

Charakterisierung und Nutzung von bakteriellen *Quorum Sensing* Molekülen für die Weiterentwicklung eines umweltgerechten Pflanzenbaus

Characterization and exploitation of bacterial *Quorum Sensing* molecules for future plant production

FKZ: 11NA033

Projektnehmer:

Universität Gießen
Institut für Phytopathologie
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen
Tel.: +49 641 99 37491
Fax: +49 641 99 37499
E-Mail: Phyto@agrار.uni-giessen.de
Internet: www.uni-giessen.de

Autoren:

Kogel, Karl-Heinz; Schikora, Adam; Imani, Jafargholi

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

I. Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für Phytopathologie	Förderkennzeichen: 2811NA033
Vorhabensbezeichnung: Charakterisierung und Nutzung von bakteriellen <i>Quorum Sensing</i> Molekülen für die Weiterentwicklung eines umweltgerechten Pflanzenbaus	
Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2012 bis 31.12.2015	
Berichtszeitraum: 01.11.2012 bis 31.12.2015	
Kooperationspartner: Universität Hamburg Institut für Pharmazie	

Kurzfassung (Deutsch)

Charakterisierung und Nutzung von bakteriellen *Quorum Sensing* Molekülen für die Weiterentwicklung eines umweltgerechten Pflanzenbaus

Kogel KH, Schikora A, Imani J

Institut für Phytopathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Gießen; karl-heinz.kogel@agrar.uni-giessen.de

Die Aktivierung und Stärkung des pflanzlichen Immunsystems ist eine vielversprechende Alternative im Pflanzenschutz. Das Konzept umfasst eine Sensibilisierung (priming) der Kulturpflanzen gegenüber Pathogenen, die einen hohen Ernteertrag auch unter Pathogendruck gewährleistet. Bakterielle *quorum sensing* Moleküle haben die Eigenschaft, Pflanzen zu sensibilisieren und sind deshalb eine mögliche Ergänzung zum Einsatz von Pflanzenschutzmaßnahmen. Das Ziel dieses Vorhabens war es, Immunantwort und physiologische Veränderungen in wichtigen Kulturpflanzen, wie Gerste, Weizen, Tomaten und Luzerne nach einer Sensibilisierung mit QS Molekülen zu analysieren. Eingesetzt wurden einerseits langkettige Acyl-Homoserinlaktone, wie das oxo-C14-HSL, und andererseits nützliche, nicht-pathogene oxo-C14-HSL-produzierende Rhizobakterium, wie *Sinorhizobium meliloti* und *Rhizobium radiobacter* F4 (*RrF4*), das aus dem nützlichen Pilz *Piriformospora indica* isoliert wurde. Wir konnten eine oxo-C14-HSL-induzierte Resistenz von *Arabidopsis* Pflanzen demonstrieren und zeigen, dass diese Resistenzinduktion auf der Basis eines Salicylsäure/Oxylin-abhängigen systemischen Signal generiert wird. Darüber hinaus bewirkt eine oxo-C14-HSL Behandlung bei Gerste und Weizen eine verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und eine transkriptionelle Regulation verteidigungsrelevanter Genen. Die oxo-C14-HSL-induzierte Sensibilisierung bewirkt eine Verstärkung der Pflanzenzellwand und eine Abwehrreaktion in den Stomata, wodurch ein Eindringen von bakteriellen und pilzlichen Krankheitserregern und deren Proliferation in der Pflanze stark gehemmt werden. Zudem wurde überraschenderweise gefunden, dass oxo-C14-HSL auch die Vermehrung des humanpathogenen Erregers *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium in *Arabidopsis* verhindert. Dieser Effekt war starker ausgeprägt bei direkter Behandlung mit oxo-C14-HSL, während eine Behandlung mit oxo-C14-HSL-produzierendem *S. meliloti* keine gute Wirkung gegen Salmonellen zeigte. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass bakterielle *quorum sensing* Moleküle eine positive Wirkung auf Pflanzen haben. Die hier beschriebene Acyl-Homoserinlaktone-induzierte Resistenz (AIR) ist ein neues Modell zur pflanzlichen „Sensibilisierung“ für schnellere und stärkere Abwehrreaktionen auf künftige Stresssituationen und bahnt somit einen vielversprechenden Weg im modernen Pflanzenschutz.

Kurzfassung (Englisch)

Characterization and exploitation of bacterial *Quorum Sensing* molecules for future plant production

Kogel KH, Schikora A, Imani J

Institute for Phytopathology, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen; karl-heinz.kogel@agrar.uni-giessen.de

The activation and strengthening of the plant's immune system is a promising alternative in crop protection. The concept includes a sensitization (priming) of the crops against pathogens, which ensures a high crop yield under high pressure from pathogens. Bacterial *quorum sensing* molecules have the ability to improve plant growth and development and therefore provide a possible complement to the use of plant protection measures. The aim of this project was to analyze immune response and physiological changes in important crops such as barley, wheat, tomatoes and alfalfa after sensitization with QS molecules. In this project we assessed the activity of long-chain acyl-homoserine lactones, such as the oxo-C14-HSL, along with non-pathogenic oxo-C14-HSL-producing rhizobacteria such as *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium radiobacter* F4 (*RrF4*, once isolated from the beneficial fungus *Piriformospora indica*). We were able to demonstrate oxo-C14-HSL-induced resistance of Arabidopsis plants and that this induction was mediated by salicylic acid / oxylipin-dependent systemic signaling. In addition, an oxo-C14-HSL treatment on barley and wheat caused an increased production of reactive oxygen species and a transcriptional regulation of defense-related genes. The oxo-C14-HSL-induced sensitization effect resulted in a strengthening the plant cell wall and a defensive reaction in the stomata, thereby penetration of bacterial and fungal pathogens and their proliferation in the plant are strongly inhibited. In addition, it was surprisingly found that oxo-C14-HSL also prevents the propagation of the human pathogen *Salmonella enterica* serovar typhimurium in Arabidopsis. This effect was pronounced in direct treatments with oxo-C14-HSL, while treatment with oxo-C14-HSL-producing *S. meliloti* did not exhibit good activity against *Salmonella*. Our results illustrate, that bacterial *quorum sensing* molecules have a positive effect on plants. The acyl-homoserine lactone-induced resistance (AIR) described herein is a new model for the plant "sensitization" that protects plants by faster and stronger defensive reactions to future stress and thus paves a promising way in modern plant protection.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung
 - 1.1 Gegenstand des Vorhabens
 - 1.2 Ziele und Aufgabenstellung
 - 1.3 Planung und Ablauf
 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand
 3. Material und Methoden
 4. Ausführlicher Darstellung der wissenschaftlichen Ergebnisse
 5. Diskussion der Ergebnisse
 6. Angabe zum voraussichtlichen Nutzen
 7. Gegenüberstellung der ursprünglichen und tatsächlichen Ziele; Hinweis auf weiterführende Fragestellungen
 8. Zusammenfassung
 9. Literaturverzeichnis
 10. Eigene Publikationen
- II. Erfolgskontrollbericht**
- III. Merkblatt**

Abkürzungsverzeichnis

AHL	Acyl-Homoserinlaktone
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>
f.sp.	forma specialis
HSL	Homoserinlaktone
ISR	Induced Systemic Resistance
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv	pathovar
QS	<i>quorum sensing</i>
RrF4	<i>Rhizobium radiobacter</i> F4
<i>S.</i>	<i>Sinorhizobium</i>
SAR	Systemic Acquired Resistance
<i>Xtt</i>	<i>Xanthomonas translucens</i>

Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Dieses Projekt wurde entsprechend der Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer für eine nachhaltige Erzeugung, Verarbeitung und Vermarktung von landwirtschaftlichen Produkten durchgeführt.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung

Das Vorhaben hatte das Ziel, umweltgerechte Pflanzenschutzmaßnahmen zu erforschen und weiterzuentwickeln. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass von Bakterien gebildete *quorum sensing* (QS) Moleküle eine positive Wirkung auf den Gesundheitsstatus von Kulturpflanzen haben. Ziel war es, die durch QS Moleküle ausgelösten Reaktionen in Pflanzen näher zu analysieren und auf ihr Anwendungspotential in der landwirtschaftlichen Praxis zu überprüfen. Ausgehend von unseren ersten Ergebnissen zur Aktivität einzelner N-Acyl-Homoserinlaktone (AHLs) wurde eine systematische Überprüfung von Molekülaktivitäten der gesamten AHL Familie (C4- bis C14-AHLs) bezüglich ihrer krankheitsreduzierenden Wirkung und der Biomasseproduktion an wichtigen Kulturpflanzen durchgeführt. Eine breit angelegte Analyse des Struktur-Funktion-Zusammenhangs der AHLs sollte Klarheit darüber schaffen, welche Strukturmerkmale von AHLs die unterschiedlichen biologischen Wirkungen, wie Resistenzinduktion und Wachstumseffekte, auslösen. Dazu wurden, zunächst an Gerste, AHLs unterschiedlicher Kettenlänge und unterschiedlicher chemischer Modifikation in einem hydroponischen System mit folgender Fragestellung getestet: Welche Wirkung haben AHLs auf (i) Mehлтаuentwicklung, (ii) Biomasseproduktion und (iii) Wurzelmorphologie. Mit den effektivsten AHLs wurden Untersuchungen zur AHL-Wirkung in weiteren Pathosystemen teilw. in Mitscherlich Gefäßen (Gerste, Weizen, Tomaten) durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden auch verschiedene Bakterien auf die Produktion von AHLs getestet, um diese dann in die Versuchsplanung zu integrieren.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die experimentellen Arbeiten wurden im Institut für Phytopathologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Beteiligt waren die Arbeitsgruppen von Dr. Adam Schikora (Arbeiten zum Mechanismus der Wirksamkeit von QS) und die Arbeitsgruppe von Dr. Jafargholi Imani (Isolation und genetische Transformation von *Rhizobium radiobacter*, inklusive Bioassays). Versuche unter Feldtestbedingungen wurden am Launsbacher Weg auf der Versuchsstation des Instituts für Pflanzenernährung der JLU Gießen durchgeführt. Am Institut für Phytopathologie der Justus-Liebig-Universität sind in den letzten 5 Jahren Arbeiten zum QS in der Arbeitsgruppe von Dr. Adam Schikora und Dr. Jafargholi Imani durchgeführt

worden. Insofern lag bei Projektbeginn nicht nur theoretische Expertise, sondern auch praktische Erfahrung mit dem Thema vor (siehe eigene Vorarbeiten und Publikationen der eigenen Arbeitsgruppe).

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten erfolgten in enger Zusammenarbeit mit folgenden Forschungseinrichtungen bzw. Hochschulinstituten:

- (1) Prof. Anton Hartman
Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)
Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktion
Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg
(Arbeiten zur Isolierung und Detektion von QS Molekülen)

- (2) PD Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität
Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Gießen
(Arbeiten mit den QS produzierenden Bakterien *Rhizobium etli* und *R. meliloti*)

- (3) Prof. Andreas Vilcinskis und Dr. Thomas Degenkolp
Institut für Insektenbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität
Heinrich-Buff-Ring 26, 35392 Gießen
(HPLC Analysen)

- (4) Prof. Wolfgang Maison,
Institut für Organische Chemie (Pharmaceutical and Medicinal Chemistry)
Universität Hamburg
Bundesstrasse 45, 20146 Hamburg
(NMR- bzw. FTICR-MS-Analysen und die Markierung von AHLs mit schweren Isotopen. Dafür ist im Finanzierungplan die Summe von 10.000 EURO für Herrn Prof. Maison veranschlagt und genutzt worden (siehe Garcia et al., Modified N-acyl-homoserine lactones as chemical probes for the elucidation of plant-microbe interactions (2013) Org Biomol Chem. 2013 Sep 25;11(40):6994-7003).

