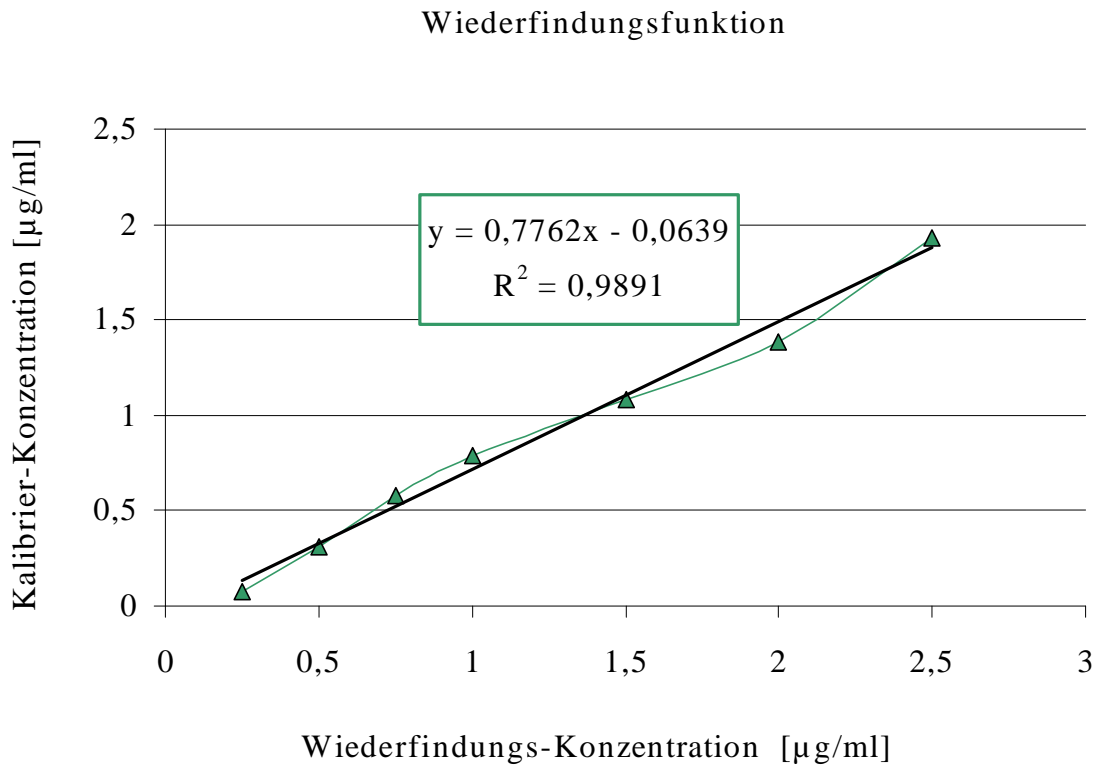


Abb. 5: Wiederfindungsfunktion mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 (nach Funke et al. 1992).

Wie in Abb. 4 zu erkennen ist, ergab die Überprüfung des Matrixeinflusses eine proportional systematische Abweichung zwischen der Kalibrierfunktion des Standards und der Kalibrierfunktion der Wiederfindungsrate. Daher erfolgte die Quantifizierung über die Kalibrierfunktion der Wiederfindungsrate mit dem Funktionsterm: $F(x)=12,249x+1,065$.

3.7 Untersuchungen auf weitere induzierbare bioaktive Substanzen in *C. sativa*

Nach persönlicher Mitteilung von Herr Dr. J.P. Tewari (University of Alberta, Edmonton, Alberta Kanada T6G 2E1) und aufgrund eigener Untersuchungen gab es zahlreiche Hinweise, dass noch mindestens eine weitere induzierbare, bioaktive Substanz neben Camalexin und Methoxycamalexin im Spross von *C. sativa* gebildet wird, die zusätzlich zu den beiden bekannten Phytoalexinen potentiell zur Sortendifferenzierung verwendet werden könnte.

Unter Gewächshausbedingungen wurden in insgesamt 60 MTP *C. sativa*-Pflanzen (vgl. 3.4) bis zum Rosettenstadium angezogen. In diesem Stadium wurden 50 MTP mit dem Pflanzenaktivator BION[®] behandelt. 10 MTP dienten als Kontrolle und wurden mit

Leitungswasser behandelt. Die MTP der beiden Varianten wurden räumlich getrennt in unterschiedlichen Gewächshauskammern inkubiert. Nach 12 Tagen erfolgte die Ernte der Sprosse. Das Pflanzenmaterial wurde direkt in Plastiktüten verpackt und bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Pflanzen waren neben denen aus vorangegangenen Untersuchungen (vgl. 3.5) die Grundlage für weitere Untersuchungen auf induzierbare, bioaktive Substanzen in *C. sativa*.

3.7.1 Erstellen eines Rohextraktes und Auftrennung

Zuerst wurde so extrahiert, dass möglichst alle potentiell biowirksamen Metabolite in einer Fraktion enthalten waren. Dafür wurde der thermische Aufschluss der Probenvorbereitung verwendet (3.6.2.1). Das Primärextrakt wurde eingeeengt (vgl. 3.6.2.1). Der resultierende wässrige Überstand wurde abgegossen und zur weiteren Bearbeitung bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und ebenfalls bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Weiterbearbeitung erfolgte nach 12 h. Die Durchführung der Aufbereitung ist in Abb. 6 dargestellt.

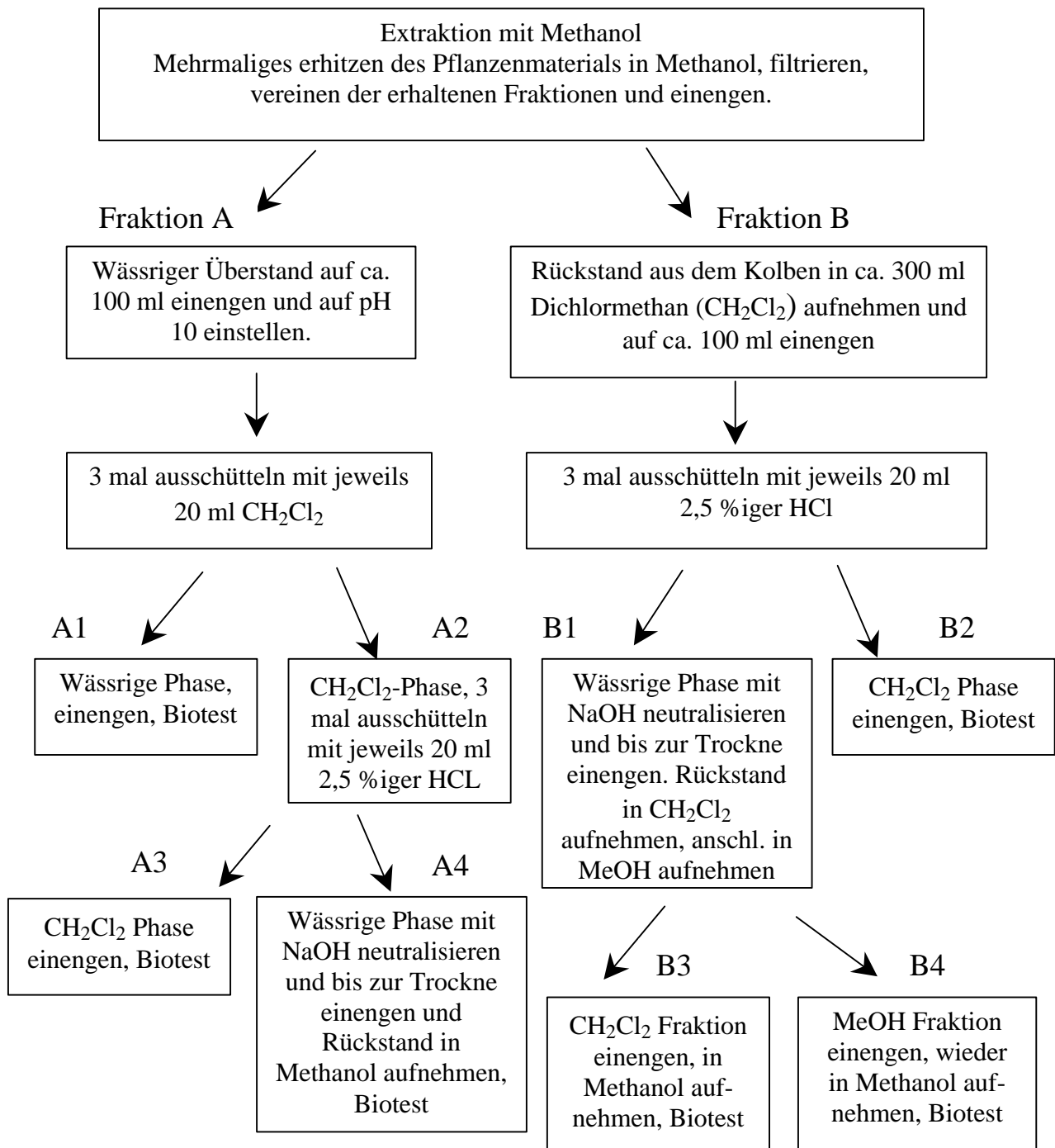


Abb. 6: Schema zur Auftrennung von Rohextrakt aus Pflanzenmaterial zur Untersuchung auf weitere induzierbare biowirksame Substanzen.

Wässriger Überstand (Fraktion A)

Die wässrige Fraktion A wurde auf ca. 100 ml eingengt, mit NaOH auf pH 10 eingestellt und 3 mal mit je 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Es ergaben sich 2 Fraktionen. Die wässrige Fraktion A1 wurde eingengt und für den Objektträger test (vgl. 3.5) in 3 ml Methanol

aufgenommen. Die erhaltene Dichlormethanphase (Fraktion A2) wurde 3 mal mit je 20 ml 2,5 %iger HCl ausgeschüttelt. Die erhaltene Dichlormethanphase (Fraktion A3) wurde eingengt und für den Objektträgertest in 3 ml Methanol aufgenommen. Die erhaltene HCl Fraktion (Fraktion A4) wurde auf pH 7 eingestellt, bis zur Trockne eingengt und für den Objektträgertest in 3 ml Methanol aufgenommen.

Dichlormethanfraktion (Fraktion B)

Die Dichlormethanfraktion (Fraktion B) wurde bis auf 100 ml eingengt und mit 3 x 20 ml 2,5 %igen HCl ausgeschüttelt. Die erhaltene HCl Fraktion (Fraktion B1) wurde auf pH 7 eingestellt und bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 x 5 ml Dichlormethan gewaschen, erneut eingengt und für den Objektträgertest in 3 ml Methanol aufgenommen (Fraktion B3). Der noch im Abdampfkolben verbleibende Rückstand der Fraktion B1 wurde mit 2 x 30 ml Methanol gewaschen. Die erhaltene Fraktion B4 wurde eingengt und für den Objektträgertest in 3 ml Methanol aufgenommen.

Der Objektträgertest wurde mit *A. brassicae* wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt. Es wurden 70 µl je Fraktion verwendet.

3.7.2 Weitere Auftrennung der biowirksamen Fraktionen

3.7.2.1 Auftrennung mit DC

Von den biowirksamen Fraktionen, die aus der Auftrennung des methanolischen Rohextraktes gewonnen wurden, mussten die bekannten Phytoalexine (Camalexin und Methoxycamalexin) abgetrennt werden. In Anlehnung an Browne et al. (1991) erfolgte eine Auftrennung mit DC an Si-60 Material. Als Laufmittel diente Dichlormethan/Methanol im Verhältnis von 98/2 (v/v). Aufgetragen wurden 100 µl. Nach dem Entwickeln wurde die DC-Platte in 3 Bereiche eingeteilt: R_F 0-0,2; R_F 0,2-0,7; R_F 0,7-1. Das Si-60-Material der Bereiche wurde jeweils abgekratzt, in Methanol gelöst und filtriert. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingengt und in 1 ml Methanol aufgenommen. Die Fraktionen wurden mit dem Objektträgertest auf ihre Biowirksamkeit getestet. Weiter erfolgte eine Analyse der Fraktionen mit der RP-HPLC auf Camalexin und Methoxycamalexin.

3.7.2.2 Auftrennung mit Flash-System (Si-60)

Mit der HPLC-Methode von Zook & Hammerschmidt (1997) zur Analyse von Camalexin konnte eine gute Auftrennung von Camalexin und Methoxycamalexin erzielt werden. Diese Methode wurde auf das Flash-System übertragen. Als Eluent wurde Hexan/Isopropanol 9/1 (v/v) verwendet. Der Druck betrug 0,2 - 0,25 bar. Es wurden 2 ml einer biowirksamen Fraktion aufgegeben und Fraktionen von jeweils 2 ml aufgefangen. Um die Auftrennung zu prüfen, wurden die erhaltenen Fraktionen mit Hilfe der RP-HPLC analysiert. Nach der Analyse wurden die Fraktionen mit gleichen Peaks jeweils vereinigt, bis zur Trockne eingengt, in 2 ml Methanol aufgenommen und im Objektträger test auf ihre Biowirksamkeit getestet. Danach wurden die Proben bei -21 °C gelagert.

3.7.2.3 Auftrennung mit RP-HPLC (C-18)

Die aus der Auftrennung mit dem Flash-System (Si-60) und DC hervorgegangenen Fraktionen, die eine Bioaktivität zeigten, jedoch kein Camalexin, bzw. Methoxycamalexin enthielten, wurden zur Vereinzelung der bioaktiven Substanz weiter aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt mittels RP-HPLC. Nach mehreren Testläufen mit dem Eluenten Acetonitril/Phosphatpuffer pH 4 in verschiedenen Konzentrationen zeigte sich ein lineares Gradientensystem mit einer Ausgangskonzentration von 70 % Acetonitril/30 % Phosphatpuffer pH 4 (v/v) und einer Endkonzentration von 98 % und 2 % (v/v) für die weitere Auftrennung am besten geeignet.

Insgesamt wurden 2 ml der biowirksamen Fraktion aufgetrennt. Es wurden 3 Fraktionen aufgefangen: k' -Wert von 0-1,5 (Retentionszeit von 2-5 min), k' -Wert von 1,6-2,4 (Retentionszeit 5 bis 6,8 min) und k' -Wert von 2,5-7 (Retentionszeit von 6,8 bis 15 min). Die aufgefangenen Fraktionen wurden bei 42 °C bis zur Trockne eingengt und in 2 ml Methanol aufgenommen. Von jeder Fraktion wurden 2 x 70 µl im Objektträger test auf eine antifungale Wirkung getestet. Von den Inhaltsstoffen der Proben, die eine Biowirksamkeit aufwiesen, wurde am Fachbereich 13 Chemie und Chemietechnik eine Strukturaufklärung durchgeführt.

3.8 Anwendung des optimierten Analysenverfahrens zur qualitativen und quantitativen Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin

3.8.1 Vergleichende Untersuchung von BION[®], anorganischen Salzen und *Botrytis cinerea* zur Induktion der Phytoalexinproduktion

In der Literatur werden neben dem Pflanzenaktivator BION[®] zur Induktion der Phytoalexinproduktion noch weitere Möglichkeiten beschreiben. Neben Kupferchloridlösungen (Rouxel et al., 1991 und Mhiri et al., 1997) werden u.a. Silbernitratlösungen (Tsuji et al., 1992) zur Induktion der Phytoalexinproduktion (Induktion der SAR) verwendet. Weiter kann mit verschiedenen Pflanzenpathogenen induziert werden. Es sollten verschiedene Induktoren im Vergleich zu BION[®] auf ihre Eignung zur Induktion der Phytoalexinproduktion zwecks Sortendifferenzierung geprüft werden.

Unter Gewächshausbedingungen wurden *C. sativa*-Pflanzen der Sorte 13 angezogen (vgl. 3.4). Im Rosettenstadium wurden die Pflanzen mit den verschiedenen Substanzen bzw. dem Pathogen behandelt. Von den oxidativ wirkenden Salzen Kupferchlorid und Silbernitrat wurden 10 mM wässrige Lösungen unter Zugabe von 0,1% Tween 20 verwendet. Von *B. cinerea* wurde eine Sporensuspension (1 Mil. Konidien/ml) verwendet. BION[®] wurde mit 0,9 mg/MTP (0,2 m²) in 20 ml Leitungswasser gelöst verwendet. Von jeder Variante wurden 2 MTP-*C. sativa* Pflanzen mit je 20 ml der entsprechenden Lösungen bzw. Sporensuspension behandelt. Als Kontrolle wurden die Pflanzen mit 20 ml Leitungswasser behandelt. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen inkubiert.

Nach 12 Tagen wurden die Sprosse geerntet, sofort in Plastiktüten verpackt und bei –21 °C bis zur Analyse gelagert.

3.8.2 Ermittlung der Phytoalexinproduktion zu verschiedenen Pflanzenstadien

Um das für die Sortendifferenzierung optimale Pflanzenstadium zu bestimmen, wurde die Phytoalexinproduktion zu verschiedenen Pflanzenstadien untersucht. Pflanzen der Sorte 13 wurden unter Gewächshausbedingungen angezogen. Jeweils zu den Entwicklungsstadien Keimblatt, Rosette, Schossen und Knospe wurde mit BION[®] (0,9 mg/20 ml Wasser pro MTP) behandelt. Zur Kontrolle wurden die Pflanzen mit Leitungswasser behandelt. Die Behandlung und die Inkubation der Pflanzen der BION[®]-Varianten erfolgte in räumlicher Trennung zu den Kontrollpflanzen. Die Inkubation erfolgte unter Gewächshausbedingungen. 12 Tage nach der BION[®]-Behandlung wurden die oberirdischen Pflanzenteile geerntet. Das

Pflanzenmaterial wurde sofort in Plastiktüten verpackt und bei -21°C bis zur Analyse gelagert.

3.8.3 Messung der Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass 6-7 Tage nach der Behandlung mit BION[®] bereits Phytoalexine anhand des Objektträgertests nachgewiesen werden konnten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen und auf Untersuchungen von Jejelowo et al. (1991) wurde mit der Sorte 2 ein weiterführender Versuch angelegt, mit dem die Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin nach Induktion mit BION[®] ermittelt wurde. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Gewächshausbedingungen. Nach 10 Tagen (2-Blattstadium) wurden die Pflanzen unter Klimakammerbedingungen ($18/10^{\circ}\text{C}$, 14/10 Tag/Nacht Rhythmus bei 6000 Lux) weiter inkubiert. 14 Tage nach der Aussaat erfolgte die Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION[®] mit einer Aufwandmenge von 0,9 mg/20 ml Leitungswasser je MTP. Zur Kontrolle wurde mit Leitungswasser behandelt. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen der BION[®]-Variante räumlich getrennt von den Kontrollpflanzen inkubiert. Bei den mit BION[®] behandelten Varianten wurden 2, 5, 8, 11, 14 und 22 Tagen nach der Behandlung jeweils von 2 MTP die Sprosse geerntet und deren Frischgewicht bestimmt. Die Ernte und Bestimmung des Frischgewichtes der Kontrolle erfolgte nach 2, 8 und 14 Tagen. Alle Proben wurden nach dem Wiegen sofort in Plastikbeutel überführt und bei -21°C bis zur Analyse gelagert.

3.8.4 Messung der Phytoalexinproduktion zur Differenzierung von 13 *C. sativa*-Sorten zu drei unterschiedlichen Temperaturregimen

Hier wurden die 13 *C. sativa*-Sorten (vgl. Tab. 1) verwendet. Je Sorte und Temperaturregime wurden 2 MTP eingesetzt. Die Pflanzen wurden in der Klimakammer ($18/11^{\circ}\text{C}$) bis zum Rosettenstadium (27 Tage) inkubiert. Zu diesem Stadium erfolgte die Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION[®]. Zur Behandlung wurden 0,9 mg BION[®]/20 ml Leitungswasser je Multitopfplatte verwendet. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen bei drei verschiedenen Temperaturregimen inkubiert. Neben den Anzuchtbedingungen erfolgte die Inkubation bei $11/6^{\circ}\text{C}$ und bei $24/15^{\circ}\text{C}$ mit jeweils 6000 Lux 14/10 Tag/Nacht Rhythmus. Ungeachtet der unterschiedlichen Temperaturregime wurden die Pflanzensprosse nach 17 Tagen geerntet und sofort in Plastiktüten bei -21°C bis zur Analyse gelagert. Für die Kontrolle wurden je

Temperaturregime zwei MTP mit Pflanzen der Sorte 13 mit Leitungswasser behandelt. Hier diente die Kontrolle zum Nachweis der erfolgreichen Induktion der Phytoalexinproduktion. Die Vorgehensweise ist in der Abb. 7 im Überblick dargestellt.

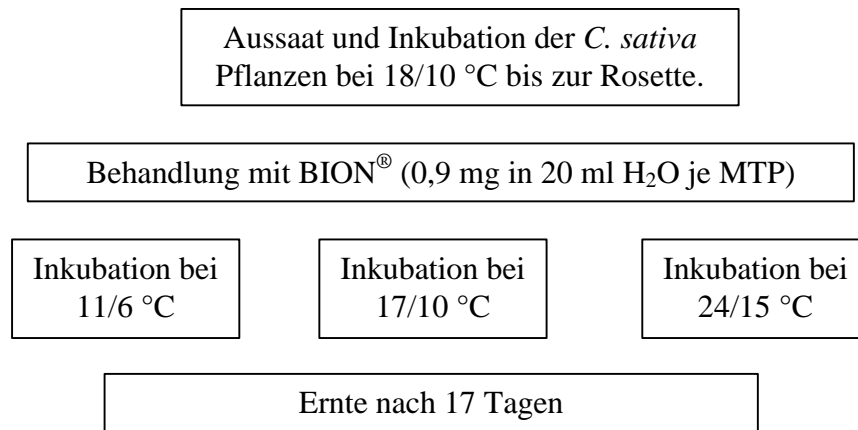


Abb. 7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Sortenscreening von *C. sativa* unter verschiedenen Temperaturregimen.

3.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 8.0 verwendet. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurden eine Varianzanalyse (Anova) durchgeführt und die Grenzdifferenz berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung des Analysenverfahrens zur quantitativen Bestimmung von Camalexin und Methoxycamalexin im Spross von *C. sativa*.

4.1.1 HPLC Analysenmethode

Zum Vergleich der verschiedenen HPLC-Methoden wurde Camalexinstandard, mit Extrelut[®]-Material (nach Browne et al., 1991) aufbereitetes Pflanzenmaterial von Pflanzen, bei denen die Phytoalexinproduktion induziert wurde, und Kontrollpflanzen verwendet (vgl. 3.5). Bei beiden HPLC-Methoden konnten zur Injektion bis zu 50 µl Injektionsvolumen sowohl der jeweilige Eluent als auch Methanol verwendet werden. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Analysen erfolgten jeweils zuerst mit dem DAD-Detektor und anschließend mit dem Fluoreszenz-Detektor. Es wurde eine Totzeit von 2 min ermittelt. Die Retentionseigenschaften der Substanzen werden in Retentionszeit (min) und Kapazitätsfaktor k' angegeben.

4.1.1.1 Normal Phase HPLC Methode (NP-HPLC) mit SI-60 Material

Zuerst wurde die Retentionszeit vom Camalexin mit Hilfe des Camalexinstandards, der im Eluent gelöst wurde, bestimmt. Die Peak-Maxima hatten einen k' -Wert von 3,3 (Retentionszeit 8,7 min).

Danach wurden die mit Extrelut[®]-Material aufgereinigten Pflanzenproben (vgl. 3.6.2.2) untersucht. Bei einem k' -Wert von 0,1 bis ca. 1,25 (Retentionszeit von 2,1 – ca. 4,5 min) wurde eine Vielzahl von Peaks (Matrixreste von der Aufbereitung) eluiert, bei 2,2 (6,7 min) konnten zwei sehr kleine Peaks beobachtet werden, die sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Varianten vorkamen und somit nicht zugeordnet werden konnten.

Die im Folgenden aufgeführten Peaks waren nur in Fraktionen vorhanden, die von Pflanzen stammten, bei denen die Phytoalexinproduktion induziert wurde. In Fraktionen aus Kontrollpflanzen wurden diese Peaks unter den gewählten Bedingungen (Pflanzenstadium, Anzucht- und Inkubationsbedingungen) nicht detektiert. Ein mittelgroßer Peak wurde bei einem k' -Wert von 2,8 (7,7 min) eluiert. Dieser Peak konnte nicht zugeordnet werden, war

aber in allen Pflanzenproben, die aus mit BION[®] behandelten Pflanzen stammten, nachweisbar. Im Nachfolgenden wird dieser Peak als **unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt (UIS)** bezeichnet. Bei einem k' -Wert von 3,3 (8,7 min) eluierte der relativ große Camalexinpeak und danach ein weiterer großer Peak dessen Maxima bei einem k' -Wert von 4,6 (11,5 min) lag. Nach seinem UV-Spektrum und der Retentionszeit wurde dieser Peak als Methoxycamalexin identifiziert (Browne et al., 1991).

Mit der NP-HPLC-Methode war es möglich Camalexin und Methoxycamalexin quantitativ zu analysieren, jedoch konnten nur wasserfreie Lösungen analysiert werden. Demnach ergab sich die Notwendigkeit eine RP-HPLC Methode zur Analyse von wässrigen Lösungen zu optimieren.

4.1.1.2 Revers Phase HPLC Methode (RP-HPLC) mit C-18 Material

Bei den ersten Messungen (55 % Acetonitril / 45 % Phosphatpuffer pH 4 (v/v) als Eluent) lag das Peakmaximum von Camalexin bei einem k' -Wert von 2,3 (Retentionszeit von 6,6 min), das Peakmaximum vom Methoxycamalexin hatte einen k' -Wert von 1,9 (Retentionszeit von 5,8 min). Problematisch waren die gering unterschiedlichen Retentionszeiten von Camalexin und Methoxycamalexin. Bei der anschließenden Optimierung der HPLC-Methode verlängerten sich die Retentionszeiten erwartungsgemäß mit steigendem Anteil an saurem Phosphatpuffer im Eluent. So lagen die k' -Werte bei der Verwendung von 40 % Acetonitril und 60 % Phosphatpuffer pH 4 (v/v) im Vergleich zu dem Mischungsverhältnis 45 % Acetonitril und 55 % Phosphatpuffer pH 4 (v/v) um 1,25 bis 1,35 höher. Gleichzeitig konnte eine Verbreiterung der Peaks bei zunehmender Retentionszeit beobachtet werden. Um eine Verringerung der Peakbreite bei gleicher Elutionskraft des Eluenten zu erreichen, wurde dem Eluent 5 % Tetrahydrofuran zugesetzt. Wurde das Acetonitril gegen Methanol ausgetauscht, so verschlechterte sich die Trennung. Demnach wurde Methanol als Eluentenbestandteil verworfen. Die späteren Analysen wurden mit Acetonitril/Tetrahydrofuran/Phosphatpuffer pH 4 35/5/60 % (v/v/v) durchgeführt. Bei der Verwendung von sauren Eluenten konnten die sauren Lösungen aus der Probenvorbereitung ohne weitere Vorbereitungen untersucht werden. Die k' -Werte beider HPLC-Verfahren sind in Tab. 8 und Tab. A 21 dargestellt.

Tab. 8: Vergleich der k' -Werte (Retentionszeiten in min) von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS nach Analyse mit den beiden HPLC-Methoden, n=3.

HPLC Verfahren	Kapazitätsfaktor (k') / (Retentionszeit (R min))		
	Methoxycamalexin	Camalexin	UIS
	$k'(R)$	$k'(R)$	$k'(R)$
NP-HPLC	4,7 (11,4)	3,3 (8,6)	2,8 (7,6)
RP-HPLC (optimiert)	4,3 (10,6)	4,8 (11,6)	5,85 (13,7)

4.1.1.3 Emissionswellenlänge von Methoxycamalexin

Bei einer Extinktionswellenlänge von 324 nm lag die maximale Emission zwischen 368 und 372 nm, bei der Extinktionswellenlänge von 318 nm (Camalexinoptimum) lag die maximale Emission vom Methoxycamalexin zwischen 355 und 360 nm. Weiter wurde die Emission von Camalexin bei einer Extinktionswellenlänge von 318 nm gemessen. Hier lag das Maximum der Emission zwischen 355 und 365 (Tab. A 20).

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Emission von Camalexin und vom Methoxycamalexin bei einer Extinktionswellenlänge von 318 nm nur geringfügig unterschieden. Demnach konnten zur Fluoreszenzanalyse des Methoxycamalexins die gleichen Wellenlängen verwendet werden wie für das Camalexin. Bei den Analysen wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 384 nm gemessen (Turk et al. 1998), da sich bei Verwendung der ermittelten Maximalwerte (355-365) nm die verwendeten Eluenten negativ auf die Analyse auswirkten.

4.1.2 Probenvorbereitung

4.1.2.1 Aufschluss der Pflanzen

Die thermische Aufbereitungsmethode mit Hilfe von Mikrowellen hatte die höchsten Ausbeuten im Vergleich zu den anderen Aufschlussverfahren. Hier lag die Effektivität zwischen 93 und 97 %. Mit den anderen Verfahren wurden zwischen 20 und 42 % der zu extrahierenden Substanzen extrahiert. Aufgrund der Ergebnisse wurde für die spätere Aufbereitung von Pflanzenmaterial die thermische Aufbereitungsmethode mit Hilfe der Mikrowellenbehandlung verwendet.

