

"Wirkungsweise und molekulare Analyse der durch Prohexadion-
Calcium induzierten Sonnenblumenresistenz gegen *Orobanch*
cumana"

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Franziska Lerner
geb. am 20.07.1990 in Chemnitz

Mainz, 17. Juni 2021

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2021¹

¹ D77

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	I
II	ABSTRACT	III
1	Einleitung	1
1.1	PARASITÄRE PFLANZEN DER <i>OROBANCHACEA</i> FAMILIE	1
1.2	<i>OROBANCHE CUMANA</i> – DER WURZELPARASIT DER SONNENBLUME	3
1.3	VORGEHENSWEISEN GEGEN DEN SONNENBLUMENPARASITEN <i>O. CUMANA</i>	5
1.4	PROHEXADION-CALCIUM - EIN WACHSTUMSREGULATOR MIT UNGEÄHNTEN FÄHIGKEITEN	8
1.5	INDUZIERTER PFLANZLICHER ABWEHRMECHANISMEN	9
1.6	FORSCHUNGSZIELE	13
2	MATERIAL	14
2.1	<i>OROBANCHE CUMANA</i> SAMEN	14
2.2	SAATGUT UND ANZUCHT DER SONNENBLUME - <i>HELIANTHUS ANNUUS</i>	14
2.3	EIGENSCHAFTEN DES VERWENDETEN ERDBODENS	14
2.4	PROHEXADION-CALCIUM	15
2.5	GERÄTE	15
2.6	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	18
2.7	PLASMIDE, MEDIEN UND PRIMER	21
2.8	PROTEINLÄNGENSTANDARD	23
2.9	SOFTWARE UND DATENBANKEN	23
3	METHODEN	25
3.1	AUFNAHME UND VERTEILUNG VON PROHEXADION IN SONNENBLUMEN	25
3.2	EXKRETION VON PROHEXADION AUS SONNENBLUMENWURZELN	25
3.3	PROHEXADION-MOBILITÄT IM BODEN	25
3.4	STERILISATION DER <i>O. CUMANA</i> SAMEN UND BRECHEN DER SAMENRUHE	25
3.5	<i>O. CUMANA</i> RASSEN-DETERMINIERUNG	26
3.6	<i>O. CUMANA</i> KEIMUNGSASSAY	26
3.6.1	VALIDIERUNG DES SONNENBLUMENWURZELEXTRAKTES ALS KEIMUNGSINDUKTOR	27
3.6.2	INHIBITIONSTUDIEN DER <i>O. CUMANA</i> KEIMUNG MIT PROHEXADION	27
3.7	VALIDIERUNG DER INHIBITIONSEFFIZIENZ DER <i>O. CUMANA</i> KEIMUNG	28
3.8	STL-INDUZIERTER KEIMUNGSASSAY VON <i>O. CUMANA</i>	28
3.9	EINFLUSS VON PROHEXADION AUF STL-GEHALT VON SONNENBLUMEN	29
3.10	METABOLOM-ANALYSE DER MIT PROHEXADION BEHANDELTEN SONNENBLUMEN	31
3.11	ANALYSE DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE AUS <i>HELIANTHUS ANNUUS</i>	33

3.11.1	TRANSFORMATION DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE IN <i>E. COLI</i>	33
3.11.2	EXPRESSION DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE.....	34
3.11.3	PROTEINEXTRAKTION MITTELS ULTRASCHALL	35
3.11.4	PROTEINREINIGUNG MITTELS NI-IDA MIT ANSCHLIEßENDER ENTSALZUNG.....	35
3.11.5	SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	36
3.11.6	FLUORESCENCE THERMAL SHIFT ASSAY (FTSA) DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE	37
3.11.7	AKTIVITÄTSNACHWEIS DER <i>HAF3H</i> MITTELS EINES UPLC-BASIERTEN ASSAYS	39
3.12	PROHEXADION-INDUZIERTER RESISTENZ DER SONNENBLUME GEGEN <i>O. CUMANA</i>	41

4 ERGEBNISSE.....45

4.1	AUFNAHME, VERTEILUNG UND EXKRETION VON PROHEXADION IN DER SONNENBLUME	45
4.2	MOBILITÄT VON PROHEXADION IM BODEN	49
4.3	RASSENDERMINIERUNG DES VERWENDETEN <i>O. CUMANA</i> SAATGUTES.....	50
4.4	VALIDIERUNG DER KEIMUNGSINDUKTOREN VON <i>O. CUMANA</i>	52
4.5	PROHEXADION ALS INHIBITOR DER <i>O. CUMANA</i> KEIMUNG	53
4.6	INHIBITIONSEFFIZIENZ DER <i>O. CUMANA</i> KEIMUNG DURCH PROHEXADION.....	56
4.7	STL ALS KEIMUNGSINDUKTOREN VON <i>O. CUMANA</i>	57
4.8	EINFLUSS VON PROHEXADION AUF KEIMUNGSINDUKTOREN VON <i>O. CUMANA</i>	58
4.9	VARIATION DER FLAVONOID-BIOSYNTHESE DURCH PROHEXADION APPLIKATION.....	63
4.9.1	MULTIVARIATE ANALYSE DER DREI DATENSÄTZE.....	63
4.9.2	UNIVARIATE ANALYSE DES SONNENBLUMEN METABOLOMS	64
4.10	INTERAKTION DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE MIT PROHEXADION	68
4.10.1	STABILISIERUNG DES SCHMELZPUNKTES DURCH PROHEXADION.....	70
4.10.2	HEMMUNG DER FLAVANON-3-HYDROXYLASE AKTIVITÄT <i>IN VITRO</i>	71
4.11	PROHEXADION-INDUZIERTER RESISTENZ DER SONNENBLUME GEGEN <i>O. CUMANA</i>	73

5 DISKUSSION.....77

5.1	PROHEXADION TRANSLOKATION IN- UND AUßERHALB DER SONNENBLUME	78
5.2	PROHEXADION ALS KEIMUNGSINHIBITOR DER <i>O. CUMANA</i> KEIMUNG	80
5.3	PROHEXADION-INDUZIERTER VARIATION DES STL GEHALTS	83
5.4	EINFLUSS VON PROHEXADION AUF DAS SONNENBLUMEN-METABOLOM.....	87
5.5	PROHEXADION INDUZIERT ABWEHRMECHANISMEN DER SONNENBLUME	91

6 ANHANG95

7 VERZEICHNISSE DER ABBILDUNGEN, TABELLEN UND ABKÜRZUNGEN..... 105

7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	105
7.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	106
7.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	108

8 DANKSAGUNG 111

9 LITERATURVERZEICHNIS.....112

10 VERÖFFENTLICHUNGFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

11 LEBENSLAUF128

I Zusammenfassung

Der obligate Holoparasit *Orobanche cumana* (*O. cumana*) stellt für Landwirte im Sonnenblumenanbau ein großes Problem dar, da er ohne effektive Behandlung hohe Ertragsverluste verursacht. Eine Möglichkeit diesem Problem gerecht zu werden ist die Anwendung des sogenannten Clearfield® Systems. Die chemische Lösung nutzt Herbizide aus der Gruppe der Imidazolinone und eine gegen Imidazolinone tolerante Sonnenblumenlinie. Doch mit der dauerhaften Anwendung dieser Lösung auf den Feldern wächst auch das Resistenzrisiko. Deshalb wurde nach neuen Lösungen gesucht und die Möglichkeit der Anwendung von Prohexadion gefunden. Dieser Wachstumsregulator zeigt in kombinierter Anwendung mit Imazamox (Imidazolinon-Herbizid) eine verbesserte Kontrolle des Parasiten im Vergleich zur Einzelapplikation von Imazamox. Im Fokus der folgenden Arbeit stand es, die Wirksamkeit und molekularen Mechanismen von Prohexadion aufzudecken. Dabei sollte analysiert werden, ob der Effekt auf einem direkten Einfluss auf den Parasiten oder auf der Beeinflussung der Sonnenblume beruht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich der Wachstumsregulator nach Blattapplikation schnell systemisch in der Sonnenblume verteilt und auch die Sonnenblumenwurzel als Angriffsort von *O. cumana* erreicht. Zudem konnte eine geringe Ausscheidung des Wirkstoffes aus den Sonnenblumenwurzeln demonstriert werden. Dies machte die Analyse des direkten Einflusses von Prohexadion auf die *O. cumana* Keimung notwendig und bewies eine signifikante, dosisabhängige Inhibition dieser *in vitro*. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass der Parasit durch einen erneuten Stimulus nicht auskeimen kann und die Hemmung durch Prohexadion damit irreversibel ist.

Als weiterer Ansatzpunkt wurde die Beeinflussung der von der Sonnenblume ausgesendeten Keimungsinduktoren durch Prohexadion untersucht. Dabei fokussierten sich die Studien auf die Sesquiterpenlactone (STL) Dehydrocostus lactone, Costunolid, Tomentosin und 8-Epixanthatin. Durch die Anwendung von Prohexadion konnte eine tendenzielle Reduktion dieser STL zu

verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden. Allerdings sind zur Untermauerung dieser Ergebnisse noch weitere Studien nötig.

Zusätzlich zeigte der Wachstumsregulator einen signifikanten Einfluss auf das Sonnenblumenmetabolom. Dabei kommt es zur Akkumulation einiger Flavonoide, wie beispielsweise Eriodictyol, dem anti-pathogene Eigenschaften zugeschrieben werden. Nach weiteren Analysen konnte auch die F3h als ein molekularer Wirkort von Prohexadion in der Sonnenblume bestätigt werden. Weiterhin konnte im Metabolom eine Anreicherung von Salicylsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure nachgewiesen werden. Diese Akkumulation deutet eine induzierte Abwehrreaktion der Sonnenblume an, welche durch qPCR Analysen bestätigt werden konnte.

Zusammenfassend ist die Anwendung von Prohexadion als Pflanzenstärkungsmittel gegen *O. cumana* im Sonnenblumenanbau sinnvoll, da es zu einem kleinen Teil direkt auf den Parasiten wirkt, aber auch die Sonnenblume auf einen Pathogenangriff vorbereitet. In weiteren Studien muss der Fokus auf die Anwendung im Feld gelegt werden. Dabei ist zu analysieren, welche Umweltbedingungen für eine optimale Wirkung sorgen und wie oft eine Anwendung von Prohexadion wiederholt werden sollte.

II Abstract

The obligate holoparasite *O. cumana* is a major threat in sunflower cultivation causing high yield losses without effective treatment. One way to combat the parasite is the so-called Clearfield® system consisting of an imidazolinone herbicide and an imidazolinone-tolerant sunflower. However, repetitive application of the Clearfield® system enhances the risk of resistance development of *O. cumana*. Therefore, new solutions and improved products were needed to control the devastating parasite. It turned out that the combined application of the growth regulator prohexadione together with imazamox (imidazolinone herbicide) was able to improve the efficacy against the parasite compared to the sole application of imazamox. The focus of the present work was to uncover molecular mechanisms of prohexadione and to find out if the efficacy is based on a direct activity on the parasite or by influencing the sunflower.

The results show that the growth regulator was systemically translocated in sunflowers very quickly after foliar application and reaches the sunflower root within 6 hours. In addition, it was possible to show that the active ingredient gets excreted from sunflower roots, directly at the site of *O. cumana* attack. Interestingly, prohexadione mediates a dose-dependent inhibition of *O. cumana* germination and the results show that prohexadione causes a terminal germination inhibition.

After showing direct effects on the parasite, the influence of prohexadione on sunflowers was investigated in more detail. First, sesquiterpene lactones (STL), so called germination inducers, emitted by sunflower roots are analyzed. Application of the growth regulator resulted in a reduction of the investigated STLs. However, further studies are needed to force this conclusion.

In addition, the sunflower metabolome was analyzed. Prohexadione application leads to accumulation of some flavonoids, such as eriodictyol, to which anti-pathogenic properties are attributed. After further analysis, the flavanone-3-hydroxylase could be confirmed as a molecular site of action of prohexadione in sunflower. Furthermore, an accumulation of salicylic acid and p-

hydroxybenzoic acid was detected in the metabolome. This accumulation suggests an induced defense response in sunflower, which could be confirmed by qPCR analyses.

In conclusion, the current work demonstrates that the additional application of prohexadione mediates advantages over the sole application of imazamox. The growth regulator directly impacts germination of the parasite, but also prepares the sunflower for pathogen attack via diverse molecular targets. Further studies need to focus on field application scenario. It is necessary to elaborate optimal treatment conditions and hands-on application protocols.

1 Einleitung

1.1 Parasitäre Pflanzen der *Orobanchaceae* Familie

Parasitismus ist eine sehr effiziente Lebensweise und kann sowohl unter Tieren als auch unter Pflanzen beobachtet werden (Poulin & Morand, 2000). Im Pflanzenreich haben schätzungsweise 1 % aller Angiospermen eine parasitische Lebensweise (Keyes *et al.*, 2001; Kuijt, 1970; Westwood *et al.*, 2010), die sich durch die Fähigkeit charakterisiert, nötige Nährstoffe über die Wurzeln oder den Spross anderer Pflanzen zu beziehen. Dabei bilden sie parasitäre Strukturen, sogenannte Haustorien, aus (Kuijt, 1970). Diese Strukturen sichern die Haftung des Parasiten an

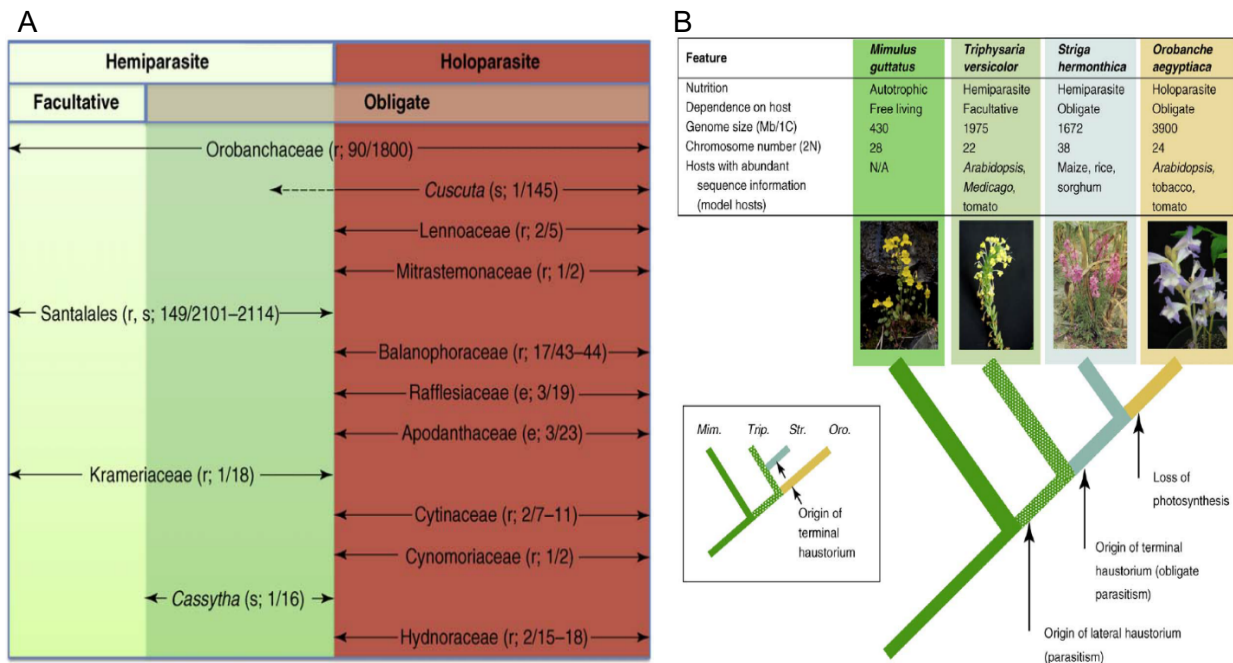


Abbildung 1: Übersicht der parasitischen Lebensweise im Reich der Orobanchaceae Familie.