Die Kooperationen sind im wissenschaftlichen Teil beschrieben.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Interaktionen zwischen Kulturpflanzen und wurzelbesiedelnden mutualistischen Bakterien werden durch ein breites Spektrum an Faktoren beeinflusst. In der Rhizosphäre basiert Kommunikation auf einem komplexen Austausch und der Perzeption von Molekülen, die durch die interagierenden Organismen produziert werden. Diese Kommunikation ist als *quorum sensing* (QS) bekannt. In vielen Gram-negativen Bakterien sind AHLs die biochemische Grundlage von QS. AHLs werden ins Medium sekretiert. Bakterien nehmen diese mit Hilfe von LuxR Rezeptoren wahr. Mit Hilfe dieser Moleküle können Bakterien ihre Genexpression in Abhängigkeit von der Populationsdichte regulieren und die Produktion von Virulenzfaktoren oder das Schwarmverhalten koordinieren. Aufgrund der Beteiligung an diesen Reaktionen sind QS Moleküle oftmals essenziell für eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtsorganismus oder für die Ausbildung einer vorteilhaften Symbiose. AHLs sind die bisher am besten beschriebenen QS Moleküle Gram-negativer Bakterien. Sie bestehen aus einem konservierten Homoserinlaktone-Ring und einer Amid (*N*)-verknüpften, 4 bis 18 C langen Acyl-Seitenkette.

***N*-Acyl-Homoserinlaktone-induzierte Reaktionen in Pflanzen**

Neben Bakterien können auch Eukaryoten mit QS Signalen oder den durch sie angesteuerten Komponenten interagieren (Bauer and Mathesius, 2004). Pflanzen sind einerseits in der Lage, die bakterielle Kommunikation direkt zu beeinflussen (z. B. durch die Exkretion von AHL-Analoga (AHL-Mimikry), andererseits reagieren sie selbst mit funktionellen Veränderungen auf die bakteriellen Signalmoleküle (Bauer and Mathesius, 2004). Sowohl pflanzliche Expressions- und Proteinmuster, als auch Hormonkonzentrationen werden lokal und systemisch durch AHLs beeinflusst (Mathesius et al., 2003; von Rad et al., 2008; Schikora et al., 2011). Das Ausmaß und auch die Art der pflanzlichen Reaktionen sind hierbei abhängig von der Dosis und der Struktur der auslösenden Verbindung. Beispielsweise berichten Mathesius und Kollegen von spezifischen Veränderungen in mehr als 150 Wurzelproteinen von *Medicago truncatula* in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der eingesetzten Konzentration der AHL-Verbindung (Mathesius et al., 2003).

Auch Wachstums- und Resistenzeigenschaften von Pflanzen können durch AHLs beeinflusst werden. Einer der ersten Berichte über eine resistenzinduzierende Wirkung stammt von Schuegger und Kollegen. Sie zeigten, dass - im Gegensatz zu Wildtypstämmen - AHL-defizienten Mutanten der Bodenbakterien *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* nur in geringem Maße eine systemische Resistenz gegen *Alternaria alternata* in Tomate induzieren (Schuegger et al., 2006). Auch Resistenzeffekte ausgelöst durch *Serratia plymuthica* in Gurke, Tomate und Bohne zeigten sich abhängig von AHL-beeinflussten Signalen (Pang et al., 2009). Veränderungen im Wachstum wurden bisher vor allem für Wurzeln beschrieben. In

Arabidopsis ließ sich ein von der Struktur und der Konzentration der applizierten AHL-Verbindung abhängiger Einfluss auf die Länge der Hauptwurzel und die Wurzelhaarbildung nachweisen (Ortiz-Castro et al., 2008; von Rad et al., 2008), eine messbare Verstärkung des Sprosswachstums zeigte sich in *Arabidopsis* und Gerste .

Insgesamt kann festgestellt werden, dass Pflanzen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Struktur auf AHL Verbindungen reagieren. Dies lässt vermuten, dass Pflanzen in der Lage sind, die bakteriellen Moleküle mit bisher unbekanntem Rezeptor-basierten Mechanismen zu registrieren. Vermutlich als Folge dieser „Perzeption“ werden spezifische Signalwege angeschaltet, was den veränderten, agronomisch höchst interessanten Phänotyp der besiedelten/behandelten Pflanze erklären könnte.

Molekularbiologische Analysen

Auch Pflanzen nehmen AHLs wahr und reagieren spezifisch auf die Länge und Modifikationen der γ Position der *Acyl* Gruppe. *N*-3-oxo-tetradecanoyl-*L*-Homoserinlaktone (oxo-C14-HSL) verstärkt die Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber biotrophen Mikroben. Dabei bewirkt Oxo-C14-HSL eine verlängerte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), AtMPK3 und AtMPK6, in Pflanzen, die mit dem bakteriellen PAMP (pathogen-associated molecular pattern) flg22 vorbehandelt werden (Schikora et al., 2011; Schenk et al. 2012). Dieser Aktivierung folgt eine höhere Expression der Transkriptionsfaktoren *WRKY22* und *WRKY29* sowie des *Defensin Pdf1.2*. Das pflanzliche Perzeptionssystem für AHLs (inklusive möglicher pflanzlicher AHL Rezeptoren) ist unbekannt. Die bakteriellen AHL Rezeptoren der LuxR Familie dagegen sind schon gut charakterisiert. Auch in tierischen Zellen wurde ein Rezeptor-basierter Mechanismus postuliert, der auf den „Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren“ (PPARs) beruhen soll.

Biologische Untersuchungen

Um die Wirkung bakterieller QS Moleküle auf Pflanzen besser zu verstehen, wurde von uns in Vorversuchen neben Gerste (*Hordeum vulgare*) auch *Arabidopsis thaliana* als Untersuchungsobjekt genutzt. AHL Verbindungen wurden direkt an die Wurzeln hydroponisch angezogener Pflanzen gegeben. Zunächst wurde nach Testsubstanzen gesucht, die veränderte Resistenz- und/ oder Wachstumseigenschaften in *Arabidopsis* hervorrufen. Die besten resistenzinduzierenden Wirkungen wurden mit der Verbindung 3-oxo-C14-HSL und der C14-Variante 3-OH-C14-HSL erhalten (Schikora et al., 2011). Die beiden Testsubstanzen wirkten, wenn auch unterschiedlich stark, resistenzverstärkend auf die behandelte Pflanze gegenüber dem bakteriellen Blattpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*). Zudem zeigten die behandelten Pflanzen kein verändertes Wachstum. Dies weist darauf hin, dass der Resistenzeffekt nicht auf einer erhöhten Investition der Pflanze in Abwehrprozesse beruht.

Letzteres würde eher mit reduziertem Wachstum einhergehen. Durch gezielte Strukturveränderungen lassen sich zudem womöglich noch stärker bioaktive Verbindungen synthetisieren. Weitere Literaturdaten zeigen, dass AHLs unterschiedlicher Kettenlänge wachstumsverstärkende Wirkung besitzen. Es war bereits vor Projektbeginn bekannt, dass die Applikation von einem anderem QS Molekül (C6-HSL) keine erhöhte Resistenz gegen *Pst* induziert (von Rad et al., 2008). Interessanterweise kann aber die Biomasse von Pflanzen durch Behandlung mit C6-HSL erhöht werden (von Rad et al., 2008; Schikora et al., 2011).

Der unterschiedliche Wirkungsgrad der AHLs wies somit auf eine Korrelation zwischen Resistenzinduktion und der Kettenlänge des Moleküls hin (Schenk et al. 2012). Diese Hypothese wurde im Vorhaben untermauert werden.

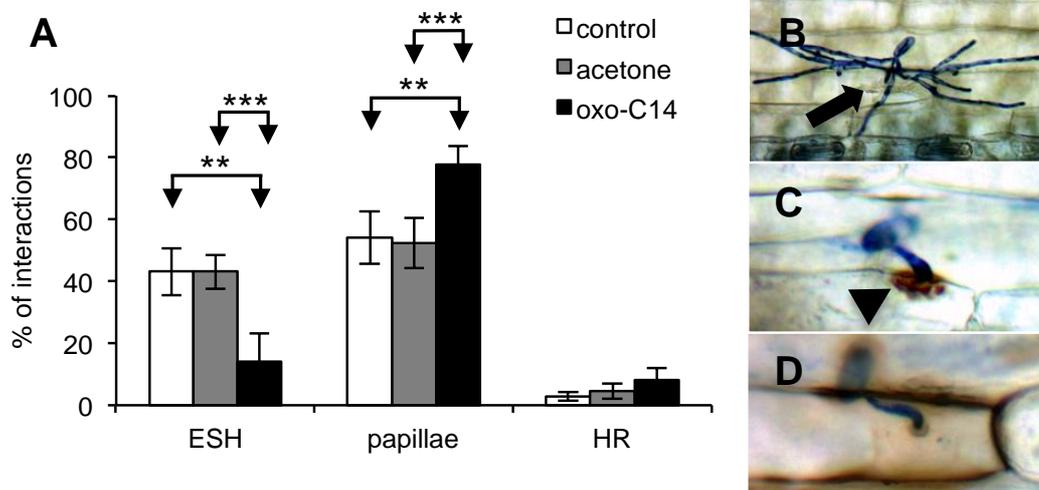


Abb. 1 Vorbehandlung mit oxo-C14-HSL führt bei Gerste zu erhöhter Resistenz gegenüber Mehlschäufel (A). ESH; elongated secondary hyphae (B), papillae (C), HR; Hypersensitive response (D). Statistische Analyse: Student's t-test: ** p < 0.005, *** p < 0.0005.



Abb. 2 Verminderte Krankheitssymptome im Weizen, der mit oxo-C14-HSL vorbehandelt und nachfolgend mit Streifenkrankheit-verursachenden Bakterien (*Xanthomonas translucens*) infiziert wurde.

• **Identifizierung der AHLs von Bodenbakterien**

Zu Beginn der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen zwei AHL-produzierenden Rhizosphärenbakterien (*Rhizobium etli* und *Sinorhizobium meliloti*) und Kulturpflanzen bestimmten wir die AHLs, die durch diese Bakterien produziert werden. Um den Typ der AHLs zu definieren, verwendeten wir die HPLC-Technik gekoppelt mit der MS/MS-Analyse. Als Standard verwendeten wir im Handel erhältliche reine C6-, oxo-C8-, oxo-C10-, oxo-C12- und oxo-C14-

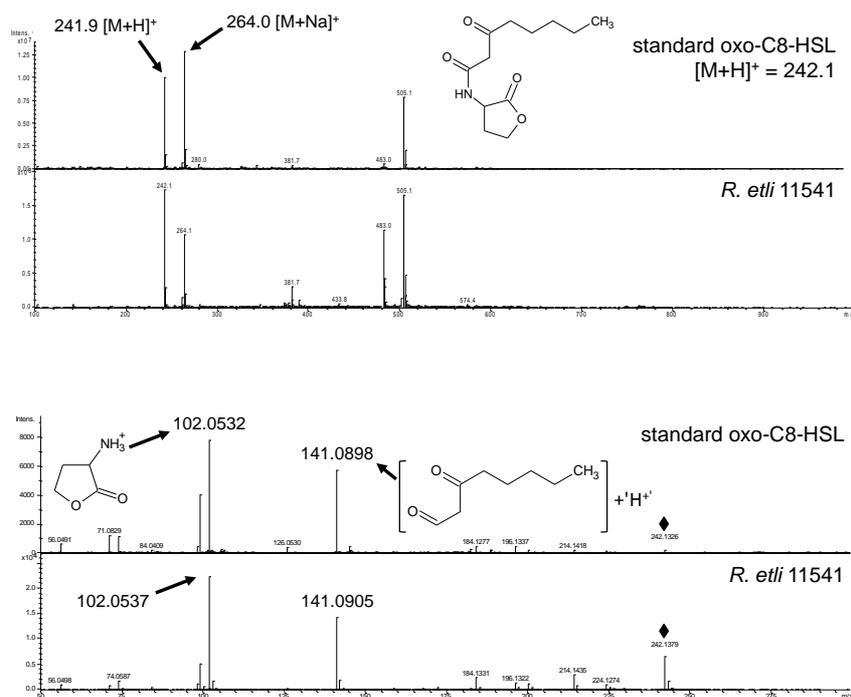


Figure 1. Verification of AHLs production in *Rhizobium etli* 11541
 The samples from HPLC were screened in the positive ion mode and a scan from 50 to 500 m/z was performed.
A: MS verification of standard oxo-C8-HSL (m/z= 242.1) shows similar mass to charge ratio peaks in *R. etli*

HPLC- Analyse oxo-C8-HSL nachgewiesen. Dies wurde danach auch mit der MS/MS-Analyse verifiziert (Abb. 3). Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Berichten überein. Im Fall von *S. meliloti* Zarkani'et'al.,'Figure'2.'