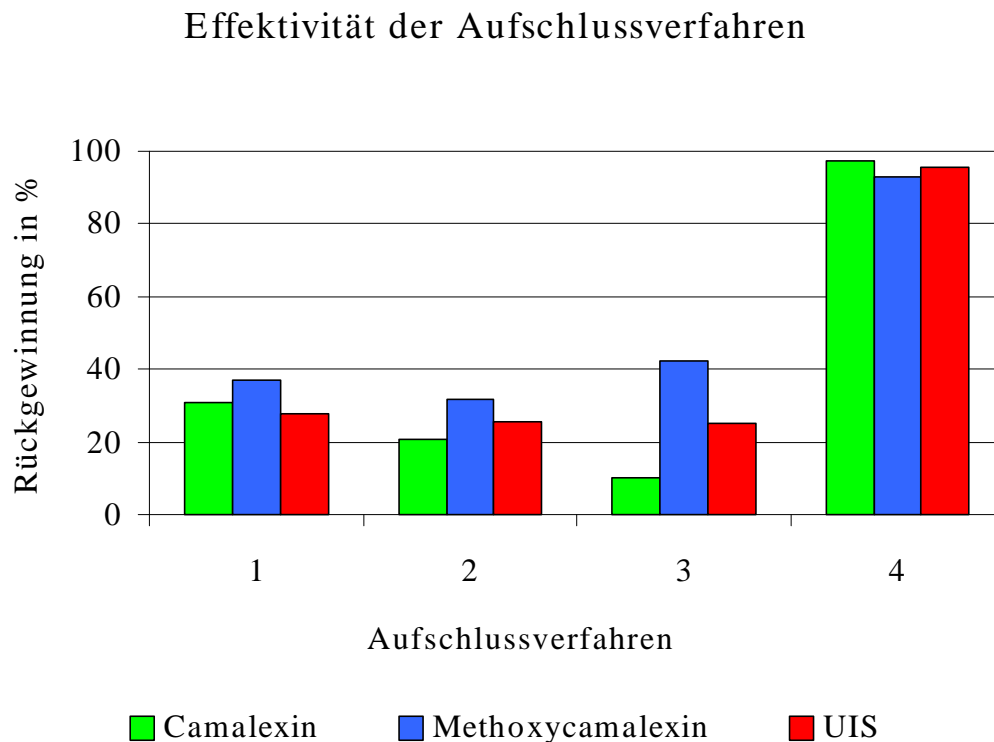


Abb. 8: Effektivität von verschiedenen Extraktionsmethoden zur Extraktion von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS aus *C. sativa* in %. (Bei den ermittelten Werten handelt es sich um direkt Vergleichbare Relativwerte), (n=3). 1 = Waschen mit Methanol, 2 = Waschen mit Isopropanol, 3 = Zerkleinern in Flüssigstickstoff und waschen mit Methanol, 4 = Erwärmen in Methanol.

4.1.2.2 Effektivität der Aufbereitung der Primärextrakte mit unterschiedlichen Festphasen

Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Bei dem 2-OH Material wurden trotz verschiedener Optimierungsversuche (Verwendung von Hexan anstelle von Dichlormethan) keine Verbesserung der Wiederfindungsrate bei der Verwendung von Camalexinstandard ohne Pflanzenmatrix erreicht. Demzufolge wurde diese Festphase nicht weiter verwendet.

Beim C-18 Material lagen die Rückgewinnungsraten bei der Extraktion ohne Pflanzenmatrix bei 90 %. Wurde hingegen Pflanzenmatrix-Camalexinstandard-Gemisch auf die Kartusche gegeben und dann extrahiert, verringerte sich die Rückgewinnungsrate auf 76 %.

Die Rückgewinnungsrate von Camalexin lag bei der Probenaufbereitung mit Extrelut[®]-Material ohne Pflanzenmatrix über 80 %. Wurde hingegen aus Pflanzenmatrix extrahiert,

verringerte sich die Wiederfindungsrate auf unter 69 %. Grundsätzlich konnte dieses Material zur Extraktion von Camalexin aus Pflanzenmatrix verwendet werden.

Werden die beiden Festphasenextraktionen mit C-18 und Extrelut[®]-Material hinsichtlich der Integrierbarkeit in das Analysenverfahren betrachtet, so war der Zeitaufwand für die Durchführung mit C-18 Material geringer, da hier das Quellenlassen von 20 min entfiel. Zusätzlich lag die Rückgewinnungsrate beim C-18 Material um 7 % höher.

Die Rückgewinnungsrate der ersten Versuchsreihe (nicht optimierte Bedingungen) mit C-18 Material lag mit über 75 % relativ hoch (Abb. 9). Da das Verfahren noch hinsichtlich der Eluentenzusammensetzungen optimierbar war, wurde eine entsprechende Versuchsreihe durchgeführt.

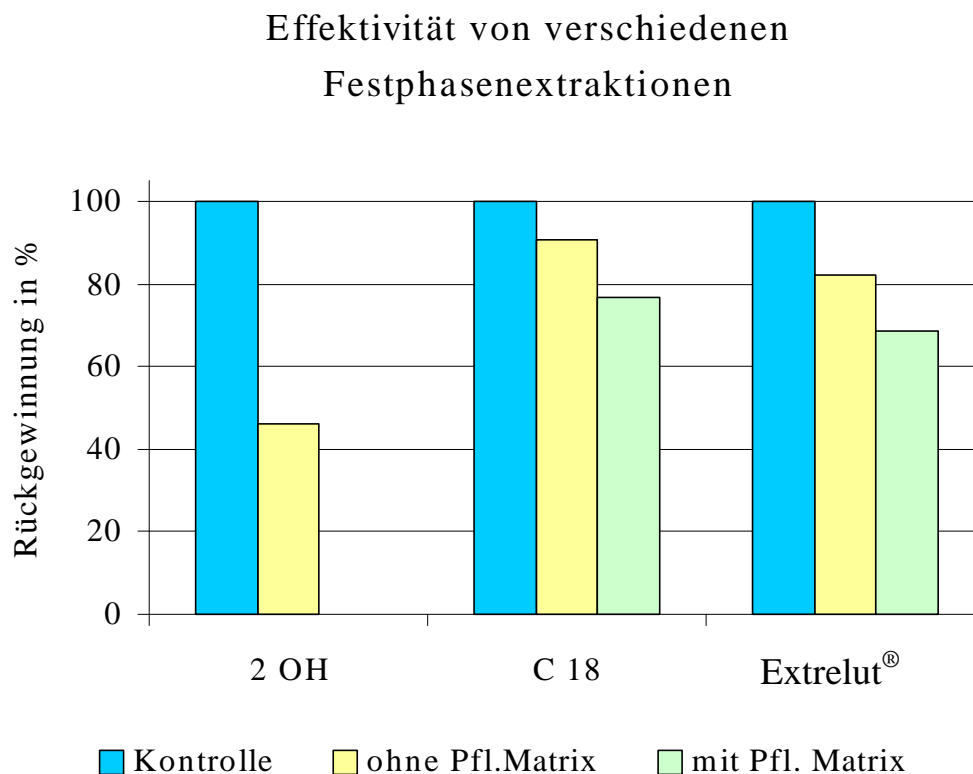


Abb. 9: Übersicht über die Effektivität der getesteten Festphasen. Dargestellt sind die ermittelten Rückgewinnungsraten in % mit und ohne Pflanzenmatrix, bezogen auf den eingesetzten Camalexinstandard (100 %), n=3.

4.1.2.3 Optimierung der Festphasenextraktion mit C-18 Material

a) Aufgeben von Camalexin auf die C-18 Kartusche ohne Pflanzenmatrix

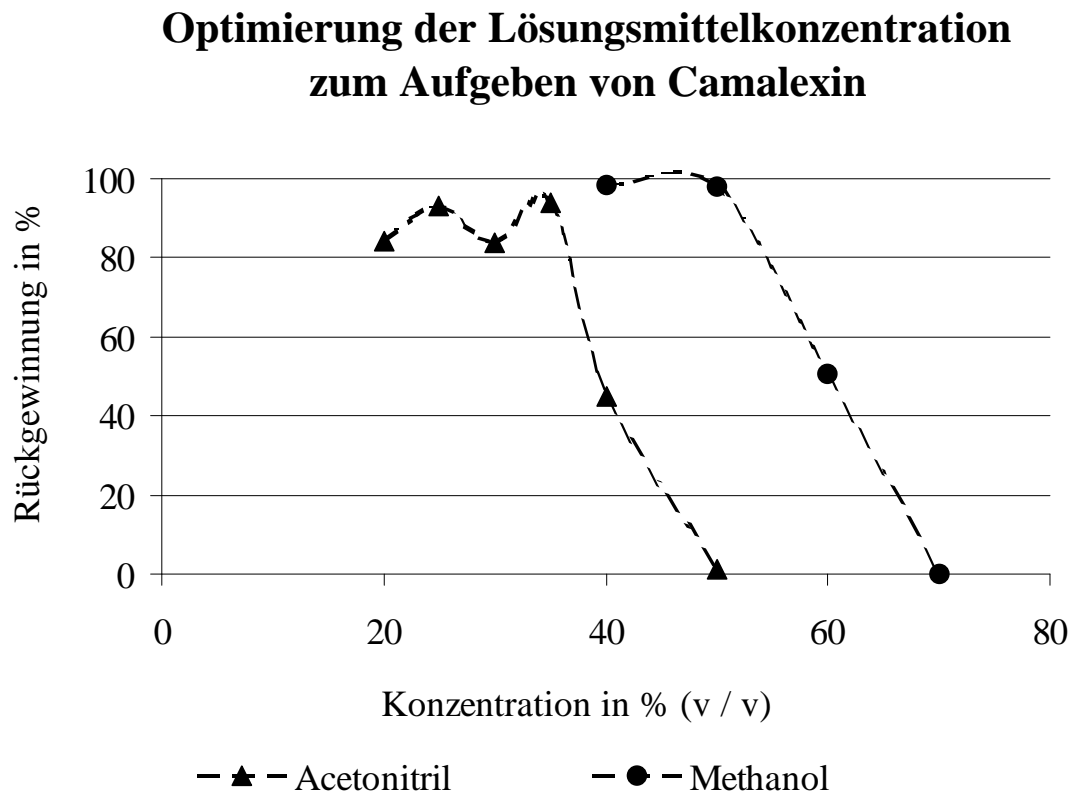


Abb. 10: Versuchsreihe zum Aufgeben von Camalexin mit verschiedenen Konzentrationen an Methanol und Acetonitril auf die C-18 Kartusche bei pH 8. Angegeben sind die Rückgewinnungsraten in % für die später zu analysierende Fraktion, $n=3$.

In Abb. 10 und Tab. A 22 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt. Zum Aufgeben von Camalexin konnte maximal 35 % (v/v) Acetonitril pH 8 und bei Methanol maximal 50 % (v/v) verwendet werden. Wurden diese Konzentrationen überschritten, so verringerte sich die Rückgewinnungsrate. Aufgrund der Ergebnisse wurde in späteren Versuchen eine maximale Konzentration von 30 % Acetonitril (v/v) bzw. 45 % Methanol (v/v) zum Aufgeben auf die C-18 Kartusche verwendet.

b) Eluieren von Camalexin von der C-18 Kartusche ohne Pflanzenmaterial

In Tab. 9, Tab. A 23 und Tab. A 24 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt. Ab einer Acetonitrilkonzentration von 70 % (v/v) konnte unter sauren Bedingungen mit 1,5 ml (maximales Probenvolumen der für den Probengeber verwendeten Vials) das gesamte

eluierbare Camalexin eluiert werden. Wurde Methanol verwendet, so war die Elutionskraft zu gering, um mit 1,5 ml das gesamte eluierbare Camalexin von der Kartusche zu eluieren. Selbst bei einer Konzentration von 95 % (v/v) wurde erst mit der zweiten Fraktion (3 ml Eluentenvolumen) eine vollständige Elution erreicht.

Tab. 9: Ergebnisse der Versuchsreihe zur Ermittlung der Konzentration an Acetonitril bzw. Methanol und der Menge an Eluent in ml zum Eluieren von Camalexin von der C-18 Kartusche. Dargestellt sind die Rückgewinnungsraten in %. 100 % entsprach der Konzentration des eingesetzten Camalexinstandards, n=3.

Fraktionen		1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Methanol pH 4 % (v/v)	75	50,5	37,8	1,6
	95	69,6	20,9	n.n.
Acetonitril pH 4 % (v/v)	60	90,3	2,4	n.n.
	70	96,6	n.n.	n.n.
	75	91,6	n.n.	n.n.
	80	94,4	n.n.	n.n.

Zusammenfassend konnte für die Festphasenextraktion von Camalexin ohne Pflanzenmatrix mit C-18 Material für das Aufgeben auf die C-18 Kartusche maximal 35 % (v/v) Acetonitril bzw. 50 % (v/v) Methanol unter basischen Bedingungen verwendet werden. Als Puffer wurde ein 3,5 mM Phosphatpuffer pH 8 verwendet.

Zum Eluieren von Camalexin konnte kein Methanol verwendet werden. Acetonitril konnte ab einer Konzentration von 70 % (v/v) unter sauren Bedingungen verwendet werden, wobei hier ein 12 mM Phosphatpuffer pH 4 verwendet wurde.

c) Aufgeben und Eluieren von Camalexin unter den optimierten Bedingungen mit Pflanzenmatrix

Methanol erwies sich zum Einwaschen als ungeeignet, da es aufgrund hoher Viskosität nur mit einem hohen Zeitaufwand (über 30 min.) möglich war, das Methanol-Pflanzenmatrix-Camalexin-Gemisch in die Kartusche einzuwaschen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 10 dargestellt.

Bei der Verwendung von Acetonitril wurde eine Wiederfindungsrate von 86,1 % ermittelt.

Tab. 10: Rückgewinnungsraten von Camalexin in % nach der Festphasenextraktion mit C-18 Material in Anwesenheit von Pflanzenmatrix unter optimierten Bedingungen, Kontrolle = eingesetzter Camalexinstandard, n=3.

Bedingungen	Rückgewinnung in %
Aufgeben: Acetonitril 30 % (v/v) pH 8 Eluieren :Acetonitril 80 % (v/ v) pH 4	86,1
Aufgeben: Methanol 50 % (v/v) pH 8 Eluieren: Acetonitril 80 % (v/ v) pH 4	zu hohe Viskosität
Kontrolle	100

4.1.3 Durchführung und Modifizierung des Analysenverfahrens

Die Rückgewinnungsraten sind in Tab. 11 dargestellt. Es war zu erkennen, dass bei der Durchführung des Analysenverfahrens, bei dem Camalexinstandard mit Leitungswasser gemischt wurde, die Wiederfindungsrate bei 88,3 % und damit nicht unterschiedlich zur Wiederfindungsrate lag, bei der Pflanzenmatrix mit Camalexin direkt auf die C-18 Kartusche gegeben wurde (85,7%). Wurde das Camalexin hingegen zum Pflanzenmaterial gegeben und dieses entsprechend des Analysenverfahrens (vgl. 3.6.3.1) aufbereitet, so lag die Rückgewinnungsrate mit 54 % auffällig niedrig.

Es wurden mehrere Versuche bezüglich des Verbleibs des Camalexins durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass sich nur 50-60 % des eingesetzten Camalexins mit 30 %igem Acetonitril unter basischen Bedingungen aus dem Abdampfkolben aufnehmen ließen. Nach mehreren Versuchen wurde festgestellt, dass sich ein großer Teil des Camalexins mit reinem Acetonitril bei einem „pH von 8“ aufnehmen ließ. Da zum Einwaschen von Camalexin in die C-18 Kartusche eine maximale Konzentration von 30-35 % Acetonitril ermittelt wurde (siehe Abb. 10), wurde die Festphasenextraktion entsprechend modifiziert, wobei dann eine Rückgewinnungsrate von 75,6 % erreicht wurde. Das modifizierte Analysenverfahren, wie es später angewendet wurde, wird unter 4.1.4 beschrieben.

Tab. 11: Effektivität des Analysenverfahrens von Camalexin in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmatrix. Dargestellt sind die Rückgewinnungsraten in % bezogen auf die Kontrolle.

Extraktionsmatrix	Rückgewinnung in %
Leitungswasser	88,3
Pflanzen-Extrakt	85,7
<i>C. sativa</i> -Pflanzen (Pflanzenmaterial)	54,0
<i>C. sativa</i> -Pflanzen nach Modifizierung	75,6
Kontrolle	100

4.1.4 Durchführung des optimierten Analysenverfahrens

Es wurden ca. 3 g Pflanzenmaterial mit 40 ml Methanol gemischt, unter Mikrowellenbehandlung bei 1000 W 1 min sieden gelassen und filtriert. Zu dem zurückbleibenden Pflanzenmaterial wurde 30 ml Methanol gegeben, unter Mikrowellenbehandlung bei 1000 W 30 sek. sieden gelassen und ebenfalls filtriert. Das zurückbleibende Pflanzenmaterial wurde nochmals mit 10 ml Methanol gewaschen und filtriert. Alle resultierenden Methanolfractionen wurden vereinigt, bei 42 °C in einem Abdampfkolben soweit eingengt, bis das Methanol abgedampft war (2-3 ml wässrige Restflüssigkeit). Der Rückstand wurde mit 2 %iger NaOH (50 µl) auf pH 8 eingestellt und in die vorkonditionierte C-18 Kartusche eingewaschen. Hier war darauf zu achten, dass Pflanzenproben von mit BION® behandelten Pflanzen mit einem pH von 4-4,5 niedriger lagen als Pflanzenproben von unbehandelten Pflanzen mit einem pH von 5-5,5 (Van den Ende, 1969). Danach wurde die Kartusche mit 1 ml Phosphatpuffer pH 8 gewaschen.

In den Abdampfkolben wurden nun (zum Lösen der zu analysierenden Substanzen) 2 ml reines Acetonitril gegeben und bei 42 °C ca. 1 min im Wasserbad inkubiert. In das Reservat der Kartusche wurde 2,1 ml Phosphatpuffer pH 8 gegeben und mit 0,7 ml warmen Acetonitril aus dem Abdampfkolben gemischt, woraus sich eine Acetonitrilkonzentration von 33 % (v/v) ergab. Die Lösung wurde in die Kartusche eingewaschen. Das Verdünnen und Mischen von Acetonitril aus dem Abdampfkolben mit Phosphatpuffer pH 8 wurde zweimal wiederholt. Der Abdampfkolben wurde anschließend mit 2,5 ml Phosphatpuffer pH 8 gewaschen und die daraus resultierende Fraktion wurden in die Kartusche eingewaschen. Danach wurde mit 1,5

ml Acetonitril/12 mM Phosphatpuffer pH 4, 80/20 % (v/v) eine klare, rötlich-braune Fraktion von der Kartusche eluiert, welche die zu untersuchenden Substanzen enthielt und direkt auf der RP-HPLC analysiert werden konnte. Es war wichtig darauf zu achten, dass die Kartusche während der Festphasenextraktion nicht trocken fiel. Die einzelnen Schritte des Analysenverfahrens sind in Abb. 11 zusammengefasst dargestellt.

1. Thermischer Pflanzenaufschluß

1. 3 g Pflanzenmaterial, Extraktion mit:
2. 40 ml MeOH 1 min Mikrowellenbehandlung, Filtration
3. 30 ml MeOH 0,5 min Mikrowellenbehandlung, Filtration
4. 10 ml MeOH, Filtration
5. Vereinigung der Methanolfractionen, auf 2-3 ml bei 42 °C einengen

2. Festphasenextraktion

1. Einstellen der Fraktion auf pH 8 (NaOH, 2 %, 50 µl) und einwaschen in die C-18 Kartusche
2. Kartusche waschen mit 1 ml Phosphatpuffer pH 8
3. Rückstand im Abdampfkolben in 2 ml Acetonitril bei 42 °C aufnehmen
4. 0,7 ml Acetonitril aus dem Abdampfkolben in 2,1 ml vorgelegten Phosphatpuffer pH 8 auf der Kartusche mischen und einlaufen lassen
5. Schritte 4 zweimal wiederholen.
6. Restliches Acetonitril aus dem Abdampfkolben mit 2,5 ml Phosphatpuffer pH 8 (bei 42 °C) aufnehmen und in die Kartusche einwaschen
7. Kartuschen mit 1 ml Phosphatpuffer pH 8 waschen
8. Elution mit 1,5 ml Phosphatpuffer pH 4, 80 % Acetonitril (v/v)

3. Messung HPLC

1. Messung mit der RP-HPLC.

Abb. 11 : Übersicht über das optimierte Analysenverfahren zur Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin aus *C. sativa*-Pflanzen.

4.2 Induktion der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* mit BION®

Unter Gewächshausbedingungen wurden *C. sativa*-Pflanzen im Rosettenstadium mit dem Pflanzenaktivator BION®, mit *A. brassicae*-Sporensuspension und als Kontrolle mit Leitungswasser behandelt. An den mit BION® behandelten Pflanzen konnten bereits 3 Tage nach der Behandlung Veränderungen im Pflanzenwuchs beobachtet werden. An den Pflanzen, die mit *A. brassicae* behandelt wurden, traten diese in abgeschwächter Form auf. Die Blätter wurden schmaler und der Winkel zur Sprossachse wurde steiler. Weiter war besonders bei den mit BION® behandelten Pflanzen das Wachstum verlangsamt, die Pflanzen blieben im Vergleich zu den mit Leitungswasser behandelten Kontrollpflanzen kleiner (Abb. 14).

Der Nachweis mit Besprühen einer entwickelten DC-Platte mit Dragendorff's Reagens (nach Browne et al., 1991), lieferte nicht den gewünschten eindeutigen Nachweis von Camalexin, bzw. Methoxycamalexin.

Auch der Versuch eine entwickelte DC-Platte mit einer Sporensuspension von *Cladosporium spec.* zu besprühen und für 48 h bei 30 °C zu inkubieren (Bioassay nach Conn et al., 1994) brachte keine eindeutigen Ergebnisse.

Erst mit dem Objektträgertest konnten die Fraktionen bestimmt werden, die biowirksame Metabolite (Phytoalexine) enthielten. Die Fraktionen, die von den behandelten Pflanzen (BION® und *A. brassicae*-Suspension) stammten, hatten eine totale Hemmung der Keimung der *A. brassicae*-Konidien zur Folge. Selbst nach 10 Tagen, als der Objektträgertest beendet wurde, war hier kein Wachstum festzustellen (Tab. 12, Abb. 12, Abb. 13). In der Kontrolle war schon ein Tag nach Testbeginn eine gute Keimung und ein gutes Myzelwachstum zu beobachten.

Mit den Ergebnissen des Objektträgertests ließen sich keine Aussagen bezüglich der Wirkkomponenten der Fraktionen machen, jedoch konnte gezeigt werden, dass mit dem Pflanzenaktivator BION® genauso wie mit *A. brassicae* die Phytoalexinproduktion bei *C. sativa* induziert werden konnte.

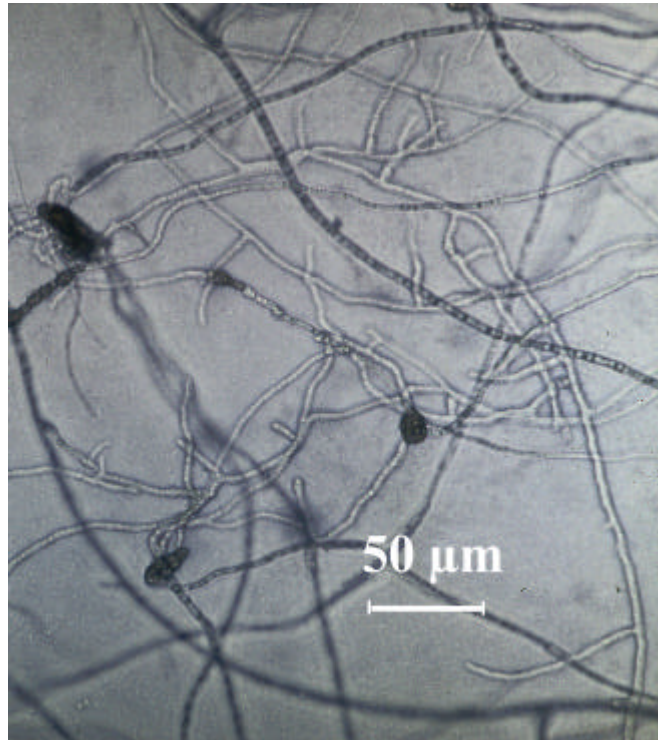


Abb. 12: Keimung und Wachstum von *A. brassicae* Konidien der Kontrolle im Objektträgertest 5 Tage nach Testbeginn.

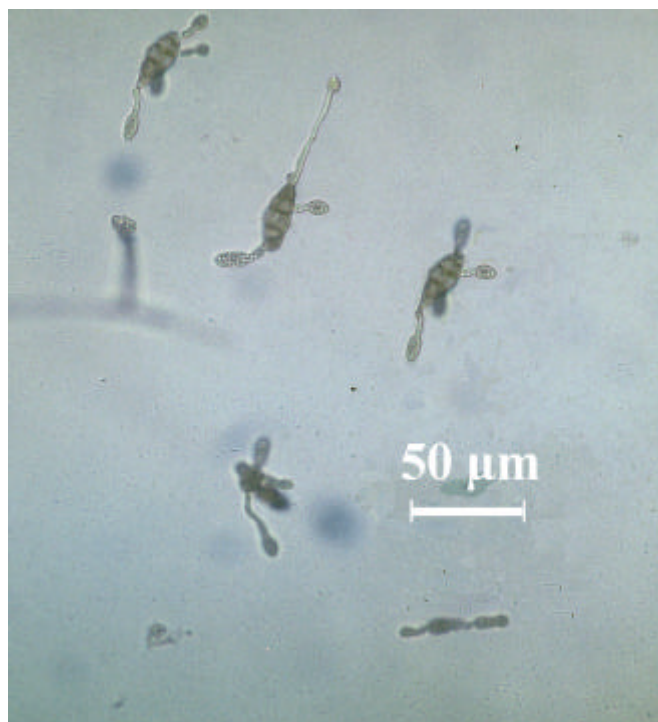


Abb. 13: Hemmung von Keimung und Wachstum von *A. brassicae* Konidien im Objektträgertest unter Zusatz von biowirksamen Fraktionen 5 Tage nach Testbeginn.

Tab. 12: Hemmwirkung von Fraktionen von unterschiedlich behandelten *C. sativa*-Pflanzen im Objektträgertest auf *A. brassicae*, n=3.

Tage nach Testbeginn	1	2	3	4	6	8	10
Versuchsvarianten							
Behandlung mit <i>A. brassicae</i>	1	1	1	1	1	1	1
Behandlung mit BION®	1	1	1	1	1	1	1
Behandlung mit Wasser (Kontrolle)	2	3	4	4	5	5	5

1= keine Keimung, keine Hyphen 2= Keimung, die auswachsende Keimhyphen sind bis zu 2 mal so lang wie die Konidien 3= ausgewachsene Keimhyphen sind bis zu 10 mal so lang wie die Konidien 4= ausgewachsene Hyphen zum Myzel verzweigt 5= Sporulation des Myzels

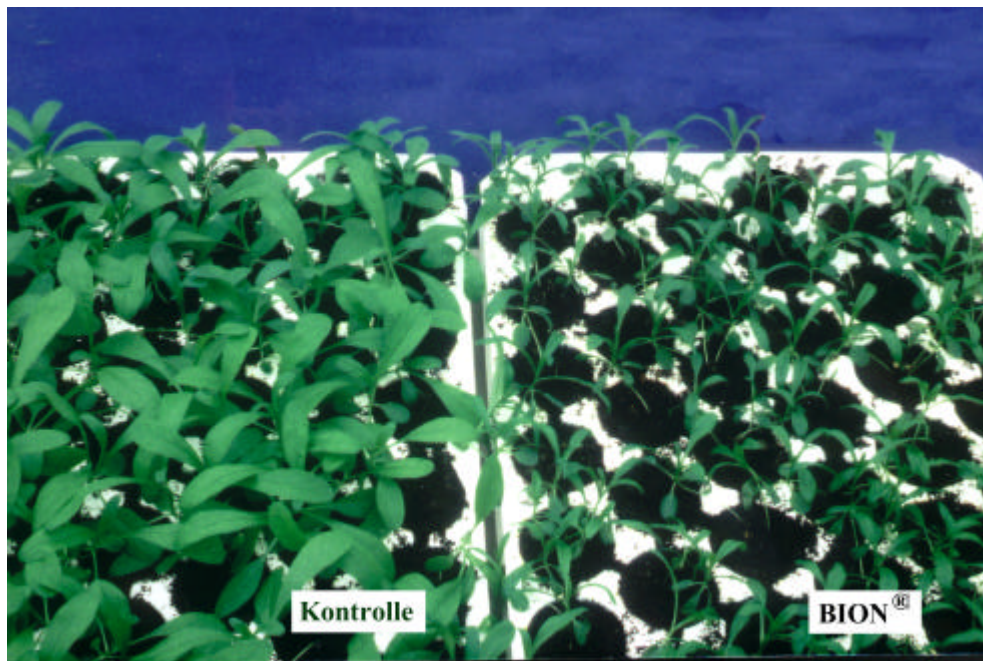


Abb. 14: Vergleich von *C. sativa*-Pflanzen der Kontrolle (Behandlung mit Leitungswasser) und der mit dem Pflanzenaktivator BION® behandelten Variante im Entwicklungsstadium Rosette (12 Tage nach Versuchsbeginn).