A. Die Diversität der Parasiten unter den Angiospermen nach Westwood *et al.* (2010). Darstellung des hemi- und holoparasitischen Lebensstils. Dabei wurde zusätzlich unterschieden zwischen fakultativer und obligater Lebensweise. Orobanchaceae deckt als einzige Klasse alle Lebensweisen ab. **B** Vergleich von Merkmalen und evolutionärer Verwandtschaften zwischen Orobanchaceae-Arten nach Westwood *et al.* (2010). In dieser Abbildung werden die drei Möglichkeiten des Parasitismus abgebildet. Beginnend mit den autotroph, freilebenden Pflanzen (Beispiel: *Mimulus guttatus*) über die fakultative hemiparasitischen Pflanzen (Beispiel: *Triphysaria versicolor*) bis hin zu den obligaten Hemiparasiten (Beispiel: *Striga hermonthica*) und den obligaten Holoparasiten (Beispiel: *Orobanche aegyptiaca*).

der Wirtspflanze und gewährleisten das Eindringen und damit die Nährstoffversorgung. Dabei entsteht eine gewisse Abhängigkeit vom Wirt, welche sich in eine fakultative und obligate

Lebensweise unterteilen lässt (Abbildung 1A). Fakultative Parasiten sind in der Lage autotroph zu leben, mit einer vom Wirt unabhängigen Reproduktion. Sollte jedoch eine passende Wirtspflanze erreichbar sein, kann diese auch parasitiert werden. Obligate Parasiten jedoch sind zwingend abhängig von einer Wirtspflanze. Die Samen dieser Pflanzen keimen nur nach Erhalt eines chemischen Signals, ausgesendet von einem passenden Wirt. Eine zusätzliche Klassifizierung der Parasiten ist anhand der Fähigkeit Photosynthese zu betreiben möglich. Hemiparasiten sind durchaus in der Lage selbst ihren Kohlenstoffbedarf über eigene Photosynthese zu decken. Holoparasiten hingegen besitzen keine photosynthetische Aktivität und müssen daher alle Nährstoffe über das Haustorium und damit den Wirt beziehen. Einzig die *Orobanchaceae* Familie deckt alle parasitischen Lebensweisen ab und kann beispielhaft an drei Vertretern beschrieben werden. In einer vergleichenden Analyse nach Westwood *et al.* (2010) werden wichtige evolutionäre Schlüsselereignisse prognostiziert, dabei beginnt die Darstellung mit der Klasse der autotroph und frei lebenden Pflanzen, wie beispielsweise *Mimulus guttatus* (Abbildung 1B). Der Ursprung eines lateralen Haustoriums (Yoshida *et al.*, 2016) führt demnach generell zum Parasitismus, welcher anhand von *Triphysaria versicolor* beschrieben werden kann, einem Vertreter der fakultativen Hemiparasiten. Dem Ursprung eines terminalen Haustoriums (Chang & Lynn, 1986; Yoshida *et al.*, 2016) folgt die Klasse der obligaten Hemiparasiten (*Striga hermonthica*). Schließlich führt der Verlust der Photosynthese zur Klasse der obligaten Holoparasiten, wie beispielsweise *Orobanche aegyptiaca* oder *Orobanche cumana*. Nach einem Modell von Bennett und Mathews (2006) könnte der Ursprung des terminalen Haustoriums auch zur unabhängigen Entwicklung von *Striga* und *Orobanche* geführt haben.

Pflanzen-Parasitismus hat einen großen agronomischen und ökonomischen Einfluss. In der Familie der *Orobanchaceae* verursachen insbesondere *Striga* und *Orobanche* global den größten agronomischen Schaden (Delavault *et al.*, 2017; Parker, 2009; Westwood *et al.*, 2010). Schätzungsweise 16 Millionen Hektar im Mittelmeerraum und Westasien sollen schon 1991 von *Orobanche spp.* bedroht gewesen sein (Parker, 2009). In Spanien sind beispielsweise 20 000 ha

der konventionellen Sonnenblumenfelder stark mit *Orobanche cumana*, dem Wurzelparasiten der Sonnenblume, befallen. In Griechenland liegt der jährliche Ernteverlust bei 60 %, wobei 10 000 ha der Sonnenblumenfelder mäßig bis stark befallen sind (Parker, 2009; Pineda-Martos *et al.*, 2013). Aufgrund der hohen agronomischen Bedeutung wird der Fokus in dieser Arbeit auf den Sonnenblumen Parasiten *O. cumana* gelegt.

1.2 *Orobanche cumana* – der Wurzelparasit der Sonnenblume

Aufgrund einiger besonderen Eigenschaften ist die Kontrolle von *O. cumana* sehr aufwendig. Die Samen haben nur eine Größe von 300 – 400 µm (Krupp *et al.*, 2015), was die Verteilung in den Felder durch Umwelteinflüsse begünstigt. Zudem produziert eine Pflanze mehrere tausend Samen, die über Jahrzehnte in Samenruhe im Boden überlebensfähig sind und somit eine Art „Samenbank“ in den infizierten Feldern aufbaut. Auch der komplizierte Lebenszyklus (Duca *et al.*, 2013) der holoparasitischen Pflanze macht die Bekämpfung schwierig (Abbildung 2). Dieser beginnt mit dem Konditionieren der Samen mittels einer über mehrere Tage anhaltenden

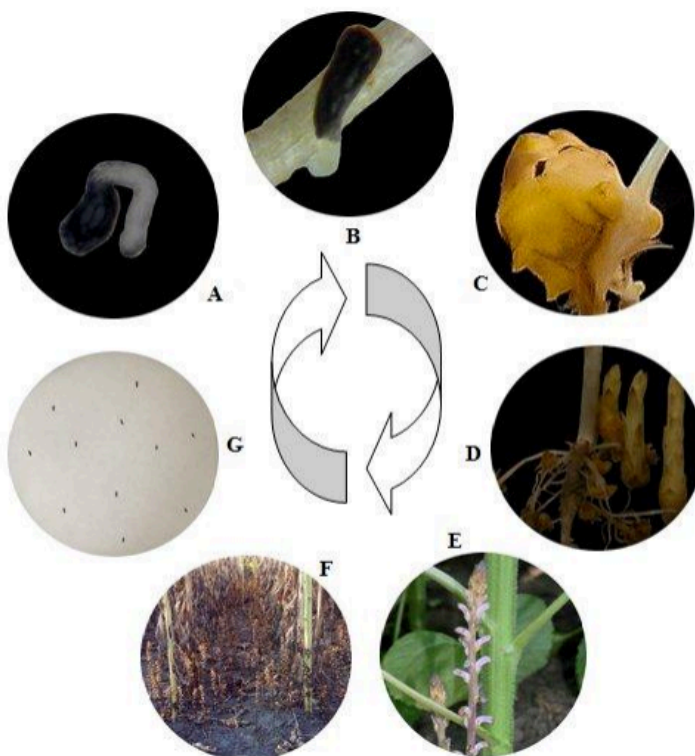


Abbildung 2: Lebenszyklus von *O. cumana*. Dieser Lebenszyklus, beschrieben durch Duca *et al.* (2013), startet mit der Samenkeimung (A) und der Entwicklung des sogenannten Appressoriums. Anschließend folgt die Phase der Entwicklung des Haustoriums (B) gefolgt von der Entwicklung der sogenannten Knötchen (C). Die Knötchen können sich dann im weiteren Wachstum in Tuberkel differenzieren (D) woraus sich wiederum nach einigem Wachstum eine blühende Orobanche Pflanze (E) entwickelt. Die letzte Phase der Samenreifung (F) schließt dann mit dem Erhalt neuer *O. cumana* Samen (G) ab.

Mindesttemperatur von ungefähr 20°C, gefolgt von einem chemischen Signal der Sonnenblumenwurzel (Duca *et al.*, 2013). Als mögliche Keimungsinduktoren werden für *O. cumana* unter anderem die Sesquiterpenlactone (STL) Dehydrocostus lactone, Costunolid, Tomentosin und 8-Epixonthatin diskutiert (Joel *et al.*, 2011; Raupp & Spring, 2013). Nach induzierter Keimung (Abbildung 2A) folgt das chemotropische Radikelwachstum in Richtung der Wirtswurzel (Worsham, 1987). Verschiedene Strukturen wie das Appressorium und eine papilläre Zellschicht, ermöglichen das Anheften des Parasiten an die Sonnenblumenwurzel, wonach der Parasit mit Hilfe intrusiver Zellen eine direkte Phloem-Verbindung zum vaskulären System der Sonnenblume herstellen kann (Joel & Losner-Goshen, 1994; Krupp *et al.*, 2019). Mit der Bildung des Haustoriums (Abbildung 2B) ist die Nährstoff- und Wasserversorgung des Parasiten gewährleistet und das weitere Wachstum beginnt. Dabei kommt es zur Formierung sogenannter Knötchen (Abbildung 2C), welche sich weiter in Tuberkel (Abbildung 2D) differenzieren. Nach Auflaufen der bräunlich-gelben *O. cumana* Pflanze (Abbildung 2E) bilden sich leicht violette Blüten, welche nach einem Reifungsprozess (Abbildung 2F) eine hohe Anzahl frischer Samen (Abbildung 2G) hervorbringen. Abhängig von Umwelteinflüssen kann die unterirdische Phase 30 bis über 100 Tage und der gesamte Lebenszyklus von *O. cumana* etwa 3 – 5 Monate andauern (Kroschel, 2001).

Als obligater Holoparasit fehlt *O. cumana* die Fähigkeit Photosynthese zu betreiben, nachgewiesen durch den Vergleich der plastidären DNA von *O. cumana* und Tabak (Delavault & Thalouarn, 2002; Wolfe & DePamphilis, 1997). Dies erklärt die fehlende grüne Färbung der blühenden Pflanzen und betont erneut die absolute Abhängigkeit vom Wirt und die verheerenden Folgen für die befallene Nutzpflanze.

Zum Schutz der Nutzpflanze wurde eine genetische Resistenz in das Sonnenblumen Genom eingekreuzt. Dies fand erstmals in der ehemaligen UdSSR statt (Pustovoit, 1966). Mittlerweile existieren einige genetische Resistenzen der Sonnenblumen gegen *O. cumana*. Diese sind in den meisten Fällen jedoch rassenspezifisch (qualitative Resistenz) und beruhen auf nur einem oder

sehr wenigen Genen (vertikale Resistenz) (Fernández-Martínez *et al.*, 2015). So sind Sonnenblumen mit dem sogenannten OR1-Gen („*Orobanche* resistance“) resistent gegen die *O. cumana* Rasse A, und Sonnenblumen mit dem OR2-Gen gegen die *O. cumana* Rasse B (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015). Allerdings scheint dieses Gen-für-Gen Modell mittlerweile nicht mehr die Komplexität der *O. cumana* Pathotypen zu erfassen, weshalb ein dreistelliger Code zur Beschreibung der Virulenz einer *O. cumana* Population vorgeschlagen wurde (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015). Die Forschung zu den Resistenzmechanismen steht allerdings noch am Anfang. Kürzlich konnte das Sonnenblumengen *HaOR7* (*Heliantus annuus Orobanche resistance gene 7*), welches eine Resistenz gegen die *O. cumana* Rasse F verleiht, identifiziert und dabei festgestellt werden, dass das Protein HaOr7 das Eindringen von *O. cumana* in das vaskuläre System der resistenten Sonnenblume verhindert (Duriez *et al.*, 2019).

Ein großes Problem der Sonnenblumenzüchtung ist jedoch, dass immer neue virulente *O. cumana* Rassen die genetische Resistenz der Sonnenblume überwinden. Als mögliche Ursache für diese schnelle Entwicklung wurden verschiedene Mechanismen diskutiert, darunter beispielsweise Rekombination und die Zunahme der genetischen Diversität, sowie Mutation und Selektion innerhalb bestimmter Genpools oder Gentransfer zwischen wilden und unkrautartigen *O. cumana* Populationen (Pineda-Martos *et al.*, 2013, 2014). In Spanien konnten bis 2014 die *O. cumana* Rassen B – F, in der Türkei zusätzlich die Rasse G und in Russland bereits Rasse H identifiziert werden (Antonova, 2014; Molinero-Ruiz *et al.*, 2015).

1.3 Vorgehensweisen gegen den Sonnenblumenparasiten *O. cumana*

Die Tatsache, dass *O. cumana* nur in Verbindung mit der Sonnenblume wächst, erschwert die Bekämpfung des Parasiten. Zusätzlich besitzt *O. cumana* keinen eigenen Photosynthese-Apparat, was wiederum die Möglichkeit der Bekämpfung durch Herbizide limitiert. Dennoch bieten die oben beschriebenen Besonderheiten des Sonnenblumenparasiten auch eine Reihe von

Möglichkeiten diesen zu bekämpfen. Die Phase der Samenconditionierung und der Rezeption der Keimungsinduktoren kann beispielsweise durch die Züchtung von Sonnenblumen die nur geringe Mengen an Keimungsinduktoren aussenden oder die Möglichkeit der suizidalen Keimungsinduktion genutzt werden. Dabei werden synthetisch hergestellte Verbindungen auf dem Feld ausgebracht, was zur Keimung einiger *O. cumana* Samen und ohne Wirtskontakt zum Absterben dieser führt. Dieses Prozedere wurde in einem Tabakfeld mit dem synthetischen Strigolacton Analog Nijmegen-1 gegen *O. ramosa* getestet. In vier von zwölf Versuchen konnte, durch den Einsatz von 6.25 g ai / ha, eine Reduktion der Parasiteninfektion um 95% gezeigt werden (Zwanenburg *et al.*, 2016). Zwei Versuche dieser Reihe waren negativ, zwei waren moderat befallen, einer konnte nicht interpretiert werden und in drei Fällen trat im Versuchsjahr kein *O. cumana* Befall auf. Für diesen attraktiven Lösungsansatz für Landwirte benötigt es jedoch noch Kosten-Nutze-Analysen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Mais als Zwischenfrucht. Die Nutzpflanze löst bis zu einem gewissen Grad die Keimung von *O. cumana* aus, dient aber nicht als passender Wirt, was zum Absterben der gekeimten Parasiten führt (Ma *et al.*, 2013). Nachweislich zeigte sich eine Reduktion der auflaufenden *O. cumana* Pflanzen nach einer dreijährigen Anbauzeit der Zwischenfrucht (Ye *et al.*, 2020). Diese Möglichkeit könnte eine Reduktion der Samenbank in den infizierten Feldern hervorrufen, ist jedoch über einen langen Zeitraum nicht ökonomisch. Die bisher erfolgreichste Lösung um Infektionen und die Bildung von Haustorien zu verhindern ist die Züchtung von resistenten Sonnenblumenlinien (Louarn *et al.*, 2016; Pérez-Vich *et al.*, 2004; Risipail *et al.*, 2007). Allerdings passt sich *O. cumana* sehr schnell an und bildet neue virulente Rassen. Die Züchtung neuer resistenter Sonnenblumenlinien ist dagegen sehr aufwendig und benötigt viel Zeit (Dimitrijevic & Horn, 2018). Schlussendlich gibt es noch die chemische Strategie unter Verwendung von Imidazolinon-Herbiziden. Beispielsweise kann der Parasit *O. crenata* in Petersilie (*Carum petroselinum* Benth.) durch den Einsatz von Imazapic und *O. minor* auf Rotkleefeldern mit Imazamox kontrolliert werden (Goldwasser *et al.*, 2003; Lins *et al.*, 2005). *O. cumana* kann ebenfalls durch Einsatz von Imazapyr und Imazapic

kontrolliert werden (Aly *et al.*, 2009; Garcia-Torres *et al.*, 1994). Ein sehr effizientes System ist das sogenannte Clearfield® System. Dieses besteht aus Imidazolinon-toleranten Sonnenblumen-Hybriden und dem dazu passenden Herbizid wie Pulsar® oder Pulsar® Plus (Mitkov *et al.*, 2019; Sala *et al.*, 2008). Der aktive Wirkstoff dieses Herbizides gehört der HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) Gruppe 2 (HRAC, 2021) an und inhibiert das Enzym Acetolactat-Synthase (Pfenning *et al.*, 2008). Dieses Enzym ist verantwortlich für die Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren wie Valin, Leucin, Isoleucin und damit essenziell für die Pflanzen (Tan *et al.*, 2005). Nach Applikation des systemischen Herbizides sterben die *O. cumana* Parasiten mit Kontakt zum vaskulären System der Sonnenblume ab, die Nutzpflanze selbst bleibt dank einer Mutation der Acetolactat-Synthase (ALS) geschützt und kann die essenziellen Aminosäuren weiter herstellen. Da dies derzeit die einzige chemische Lösung für die Kontrolle von *O. cumana* ist, wird das Resistenzrisiko als sehr hoch angesehen, da von vielen anderen Unkräutern berichtet wurde, die aufgrund einer Mutation am Zielgen ALS-resistent geworden sind (Heap, 1993-2021).