Abb. 3 N

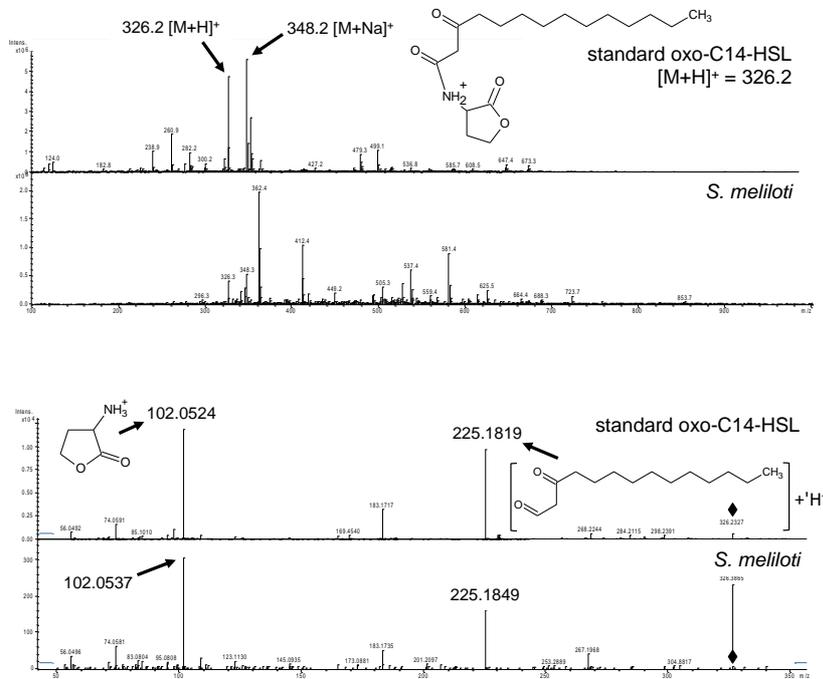


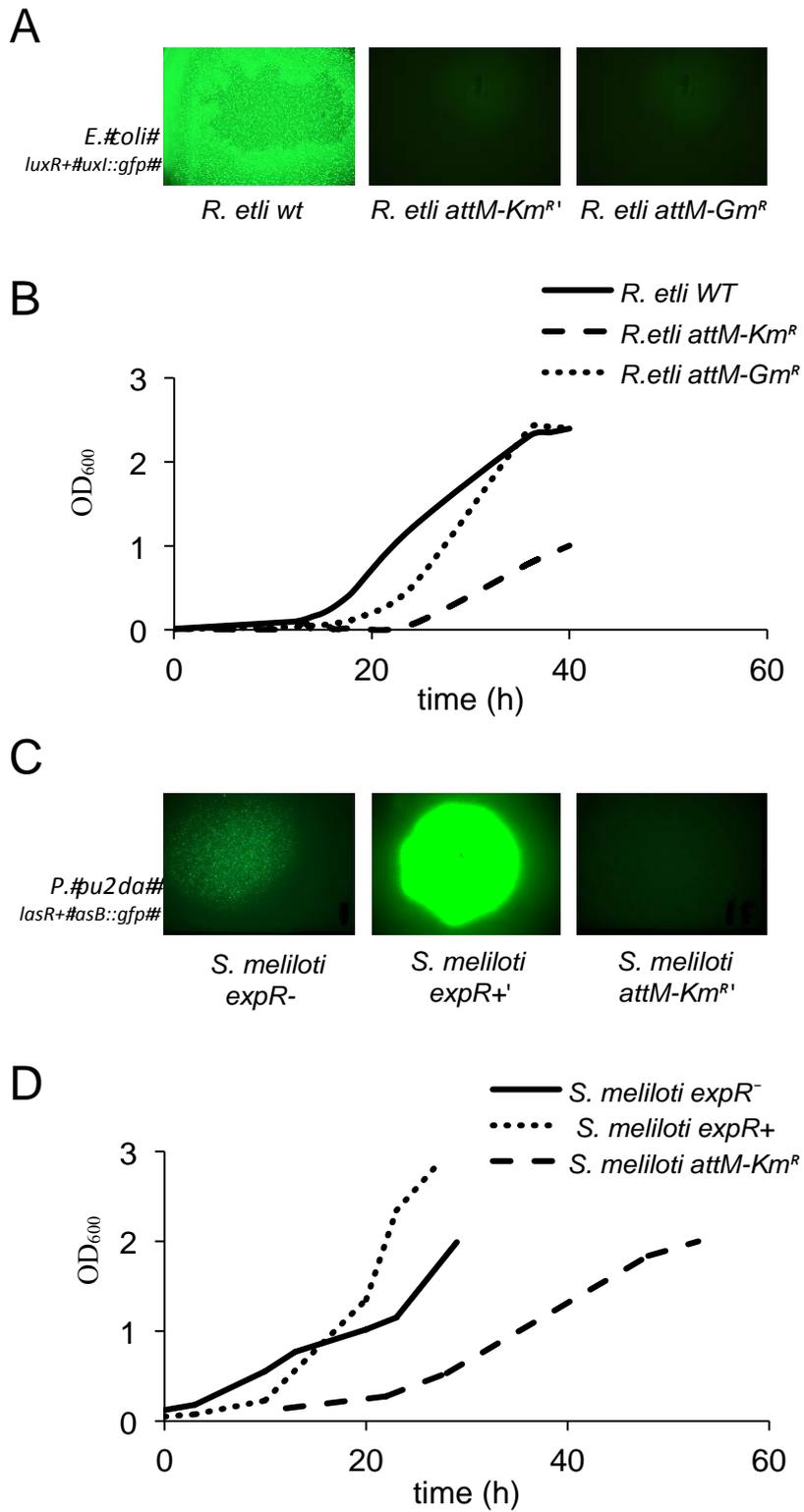
Abb. 4 N

Da das Bakterie negativ-*Agrobac* den Lak

Figure 2. Verification of AHLs production in *Sinorhizobium meliloti*
 The samples from HPLC were screened in the positive ion mode and a scan from 50 to 400 m/z was performed.
A: MS verification of standard oxo-C14-HSL ($m/z = 326.2$) shows similar mass to charge ratio in *S. meliloti* extracted AHL.
B: Further confirmation with MS/MS shows the match of *S. meliloti* extracted AHL with the standard oxo-C14-HSL. The 102.0524(37) peaks represent the presence of the lactone ring (the diagnostic fragment). The highlighted values represent the ratio m/z of the respective fragments. Diamonds mark the peaks representing molecules used for MS/MS analysis.

zwischen *meliloti* als Gen von se, welche macht. Um

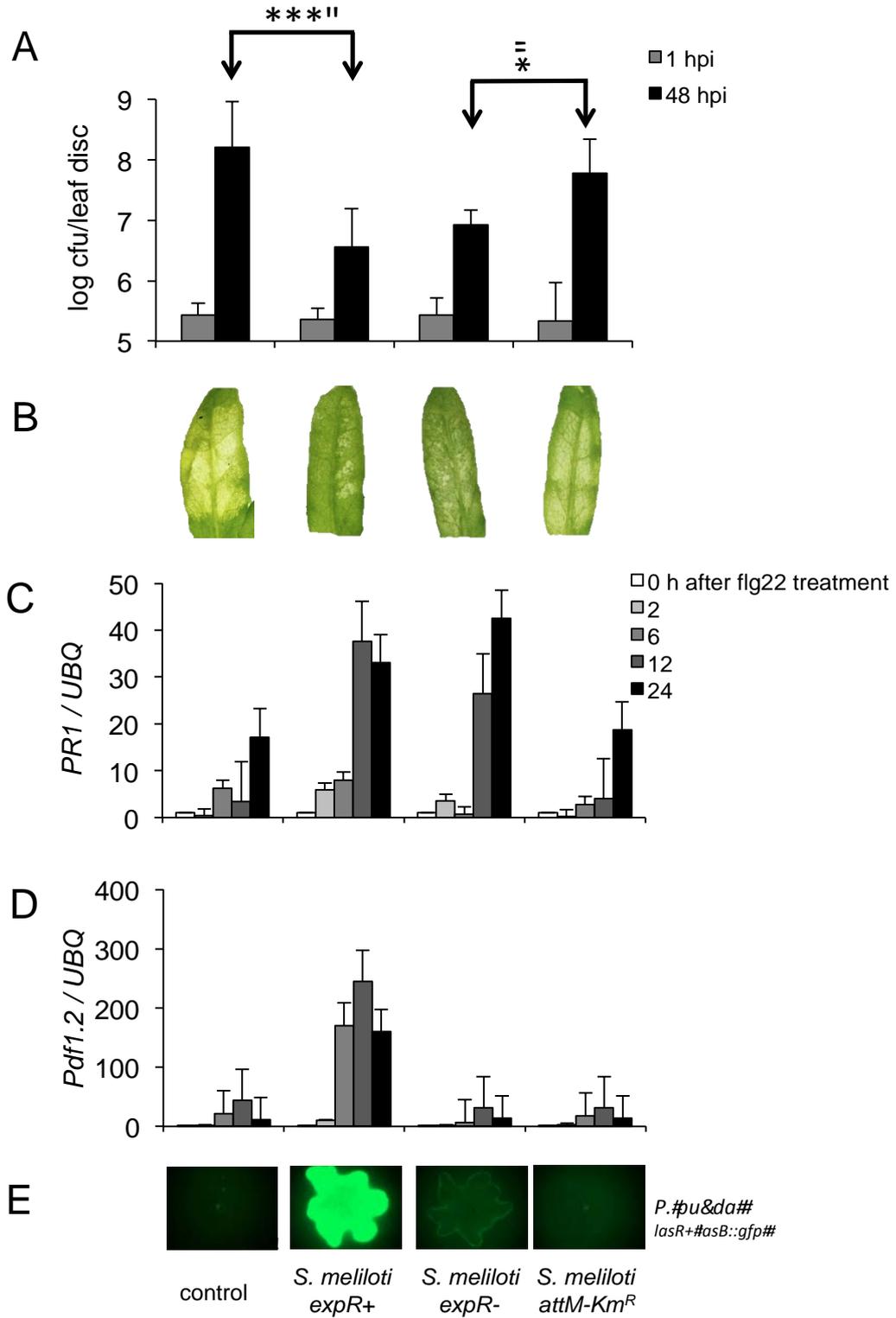
AHL-negative Stämme zu bekommen, wurden so zwei Plasmide mit universellem Expressionspromotor und dem Laktonase-Gen pBBR1-MCS2-km^R::AttM und pBBR1-MCS5-Gm^R::AttM in *R. etli* und *S. meliloti* integriert. Der Verlust der AHL Produktion bei diesen transformierten AHL-negativen Stämmen konnte bestätigt werden (Abb. 5A, C). Darüber hinaus haben wir getestet, wie der Mangel an AHLs das Wachstum beider Rhizosphärenbakterien beeinflusst. Der Mangel an AHLs resultierte in einem verzögerten Wachstum der Bakterien (Abb. 5B, D).