4.3 Weitere induzierbare bioaktive Metabolite in *C. sativa*

Mit dem gewählten Extraktionsverfahren mit Methanol sollten alle potentiell biowirksamen Substanzen, die im Spross von *C. sativa* vorhanden waren, extrahiert werden. Es wurden mit BION[®] behandelte *C. sativa*-Pflanzen verwendet. Als Kontrolle wurden Pflanzen verwendet, die mit Leitungswasser behandelt waren.

Die Fraktionen A4 und B3 (Abb. 6) hatten im Objektträgertest eine keimhemmende Wirkung auf *A. brassicae* und enthielten u.a. Camalexin und Methoxycamalexin. Bei der Kontrolle konnte bei den gleichen Fraktionen im Objektträgertest keine Wirkung auf *A. brassicae* festgestellt werden. Bei allen anderen Fraktionen trat bei *A. brassicae* keine hemmende Wirkung im Objektträgertest auf. Die HPLC-Analyse der Fraktionen A4 und B3 zeigte erwartungsgemäß das Vorhandensein von Camalexin und Methoxycamalexin als biowirksame Substanzen. Da sich die Fraktionen A4 und B3 in ihrer Aufarbeitung prinzipiell nicht unterschieden, wurden sie zur weiteren Auftrennung zur Fraktion „V“ vereinigt. Nun mussten die bekannten Phytoalexine (Camalexin und Methoxycamalexin) abgetrennt werden. War eine der daraus resultierenden Fraktionen bioaktiv und enthielt kein Camalexin oder Methoxycamalexin, so war das Vorhandensein eines weiteren Phytoalexins im Spross von *C. sativa* in dieser Fraktion sehr wahrscheinlich.

Die Fraktion „V“ wurde mittels präparativer DC (Si 60) in drei Fraktionen aufgetrennt: V_I mit einem R_f-Wert von 0-0,2, V_{II} mit einem R_f-Wert von 0,2-0,7 und V_{III} mit einem R_f-Wert von 0,7-1. Die Fraktion V_I zeigte im Objektträgertest keine Wirkung. Die Fraktionen V_{II} und V_{III} erwiesen sich im Objektträgertest als biowirksam auf *A. brassicae*; die entsprechenden Kontrollen zeigten keine Wirkung. Bei der anschließenden RP HPLC-Analyse konnte das Camalexin und das Methoxycamalexin in der Fraktion V_{II} nachgewiesen werden. Es waren nur wenig weitere kleine Peaks zu erkennen. In der Kontrolle konnte weder Camalexin noch Methoxycamalexin nachgewiesen werden. Bei der Fraktion V_{III} wurde kein Camalexin und kein Methoxycamalexin gefunden. Hier ergab die Analyse mehrere Peaks, deren *k'*-Werte zwischen 0,1 und 2,5 lagen. Peaks mit einem höheren *k'*-Werten waren erwartungsgemäß nicht vorhanden. Demnach enthielt die Fraktion V_{III} ein oder mehrere induzierbare Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf *A. brassicae* hatten. Die entsprechend aufgetrennte Kontrolle zeigte keine Wirkung im Objektträgertest.

Um eine größere Menge der Fraktion „V“ aufzutrennen, wurde in Anlehnung an den Ergebnissen aus der präparativen DC die Flashchromatographie an Si-60 verwendet. Hier

zeigte die erste aufgefangene Fraktion V_I (4 x 2 ml) (entsprach auch der Fraktion V_I aus der Auftrennung mit der DC) eine Biowirksamkeit im Objektträgertest und enthielt gleichzeitig kein Camalexin oder Methoxycamalexin. Die zweite Fraktion (weitere 5 x 2 ml) enthielten sowohl das Camalexin und das Methoxycamalexin, als auch das unbekannte induzierbare Stoffwechselprodukt (UIS) (entsprach der Fraktionen V_{II} und V_{III} aus der DC Auftrennung) und hatte ebenfalls eine Wirkung auf *A. brassicae* im Objektträgertest. Die später aufgefangenen Fraktionen zeigten keine Wirkung auf *A. brassicae*. Auf eine Auftrennung der Kontrolle wurde verzichtet.

Die weitere Auftrennung der Fraktion V_I erfolgte mit der RP-HPLC mit einem Gradientensystem. Es wurden nur die Fraktionen der BION[®]-Varianten aufgetrennt. Aus dieser Auftrennung wurden drei Fraktionen aufgefangen: V_{Ia} (k' -Wert 0-1,5, Retentionszeit 2-5 min), V_{Ib} (k' -Wert 1,6-2,4, Retentionszeit 5-6,8 min) und V_{Ic} (k' -Werte 2,5-7, Retentionszeit 6,8-15 min). Die Fraktion V_{Ia} erwies sich im Objektträgertest als biowirksam, die beiden anderen Fraktionen V_{Ib} und zeigten keine Biowirksamkeit im Objektträgertest auf *A. brassicae* (siehe Tab. 13). Bei dem Versuch die bioaktive(n) Substanz(en) am Fachbereich 13 Chemie und Chemietechnik zu identifizieren, stellte sich heraus, dass die Fraktion neben „Verunreinigungen“ noch eine zu geringe Menge an aliphatischen Verbindungen enthielt. Eine Strukturaufklärung war daher nicht möglich.

Eine weitere Substanz, die als potentiell induzierbarer bioaktiver Metabolit in Frage kam, war das UIS (unbekannte induzierbare Stoffwechselprodukt), welches bei der Optimierung der HPLC-Methoden (4.1.1) gefunden wurde. Das UIS war immer in Fraktionen aus mit BION[®] behandelten Pflanzen in höheren Konzentrationen nachweisbar, in der Kontrolle konnten nur geringe Mengen detektiert werden. Unter den Bedingungen der RP-HPLC lag der k' -Wert des Peaks bei 5,85 (Retentionszeit von 13,7 min) und somit höher als die k' -Werte vom Camalexin und Methoxycamalexin. Von der Fraktion V_I wurde mit Hilfe der RP-HPLC das UIS separiert. Die Aufgefangene Fraktion entsprach der Fraktion V_{Ic} . Die Ergebnisse des anschließenden Objektträgertestes sind in der Tab. 13 dargestellt. Diese Fraktion bewirkte keine Hemmung der Keimung und des Wachstums der von *A. brassicae*. Demnach ist das UIS kein weiteres Phytoalexin, da es keine Bioaktivität zeigte.

Tab. 13: Vergleich der Wirkung von verschiedenen Fraktionen nach Auftrennung mit der RP-HPLC auf *A. brassicae* im Objektträgertest, n=3, Boniturschema siehe Tab. 3.

Tage nach Testbeginn	1 Tag	2 Tage	3 Tage
V _{1a}	3	4	5
V _{1b}	1	1	2
V _{1c}	1	1	2
Kontrolle	3	4	5

4.4 Anwendung des optimierten Analysenverfahrens zur Analyse von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS im Spross von *C. sativa*

In dieser Versuchsreihe wurde die optimierte Analysenmethode zur Quantifizierung von Camalexin, Methoxycamalexin und das UIS auf verschiedene Fragestellungen bezüglich der Phytoalexinproduktion von *C. sativa* angewandt, mit dem Ziel, anhand der Quantität und der Qualität der produzierten Phytoalexine die 13 *C. sativa*-Sorten zu differenzieren.

In Vorversuchen wurden nur Blätter bzw. nur Stängel von *C. sativa* Pflanzen zum Ende der Rosette aufbereitet. Es stellte sich heraus, dass es Unterschiede bezüglich der Konzentrationen von Camalexin und Methoxycamalexin zwischen Blättern und Stängeln gab. So konnte bei den gleichen Pflanzen für die Blätter eine Konzentration von 115,7 µg/kg FM und für die Stängel eine Konzentration von 35,4 µg/kg FM ermittelt werden. Für die hier vorgenommenen Messungen hatte dies keine Bedeutung, da immer Mischproben von Stängeln und Blättern mehrerer Pflanzen verwendet wurden.

4.4.1 Induktion der Phytoalexinproduktion mit BION[®], anorganischen Salzen und *B. cinerea*

Hier sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene Elicitoren eine differenzierte Antwort von *C. sativa* bezüglich der Phytoalexinproduktion bewirkten.

Während der Durchführung des Versuchs unter Gewächshausbedingungen herrschten sommerliche Temperaturen. Dies hatte zur Folge, dass die Temperaturen im Gewächshaus am Tag zwischen 28 und 35 °C und in der Nacht zwischen 20 und 24 °C lagen.

Der Zustand der Pflanzen vor der Ernte wurde fotografisch festgehalten und ist in Abb. 15 dargestellt. Die Pflanzen der BION[®]- (keine Abb.) und der *B. cinerea*-Varianten zeigten keinen Unterschied zur Kontrolle.

Die mit Silbernitrat behandelten Pflanzen zeigten im Vergleich zur Kontrolle ein verlangsamtes Wachstum und Chlorosen auf den Blättern.

Die mit Kupferchlorid behandelten Pflanzen waren erheblich kleiner als die Pflanzen der Kontrolle. Weiter trat hier eine deutliche Schädigung der Pflanzen in Form von chlorotisierten und abgestorbenen Blättern auf. Ein Teil der Pflanzen waren bis zum Versuchende abgestorben.

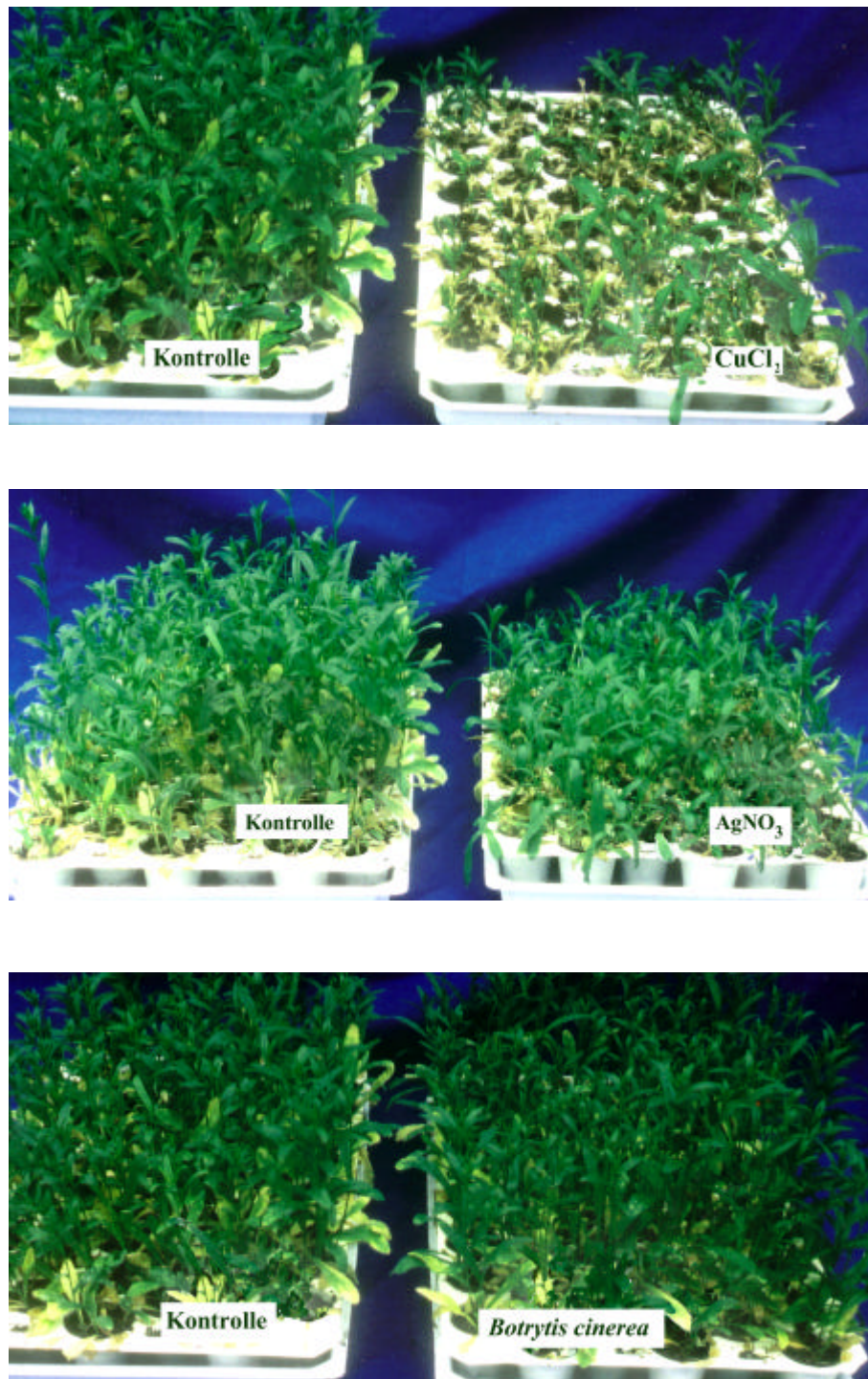


Abb. 15: Unterschiede im Wachstum von *C. sativa*- Pflanzen zwischen der Kontrolle (Behandlung mit Leitungswasser) und den mit CuCl_2 , AgNO_3 und *B. cinerea* behandelten Varianten im Entwicklungsstadium beginnende Schossung (12 Tage nach Versuchsbeginn). Die Behandlungen erfolgten zur Rosette.

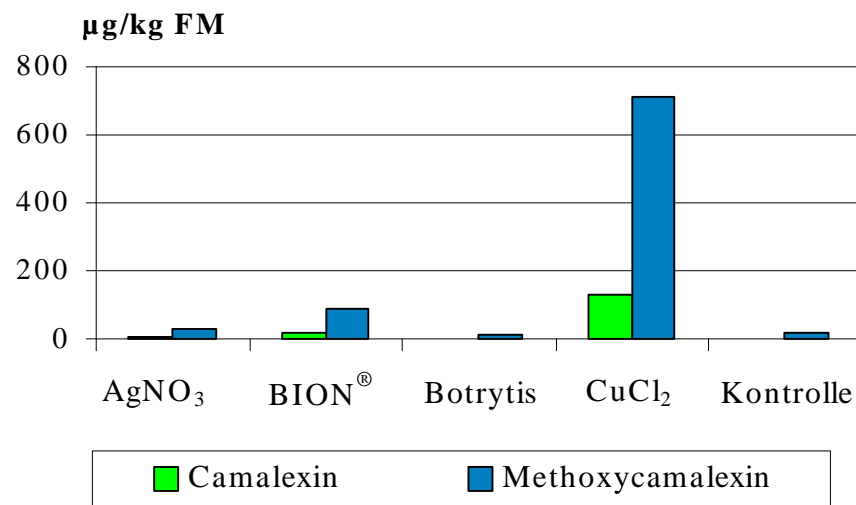


Abb. 16: Produktion von Camalexin und Methoxycamalexin in *C. sativa* nach Induktion mit verschiedenen Elicitoren unter Gewächshausbedingungen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Camalexinstandard, n=3. GD 5 % Camalexin 51 µg, GD 5 % Methoxycamalexin 217 µg.

Nach der Behandlung mit den verschiedenen Induktoren konnte nur bei der CuCl₂-Variante eine signifikant höhere Konzentration an Camalexin und Methoxycamalexin gemessen werden als in der Kontrolle. Alle anderen Varianten waren bezüglich der Phytoalexinkonzentration nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Wie in Abb. 16 dargestellt, lag die Konzentration an Methoxycamalexin bei der Behandlung mit CuCl₂ mit über 700 µg/kg Frischgewicht am höchsten. Bei den anderen Varianten lagen die Konzentrationen bei 13,8 für *B. cinerea* und 89,4 µg/kg FM für die BION®-Variante. Beim Camalexin lag die CuCl₂-Behandlung mit einer Konzentration von über 130 µg/kg FM am höchsten. Bei den anderen Varianten lagen die Konzentrationen zwischen 14,8 und 0,05 µg/kg FM.

Wird der Zustand der Pflanzen und die Produktion an Phytoalexin verglichen, so war die Konzentration in den am schlechtesten entwickelten Pflanzen (CuCl₂-Behandlung) am höchsten.

4.4.2 Induktion der Phytoalexinproduktion von *C. sativa* mit dem Pflanzenaktivator BION[®] zu verschiedenen Entwicklungsstadien

Mit diesem Versuch sollten Unterschiede bezüglich der Konzentration an Camalexin, Methoxycamalexin und des UIS in *C. sativa* zu verschiedenen Stadien untersucht werden. Für die Untersuchung wurde die Sorte 13 verwendet. Ziel war die Ermittlung des optimalen Entwicklungsstadiums zur Sortendifferenzierung.

Nach der Behandlung mit BION[®] traten bei den Pflanzen Wachstumsdepressionen auf, was auch in den anderen Versuchen beobachtet wurde. Diese Effekte waren besonders stark in den Stadien Keimblatt und Rosette ausgeprägt. In dem Stadium Schossen waren die Effekte nur noch in abgeschwächter Form zu beobachten, zur Knospung konnten die Effekte nicht mehr beobachtet werden. Bezüglich der Konzentrationen an Camalexin, Methoxycamalexin und des UIS traten zwischen der Behandlung mit BION[®], im Vergleich zur Kontrolle zu den Stadien Keimblatt, Rosette und Schossen signifikante Unterschiede auf. Zum Knospenstadium waren die gemessenen Konzentrationen der BION[®] Variante zwar noch höher als die ermittelten Konzentrationen der Kontrollen, jedoch waren die Unterschiede nicht mehr signifikant. Die höchsten Konzentrationen wurden beim Methoxycamalexin gefunden. Die Konzentrationen an Camalexin und dem UIS waren relativ gering im Vergleich zum Methoxycamalexin. Im allgemeinen lagen die gemessenen Konzentrationen zu den Stadien Keimblatt und Rosette am höchsten, im Knospenstadium wurde bei allen analysierten Substanzen die geringste Konzentration gemessen (Abb. 17 und Tab. A 25).

Bei den Analysen der Pflanzen in den Stadien Schossen und Knospe traten bei der Verwendung von 3 g Pflanzenmaterial bei 3 Wiederholungen sehr große Unterschiede innerhalb der Wiederholungen auf. Als Konsequenz wurden 30 g Pflanzenmatrix je Wiederholung mit Methanol extrahiert und von diesem Extrakt dann die Menge an Methanol im ml entnommen, die 3 g Frischmasse entsprach. Durch die höhere Anzahl an Pflanzen, die zur Aufbereitung verwendet wurden, lagen die Unterschiede zwischen den Wiederholungen in einem statistisch auswertbaren Bereich.

Die Camalexin-Konzentration lag im Keimblattstadium bei 15,2 µg/kg FM und stieg zu den Stadien Rosette und Schossen auf 20,0 bzw. 28,6 µg/kg FM. Im Knospenstadium wurde die signifikant geringste Konzentration mit 5,9 µg/kg FM gemessen. Beim Methoxycamalexin lagen die Konzentrationen im Keimblattstadium und im Rosettenstadium mit 172,3 bzw. 210,6 µg/kg FM signifikant über den Konzentrationen, die zum Schossen (99,8 µg/kg FM)

gemessen wurden. Im Knospenstadium wurden die signifikant geringsten Konzentrationen gemessen. Bezüglich des UIS wurde im Keimblattstadium eine Konzentration von 27,7 $\mu\text{g/kg}$ FM ermittelt. Zu den Stadien Rosette und Schossen stieg die Konzentration auf 56,1 bzw. 60,9 $\mu\text{g/kg}$ FM an und war somit signifikant unterschiedlich zu den ermittelten Konzentrationen im Keimblatt- und im Knospenstadium (4,6 $\mu\text{g/kg}$ FM), die sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Die bei den Kontrollen gemessenen Konzentrationen lagen mit einer Ausnahme zu allen Stadien unterhalb der Nachweisgrenze. Die Ausnahme bildete das UIS, welches zum Schossen eine Konzentration von 8,6 $\mu\text{g/kg}$ FM aufwies, zur Knospe wurde wieder eine geringe Konzentration von 1,9 $\mu\text{g/kg}$ FM gemessen.

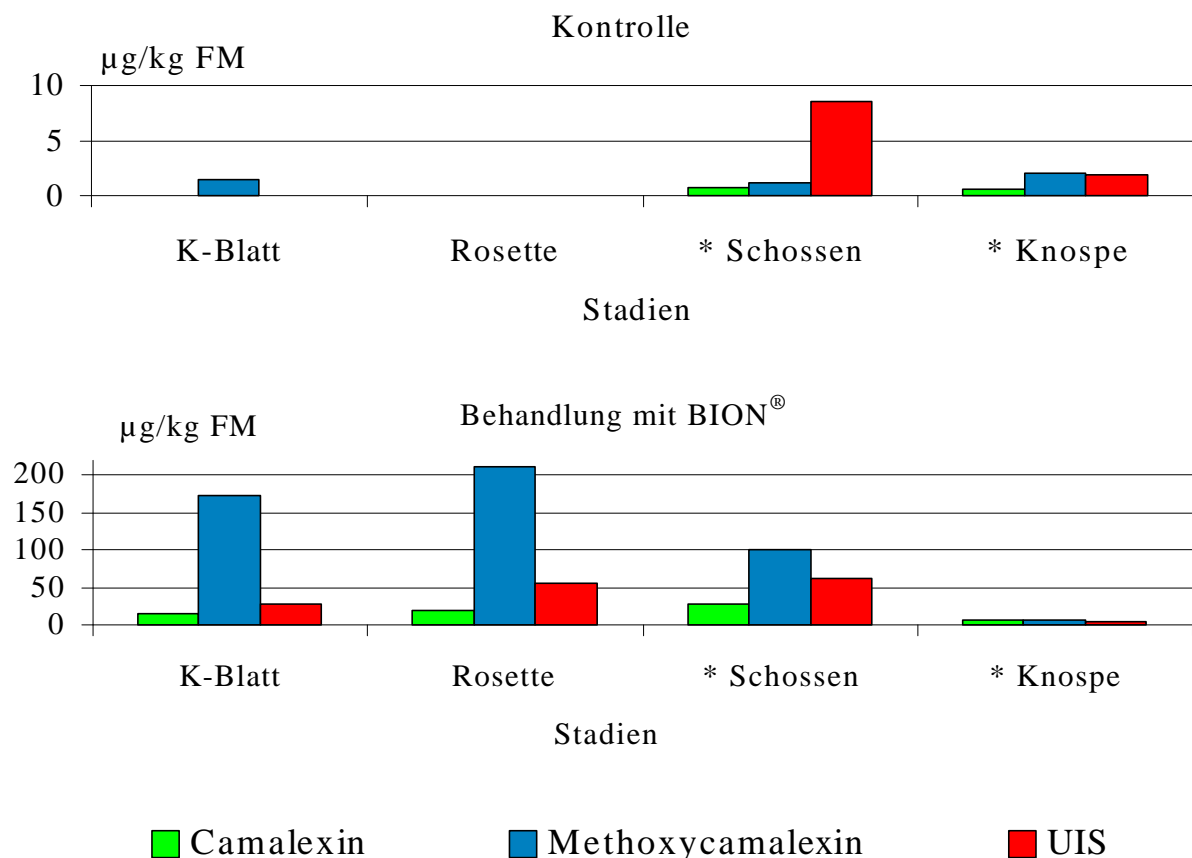


Abb. 17: Konzentrationen an Camalexin Methoxycamalexin und dem UIS im Spross von *C. sativa* (Sorte 13) zu verschiedenen Entwicklungsstadien nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION® im Vergleich zur mit Leitungswasser behandelten Kontrolle, n=3. UIS = unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt. * Es wurden 30 g Pflanzenmaterial zur Aufbereitung verwendet. GD 5 % Camalexin 9,9 $\mu\text{g/kg}$ FM, GD 5 % Methoxycamalexin 44,1 $\mu\text{g/kg}$ FM GD 5 % UIS 17,0 $\mu\text{g/kg}$ FM.

4.4.3 Akkumulation von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS in *C. sativa* nach der Behandlung mit BION[®]

Dieser Versuch sollte Aufschluss über die Akkumulation von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION[®] geben.

Bereits 2 Tage nach der Behandlung war im Vergleich zur Kontrolle die schon erwähnten Wachstumsdepressionen zu erkennen. In dieser Untersuchung wurden die Wachstumsveränderungen anhand des Frischgewichtes quantifiziert. Hierfür wurden die Frischmassen der geernteten Pflanzen in g ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefasst. Sowohl in der Kontrolle als auch in der BION[®]-Variante war eine konstante Gewichtszunahme der Pflanzen zu beobachten. Auffällig war, dass die ermittelten Frischgewichte der BION[®]-Variante um ca. 30 % geringer waren als die der Kontrolle.

Tab. 14: Entwicklung der Biomasse (Frischgewicht in g) von *C. sativa* nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION[®] im Vergleich zur Kontrolle (n=3).

	Frischgewicht in g					
Tage nach Behandlung	2	5	8	11	14	22
Kontrolle (Leitungswasser)	23,4	-	28,2	-	49,0	-
BION [®]	17,4	19,3	21,5	31,4	33,9	42,1

Bezüglich der analysierten Substanzen (Camalexin, Methoxycamalexin und UIS) wurden Unterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Pflanzen beobachtet. Die mit BION[®] behandelten Pflanzen zeigten gegenüber der Kontrolle hochsignifikant höhere Messwerte. Bei der BION[®]-Variante wurden 8 Tage nach der Behandlung die höchsten Konzentrationen ermittelt. Danach verringerten sich die Konzentrationen, 22 Tage nach der Behandlung konnten noch ca. 40 % der Maximalkonzentration gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 und Tab. A 26 dargestellt.

Bezüglich der Verteilung der Konzentrationen der analysierten Substanzen lag die Konzentration an Camalexin 2 und 5 Tage nach der Behandlung mit BION[®] tendenziell höher als die von Methoxycamalexin. 8, 11 und 14 Tage nach der Behandlung lag die Konzentration an Methoxycamalexin tendenziell höher. 22 Tage nach der Behandlung lagen die Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin etwa gleich hoch. Die Konzentration

an UIS lag zu allen Messungen deutlich unter den ermittelten Konzentrationen für Camalexin und Methoxycamalexin.

2 Tage nach Behandlung mit BION[®] lagen die Messwerte der BION[®]-Variante im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher. Bei der BION[®]-Variante konnte für Camalexin die höchste Konzentration mit 496,4 µg/kg FM gemessen werden. Die Konzentration an Methoxycamalexin lag mit 107,3 µg/kg FM deutlich niedriger, wobei die Konzentration an UIS mit 13 µg/kg FM am geringsten war. Fünf Tage nach der Behandlung stieg die Konzentration an Camalexin auf 3203,7 µg/kg FM, die vom Methoxycamalexin auf 2255,8 µg/kg FM. Die Konzentration des UIS lag mit 130,2 µg/kg FM am niedrigsten. Nach 8 Tagen wurden bei allen analysierten Substanzen die signifikant höchsten Konzentrationen gemessen. Camalexin lag mit einem Wert von 5584,9 µg/kg FM unter dem des Methoxycamalexins mit 5901,5 µg/kg FM. Die Konzentration an UIS lag bei 734,0 µg/kg FM. 11 und 14 Tage nach Versuchsbeginn nahm die Konzentration der gemessenen Substanzen wieder ab. Die Konzentrationen an Camalexin lagen nach 11 Tagen bei 1856,5 und nach 14 Tagen bei 2364,4 µg/kg FM. Die Konzentrationen an Methoxycamalexin lagen nach 11 Tagen bei 3325,6 und nach 14 Tagen bei 3971,7 µg/kg FM. Das UIS lag nach 11 Tagen mit 401,3 und nach 14 Tagen mit 444,7 µg/kg FM am niedrigsten. Nach 22 Tagen lag die Konzentration an Camalexin bei 2129,5 µg/kg FM und damit leicht über der vom Methoxycamalexin mit 1886,2 µg/kg FM. Für das UIS wurde eine Konzentration von 381,9 µg/kg FM ermittelt.

Bei der Kontrolle erfolgte zu 3 Terminen (2 Tage, 8 Tage und 14 Tage) eine quantitative Analyse. 2 Tage nach Versuchsbeginn lag die Konzentration an Camalexins bei 53,2 µg/kg FM. Die Konzentrationen an Methoxycamalexin und an UIS lagen mit 5,6 bzw. 4,6 µg/kg FM sehr niedrig. Nach 8 Tagen war ein allgemeiner Anstieg zu beobachten. Für Camalexin wurde eine Konzentrationen von 184,7 µg/kg FM, für das Methoxycamalexin 137,3 µg/kg FM und für das UIS 10,4 µg/kg FM ermittelt. Nach 14 Tagen wurden Konzentrationen ermittelt, die sich von denen nach 8 Tagen nur geringfügig unterschieden.