Deshalb werden neue Lösungen zur Kontrolle von *O. cumana* dringend gebraucht. Ein sehr interessanter Ansatz wurde durch Studien von Fan *et al.* (2007) demonstriert. Sie zeigten, dass durch den Gebrauch von Prohexadion die Gesamtzahl an *O. cumana* Haustorien an den Sonnenblumenwurzeln signifikant reduziert wurde. Aufgrund dieser Studie wurde die kombinierte Anwendung von Imazamox an toleranten Sonnenblumen in Kombination mit Prohexadion getestet. Dabei ergibt sich durch den zusätzlich zweimalig geteilten Einsatz der Höchstmenge von 100 g ai / ha Prohexadion (Split-Applikation) ein positiver Effekt auf den Sonnenblumenertrag, aber auch weniger, sowie später aufgelaufenen *O. cumana* Pflanzen als in der Kontrolle in der nur Imazamox appliziert wurde (Pfenning & Bremer, 2013). Somit scheint die kombinierte Anwendung Potential für die Kontrolle von *O. cumana* zu haben. Möglicherweise kann durch den Einsatz von Prohexadion auch die Aufwandmenge für Imazamox reduziert werden.

1.4 Prohexadion-Calcium - ein Wachstumsregulator mit ungeahnten Fähigkeiten

Prohexadion ist eine gut erforschte Verbindung, welche zur Wachstumsregulierung und zur Stärkung des Pflanzensprosses, um ein Umknicken der Pflanzen zu verhindern, eingesetzt wird (Rademacher, 2014, 2015). Bisher gibt es nur eine Studie welche die Verteilung, Aufnahme und den Metabolismus von Prohexadion in verschiedenen Gräserarten beschreibt. Diese bewies anhand radioaktiver Studien eine schnelle Aufnahme, sowie eine Verteilung des Wirkstoffes bis in die Wurzeln. Außerdem konnten 48 Stunden nach Behandlung zwei polare Metaboliten in den Blättern detektiert werden (Beam & Askew, 2007). Zum Verhalten von Prohexadion in der Sonnenblume gab es bis zu der vorliegenden Arbeit keine Erkenntnisse.

Für Prohexadion wurden verschiedene Wirkorte beschrieben. So beeinflusst der Wirkstoff späte Phasen der Gibberellin-Biosynthese mit Hemmung der 2 β - und 3 β -Hydroxylierung (Brown *et al.*, 1997; Griggs *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1990), sowie die ACC-Oxidase (Aminocyclopropan-carbonsäure-Oxidase), welche ACC in Ethylen umwandelt (Rademacher, 2015). Ein weiteres nachgewiesenes Target ist die Flavanon-3-Hydroxylase (F3h) von *Malus domestica* und *Pyrus communis* (Bizjak *et al.*, 2013; Halbwirth *et al.*, 2006; Roemmelt *et al.*, 2003). Bei allen beschriebenen Wirkorten von Prohexadion handelt es sich um 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase. Diese benötigen jeweils den Co-Faktor 2-Oxoglutarat. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Prohexadion und 2-Oxoglutarat (Abbildung 3) führt der Einsatz des

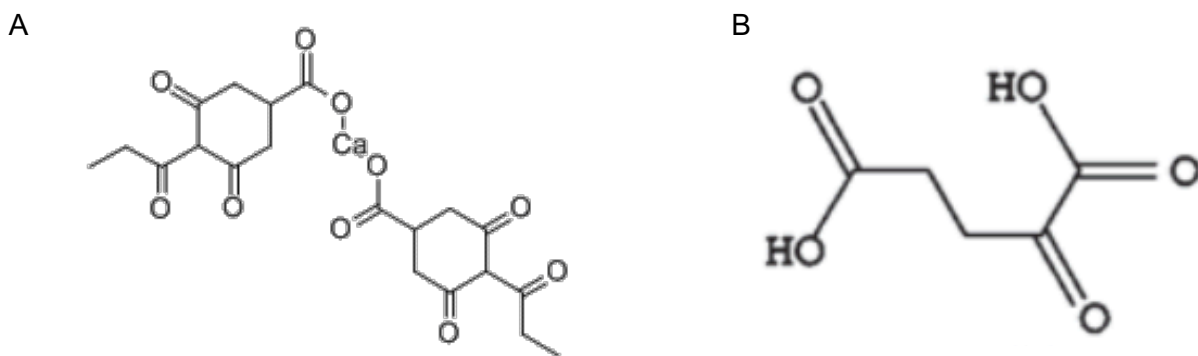


Abbildung 3: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Prohexadion-Calcium und 2-Oxoglutarat.

A. Das bivalente Salz des Acylcyclohexadion Prohexadion-Calcium hat strukturelle Ähnlichkeit zur B. 2-Oxoglutarat. (Nach Rademacher, 2000)

Wachstumsregulators wahrscheinlich zur kompetitiven Hemmung der Enzyme (Rademacher, 2000).

Unterschiedliche Studien konnten eine reduzierende Wirkung von Prohexadion auf die Feuerbrandanfälligkeit (*Erwinia amylovora*) von Apfel und Birne nachweisen (Costa *et al.*, 2001; Roemmelt *et al.*, 2003, 1999; Yoder *et al.*, 1999). Diese wird jedoch nicht auf eine direkte Wirkung auf den Erreger, sondern vielmehr auf die Veränderung der Flavonoid-Biosynthese zurückgeführt (Roemmelt *et al.*, 2003). Möglicherweise spielt dabei aber auch die Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen eine Rolle, die deshalb ebenfalls untersucht werden sollte.

1.5 Induzierte pflanzliche Abwehrmechanismen

Phytopathogene haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um Pflanzengewebe zu infizieren und kolonisieren. Genauso haben Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen zur Erkennung und Abwehr dieser Phytopathogene entwickelt. Die Erkennung eines Pathogens kann zum einen zu einer hypersensitiven Antwort („Hypersensitive Response“, HR) führen, wodurch es an der Infektionsstelle zum Absterben einzelner Pflanzenzellen kommt. Dies dient einer ersten Limitierung der Infektion und verhindert dessen schnelle Ausbreitung (Anil *et al.*, 2013). Zum anderen wird eine systemische Abwehr induziert, um auch das restliche Pflanzengewebe auf nachfolgende Infektionen vorzubereiten. Diese Mobilisierung einer infektionsinduzierten zellulären Abwehrreaktion bezeichnet man auch als „Priming“ (Conrath *et al.*, 2002). Dieser Prozess kann grob in zwei Kategorien unterteilt werden, der systemisch erworbenen Resistenz („systemic acquired resistance“, SAR) und der induzierten systemischen Resistenz (ISR).

Die ISR bezieht sich dabei auf die Kolonisierung der Rhizosphäre mit nicht-pathogenen Bakterien, welche meist sogenannte wachstumsfördernde Rhizobakterien (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) sind (Kloepper *et al.*, 1980). Durch unterschiedliche Prozesse, die während der ISR in der Pflanze ablaufen, wird das Auftreten oder die Schwere von Pflanzenkrankheiten

verringert (van Loon *et al.*, 1998). Diese Abwehrreaktion funktioniert unabhängig von Salicylsäure (SA), benötigt aber Jasmonsäure (JA) und/oder Ethylen (Pieterse *et al.*, 2000).

Die SAR hingegen wird beispielsweise durch nekrotisierende Pathogene hervorgerufen und aktiviert eine fein abgestimmte Abwehrreaktion in der gesamten Pflanze. Sie erhöht dabei die Resistenzkapazität gegen weitere Attacken, auch an noch nicht befallenen und weit vom Infektionsherd entferntem Gewebe (Kuč, 1982). Die pathogen induzierte SAR ist mit großen Transkriptomveränderungen assoziiert (Maleck *et al.*, 2000) und kann zur systemischen Akkumulation von Salicylsäure führen (Durrant & Dong, 2004). Die *Arabidopsis* Mutante *sid* („SA induction-deficient“) akkumuliert beispielsweise keine Salicylsäure (SA) nach Pathogeninokulation und ist damit anfälliger. Zusätzlich ist in dieser transgenen Pflanze die Expression des Pr1 Proteins (pathogenesis-related protein) trotz Pathogenattacke deutlich reduziert. Eine weitere Mutante ist zusätzlich nicht fähig Pr5 zu exprimieren (Nawrath & Métraux, 1999). Das Expressionsmuster der Pr1, Pr2 und Pr5 Gene wird daher als Marker für die SA-abhängige SAR gesehen und wurde schon in unterschiedlichen Spezies, wie Tomate und Sonnenblume, untersucht (Molinari *et al.*, 2014; Radwan *et al.*, 2005). Npr1 („Non-expressor of pathogenesis related genes 1“) ist ein weiterer wichtiger Schlüsselregulator der SAR (Fan & Dong, 2002; Grant & Lamb, 2006). Dieses Protein bildet mit dem Transkriptionsfaktor TGA2 einen Komplex, welcher durch SAR Induktion, und damit Anreicherung von SA, verstärkt an die DNA bindet und damit die PR-Genexpression erhöht (Abbildung 4).

Die pathogen assoziierte SAR kann auch SA unabhängig ablaufen. Dafür wird, nach Pathogenbefall, die JA (Jasmonat) abhängige SAR aktiviert, welche mit einer induzierten Expression des Pdf („Plant defensin“) Proteins einhergeht (Penninckx *et al.*, 1996) und zur Resistenz gegen verschiedene Pathogene beiträgt (Thomma *et al.*, 1998).

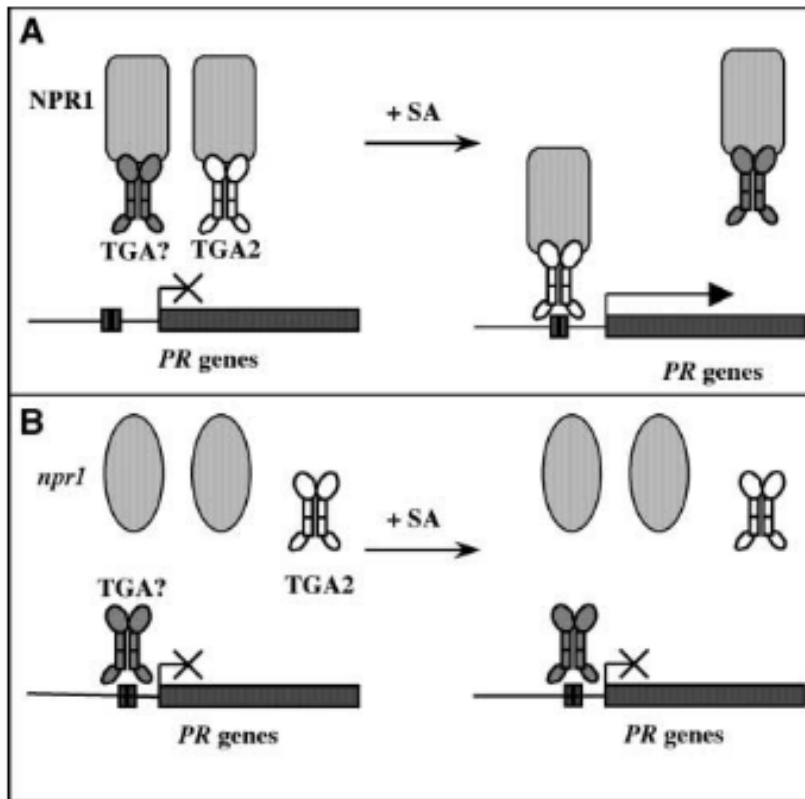


Abbildung 4: Model von Fan & Dong (2002) für den regulatorischen Mechanismus von TGA2 in SAR-assoziierten Gen-Expression.

A. In Wildtyp-Pflanzen bildet NPR1 Komplexe mit TGA2 und anderen TGA-Faktoren (TGA?). Unter nicht-induzierten Bedingungen sind diese Komplexe nicht in der Lage an die DNA zu binden. Durch SAR-Induktion (+SA) wird mehr NPR1 verfügbar, und der NPR1-TGA2 Komplex wird gebildet. Dank unbekannter Mechanismen verstärkt NPR1 die DNA-Bindungsaffinität von TGA2, was zur PR-Geninduktion führt. **B.** In einer *npr1*-Mutante ist die NPR1-TGA2-Interaktion gestört, so dass TGA2 nicht an die DNA binden kann. Einige TGA-Faktoren (TGA?) können in Abwesenheit von NPR1 zwar an die DNA binden, sind aber nicht aktiv an der Induktion der PR-Genexpression beteiligt.

Ein weiterer wichtiger Regulator von Abwehrmechanismen in der Pflanze ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (Pal), welche das erste Enzym des Phenylpropanoid-Stoffwechsels und damit ein Schlüsselenzym zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel darstellt. Der Knock-out der vier Pal Varianten in *Arabidopsis* führt beispielsweise zu erhöhter Anfälligkeit gegen das Bakterium *Pseudomonas syringae* und zu einer verringerten Akkumulation von SA nach Pathogenbefall (Huang *et al.*, 2010). Eine erhöhte Pal-Aktivität spricht somit für einen Abwehrmechanismus, welcher sowohl durch biotischen als auch durch abiotischen Stress der Pflanze ausgelöst werden kann. Dabei entstehen Phenylpropanoide, die unter anderem als Phytoalexine klassifiziert werden können (Dixon & Paiva, 1995). Zusätzlich zeigten Untersuchungen, dass gegen *O. cumana* resistente Sonnenblumenlinien eine Akkumulation des Pal-Proteins nach Pathogenbefall in der Wurzel aufweisen, nicht aber die anfällige Variante. Ebenso konnte eine Akkumulation der dem Sekundärmetabolismus angegliederten 4-coumarat-CoA-Ligase (4Cl) festgestellt werden, welche auch in der anfälligen Variante nicht nachweisbar war (Yang *et al.*, 2017). Dies beweist eine Steigerung des Lignin-Stoffwechsels, wodurch potentiell der Lignin-Gehalt in den

Sonnenblumenwurzeln und damit die Resistenz gegen *O. cumana* erhöht wird (Goldwasser *et al.*, 1999). Die Studie von Yang *et al.* (2017) detektiert ebenso eine Akkumulation von CerK1 („chitin elicitor receptor kinase 1“), einem Strukturerkennungsrezeptor („pattern-recognition receptor“, PRR) der Zelloberfläche. Dieser Rezeptor erkennt konservierte pathogen-assoziierte molekulare Strukturen („pathogen-associated molecular pattern“ PAMP) und aktiviert somit die PAMP getriggerte Immunität („PAMP-triggered immunity“, PTI). Dabei spielt die direkte Bindung von pathogenem Chitin mittels des Lysin-Motivs der CerK1 eine wichtige Rolle (Miya *et al.*, 2007).