- ***S. meliloti* produziert langkettiges oxo-C14-HSL und induziert Resistenz**

Langkettige AHLs (oxo-C14-HSL) haben, wie kürzlich von uns veröffentlicht, die Fähigkeit, Resistenz bei Gerste, wie auch bei Arabidopsis, gegenüber biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen zu induzieren (Schikora et al., 2011). Hier untersuchten wir nun die Auswirkungen des von *S. meliloti* produzierten oxo-C14-HSL auf Resistenz bei verschiedenen Pflanzen gegenüber *Pseudomonas* sowie reines oxo-C14-HSL gegenüber *Xanthomonas* Bakterien und Mehltaupilz. Die Rhizosphäre von Kulturpflanzen wurden innerhalb von 3 Wochen regelmäßig mit *S. meliloti* Bakterien inokuliert, danach wurden die Blätter mit *Pst* (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) Bakterien infiltriert. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten cfu (colony forming units) wurde 1 und 48 Stunden nach der Infiltration ermittelt. In mit *S. meliloti* vorbehandelten Pflanzen war das Wachstum von *Pst* Bakterien signifikant langsamer, als in Kontrollpflanzen (Abb. 6A, B). Darüber hinaus scheint der Resistenz-induzierende Effekt AHL-abhängig zu sein, weil Vorbehandlung mit Bakterienstämmen, die weniger oder kein oxo-C14-HSL produzieren (*S. meliloti expR-* oder *S. meliloti AttM-KmR*) eine reduzierte oder keine Wirkung zeigten.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen waren auch die Expressionsprofile von zwei *PR* (*pathogenesis-related*) Genen (*PR1* und *Pdfl.2*) entsprechend verändert. Die Behandlung mit dem bakteriellen PAMP flg22 induzierte die Expression von *PR1* und weniger die von *Pdfl.2*. Nach einer Behandlung mit *S. meliloti expR+* war die Expression von *PR1* deutlich erhöht (Abb. 6C). Ebenso war die Expression von *Pdfl.2* in diesen Pflanzen erhöht (Abb. 6D). Zusammen mit der induzierten Resistenz gegenüber *Pst* weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass eine Vorbehandlung mit dem oxo-C14-HSL produzierenden *S. meliloti* Stamm *expR+* (Abb. 6E) eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen induzieren kann.



- **Das oxo-C14-HSL produzierende Bakterium *Sinorhizobium meliloti* erhöht Resistenz in Gerste und Tomate**

Wir haben feststellen können, dass oxo-C14-HSL das meistproduzierte AHL des Bakteriums darstellt (Zarkani et al 2013). oxo-C14-HSL wurde schon in früheren Experimenten als resistenzinduzierend nachgewiesen (Schikora et al 2011, Schenk et al 2012). Wir haben deshalb geprüft, ob die von *S. meliloti* produzierten AHLs einen Einfluss auf die Resistenz von Gerste und Tomaten haben. In Erde gewachsene Pflanzen wurde 3 Wochen lang mit *S. meliloti expR+* (wild-typ Stamm), *S. meliloti attM* (ein AHL-negativer Stamm) oder $MgCl_2$ als Kontrolle behandelt und anschließend mit Pathogenen inokuliert. Gerstenpflanzen wurden mit *Blumeria graminis f.sp. hordei* (Echter Mehltau) (Abb. 7; 8) und Tomaten mit *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule; Abb. 9) infiziert. Das Wachstum der Pathogene und die verursachten Symptome wurden in den Tagen nach der Inokulation ermittelt.

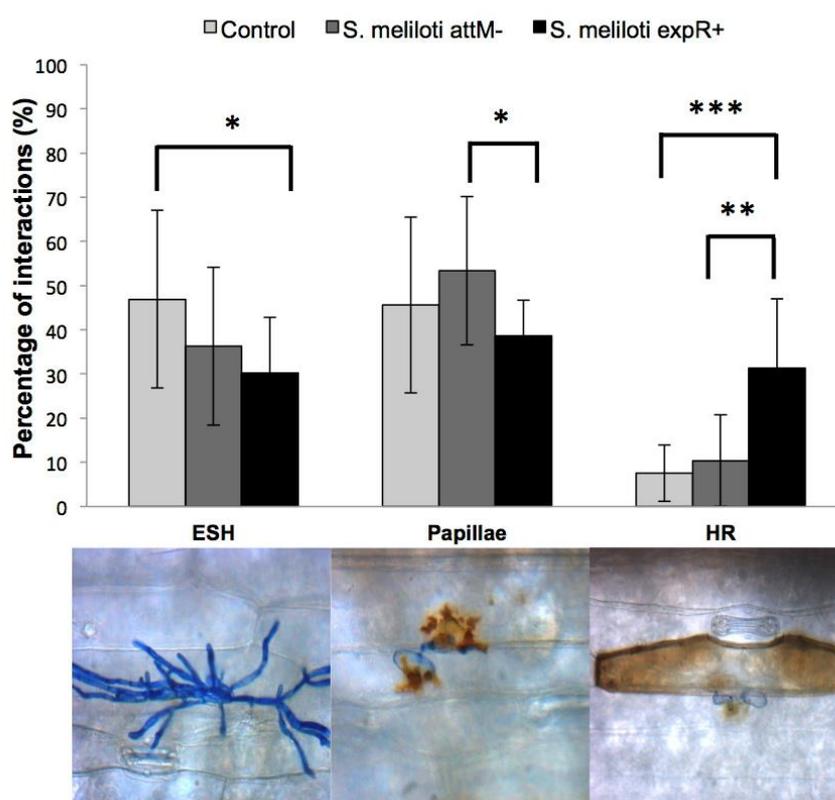


Abb. 7 Interaktion zwischen Gerste und *Blumeria graminis f.sp. hordei* nach Behandlung mit *S. meliloti expR+* und *S. meliloti attM*. Gerstenpflanzen wurden mit *S. meliloti* vorbehandelt und nach 3 Wochen mit *B. graminis* inokuliert. Eine nicht-resistente Pflanze ermöglicht dem Pilz die Formation von länglichen sekundären Hyphen (ESH) und später eines Myzelium. Eine resistente Pflanze reagiert mit einer vermehrten Bildung von Papillen oder mit einer Hypersensitiven Reaktion (HR). In den mit *S. meliloti* vorbehandelten Pflanzen konnte eine signifikante Erhöhung der Resistenz beobachtet werden. * repräsentiert $p < 0.05$ im Student t-test; ** $p < 0.005$ und *** $p < 0.0005$.

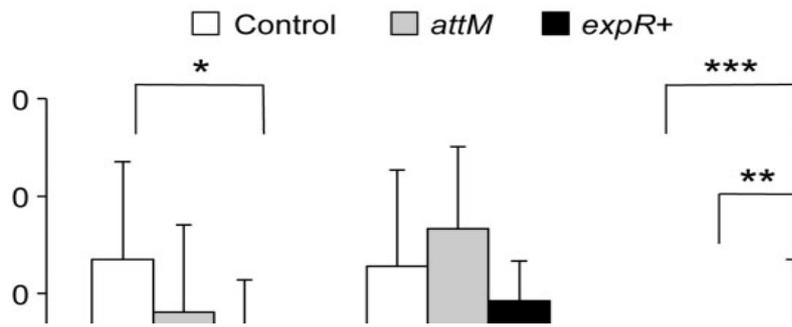
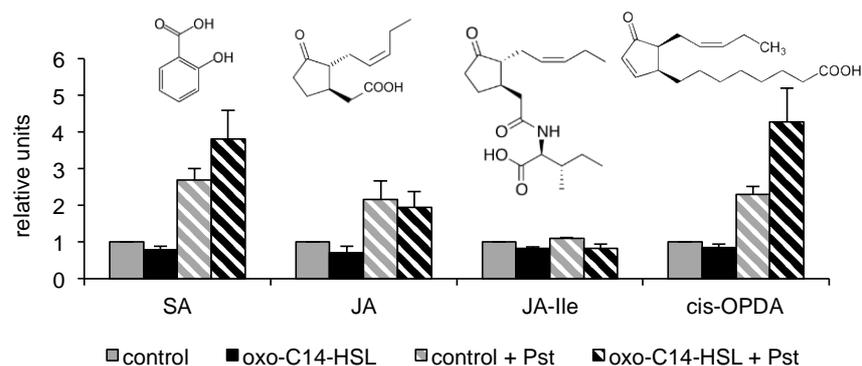


Figure. Impact of *S. meliloti* oxo-C14-HSL against tomato late blight. Four weeks inoculation of tomato plants rizosphere (cv. Moneymaker and cv. Minibel) with oxo-C14-HSL-producing *S. meliloti* strain (*expR*⁺) enhanced resistance towards the oomycete *Phytophthora infestans*. In contrast, control plants treated with MgSO₄ or with *attM*⁺ lactonase-expressing *S. meliloti* strain presented severe disease symptoms against this pathogen.

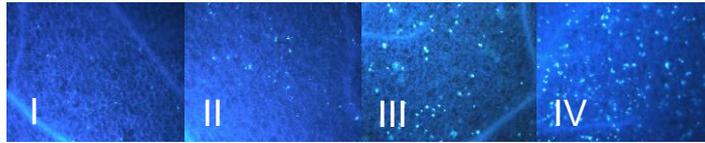
Symptome wurden nach 5 Tagen ermittelt. Obere Bilder zeigen die Produktion von AHL, visualisiert mit Hilfe des Biomarker Bakteriums *E. coli GFP*.

- **Die AHL-induzierte Resistenz (AIR) basiert auf Modifikationen der Zellwand**

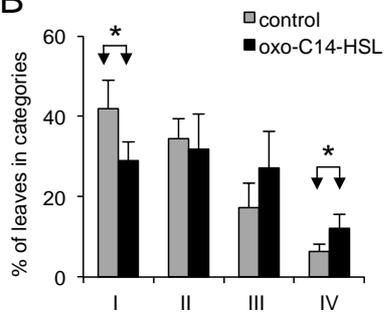
Der positive Effekt von symbiontischen Bakterien auf Pflanzen basiert zumindest teilweise auf den AHL-Molekülen. Darüber hinaus können kommerziell-produzierte AHLs die Wirtspflanzen sensibilisieren, sodass eine effiziente Abwehrreaktion gegenüber einem breiten Spektrum von Krankheitserregern ermöglicht und das Pflanzenwachstum gefördert wird. Interessanterweise können Pflanzen zwischen verschiedenen Formen von AHL unterscheiden und damit andere Arten von phänotypischen Reaktionen zeigen. Die AHL-induzierte Resistenz (AIR) ist ein Phänomen, welches in den letzten zwei Jahrzehnten von mehreren unabhängigen Laboratorien beobachtet wurde. In AHL-behandelten Pflanzen kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs), abwehrrelevanten Transkriptionsfaktoren, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, höhere Produktion von phenolischen Verbindungen sowie verstärkten Zellwandauflagerungen. Darüber hinaus basiert das AIR Phänomen auf einer systemischen Reaktion, die von einem Oxylin- und Salicylsäure (SA)-abhängigen Signalweg reguliert wird. Anders als die antagonistische Wirkung der Pflanzenhormone Salicylsäure und Jasmonsäure in Pflanzen-Mikroben-Interaktionen ist der



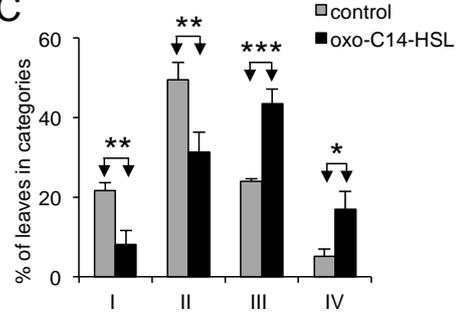
A



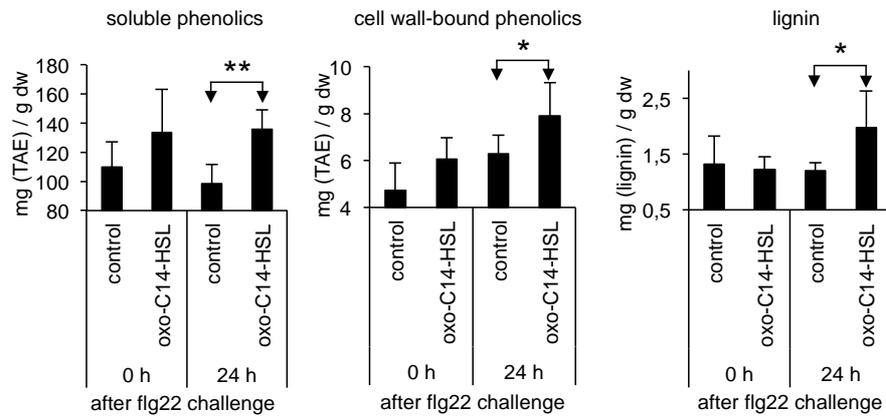
B



C



se
ng
lle
)