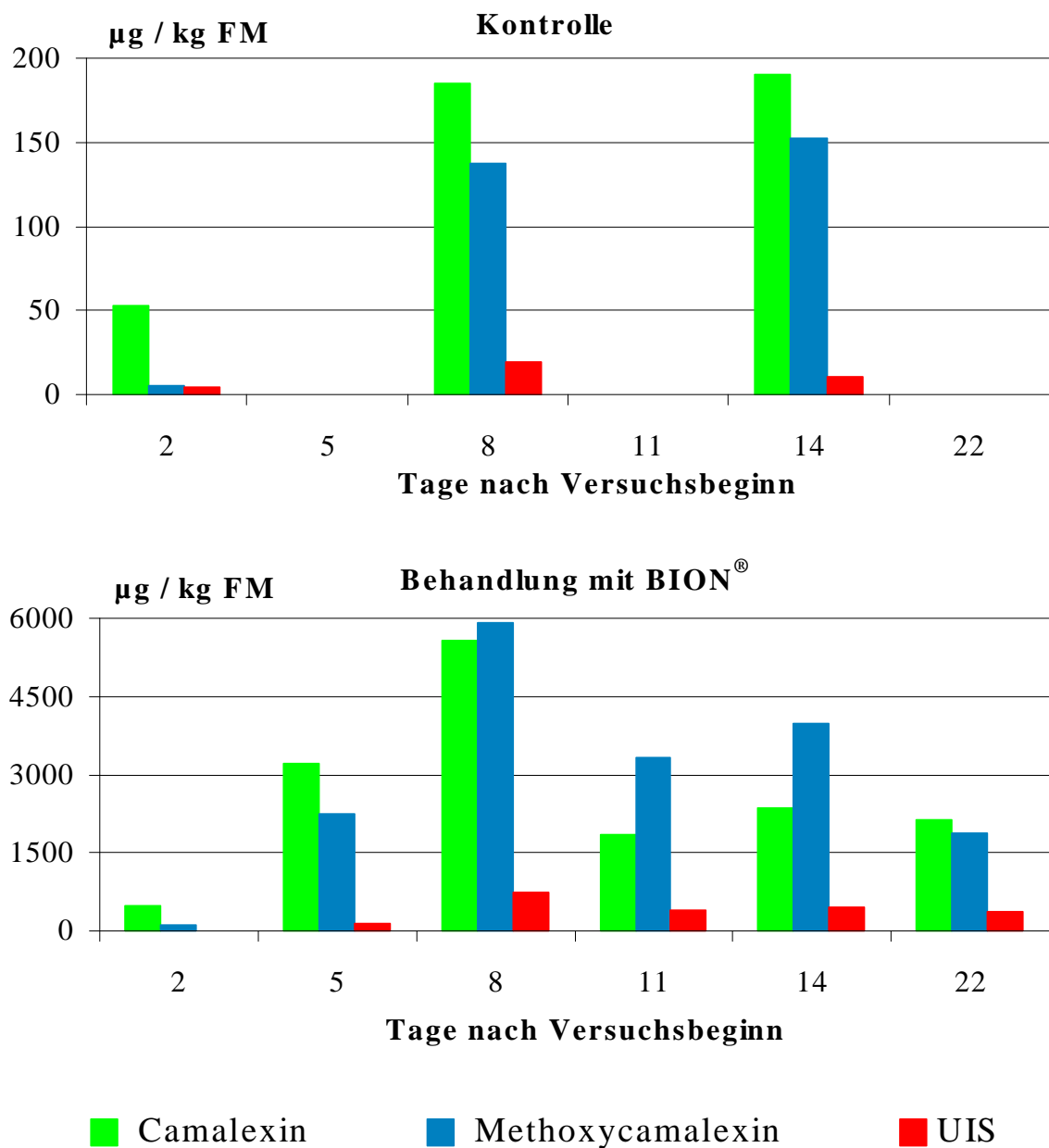


Abb. 18: Akkumulation von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS im Spross von *C. sativa* (Sorte 2) nach Behandlung mit BION® im Vergleich zur mit Leitungswasser behandelten Kontrolle, n=3. GD 5 % Camalexin 884,7 µg/kg FM, GD 5 % Methoxycamalexin 1166,6 µg/kg FM, GD 5 % UIS 177,8 µg/kg FM.

4.4.4 Differenzierung von 13 *C. sativa*-Sorten anhand von unterschiedlichen Phytoalexinkonzentrationen bei drei Temperaturregimen

Diese Untersuchung wurde aufbauend auf den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Untersuchungen bezüglich des optimierten Analysenverfahrens und der Phytoalexinproduktion (Stadien und Akkumulation) durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchung war die Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten aufbauend auf Unterschieden in der Produktion von Phytoalexinen. Auch hier war, wie schon zuvor beschrieben (vgl. 4.4.1), eine Veränderung des Pflanzenwachstums bedingt durch die BION[®]-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass die Wachstumsdepressionen mit steigender Temperatur weniger stark ausgeprägt waren.

Die Präsentation der Ergebnisse wird in zwei Abschnitte untergliedert. Zuerst werden die ermittelten Konzentrationen an Camalexin, Methoxycamalexin und UIS beschrieben. Im zweiten Teil werden verschiedene Differenzierungen der *C. sativa*-Sorten anhand dieser Ergebnisse vorgestellt.

4.4.4.1 Ermittelte Konzentrationen

Bezüglich der quantifizierten Mengen an Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS konnte allgemein festgestellt werden, dass die ermittelten Konzentrationen mit steigender Inkubationstemperatur abnahmen. Es waren signifikante Unterschiede zwischen den Sorten innerhalb der drei Temperaturregime vorhanden. Weiter war das Konzentrationsverhältnis von Camalexin und Methoxycamalexin zwischen den Sorten unterschiedlich. Die Konzentrationen an Camalexin, Methoxycamalexin und UIS wiesen signifikante Unterschiede auf. Die ermittelten Konzentrationen an UIS waren immer deutlich geringer als die Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin.

Die Kontrolle, bei der repräsentativ für alle Sorten die Sorte 13 verwendet wurde, wies mit einer Ausnahme immer die geringsten Konzentrationen auf. Die Kontrolle wurde in dieser Untersuchung nur als Indikator für die erfolgreiche Induktion der LAR angelegt. Demnach können die ermittelten Konzentrationen der Kontrolle nur mit den Konzentrationen der Bion[®]-Varianten der Sorte 13 direkt verglichen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19, Tab. A 28 und Tab. A 29 dargestellt.

Bei dem Temperaturregime von 11/6 °C lag die Konzentration an Camalexin bei den Sorten 1, 2, 11 und 12 zwischen 400 und 500 µg/kg FM im Vergleich zu allen anderen Sorten

signifikant am höchsten. Bei der Sorte 13 wurde eine Konzentration von 390 µg/kg FM ermittelt. Die Sorten 5, 6, 8 und 9 lagen zwischen 220 und 260 µg/kg FM und die Sorten 3, 4, 7 und 10 lagen zwischen 25 und 100 µg/kg FM am niedrigsten. Bei der Sorte 10 und der Kontrolle wurden die signifikant niedrigsten Konzentrationen im Vergleich zu allen anderen Sorten gemessen.

Beim Methoxycamalexin lag die Konzentration der Sorte 13 mit 736,8 µg/kg FM im Vergleich zu allen anderen Sorten signifikant am höchsten. Mit einer Konzentration zwischen 335-680 µg/kg FM waren die Sorten 2, 6, 9, 11 und 12 im mittleren Bereich angesiedelt, während die Sorten 1, 3, 4, 5, 7, 8 und 10 mit Werten zwischen 257 und 102,0 µg/kg FM im Vergleich zu den anderen Sorten signifikant am niedrigsten waren.

Beim UIS lag die Sorte 13 mit über 190 µg/kg Frischgewicht signifikant am höchsten. Die Sorten 2, 9, 11 und 12 lagen mit Konzentrationen zwischen 51-110 µg/kg FM im mittleren Bereich. Mit Konzentrationen zwischen 4–36 µg/kg Frischgewicht lagen die Sorten 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 und die Kontrolle im unteren Bereich und signifikant geringer als die Konzentrationen der Sorten 2, 11 und 13.

Bei dem Temperaturregime von 18/11 °C konnte die Sorte 1 aufgrund eines Versuchsfehlers nicht mit in die Auswertung einbezogen werden, was auf die Gesamtaussage der Untersuchung keinen Einfluss hatte.

Wurden die hier ermittelten Konzentrationen mit denen des Temperaturregimes von 11/6 °C verglichen, so lagen die Werte deutlich niedriger. Die höchste Konzentration an Camalexin betrug 421,7 µg/kg FM bei der Sorte 2. Der höchste Wert beim Methoxycamalexin betrug bei der Sorte 11 509,7 µg/kg FM. Bei dem UIS wurde die höchste Konzentration bei der Sorte 2 mit 68,6 µg/kg FM ermittelt. Zwischen den Sorten traten signifikante Unterschiede auf.

Die Konzentrationen an Camalexin lagen bei den Sorten 2 und 11 mit 421,7 bzw. 331,2 µg/kg FM im Vergleich zu allen anderen Sorten signifikant am höchsten. Die Sorten 4, 5, 8 und 12 lagen mit 100-240 µg/kg FM im mittleren Bereich. Mit einer Konzentration von 2 bis 45 µg/kg FM lagen die Sorten 3, 6, 7, 9, 10 und 13 im unteren Bereich. Anzumerken ist hier, dass die Kontrolle (unbehandelte Pflanzen der Sorte 13) mit 4,4 µg/kg FM eine gering höhere Konzentration an Camalexin aufwies als die mit BION[®] behandelte Variante der Sorte 13 mit 2,0 µg/kg FM.

Beim Methoxycamalexin lagen die Konzentrationen der Sorten 6 und 11 mit 357,8 bzw. 509,7 µg/kg FM im oberen Bereich, wobei die Konzentration der Sorte 11 im Vergleich zu

allen anderen Sorten signifikant am höchsten lag. Die Sorten 2, 5, 12 und 13 lagen mit Konzentrationen von 162 bis 306 µg/kg FM im mittleren Bereich. Die Sorten 3, 4, 7, 8, 10 und die Kontrolle lagen mit Werten zwischen 24 und 96 µg/kg FM im unteren Bereich und signifikant unterschiedlich zu den Konzentrationen der Sorten 6, 9, 11 und 12. Auffällig war hier die Sorte 10 mit der geringsten Konzentration an Methoxycamalexin von 24,6 µg/kg FM.

Beim UIS lagen die Sorten 2, 11 und 12 im oberen Bereich mit Konzentrationen von 41,1 bis 68,6 µg/kg FM, wobei die Sorten 2 und 11 im Vergleich zu allen anderen Sorten die signifikant höchsten Werte aufwiesen. Die Sorten 5, 6, 9 und 13 lagen im mittleren Bereich mit einer Konzentration von 16-31 µg/kg FM. Mit Werten zwischen 1 und 10,3 µg/kg lagen die Sorten 4, 7, 8, 10 und die Kontrolle am niedrigsten.

Bei dem Temperaturregime von 24/16 °C waren die Konzentrationen an Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS im Vergleich zu den anderen Temperaturregimen am niedrigsten. Beim Camalexin und beim UIS wies die Sorte 2 die höchsten Konzentrationen mit 99,6 bzw. 22,5 µg/kg FM auf. Beim Methoxycamalexin wurde der höchste Wert bei der Sorte 13 mit 124 µg/kg FM gemessen. In der Kontrolle konnten die drei Substanzen nicht nachgewiesen werden.

Beim Camalexin lagen die Sorten 2 und 12 mit 99,6 bzw. 80,8 µg/kg FM im oberen Bereich, wobei der Wert der Sorte 2 im Vergleich zu allen anderen Sorten signifikant am höchsten war. Im mittlerem Bereich lagen die Sorten 1, 7, und 10 mit Konzentrationen zwischen 31 und 46 µg/kg FM. Im unteren Bereich waren die Sorten 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13 und die Kontrolle mit Werten zwischen n.n. und 5 µg/kg FM angesiedelt und somit signifikant unterschiedlich zu den Werten der Sorten 2 und 12.

Beim Methoxycamalexin wurden für die Sorten 10, 12 und 13 Konzentrationen zwischen 88 bis 124 µg/kg FM ermittelt. Die Konzentration der Sorte 13 war mit 124 µg/kg FM im Vergleich zu allen anderen Sorten signifikant am höchsten. Mit Konzentrationen zwischen 36 und 68 µg/kg FM lagen die Sorten 5, 6, 7, 9 und 11 im mittleren Bereich. Im unteren Bereich lagen die Sorten 1, 2, 3, 4, und 8 mit Werten zwischen 5 und 14 µg/kg FM.

Beim UIS lag die Sorte 2 mit einer Konzentration von 22,5 µg/kg FM signifikant am höchsten. Die Werte der anderen Sorten lagen zwischen nicht detektierbar und 10 µg/kg FM.

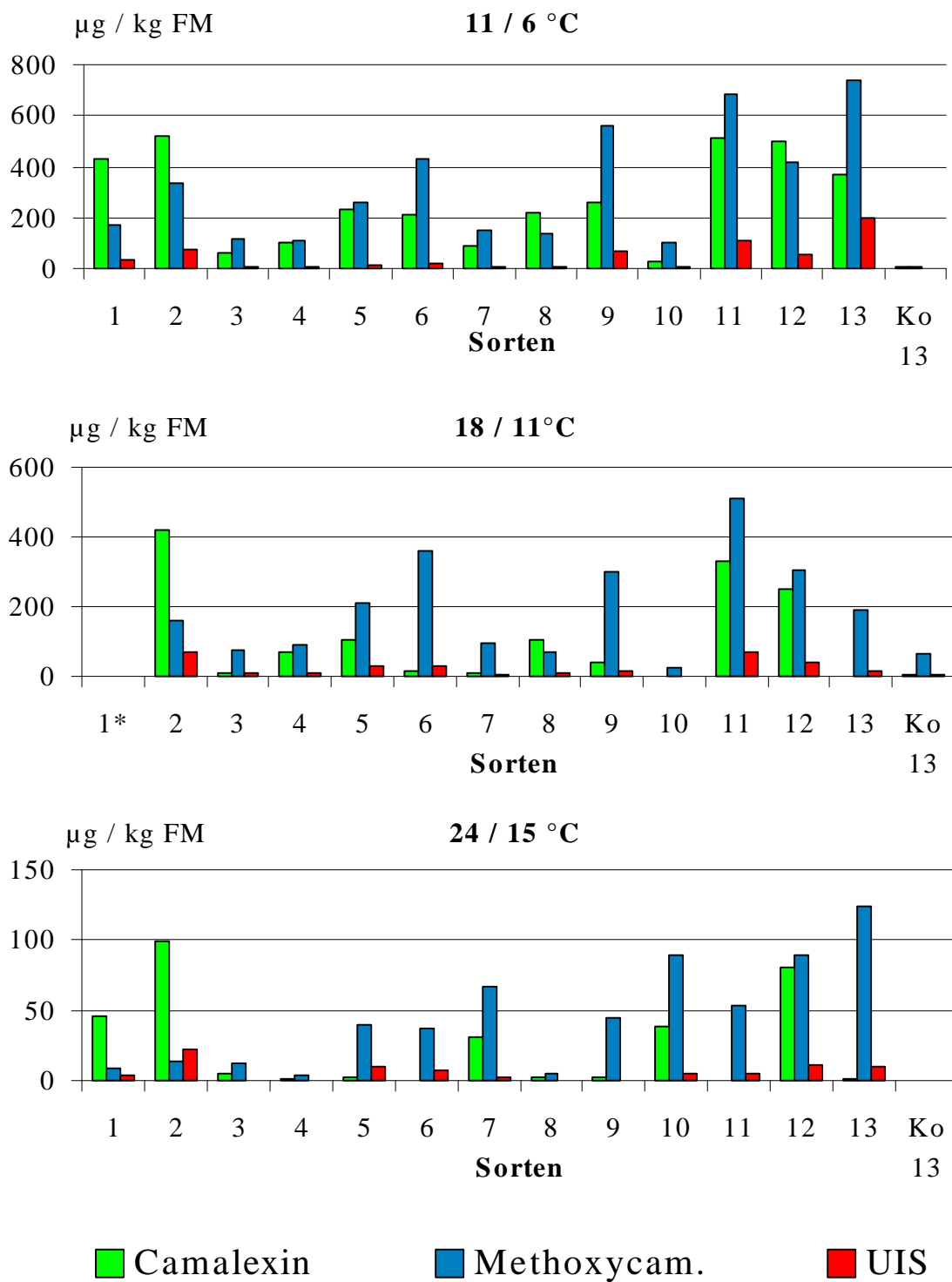


Abb. 19: Ergebnisse der Quantifizierung von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS von 13 *C. sativa*-Sorten, die bei 3 verschiedenen Temperaturregimen inkubiert wurden. Ko = Kontrolle der Sorte 13. *Die Sorte 1 konnte aufgrund eines Versuchsfehles nicht quantifiziert werden, n=3.

4.4.4.2 Differenzierung der 13 Sorten anhand der ermittelten Phytoalexin-Konzentrationen

Bei den verschiedenen Möglichkeiten der Differenzierung der *C. sativa*-Sorten, wurde der UIS nicht mitberücksichtigt, da die Konzentrationen sehr gering waren und entsprechend gering auch die Unterschiede zwischen den Sorten. Weiter wurde die Priorität auf die Phytoalexine gelegt und das UIS war kein Phytoalexin. Eine Differenzierung erfolgte anhand der ermittelten Phytoalexinkonzentration und anhand der prozentualen Verhältnisse von Camalexin und Methoxycamalexin unter Berücksichtigung der verschiedenen Temperaturregime.

a) Differenzierung anhand der ermittelten Phytoalexinkonzentrationen

Anhand der ermittelten Phytoalexinkonzentrationen wurden drei verschiedene Sortendifferenzierungen vorgenommen. Berücksichtigt wurden die Konzentration an Camalexin und Methoxycamalexin je Temperaturregime und Sorte, die Summe der Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin je Temperaturregime und die Summe der Phytoalexine der drei Temperaturregime der 13 Sorten.

b) Differenzierung anhand der Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin je Temperaturregime und Sorte

Hier ergab sich eine sehr engmaschige Differenzierung, die in Tab. 15 dargestellt ist.

Die Sorten 1 und 2 wurde beim Camalexin zu allen Temperaturregimen in die hohe Kategorie eingeordnet. Beim Methoxycamalexin wurden diese Sorten mit steigender Temperatur zuerst in die zweite und dritte und dann in die vierte Kategorie eingeordnet.

Die Sorten 3 und 4 wurden bei allen Temperaturregimen in die Kategorien drei und vier eingeordnet.

Die Sorten 5 und 6 wurden bei allen Temperaturregimen in der zweiten und dritten Kategorie eingeordnet.

Die Sorte 7 war bei dem Temperaturregime 24/16 °C in den Kategorie zwei und drei angesiedelt, ansonsten in den Kategorien drei und vier.

Die Sorte 8 wurde jeweils beim Camalexin bei den Temperaturregimen 11/6 und 18/11 °C in die zweite Kategorie eingeordnet, ansonsten in den Kategorien drei und vier.

Die Sorte 9 wurde beim Camalexin in die Kategorien zwei und drei, beim Methoxycamalexin in die Kategorien eins und zwei eingeordnet.

Die Sorte 10 lag bei dem Temperaturregime von 24/16 °C in der Kategorie zwei, bei den kühleren Temperaturregimen wurde die Sorte 10 in die Kategorien drei und vier eingeordnet.

Die Sorte 11 wurde bei dem Temperaturregime 11/6 °C und 18/11 °C sowohl beim Camalexin als auch beim Methoxycamalexin in die Kategorie eins eingeordnet.

Die Sorte 12 wurde bei allen Temperaturregimen beim Camalexin in der ersten Kategorie, beim Methoxycamalexin in der zweiten Kategorie eingeordnet.

Die Sorte 13 lag bei dem Temperaturregime von 11/6 °C beim Camalexin und beim Methoxycamalexin in der Kategorie eins. Beim Temperaturregime 18/11 °C wurde die Sorte 13 bei beiden Phytoalexinen in die Kategorie drei eingeordnet. Bei dem Temperaturregime 24/16 °C wurde die Sorte 13 beim Camalexin in die Kategorie drei und beim Methoxycamalexin in die Kategorie eins eingeordnet.

Tab. 15: Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten anhand der ermittelten Konzentrationen an Camalexin bzw. Methoxycamalexin zu drei Temperaturregimen.

	Kategorie 1 hoch	Kategorie 2 mittel	Kategorie 3 gering	Kategorie 4 sehr gering
11/6 °C, Camalexin				
Bereich [µg/kg FM]	520 – 370	260 - 200	100 - 20	n.v.
Sorten	1, 2, 11, 12, 13	5, 6, 8, 9	3, 4, 7, 10	n.v.
11/6 °C Methoxycamalexin				
Bereich [µg/kg FM]	736 - 562	416 - 335	257 - 136	120 - 102
Sorten	9, 11, 13	2, 6, 12	1, 5, 7, 8	3, 4, 10
18/11 °C, Camalexin				
Bereich [µg/kg FM]	421 - 248	107 - 71	42 - 2	n.v.
Sorten	2, 11, 12	4, 5, 8	3, 6, 7, 9, 13, 10	n.v.
18/11 °C Methoxycamalexin				
Bereich [µg/kg FM]	509	357 - 299	209- 160	69 - 25
Sorten	11	6, 9, 12	2, 5, 13	3, 4, 7, 8, 10
24/16 °C, Camalexin				
Bereich [µg/kg FM]	100 - 80	45 - 31	5 – n.n.	n.v.
Sorten	2, 12	1, 7, 10	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13	n.v.
24/16 °C, Methoxycamalexin				
Bereich [µg/kg FM]	124	90 - 67	53 - 36	14 - 3
Sorten	13	7, 10, 12	5, 6, 9, 11	1, 2, 3, 4, 8

Für den Bereich ist jeweils die höchste und die geringste Konzentration (gerundet) der jeweiligen Kategorie angegeben. Die Zuordnung der Bereiche zu den jeweiligen Kategorien erfolgte willkürlich. Bei dem Temperaturregime von 18/11 °C wurde die Sorte 1 nicht berücksichtigt. n.v.= nicht vorhanden, n.n.= nicht nachweisbar

Differenzierung anhand der Summe der Phytoalexine (Camalexin und Methoxycamalexin) je Temperaturregime.

Hier wurde die Summe der gemessenen Phytoalexinkonzentrationen (Camalexin und Methoxycamalexin) je Temperaturregime jeder Sorte ermittelt (Abb. 20 und Tab. A 27).

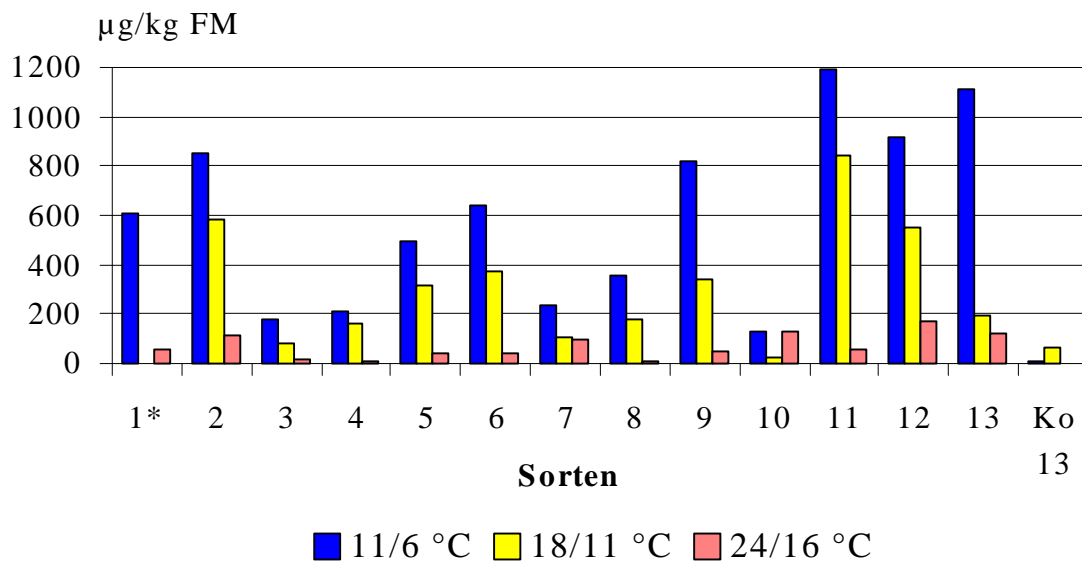


Abb. 20: Konzentrationen an Phytoalexin (Summe an Camalexin und Methoxycamalexin) von 13 *C. sativa*-Sorten zu drei unterschiedlichen Temperaturregimen nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION®. Ko13 = Kontrolle der Sorte 13, *Die Sorte 1 wurde aufgrund eines Versuchsfehlers bei dem Temperaturregime 18/11 °C bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt.

Erfolgte die Differenzierung anhand der Summe der ermittelten Phytoalexinkonzentration (Summe Camalexin und Methoxycamalexin) so ergaben sich für die drei Temperaturregime die in Tab. 16 dargestellte Differenzierung der Sorten. Die Bereiche wurden den Kategorien willkürlich zugeordnet.

Bei dem Temperaturregime von 11/6 °C beinhaltet die Kategorie 1 die Sorten 11 und 13, die Kategorie 2 die Sorten 2, 9, 12, die Kategorie 3 die Sorten 1, 5, 6 und die Kategorie 4 die Sorten 3, 4, 7, 8 und 10.

Bei dem Temperaturregime von 18/11 °C beinhaltet die Kategorie 1 die Sorten 2, 11 und 12, die Kategorie 2 die Sorten 5, 6 und 9, die Kategorie 3 die Sorten 3, 4, 7, 8 und 13 und die Kategorie 4 die Sorte 10. Die Sorte 1 wurde nicht berücksichtigt.

Bei dem Temperaturregime von 24 / 16 °C beinhaltet die Kategorie 1 die Sorten 2, 10, 12 und 13, die Kategorie 2 die Sorten 1, 5, 6, 9 und 11 und die Kategorie 3 die Sorten 3, 4 und 7.

Bezüglich der Sorte 10 ist anzumerken, dass die Konzentrationen an Phytoalexinen (Summe Camalexin und Methoxycamalexin) bei dem Temperaturregime von 24/16 °C auf gleichen Niveau mit den Sorten 2, 12, und 13 lag. Weiter bildete die Sorte 10 bezüglich der Produktion

an Phytoalexinen (Summe von Camalexin und Methoxycamalexin) eine Ausnahme in der Weise, dass bei dem kühlen Temperaturregime von 11/6 °C und dem warmen 24/16 °C jeweils eine Konzentration von 127 µg/kg FM Phytoalexin ermittelt wurde. Bei dem mittleren Temperaturregime (16/11 °C) lag die Konzentration mit 9,5 µg/kg FM relativ niedrig.

Tab. 16: Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten anhand der Summe der Phytoalexinkonzentrationen (Summe Camalexin und Methoxycamalexin je Temperaturregime und Sorte.

	Kategorie 1 hoch	Kategorie 2 mittel	Kategorie 3 gering	Kategorie 4 sehr gering
11/6 °C				
Bereich [µg/kg FM]	>1100	900-800	650-490	360-120
Sorten	11, 13	2, 9, 12	1, 5, 6	3, 4, 7, 8, 10
18/11 °C				
Bereich [µg/kg FM]	850-550	400-340	200-80	27
Sorten	2, 11, 12	5, 6, 9	3, 4, 7, 8, 13	10
24/16 °C				
Bereich [µg/kg FM]	180-130	60-44	< 20	n.v.
Sorten	2, 10, 12, 13	1, 5, 6, 9, 11	3, 4, 7, 8	n.v.

Für den Bereich ist jeweils die höchste und die geringste Konzentration (gerundet) der jeweiligen Kategorie angegeben. Die Zuordnung der Bereiche zu den jeweiligen Kategorien erfolgte willkürlich. Bei dem Temperaturregime von 18/11 °C wurde die Sorte 1 nicht berücksichtigt. n.v.= nicht vorhanden

Differenzierung anhand der Summe der Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin über alle Temperaturregime je Sorte.

Hier wurde die Summe der gemessenen Phytoalexinkonzentration jeder Sorte über die Temperaturregime ermittelt (Abb. 21). Erfolgte die Differenzierung anhand der Summe der Phytoalexinkonzentrationen aller Temperaturregime je Sorte, so ergab sich die in der Tab. 17 dargestellte Differenzierung der 13 Sorten.

In der Kategorie 1 wurden die Sorten 2, 11, 12, und 13 zusammengefasst. In der Kategorie 2 befanden sich die Sorten 5, 6 und 9 und in der Kategorie 3 die Sorten 3, 4 und 10. Die Sorte 1 wurde bei der Differenzierung nicht mit berücksichtigt.