Die beschriebenen Abwehrmechanismen der Pflanze können verschiedenen Forschungsergebnissen zufolge auch durch chemische Verbindungen erzeugt werden. So konnte die Verbindung Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothioicacid S-methylester (BTH) mit der Induktion einer SAR in Weizen gegen eine Mehltauinfektion in Verbindung gebracht werden (Görlach *et al.*, 1996). Ebenso kann eine Vorbehandlung mit BTH zu einer erhöhten PAL Genexpression führen (Kohler *et al.*, 2002). Auch im Kampf gegen Wurzelparasiten der Familie der *Orobanchacea* zeigte BTH schon seine Wirkung. So konnte eine Blattapplikation von 0,6 – 1 mM BTH eine *O. crenata* Infektion im Gewächshaus und der Klimakammer reduzieren (Pérez-de-Luque *et al.*, 2004), ebenso wie BTH eine Reduktion von *O. cumana* an Sonnenblumen in Topfversuchen hervorrief (Sauerborn *et al.*, 2002).

Dank der Forschungsergebnisse von Pfenning *et al.* (2013) stellt sich nun die Frage, ob die gezeigte Reduktion der aufgelaufenen *O. cumana* Pflanzen im Prohexadion-behandelten Feld mit einer aktivierten systemischen Resistenz der Sonnenblume zusammenhängt.

1.6 Forschungsziele

Wie bereits erläutert, verursacht *O. cumana* große agronomische und ökonomische Schäden im Sonnenblumenanbau. Diesem Problem kann chemisch aktuell nur mit dem Clearfield® System entgegengewirkt werden, was wiederum mit Resistenzrisiken einhergeht. Die Möglichkeit des Einsatzes von Prohexadion in befallenen Feldern soll daher näher untersucht werden, um neue Wege der *O. cumana* Eindämmung zu ergründen. Durch die genaue Analyse des Wirkungsmechanismus von Prohexadion auf die Sonnenblume und / oder *O. cumana* kann das Marketing von BASF in der Aufklärung der Landwirte unterstützt werden und es besteht die Möglichkeit die gewonnen Erkenntnisse auf zukünftige Produktentwicklungen zu übertragen.

Aufgrund der bisher fehlenden Datenlage stand zunächst die Aufnahme, Verteilung und potenzielle Exkretion von Prohexadion in der Sonnenblume im Fokus dieser Forschungsarbeit, um gewonnene Erkenntnisse auf die Effektivität der *O. cumana* Bekämpfung übertragen zu können. Des Weiteren sollte die Verteilung des Wirkstoffes im Boden und die Wirkung von Prohexadion auf die Keimung des Sonnenblumenparasiten eruiert werden, um einen detaillierten Einblick zu erhalten, ob und wie Prohexadion die Samen im Boden erreichen könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Analyse der STL, welche als mögliche Keimungsinduktoren von *O. cumana* diskutiert werden. Die Idee dabei war einen möglichen Effekt von Prohexadion auf die Exkretion oder Bildung der in der Sonnenblume gebildeten Keimungsinduktoren zu ermitteln. Die Untersuchung der Sonnenblume sollte dann mit der Analyse von Metabolom-Veränderung, verursacht durch Prohexadion-Behandlung, weitergeführt und die Bestätigung eines potentiellen molekularen Wirkortes von Prohexadion kontrolliert werden. Ebenso sollte die induzierende Wirkung von Prohexadion auf eine systemische Resistenz der Sonnenblume gegen *O. cumana* auf molekularer Basis untersucht werden.

2 Material

2.1 *Orobanche cumana* Samen

Alle in dieser Arbeit verwendeten *O. cumana* Samen wurden 2017 in Arahál (Spanien, Koordinaten: 37°21'8"11" N / 05°34'4"64" W) kurz nach der Blüte geerntet. Zur Reinigung der 300 – 400 µm großen Samen, wurden die aufgebrochenen Samenkapseln mit Hilfe unterschiedlicher Siebe der Firma Retsch gereinigt. Die Maschenweite reichte dabei von 500 – 100 µm, wobei das Sieb mit der kleinste Maschenweite (100 µm) die gereinigten *O. cumana* Samen enthielt. Die Samen wurden anschließend in einem Plastik Gefäß verwahrt und bei 6°C gelagert.

2.2 Saatgut und Anzucht der Sonnenblume - *Helianthus annuus*

Sofern nicht anders beschrieben wurde die Sonnenblumen-Variante (*Helianthus annuus*) Paraiso 1000 als Wirt für *O. cumana* verwendet. Diese Sorte ist anfällig für alle *O. cumana* Rassen und ist tolerant gegen Imidazolinone, also Herbizide der HRAC Gruppe 2 (HRAC, 2021). Diese Herbizide inhibieren in nicht toleranten Pflanzen das Enzym Acetolactat-Synthase (ALS) und somit die Synthese der essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Alle Experimente mit Sonnenblumen wurden in einer Klimakammer unter folgenden Bedingungen inkubiert: 20 Stunden bei 24°C und 13 000 lm / m² mit einer morgendlichen Rampe für 4 Stunden von 20°C auf 24°C und 13 000 lm / m². In der Nachtperiode lag die Temperatur bei 20°C für 4 Stunden.

2.3 Eigenschaften des verwendeten Erdbodens

Die Erde, die sowohl für das Umsetzen der Sonnenblumen als auch für die Wirkstoff-Mobilitätsstudien verwendet wurde, hatte die Eigenschaften von lehmigem Sandboden. Der pH-Wert betrug 7,57, und enthalten waren 1,43 % organischer Kohlenstoff und 3,5 % CaCO₃ in der Trockensubstanz (TS). Ebenso 0,12 mg / g TS P₂O₅, 0,1 mg / g TS K₂O und 0,1 mg / g TS Mg.

2.4 Prohexadion-Calcium

Prohexadion-Calcium wurde als Reinsubstanz für die Keimungsassays verwendet. Das BASF Produkt Regalis® (BASF, 2020), welches den formulierten Wirkstoff enthält, wurde für alle weiteren Studien verwendet. Alle Applikationen des formulierten Wirkstoffes wurden in der H3 Spritzkabine unter Verwendung der XR Teejet 80 015 Düse durchgeführt.

2.5 Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung für
ACQUITY UPLC System	Waters™	Proben Analyse
Analysenwaage	Mettler Toledo	Einwaage
Autoklav	Fedegarc Autoklaven AG, IBS tecnomara	Sterilisation
Autoklav	Varioklav, Dampfsterilisator	Sterilisation
Autoklav	Tuttnauer ELV 5075	Sterilisation
BioPhotometer	Eppendorf	Messung der optischen Dichte
Bodenzentrifuge	Beckmann, Avanti	Probenzentrifugation
CFX connect, Real Time System	BioRad	Schmelzpunktbestimmung
ChemiDoc™ MP System	BioRad	Gelelektrophorese, Western Blot
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf	Denaturierung, Transformation, Inkubation
Fast Prep -24; Sample Preparation System	MP Biomedicals™	Gewebeaufschluß

Flachstrahldüse XR TeeJet 80 015	Spraying Systems	Applikation in der Spritzkabine
Gefriertrocknungsanlage mit Vakuumpumpe	Christ LCG ALPAH 1-4 LSC + Drehschiebervakuumpumpe von Vacuubrand	Gefriertrocknung von Proben
gentleMACS M Tubes	Miltenyi Biotec	Gewebeaufschluß
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec	Gewebeaufschluß
H3 Spritzkabine	BASF SE Robotik und Laborautomatisierung	Roboteranlage zur Applikation der Sonnenblumen
Hard-Shell® 96-Well PCR Plate	BioRad	Für CFX Connect, Durchführung FTSA
Inkubator	Certomat HK	Inkubation <i>E. coli</i> und <i>O. cumana</i>
Inkubator (groß)	Infors HT, Multitron	<i>O. cumana</i> Inkubation
Klimakammer	Conviron CMP4030	Inkubation Sonnenblumen
Lysing Matrix D	MP Biomedicals™	Wurzelaufschluß
Mahlbecher MM 400, 50 ml	Retsch®	Wurzelaufschluß
Microseal® 'B' Adhesive Seals, Optical	BioRad	Für CFX Connect, Durchführung FTSA
Milli-Q® Integral Wasseraufbereitungssystem	Millipore	Reinstwasseraufbereitung
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BioRad	Gelelektrophorese
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und DNA/RNA
Pipetten	Eppendorf	alle Experimente
Pipettenspitzen	Eppendorf	2,5, 10, 200, 300, 1000 µl ohne Filter für alle Experimente

PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad	Gelelektrophorese
Q125 Sonicator	QSonica	Zellaufschluss E. coli
Rotations-Vakuum-Konzentratoren	Christ, Typ 2-33IR	Proben-Konzentration
Schwingmühle	Retsch®, Typ MM301	Wurzelextraktion, Probenaufbereitung qPCR
Stereomikroskop	Axio Zoom.V16, Zeiss	Auszählen Keimungsassay
Steriflip-GP, 0,22 µm, Polyethersulfon, gamma-sterilisiert	Millipore	Steril-Filtrationseinheit
Sterilbank	Thermo Electron Corporation; HERA Safe	Arbeiten mit GVO's
Synergy HT Photometer	BioTek®	Bradford Assay, Enzymassays
Thermomixer	Eppendorf	Denaturierung für SDS-PAGE
Tischzentrifuge	Eppendorf (5430R)	alle Experimente
Trans-Blot Turbo, Transfer System	BioRad	Western Blot
TRIPLE QUAD API 5500	AB SCIEX	Elektrospray Ionisierung
UPLC System ACQUITY	Waters™	Analytische Messungen
Waage	Sartorius	Einwaage

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Lieferant	Bestellnummer	CAS-Nummer
(+/-) Eriodyctiol	Merck KGaA	94258	4049-38-1
8-Epixanthatin	CemFaces	CFN89507	30890-35-8
Acetonitril	Merck KGaA	271004	75-05-8
Agar Typ E	Merck KGaA	A4675	9002-18-0
Ameisensäure	Fluka	56302	64-18-6
Ampicillin	Carl Roth	K029.2	69-53-4
Bovine serum albumine	Merck KGaA	05470	9048-46-8
BugBuster MasterMix	Merck KGaA	71456	
Chloramphenicol	Merck KGaA	C0378	56-75-7
cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche	11873580001	
Costunolid	Merck KGaA	SML0417	553-21-9
D(+)-Saccharose	Merck KGaA	16104	57-50-1
Dehydrocostus lactone	Merck KGaA	42575	477-43-0
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA	450200	7758-11-4
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA	S7907	7558-79-4

Dimethylsulfoxid	Merck KGaA	276855	67-68-5
DNase I	Roche	10104159001	
Essigsäure	Merck KGaA	71251	64-19-7
Ethanol	Merck KGaA	34852	64-17-5
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	Merck KGaA	E7889	139-33-3
Fludioxonil	Merck KGaA	46102	131341-86-1
Gentamycin	Merck KGaA	G1264	1405-41-0
GoScript™ ReverseTranscription System	Promega	A5001	
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega	A6002	
Hepes Natriumsalz	Merck KGaA	H7006	75277-39-3
IPTG	Merck KGaA	I6758	367-93-1
Kanamycinsulfat	Merck KGaA	B5264	25389-94-0
LB Medium	Invitrogen™	12780052	
Lysozyme	Merck KGaA	L6876	12650-88-3
Magensiumchlorid hexahydrat	Merck KGaA	63072	7791-18-6
Magermilchpulver	Merck KGaA	70166	
Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit	Promega	AS1340	

Methanol	Merck KGaA	34860	67-56-1
MOPS	Merck KGaA	M1254	1132-61-2
Murashige & Skoog medium including B5 vitamins	Duchefa Biochemie	M0231	
Natriumchlorid	Merck KGaA	13423	7647-14-5
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	S9638	10049-21-5
Novex™ NuPAGE™ Probenreduktionsmittel (10X)	Thermo Fisher Scientific	NP0004	
PD-10 Einwegsäulen	GE Healthcare	17-0851-01DE	
Pierce™ Rinderserumalbumin Standards	Thermo Fisher Scientific	23208	
Prohexadion-Calcium in Formulierung	BASF SE (intern)	Regalis®	127277-53-6
Prohexadion-Calcium, Reinsubstanz	BASF SE (intern)		127277-53-6
Protino Ni-IDA 1000 Kit	MACHEREY-NAGEL	745160	
rac-GR24	Apollo	BICR114_5mg	76974-79-3
S.O.C-Medium	Thermo Fisher Scientific	15544-034	
SYPRO™ Orange	Thermo Fisher Scientific	S6650	
Taxifolin	Merck KGaA	78666	480-18-2
Tomentosin	tebu-bio	186MC-3538	33649-15-9
Triton-X-100	Merck KGaA	X100	9002-93-1

Trizma®-Base	Merck KGaA	T1503	77-86-1
Tween20	BioRad	170-6531	9005-64-5
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat reduziert Tetranatriumsalz	Merck KGaA	N1630	2646-71-1
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert Dinatriumsalz Hydrat (NADH)	Merck KGaA	10128023001	606-68-8

2.7 Plasmide, Medien und Primer

Für die Interaktionsanalyse mit Prohexadion wurde die F3h aus *Helianthus annuus* (HaF3h) im pET24-N-His Vektor (Abbildung 5) bei BioCat synthetisiert. Das Molekulargewicht dieser Sequenz wurde mit N-terminalem His-Tag angegeben (Tabelle 8).

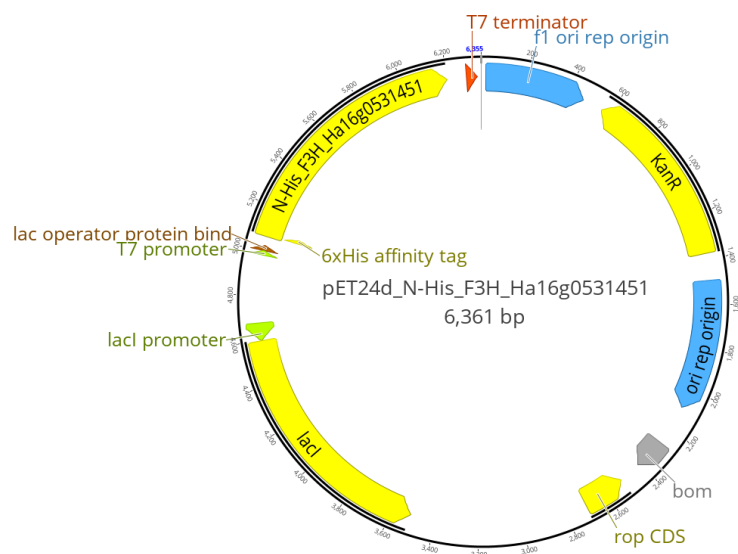


Abbildung 5: HaF3h im pET24-N-His Vektor.

Zur Selektion ist in diesem Vektor eine Kanamycin Resistenzgen vorhanden. Der T7 Promotor kann über IPTG induziert werden. Beim Insert handelt es sich um die HaF3h mit einen N-terminalen His-Tag.