P
b
i
r
n

E
K
u

(*S. meliloti attM*) vor der Inokulation mit Pathogenen behandelt. Weizen wurde mit dem Pathogen *Puccinia graminis* (Schwarzrost) behandelt (Abb. 13)

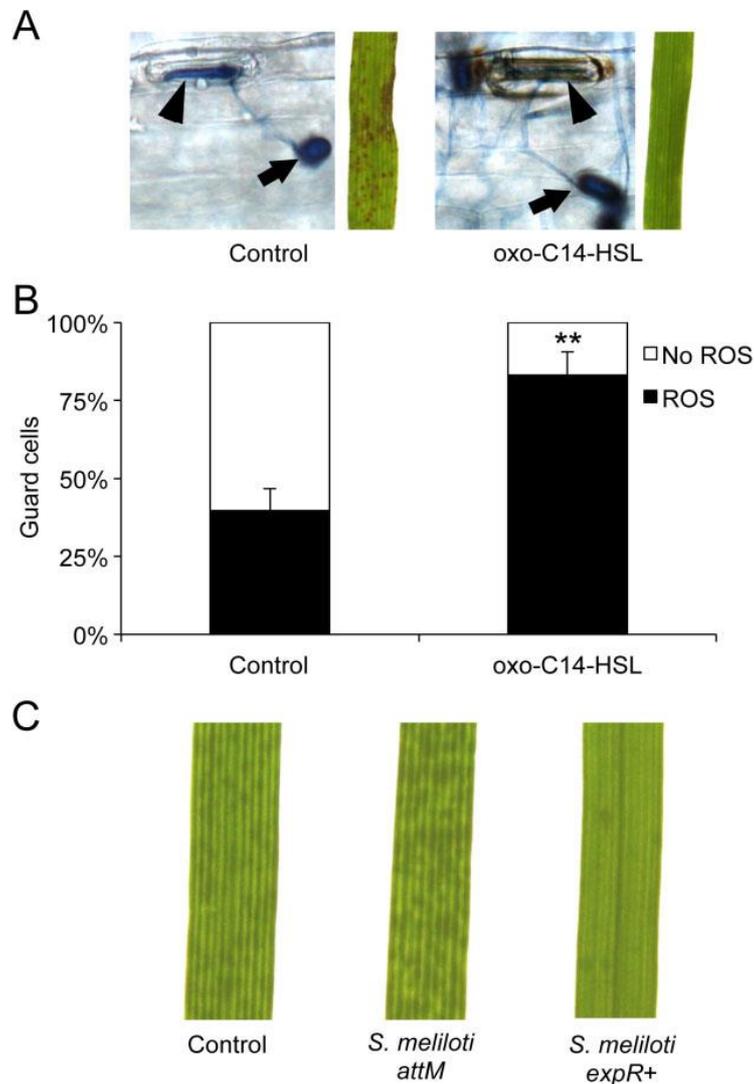


Abb. 13 Verstärkte Akkumulation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Schließzellen von Weizen nach Vorbehandlung mit oxo-C14-HSL. A. Pfeil zeigt eine keimende Uredospore; die Keimhyphye wächst in Richtung der Stomata-Öffnung (Pfeilspitze) (Kontrolle). Die Vorbehandlung mit oxo-C14-HSL führte zu einer signifikanten Akkumulation von H_2O_2 . Weizen cv. Bobwhite wurde mit oxo-C14-HSL oder Aceton (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurde mit *Puccinia graminis f.sp. tritici* inokuliert. DAB-Färbung wurde 2 Tage nach der Inokulation durchgeführt. Auf der rechten Seite: exemplarische Blätter nach 11 Tagen, die die Unterschiede in der Entwicklung von Pusteln zwischen Kontrolle und oxo-C14-HSL-behandelten Pflanzen zeigen. B. Der Anteil der Schließzellen mit einer höheren Akkumulation von H_2O_2 wie in A, 2 Tage nach Inokulation mit *P. graminis*. ** $P \leq 0,005$ im *t*-Test. Der Versuch wurde viermal wiederholt. C. Entwicklung von Pusteln auf Weizenblättern, die mit $MgSO_4$ (Kontrolle), *S. meliloti attM* oder *S. meliloti expR+* behandelt wurden.

- **Quantifizierung von AHL-bildendem *Rhizobium radiobacter* (RrF4) in besiedeltem in Weizenwurzel**

Um den Besiedlungsgrad der Weizenwurzel mit dem QS Moleküle produzierenden *RrF4* zu ermitteln, wurde eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) zur relativen Quantifizierung der *RrF4*-DNA in Bezug auf Pflanzen-DNA durchgeführt. Hierbei wurden Weizenkeimlinge mit *RrF4* inokuliert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Für die qPCR wurde genomische DNA aus dem mit *RrF4* inokulierten Wurzelmaterial (200-300 mg) mittels DNeasy plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Pro Reaktion wurden 20 ng DNA in 10 µl SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) mit 3,5 µl RNase-freiem und DNase-freiem Wasser und 350 nM Oligonukleotiden (internal transcribed spacer, ITS-Rh_F TCAGCACATAACCACACCAATCGCG; ITS-Rh_R TGCTTTGTACGCTCGTAAGAAGGG) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Jede Probe wurde als Triplikate angesetzt. Die Amplifikation erfolgte in einem Cycler von Applied Biosystems (Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR, Applied Biosystems Inc., CA, USA). Die Cycle-Threshold (Ct) Werte wurden von der zu den Instrumenten gehörigen Software bestimmt und die relativen Expressionswerte (2^{Ct}) berechnet (Abb. 14). Als Referenz-Gen wurde das konstitutiv exprimierte Weizen Alpha-Tubulin (Ta-αTub_F ATCTCCAACCTCCACAGTGTCG, Ta-αTub_R TCATCGCCCTCATCACCGTC9) eingesetzt.

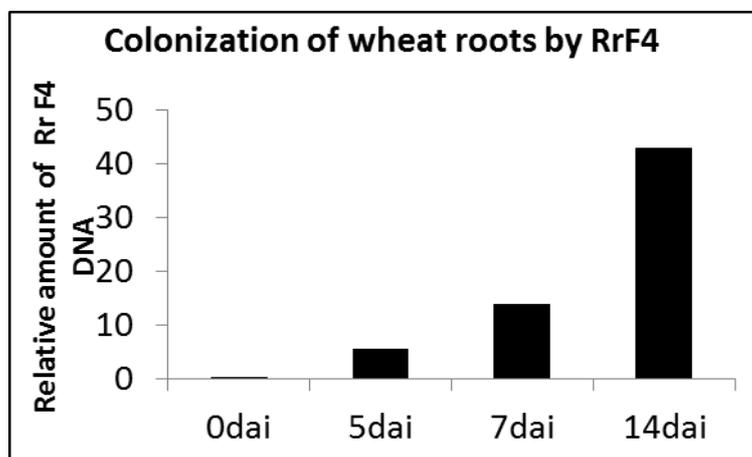


Abb. 14 Quantifizierung der Besiedlung von *Rhizobium radiobacter* Isolat 4 (*RrF4*) in der Weizenwurzel. Die Abbildung zeigt eine Zunahme von *RrF4* in der Weizenwurzel während der Ko-Kultur mit zunehmender Zeit.

- **Lokalisierung und Quantifizierung von *Rhizobium radiobacter* F4 in Gerstenwurzeln**

Für die Visualisierung der besiedelten Wurzel wurde ein Glucuronidase-exprimierender *RrF4* Stamm (*RrF4*-GUS) erstellt. Nach Zugabe des GUS Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-glucuronsäure-cyclohexylammoniumsalz (X-Gluc) werden die GUS-exprimierenden Bakterien blau. Die blaue Farbe dient als Indikator für die Bakterienpräsenz in der Gerstenwurzel (Abb. 15). Zusätzlich wurde der Besiedlungsgrad der Weizenwurzel mit *RrF4*-GUS durch eine qPCR zur relativen Quantifizierung der *RrF4*-GUS-DNA in Bezug auf Pflanzen-DNA ermittelt. Hierbei wurden Weizenkeimlinge mit *RrF4*-GUS inokuliert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Für die qPCR wurde genomische DNA aus inokuliertem und nicht inokuliertem Wurzelmaterial (200-300 mg) mittels DNeasy plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert (Methode siehe oben). Die CT-Werte (Cycle Threshold) wurden von der zu den Instrumenten gehörigen Software bestimmt und die relativen Expressionswerte (2Ct) berechnet. Als Referenzgen wurde das konstitutiv exprimierte Weizen *Alpha-Tubulin* (Ta- α Tub_F ATCTCCA ACTCCACCAGTGTCG, Ta- α Tub_R TCATCGCCCTCATCACCGTC9) eingesetzt. (Eine ausführliche Beschreibung dieser Ergebnisse enthält die Publikation Glaeser et al. 2015).

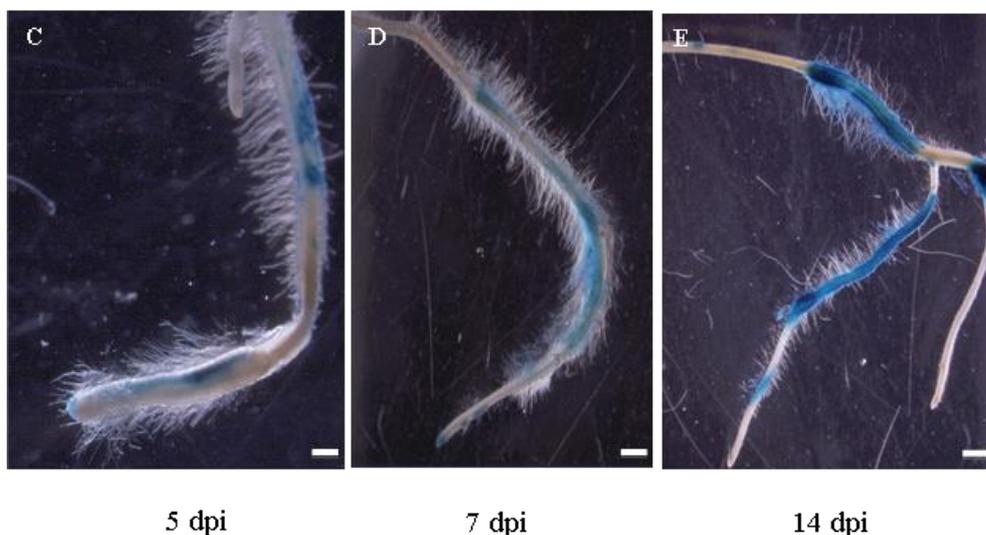


Abb. 15 Besiedlungsmuster von GUS- exprimierenden *RrF4* in Gerstenwurzel zu verschiedenen Zeitpunkten. Die blaue Farbe zeigt der Präsenz von Bakterien innerhalb der Wurzel (C-E). Visualisiert nach der Zugabe von GUS Substrat X-Gluc. Maßstab Balke = 1mm.