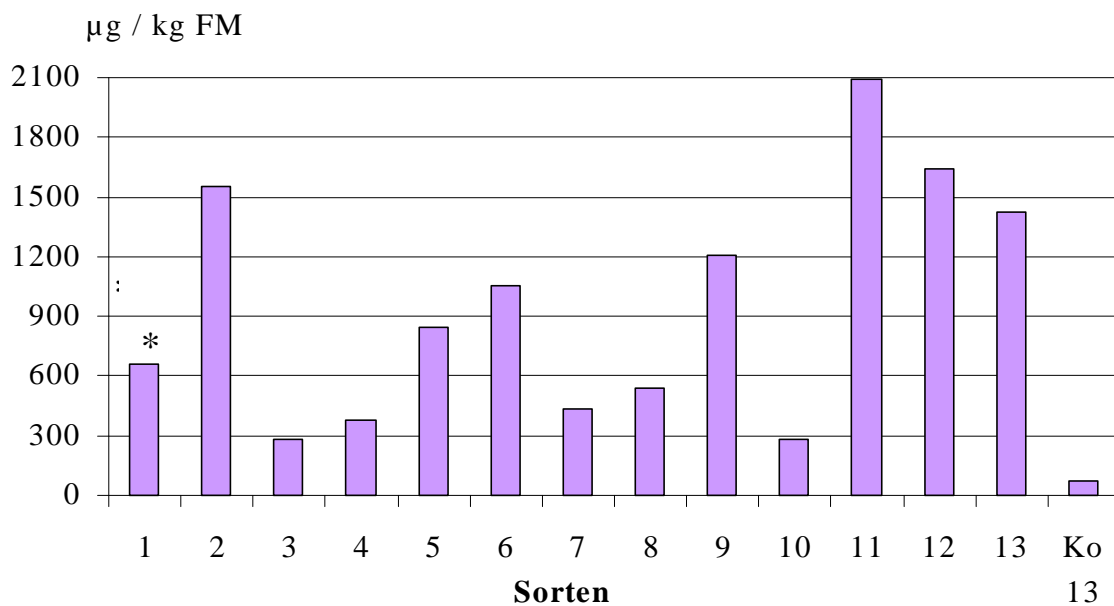


Abb. 21: Konzentrationen an Phytoalexinen (Summe von Camalexin und Methoxycamalexin der drei Temperaturregime) von 13 *C. sativa*-Sorten nach Behandlung mit BION®. Ko13 = Kontrolle der Sorte 13, *Die Werte der Sorte 1 für das Temperaturregime 18/11 °C wurde aufgrund eines Versuchsfehlers nicht berücksichtigt.

Tab. 17: Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten anhand der Summe der Phytoalexinkonzentration (Camalexin und Methoxycamalexin) aller Temperaturregime je Sorte.

	Kategorie 1 hoch	Kategorie 2 mittel	Kategorie 3 gering
Bereich [µg/kg FM]	2100-1400	1200-850	550-290
Sorten	2, 11, 12, 13	5, 6, 9	3, 4, 7, 8, 10

Für den Bereich ist jeweils die höchste und die geringste Konzentration (gerundet) der jeweiligen Kategorie angegeben. Die Zuordnung der Bereiche zu den jeweiligen Kategorien erfolgte willkürlich. Die Sorte 1 wurde nicht berücksichtigt.

b) Differenzierung anhand der prozentualen Verhältnisse von Camalexin und Methoxycamalexin

Um das Verhältnis von Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS betrachten zu können, wurden die jeweiligen prozentualen Anteile in Bezug zur Gesamtproduktion berechnet (Summe von Camalexin, Methoxycamalexin und UTS wurde als 100 % gesetzt).

In Abb. 22 und Tab. A 31 sind die prozentualen Anteile an Camalexin, Methoxycamalexin und UIS in Bezug zur Gesamtproduktion der 13 *C. sativa*-Sorten für jedes Temperaturregime dargestellt. In Tab. A 30 sind die prozentualen Anteile der Summe von Camalexin und Methoxycamalexin dargestellt.

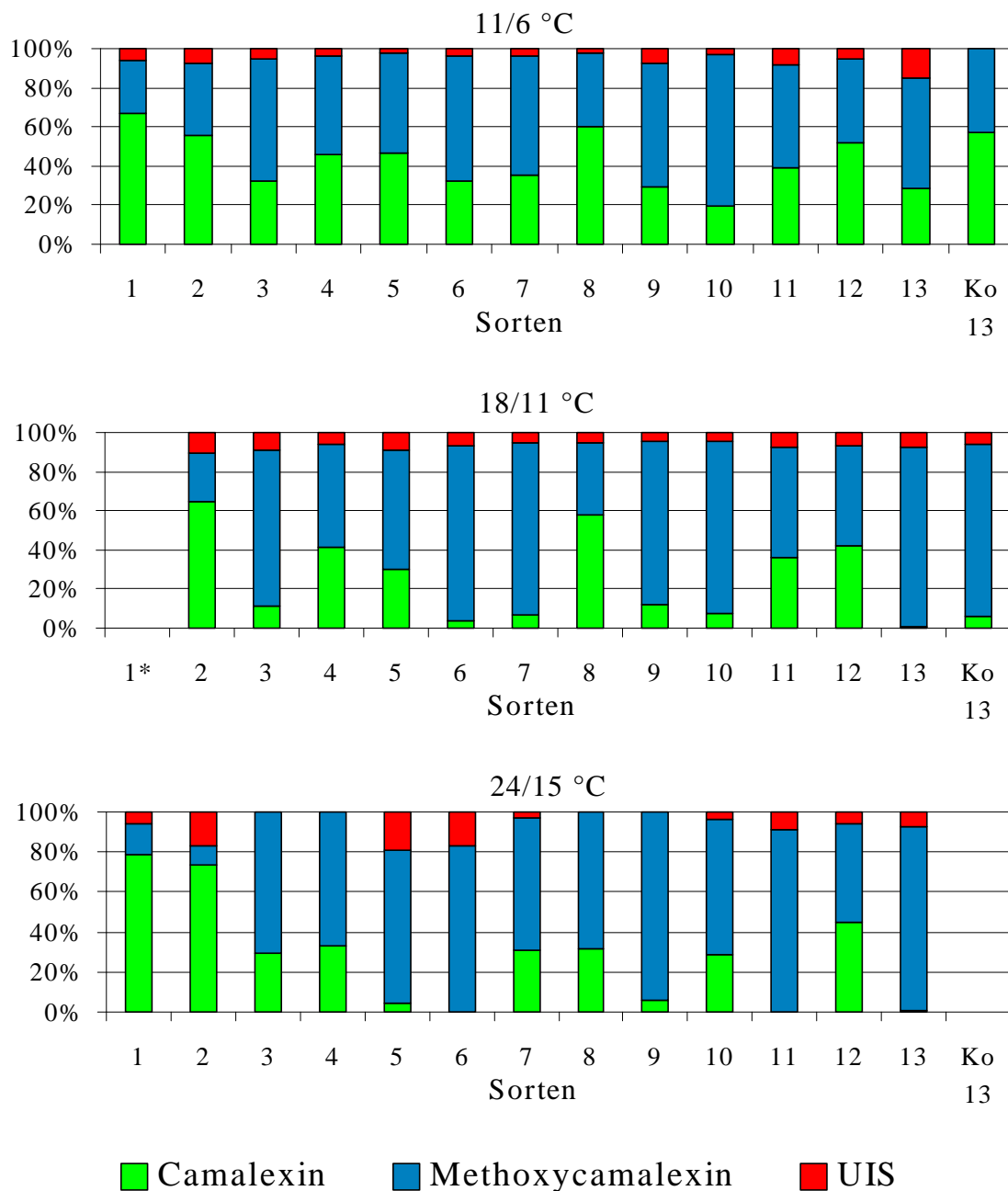


Abb. 22: Prozentuale Anteile an Camalexin, Methoxycamalexin und UIS von 13 *C. sativa*-Sorten bei drei unterschiedlichen Temperaturregimen nach Behandlung mit BION®. * Die Sorte 1 wurde aufgrund eines Versuchsfehlers nicht berücksichtigt, Ko = Kontrolle Sorte 13.

Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile an Camalexin, Methoxycamalexin und UIS für jedes Temperaturregime traten Unterschiede zwischen den analysierten Substanzen, zwischen den Sorten und zwischen den Temperaturregimen auf. Der Anteil an UIS war bei allen Sorten und Temperaturen am niedrigsten und lag zwischen n.n. und 19,5 %. Beim Camalexin und Methoxycamalexin wiesen die prozentualen Anteile je nach Sorte und Temperatur große Unterschiede auf. Die 13 *C. sativa* Sorten ließen sich anhand der prozentualen Verhältnisse in 4 Kategorien einteilen (Tab. 18):

Kategorie 1: Der Camalexinanteil war über alle Temperaturregime höher als der Methoxycamalexinanteil

Bei den Sorten 1 und 2 war der Camalexinanteil bei allen Temperaturregimen mit über 50 % höher als der Methoxycamalexinanteil, wobei bei beiden Sorten eine Zunahme des Camalexinanteils auf über 70 % bei dem Temperaturregime von 24/16 °C beobachtet werden konnte.

Kategorie 2: Der Methoxycamalexinanteil war über alle Temperaturregime höher als der Camalexinanteil

Die Sorten 5, 6, 9 und 13 hatten beim Temperaturregime von 11/6 °C einen höheren Anteil an Methoxycamalexin im Vergleich zum Camalexin. Mit steigender Temperatur nahm der Anteil an Methoxycamalexin zu und der Camalexinanteil ab. Bei der Sorte 6 konnte bei dem Temperaturregime von 24/16 °C kein Camalexin mehr detektiert werden. Der Methoxycamalexinanteil lag hier bei 82,8 %. Bei der Sorte 13 konnte ab dem mittleren Temperaturregime kein Camalexin mehr detektiert werden, der Methoxycamalexinanteil lag bei dem mittleren Temperaturregime bei 91,2 %, bei dem kalten Temperaturregime bei 92,3 %.

Die Sorten 3, 7 und 10 zeigten bei dem Temperaturregime 11/6 °C einen höheren Anteil an Methoxycamalexin (63,2, 60,4 bzw. 77,5 %) im Vergleich zum Camalexin (32,4, 35,6 bzw. 19,3 %). Beim Temperaturregime von 18/11 °C stieg der Methoxycamalexinanteil (79,2, 87,9 bzw. 88,3 %) und verringerte sich der Camalexinanteil (11,4, 7,1 bzw. 7,5 %). Bei dem Temperaturregime von 24/16 °C verringerte sich der Methoxycamalexinanteil wieder (70,6, 66,3 bzw. 67,6 %) wobei der Camalexinanteil wieder erhöht war (29,4, 31,1 bzw. 29,0 %).

Bei der Sorte 11 lag der Methoxycamalexinanteil bei den Temperaturregime von 11/6 °C und 18/11 °C mit einem Anteil von 52,3 % bzw. 56,1 % höher als der Camalexinanteil mit 39,3 %

bzw. 36,5 %. Beim Temperaturregime von 24/16 °C lag der Methoxycamalexinanteil bei 91,2 %, Camalexin war hier nicht vorhanden.

Kategorie 3: Bei den Temperaturregime 11/6 und 18/11 °C war der Camalexinanteil höher, bei dem Temperaturregime 24/16 °C war der Methoxycamalexinanteil höherer

Die Sorte 8 wies bei den Temperaturregime von 11/6 °C und 18/11°C einen Anteil von 60,0 bzw. 58,0 % Camalexin auf. Beim Temperaturregime von 24/16 °C sank der Camalexinanteil auf 31,1 % und der Methoxycamalexinanteil stieg auf 68,6 %.

Kategorie 4: Camalexinanteil und Methoxycamalexinanteil waren bei allen Temperaturregimen mehr oder weniger gleich.

Bei den Sorten 4 und 12 war der Camalexin- und der Methoxycamalexinanteil bei allen Temperaturregime mehr oder weniger gleich, wobei der Methoxycamalexinanteil der Sorte 4 bei dem Temperaturregime 24/16 °C auf 66,7 % erhöht war und sich somit der Camalexinanteil auf 43,3 % verringerte. Das UIS war hier nicht mehr detektierbar.

Tab. 18: Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten anhand der prozentualen Verhältnisse von Camalexin zu Methoxycamalexin unter Berücksichtigung der Temperaturregime je Sorte.

	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4
Sorten	*(1), 2	3, 5, 6,7, 9, 10, 13	8	4, 12

* Bei der Differenzierung wurde das Temperaturregime 18/11 °C nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Mit dem optimierten Analysenverfahren konnten Camalexin, Methoxycamalexin und UIS aus frischem Pflanzenmaterial von *C. sativa* in Serienuntersuchungen gleichzeitig analysiert werden.

Zur Induktion und anschließender Analyse der Phytoalexine von *C. sativa* erwies sich das Rosettenstadium aufgrund der hohen Phytoalexinkonzentrationen als günstig. Insofern wurde dieses Stadium für die Sortendifferenzierung verwendet.

Eine Differenzierung anhand der Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin und anhand der jeweiligen prozentualen Verteilung unter Berücksichtigung der Temperatur konnte durchgeführt werden. Bei der Differenzierung anhand der ermittelten Konzentrationen wurden die höchsten Konzentrationen an Phytoalexinen bei den Sorten 1, 2, 9, 11, 12 und 13 gefunden. Die Sorten 1 und 2 fielen durch ihren hohen Gehalt an Camalexin auf. Die Sorte 10 lag bei den kühleren Temperaturregimen immer in der geringen bis sehr geringen Kategorie, bei dem Temperaturregime von 24/16 °C lag die Sorte 10 dann in der hohen bis mittleren

Kategorie. Bei der Differenzierung anhand der prozentualen Verteilung fielen auch die Sorten 1 und 2 heraus. Die Sorten 4 und 12 fielen durch die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Phytoalexine über alle Temperaturregime auf. Insofern können zwischen den beiden vorgenommenen Differenzierungen Parallelen und Unterschiede festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Induktion der Phytoalexinproduktion mit BION[®] und anderen Elicitoren

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, bei denen verschiedene Induktoren zur Induktion der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* vergleichend betrachtet wurden.

Im ersten Versuch wurde die prinzipielle Eignung des Pflanzenaktivators BION[®] zur Induktion der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* getestet, da BION[®] zur Induktion der Phytoalexinproduktion an *C. sativa* noch nicht eingesetzt wurde.

Hierfür wurde die Induzierbarkeit der Phytoalexinproduktion durch BION[®] und *A. brassicae*-Sporensuspension anhand entsprechender Tests (Objektträgertests, TLC-Tests) verglichen.

Nach Browne et al. (1991) kann mit *A. brassicae* die Produktion von Camalexin und Methoxycamalexin induziert werden. Die allgemeine Eignung des Pflanzenaktivators BION[®] zur Induktion der Pflanzenabwehr und somit der Phytoalexinproduktion wurde bereits anhand von Untersuchungen für verschiedene Kulturpflanzen unterschiedlicher Gattungen bestätigt (Métraux et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Görlach et al., 1996 und Lawton et al., 1996). Es sollte geprüft werden, ob die Phytoalexinproduktion speziell bei *C. sativa* mit BION[®] induziert werden kann. Es wurden mit Hilfe des Objektträgertests keine Unterschiede zwischen der induzierten Phytoalexinproduktion mit BION[®] bzw. *A. brassicae*-Sporensuspension festgestellt. Bei dem Nachweis von Camalexin und Methoxycamalexin mittels TLC konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Die nicht eindeutigen Ergebnisse der TLC-Tests können damit begründet werden, dass die eingesetzte Menge der zu testenden Fraktion 30-50 µl betrug, während beim Objektträgertest 200 µl eingesetzt wurden. Ein Aufkonzentrieren der Fraktion wäre nach einer Aufreinigung grundsätzlich möglich gewesen, war aber aufgrund der Ergebnisse des Objektträgertests nicht notwendig. Demnach konnte mit BION[®] die Phytoalexinproduktion in *C. sativa* induziert werden.

In einem zweiten Versuch wurden Induktoren verwendet, die zur Induktion des Abwehrsystems bei verschiedenen Pflanzen u.a. auch an Pflanzen aus der Familie der *Brassicaceae* verwendet wurden (Rouxel et al., 1991; Tsuji et al., 1992). Demnach war davon auszugehen, dass sie die Phytoalexinproduktion auch bei *C. sativa* induzieren können.

Zum Zeitpunkt, als die Untersuchung durchgeführt wurde, lagen noch keine Ergebnisse bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* vor. Als Arbeitshypothese wurde von einem proportionalen Zusammenhang zwischen Temperatur und Phytoalexinproduktion ausgegangen. Demzufolge wurden die Pflanzen bei sommerlichen Temperaturen im Gewächshaus inkubiert und für die Versuchsdurchführung nicht in eine temperierte Klimakammer überführt.

In dem Versuch Differenzierung der *C. sativa*-Sorten bei verschiedenen Temperaturen (vgl. 4.4.4) wurde festgestellt, dass der Zusammenhang zwischen Temperatur und Phytoalexinproduktion umgekehrt proportional ist. Vor diesem Hintergrund werden die geringen Konzentrationen an Phytoalexin, welche in diesem Versuch ermittelt wurden, verständlich.

Die Konzentration an Methoxycamalexin lag bei den mit AgNO_3 , BION[®] bzw. *B. cinerea* behandelten Varianten nicht unterschiedlich zur Kontrolle. Nur beim CuCl_2 waren die Werte signifikant höher als die der Kontrolle. Werden die Pflanzen der verschiedenen Varianten miteinander verglichen, so waren die mit CuCl_2 behandelten Pflanzen erheblich kleiner als die Pflanzen der anderen Varianten (vgl. Abb. 14). Zusätzlich war ein Großteil der Blätter welk und wies eine hohe Anzahl an Chlorosen auf.

Bei dieser Untersuchung waren, möglicherweise aufgrund der hohen Temperaturen, nur Unterschiede zwischen CuCl_2 und den anderen verwendeten Elicitoren zu beobachten. Es wird aber deutlich, dass die Phytoalexinproduktion entscheidend von dem verwendeten Elicitor abhängig ist. Weiter traten Unterschiede je nach verwendetem Elicitor bezüglich des Pflanzenzustandes auf. So wiesen die mit CuCl_2 behandelten Pflanzen die stärksten Schäden auf. Nach Bailey et al. (1982) kann durch Verletzungen die Phytoalexinproduktion in Pflanze induziert werden. So wird die Phytoalexinproduktion im Fall von CuCl_2 wahrscheinlich durch die entstandene Schädigung an den Pflanzen (oxidativer Stress) verursacht, im Gegensatz zu BION[®] und dem Pathogen *B. cinerea*, die als Elicitoren direkt die Abwehrkaskade induzieren (Bailey, et al., 1982 und Leadbeater et al., 1997). Bei AgNO_3 war anscheinend der Grad der Schädigung der Pflanzen zu gering, um die Phytoalexinproduktion zu induzieren.

Inwieweit *C. sativa* bezüglich der Phytoalexinproduktion auf verschiedene Elicitoren nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ reagiert, müsste in weiten Untersuchungen geklärt werden.

Werden die Elicitoren bezüglich der späteren Verwendung zur Induktion der Phytoalexinproduktion in Untersuchungen an *C. sativa* miteinander verglichen, so wurde die prinzipielle Anwendbarkeit von CuCl_2 , BION[®] und *A. brassicae* in dieser Untersuchung nachgewiesen. AgNO_3 und *B. cinerea* kann mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Induktionswirkung unterstellt werden, jedoch müssten noch Untersuchungen zur Bestätigung durchgeführt werden. Bei der Induktion der Phytoalexinproduktion mit CuCl_2 AgNO_3 wurden die *C. sativa*-Pflanzen immer dauerhaft geschädigt und somit konnte keine Unterscheidung zwischen Wachstumseffekten aufgrund der Stresswirkungen des Elicitors (oxidativer Stress) und abwehrbedingten Wachstumsveränderungen gemacht werden. Mit den beiden Pathogenen konnte eine der natürlichen Situation sehr nahekommende Induktion der Phytoalexinproduktion erfolgen. Nachteilig war hier der Erhalt von sporulierendem Pilzmaterial, was bei einer regelmäßigen Durchführung von Versuchen mit einem gewissen Maß an Ausstattung und Arbeitsaufwand verbunden ist. Weiter können sich Pilzstämme bei Lagerung auf Nährmedium in ihren Eigenschaften verändern. Hier besteht die Gefahr, dass sich die Reaktion der Pflanzen auf den Pilzstamm ebenfalls verändert. Werden in Untersuchungen unterschiedliche Pilzstämme verwendet, so muss bei einer vergleichenden Betrachtung der Analysenergebnisse zuvor die Vergleichbarkeit der Pilzstämme sichergestellt werden. Wurde der Pflanzenaktivator BION[®] verwendet, so konnten keine direkten Schäden an den Pflanzen, hervorgerufen durch oxidativen Stress, beobachtet werden. Das handelsübliche BION[®] liegt als Granulat vor, welches einfach in Wasser gelöst werden kann und über mehrere Jahre haltbar ist. Als Alternative zu BION[®] hätte noch Salicylsäure oder INA (Dudler, 1997) verwendet werden können. Der Vorteil von BION[®] besteht in der einfachen Anwendbarkeit und seiner besseren Pflanzenverträglichkeit (Dudler, 1997). Da BION[®] in der pflanzenbaulichen Praxis eingesetzt wird, konnten hier erste Hinweise für eine Anwendung bei einem zukünftigen Anbau von *C. sativa* gesammelt werden. Demnach wurde für alle Untersuchungen, bei denen die Phytoalexinproduktion induziert wurde, BION[®] verwendet.

5.2 Optimierung eines Analysenverfahrens zur Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin

Zur Entwicklung der Probenvorbereitung wurde zuerst anhand verschiedener Extraktionsmethoden mit Methanol die Extraktion der Phytoalexine aus Pflanzenmaterial von

C. sativa und die Aufreinigung von Pflanzenmaterial anhand verschiedener Festphasen optimiert. Hieraus resultierte schließlich die Probenvorbereitung mit der thermischen Extraktion in Methanol und die Festphasenextraktion mit C-18 Material.

Bei der Entwicklung der Extraktionsmethode wurden neben dem thermischen Verfahren noch zwei weitere Verfahren auf ihre Eignung getestet. Werden die Verfahren miteinander verglichen, so war die thermische Extraktion am effektivsten. Interessant war, dass sich die Effektivität der beiden Extraktionsverfahren, Extraktion mit Methanol bzw. Isopropanol durch Waschen des Pflanzenmaterials von dem Extraktionsverfahren, bei dem das Pflanzenmaterial in Flüssigstickstoff zermörsert und dann mit Methanol extrahiert wurde, nicht unterschieden. Demnach führte ein bloßes mechanisches Zerstören der Pflanzenzellen zu keiner Erhöhung der extrahierten Menge an Camalexin und Methoxycamalexin aus Pflanzenmaterial von *C. sativa*. Die besseren Rückgewinnungsraten bei der thermischen Extraktion können mit der Veränderung der Löslichkeitsgleichgewichte bedingt durch die Temperaturerhöhung begründet werden. Weiter ist es wahrscheinlich, dass die zu extrahierenden Phytoalexine von Substanzen bzw. Strukturen der Pflanzenmatrix zurückgehalten werden. Durch das Erhitzen wurden diese Substanzen bzw. Strukturen zerstört oder so verändert, dass die zu extrahierenden Phytoalexine nicht mehr zurückgehalten wurden. Als mögliche Strukturen können Pflanzenbestandteile wie die Kutikula, Zellwand, Zellmembran oder Membranproteine angeführt werden. Da Camalexin und Methoxycamalexin an solchen Strukturen Substanzen adsorbieren können, ist dies vorstellbar (Kollmann et al., 1989).

Von Kollmann et al. (1989) wurde eine thermische Extraktion mit Methanol beschrieben, bei der das Pflanzenmaterial 15 min bei 80 °C inkubiert wurde. Diese Methode wurde von Glazebrook et al. (1997) bei der Extraktion von Camalexin aus *Arabidopsis*-Mutanten angewandt. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass das Camalexin bei Temperaturen von 80 °C nicht in größerem Maße zerstört wird. Es war jedoch nicht auszuschließen, dass das Camalexin und Methoxycamalexin bei diesen Temperaturen unter dem Einfluss von Mikrowellen zerstört werden könnte. Durch eine Mikrowellenbehandlung von Camalexinstandard über 5 Minuten in mehreren Versuchen konnte eine Zerstörung ausgeschlossen werden. Für Methoxycamalexin wurde dieser Nachweis aufgrund fehlender Reinsubstanz mit methoxycamalexinhaltigen Fraktionen bekannter relativer Konzentrationen durchgeführt.

Für die Festphasenextraktion wurden drei verschiedene Festphasen mit unterschiedlichen Eigenschaften miteinander verglichen. Das verwendete 2-OH Material hatte einen polaren Charakter. Bei der Festphasenextraktion sollte das Camalexin und das Methoxycamalexin unter unpolaren Bedingungen (Chloroform bzw. Hexan) an das 2-OH Material adsorbieren. Danach sollten die Phytoalexine mit wässrigem Methanol eluiert werden. Möglicherweise ist die Affinität von Camalexin zu dem 2-OH Material zu gering, so dass ein Teil des eingesetzten Camalexins mit dem zum Auftragen und Waschen benutzten Chloroform bzw. Hexan von der Kartusche eluiert wurde. Anhand der schlechten Ergebnisse war die Aussicht auf eine Eignung zur Anwendung von 2-OH Material auf die gestellte Problematik sehr gering. Demnach wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung durchgeführt.

Bei dem C-18 Material, welches einen unpolaren Charakter hatte, sollte das Camalexin unter basischen und mehr polaren Bedingungen (wässriges Acetonitril) mit einem geringen Anteil an organischen Lösungsmittel an das C-18 Material adsorbieren. Eluiert wurde unter sauren und mehr unpolaren Bedingungen mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel (80-90 %). Bei dieser Festphasenextraktion wurde die Eigenschaft von Indolen ausgenutzt, die unter basischen Bedingungen deprotoniert vorliegen und somit einen eher unpolaren Charakter haben, unter sauren Bedingungen protoniert vorliegen und somit einen eher polaren Charakter haben. Dass diese Eigenschaft der zu analysierenden Phytoalexine (Camalexin und Methoxycamalexin) eine entscheidende Rolle zukommt wird daran deutlich, dass die Phytoalexine unter sauren Bedingungen leichter von dem unpolaren C-18 Material eluiert werden konnten als unter basischen Bedingungen.

Werden die Rückgewinnungsraten der Extraktionen mit und ohne Pflanzenmaterial verglichen, so zeigte die Extraktion mit Pflanzenmaterial eine geringere Rückgewinnungsrate. Schon bei der Extraktion ohne Pflanzenmaterial lag die Rückgewinnungsrate bei 90 %. Hier wird deutlich, dass von dem eingesetzten Camalexin ca. 10 % an das unpolare C-18 Material adsorbiert bleiben und nicht unter den gewählten Bedingungen eluiert werden konnte. Wurde mit Pflanzenmaterial extrahiert, erhöhte sich der Anteil auf ca. 15 %. Hier wird deutlich, dass sich Stoffe oder Strukturen im Pflanzenmaterial befinden, an die ein Teil des Camalexins so adsorbierte, dass es nicht wieder eluiert werden konnte. Ob das Camalexin bei der Extraktion mit Pflanzenmaterial zu einem größeren Teil an dem C-18 Material adsorbiert oder an dem Pflanzenmaterial, welches an das Adsorbens adsorbiert, kann nicht gesagt werden. Wurden andere Lösungsmittel zum Eluieren wie z.B. Aceton verwendet, um die Rückgewinnungsrate von Camalexin zu erhöhen, so gelangte ein Großteil der von dem C-18 Material

zurückgehaltenen Matrixreste in die zur Analyse bestimmte Fraktion, die dadurch nicht mehr mit der HPLC analysiert werden konnte.

Für die Extraktion mit Extrelut[®]-Material war es notwendig, den zu extrahierenden Pflanzenextrakt im Wässrigen mit einem pH von 3-4 auf das Extrelut[®]-Material zu geben. Das Wasser und ein Großteil der Pflanzenmatrix wurde von dem Extrelut[®]-Material resorbiert bzw. adsorbiert. Danach konnte das Camalexin mit Dichlormethan eluiert werden. Die Wiederfindungsrate lag zwischen 81,2 % (ohne Pflanzenmaterial) und 68,4 % (mit Pflanzenmaterial). Bei der Extraktion ohne Pflanzenmaterial ist es denkbar, dass das Camalexin aufgrund der sauren Bedingungen an das Extrelut[®]-Material, welches das Wasser (pH 3-4) resorbiert hat, adsorbiert. Bei der Elution mit Dichlormethan lag die Verteilung vom Camalexin nur zu ca. 80 % auf der Seite des Eluenten. Die Verringerung der Wiederfindungsrate bei der Extraktion mit Pflanzenmaterial gegenüber der Extraktion ohne Pflanzenmaterial kann damit begründet werden, dass ein Großteil des Pflanzenmaterials von dem Extrelut[®]-Material zurückgehalten wurde und damit auch ein hoher Anteil des eingesetzten Camalexins, welches an Substanzen bzw. Strukturen des Pflanzenmaterials adsorbierte. Es wäre denkbar, dass bei einem basischen pH mehr Camalexin eluiert werden könnte, da dann höchstwahrscheinlich eine höhere Affinität zum Eluent gegeben wäre. Dafür wäre es notwendig gewesen, dass Camalexin nicht im Sauren, sondern im Basischen auf das Adsorbenz zu geben. Diese Möglichkeit wurde nicht ausprobiert, da die Löslichkeit von Camalexin unter basischen Bedingungen im Wässrigen sehr schlecht ist und demzufolge keine Aussicht auf Erfolg zu erkennen war. Eine Möglichkeit den pH-Wert während der Extraktion zu verändern war nicht gegeben.

Werden C-18 Material und Extrelut[®]-Material bezüglich der Extrahierbarkeit von Camalexin miteinander verglichen, so konnten grundsätzlich beide Materialien zur Extraktion von Camalexin und Methoxycamalexin verwendet werden. Bei dem C-18 Material war der Arbeits- und Materialaufwand im Bezug auf das gesamte Analysenverfahren geringer als bei dem Extrelut[®]-Material. Zusätzlich lag die Wiederfindungsrate höher. Demzufolge wurde das C-18 Material für die Festfasenextraktion verwendet.