Für die Transformation und Expression wurden folgende Medien verwendet:

S.O.C.-Medium: 2% Tryptone
 0,5 % Yeast Extract
 10 mM NaCl

2,5 mM KCl
 10 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

LB-Medium: 10 g/L Pepton
 5 g/L Hefeextrakt
 5 g/L NaCl
 → pH 7,0 ± 0,2

Antibiotika: Kanamycin (Stammlösung: 50 mg/mL)
 → Verdünnung: 1:1000 (Endkonzentration: 50 µg/mL)

Zur Untersuchung der Transkriptregulation bestimmter Gene nach Applikation von Prohexadion wurden qPCR Studien im Labor von Dr. Michael Eichenlaub (BASF SE, Ludwigshafen) mithilfe der in Tabelle 3 aufgeführten Primerpaare durchgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Primer für qPCR Analyse.

Gen	Primersequenz		Amplikonlänge (bp)
	Primer forward (5' → 3')	Primer reverse (3' → 5')	
CERK1	CAGTTCGTAAGATGGCTCAACTTG	GATAGATCTCATGCTCGGCCTTAG	77
PAL	GGATTTGGTGCTACTTCTCATAGGA	TGTGCCGTTGCCGAATATC	99
4CL	AAATCGAATGGATCAACCATCAC	GCTTGTAAGAATACCACCTGTTTTGAG	73
PDF	GGGGCCCCGGGAAC	ACCTGCAGGAGGAGCTGGT	128
PR1	GGTGAGAACATTGCCCAAGGT	ACCTGCAGGAGGAGCTGGT	88
PR5	ATGTACCGCGGATATCAATGG	TGTGGTCATACGATGATCTTTCACT	76
NPR1	AGCGATAGTTTTCCCAACAAACA	AACCGTCTAATGAAGTATGACCTTCTC	112
EF1	CGGTGTCAAGCAAATGATCTGT	CCTCGCCTTCGAGTACTTTGG	70

2.8 Proteinlängenstandard

Zur Visualisierung der Proteingröße im SDS-Polyacrylamidgel nach Proteinexpression in *E. coli* Zellen wurde der PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Abbildung 6) verwendet.

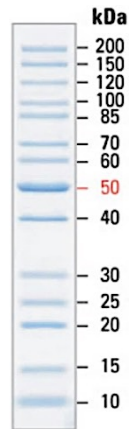


Abbildung 6: Proteinlängenstandard.

Banden Profil des PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, #26614) aufgetrennt mit Hilfe eines 8-16% Tris-glycine Gels (SDS-PAGE), welches mit Coomassie blue dye gefärbt wurde. Die Informationen stammen von ThermoFisher Scientific.

2.9 Software und Datenbanken

Zur Analyse und Recherche von Gensequenzen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Datenbanken verwendet. Die Auswertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurde mithilfe der in Tabelle 5 aufgelisteten Software durchgeführt.

Datenbank	Verwendung	Internetadresse
ChloroP	Berechnung Transitpeptid	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
UniProt	Sequenzrecherche	http://www.uniprot.org/
Clustal Omega	Sequenzvergleiche	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
BLAST®	Sequenzrecherche	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
EPPO Global Database	EPPO Code Recherche	https://gd.eppo.int/

Tabelle 5: Liste der verwendeten Software

Software	Verwendung	Version
SigmaPlot	Statistische Analyse	12.5.
Analyst®	Analytische Auswertung	1.6.3 (AB Sciex)
Geneious Prime®	Sequenzanalyse	2020.1.2
EndNote™	Literaturdatenbank	X8.1
CFX Manager™	FTSA Analyse	3.1 (Bio-Rad)
Image Lab™	SDS PAGE Analyse	5.0 (Bio-Rad)

Die statistische Analyse mit SigmaPlot erfolgte nach der Methode von Cumming *et al.* (2007).

3 Methoden

3.1 Aufnahme und Verteilung von Prohexadion in Sonnenblumen

Um zunächst das Verhalten von Prohexadion in der Sonnenblume zu analysieren, wurden die Aufnahme und Verteilung von Prohexadion nach Tropfenapplikation auf das Blatt einer 20 Tage alten Sonnenblume analysiert. Dafür wurde das Extrakt der Sonnenblumenbestandteile analytisch untersucht. Die Details zum Versuchsaufbau wurden bereits durch Lerner *et al.* (2020) beschrieben.

3.2 Exkretion von Prohexadion aus Sonnenblumenwurzeln

Anschließend wurde eine potentielle Exkretion von Prohexadion aus Sonnenblumenwurzeln evaluiert. Diese Fragestellung erforderte die Ausarbeitung eines neuen Testsystems, welches als Ergebnis der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls in Lerner *et al.* (2020) publiziert wurde.

3.3 Prohexadion-Mobilität im Boden

Zur Untersuchung der Auswaschung von Prohexadion im Boden nach kontrollierter Beregnung wurde eine sogenannte Mobilitätsstudie durchgeführt (Lerner *et al.* , 2020). Dafür wurden die folgenden Bodentiefen untersucht: 0 – 2 cm; 2- 4 cm und 4 – 10 cm.

3.4 Sterilisation der *O. cumana* Samen und Brechen der Samenruhe

Zur Vermeidung unerwünschter mikrobieller Kontamination in den folgenden Versuchsdurchführungen wurden die *O. cumana* Samen unter geringen Abwandlungen des

Protokolls von Pouvreau *et al.* (2013) sterilisiert. Diese Durchführung, sowie die Vorkonditionierung der Samen wurden als Teil dieser Arbeit bereits veröffentlicht (Lerner *et al.* , 2020).

3.5 *O. cumana* Rassen-Determinierung

Zur Bestimmung der Rasse des verwendeten *O. cumana* Saatgutes wurden sogenannte Wurzelkammern etabliert. Dafür wurden 500 µL der vorkonditionierten *O. cumana* Samen-Lösung mit einer abgeschnittenen 1000 µL Spitze auf ein steriles Filterpapier (10 x 15 cm) verteilt. Dieses Filterpapier wurde anschließend so eingerollt, dass sich die Samen an der Innenseite befanden. Diese Rollen wurden anschließend in der Mitte eines 500 mL Plastikgefäßes positioniert und mit Vermiculit befüllt. Dabei wurde in jede Rolle ein sieben Tage alter Sonnenblumen-Keimling positioniert. So hatten die Sonnenblumenwurzel während des Wachstums Kontakt zu den vorkonditionierten *O. cumana* Samen. Die Kammern wurden dann komplett mit Vermiculit aufgefüllt bis das Filterpapier vollständig bedeckt war. Anschließend wurden sie gegossen und in der Klimakammer positioniert. Dem Wasser wurde Hakaphos blue als Dünger beigemischt. Nach 21 Tagen Inkubation wurden die *O. cumana* Infektionen in Form von Haustorien oder Tuberkeln an der Wurzel gezählt. Die drei biologischen Replikate mit jeweils fünf technischen Replikaten wurden blind evaluiert. Das bedeutet, dass der genetische Hintergrund der verwendeten Sonnenblumen erst nach Evaluation des Experiments offengelegt wurde. Hier wurde ein Sonnenblumen-Kit der Firma SOLTIS verwendet. Die Sorten SOL5 und Paraiso 1000 waren Vertreter der *O. cumana* anfälligen Sorten. SOL1, SOL2, SOL3, SOL4 und SOL6 hatten Resistenzen gegen die *O. cumana* Rassen G-H, G, F, E und H.

3.6 *O. cumana* Keimungsassay

Um direkte Einflüsse auf die *O. cumana* Keimung zu eruieren, wurde ein Keimungsassay etabliert. Dabei wurde das Protokoll von Lerner *et al.* (2020) verwendet.

3.6.1 Validierung des Sonnenblumenwurzelextraktes als Keimungsinduktor

Das Strigolacton-Analog *rac*-GR24 (Ye *et al.* , 2017) wird häufig als Keimungsinduktor für *O. cumana* verwendet. Da diese Chemikalie teuer in der Anschaffung und synthetisch ist, wurde in dieser Reihe ein neuer natürlicher Keimungsinduktor getestet. Dafür wurden Wurzeln der Wirtspflanze, in diesem Fall eine *O. cumana* anfällige Sonnenblume Variante, mit Wasser extrahiert (Lerner *et al.* , 2020).

Die Konzentration des Sonnenblumenwurzelextraktes (SWE) wurde zunächst in einer Versuchsreihe validiert. Dafür wurden in einer 48-Well Platte 1 % (v/v) vorkonditionierte *O. cumana* Samen jeweils mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 % (v/v) Sonnenblumenwurzelextrakt und 0,1 µg/mL Fludioxonil mit 10 µL einer zuvor vorkonditionierten *O. cumana* Lösung vermischt (3.1). Nach fünf Tagen im Dunkeln bei 21°C konnte die Keimrate mit Hilfe des Stereomikroskops evaluiert werden.

Anschließend wurde ein Vergleich der Keimraten mit 5 % (v/v) Wurzelextrakt einer *rac*-GR24 Konzentrationsreihe gegenübergestellt. Der Versuchsansatz blieb dabei wie beschrieben, nur wurden dem Ansatz noch eine finale Konzentration von 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM *rac*-GR24 statt Wurzelextrakt zugefügt. Zusätzlich wurde den Proben mit *rac*-GR24 eine Konzentration von 2,2 mg / mL autoklaviertem Murashige & Skoog Medium (pH 6,0) zugefügt.

Diese Versuche wurden anhand von acht technischen Replikaten evaluiert.

3.6.2 Inhibitionsstudien der *O. cumana* Keimung mit Prohexadion

Diese Studie wurden ebenfalls wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde den Ansätzen eine finale Konzentration von 50, 75, 100, 125 und 150 µM Prohexadion als Reinsubstanz zugefügt. Die Versuchsreihe mit Sonnenblumenwurzelextrakt als

Keimungsinduktor wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils acht technischen Replikaten durchgeführt.

Zum Vergleich des natürlichen Keimungsinduktors mit dem synthetischen Strigolacton-Analog wurde diese Studie auch mit 10 μ M *rac*-GR24 und der oben genannten Prohexadion-Konzentrationsreihe durchgeführt. Im Unterschied zum vorausgegangenen Versuch wurden diese Samen für zwölf Tage mit *rac*-GR24 und Prohexadion inkubiert anstatt für fünf Tage. Der Grund hierfür war eine verzögerte Keimungsinduktion mit *rac*-GR24 in der Kontrollgruppe ohne Prohexadion. Der Versuch wurde ebenfalls anhand von drei biologischen Replikaten mit jeweils acht technischen Replikaten evaluiert.

3.7 Validierung der Inhibitionseffizienz der *O. cumana* Keimung

Zur Evaluierung einer Inhibitionseffizienz von Prohexadion gegen die *O. cumana* Keimung wurde das Protokoll des Keimungsassays angepasst (Lerner *et al.* , 2020).

Diese Versuchsreihe, bezeichnet als EGI (efficiency of germination inhibition) diente der Imitation einer möglichen zweiten Keimungsinduktor-Welle im Feld die von den Sonnenblumen induziert werden könnte.

Während dieser Studie wurde nur Sonnenblumenwurzelextrakt verwendet. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten mit jeweils acht technischen Replikaten herangezogen.

3.8 STL-induzierter Keimungsassay von *O. cumana*

Die Sesquiterpenlactone (STL) Dehydrocostus lactone, Costunolid, Tomentosin und 8-Epixanthatin zeigen keimungsstimulierende Wirkung auf *O. cumana* (Joel *et al.* , 2011; Raupp & Spring, 2013). Um eine Wirkung auf das in dieser Studie verwendete *O. cumana* Saatgut

nachzuweisen wurden diese Substanzen auch im bereits beschriebenen Keimungsassay (Lerner *et al.* , 2020) getestet.

In jedem Testansatz wurde jeweils eine Kontrollreihe mit 5 % (v/v) Sonnenblumenwurzelextrakt und eine Kontrollreihe mit 10 µM *rac*-GR24 mitgeführt. Zusätzlich wurde in den Testreihen mit STL und *rac*-GR24 2,2 mg / mL Murashige & Skoog Medium mit einem pH von 6,0 eingesetzt.

Der Versuch wurde einmalig mit acht technischen Replikaten durchgeführt.

3.9 Einfluss von Prohexadion auf STL-Gehalt von Sonnenblumen

Zur Untersuchung des Einflusses einer Prohexadion-Behandlung auf die Konzentration der STL Dehydrocostus lactone, Costunolid, Tomentosin und 8-Epixanthatin in den Sonnenblumenwurzeln sowie im Exsudat wurde eine neue Testreihe etabliert. Dafür erfolgte die Aussaat der Sonnenblumen in Erde. Pikiert wurden sie nach sieben Tagen wieder in Erde aber in Lochplatten mit einem Lochdurchmesser von 6 cm. Nach weiteren vier Tagen in der Klimakammer wurden die Pflanzen zur Adaptation in braune Gewindeflaschen (50 mL; 216620; Illax) überführt. Dafür wurden die Wurzeln der Pflanzen zunächst von Erde befreit und anschließend unter fließendem Wasser ausgewaschen. In jede Gewindeflasche wurde ein Volumen von 50 mL Wasser mit Hakaphos blau Dünger gefüllt. Die Applikation erfolgte nach drei weiteren Tagen in der Klimakammer an der H3 Spritzkabine. Vor der Applikation wurde das Wasser aus allen Gewindeflaschen durch frisches Wasser mit Hakaphos blau ersetzt. Die Pflanzen wurden entweder mit 300 g ai / ha Leerformulierung oder 300 g ai / ha Prohexadion in Formulierung behandelt.

Die Ernte von jeweils 5 Pflanzen erfolgte nach 0, 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Applikation (HAA). Dabei wurde die Pflanzen aus den Gewindeflaschen entfernt und auf Filterpapier gelegt. Der grüne Teil der Sonnenblumen wurde verworfen und die Wurzel in separate Gefäße überführt.

Ebenfalls wurde das in der Gewindeflasche befindliche Wasser in separaten Gefäßen aufgefangen. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei -80°C bis zur Extraktion der Proben.

Den gefrorenen Exsudat-Proben wurden mit Hilfe einer Anlage der Firma Christ LCG gefriergetrocknet. Anschließend wurde den Proben 4 mL kaltes Acetonitril zugefügt und kurz homogenisiert. Die Proben wurden dann über Nacht im Kühlraum gelagert. Nach 16 Stunden wurden die Proben für 10 Minuten bei 2465 x g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden ungefähr 2 mL Proben genommen, welche bis zur Analyse bei -80°C gelagert wurden.

Alle Proben wurden zunächst gewogen und die anschließende Extraktion der Wurzelproben erfolgte mit Hilfe des gentleMACS™ Dissociator in dazu passenden M Tubes. Allen Wurzelproben wurden 6 mL kaltes Acetonitril zugefügt und zwei 45 Sekunden Zyklen eines vorinstallierten Standardprogrammes (s. Tabelle 24) gestartet. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2465 x g und 4°C wurden alle festen Zellbestandteile pelletiert. Vom Überstand wurden Proben genommen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer ACQUITY HSS T3 1,8 µm (2,1x50mm) Säule und dem ACQUITY UPLC System (Waters™). Die Säule wurde für diesen Versuch auf 40°C erhitzt. Das Laufmittel A für die Analyse war Wasser versetzt mit 0,1 % Ameisensäure, Laufmittel B bestand aus Acetonitril ebenfalls versetzt mit 0,1 % Ameisensäure. Der Gradient ist im Anhang in Tabelle 25 beschrieben. Diese Messmethode wurde für alle vier STL angewendet.