Darüber hinaus wurde *RrF4* mit dem Reporter gen von *Aequorea victoria* markiert, welches für ein Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) codiert, um die Bakterienbesiedlung intrazellulär zu detektieren. Die Abbildung 16 zeigt einen Querschnitt von besiedelten Gerstenwurzeln.

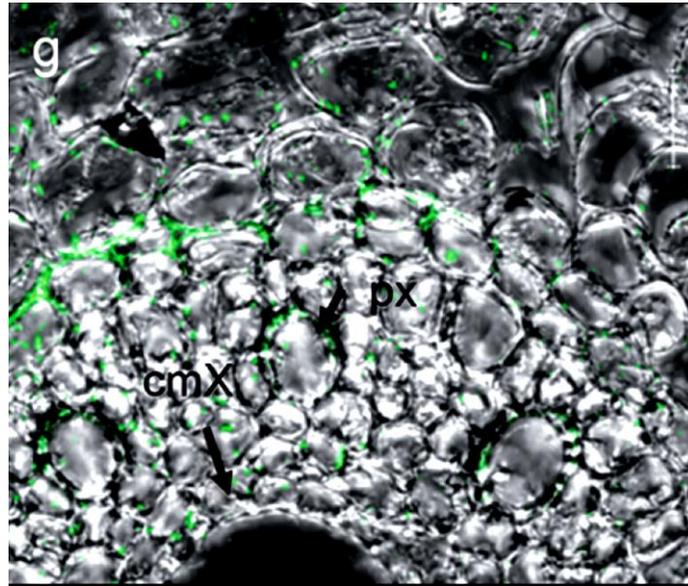


Abb. 16 Konfokale Laser-Scanning mikroskopische Analyse einer Gerstenprimärwurzel (Querschnitt). GFP-exprimierende *RrF4* (grün) sind 21 h nach der Inokulation in verschiedenen Gewebeverbänden der Wurzel nachweisbar: Epidermis (epi), Wurzelhaarzellen (RH), Kortex (cx), Endodermis (en), periphere Xylemgefäße (PX); zentrale Metaxylem Gefäße (CMX).

- **Untersuchungen zur Resistenzinduktion in Weizen durch die *Rhizobium radiobacter* Mutante RrF4NM13 (Gewächshaus)**

Rhizobium radiobacter RrF4 produziert normalerweise verschiedene AHLs mit Acylketten von C8, C10 und C12. Zudem induziert *RrF4* auch ein breites Spektrum von physiologischen Reaktionen, wie Wachstumsförderung und induzierte Resistenz, in der Pflanze (Glaeser et al. 2015). Um die Effekte von AHLs zu bestätigen, wurde die *RrF4*-Mutante RrF4NM13 erstellt, die AHLs abbaut. Zur Ermittlung der unterschiedlichen Wachstumseffekte wurden die Wurzeln von 3 Tage alten Weizenkeimlinge in *RrF4* oder RrF4NM13 Suspensionen ($OD_{600} = 1.4$) mittels „dip-inoculation“ für 30 min inkubiert, anschließend unter Gewächshausbedingungen kultiviert und nach 3 Wochen mit dem Bakterium *Xanthomonas translucens (Xtt)*, dem Verursacher der Schwarzspeligkeit (auch bakterielle Streifenkrankheit genannt), inokuliert. Der Inhibitionsgrad (prozentual) der Symptomausprägung in Blättern wurde in zwei Zeitpunkten ermittelt. Hierfür wurde zunächst eine Skala für Infektionserfolg etabliert: 0 = keine Symptome; 1 = 10% Infektion; 2 = 20% Infektion; 3 = 30% Infektion; 4 = 40% Infektion; 5 = 50% Infektion; 6 = 60% Infektion und 7 = 70% Infektion). Die mit *RrF4* vorbehandelten Pflanzen zeigen eine erhöhte Resistenz gegen *Xtt*, während die Resistenzinduktion durch die *RrF4*-Mutante (*RrF4NM13*) niedriger ist (Abbildung 17, 18).



Abb. 17 Symptome einer *Xtt* Infektion: Infektion von unbehandelten (control) oder mit RrF4NM13 und mit RrF4 vorbehandelten Weizenblättern durch *Xtt*. Vorbehandlung mit RrF4 führt zu erhöhter Resistenz gegenüber *Xtt* im Vergleich zur Kontrolle und der AHL-reduzierten Mutante RrF4NM13. Mock: Unbehandelte/nicht-inokulierte Weizenblätter.

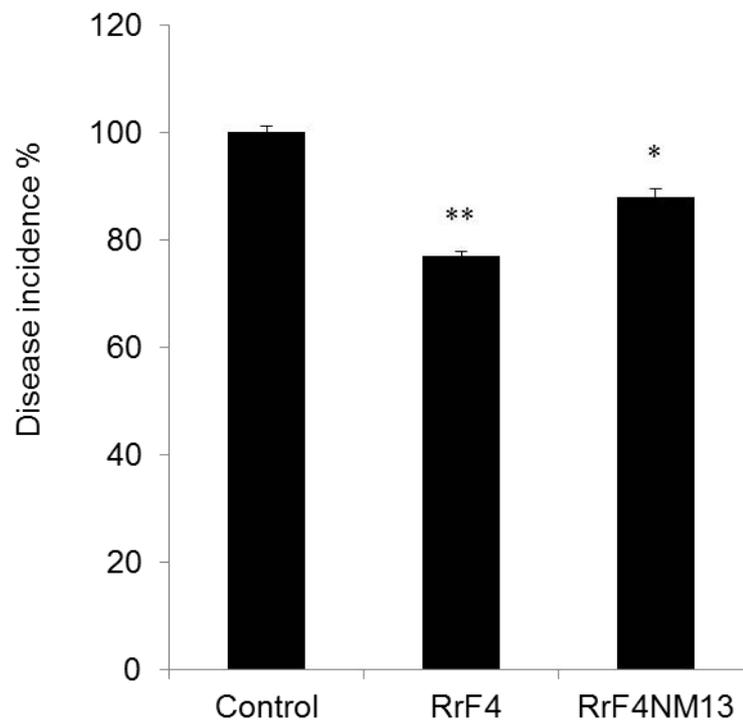


Abb. 18 Einfluss von *Rhizobium radiobacter* RrF4 und der RrF4-Mutante RrF4NM13 auf die Krankheitsentwicklung. Der Befallsgrad wurde 5 und 7 Tagen nach der Behandlung mit *Xanthomonas translucens* (*Xtt*) ermittelt. Der Pathogenbefall war in mit RrF4 behandelten Pflanzen im Vergleich zur RrF4-Mutante RrF4NM13 und Kontrollpflanzen reduziert (Student's *t*-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

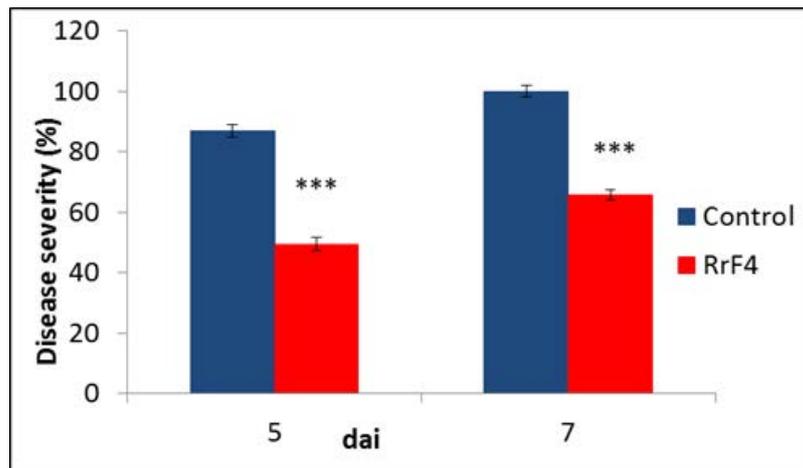


Abb. 19 Einfluss von *Rhizobium radiobacter* RrF4 auf die Krankheitsentwicklung. Der Befallsgrad wurde 5 und 7 Tagen nach Behandlung mit *Xanthomonas translucens* (*Xtt*) ermittelt. Der Pathogenbefall war in mit RrF4 behandelten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen reduziert (Student's *t*-test: *** $p < 0.001$).

Darüber hinaus zeigten mit der RrF4-Mutante RrF4NM13 besiedelte Weizenwurzeln ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zu den mit RrF4 Wildtype behandelten Weizenwurzeln (Abb. 20).

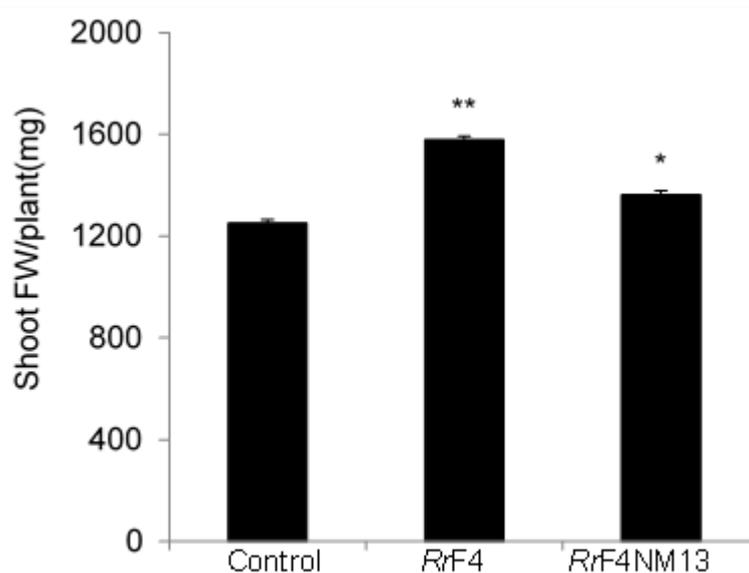


Abb. 20 Einfluss von *Rhizobium radiobacter* RrF4 und der RrF4-Mutante RrF4NM13 auf die Entwicklung der Biomasse des Sprosses. Student's *t*-test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

- **Ermittlung des Chlorophyllgehalts in mit *RrF4* und *RrF4NM13* behandelten Weizenblättern**

Da der Photosynthese-Apparat durch Infektion mit pflanzenpathogenen Bakterien beeinträchtigt wird, wurde in diesem Versuch der Chlorophyllgehalt einzelner Prüfglieder gemessen. Ergänzend zu dem Bericht von 2014 wurde der Einfluss von *RrF4NM13* auf Chlorophyllgehalt ermittelt.

Das Chlorophyll wurde aus dem frisch geernteten und im Flüssigstickstoff fein gemörserten Blattmaterial mittels eines Homogenisators mit 80% Aceton extrahiert. Der Chlorophyllgehalt wurde dann photometrisch bestimmt (Abb. 21).