Bei der Durchführung des Analysenverfahrens mit der thermischen Extraktion und der Festphasenextraktion mit C-18 Material konnten Unterschiede bezüglich der Wiederfindungsrate mit und ohne Pflanzenmaterial beobachtet werden. Als schwierig erwies sich hier das Aufnehmen der Phytoalexine bei der Aufbereitung mit Pflanzenmaterial nach dem Einengen aus dem Abdampfkolben. Es wurde versucht, mit verschiedenen

Konzentrationen an Methanol, Hexan und Acetonitril bei unterschiedlichen Bedingungen eine höhere Wiederfindungsrate zu erzielen. Wurde bis zur Trockne eingeeengt, so konnte mit reinem Methanol, Acetonitril oder Hexan nur ca. 50 % des ursprünglich eingesetzten Camalexins wiedergefunden werden. Erst mit reinem Acetonitril bei pH 8 und einer Temperatur von 42 °C war es möglich eine Wiederfindungsrate von über 75 % zu erreichen. Hier war es unbedingt notwendig, nicht bis zur Trockne einzuengen, sondern den verbleibenden wässrigen Rest nach dem Abdampfen des Methanols zu basifizieren, auf die C-18 Kartusche zu geben und dann den Abdampfkolben mit reinem Acetonitril zu waschen.

Somit ergaben sich bei der Probenvorbereitung zwei Arbeitsschritte, bei denen ein Teil des eingesetzten Camalexins an Substanzen bzw. Strukturen des Pflanzenmaterials so adsorbierte, dass es nicht eluiert werden konnte. Als mögliche Strukturen könnten, wie schon erwähnt, Pflanzenbestandteile angeführt werden. Es wäre denkbar, dass das Binden an unpolare (lipophile) Stoffen wie z.B. Zellmembranen, vor allem im sauren Milieu, eine notwendige Eigenschaft der Phytoalexine ist, damit sie u.a. an der Zellmembran von Pflanzen oder Pathogenen akkumulieren und so in ausreichender Konzentration am Wirkort vorliegen. Spekulativ könnten auch spezielle Strukturen von der Pflanze z.B. als membranständige Proteine oder Zellwandbestandteile ausgebildet sein, die dafür sorgen, dass ein Teil der Phytoalexine an bestimmten Stellen, die für das Eindringen von Pathogenen eine Schlüsselposition darstellen, akkumuliert werden. Eventuell spielen noch andere Effekte und Eigenschaften eine wichtige Rolle. Zur genaueren Klärung sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Zur Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin wurden zwei HPLC-Methoden optimiert (RP- und NP-HPLC), mit denen Camalexin und Methoxycamalexin gleichzeitig analysiert werden konnten. Werden die beiden Methoden miteinander verglichen, so unterschieden sich, wie erwartet, die Retentionszeiten von Camalexin und Methoxycamalexin. Von beiden Methoden wurde die gestellten Anforderungen erfüllt. Eine Analyse konnte in einer Zeitspanne von unter 15 min durchgeführt werden, die Retentionszeiten von Camalexin und Methoxycamalexin waren für eine quantitative Analyse unterschiedlich genug und die Analyse der zu analysierenden Substanzen wurde nicht durch Verunreinigungen beeinträchtigt. Die Analyse mit der RP-HPLC Methode wies gegenüber der NP-HPLC Methode den Vorteil auf, dass wässrige Lösungen analysiert werden konnten. Dies bedeutete für die angewandte Festphasenextraktion mit C-18 Material ein direktes Analysieren der aus

der Festphasenextraktion stammenden Fraktion ohne weitere Bearbeitungsschritte, da mit 1,5 ml (maximales Probenvolumen der für den verwendeten Probengeber geeigneten Probenfläschchen) alles eluierbare Camalexin und Methoxycamalexin von der Kartusche eluiert werden konnte. Bei der Verwendung der NP-HPLC musste das Eluat aus der Festphasenextraktion erst bis zur Trockne eingengt und anschließend wieder in entsprechenden wasserfreien Lösungsmittel zur Analyse aufgenommen werden.

Mit dem optimierten Analysenverfahren konnte die Bearbeitungsdauer der Pflanzenproben im Vergleich zu den beschriebenen Verfahren erheblich verkürzt werden, was für die Anwendung in Serienuntersuchungen eine wichtige Voraussetzung ist. Wird die entwickelte Probenvorbereitung mit der Probenvorbereitung von Kollman et al. (1989) und Glazebrook et al. (1997) verglichen, so konnte der Zeitaufwand für die Extraktion durch die Mikrowellenbehandlung von 15 min auf 5 min verkürzt werden. Versuche, bei denen die Phytoalexine von *C. sativa* nach dem Einengen in Hexan aufgenommen wurden, zeigten eine geringe Rückgewinnungsrate. Insofern konnte nicht, wie bei Kollmann et al. (1989) und Glazebrook et al. (1997), Hexan zum Aufnehmen der *C. sativa*-Phytoalexine verwendet werden. Nach der Festphasenextraktion konnte die erhaltene Fraktion direkt mit der HPLC analysiert werden. Bei Kollmann et al. (1989) und Glazebrook et al. (1997) war es erforderlich das erhaltene Eluat bis zur Trockne einzuengen, in Dichlormethan aufzunehmen um dann das Dichlormethan wieder unter einem Stickstoffstrom bei 50 °C zu verdampfen. Der Rückstand wurde dann in einer definierten Menge Methanol aufgenommen und anschließend mit der HPLC analysiert. Wurde die von Kollmann et al. (1989) beschriebene Methode zur Analyse von Phytoalexinen von *B. juncea* (Ruten-Kohl) und *B. napus* (Raps) auf *C. sativa* übertragen, so ergaben sich Wiederfindungsraten von 40-50 %. Von Stork & Sacristán (1995) wurde die Analysenmethode von Kollmann et al. (1989) verändert und die Konzentrationen an verschiedene Phytoalexine von *B. napus*, *B. carinata*, *B. juncea* und *Sinapsis arvensis* (Ackersenf) nach Induktion mit *Leptoshaeria maculans* untersucht. Diese Modifizierungen führten in dieser Untersuchung zu keiner Verbesserung der Wiederfindungsrate von Camalexin. Zur Analyse von Camalexin aus *A. thaliana* wurde von Tsuji et al. (1992) ebenfalls eine thermische Extraktion in Methanol verwendet. Die daraus resultierenden Extrakte wurden eingengt, in Chloroform aufgenommen, mit Flash-Chromatographie und anschließender TLC gereinigt. Danach erfolgte die Analyse mit der RP-HPLC (C-18). Jejelowo et al. (1991) verwendet zur Extraktion von Camalexin eine Diffusionsmethode nach Keen (1978). Die Aufreinigung erfolgt über präparative TLC mit

anschließender PR-HPLC Analyse an C-18 Material. Wird die entwickelte Analysenmethode mit den in der Literatur gefundenen verglichen, so war der Zeit- und Materialaufwand für die Probenaufbereitung verringert.

Inwieweit die entwickelte Methode zur Analyse anderer indolischer Phytoalexine aus verschiedenen Pflanzen geeignet ist, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass das entwickelte Analysenverfahren zur Analyse von Camalexin aus *A. thaliana* geeignet ist und das bisherige Verfahren (Tsuji et al., 1992; Zook et al., 1998) ersetzen könnte.

Wird über Möglichkeiten einer weiteren Optimierung des Analysenverfahrens nachgedacht, so könnte eine andere Konservierungsmethode für das Pflanzenmaterials verwendet werden. Das frische Pflanzenmaterial wurde bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse gelagert. Eine andere Möglichkeit der Konservierung bestände darin, die geernteten Pflanzen einzufrieren und dann einer Gefriertrocknung zu unterziehen (Jejelowo et al., 1991). Der Vorteil würde eventuell darin bestehen, dass bei der Extraktion weniger Verunreinigungen in die Probe gelangen würden, da die Proben praktisch wasserfrei wären. Inwieweit eine Gefriertrocknung (eventuell auch Trocknung bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) Vorteile bezüglich der Wiederfindungsraten bietet, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5.3 Anwendung des optimierten Analyseverfahrens zur Quantifizierung von Camalexin und Methoxycamalexin

Wurden mit dem entwickelten Analysenverfahren mit BION[®] behandelte *C. sativa*-Pflanzen analysiert, so trat neben Camalexin und Methoxycamalexin ein weiterer Peak auf. Dieser Peak wurde mit Hilfe der HPLC abgetrennt und im Objektträger test mit *A. brassicae* auf seine Biowirksamkeit getestet. Es stellte sich heraus, dass die Fraktion nicht biowirksam war. Die gefundene Substanz wurde schließlich als unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt (UIS) bezeichnet. Es ist wahrscheinlich, dass es sich aufgrund des Verhaltens bei der Probenaufbereitung und der gefundenen Retentionszeiten bei den HPLC-Analysen um eine Indolverbindung handelt. Nach Zhao & Last (1996) und Zook & Hammerschmidt (1997) steht der Biosyntheseweg von Tryptophan im engen Zusammenhang mit der Biosynthese von Camalexin in *A. thaliana*. Es kann davon ausgegangen werden, dass Camalexin und Methoxycamalexin in *C. sativa* über den gleichen Syntheseweg gebildet werden. Demnach besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dem UIS um ein Zwischenprodukt im Camalexin-

(Methoxycamalexin) Stoffwechsel von *C. sativa* handelt. Inwieweit das UIS ein Vorprodukt oder ein Abbauprodukt darstellt, kann anhand der erzielten Ergebnisse nicht entschieden werden. Zur genauen Klärung der Herkunft und der Beziehung zur Abwehrreaktion des UIS müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Bei allen Versuchen wurden nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION® Wachstumsveränderungen an *C. sativa* beobachtet. Solche Wachstumsveränderungen sind von verschiedenen Kulturpflanzen nach Behandlung mit Pflanzenaktivatoren bekannt. An Gurken konnten konzentrationsabhängige Wachstumsdepressionen nach Behandlung mit BION® in Form von kleineren Blättern, dünneren Stängeln und kürzeren Blattstielen beobachtet werden (Laun, 1997). Beim Auftreten solcher Wachstumsdepressionen als Folge der Anwendung von Pflanzenstärkungsmitteln z.B. BION® ist es oft schwer zu unterscheiden, ob diese zur Abwehrreaktion der Pflanze gehören, oder ob eine Schädigung durch den Pflanzenaktivator vorliegt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung der Phytoalexine bei *C. sativa* als Indikator für die Aktivierung der Abwehrkaskade angesehen werden kann. Da die Wachstumsveränderungen nur dann auftraten, wenn auch eine erhöhte Phytoalexinproduktion festzustellen war, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die Wachstumsveränderungen mit der Aktivierung der Abwehrkaskade zusammenhängen und keine direkte Schädigung des Pflanzenaktivators BION® darstellen.

5.3.1 Induktion der Phytoalexinproduktion von *C. sativa* mit dem Pflanzenaktivator BION® zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien

Hier konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet werden. Es war sehr auffällig, dass in den mit BION® behandelten Pflanzen die Konzentration an Methoxycamalexin in den Stadien Keimblatt und Rosette sehr hoch lag. Zum Schossen nahm die Konzentration wieder ab. Zur Knospe waren keine Unterschiede mehr zur Kontrolle vorhanden. Der Versuch wurde im Herbst unter Gewächshausbedingungen durchgeführt. Die Temperaturen lagen am Tag zwischen 15-20 °C und in der Nacht zwischen 8-12 °C.

Die Bildung von Phytoalexinen in *C. sativa* steht in einem direkten Zusammenhang zur *Alternaria*-Resistenz (Jejelowo et al., 1991; Conn et al., 1991) und zur Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* (Conn et al., 1994). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die an *C. sativa* nachgewiesenen Phytoalexine bei der Ausbildung von Resistenzen gegen weitere Pathogene beteiligt sind. Von Henneken et al. (1998), Föller et al. (1998) und Föller (2000) wurde in

verschiedenen Untersuchungen über Krankheiten an *C. sativa* ein vermehrter Befall mit verschiedenen Pathogenen in den späteren Entwicklungsstadien gefunden. In den früheren Entwicklungsstadien wurden nur wenige Krankheiten gefunden.

Nach Schlösser (1997) ist bei einem Befall einer Pflanze mit einem Pathogen in den frühen Entwicklungsstadien eine potentiell höhere Schädigung zu erwarten als zu einem späteren Entwicklungsstadium. Vor diesem Hintergrund wird verständlich, dass bei *C. sativa* in den frühen Entwicklungsstadien, in denen möglicherweise eine erhöhte Gefährdung gegenüber Pathogenen besteht, ein induzierbares Abwehrsystem zur Vermeidung eines Befalls mit Pathogenen ausgebildet ist. Wird das abrufbereite Abwehrsystem im Keimblattstadium oder im Rosettenstadium mit BION[®] induziert, so bedeutet dies bei *C. sativa* eine Veränderung des Wachstums und eine energetische Belastung. Dass die Induzierung des Abwehrsystems einen zusätzlichen energetischen Aufwand bedeutet, wird u.a. bei Hoffmann et al. (1994) und Schlösser (1997) beschrieben. Zusätzlich konnte in der Untersuchung zur Phytoalexinakkumulation eine Abnahme der Biomasse (vgl. 4.4.3 und 5.3.2) nach der Induktion der Phytoalexinsynthese beobachtet werden, was die energetische Belastung von *C. sativa* zur Aktivierung der Abwehrkaskade verdeutlicht. Die geringere Produktion an Biomasse kann als Energieäquivalent angesehen werden, welches zur Ausbildung der induzierten Abwehrmechanismen erforderlich ist. Dieser erhöhte Energieaufwand, der nur im Bedarfsfall (z.B. Befall mit Pathogenen, Schädlingsfraß) entsteht, scheint in ökonomischer Weise im Zusammenhang mit einer Reproduktionsgefährdung zu stehen, da, wie schon erwähnt, ein Pathogenbefall in den früheren Entwicklungsstadien potentiell weitreichende Folgen hat (Schlösser, 1997). Das für die Assimilation notwendige Pflanzengewebe wird bei einem Pathogenbefall verringert, so dass weniger Lichtenergie in der wichtigen vegetativen Phase von der Pflanze umgewandelt werden kann. Weiter können Pflanzenorgane wie Knospenanlagen, die für die Reproduktion entscheidend sind, geschädigt werden (Gaunt, 1995). Hier kann angeführt werden, dass ein entsprechender Energieaufwand zur Befallsverringerung bzw. Befallsvermeidung in Anbetracht einer Verringerung der Energieversorgung und Gefährdung der Reproduktion in den frühen Entwicklungsstadien durchaus sinnvoll ist. Zu den späteren Entwicklungsstadien scheint die Bereitstellung eines Abwehrsystems bei *C. sativa*, verbunden mit einem erhöhten Energieaufwand, nicht mehr sinnvoll, da eine geringere Befallswahrscheinlichkeit (z.B. Altersresistenz) und weiter die Auswirkungen eines Befalls mit Pathogenen auf die Reproduktion eher gering sind. Bei dieser Betrachtung ist anzuführen, dass der Zusammenhang zwischen einem

reproduktionsgefährdenden bzw. Ertragsrelevanten Befall und einer Reproduktionsverminderung bzw. Ertragsverlust oft sehr schwer hergestellt werden kann (Gaunt & Bryson, 1995; Gaunt, 1995).

Die Untersuchung zur Induktion der Phytoalexinproduktion zu verschiedenen Entwicklungsstadien wurde nur mit einer Sorte (Sorte 13) durchgeführt. Zur Bestätigung müsste bei den anderen zwölf Sorten ebenfalls die Phytoalexinkonzentration zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht werden

5.3.2 Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin in *C. sativa* nach der Induktion mit dem Pflanzenaktivator BION[®]

Bereits 2 Tage nach Versuchsbeginn wurden Unterschiede zwischen der Kontrolle und der BION[®]-Variante bezüglich der Phytoalexinkonzentration beobachtet. In der Kontrolle konnte nach 8 Tagen ein Anstieg der beiden analysierten Phytoalexine auf eine Konzentration von 150-170 µg/kg Frischgewicht beobachtet werden. Nach 14 Tagen lag die Konzentration auf dem gleichen Niveau wie nach 8 Tagen. Bei der BION[®]-Variante stieg die Konzentration der beiden Phytoalexine bis 8 Tage nach Versuchsbeginn jeweils auf einen Wert von fast 6000 µg/kg Frischgewicht. Danach nahm die Konzentration ab und lag nach 11 und 14 Tagen für Camalexin bei 2000 µg/kg Frischgewicht und für Methoxycamalexin bei 3000 µg/kg Frischgewicht. Nach 22 Tagen war die Konzentration des Camalexins noch auf dem gleichen Niveau wie nach 11 und 14 Tagen, die Konzentration an Methoxycamalexin fiel auf das Niveau von Camalexin mit 2000 µg/kg Frischgewicht. Der anfängliche Anstieg der Phytoalexinkonzentration bis 8 Tage nach der Behandlung deckt sich mit den Ergebnissen von Jejelowo et al. (1991). Der nach 8 Tagen auftretende starke Abfall der Phytoalexinkonzentration auf ein stabiles Niveau (bis 22 Tage) wurde so nicht erwartet. Bei Jejelowo et al. (1991) erfolgte nach der Induktion der Phytoalexinproduktion in *C. sativa* ein relativ steiler Anstieg der Phytoalexinkonzentration, die nach 6 Tagen ihren Höhepunkt erreichte und auf dem Niveau bis zum Versuchende (10 Tage nach Induktion) blieb. Der plötzliche Abfall der Phytoalexinkonzentration auf ein relativ hohes und gleichbleibendes Niveau deutet auf einen regulierten Abbau (Abbaumechanismus) hin. In Pflanzen werden Thiabendazole photolytisch abgebaut (Perkow & Ploss, 1999). Da Thiabendazole den Phytoalexinen Camalexin und Methoxycamalexin von der chemischen Struktur her sehr ähnlich sind, ist ein vorgezeichneter Abbauweg durchaus wahrscheinlich (Abb. 23).

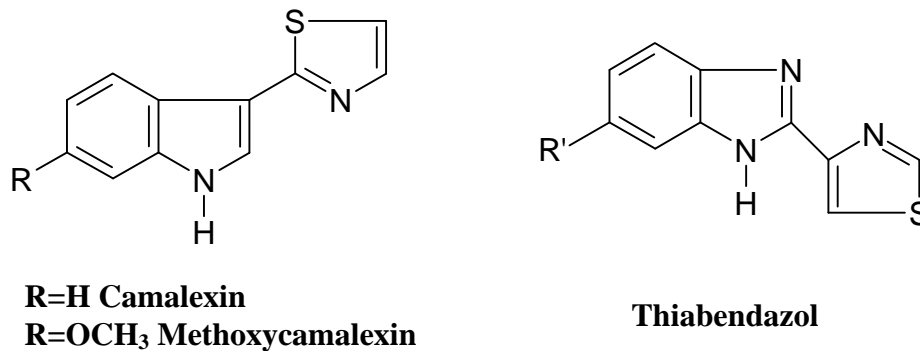


Abb. 23 Vergleich von Thiabendazolen und Camalexin bzw. Methoxycamalexin

Werden die in diesem Versuch ermittelten Konzentrationen der BION[®]-Variante an Camalexin und Methoxycamalexin der Sorte 2 mit den ermittelten Konzentrationen der anderen Versuche verglichen, so lag die Konzentration hier (bis zu 6000 µg/kg Frischgewicht) erheblich höher als in den anderen Versuchen (bis zu 500 µg/kg Frischgewicht). Weiter war der Anstieg der Konzentration an Phytoalexin in der Kontrolle ungewöhnlich. Zusätzlich ist anzumerken, dass die gemessene Konzentration an Phytoalexin mit fast 200 µg/kg Frischgewicht für die Kontrolle ungewöhnlich hoch war und auf einem ähnlichem Niveau lag wie die Konzentration der BION[®]-Varianten in der Differenzierungsuntersuchung bei dem Temperaturregime 18/11 °C.

Während die für diesen Versuch verwendeten Pflanzen unter Gewächshausbedingungen angezogen wurden, herrschten sommerliche Außentemperaturen. Demzufolge lagen die Temperaturen im Gewächshaus zwischen 27 bis 35 °C am Tag und zwischen 20 bis 25 °C in der Nacht. Mit Erreichen des Rosettenstadiums wurden die Pflanzen direkt in die Klimakammer mit einer Versuchstemperatur von 18/11 °C überführt.

Es ist wahrscheinlich, dass die hohe Konzentration an Phytoalexinen im Zusammenhang mit den relativ hohen Temperaturen während der Anzucht der Pflanzen und dem plötzlichen Überführen zu kühleren Temperaturbedingungen bei Versuchsbeginn steht.

Bei der Kontrolle wirkt die Temperaturänderung von warmen zu kühlen Temperaturen anscheinend als Elicitor für die Phytoalexinproduktion. Dies wird daran deutlich, dass 8 Tage nach Versuchsbeginn (Temperaturänderung) die Konzentration an Camalexin auf 184 µg/kg FM und an Methoxycamalexin auf 137 µg/kg anstieg.

Von Jejelowo et al. (1991) wurde die Akkumulation von Camalexin in *C. sativa* untersucht. Werden die ermittelten Konzentrationen von Jejelowo et al. (1991) mit den in dieser Untersuchung ermittelten Konzentrationen verglichen, so ergibt sich eine prinzipielle Übereinstimmung (Tab. 19).

Bei Jejelowo et al. (1991) finden sich keine Angaben zur verwendeten *C. sativa*-Sorte. Es wurden von ca. 7 Wochen alten Pflanzen (über Anzuchtbedingungen finden sich keine Angaben) das 10. bis 18. Laubblatt verwendet. Die Blätter wurden in Petrischalen überführt. Als Elicitor wurde Sporensuspension von *A. brassicae* in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Versuchstemperatur betrug 25 °C.

Ein direkter Vergleich der von Jejelowo et al. (1991) ermittelten Konzentrationen für Camalexin mit den erzielten Ergebnissen in der vorliegenden Untersuchung ist nicht möglich, da sich die Konzentrationsangaben bei Jejelowo et al. (1991) auf das Trockengewicht der Blätter beziehen. Weiter wurden abgetrennte Pflanzenteile und nicht die Gesamtpflanze nach einer längeren Anzuchtphase (späteres Entwicklungsstadium) verwendet. Bezüglich der Akkumulation der Phytoalexine können aber Parallelen beobachtet werden. So stieg die Phytoalexinkonzentration bei Jejelowo et al. (1991) bis 6 Tage nach der Behandlung mit *A. brassicae* steil an und blieb auf dem erreichten Niveau bis zum Versuchsende (10 Tage). Eine Verringerung der Konzentration, wie sie bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, wurden von Jejelowo et al. (1991) während des Versuchszeitraum nicht festgestellt. Wird davon ausgegangen, dass das Trockengewicht von *C. sativa* Blättern ca. 5 % des Frischgewichtes ausmacht, so können die ermittelten Konzentrationen der beiden Versuche nach entsprechender Umrechnung miteinander verglichen werden. In Tab. 19 sind die umgerechneten Konzentrationen in FM und TM beider Untersuchungen dargestellt. Die Konzentrationen an Camalexin lagen in beiden Untersuchungen auf einem vergleichbaren Niveau. Jejelowo et al. (1991) räumten ein, dass die ermittelten Konzentrationen von Versuch zu Versuch einer gewissen Schwankung unterworfen waren, der Verlauf der Phytoalexinakkumulation sei aber immer gleich gewesen.

Tab. 19: Vergleich der ermittelten Konzentrationen an Camalexin nach Behandlung mit *A. brassicae*- Suspension (Jejelowo et al., 1991) bzw. nach Behandlung mit BION® an *C. sativa*.

Tage nach Versuchsbeginn	Induktion mit <i>A. brassicae</i> -Suspension		Induktion mit dem Pflanzenaktivator BION®	
	TM µg/g	FM* µg/g	TM* µg/g	FM µg/g
2	60	3,0	20	0,5
5	190	9,5	64	3,2
6	280	14	-	-
8	280	14	110	5,5
10	280	14	-	-
11	-	-	36	1,8
14	-	-	44	2,2
22	-	-	44	2,2

Alle Werte wurden in µg Camalexin /g (TM, FM) angegeben. *Die Konzentrationen wurden auf Basis von 5 % Trockenmasse kalkuliert.

Wird die Phytoalexinakkumulation von *C. sativa* mit der Akkumulation von Phytoalexinen anderen Arten aus der Pflanzenfamilie der *Brassicaceae* verglichen, so ergaben sich keine Übereinstimmungen. Von Tsuji et al. (1992) wurden Untersuchungen zum Verlauf der Akkumulation von Camalexin in *A. thaliana* nach Induktion mit *P. syringae* pv *syringae* durchgeführt. Es wurden Blätter von 3 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Über Temperaturbedingungen während der Anzucht wurden keine Angaben gemacht. Nach 12 h war ein Anstieg auf 4 µg/g Frischgewicht zu beobachten, der bis 36 Stunden nach der Induktion anhielt (8 µg/g Frischgewicht). Danach wurde bis zum Versuchsende (48 h) ein leichter Abfall auf 6,5 µg/g Frischgewicht beobachtet. Hier lagen die ermittelten Konzentrationen an Camalexin ähnlich hoch wie die in *C. sativa* ermittelten Konzentrationen. Bezüglich des Verlaufs der Akkumulation wurden bei *A. thaliana* eine frühere Akkumulation von Camalexin beobachtet als bei *C. sativa*. Dies kann damit begründet werden, dass bei *A. thaliana* die Phytoalexinbildung im Zusammenhang mit der relativ früh und schnell ablaufenden Hypersensitivitätsreaktion, die durch *P. syringae* induziert wurde, steht (Tsuji et al., 1992). Bei *C. sativa* kann dagegen davon ausgegangen werden, dass die Bildung von Phytoalexinen im Zusammenhang mit der LAR steht.

In Untersuchungen zur Akkumulation des Phytoalexins Spirobrassinin (Stork & Sacristán, 1995) an *B. napus* wurde erst 8-10 Tage nach Induktion der Phytoalexinakkumulation mit CuCl_2 ein steiler Anstieg der Konzentration beobachtet. Die Versuche wurden mit Keimpflanzen, die bei 22 °C angezogen wurden, bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt. Diese Ergebnisse sind mit der Phytoalexinproduktion von *C. sativa* nicht vergleichbar. Dies macht deutlich, dass die generelle Übertragbarkeit der Bedingungen der Phytoalexinproduktion von *C. sativa* auf andere *Brassicaceae* nicht möglich ist.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Akkumulation der Phytoalexine in *C. sativa* an der Sorte 2 untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse sollten weitere Akkumulationsversuche mit den anderen *C. sativa*-Sorten (vgl. Tab. 1) unter Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums, des Elicitors und der Temperatur durchgeführt werden.

5.3.3 Untersuchungen auf weitere bioaktive Metabolite in *C. sativa*

In dieser Untersuchung wurde verschiedenen Hinweisen auf weitere bioaktive Verbindungen nachgegangen. Nach der Aufbereitung von ca. 5 kg Pflanzenmaterial ergab sich eine Fraktion, die eine Wirkung auf *A. brassicae* hatten aber kein Camalexin oder Methoxycamalexin enthielt. Die entsprechende Kontrolle zeigte keine Wirkung auf *A. brassicae*. Bei dem Versuch die bioaktive Komponente zu identifizieren, wurden verschiedene aliphatische Verbindungen gefunden, die keine eindeutigen Aussagen zuließen. Entweder war die Konzentration der bioaktive(n) Substanz(en) zu gering, oder die Substanz(en) stammten nicht von *C. sativa* Pflanzen und es handelt sich um ein Artefakt. Für eine Prüfung müsste mehr Pflanzenmaterial eventuell mit einer anderen Probenaufbereitung gewählt werden. Hier könnte z.B. für die Extraktion Ethylacetat anstelle von Methanol verwendet werden.

Es konnte demnach für die Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten nur die bekannten Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin verwendet werden.

5.3.4 Differenzierung von 13 *C. sativa* Sorten

Dieser Versuch wurde aufbauend auf den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Untersuchungen angelegt. In den oberirdischen Pflanzenteilen von *C. sativa* waren nur die

Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin bekannt. Demnach wurde die Sortendifferenzierung anhand dieser Phytoalexine durchgeführt.

Schlösser (1997) regt u.a. Untersuchungen bezüglich Sortenunterschiede und Temperaturabhängigkeit bei der Bildung von Phytoalexinen an. Daran anknüpfend war das Ziel dieser Untersuchung herauszufinden, ob es Sortenunterschiede bezüglich der Phytoalexinkonzentration nach Behandlung mit dem Pflanzenaktivator BION® bei verschiedenen Temperaturen gibt, die zur Sortendifferenzierung eingesetzt werden können. Die Ergebnisse zeigen eine Temperaturabhängigkeit der Produktion der analysierten Phytoalexine, wobei der Zusammenhang zwischen Temperatur und Phytoalexinproduktion im allgemeinen umgekehrt proportional war. Eine Ausnahme bildete die Sorte 10, die in der Summe der analysierten Phytoalexine die gleichen Konzentrationen bei den Temperaturregimen von 11/6 °C und 24/16 °C aufwies. Weiter wurden Unterschiede zwischen den 13 Sorten bezüglich der Gesamtphytoalexinkonzentration als auch der Konzentration an Camalexin und Methoxycamalexin gefunden. So lagen z.B. bei den Sorten 1 und 2 die Camalexinkonzentration bei allen Temperaturregimen höher als die ermittelte Methoxycamalexinkonzentration. Bei den Sorten 4 und 12 lagen die Konzentrationen etwa gleich und bei den Sorten 6, 11 und 13 war die Camalexinkonzentration niedriger als die Methoxycamalexinkonzentration.