Anschließend wurde eine Elektrospray-Ionisierung mit TRIPLE QUAD API 5500 (AB SCIEX) durchgeführt. Die dabei entstandenen Fragmente sind in Tabelle 39 (Anhang) aufgeführt. Die Fragmente 211.000 Da (8-Epixanthatin), 195.000 Da (Dehydrocostus lacton), 185.000 Da (Tomentosin) und 131.000 Da (Costunolid) wurden analysiert und mit dem Programm Analyst 1.6.3 evaluiert.

Der Gehalt der unterschiedlichen STL in den Wurzeln oder im Exsudat wurde auf das jeweilige Wurzeltrockengewicht normiert. Von den einzelnen Messwerten wurde zu jedem biologischen Replikat ein Mittelwert pro Zeitpunkt, Behandlung und Gewebe (Wurzel oder Exsudat) erstellt. Aus den drei biologischen Replikaten wurde dann der Median ermittelt und auf einen BoxPlot aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe eines t-Tests. Hierbei wurden die Behandlungsgruppen (Leerformulierung und Prohexadion) zu jedem Zeitpunkt auf einen signifikanten Unterschied hin analysiert.

3.10 Metabolom-Analyse der mit Prohexadion behandelten Sonnenblumen

Das Metabolomprofil von Pflanzen lässt sich durch Wirkstoffe beeinflussen, wodurch sich eine Eingrenzung des Wirkortes ergeben kann. Mit Hilfe der Metabolom-Analyse sollten, die durch Prohexadion-induzierten Effekte in der Sonnenblume untersucht werden.

Dafür wurden die Sonnenblumen zur Anzucht in der Klimakammer platziert und nach dem Vereinzeln in Töpfe (Ø 8,5 cm) randomisiert in der Kammer untergebracht. Die 18 - 20 Tage alten Sonnenblumen (Blattstadium 6 – 8) wurden in der H3 Spritzkabine jeweils mit 25 g ai / ha (geringe Rate) oder 100 g ai / ha (hohe Rate) mit formuliertem Prohexadion appliziert. Als Kontrolle wurden ebenfalls Sonnenblumen mit 100 g ai / ha der Leerformulierung (LF) appliziert.

Nach der Applikation am Vormittag befanden sich die Pflanzen für 30 Minuten in einer Abdampfstrecke. Anschließend wurden sie in die Klimakammer überführt, in der direkt die ersten Pflanzen für den Zeitpunkt 0 geerntet werden konnten. Dafür wurden von drei Sonnenblumen die applizierten Blätter vom Stängel entfernt und in 30 mL Probengefäß (OMNI International, 19-6635-50) überführt, welches sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Dieses Verfahren wurde für jede Applikation fünfmal wiederholt. Dieses Prozedere wurde nach 6, 24, 48 und 72 Stunden wiederholt. Die Proben wurden bis zum Versand auf Trockeneis bei -80°C gelagert.

Die Weiterverarbeitung der Proben und die Analyse erfolgte bei BASF Metabolome Solutions GmbH in Berlin. Dort wurden die Proben zunächst gefriergetrocknet und zermahlen. Anschließend wurden die Metaboliten mit einer Mischung aus Methanol, Dichlormethan, Wasser und Toluol (93:47:16,5:1, v/v) mit 0,5 vol-% Ameisensäure unter Verwendung einer Kugelmühle extrahiert. Um die Reproduzierbarkeit der Analysen zu gewährleisten, wurden interne Standards zur Extraktionsmischung hinzugegeben.

Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot des Extraktes mittels LC-MS/MS unter Verwendung einer Umkehrphasen- und hydrophilen Wechselwirkungs-Flüssigkeitschromatographie (HILIC) analysiert, gefolgt von MS/MS-Detektion (AB Sciex QTrap 6500+). Für diese Messung wurden sowohl der positive als auch der negative Modus verwendet. Als Laufmittel A für die RP-HPLC Gradient Elution wurde mit einem Gemisch aus Wasser, Methanol und 0,1 M Ammoniumformiat (1:1:0,02 w/w) verwendet. Laufmittel B bestand dabei aus einem Gemisch aus Methyl-tert-butylether, 2-Propanol, Methanol und 0,1 M Ammoniumformiat (2:1:0,5:0,035 w/w) mit 0,5 Gewichtsprozent Ameisensäure. Der Gradient lief anfangs mit 100 % Laufmittel A, nach 0,5 Minuten wurde der Anteil auf 75 % gesenkt und nach 5,9 Minuten auf 10 % Laufmittel A. Für die HILIC Gradienten Elution bestand das Laufmittel A aus Acetonitril mit 1 vol-% Wasser und 0,2 vol-% Essigsäure. Das Laufmittel B bestand aus 0,007 M Ammoniumacetat mit 0,2 vol-% Essigsäure. Zunächst lag der Gradient bei 100 % des Laufmittels A und wurde nach 5 Minuten auf 10 % reduziert. Die Durchflussrate lag bei 600 µL/min.

Ein zweites Aliquot des Extraktes wurde mit Wasser (3,75:1, v/v) gemischt, wodurch sich eine Phasentrennung einstellte. Beide Phasen wurden mittels GC-MS, nach Derivatisierung, beschrieben durch Grossmann *et al.* (2010) analysiert.

Die unpolare Fraktion wurde mit Methanol unter sauren Bedingungen behandelt, um Fettsäuremethylester zu bekommen, die sowohl aus freien Fettsäuren als auch aus hydrolysierten komplexen Lipiden gewonnen wurden.

Die polaren und unpolaren Fraktionen wurden jeweils zunächst mit O-Methyl-hydroxylamine hydrochloride (um die oxo-Gruppen zu O-Methyloxim zu konvertieren) und anschließend mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide derivatisiert.

Alle Proben wurden einmal in einem randomisierten analytischen Sequenzdesign analysiert, um artifizielle Ergebnisse in Bezug auf analytische Verschiebungen zu vermeiden. Die Daten wurden auf interne Standards korrigiert und auf den Median der Referenzproben normalisiert. Die Referenzproben wurden aus einem Pool abgeleitet, der aus Aliquoten aller Probenextrakte generiert wurde, um die Variation zwischen unterschiedlichen Geräten und Messfehler im selben Gerät zu berücksichtigen.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde pro Zeitpunkt für die Profilerstellungsdaten in R durchgeführt (Thévenot *et al.* , 2015). Die Behandlungseffekte im Vergleich zu den Kontrollen wurden pro Metabolit und Zeitpunkt (für alle Replikate) durch Varianzanalyse (ANOVA) in R berechnet (Gentleman *et al.* , 2004). Veränderungen bekannter Metaboliten wurden, unter Verwendung des Metanomics Pathway Explorer, in biochemischen Stoffwechselwegen visualisiert (Grossmann *et al.* , 2010).

Die Analyse wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Wie bereits beschrieben enthielt jedes biologische Replikat fünf technische Replikate pro Zeitpunkt, Applikation und Gewebe. Jedes dieser technischen Replikate vereinte die Proben aus drei Sonnenblumen.

3.11 Analyse der Flavanon-3-Hydroxylase aus *Helianthus annuus*

Das Enzym F3h aus *Helianthus annuus* (HaF3h) musste für Interaktionsstudien rekombinant hergestellt werden. Die Sequenz wurde wie in Kapitel 2.7 beschrieben bei BioCat synthetisiert und in den Vektor pET24-N-His (Abbildung 5) kloniert. Das draus resultierende Protein hatte einen N-terminalen His-Tag.

3.11.1 Transformation der Flavanon-3-Hydroxylase in *E. coli*

Zunächst wurde das Konstrukt in *E. coli* transformiert. Dafür wurden kompetente Zellen von Invitrogen (One Shot® BL21 Star™ (DE3)) verwendet.

Alle für die Transformation oder Expression verwendeten Lösungen wurden für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert oder steril-filtriert (Sterilflip®).

Es wurden 50 µl kompetente Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 45 Sekunden Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C wurden die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL des auf 37°C vorgewärmten S.O.C-Mediums wurde die Suspension für 1 Stunde bei 37°C und 300 upm inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 upm waren die Zellen pelletiert und der Überstand konnte einfach abgeschüttet werden. In der zurückgebliebenen Flüssigkeit konnte das Pellet resuspendiert und auf einer Agar-Platte (LB mit Kanamycin) verteilt werden. Die Inkubation der Platte erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.11.2 Expression der Flavanon-3-Hydroxylase

Eine 50 mL Vorkultur bestehend aus LB-Medium mit Kanamycin, wurde mit einem Klon der Transformationsplatte inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator bei 200 upm.

Am darauffolgenden Tag wurde eine Hauptkultur mit 1 L LB-Medium, Kanamycin und 2% (v/v) Inokulum aus der Vorkultur bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,7 erreicht war. Anschließend wurde die Expression mit 0,1 mM IPTG induziert und über Nacht im Schüttelinkubator bei 20°C und 180 upm inkubiert. Nach ungefähr 16 Stunden wurde die Zellsuspension für 20 Minuten bei 6000 x g und 4°C pelletiert und anschließend in 50 mL 50 mM Tris/HCl + 25 mM NaCl pH 8,0 resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut für 30 Minuten bei 7197 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert.

3.11.3 Proteinextraktion mittels Ultraschall

Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall wurde der Sonicater und der LEW-Puffer aus dem Protino Ni-IDA Kit (Macherey-Nagel) als Bestandteil des Aufschlusspuffers verwendet.

Aufschlusspuffer: 1x LEW Buffer

+ Protease Inhibitor complete EDTA-free

+ 1 mg/ml Lysozym

+ 5 µg/ ml DNase

Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und im oben genannten Aufschlusspuffer resuspendiert (5 mL Puffer/ g Pellet). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mittels Ultraschall in einem 50 mL Falcon aufgeschlossen. Dafür wurde die Suspension auf Eis 4 x 45 Sekunden mit Ultraschall behandelt, immer mit 30-sekündiger Pause. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 7197 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur schnellstmöglichen Aufreinigung bei 4°C gelagert.

3.11.4 Proteinreinigung mittels Ni-IDA mit anschließender Entsalzung

Die Aufreinigung des Enzyms *HaF3h* mit einem N-terminalen His-Tag fand bei 4°C statt. Dementsprechend wurden die Säulen und alle verwendeten Puffer vorgekühlt. Verwendet wurde das Protino Ni-IDA Kit (Macherey-Nagel), nach dessen Anleitung die Aufreinigung durchgeführt wurde. Bei jedem Schritt wurde eine Probe vom Durchlauf aufbewahrt und bei -20°C gelagert, um

das Enzym in jeder Fraktion in einem SDS-Polyacrylamidgel zu visualisieren. Das Enzym wurde mit 2,5 mL Elutionspuffer eluiert.

Das erste Eluat wurde zur Entsalzung nach Produktanleitung auf die vorbereiteten und gekühlten PD-10 Einwegsäulen (GE Healthcare) gegeben und mit 3,5 mL 20 mM K-Phosphat pH 7,0 eluiert. Anschließend wurde eine finale Konzentration von 10 % (v/v) Glycerin zur stabilen Lagerung bei -80°C hinzugegeben.

Die Konzentration des Proteins wurde anhand folgender Parameter am NanoDrop ermittelt:

Extinktionskoeffizient: 48,15

Molekulares Gewicht: 42,6 kDa

3.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X, NP0007) von ThermoFisher Scientific

NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X, NP0004) von ThermoFisher Scientific

TGS-Puffer: 10x Tris/ glycine pemixed buffer (161-0734, Bio-Rad)

SDS-Gele: 12% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels
(10 well, 30 µl, 4568043, Bio-Rad)

Die denaturierende Gelelektrophorese diente der Größentrennung von Proteinen, welche je nach Aminosäuresequenz verschiedene Ladungen aufweisen. Von jeder Probe wurden 5 µL mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Vorbereitung wurden sie mit NuPAGE® LDS Sample Buffer und ddH₂O

vermischt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 95°C im Thermomixer von Eppendorf denaturiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde NuPAGE® Sample Reducing Agent zugefügt und die Proben kurz zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben und die Längenstandards in die Taschen des eingespannten und mit 1x TGS-Puffer aufgefüllten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde 5 Minuten bei 120 V und anschließend für 25 min bei 250 V laufen gelassen. Da die Proteine im SDS-Gel mittels UV-Licht visualisiert wurden (Kazmin *et al.* , 2002), musste keine Coomassie Färbung angefertigt werden. Es wurde lediglich mit der ChemiDoc™ aktiviert und anschließend fotografiert.

3.11.6 Fluorescence Thermal Shift Assay (FTSA) der Flavanon-3-Hydroxylase

Zur Untersuchung der Protein-Ligand Interaktionen zwischen dem Enzym, *HaF3h* und Prohexadion wurde eine Schmelzpunktbestimmung über den „Fluorescence Thermal Shift Assay“ (FTSA) durchgeführt. Hierbei wird der spezifische Schmelzpunkt eines Proteins bestimmt. Dieses Verfahren unterliegt dem Mechanismus, dass die Entfaltung des Enzyms bei steigender Temperatur durch die Interaktion mit einem Wirkstoff verzögert wird (Layton & Hellings, 2010). Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYPRO™ Orange lagert sich unspezifisch an hydrophobe Aminosäurereste an, die zunehmend während der Proteinentfaltung exponiert werden. Die erste Ableitung der gemessenen Schmelzkurve definiert den Schmelzpunkt des jeweiligen Proteins.

Nach einschlägigen Testreihen zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen der Komponenten (Tabelle 6) wurden 2 µM *HaF3h* und 20 mM K-Phosphat Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Ebenso stellte sich eine Konzentration von 50 µM 2-Oxoglutarat und Ni(II)Cl als optimal heraus. Das SYPRO™ Orange wurde 1:1000 auf eine noch 5fache Konzentration verdünnt. Der Wirkstofftest mit 20 und 80 µM wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils

zwei technischen Replikaten durchgeführt. In jeder Testreihe wurde dabei ein Versuch mit oder ohne 2-Oxoglutarat durchgeführt.

Tabelle 6: Versuchsansatzes zur Interaktionsanalyse der HaF3h und Prohexadion.

Komponente	Finale Konzentration
HaF3h	2 μ M
K-Phosphat pH 7,0	20 mM
2-Oxoglutarat	50 μ M
Ni(II)Cl	50 μ M
SYPRO™ Orange	5fach
Prohexadion	20 μ M und 80 μ M

Im ersten Schritt musste das nativ gebundene Metallion der HaF3h entfernt werden, dafür wurde das Enzym mit 20 mM K-Phosphat Puffer pH 7,0 zur Chelatisierung zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 25 μ M EDTA behandelt. Anschließend wurden die anderen Komponenten hinzugefügt und in die Platte (Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, Bio-Rad, HSP9655) überführt.

Die Platte wurde mit hitzebeständiger Folie versiegelt und in die qPCR-Maschine (CFX connect) gestellt. Unter Erhöhung der Temperatur (0,3°C/Minute) auf 85°C wurden das Fluoreszenzsignal des SYPRO™ Orange (Ex: 488 nm, Em: 583 nm) gemessen.

3.11.7 Aktivitätsnachweis der *HaF3h* mittels eines UPLC-basierten Assays

Die 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase F3h katalysiert die 3 β -Hydroxylierung von Eriodictyol zu Taxifolin (Abbildung 7). Für einen Aktivitätsnachweis, der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten *HaF3h*, wurde das Edukt Eriodictyol und das Produkt Taxifolin über die UPLC aufgetrennt, um dessen Ab- oder Zunahme zu analysieren und damit die potentielle Inhibitorwirkung von Prohexadion zu visualisieren.