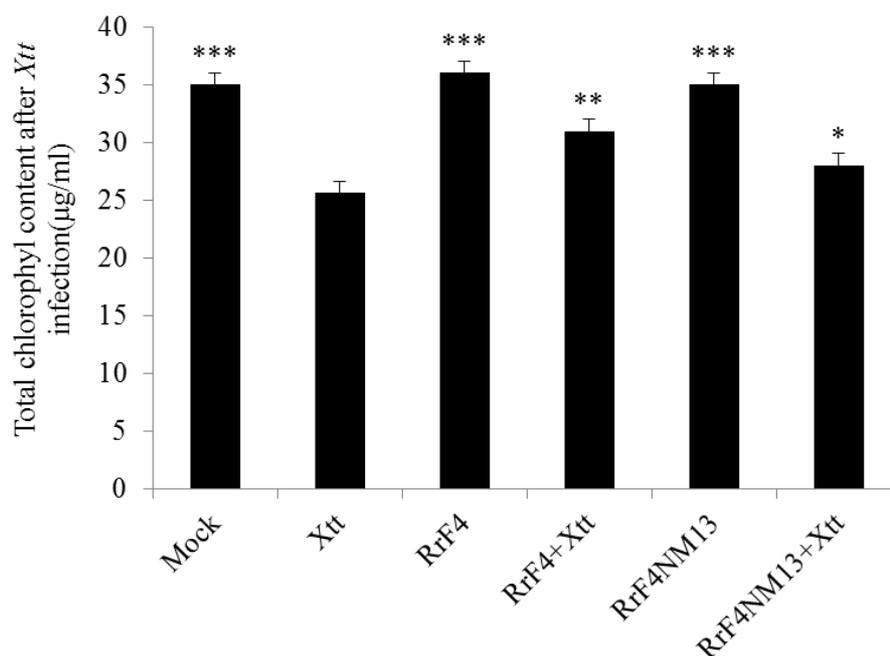


Abb. 21 Ermittlung des Chlorophyllgehalts in mit *Xtt* befallenen Weizenblättern. *Xtt* verursacht eine Reduktion des Chlorophyllgehalts in Blättern, während durch Vorbehandlung mit *RrF4* (Variante *RrF4+Xtt*) und schwächer mit *RrF4NM13* ein Verlust minimiert werden konnte. Drei unabhängige biologische Wiederholungen, 15 Pflanzen pro Variante, Student's *t*-test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

- **AIR ist auch gegen Humanpathogene auf Pflanzen wirksam**

Lebensmittelvergiftungen, die in Zusammenhang mit dem Verzehr von mit *Salmonella* kontaminiertem frischem Obst oder Gemüse gebracht werden, deuten darauf hin, dass *Salmonellen* Tiere, aber auch Pflanzen befallen können. Eine Mehrheit früherer Berichte suggerierte eine extrazelluläre Lebensweise von *Salmonellen* auf Pflanzen. Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass *Salmonellen* das pflanzliche Gewebe auch intrazellulär infizieren kann; eine wichtige Rolle spielt hier das pflanzliche Immunsystem. Wir untersuchten, ob die Stärkung des Immunsystems durch AIR eine positive Auswirkung auf die Resistenz gegenüber dem Humanpathogen *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium hat. An Hand von Experimenten

mit Arabidopsis Pflanzen konnten wir zeigen, dass AIR auch gegenüber Humanpathogenen wirksam ist (Abb. 22).

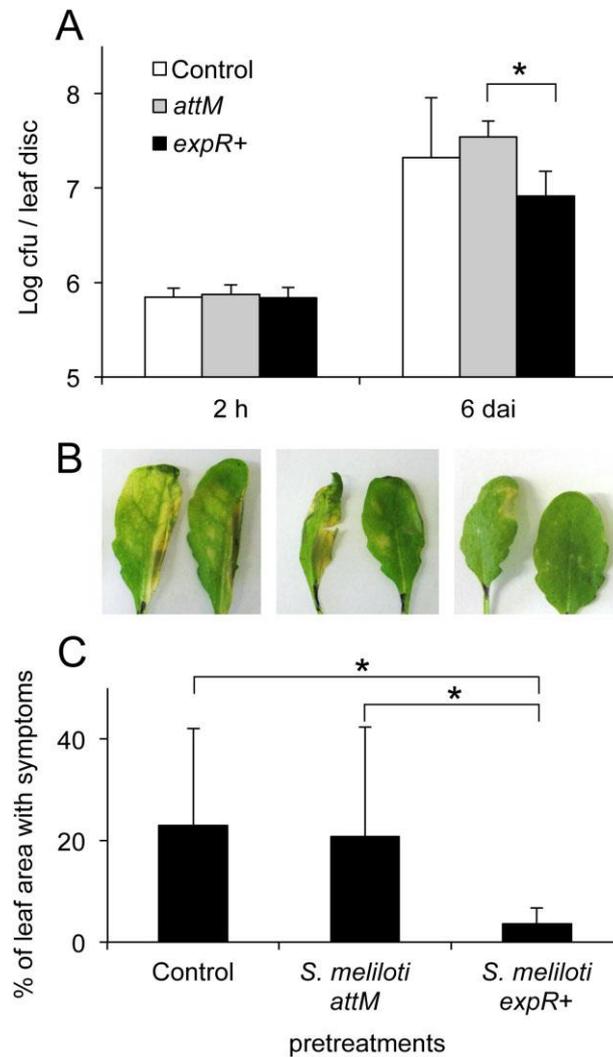


Abb. 22 Die Behandlung mit oxo-C14-HSL-produzierendem *S. meliloti* Stamm *expR+* verbessert die Resistenz gegenüber dem humanpathogenen Bakterium *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Arabidopsis. A. Verbreitung von *Salmonella* in Arabidopsis Pflanzen, 6 Tage nach der Inokulation. * $p \leq 0,05$ im *t*-Test. B. Makroskopische Symptome verursacht durch *Salmonella* auf Arabidopsis Blättern. C. Quantifizierung der Symptome von *Salmonella* auf Blättern von Arabidopsis mithilfe von Algorithmen beschrieben in Schikora et al., (2012). * $p \leq 0,05$ im *t*-Test.

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen

Die Erkenntnis, dass mikrobielle QS Moleküle bei der Infektion von Kulturpflanzen eine wichtige Rolle spielen, wird seit längerer Zeit postuliert. Unser Projekt bestätigt diese Hypothese und generiert gleichzeitig auch genetische Daten, die die zentrale Rolle dieser Moleküle in Zusammenhang mit Induzierter Resistenz und Wachstumsförderung in Pflanzen belegen. Unsere Auffassung nach ist hiermit der Weg für eine breit angelegte Analyse von QS Aktivitäten in Pflanzen gelegt. Insbesondere die Verwendung neuer QS Derivate scheint viel versprechend zu sein, da die Aktivität der Moleküle aus quantitativer und qualitativer Sicht von der Struktur der C-Kette abhängt. Dieser Sachverhalt bedarf einer sehr chemischen Bearbeitung und kann letztlich von einem phytopathologisch ausgerichteten Institut nicht geleistet werden. Erste Kooperationen mit Chemikern (Thomanek H, Schenk ST, Stein E, Kogel KH, Schikora A, Maison W. Modified N-acyl-homoserine lactones as chemical probes for the elucidation of plant-microbe interactions (2013) Org Biomol Chem. 2013 Sep 25;11(40):6994-7003) zeigen jedoch, dass eine Derivatisierung zu neuen Molekülaktivitäten führen kann.

Neben dem praktischen Nutzen der Arbeit, dessen Relevanz sich erst durch feldnahe Versuchsansätzen von Seiten der Pflanzenschutzindustrie herausstellen kann, ergibt sich ein sehr hoher Wert aus wissenschaftlicher Sicht. Die zahlreichen Publikationen, teils in Zeitschriften mit sehr hohem internationalem Renommee, zeigen, dass Neuland betreten wurde. Der Wirkungsmechanismus (*mode of action*) von QS Molekülen ist hoch interessant und seine komplette Aufklärung wird auch zu weiteren Möglichkeiten im praktischen Pflanzenschutz beitragen. Vor allem die Kombinationswirkung von QS Molekülen, nämlich die Förderung der Pflanzengesundheit und die Wachstumsförderung, macht sie für eine weitere Bearbeitung durch kommerzielle Unternehmen und für Einsatz als potentielle Biologicals interessant.

Zurzeit wird eine direkte Verwertung mittels unseres im Jahr 2014 gegründeten **TransMIT Zentrums für Innovativen Pflanzenschutz** geprüft (Leiter Prof. Kogel). Die TransMIT GmbH – mit rund 160 Angestellten – erschließt im Schnittfeld von Wissenschaft und Wirtschaft professionell die Potenziale von Wissenschaftlern aus mehreren Forschungseinrichtungen in und außerhalb Hessens. Insbesondere direkt aus den drei Gesellschafterhochschulen der TransMIT GmbH (Justus-Liebig-Universität Gießen, Technische Hochschule Mittelhessen und Philipps-Universität Marburg) bietet der Geschäftsbereich TransMIT-Zentren innovative Produkte und Dienstleistungen aus allen Bereichen von Wissenschaft und Forschung. Das **TransMIT Zentrum für innovativen Pflanzenschutz** ist eines von 166 Zentren, die in der TransMIT betreut werden. Innerhalb dieses Zentrums verhandeln wir zurzeit mit der Firma Phytoauxilium, 6 rue de l'Industrie 49 450 ST Macaire en Mauges, Frankreich, dessen Produkt *Veg'lys* in den meisten im Projekt angelegten Versuchen als Standard mitgeführt wurde, um sie für eine ausführliche Testung von QS Derivaten unter Praxisbedingungen zu gewinnen.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlichen Zielen;

Hinweis auf weiterführende Fragestellungen

Die Kostenübersicht erfolgt mit der Erstellung des zahlenmäßigen Nachweises. Die Höhe der beantragten Kosten ist im Projekt nicht überschritten worden. Kostenneutrale Änderungen, wie der zeitweise Einsatz einer technischen Kraft statt eines Doktoranden, wurde im Vorfeld durch das BLE genehmigt. Der Zeitplan wurde eingehalten. Die Projektarbeiten waren aus Sicht des Antragstellers sehr erfolgreich, was sich relativ objektiv an der hohen Anzahl von projektbasierten Publikationen zeigen lässt.

Der schon lange postulierte Homoserinlaktone-Rezeptor konnte noch nicht identifiziert werden. Allerdings gibt es einige Kandidaten, die zurzeit in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet werden. Anbei werden die im Projektzeitraum publizierten relevanten Publikationen von anderen Gruppen angeführt. Der Arbeitsplan wurde auf Basis dieser neuen wissenschaftlichen Informationen jeweils immer berücksichtigt:

1. Garcia AV, Hirt H. Salmonella enterica induces and subverts the plant immune system. *Front Microbiol.* 2014; doi: 10.3389/fmicb.2014.00141.
2. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker P. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52. 2014;52:347-75. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
3. Hartmann A, Rothballer M, Hense BA, Schroder P. Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe-plant interactions. *Front Plant Sci.* 2014; doi: ARTN 131 10.3389/fpls.2014.00131.
4. Helman Y, Chernin L. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular plant pathology.* 2015;16(3):316-29. doi: 10.1111/mpp.12180.
5. Kusari P, Kusari S, Spiteller M, Kayser O. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology. *Appl Microbiol Biot.* 2015;99(13):5383-90. doi: 0.1007/s00253-015-6660-8.
6. Montillet JL, Leonhardt N, Mondy S, Tranchimand S, Rumeau D, Boudsocq M, et al. An Abscisic Acid-Independent Oxylinin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in Arabidopsis. *Plos Biol.* 2013;11(3). doi: Artn E1001513 Doi 10.1371/Journal.Pbio.1001513.
7. Karlsson T, Turkina MV, Yakymenko O, Magnusson KE, Vikstrom E. The Pseudomonas aeruginosa N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. *PLoS pathogens.* 2012;8(10):e1002953. doi: 10.1371/journal.ppat.1002953.
8. Meng FH, Altier C, Martin GB. Salmonella colonization activates the plant immune system and benefits from association with plant pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 2013;15(9):2418-30. doi: Doi 10.1111/1462-2920.12113.
9. Zhao Q, Zhang C, Jia ZH, Huang Y, Li HL, Song SS. Involvement of calmodulin in regulation of primary root elongation by N-3-oxo-hexanoyl homoserine lactone in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci.* 2015; doi: Artn 807 10.3389/Fpls.2014.00807.
10. Liu F, Bian ZR, Jia ZH, Zhao Q, Song SS. The GCR1 and GPA1 Participate in Promotion of Arabidopsis Primary Root Elongation Induced by N-Acyl-Homoserine Lactones, the Bacterial Quorum-Sensing Signals. *Mol Plant Microbe In.* 2012;25(5):677-83. doi: 10.1094/Mpmi-10-11-0274.
11. Palmer AG, Senechal AC, Mukherjee A, Ane JM, Blackwell HE. Plant Responses to Bacterial N-Acyl L-Homoserine Lactones are Dependent on Enzymatic Degradation to L-Homoserine. *Acs Chem Biol.* 2014;9(8):1834-45. doi: 10.1021/cb500191a.
12. Ong HB, Lee WS, Patterson S, Wyllie S, Fairlamb AH. Homoserine and quorum-sensing acyl homoserine lactones as alternative sources of threonine: a potential role for homoserine kinase in insect-stage Trypanosoma brucei. *Mol Microbiol.* 2015;95(1):143-56. doi: 10.1111/mmi.12853.