Anhand der in diesem Versuch ermittelten Phytoalexinkonzentrationen nach der Behandlung von *C. sativa* mit BION® im Rosettenstadium und Ernte nach 17 Tagen, konnten die 13 untersuchten Sorten gut differenziert werden. Als Kriterien konnte die gebildete Menge an Phytoalexinen zu verschiedenen Temperaturen und der Anteil an Camalexin und Methoxycamalexin im Vergleich zur Gesamtphytoalexinkonzentration verwendet werden.

Diese Eindeutigkeit der erzielten Ergebnisse war aus verschiedenen Gründen nicht zu erwarten:

- 1) Schuster (1997) konnte anhand von verschiedenen Ertragsparametern und Glukosinulatgehalte keine Unterschiede zwischen *C. sativa* -Sorten/Linien finden und kommt zu dem Schluss, dass nur eine geringe genetische Variabilität bezüglich dieser Eigenschaften zwischen den Sorten/Linien vorhanden ist. Die geringe genetische Variabilität bezüglich der Ertragsparameter und der Glukosinulatgehalte kann anhand der erzielten Ergebnisse nicht auf die genetische Variabilität der Phytoalexinproduktion übertragen werden.

- 2) Untersuchungen von Rouxel et al. (1991) an verschiedenen *Brassica*-Species (*B. napus*, *B. rapa* und *B. juncea*) zur Differenzierung anhand der Konzentration von verschiedenen Phytoalexinen scheiterte an der uneinheitlichen Reaktion von Einzelpflanzen innerhalb einer Linie. Die Untersuchung wurde an Keimblättern durchgeführt, wobei CuCl_2 als Elicitor verwendet wurde.
- 3) Stork & Sakristàn (1995) konnten bei Untersuchungen zur Produktion und Zusammensetzung der Anteile der Phytoalexine von vier verschiedenen *B. napus* Sorten (Lesira, Lirajet, Liropa und Olymp) keine Unterschiede zwischen den verwendeten Sorten feststellen. Die Untersuchungen wurden im Keimblattstadium bei konstant 20 °C durchgeführt. Zur Induktion der Phytoalexinbildung wurde eine Inokulation mit *Phoma lingam* verwendet.

Davon ausgehend, dass die Phytoalexinbildung bei *B. napus* und *C. sativa* entscheidend von den Parametern Entwicklungsstadium der Pflanzen, verwendeter Elicitor und Temperatur beeinflusst werden, lassen die Ergebnisse der angeführten Versuche mit *B. napus*, verglichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, verschiedene Interpretationen zu. Die Temperatur von 20 °C und das Entwicklungsstadium (Keimblatt) von *B. napus*, die bei der Untersuchung von Stork & Sakristàn (1995) verwendet wurden, lagen für die Inokulation mit *P. lingam* im Optimalbereich, jedoch nicht für die Phytoalexinbildung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei einem Temperaturregime (z.B. 20/12 °C) oder einer niedrigeren Temperatur zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien mit verschiedenen Elicitoren andere Ergebnisse erzielt werden können.

Bei einer weiterführenden Betrachtung stellt sich die Frage, inwieweit ein Zusammenhang zwischen den ermittelten Phytoalexinkonzentration an *C. sativa* nach der Behandlung mit BION[®] und der Resistenz gegen verschiedene Pathogene unter Labor- und Freilandbedingungen besteht. So sollte sich ein Bezug zwischen der vorgenommenen Sortendifferenzierung und dem Auftreten von Resistenzen im Freiland herstellen lassen.

In Labor- und Freilanduntersuchungen mit *C. sativa* (Föller, 2000; Brinker, 1999) wurden verschiedene an *C. sativa* vorkommende Krankheiten gefunden. Als die wichtigsten Krankheiten werden Falscher Mehltau (*Peronospora parasitica*), Grauschimmelfäule (*Botrytis cinerea*) und Weißstängligkeit (*Sclerotinia sclerotiorum*) genannt. Ertragseinbußen aufgrund eines Krankheitsbefall wurden selten beobachtet.

Mit dem Pathogen *P. parasitica* an *C. sativa* wurden von Föller (2000) weitergehende Untersuchungen mit den gleichen 13 *C. sativa*-Sorten durchgeführt, die auch in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden. In den Freilandversuchen waren die Sorten 7, 9, 11 und 13 gering befallen, die Sorten 5, 8, 10 und 12 zeigten einen mittleren bis hohen Befall und die Sorten 1, 2, 3, 4, und 6 zeigten einen starken Befall. In den Klimakammeruntersuchungen, die bei 17/10 °C durchgeführt wurden, zeigten die Sorten 11 und 13 einen geringen Befall, die Sorten 9, 10 und 12 einen mittleren bis hohen Befall und die Sorten 1,2,3,4,5,6,7,8 einen starken Befall.

Wird die in dieser Untersuchung vorgenommene Differenzierung der 13 *C. sativa*-Sorten anhand von Phytoalexinkonzentrationen mit den von Föller (2000) gefundenen Anfälligkeitsunterschieden bezüglich *P. parasitica* verglichen, so ergaben sich Übereinstimmungen. So zeigten die Sorten 9, 10, 11, 12 und 13 bei Föller (2000) in den Laboruntersuchungen einen geringen bis mittleren Befall mit *P. parasitica*. Mit Ausnahme der Sorte 10 wurde in der vorliegenden Untersuchung für die Sorten 9, 11, 12 und 13 eine hohe Konzentration an Methoxycamalexin ermittelt. Die Sorten 1 und 2 waren in den Laboruntersuchungen stark mit *P. parasitica* befallen. Hier wurde in der vorliegenden Untersuchung hohe Konzentrationen an Camalexin und geringere Konzentrationen an Methoxycamalexin gefunden.

Von Föller (2000) wurden zusätzlich Untersuchungen zur Anfälligkeit von *C. sativa* gegen *P. parasitica* nach Behandlung mit BION[®] durchgeführt. Hier wiesen alle verwendeten Sorten einen geringen Befall auf. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass bei den verwendeten *C. sativa* Sorten ein induzierbares Abwehrsystem gegen *P. parasitica* ausgebildet ist. Ein Befall hängt demnach entscheidend von der Induzierbarkeit des Abwehrsystems ab.

Da der stark verringerte Befall von *P. parasitica* an *C. sativa* nach der Behandlung mit BION[®] nicht mit der ermittelten Konzentration an Phytoalexinen korreliert, kann davon ausgegangen werden, dass neben den Phytoalexinen noch weitere Abwehrmechanismen an der Wirt-Pathogen-Beziehung *C. sativa* - *P. parasitica* beteiligt sind. Als mögliche Abwehrmechanismen kämen PR- Proteine, Papillenbildung, Zellwandverstärkung, usw. in Betracht.

Spekulativ kann ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit von *C. sativa* hohe Methoxycamalexinkonzentrationen zu produzieren und der Induzierbarkeit der Abwehrreaktion durch *P. parasitica* hergestellt werden.

Für andere an *C. sativa* vorkommende Pathogene liegen keine Untersuchungen bezüglich Anfälligkeitsunterschieden und der induzierten Abwehrreaktion vor. Es müssten demnach noch weitere Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von Phytoalexinen und einem Krankheitsbefall unter Freiland- und Laborbedingungen, bei der Verwendung eines Pflanzenaktivators an *C. sativa* erfolgen. Weiter muss bei solchen Untersuchungen die Abwehrreaktion an möglichst vielen Parametern gemessen werden. Dies würde eine intensive Untersuchung der Komponenten der Abwehrkaskade an *C. sativa* mit einschließen.

5.4 Abschließende Betrachtung der Untersuchung und Ausblick

Untersuchungen zum Verständnis des in Pflanzen ausgebildeten Abwehrsystems zielen letztlich auf eine praktische Anwendung hin. Diese betrifft sowohl die Anwendung in der Resistenzzüchtung, als auch in der Bestandesführung von Kulturpflanzen. Ein Problem der Resistenzzüchtung ist das Auffinden und Beurteilen von Resistenzen und damit verbunden das Finden der Gene, die zur Resistenz führen. Wenn auf Resistenz gezüchtete Kulturpflanzen angebaut werden, so ist die Überwindung der Resistenzen durch eine Anpassung der Pathogene absehbar (Überwindung der Resistenz), und es wird notwendig neue Resistenzen zu finden. Demnach kann die Qualität einer Resistenz gegen ein bestimmtes Pathogen in der Dauer bis zur Überwindung der Resistenz durch das Pathogen gesehen werden (Becker, 1993).

Der hohe Zeitaufwand beim Auffinden und Prüfen neuer Resistenzen liegt daran, dass die Beurteilung der Resistenz von Pflanzen (Gewebe- und Zellkultur-, Klimakammer-, Gewächshaus- und Freilandversuche) gegenüber Pathogenen nur durch Resistenztests erfolgt. Eine Verbesserung der Situation könnte in der Zuhilfenahme von biochemischen und analytischen Methoden bestehen, mit denen die Qualität des induzierbaren Abwehrsystems von Pflanzen und damit verbunden eine verbesserte Resistenz gegenüber Pathogenen gemessen werden kann. Eine Grundvoraussetzung dafür ist die Möglichkeit anhand von Messparametern eine Differenzierung von Kultivaren zu erreichen, die im Zusammenhang mit einer Resistenz (auch induzierten Resistenz) unter Anbaubedingungen steht. Aus der Einbeziehung des induzierten Abwehrsystems, welches in vielen Pflanzen in unterschiedlicher Weise ausgebildet ist und oft maßgeblich an der Ausbildung von

Resistenzen gegen Pathogen beteiligt ist, in die Pflanzenzüchtung, ergeben sich eine Vielzahl neuer Bekämpfungsstrategien gegen Pflanzenkrankheiten.

In dieser Untersuchung wurde eine Analysenmethode zur quantitativen Analyse der an *C. sativa* vorkommenden Phytoalexine Camalexin und Methoxycamalexin entwickelt. Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde eine Differenzierung der verwendeten 13 *C. sativa*-Sorten aufgrund von Unterschieden bezüglich der Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin als auch aufgrund der Gesamtkonzentration an Phytoalexin durchgeführt. Um diese Differenzierung durchführen zu können, mussten die Faktoren und die Bedingungen, von denen die Phytoalexinproduktion abhängig ist, näher betrachtet werden. Zu diesen Faktoren gehören bei *C. sativa* u.a. das Entwicklungsstadium der Pflanzen, der verwendete Elicitor, die Temperatur und die Akkumulation der Phytoalexine. Auch auf eine breite Streuung der Herkünfte wurde geachtet. Die gute Differenzierung der Sorten wäre ohne diese vorbereitenden Untersuchungen nicht möglich gewesen. Bezüglich der Temperaturabhängigkeit müssen weitere Untersuchungen an *C. sativa* und an anderen Pflanzen-Arten durchgeführt werden. Speziell wäre hier die Induktionswirkung von Temperaturänderungen, die sich in dieser Untersuchung angedeutet hat, zu nennen.

In dieser Untersuchung wurde die Differenzierung von 13 *C. sativa*-Sorten anhand von Phytoalexinen durchgeführt. Ohne Zweifel besteht zwischen dem Vorhandensein von Phytoalexinen und der Hemmung von Pathogenen sowohl in-vitro als auch in-vivo ein Zusammenhang. Dies konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden (u.a. Tverskoy et al., 1991; Jejelowo et al., 1991; Tsuji et al., 1992; Lo et al., 1996; Khirbat & Jalali, 1998; Zheng & Ramirez, 1999). Welchen Stellenwert Phytoalexine bei der Abwehr von Pathogenen bei Pflanzen haben, ist im Einzelfall schwierig zu sagen, da die Abwehrreaktion ein komplexer Vorgang ist, der aus einer Vielzahl von Komponenten besteht, die zusammen in ihrer Kombination wirken (Elstner et al., 1996; Schlösser, 1997). Wenn das induzierbare Abwehrsystem von *C. sativa* bzw. auch anderer Pflanzen zur Beurteilung von Resistenzen verwendet werden soll, so sollten hier möglichst viele Komponenten der Abwehrreaktion berücksichtigt werden. Bei *C. sativa* könnte noch das von Conn et al (1994) in der Wurzel nachgewiesene Phytoalexin (wird im Zusammenhang mit einer *R. solani*-Resistenz diskutiert) mit in eine Sortendifferenzierung einbezogen werden.

Zusätzlich könnten im Fall von *C. sativa*, nach entsprechenden Untersuchungen, weitere Komponenten des Abwehrsystems wie die PR-Proteine und das PR-1 Gen (Indikator für die SAR) zur Sortendifferenzierung verwendet werden. Dabei könnte an verschiedene

Untersuchungen von *A. thaliana* angeknüpft werden (u.a. Tsuji et al., 1992; Pieterse et al., 1996; Glazebrook et al., 1996; Reuber et al., 1998; Cameron et al., 1999). Hieraus würden sich weitere Aspekte für die Sortendifferenzierung ergeben. So ist die Reaktionszeit der Pflanze auf einen Pathogenbefall von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Abwehr (Elstner et al., 1996; Schlösser, 1997). Weiter könnten der Einfluss von z.B. Entwicklungsstadium und Temperatur auf die Abwehrreaktion genauer untersucht werden.

Als weiterer Faktor, der in der vorliegenden Untersuchung konstant gehalten wurde, kann die Nährstoffversorgung der Pflanzen angeführt werden. Hier müsste die Abhängigkeit der Phytoalexinproduktion von verschiedenen unterschiedlich zusammengesetzten Nährstoffgaben auch mit Blick auf eine Sortendifferenzierung untersucht werden. Es könnten sich Zusammenhänge zwischen der Phytoalexinproduktion (induziertes Abwehrsystem) und der Nährstoffversorgung ergeben, die für die Züchtung und den Anbau von Kulturpflanzen eine große Bedeutung haben könnten.

Für die Übertragbarkeit, der in der vorliegenden Untersuchung vorgenommenen Sortendifferenzierung auf Anfälligkeitsunterschiede von *C. sativa* gegenüber *P. parasitica*, wurden erste Hinweise gefunden (Föller, 2000). Die Anfälligkeit korreliert anscheinend mit der Konzentration an Methoxycamalexin (5.3). In weiterführenden Untersuchungen müsste geklärt werden, inwieweit die Konzentration an Phytoalexinen in qualitativer und quantitativer Hinsicht einen Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Beziehung zwischen *C. sativa* und weiteren bedeutenden Pathogenen (z.B. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*) hat. Dies kann z.B. anhand von Inokulationsversuchen mit verschiedenen Krankheiten unter Klimakammerbedingungen, unter Berücksichtigung der Aktivierung des Abwehrsystems mit BION[®] und gleichzeitiger Messung der Konzentration an Phytoalexinen (Abwehrreaktionen) erfolgen.

Weiter kann davon ausgegangen werden, dass die induzierte Resistenz gegen *P. parasitica* nicht allein auf eine erhöhte Konzentration an Phytoalexin (Methoxycamalexin) bei *C. sativa* begründet werden kann, sondern das noch andere Komponenten des Abwehrsystems beteiligt sind.

Werden die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Ergebnisse bezüglich der induzierbaren Resistenz auf das Freiland übertragen, so könnte bei einem Anbau von *C. sativa* als nachwachsender Örohstoff Pflanzenaktivatoren wie z.B. BION[®] eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit einer fungizidfreien bzw. fungizidreduzierten Kulturführung

zukommen. Die Präimmunisierung von Kulturpflanzen wurde schon vielfach mit Erfolg angewandt. So wird beim Tomatenanbau unter Glas vielfach eine Behandlung mit einem Impfvirus zur Immunisierung der Tomatenpflanzen gegen die Mosaik-Krankheit durchgeführt (Krieg & Franz, 1989). Siegrist et al. (1997) konnte nach Vorbehandlung von Buschbohnen mit BION[®] eine Wirkung gegen verschiedene Erreger (*Uromyces appendiculatus*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) beobachten.

In den Versuchen zur Akkumulation wurde festgestellt, dass im Rosettenstadium bereits 2 Tagen nach der Behandlung mit BION[®] eine erhöhte Phytoalexinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde. Die erhöhte Konzentration hält bis zu 20 Tage nach der Behandlung an. Aufgrund der Untersuchungen von Jejelowo et al. (1991) kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Konzentrationen zumindest gegen *A. brassicae* eine Resistenz bewirken. Inwieweit die gefundenen Phytoalexinkonzentrationen repräsentativ für eine allgemeine Immunisierung der Pflanzen gegen verschiedene Krankheiten angesehen werden kann, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Weiter müsste geklärt werden, inwieweit die energetische Belastung von *C. sativa* durch die Präimmunisierung eine Ertragsrelevanz hat. Hierauf basierend könnte dann der Einsatz von Pflanzenaktivatoren speziell bei *C. sativa* einer ökonomischen Betrachtung unterzogen werden.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Aspekte wurde verdeutlicht, dass potentiell die Möglichkeit besteht, das induzierte Abwehrsystem mit in die züchterische Bearbeitung von *C. sativa* (Kulturpflanzen) zu integrieren. Die Bearbeitung müsste in einer Optimierung der Induzierbarkeit des Abwehrsystems durch Pathogene bzw. Induktoren, kombiniert mit dem Umfang der Abwehrreaktion unter Einbeziehung des Energiehaushaltes (Ertrag) der Kulturpflanzen bestehen. So könnten polygene Resistenzen mit einem angemessenen Aufwand erzeugt werden, bei denen die meisten Resistenzfaktoren bekannt sind. Das Ziel wäre die Reduzierung (Verzicht) von Fungizidmaßnahmen, bzw. die Kombination von Fungiziden mit resistenzinduzierenden Elicitoren. Hier ergeben sich neue Aspekte für den integrierten und den ökologischen Landbau.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Differenzierung von 13 unterschiedlichen *Camelina sativa*- Sorten/Linien anhand der gebildeten Phytoalexine nach Induktion mit einem Elicitor.

- 1) Hierfür wurde ein Analysenverfahren zur gleichzeitigen Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin in *C. sativa* optimiert. Die Extraktion wurde mit Hilfe einer Mikrowellenbehandlung in Methanol, die Festphasenextraktion mit C-18 Material durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit der RP-HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor.

Die Wiederfindungsrate des Verfahrens lag bei über 75 %.

Mit dem optimierten Verfahren ist eine einfache und zeitsparende Analyse von Camalexin und Methoxycamalexin aus frischem Pflanzenmaterial möglich. Das Analysenverfahren ist für die Durchführung von Serienuntersuchungen gut geeignet.

Mit dem optimierten Analysenverfahren wurden verschiedene Fragestellungen bezüglich der Phytoalexinproduktion von *Camelina sativa* bearbeitet, welche die Grundlagen zur Durchführung der Untersuchung zur Sortendifferenzierung anhand der Phytoalexinkonzentration bildeten.

- 2) Zur Induktion der Phytoalexinproduktion unter Gewächshaus- und Klimakammerbedingungen wurden verschiedene Elicitoren (*Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, Silbernitrat, Kupferchlorit, BION[®]) verglichen, wobei sich herausstellte, dass der Pflanzenaktivator BION[®] aufgrund der Unkompliziertheit bei der Anwendung und seiner guten Pflanzenverträglichkeit am besten geeignet war.
- 3) Zu den Entwicklungsstadien Keimblatt, Rosette, Schossen und Knospe wurde an Pflanzen einer dänischen Zuchtlinie mit BION[®] die Phytoalexinproduktion induziert. Zu den Stadien Keimblatt und Rosette wurden die höchsten Phytoalexinkonzentrationen (Camalexin und Methoxycamalexin) gemessen. Zum Schossen war die Konzentration um 50 % verringert. Im Knospenstadium waren keine Unterschiede mehr zur Kontrolle vorhanden.
- 4) An der Sorte Bavaria wurde die Akkumulation von Camalexin und Methoxycamalexin nach Behandlung mit BION[®] im Rosettenstadium untersucht. Nach 2 Tagen war ein Anstieg der Konzentration im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die Konzentration stieg bis 8 Tage nach der Behandlung auf über 5500 µg/kg Frischmasse an (Abb. 18). Nach 11 Tagen war ein Abfall auf 3000 µg/kg Frischmasse zu beobachten. Dieses Niveau blieb dann bis zum Versuchsende nach 22 Tagen erhalten. In der Kontrolle lagen die

Konzentrationen zwischen 50 und 200 µg/kg Frischmasse. Die Konzentration an Camalexin und Methoxycamalexin war bei dieser Sorte ungefähr gleich hoch.

- 5) 13 *C. sativa*-Sorten/Linien wurden unter drei unterschiedlichen Temperaturregimen inkubiert. 17 Tage nach Behandlung mit BION[®] wurden die Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin verglichen. Der Temperaturbereich lag zwischen 24 und 6 °C. Es wurde eine negative Korrelation zwischen Temperatur und Konzentration an Phytoalexinen festgestellt. Zwischen den verwendeten Sorten/Linien traten sowohl Unterschiede bezüglich der Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin als auch Unterschiede bezüglich der Gesamtkonzentrationen an Phytoalexin auf. Anhand der Messdaten wurden verschiedene Differenzierungen der 13 Sorten/Linien durchgeführt.
- 6) Zusätzlich wurden Untersuchungen auf das Vorhandensein weiterer mit BION[®] induzierbarer bioaktiver Substanzen an *Camelina sativa* durchgeführt. Hierbei wurde eine Fraktion erhalten, die eine wachstumshemmende Wirkung auf *A. brassicae* hatte. Die biowirksame Komponente konnte nicht identifiziert werden, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um ein Artefakt handelt.
- 7) Weiter wurde bei diesen Untersuchungen eine durch BION[®] induzierbare nicht biowirksame Substanz gefunden. Hier könnte es sich um ein Stoffwechselprodukt der Camalexin- (Methoxycamalexin) Synthese handeln.

HPLC-Analysis of Phytoalexins to differentiate various *Camelina sativa* (L.) Crtz.-cultivars

Summary

The purpose of this investigation was to differentiate 13 cultivars/breeding lines of *Camelina sativa* based on the concentration of phytoalexins after induction with an elicitor. To realize this:

1. A method was optimized to simultaneously analyze the *C. sativa* phytoalexins Camalexin and Methoxycamalexin. The extraction was accomplished with a microwave treatment in Methanol. C-18 material was used to clean the sample. The quantification of phytoalexins was performed using HPLC equipped with a fluorescence detector. Using the optimized method, simple and time saving analyses of Camalexin and Methoxycamalexin in serial investigations from fresh plant material were possible. The recovery rate was approximately 76 %.

The optimized method was used to examine the production of phytoalexins in *C. sativa*. These examinations were necessary to create a foundation of information. Based on this foundation it was possible to differentiate the cultivars/breeding of *C. sativa*.

3. Different elicitors (*Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, AgNO₃, CuCl₂, BION[®]) were compared with regard to their applicability to induce phytoalexin production in *C. sativa* under greenhouse and climatic chamber conditions. The plant activator BION[®] proved to have the best potential. The application of this elicitor was uncomplicated and assimilation by the plants was good.
3. At different development stages (cotyledon stage, rosette, stem extension, flower bud development) of one breeding line from Denmark, the phytoalexin production was induced with BION[®] and the concentrations were analyzed. The highest concentrations were detected at the cotyledon and rosette stages. Compared to this stages the concentration of phytoalexins was approximately 50 % lower at the stem extension stage. At flower bud development stage there were no differences noted compared to the control, treated with tap water.
4. An investigation was accomplished concerning the accumulation of phytoalexins in the cultivar Bavaria at the rosette stage after treatment with BION[®]. Two days after

treatment with BION[®] there was an increased concentration noted compared to the control. Eight days after treatment, an increase of phytoalexin concentration to more than 5500 µg/kg fresh matter was observed (Abb. 18). However, after 11 days a decrease to 3000 µg/kg fresh matter was determined. This level remained constant until the end of the investigatory period (22 days).

5. 13 *C. sativa* cultivars/breeding lines were cultivated. In the rosette stage the plants were treated with BION[®] and then incubated at three different temperatures. 15 days after treatment the concentration of phytoalexin (Camalexin and Methoxycamalexin) was determined. There was found a negative correlation between the temperature and the concentration of phytoalexin. The higher temperatures caused a lower amount of phytoalexins, whereas the colder temperature caused a higher amount of phytoalexin. The investigated cultivars/breeding lines showed differences regarding the concentration of Camalexin and Methoxycamalexin and the total phytoalexin. Based on the results, it was possible to differentiate the 13 *C. sativa* cultivars/breeding lines.
6. Additional investigations were carried out to determine whether other inducible bioactive compounds in *C. sativa* were present. One of the obtained fractions (contains no Camalexin or Methoxycamalexin) showed growth inhibiting bioactivity on *A. brassicae*. The bioactive compound could not be identified because the amount was too small. Furthermore, it can not be excluded that the compound is an artifact.
7. Furthermore, an inducible compound which showed no bioactivity was detected. Probably, it is a product of the indolic-synthesis-pathway.

7 Literaturverzeichnis

- Adam, L. & Somerville, S.C. 1996: Genetic characterisation of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 9 (3), 341-356.
- Alexander, D.; Goodman, R.M.; Gut-Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl-Goy, P.; Luntz T.; Ward E.; Ryals, J. 1993: Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. **90**, 7327-7331.
- Baily, J.A. & Mannsfield, J.W. 1982: *Phytoalexins*. Black & Sons, Glasgow, Scotland.
- Barker, S. A.; Long, A. R.; Short, C. R. 1989: Isolation of drug residues from tissue by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography* **475**, 353-361.
- Becker, H. 1993: *Pflanzenzüchtung*. UTB Verlag Stuttgart.
- Bramm, A.; Dambroth, M.; Schulte-Körne, S. 1990: Ertragsanalytische Untersuchungen an Lein, Leindotter und Mohn. *Landbauforschung Völkerode* **40**, 107-114.
- Brinker, K. 1999: Auftreten, Bedeutung und Kontrolle von Schaderregern einschließlich Unkräutern an Leindotter (*Camelina sativa* (L.) Crtz.), Dissertation.
- Browne, L.M.; Conn, K.L.; Ayer, W.A.; Tewari, J.P. 1991: The Camalexins: New Phytoalexins produced in the leaves of *Camelina sativa* (Cruciferae). *Tetrahedron* Vol.**47**, No. 24, pp. 3909-3914.
- Cameron, R.K.; Paiva, N.L.; Lamb C.J.; Dixon R.A. 1999: Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**. 121-130.
- Conn, K. L.; Browne, L. M.; Tewari, J. P.; Ayer, W. 1994: Resistance to *Rhizoctonia solani* and presence of antimicrobial compounds in *Camelina sativa* roots. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology* Vol.**3**, 125-130.
- Conn, K. L.; Jejelowo, O. A.; Tewari, J. P.; Bain, P. S. 1991: *Camelina sativa* phytoalexins (camalexin and methoxycamalexin) provide resistance against *Alternaria brassicae*. *Canadian Journal of Plantpathology*, Vol. **13** pp. 274.

- Delaney, T.P.; Uknes, S.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Weymann, K.; Negrotto, D.; Gaffney, T.; Gut-Rella, M.; Kessmann, H.; Ward, E.; Ryals, J. 1994: A central role of Salicylic Acid in plant disease resistance. *Science* Vol. **266**, 1247-1250.
- Dudler, R. 1997: Krankheitsresistenz bei Pflanzen. *Bulletin de la Société Botanique Suisse Botanica Helvetica* **107** (2), 151-170.
- Ebhardt, O. 1925: Leindotteranbau. Dt. Lw. Presse (DLP) Berlin **52**, 198.
- Elstner, E.F.; Oßwald, W.; Schneider, I. 1996: *Phytopathologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford.
- Fenwick, G. R.; Heaney, R. K.; Mullin, W. J. 1983: Glucosinolates and their breakdown products in food and foodplants. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. and Nutrit.* **18**, 123.
- Föller, I.; Henneken, M.; Paul, V.H. 1998: Occurrence of false flax disease (*Camelina sativa* (L.) Crtz.) in field trials in Germany in 1995 and 1996. *IOBC Bulletin* Vol. **21** (5), 65-76.
- Föller, I. 2000: Dreijährige Felduntersuchungen von Leindotter (*Camelina sativa* (L.) Crtz.) auf Krankheiten unter besonderer Berücksichtigung von Falschem Mehltau (*Peronospora parasitica* (Pers.) Fr.), Dissertation.
- Frehse, H. & Thier H.P. 1991: Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept. *GIT Fachz. Lab.* **4**, 285-291.
- Friedt, W.; Büchsenhütz-Nothdurft, A.; Bickert, C.; Schuster, A. 1994: Züchterische und produktionstechnische Bearbeitung von Lein und Leindotter im Hinblick auf eine Verwendung als nachwachsender Rohstoff. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **30**, 158-172.
- Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Rella, M. G.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J.P.; Kessmann, H.; & Ryals, J. 1996: A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance to tobacco. *Plant Journal* **10**, 61-70.
- Funke, W.; Dammann, V. & Donnevert G. 1992: *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Gaunt, R.E. 1995: The relationship between plant disease severity and yield. *Annual Review of Phytopathology* Vol. **33**, 119-144.