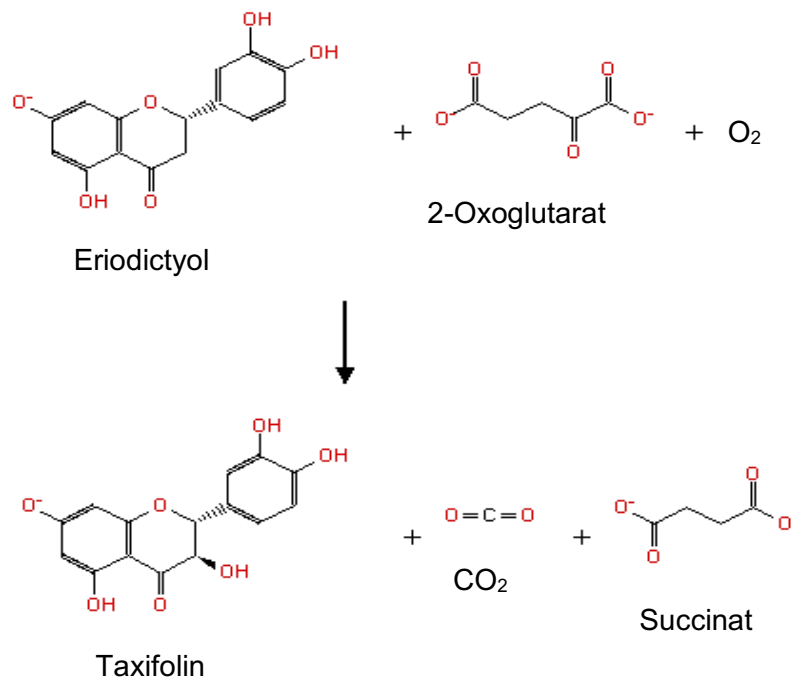


Abbildung 7: Katalysierte Reaktion der F3h.

Die 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenase F3h katalysiert die 3 β -Hydroxylierung von Eriodictyol zur Taxifolin.

Die Komponenten wurde wie in Tabelle 7 beschrieben in einer bestimmten Reihenfolge in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Aus diesem Reaktionsgefäß wurde immer nach 15 Minuten 200 μ L entnommen und mit 100 μ L Methanol und 10 μ L Eisessigsäure abgestoppt. Diese Proben wurden dann für 30 Minuten bei 4°C und 18 213 x g zentrifugiert und 150 μ L davon in eine Mikrotiterplatte zur Messung in der UPLC überführt.

Tabelle 7: Komponentenreihenfolge für in-vitro Aktivitätsnachweis der HaF3h.

Zugaben-Priorität	Komponente	Finale Konzentration
1	Ascorbic acid	500 µM
2	Fe(II)Cl	250 µM
3	2-Oxoglutarat	62,5 µM
4	Eriodictyol	250 µM
5	K-Phosphat pH 7,0	20 mM
6	HaF3h	0,77 µg/µL
7	Prohexadion	0 – 1000 µM

Ebenso wurde eine Standardreihe zur Validierung jedes Messergebnisses angefertigt. Diese Konzentrationsreihe von Eriodictyol und Taxifolin wurde, wie die Proben auch, mit dem entsprechenden Verhältnis von Methanol und Eisessigsäure abgestoppt, so dass die Konzentrationen vergleichbar waren und direkt in die Auswertung übernommen werden konnten.

Die Auftrennung erfolgte über eine YMC-Triart C18 Säule (50 x 3,0 mm, S-3µm, 12nm) mit jeweils 50 % Laufmittel A und B unter einem Fluss von 0,5 mL / min. Als Laufmittel A wurde 100% Methanol und als Laufmittel B Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure verwendet. Die Extraktion der Signale erfolgte bei 290 nm. Unter diesen Bedingungen lag die Retentionszeit von Eriodictyol bei 2,1 Minuten und von Taxifolin bei 1,1 Minuten.

Zur Auswertung wurde die Steigung (0 – 15 Minuten) von Taxifolin verwendet. Dafür wurde die gemessene Peak Area in µg / mL anhand der jeweils mitgemessenen Standardreihe umgewandelt. Davon wurde dann die Steigung im linearen Bereich von 0 – 15 Minuten in µg x mL⁻¹ x min⁻¹ ermittelt. Die prozentuale Hemmung wurde mit Hilfe der untenstehenden Formel kalkuliert.

$$\% \text{ Hemmung}_{P} = 100 - \left(\left(\frac{100}{S_{PK}} \right) \times S_{P} \right)$$

% Hemmung_P = prozentuale Hemmung der kalkulierten Probe

S_{PK} = Steigung der Positiv-Kontrolle (0 µM Prohexadion)

S_P = Steigung der kalkulierten Probe

Der Versuch wurde in drei biologischen Replikaten wiederholt mit jeweils zwei technischen Replikaten.

3.12 Prohexadion-induzierte Resistenz der Sonnenblume gegen *O. cumana*

Zur Adressierung einer durch Prohexadion induzierten Resistenz der Sonnenblumen gegen *O. cumana* wurde eine RT-qPCR Studie durchgeführt. Dafür wurden die Sonnenblumen in Vermiculit angezogen und am selben Tag die *O. cumana* Samen nach Lerner *et al.* (2020) vorkonditioniert, um die Samenruhe zu brechen. Sieben Tage später wurden die Sonnenblumen in Wurzelkammern (siehe 3.5) pikiert und bis zur Applikation in der Klimakammer verwahrt.

Die Applikation mit 300 g ai / ha Prohexadion in Formulierung bzw. 300 g ai / ha Leerformulierung erfolgte 28 Tage später und wurde in der H3 Spritzkabine mit der XR Teejet 80 015 Düse durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte in Vorversuchen sicher eine Infektion mit *O. cumana* nachgewiesen werden. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase in der Abdampfstrecke wurden die ersten 5 Pflanzen jeder Infektion und Applikation geerntet. Dabei wurden zunächst die Blätter vom Spross getrennt, gewogen und in einem gemeinsamen 50 mL Probengefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Wurzeln grob vom Vermiculit befreit und in

Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen und Wiegen der Wurzeln wurden diese ebenfalls in ein 50 mL Probengefäß überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bei Pflanzen mit einer *O. cumana* Infektion wurden die Tuberkel und Haustorien nach dem Auswaschen gezählt. Die Dauer bis zum Einfrieren der Wurzeln wurde bei infizierten und nicht infizierten Pflanzen gleich gehalten. Dieser Prozess wurde 24 Stunden nach Applikation wiederholt. Die Proben wurden mit einer Schwingmühle (Retsch) in 50 mL vorgekühlten Stahlmahlbechern für 45 Sekunden bei 30 Hz zerkleinert. Dabei wurde stetig darauf geachtet, dass die Proben niemals auftauten und auf Trockeneis gelagert wurden.

Nach der Zerkleinerung wurden die Proben bis zum Versand in ein BASF-internes Labor bei -80°C gelagert. In diesem Labor wurde die RNA-Extraktion, die cDNA Synthese und die qPCR durchgeführt.

Für die RNA-Extraktion wurden die Proben mit einem Precellys® Bead Mill Homogenizer (Bertin Technologies) mit Hilfe von Lysing Matrix B Röhrchen (MP Biomedicals) aufgeschlossen. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit einem Maxwell® RSC 48-Instrument (Promega) unter Verwendung des Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde mit einem NanoDrop Photometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert.

Für die cDNA-Synthese wurde das GoScript™ ReverseTranscription System (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Der Versuch wurde mit Hilfe des Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) mit 500 ng isolierter Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial und einem 1:1 Verhältnis von Oligo (dT)15 und der „random hexamer Primer Mixture“ verwendet.

Die anschließende qPCR wurde mit Hilfe des GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) nach Herstelleranweisung durchgeführt. Dafür wurden 10 pmol Primer / rx und Evagreen als Sonde verwendet. Die eingesetzten RNA Konzentration sind in Tabelle 43 (Anhang) und das Zyklusprogramm in Tabelle 44 aufgelistet. Die Reaktionen wurden in Triplikaten auf 384-Well-

Platten mit einem Biomek FX-Gerät (BeckmannCoulter) angesetzt. Die tatsächlichen qPCR-Reaktionen wurden auf einem Light Cycler 480 II-System (Roche) durchgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Gene

Bezeichnung	Gennummer	EPPO Code	Molekulargewicht
Chitin elicitor receptor kinase 1 (CERK1)	Ha3.3917	HELAN	67,5 kDa
Phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL)	Ha2.3067	HELAN	76,9 kDa
4-coumarate-CoA ligase (4CL)	HanXRQChr05g0157551	HELAN	58,8 kDa
Plant defensin (PDF)	HanXRQChr16g0506041	HELAN	34,7 kDa
Pathogenesis-related protein 1 (PR1)	Ha12.2143	HELAN	17,5 kDa
Pathogenesis-related protein 5 (PR5)	Ha17.649	HELAN	24,0 kDa
Non-expressor of pathogenesis-related 1 (NPR1)	HanXRQChr12g0354641	HELAN	64,9 kDa
Elongation factor 1-alpha (EF1)	Ha7.1532	HELAN	58,1 kDa

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der LightCycler 480 Software 1.5.1.62 SP3. Dabei wurde der Crossing Point (Cp) nach der Methode „Second Derivative Maximum“ berechnet. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der „Advanced Analysis“ Methode der Software und berechnet den Δ Cp. Bei dieser Berechnung wird der Cp Wert des untersuchten Gens (Tabelle 8) mit dem Cp Wert der Referenz (EF1alpha, Ha7.1532), sowie der jeweiligen Menge der eingesetzten Gesamt-RNA und die jeweilige Effizienz berücksichtigt.

Zur Analyse des Infektionseffektes wurde der Quotient – Infektionseffekt errechnet. Dabei wurde der Δ Cp der jeweiligen Probe (Blatt oder Wurzel) mit *O. cumana* Infektion durch den Δ Cp der jeweiligen Probe (Blatt oder Wurzel) ohne *O. cumana* Infektion geteilt. Die Behandlung dieser Pflanzen erfolgte wie oben beschrieben mit Leerformulierung. Diese Analyse wurde sowohl für die Blattproben als auch für die Wurzelproben durchgeführt.

Zur Analyse des Behandlungseffektes wurde der ΔC_p der jeweiligen Probe (Blatt oder Wurzel) mit Prohexadion Behandlung durch den ΔC_p der jeweiligen Probe (Blatt oder Wurzel) behandelt mit Leerformulierung geteilt. Alle Pflanzen waren dabei nicht mit *O. cumana* infiziert. Diese Analyse wurde sowohl für die Blattproben als auch für die Wurzelproben durchgeführt.

Der Versuch wurde zweimal an verschiedenen Tagen wiederholt. Jeder Versuch enthielt fünf technischen Replikate, welche für Infektion und Zeitpunkt in einer Probe vereint wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Aufnahme, Verteilung und Exkretion von Prohexadion in der Sonnenblume

Feldversuche haben gezeigt, dass eine Mischung von Imazamox und Prohexadion, im Vergleich zur Einzelapplikation von Imazamox, zu einer Reduktion des *O. cumana* Auflaufs im Feld führte (Pfenning *et al.*, 2013). Um zu definieren ob dieser Effekt durch die Prohexadion-Aktivität als generellem Wachstumsregulator in der Sonnenblume oder durch Translokation des Wirkstoffes in die Sonnenblumenwurzel und damit direkt als Inhibitor auf die *O. cumana* Keimung wirken

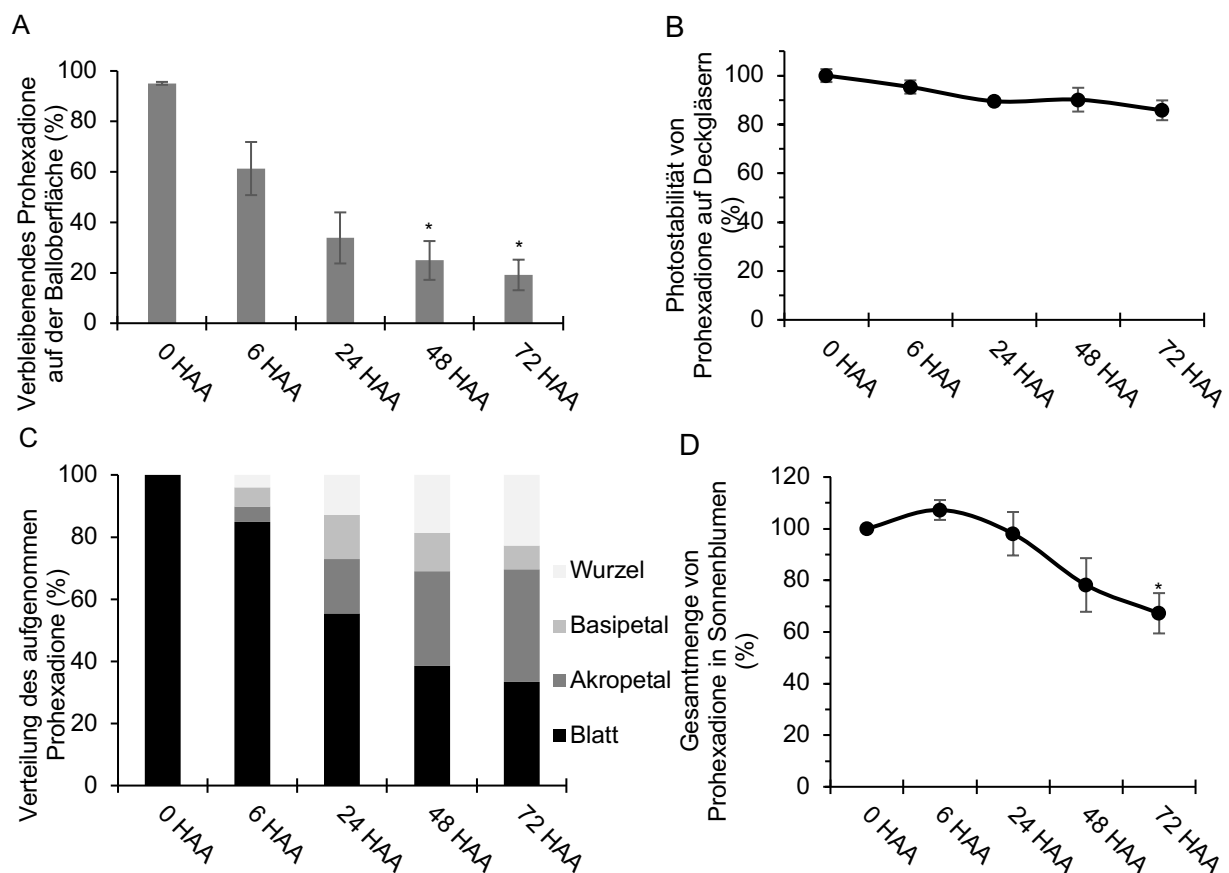


Abbildung 8: Absorption und Verteilung von Prohexadion in Sonnenblumen.

A. Verbleibendes Prohexadion auf der Blattoberfläche normiert auf 0 HAA (Hours after application). Die Fehlerbalken der Grafen stellen den Standardfehler von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten dar. Die Rohdaten sind im Anhang (Tabelle 16) bereitgestellt. **B.** Photostabilität von Prohexadion auf Glasobjektträgern. Das Versuchsdesign entsprach der Blattapplikation mit 2 biologischen Replikaten und jeweils 3 technischen Replikaten. Die Rohdaten sind im Anhang in Tabelle 17 bereitgestellt. **C.** Menge an Prohexadion in den unterschiedlichen Pflanzengeweben nach Applikation von 4 µg Prohexadion pro Pflanze zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle Proben wurden auf die aufgenommene Menge Prohexadion pro Zeitpunkt normiert. Die Standardfehler wurden im Anhang in Tabelle 18 bereitgestellt. **D.** Wiederfindung von Prohexadion in allen Pflanzen und Pflanzengeweben normiert auf die Kontrolle (0 HAA). Die Rohdaten befinden sich im Anhang in Tabelle 19. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (0 HAA) und der jeweils analysierten Gruppe mit einem p -Wert $< 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode).

könnte, wurde Prohexadion zunächst auf dessen Blattaufnahme und die Verteilung sowie Exkretion aus Sonnenblumenwurzeln untersucht.