Aus Kpt II, 1 ergeben sich direkt die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises. Insbesondere ergibt sich aus der ausführlichen wissenschaftlichen Darstellung der personelle Aufwand zur praktischen Durchführung der oben beschriebenen Arbeitsschritte. Die Arbeiten konnten nur durch den Einsatz eines Doktoranden und einer technischen Kraft durchgeführt werden. Die technische Kraft war insbesondere notwendig, um die technisch anspruchsvollen Arbeiten wie die genetische Transformation von Bakterien durchzuführen. Zudem oblagen der technischen Kraft die Arbeiten mit dem Humanpathogen Salmonellen, die unter S2 Bedingungen durchgeführt werden mussten. Der Doktorand (Sebastian Schenk) hat in der Hauptsache die molekularbiologischen und biochemischen Analysen zur QS Wirkung (mode of action) durchgeführt. Er konnte seine Arbeit sehr erfolgreich mit **summa cum laude** abschließen und ist Autor in 8 (sic) projektbasierten Publikation (siehe unten). Die ihm nachfolgende Doktorandin Lisa Höfle ist noch mit weiten Arbeiten zum QS signalling beschäftigt, das nun über einen Industriepartner finanziert wird.

1. Hernández-Reyes C, **Schenk ST**, Neumann C, Kogel KH, Schikora A. (2014) *Microb Biotechnol.* 2014 Nov;7(6):580-8
2. **Schenk ST**, Hernández-Reyes C, Samans B, Stein E, Neumann C, Schikora M, Reichelt M, Mithöfer A, Becker A, Kogel KH, Schikora A. (2014) *Plant Cell.* 2014 Jun 24;26(6):2708-2723
3. Garcia AV, Charrier A, Schikora A, Bigeard J, Pateyron S, de Tauzia-Moreau, Thomanek H, **Schenk ST**, Stein E, Kogel KH, Schikora A, Maison W. (2013) *Org Biomol Chem.* 2013 Sep 25;11(40):6994-7003
4. **Schenk ST**, Stein E, Kogel KH, Schikora A. (2012) *Plant Signal Behav.* 2012 Feb 1;7(2).
5. Schikora A, **Schenk ST**, Stein E, Molitor A, Zuccaro A, Kogel KH. (2011). *Plant Physiol.* 2011 Sep 22.
6. **Schenk ST**, Schikora A (2015). *Bio-protocol* 5(6): e1429. <http://www.bio-protocol.org/e1429>
7. **Schenk ST**, Schikora A (2015). *Bio-protocol* 5(6): e1430. <http://www.bio-protocol.org/e1430>
8. **Schenk TS**, Schikora A. (2015) *Front. Plant Sci.* Jan14;5:784 (doi: 10.3389/fpls.2014.00784)

Book chapters:

Hartmann A, **Schenk ST**, Riedel T, Schröder P and Schikora A (2012) The Response of Plants towards N-acyl Homoserine Lactones of Quorum Sensing Active Bacteria in the Rhizosphere. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere.*

Die Notwendigkeit der Arbeiten ergibt sich aus der ausführlichen Darstellung der wissenschaftlichen Ergebnisse in Kombination mit dem vorherigen Stand der Technik. Insbesondere war der Personalaufwand notwendig, um die wissenschaftlich substanziellen und aussagekräftigen Ergebnisse zu erarbeiten. Der experimentelle Aufwand war hoch, aber essenziell für das Gelingen der Arbeit. Die sehr erfolgreiche Publikationstätigkeit der im Projekt angestellten Mitarbeiter zeigt, dass die Input-Output Bilanz in diesem Projekt hervorragend war.

8. Zusammenfassung

Folgende wichtigen Ergebnisse wurden erzielt:

- ✚ QS Moleküle zeigen eine für den Schutz von Pflanzen gegenüber Krankheitserregern nützliche Aktivität, die sich in einer verbesserten Pflanzengesundheit und einer verbesserten Biomassenproduktion manifestiert.
- ✚ Nicht nur artifizielle QS Moleküle, sondern auch nützliche Bakterien, die unter Infektionsbedingungen QS Moleküle bilden, sind potenziell für einen umweltgerechten Pflanzenschutz nutzbar.
- ✚ Eine Strategie zur Erzeugung von optimierten QS Molekülen durch chemische Derivatisierung von Homoserinlaktonen ist für weitere Arbeiten zu empfehlen.
- ✚ Der Wirkungsmechanismus von QS Molekülen an Pflanzen ist noch nicht vollständig aufgeklärt; insbesondere ist nicht bekannt, wie QS Moleküle der Homoserinlaktone-Gruppe zunächst von der Pflanze erkannt werden (ein Rezeptor ist noch nicht identifiziert worden). Jedoch konnte in dem Projekt gezeigt werden, dass QS Moleküle eine molekulare Signalkette auslösen, die aus Elementen von zwei bekannten Abwehrwegen, der Induced Systemic Resistance (ISR, Jasmonat-Weg) und der Systemic Acquired Resistance (SAR, Salicylat-Signalweg) besteht.
- ✚ Selbst Infektionen von Pflanzen durch humanpathogene Salmonellen lassen sich durch den Einsatz von QS Molekülen reduzieren.

9. Literaturverzeichnis

Bauer WD, Mathesius U (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol.* 2004 Aug;7(4):429-33.

Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1444-1449.

Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 31: 1497-1509.

Pang YD, Liu XG, Ma YX, Chernin L, Berg G, Gao KX (2009) Induction of systemic resistance, root colonisation and biocontrol activities of the rhizospheric strain of *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones. *European Journal Plant Pathology* 24: 261-826.

Schuhegger R, Ihring A, Gantner S, Bahnweg G, Knappe C, Vogg G, Hutzler P, Schmid M, Van Breusegem F, Eberl L, Hartmann A, Langebartels C (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ.* 29: 909-918.

von Rad U, Klein I, Dobrev PI, Kottova J, Zazimalova E, Fekete A, Hartmann A, Schmitt-Kopplin P, Durner J (2008) Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserinellactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* 229: 73-85.

10. Projektbasierte eigene Publikationen

Veröffentlichungen im peer-review Verfahren:

1. Glaeser SP, Imani J, Alabid I, Guo H, Kumar N, Kämpfer P, Hardt M, Blom J, Goesmann A, Rothballer M, Hartmann A, Kogel KH (2015) Non-pathogenic Rhizobium radiobacter F4 deploys plant beneficial activity independent of its host Piriformospora indica. ISME J. doi:10.1038/ismej.2015.163.
2. Hernández-Reyes C, Schenk ST, Neumann C, Kogel KH, Schikora A. (2014) N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. Microb Biotechnol. 2014 Nov;7(6):580-8
3. Schenk ST, Hernández-Reyes C, Samans B, Stein E, Neumann C, Schikora M, Reichelt M, Mithöfer A, Becker A, Kogel KH, Schikora A. (2014) N-Acyl-Homoserine Lactone Primes Plants for Cell Wall Reinforcement and Induces Resistance to Bacterial Pathogens via the Salicylic Acid/Oxylipin Pathway. Plant Cell. 2014 Jun 24;26(6):2708-2723
4. Baumgardt K, Charoenpanich P, McIntosh M, Schikora A, Stein E, Thalmann S, Kogel KH, Klug G, Becker A, Evguenieva-Hackenberg E. (2014) RNase E Affects the Expression of the Acyl-Homoserine Lactone Synthase Gene sinI in Sinorhizobium meliloti. J Bacteriol. 2014 Apr;196(7):1435-47.
5. Garcia AV, Charrier A, Schikora A, Bigeard J, Pateyron S, de Tautzia-Moreau Thomanek H, Schenk ST, Stein E, Kogel KH, Schikora A, Maison W. Modified N-acyl-homoserine lactones as chemical probes for the elucidation of plant-microbe interactions (2013) Org Biomol Chem. 2013 Sep 25;11(40):6994-7003
6. Zarkani A, Stein E, Röhrich CR, Schikora M, Hackenberg E, Degenkolb T, Vilcinskas A, Klug G, Kogel KH, Schikora A (2013) Homoserine lactones govern partly the reaction of plant to rhizobia bacteria Int J Mol Sci. 2013 Aug 20;14(8):17122-46
7. Schenk ST, Stein E, Kogel KH, Schikora A. (2012) *Arabidopsis* growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. Plant Signal Behav. 2012 Feb 1;7(2).
8. Schikora A, Schenk ST, Stein E, Molitor A, Zuccaro A, Kogel KH. (2011) N-acyl-homoserine lactone confers resistance towards biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6. Plant Physiol. 2011 Sep 22.

Method Papers:

9. Schenk, S. T. and Schikora, A. (2015). Staining of Callose Depositions in Root and Leaf Tissues. *Bio-protocol* 5(6): e1429. <http://www.bio-protocol.org/e1429>
10. Schenk, S. T., Schikora, A. (2015). Lignin Extraction and Quantification, a Tool to Monitor Defense Reaction at the Plant Cell Wall Level. *Bio-protocol* 5(6): e1430. <http://www.bio-protocol.org/e1430>

Reviews:

11. Schenk TS, Schikora A. (2015) AHL-priming functions via oxylipin and salicylic acid. Front. Plant Sci. Jan14;5:784 (doi: 10.3389/fpls.2014.00784)
12. Schikora M, Schikora A. (2014) Image-based Analysis to Study Plant Infection with Human Pathogens. Comput Struct Biotechnol J. 2014 Sep 28;12(20-21):1-6
13. Hartmann A, Schikora A (2012) Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. Journal of Chemical Ecology. J Chem Ecol. 2012 Jun;38(6):704-13. Epub 2012 May 31.

Book chapter (non-peer-review):

14. Hartmann A, Schenk TS, Riedel T, Schröder P and Schikora A (2012) The Response of Plants towards N-acyl Homoserine Lactones of Quorum Sensing Active Bacteria in the Rhizosphere. Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere.

Tagungsteilnahme:

1. Schikora A. (2015) Vortrag: AHL-priming functions via oxylipins and SA pathway. Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen 2015.
2. Schenk et al., (2015) Poster: Investigation of the AHL-induced Resistance Phenomenon. Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen 2015.
3. Schikora et al., (2015) Bacterial quorum sensing molecules influence plant immune system SFB Workshop Halle 2015.
4. Schenk et al., (2015) Poster The possible use of AHL-priming in crop protection IPPC 2015, Berlin.
5. Schikora A. et al (2015) Kurzvortrag: The beneficial effect of plant-associated bacteria are based on quorum sensing molecules. miCROPe2015, Wien 2015. Guo et al. (2015) Investigation of the endobacterium *Rhizobium radiobacter* F4 from beneficial fungus *Piriformospora indica*. VAAM-Jahrestagung 2015. 1.–4. März in Marburg/Lahn. Biospektrum. D13808-F-ISSN 0947-0867
6. Alabid et al. (2015) Reduction of root colonization by the endomycotic bacterium *Rhizobium radiobacter* F4 in the gibberellic acid barley mutant. VAAM-Jahrestagung 2015. 1.–4. März in Marburg/Lahn. Biospektrum. D13808 F-ISSN 0947-0867
7. Alabid et al. (2015) Vortrag in 35. Jahrestagung des DPG Arbeitskreises Wirt-Parasit-Beziehungen, 19-23. März 2015, Halle.
8. Imani et al. 2014. Vortrag: Bacteria hidden in the rhizosphere: perspectives for plant health, soil fertility and global climate change lunch time seminar 07.05.2014, Interdisziplinäres Forschungszentrum (iFZ) der Justus-Liebig Universität Gießen.