- Gaunt, R.E & Bryson R.J. 1995: Plant and crop yield potential and response to disease. *Aspects of Applied Biology* **42**, 1-7.
- Glazebrook, J.; Rogers E.; Ausubel F.M. 1996: Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.
- Glazebrook, J.; Zoog, M.; Mert, F.; Kagan, I.; Rogers, E.E.; Crute, I.R.; Holub, E.; Hammerschmidt, R.; Ausubel, F.M. 1997: Phytoalexin-Deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 Encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to Downy Mildew resistance. *Genetics* **146**, 381-392.
- Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K. H.; Oostendrop, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessmann, H.; & Ryals, J. 1996: Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**, 629-643.
- Grigson, G. 1960: Gold of Pleasure. In :The Englishman's Flora, Phoenix House LTD, London, 64.
- Gross, D. 1993: Phytoalexins of the Brassicaceae review. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **100** (4), 433-442.
- Hammerschmidt, R. 1999: Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 77-84
- Harborne, J. B. 1999: The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical systematics Ecology* **27**, 335-367.
- Henneken M.; Föller I.; Paul V.H. 1998: First Laboratory investigations on the reaction of cultivars and breeding lines of *Camelina sativa* (L) Crtz. to downy mildew (*Peronospora parasitica* (syn.: *P.camelina*) clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and verticillium wilt (*Verticillium dahliae*). *IOBC Bulletin* Vol. **21** (5), 77-84.
- Higuera, B.L.; de Gómez, V.M.; 1996: Contribution of HPLC to the study of defence mechanisms acting in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) roots on infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *HRC: Journal of High Resolution Chromatography* **19** (12), 706-708.
- Hoffmann, G.M.; Nienhaus, F.; Poehling, H.M.; Schönbeck, F.; Weltzien, H.C.; Wilbert, H. 1994: *Lehrbuch der Photomedizin*. 3 Auflage Blackwell-Wissenschafts-Verlag Berlin

- Honermeier, B. & Agegnehu, M. 1994a: Zur Anbaueignung von Sommerleindotter (*Camelina sativa* Crtz). Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. **7**, 331-334.
- Jamieson, J. & Dunkan, H. J. 1989: Determination of thiabendazole residues in potatoes using high pressure liquid chromatography. Potato Research **32**, 123-126.
- Jeandet, P.; Breuil, A. C.; Adrian, M.; Weston, L. A.; Debord, S.; Meunier, P.; Maume, G.; Bessis, R. 1997: HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. Analytical-Chemistry-Washington. **69** (24), 5172-5177.
- Jejelowo, O.A., Conn K.L., Tewari J.P. 1991: Relationship between conidial concentration, germling growth, and phytoalexin production by *Camelina sativa* leaves inoculated with *Alternaria brassicae* Mycol. Res **95** (8), 928-934
- Keen, N.T. 1978: Phytoalexins: efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. Phytopathology **68**, 1237-1239.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P.; Fritig, B. 1987: Biological function of „pathogenesis-related“ proteins: Four PR proteins of tobacco have 1,3-â-glucanase activity. Embo J. **6**, 3209-3212.
- Khirbat S.K. & Jalaly B.L. 1998: Production of phytoalexin in the leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) after inoculation with *Ascochyta rabiei*. Legume Reserch, **21** (3/4), 135-143.
- Kim, K. H. & Matsuyama 1998: A novel formed in mulberry leaves at the infection of *Phloeospora maculans*, causal agent of leaf spot. J. FAC. Agr., Kyushu Univ., **43** (1-2), 89-93.
- Kollmann, A.; Rouxel, T.; Bousquet, J. F. 1989: Efficient clean up of non aqueous extracts using reversd-phase cartridges. Journal of Chromatography **473**, 293-300.
- Knörzer, K. H. 1978: Entwicklung und Ausbreitung des Leindotters. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **91**, 187-195.
- Krieg, A. & Franz, J.M. 1989: Lehrbuch der biologischen Schädlingsbekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin - Hamburg:
- Laun, N. 1997: Induced resistance: first experiments with Bion in vegetables. Gemüse München **34** (5), 294-297.

- Lawton, K.A.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T. & Ryals, J. 1996: Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* **19**, 71-82.
- Leadbeater, J.A.; Oostendrop, M.; Rues W. 1997: Optimising the inducers of host resistance. *Aspects of Applied Biology* **50**, 271-278.
- Legrand, M.; Kauffmann, S.; Geoffroy, P. & Fritig, G. 1987: Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6750-6754.
- Lo S.C.; Weiergang I.; Bonham C.; Hipskind J.; Wood K.; Nicholson R.L. 1996: Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**, (1), 21-31.
- Long, A. R.; Hsieh, L.C.; Malbrough, M.S.; Short, C.R.; Barker, S.A.. 1989: Multiresidue method for isolation and liquid chromatographic determination of seven benzimidazole anthelmintics in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* Vol. **72**, (5), 739-741.
- Lucas, J.A. 1999: Plant immunisation. From myth to SAR. *Pesticide Science* **55**, 193-196.
- Mansfeld, R. 1986: Camelina. In: *Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen)*, Schultze-Motel, J. (Ed.), Springer Verlag Berlin, 281-284.
- Métraux, J.P.; Ahl-Goy, P.; Staub, T.; Speich, J.; Steinemann, A.; Ryals, J. & Ward, E. 1991: Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction*. Hennecke H. & Verma D. P. S., eds. Dordrecht: Kluver, 432-439.
- Mhiri, C.; Morel, J.; Vernhettes, S.; Casacuberta J.M.; Lucas, H.; Grandbastien M. 1997: The promoter of tobacco Tnt 1 retrotransposon is induced by wounding and abiotic stress. *Plant Molecular Biology* **33**, 257-266.
- Müller, K. O. & Börger, H. 1940: Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land. Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* **23**, 189-231.

- Osbourn, A. E. 1999: Antimicrobial phytoprotectments and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology* **26**, 163-168.
- Perkow, W. & Ploss, H. 1999: Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. 3. Auflage Parey Buchverlag Berlin.
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees S. C. M.; Van Pelt J. A.; Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, H.; Wiesbeek, P. J.; Van Loon L. C. 1998: A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. **10**, 1571-1580.
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees S. C. M.; Van Pelt J. A.; Trijssenaar, A.; Van't Westende Y. A. M.; Bolink, E. M.; Van Loon L. C. 1996: Systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by biocontrol bacteria. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **61** (2a) 209-220.
- Regel, C. 1940: In Mitteleuropa wildwachsende und angebaute Ölpflanzen. *Angewandte Botanik* **22**, 400-413.
- Reuber, T. L.; Plotnikova, J. M., Dewdney, J.; Rogers, E. E.; Wood, W.; Ausubel F. M. 1998: Correlation of defence gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *The Plant Journal* **16** (4), 473-485.
- Rogers, E.E.; Glazebrook, J.; Ausubel, F. M. 1996: Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Molecular-Plant-Microbe-Interactions* Vol. **9** (8), 748-757.
- Rouxel, T.; Kollmann, A.; Boudlard ; L. and Mithen, R. 1991: Abiotic elicitation of indole phytoalexins and resistance to *Leptosphaeria maculans* with Brassiceae. *Planta* **184**, 271-278.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. S.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H. Y.; Hunt, M.D. 1996: Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* Vol. 8, 1809-1819.
- Ryals, J.; Laawton, K.A.; Deleany, T.P.; Friedrich, L.; Kessmann, H.; Neuenschwander, U.; Uknes, S.; Vernooij, B.; Weymann K. 1995: Signal transduktion in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Sci. USA* **92**, 4202-4205.
- Schlösser, E. 1997: Allgemeine Phytopathologie. Thieme Verlag Stuttgart.
- Schultze-Motel, J. 1979: Die Anbaugeschichte des Leindotters, *Camelina sativa* (L.) Crantz. In: Körber-Grohne, U. (Ed.), Festschrift Maria Hoff, *Archeo-Physika* **8**. Habelt, Bonn. 267-281.

- Schuster, A. & Friedt, W. 1994: Qualitätsmerkmale von Leindotter (*Camelina sativa* (L.) Crtz.). VDLUFA - Schriftenreihe, Kongreßband 1994, 875-878
- Schuster, A. 1997: Vergleichende produktionstechnische, qualitative und züchterische Untersuchungen an Leindotter (*Camelina sativa* (L.) Crtz.). Giessen (Germany) Wissenschaftlicher Fachverlag, 133 p.
- Schwedt, G. 1995: Analytische Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Shulaev, V.; Silverman, P. & Raskin, I. 1997: Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* (London) **385**, 718-721.
- Siegrist, J.; Glenewinkel, D.; Kolle, C.; Schmidtke, M. 1997: Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. *Journal of Plant Disease and Protection* **104** (6), 599-610.
- Slusarenko, A.J.; Longland, A.C.; Whitehead, I. M. 1989: A convenient and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. *Botanica Helvetica* **99** (2) 203-207.
- Stork M. & Sacristán M.D. 1995: The role of Phytoalexin in seedling resistance to *Leptophaeria maculans* in some Crucifers. *Z. Naturforsch.* **50c**, 15-20.
- Strasburger, E.; Noll, F.; Schenck, H.; Schimper, A.F.W. 1993: Lehrbuch der Botanik 32. Auflage Gustav Fischer Verlag.
- Strasil, Z. & Skala, J. 1995: Effects of locality, N-fertilization and crop density on production and quality of *Camelina sativa* seeds. *Fragmenta Agronomica* **12**, 44-45.
- Tewari, J.P. 1991: Current understanding of resistance to *Alternaria brassicae* in cruciferes. 8Th International Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada, p. 471-476.
- Thulke, O. & Conrath, U. 1998: Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The plant journal* **14** (1), 35-42.
- Tsuji, J.; Jackson, E.P.; Gage, D.A.; Hammerschmidt, R.; and Somerville, S.C. 1992: Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* **98**, 1304-1309.

- Turk, F.M.; Bennett, M.H.; Glazebrook, J.; Mansfield, J.W. and Holub E.B. 1998: Biotic and abiotic elicitation of Camalexin in phytoalexin-deficient (PAD) mutants and several wild-type accession of *Arabidopsis*. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland August 1998.
- Tverskoy L.; Dmitriev A.; Kozlovsky A.; Grodzinsky D. 1991: Two phytoalexins from *Allium cepa* bulbs. *Phytochemistry* **30** (3), 799-800.
- Unkes, S.; Winter, A.M.; Delaney, T.; Vernooij, B.; Morse, A.; Friedrich, L.; Nye, G.; Potter, S.; Ward, E.; and Ryals, J. 1993: Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 692-698.
- Van den Ende, G. 1969: Phytoalexin-Bildung bei der Wechselwirkung zwischen *Sclerotinia fructicola* und Wirtsgewebe. *Phytopathologische Zeitschrift* **64**, 68-76
- Van Loon, L.C. 1997: Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 753-765.
- Volko, S.M.; Boller, T. & Ausubel, M. 1998: Isolation of new *Arabidopsis* mutants with enhance disease susceptibility to *Pseudomonas syringae* by direct screening. *Genetics* **149**, 537-548.
- Wellie-Stephan, O. 1995: Leindotter – Wiederentdeckung einer vergessenen Kulturpflanze. *DSV-Magazin Innovation* **1**, 22-23.
- Woloshuk, C.P.; Meulenhoff, J.S.; Sela-Buurlage, M.; Van den Elzen, P.J.M.; Cornelissen, B.J.C. 1991: Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* **3**, 619-628.
- Zhang, W.; Han, D.Y.; Dick, W.A.; Davis, K.R.; Hoitink, H.A.J. 1998: Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in Cucumber and *Arabidopsis*. *Phytopathology* **88** (5), 450-455.
- Zhao, J. M.; Williams, C.C.; Last, R. L. 1998: Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant-Cell* **10** (3), 359-370.
- Zhao, J. M. & Last, R. L. 1996: Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8** (12), 2235-2244.

- Zheng J. & Ramirez V.D. 1999: Piceatannol, a stilbene phytochemical, inhibits mitochondrial F₀F₁-ATPase activity by targeting the F₁ complex. *Biochemical and Biophysical Communication* **261**, 499-503.
- Zook, M. & Hammerschmidt, R. 1997: Origin of the thiazole ring of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **113** (2), 463-468.
- Zook, M.; Leege, L.; Jakobson, D.; Hammerschmidt, R, 1998: Camalexin accumulation in *Arabis lyrata*. *Phytochemistry* **49** (8), 2287-2289.
- Zubr, J. 1992: New vegetable oil for food application. *Agrofoodindustry-Hi-Tech*. Milan, Italy : Teknoscienze. July/Aug 1992. **3** (4), 24-26.
- Zubr, J. 1997: Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Industrial Crops and Products* **6** (2), 113-119
- Zubr, J. 1998: Individual Progress Report 1997 "Alternative oilseed-crop *Camelina sativa*" Contract AIR3-CT94-2178.

8 Anhang

Tab. A 20: Messreihe zur Bestimmung der Emissionswellenlängen von Methoxycamalexin bei einer Extinktionswellenlänge von 318 und 324 nm.

Extinktion: 324 nm		Extinktion 318 nm		Extinktion 318	
Methoxycamalexin		Methoxycamalexin		Camalexin	
Wl. (nm)	Em (mV*s)	Wl. (nm)	Em (mV*s)	Wl. (nm)	Em (mV*s)
359,6	10,67265	359,6	12,28644	359,6	16,04709
361,5	10,87660	361,5	12,31636	361,5	16,06804
363,4	11,01981	363,4	12,35181	363,4	15,95381
365,3	11,08704	365,3	12,29455	365,3	15,82655
367,2	11,19963	367,2	12,26740	367,2	15,61961
369,1	11,23042	369,1	12,15834	369,1	15,32634
371,0	11,28018	371,0	12,03001	371,0	15,05017
372,9	11,22029	372,9	11,89507	372,9	14,63939
374,8	11,22889	374,8	11,73412	374,8	14,23323
376,7	11,13409	376,7	11,56626	376,7	13,82177
378,6	11,08000	378,6	11,32253	378,6	13,34088
380,5	10,91662	380,5	11,07875	380,5	12,79989
382,4	10,76303	382,4	10,77639	382,4	12,25485
384,3	10,54134	384,3	10,48974	384,3	11,72476
386,2	10,31097	386,2	10,14423	386,2	11,13239
388,1	10,09111	388,1	9,89482	388,1	10,64654
390	9,86354	390	9,58979	390	10,12981
391,9	9,55238	391,9	9,32477	391,9	9,65559

Die für die späteren Messungen verwendete Wellenlänge (384 nm) ist grau unterlegt. Zum Vergleich wurde Camalexinstandard bei einer Extinktionswellenlänge von 318 nm gemessen, Wl = Wellenlänge, Em = Emission.

Tab. A 21: Vergleich der k' -Werte (Retentionszeiten in min.) von Camalexin, Methoxycamalexin und UIS bei unterschiedlichen Zusammensetzungen des Eluenten nach Analyse von *C. sativa* mit der RP-HPLC.

				Kapazitätsfaktor (k') / Retentionszeiten (R min)					
Eluenten in % v/v/v				Methoxy.		Camal.		UIS	
MeCN	THF	pH 4	pH 8	K	R	K	R	K	R
40	-	-	60	5,25	12,5	5,8	13,6	-	-
40	-	60	-	4,9	11,8	5,4	12,8	6,7	15,4
45	-	55	-	3,65	9,3	4,05	10,1	5,35	12,7
42	5	53	-	3,25	6,7	2,6	7,2	3,05	8,1
35	5	60	-	4,3	10,6	4,8	11,6	5,85	13,7
34	5	61	-	4,8	11,6	5,3	12,6	6,45	14,9
32	5	63	-	6,05	14,1	6,7	15,4	8,25	18,5

MeCN = Acetonitril, MeOH = Methanol, THF = Tetrahydrofuran, pH 4 = Phosphatpuffer sauer mit pH 4, pH 8 = Phosphatpuffer basisch mit pH 8, Camal.=Camalexin, Methoxy. = Methoxycamalexin, UIS. = unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt. Die grau unterlegte Methode wurde für die späteren Messung verwendet.

Tab. A 22: Versuchsreihe zum Aufgeben von Camalexin mit verschiedenen Konzentrationen an Methanol und Acetonitril auf die C-18-Kartusche bei pH 8. Angegeben sind die ermittelten Peakflächen in mV*S vom Camalexin und die Rückgewinnungsrate in % für die später zu analysierende Fraktion nach der RP-HPLC Analyse. Eluiert wurde mit Acetonitril/Phosphat-Puffer pH 8 im Verhältnis von 70/30 (v/v).

Acetonitril in % (v/v)	20	25	30	35	40	50	Kontrolle
Peakfläche [mV*S]	9,7	10,7	9,7	10,8	5,1	0,1	11,5
Rückgewinnung in %	84,1	93,1	84,0	93,9	44,8	1,1	100
Methanol in % (v/v)	40	50	60	70	-	-	Kontrolle
Peakfläche [mV*S]	12,7	12,6	6,5	0,0	-	-	12,9
Wiederfindung in %	98,4	97,8	50,7	0,0	-	-	100

Tab. A 23: Ergebnisse der Versuchsreihe zur Ermittlung der Konzentration an Acetonitril bzw. Methanol und der Menge an Eluent zum Eluieren von Camalexin von der C-18 Kartusche. Dargestellt sind die Peakflächen der Camalexinkonzentration in mV*S. und in % bezogen auf die Kontrolle nach der RP-HPLC Analyse.

	Phosphatpuffer pH 4 MeOH 75 % v/v		Phosphatpuffer pH 4 MeOH 95 % v/v		Phosphatpuffer pH 4 MeCN 75 % v/v	
Fraktionen	Peakfläche [mV*S]	%	Peakfläche [mV*S]	%	Peakfläche [mV*S]	%
1) 1,5 ml	7,5	50,5	10,3	69,6	13,6	91,6
2) 1,5 ml	5,6	37,8	3,1	20,9	0,0	0,0
3) 1,5 ml	0,2	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Summme	13,3	89,9	13,4	90,5	13,6	91,6
Kontrolle	14,8	100	14,8	100	14,8	100

MeOH = Methanol, MeCN = Acetonitril

Tab. A 24: Eluieren von Camalexin von der C-18 Kartusche mit verschiedenen Konzentrationen an Acetonitril unter sauren Bedingungen. Dargestellt sind die Peakflächen in mV*S und in % bezogen auf die Kontrolle.

Phosphatpuffer pH 4 : Acetonitril in % (v/v)	60	70	80	Ko
Peakfläche [mV*S]	12,4	13,0	12,8	13,6
Rückgewinnung in %	90,7	96,0	94,4	100

Ko=Kontrolle

Tab. A 25: Konzentrationen an Camalexin, Methoxycamalexin und des UIS der *C. sativa*-Sorte 13 zu verschiedenen Entwicklungsstadien nach Behandlung mit BION®.

	Camalexin		Methoxycamalexin		UIS	
Variante	Ko	BION®	Ko	BION®	Ko	BION®
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
Pflanzenstadien						
Keimblatt	0,0	15,2	1,5	172,3	0,0	27,7
Rosette	0,0	20,0	0,0	210,6	0,0	56,1
Schossen	0,8	28,6	1,1	99,8	8,6	60,9
Knospe	0,5	5,9	2,0	60,9	1,9	4,6
GD _{5%}	-	9,9	-	44,1	-	17,0

Tab. A 26: Verlauf der Produktion von Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS nach der Behandlung von *C. sativa* mit BION® im Vergleich zur Kontrolle.

	Camalexin		Methoxycamalexin		UIS	
Variante	Kontrolle	BION®	Kontrolle	BION®	Kontrolle	BION®
Tage nach Induktion	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
2	53,2	496,4 ^d	5,6	107,3 ^e	4,6	13,0 ^d
5	n.a.	3203,7 ^b	n.a.	2255,8 ^{cd}	n.a.	130,2 ^c
8	184,7	5584,9 ^a	137,3	5901,5 ^a	19,4	734,0 ^a
11	n.a.	1856,5 ^b	n.a.	3325,6 ^{bc}	n.a.	401,3 ^b
14	190,3	2364,4 ^{bc}	152,7	3971,7 ^b	10,4	444,7 ^b
22	n.a.	2129,5 ^c	n.a.	1886,2 ^d	n.a.	381,9 ^b
GD _{5 %}		884,7		1166,6		177,8

n.a.= nicht analysiert

Tab. A 27: Summierte Konzentrationen an Camalexin und Methoxycamalexin der 13 *C. sativa*-Sorten bei drei Temperaturregimen.

Temperatur	11/6 °C	18/11 °C	24/16 °C
Sorte			
1	606,5	n.a.	54,7
2	853,9	583,3	113,5
3	178,3	84,7	17,0
4	209,1	163,0	5,1
5	491,4	312,6	42,4
6	644,1	373,3	36,7
7	235,6	103,2	98,6
8	358,4	175,9	7,4
9	821,2	341,0	48,1
10	127,5	26,7	127,5
11	1193,8	840,9	53,9
12	916,7	555,2	169,8
13	1108,7	193,3	124,7
Ko, 13	8,8	67,4	0,0
GD _{5%}	306,3	325,2	66,8

Ko=Kontrolle der Sorte 13, n.a.= nicht analysiert, *Sorte 1 wurde bei der Quantifizierung wegen eines Versuchsfehlers nicht berücksichtigt.

Tab. A 28: Ergebnisse der Quantifizierung von Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS von 13 *Camelina sativa*-Sorten, die bei 3 verschiedenen Temperaturregimen inkubiert wurden, n=3.

	Temperatur 11 /6 °C			Temperatur 18/11 °C			Temperatur 24/16 °C		
	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS
Sorte	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
1	432,6	173,9	36,9	n.a.	n.a.	n.a.	45,4	9,3	3,3
2	518,1	335,8	71,8	421,7	161,6	68,6	99,6	14,0	22,5
3	61,1	117,2	10,2	10,7	74,0	8,7	5,0	12,0	n.n.
4	99,7	109,5	7,8	71,8	91,2	10,3	1,7	3,4	n.n.
5	233,8	257,5	12,0	102,9	209,8	31,1	2,4	40,1	10,2
6	215,2	428,9	23,7	15,5	357,8	17,7	n.n.	36,4	7,6
7	87,4	148,2	9,8	7,7	95,6	5,41	31,5	67,1	2,6
8	219,3	136,2	7,3	107,3	68,6	9,1	2,3	5,1	n.n.
9	259,1	562,1	70,2	42,0	299,0	16,34	2,7	45,2	n.n.
10	25,5	102,0	4,2	2,1	24,6	1,2	38,3	89,3	4,5
11	512,5	681,3	109,3	331,2	509,7	67,5	n.n.	53,9	5,2
12	500,0	416,6	51,8	248,9	306,3	41,1	80,8	88,9	10,9
13	371,9	736,8	197,5	2,0	191,3	16,3	0,8	124,0	9,5
Ko (13)	5,1	3,7	n.n.	4,4	63,0	4,3	n.n.	n.n.	n.n.
GD_{5%}	162,0	127,4	33,4	179,2	174,7	29,2	56,0	40,9	8,7

n.a.= nicht analysiert, n.n.= nicht nachweisbar, alle Angaben in µg/kg Pflanzenfrischmasse. Die Quantifizierung vom Methoxycamalexin und von dem UIS erfolgten anhand des Camalexinstandards. Camal. = Camalexin, Metho. = Methoxycamalexin, UIS = unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt.

Tab. A 29: Übersicht über die aufgetretenen Signifikanzen (5%) bei der Quantifizierung von Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS von 13 *C. sativa*-Sorten, die bei 3 verschiedenen Temperaturregimen inkubiert wurden

	Temperatur 11 /6 °C			Temperatur 18/11 °C			Temperatur 24/16 °C		
	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS
Sorte									
1	a	e,f	d,e,f	n.a.	n.a.	n.a.	a,b,c	e,f	b,c
2	a	c,d	c	a	c,d	a	a	d,e,f	a
3	d,e	f,g	f,g	c	d	c,d	c	d,e,f	c
4	c,d,e	f,g	f,g	b,c	d	c,d	c	f	c
5	b,c,d	d,e	f,g	b,c	b,c,d	b,c	c	c,d,e,f	b
6	b,c,d	c	f,g	c	a,b	b,c	c	c,d,e,f	b,c
7	e,d	E,f	f,g	c	d	c,d	b,c	b,c	b,c
8	b,c,d	E,f	f,g	b,c	d	c,d	c	e,f	c
9	b,c	b	c,d	c	b,c	b,c,d	c	c,d,e	c
10	e	f,g	f,g	c	d	d	b,c	a,b	b,c
11	a	a,b	b	a	a	a	c	b,c,d	b,c
12	a	c	c,d,e	a,b	b,c	a,b	a,b	a,b	b
13	a,b	a	a	c	b,c,d	b,c,d	c	a	b
Ko (13)	e	g	g	c	d	c,d	c	e	c

Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich jeweils nur auf eine Substanz eines Temperaturregimes der 13 Sorten. Camal. = Camalexin, Methox. = Methoxycamalexin, UIS = unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt.

Tab. A 30: Prozentualer Anteil der analysierten Phytoalexine (Summe von Camalexin und Methoxycamalexin) von 13 *C. sativa*-Sorten.

Temperatur	11/6 °C	18/11 °C	24/16 °C
Sorte	%	%	%
1 *	91,7	n.a.	8,3
2	55,1	37,6	7,3
3	63,7	30,3	6,1
4	55,4	43,2	1,3
5	58,1	36,9	5,0
6	61,1	35,4	3,5
7	53,9	23,6	22,5
8	66,2	32,5	1,4
9	67,9	28,2	4,0
10	45,3	9,5	45,3
11	57,2	40,3	2,6
12	55,8	33,8	10,3
13	77,7	13,5	8,7
Ko (13)	11,5	88,5	n.n.

Ko=Kontrolle Sorte 13, n.a.= nicht analysiert, n.n.= nicht nachweisbar, *beim Temperaturregime 18/11 °C wurde die Sorte 1 aufgrund eines Versuchsfehlers nicht analysiert.

Tab. A 31: Prozentuale Anteile von Camalexin, Methoxycamalexin und dem UIS von 13 *C. sativa* Sorten bei drei unterschiedlichen Temperaturregimen.

	Temperatur 11/6 °C			Temperatur 18/11 °C			Temperatur 24/16 °C		
	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS	Camal.	Methox.	UIS
Sorte	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1 *	67,2	27,0	5,7	n.a.	n.a.	n.a.	78,4	16,0	5,6
2	56,0	36,3	7,8	64,7	24,8	10,5	73,2	10,3	16,6
3	32,4	62,2	5,4	11,4	79,2	9,3	29,4	70,6	0,0
4	45,9	50,5	3,6	41,4	52,6	5,9	33,3	66,7	0,0
5	46,5	51,2	2,4	29,9	61,0	9,0	4,6	76,0	19,5
6	32,2	64,2	3,6	3,9	89,2	6,9	0,0	82,8	17,2
7	35,6	60,4	4,0	7,1	87,9	5,0	31,1	66,3	2,6
8	60,0	38,0	2,0	58,0	37,1	4,9	31,4	68,6	0,0
9	29,1	63,1	7,9	11,7	83,7	4,6	6,0	94,0	0,0
10	19,3	77,5	3,2	7,5	88,3	4,2	29,0	67,6	3,4
11	39,3	52,3	8,4	36,5	56,1	7,4	0,0	91,2	8,8
12	51,6	43,0	5,3	41,7	51,4	6,9	44,8	49,2	6,0
13	28,5	56,4	15,1	1,0	91,2	7,8	0,6	92,3	7,1
Ko (13)	57,5	42,5	0,0	6,1	87,9	6,0	0,0	0,0	0,0

Camal. = Camalexin, Methox. = Methoxycamalexin, UIS = unbekanntes induzierbares Stoffwechselprodukt, Ko=Kontrolle Sorte 13, n.a.=nicht analysiert, * Die Sorte 1 wurde bei 18/11 °C aufgrund eines Versuchsfehlers nicht analysiert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Krohn gilt mein Dank für die Möglichkeit im Fachbereich 13 Chemie und Chemietechnik der Universität-Gesamthochschule-Paderborn promovieren zu können.

Bei Herrn Prof. V.H. Paul möchte ich mich für die Überlassung des Arbeitsplatzes in einer interessanten Atmosphäre, für die fachlichen und die nichtfachlichen fruchtbaren Diskussionen, seiner Bereitschaft konventionelle Fragestellungen mit unkonventionellen Methoden zu bearbeiten, sowie der Beteiligung an der Organisation von Finanzmitteln bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die aufschlussreichen Diskussionen über analytische Chemie.

Herrn Prof. Dr. J.P. Tewari (University Alberta, Edmonton, Kanada) danke ich für die guten fachlichen Diskussionen, welche zur Themenfindung und zum Gelingen der Arbeit zu einem großen Teil beigetragen haben.

Herrn Prof. W.A. Ayer (University Alberta, Edmonton, Kanada) danke ich für die schnelle und unkomplizierte Zusendung von 2 mg Camalexin.

Herrn Dr. Zubr danke ich für die Überlassung von drei züchterisch bearbeiteten vor der Sortenzulassung stehenden *Camelina sativa*-Linien.

Bei meinen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe LBQS für die gute und kreative Zusammenarbeit und die weiterführenden fachlichen Diskussionen.

Bei den Mitarbeitern von Prof. Dr. K. Krohn möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken

Bei den Mitarbeitern von Prof. Dr. M. Grote möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.