Dafür wurden Sonnenblumenblätter mittels Tropfenapplikation mit Prohexadion behandelt. Zunächst wurde die Aufnahme anhand des Applikationsrestes auf der Blattoberfläche nach unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten analysiert (Abbildung 8A). Die Ergebnisse zeigen, dass 72 Stunden nach Applikation (72 HAA) rund 19 % des aktiven Wirkstoffes noch auf der Blattoberfläche detektiert werden konnten. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass der Hauptteil des applizierten Prohexadion zu diesem Zeitpunkt bereits absorbiert wurde.

Dass es sich dabei tatsächlich um die Aufnahme ins Sonnenblumengewebe und nicht etwa um einen Abbau durch Lichteinfluss handelt, wurde über Photostabilitätsanalysen bestätigt (Abbildung 8B). Die Resultate zeigten eine Lichtstabilität des Wirkstoffes auf Glasobjekträgern über 72 Stunden. Die Ergebnisse der Photostabilität und der analysierten Wirkstoffreste auf der Blattoberfläche wurden zur Kalkulation des relativen Anteils an tatsächlich aufgenommenen Prohexadion in das Blatt herangezogen (Tabelle 9). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Prohexadion mit der Zeit zunahm und dass 72 Stunden nach Applikation eine relative Absorptionsrate von 65 % erreicht werden konnte.

Tabelle 9: Kalkulierte Absorption von Prohexadion.

Zur Definition des tatsächlich absorbierten Anteils an Prohexadion über 72 Stunden, wurde der gemessene Wirkstoffrückstand von der Kontrolle (0 HAA) abgezogen und mit dem Stabilitätsfaktor aus den Photostabilitätsstudien multipliziert. Das † kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und der jeweils analysierten Gruppe mit einem p-Wert kleiner als 0,05 (einfaktorielle Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode).

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	0 (± 1)	32 (± 10) [†]	55 (± 9) [†]	63 (± 7) [†]	65 (± 5) [†]
Stabilitätsfaktor	1	0,95	0,89	0,90	0,86

Dieser absorbierte Anteil wurde anschließend genauer anhand von Verteilungsstudien analysiert.

Für diese Studie wurden die Sonnenblumen in vier Abschnitte unterteilt: akropetale, basipetale, appliziertes Blatt und Wurzel. Die Menge an Prohexadion im akropetalen Teil stieg auf 36 %, 46

während der prozentuale Anteil im Blatt über 72 Stunden von 100 % auf 33 % fiel (Abbildung 8C). Allerdings variierte der Anteil von Prohexadion im basipetalen Teil über die unterschiedlichen Erntezeitpunkte. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass der basipetale Teil hauptsächlich aus vaskulärem Gewebe bestand. Interessanterweise wurde Prohexadion in die Wurzeln transloziert und zusätzlich stieg die Wirkstoffkonzentration über die Zeit an. Somit erreicht Prohexadion tatsächlich den Angriffspunkt des Sonnenblumenparasiten *O. cumana*. 24 Stunden nach Applikation wurden schon 13 % des absorbierten Prohexadions in der Wurzel gefunden. Dieser Anteil stieg 72 Stunden nach Applikation auf rund 23 %. Zusätzlich wurde die Gesamtwiederfindung von Prohexadion in der gesamten Sonnenblume untersucht (Abbildung 8D). Die Ergebnisse zeigten, dass die Gesamtmenge an Prohexadion über die analysierte Zeit sank. 72 Stunden nach Applikation konnten nur noch 67 % in allen analysierten Pflanzenteilen einschließlich des Wirkstoffrestes auf der Blattoberfläche detektiert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Wirkstoff entweder metabolisiert oder durch die Wurzeln ausgeschieden wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Möglichkeit der Prohexadion-Exkretion aus der Sonnenblumenwurzel untersucht. Dafür wurden die Pflanzen in der H3 Spritzkabine appliziert und anschließend der Spross, die Wurzel und die Erde auf Prohexadion analysiert. Obwohl der Versuchsaufbau etwas vom vorherigen Versuch abwich, konnte eine ähnliche Wirkstoffverteilung in der Sonnenblume festgestellt werden. Abbildung 9A zeigt, dass 72 Stunden nach Applikation die Menge an Prohexadion im Spross von 99 % auf 76 % sank und im Vergleich dazu die Menge in der Wurzel auf 22 % stieg. Zusätzlich konnte Prohexadion auch erfolgreich aus der Erde extrahiert werden und stieg von 1 % auf 2 % in 72 Stunden an. Berücksichtigt man die Aufwandmenge von 300 g ai / ha, die Gesamtwiederfindung von 71 % (Abbildung 9B) und 2 % ausgeschiedenes Prohexadion, entspricht die ausgeschiedene Menge einer umgewandelten Konzentration von 3 g ai / ha.

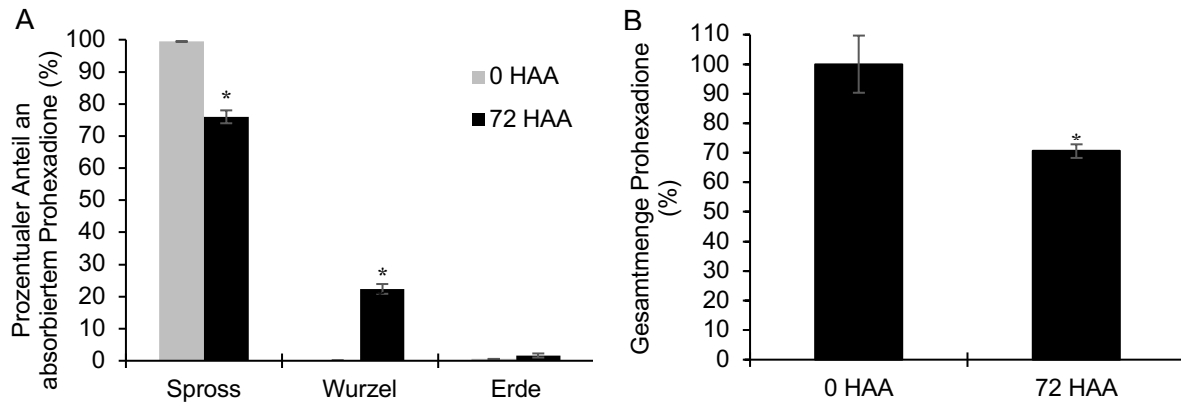


Abbildung 9: Exkretion von Prohexadion aus Sonnenblumenwurzeln.

A. Menge an Prohexadion im Spross, der Wurzel und der Erde nach Spritzapplikation von 300 g ai / ha Prohexadion. Alle Proben wurden auf die absorbierte Menge Prohexadion pro Zeitpunkt normiert. Die Standardfehler wurden anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert und wurden im Anhang in Tabelle 20 bereitgestellt. **B.** Wiederfindung von Prohexadion in allen Pflanzen, Pflanzengewebe und der Erde normalisiert auf die Kontrollgruppe (0 HAA). Die Standardfehler wurden anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert und sind bereitgestellt im Anhang in Tabelle 21. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (0 HAA) und der jeweils analysierten Gruppe mit einem p -Wert $< 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode).

Jedoch ist es wichtig zu vermerken, dass es aufgrund technischer Einschränkungen zur Limitierung der totalen Extraktion von Prohexadion aus der Erde gekommen sein könnte. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass in dieser Versuchsreihe eine verringerte Blattoberfläche beobachtet werden konnte, was durchaus einen direkten Einfluss auf die Wurzelmasse hat. Zusätzlich ist durch die verringerte Blattoberfläche, die Menge an applizierten Prohexadion reduziert, wodurch die tatsächlich ausgeschiedene Menge an Prohexadion von der gemessenen Menge abweichen kann.

4.2 Mobilität von Prohexadion im Boden

Um die Wirkungsweise von Prohexadion genauer zu analysieren wurde untersucht, ob die bei der Spritzapplikation auf den Boden aufgebrauchten Wirkstoffmengen für den verminderte Auflauf von *O. cumana* verantwortlich sein kann. In dieser Versuchsreihe soll die Mobilität des auf den Boden applizierten Prohexadions analysiert werden. Dafür wurde der Wirkstoff direkt auf die Bodenoberfläche appliziert und Proben von drei verschiedenen Bodentiefen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten analysiert. Die Stabilitätsstudie zeigte, dass der Wachstumsregulator bis zu 24 Stunden im Boden stabil war (Abbildung 10A), 48 Stunden nach

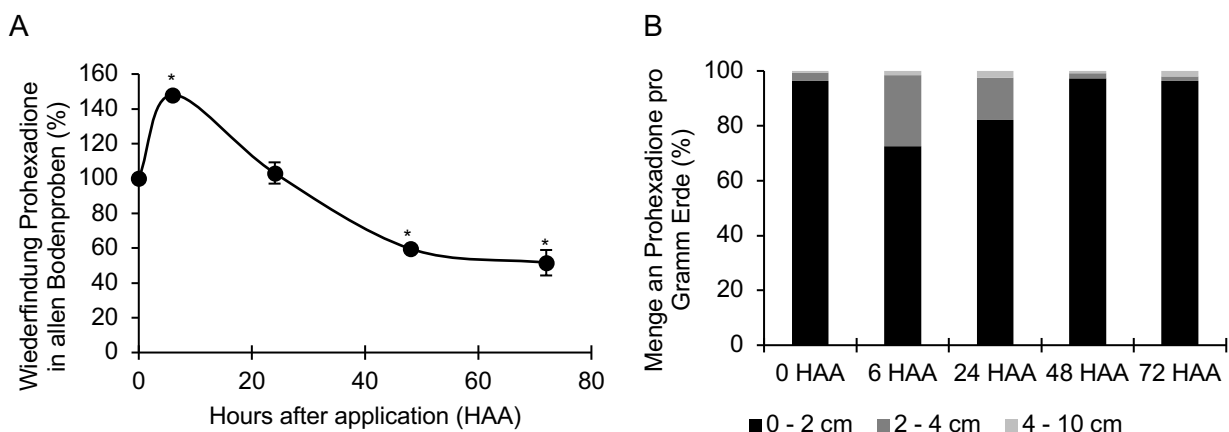


Abbildung 10: Verteilung und Stabilität von Prohexadion in Erde.

A. Wiederfindung von Prohexadion in allen Bodenproben normiert auf die Kontrollgruppe (0 HAA). Die Standardfehler wurden anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (0 HAA) und der analysierten Gruppe mit einem p -Wert $< 0,05$ (einfaktorielle Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode). **B.** Menge an Prohexadion in den unterschiedlichen Bodentiefen nach Applikation von 300 g ai / ha Prohexadion zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Alle Proben wurden auf den Mittelwert der Prohexadion-Gesamtmenge zu jedem analysierten Zeitpunkt normiert. Die Standardfehler wurden anhand von drei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten kalkuliert und im Anhang bereitgestellt (Tabelle 23).

Applikation jedoch nur noch 60 % des Wirkstoffes im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden konnte. Die Gesamtmenge an Prohexadion in allen Bodenproben sank über den analysierten Zeitraum signifikant, so dass 72 Stunden nach Applikation nur noch 52 % Prohexadion wiedergefunden werden konnten.

Hinsichtlich des Mobilitätspotentials von Prohexadion im Boden konnten bis zu 2 % Wirkstoff in der Bodentiefe von 4 – 10 cm nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um den Bereich, in dem sich Sonnenblumenwurzeln befinden. Der Hauptanteil des Wirkstoffes verblieb jedoch im

oberen Teil (0 – 2 cm) und 26 % konnten in einer Tiefe von 2 – 4 cm nachgewiesen werden (Abbildung 10B). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Prohexadion eine weniger mobile Verbindung ist und dass es im Boden nach 24 Stunden abgebaut wird. Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass Prohexadion die *O. cumana* Samen hauptsächlich durch Exkretion und nicht durch Auswaschung erreicht. Deshalb wird im nächsten Versuchsabschnitt die direkte Wirkung von Prohexadion auf die *O. cumana* Keimung untersucht.

4.3 Rassendeterminierung des verwendeten *O. cumana* Saatgutes

In Spanien ist die Sonnenblume für viele Landwirte eine wichtige Kulturpflanze. Diese wird jedoch durch hohe *O. cumana* Infektionsraten und daraus resultierende Ernteverluste gefährdet. Deshalb wurde für diese Arbeit *O. cumana* Saatgut in Spanien gesammelt, ins Agrarzentrum nach Limburgerhof versandt und dort gereinigt. Um die Rasse dieses Saatgutes zu definieren, wurde ein Sonnenblumen-Kit von SOLTIS verwendet. Dieses enthielt verschiedene Sonnenblumensorten, welche spezifische Gene tragen, die als *Orobanche*-Resistenzgene definiert sind und die Resistenz gegen verschiedene *O. cumana*-Rassen verleihen. Drei der getesteten Sonnenblumenlinien zeigten ein signifikantes Infektionsniveau (Tabelle 10). Zwei davon waren anfällige Kontrolllinien und die dritte Sonnenblumensorte trug ein Resistenzgen gegen die *O. cumana* Rasse E (SOL4). Somit handelt es sich bei den vorliegenden *O. cumana*-Samen nicht um die Rasse E, da diese resistente Sonnenblumenlinie von dem Parasiten signifikant infiziert werden konnte. Die Sonnenblumenlinie mit Resistenz gegen die Rasse F (SOL3) wurde jedoch von der getesteten *O. cumana*-Population nicht signifikant infiziert. Somit enthält das gesammelte Saatgut mindestens *O. cumana*-Samen der Rasse F. Es kann jedoch nicht vorausgesetzt werden, dass die Population ausschließlich virulente Samen der Rasse F enthält, da sie auf dem Feld gesammelt wurde. Das Saatgut war somit eine Mischung aus

verschiedenen Rassen, mit der vermutlich vorherrschenden Rasse F. Alle Versuche mit *O. cumana*

Samen wurden mit diesem Saatgut durchgeführt.

Tabelle 10: Evaluierung der *O. cumana* Rassendeterminierung.

Sechs unterschiedlich Sonnenblumenvarianten der Firma SOLTIS und die Variante Paraiso 1000 als bekannte anfällige Sorte wurden für diese Experiment verwendet. Die Durchführung erfolgte in drei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten. Die Korrelation zwischen den Gruppen wurde durch die Buchstaben a und b markiert.

Sonnenblumenvariante	Mittlere Anzahl Haustorien / Pflanze	Standardfehler	Resistenz
SOL1	0 ^a	0,0	G - H
SOL2	0,1 ^a	0,1	G
SOL3	0,1 ^a	0,1	F
SOL4	18,9 ^b	10,5	E
SOL5	26,7 ^b	12,9	anfällig
SOL6	0 ^a	0,0	H
Paraiso 1000	22, ^b	5,1	anfällig

4.4 Validierung der Keimungsinduktoren von *O. cumana*

Das üblicherweise als Keimungsinduktor verwendete synthetische Strigolacton-Analog *rac*-GR24 (Pouvreau *et al.* , 2013; Ye *et al.* , 2017), sollte mit Hilfe dieser Versuchsreihe durch einen natürlichen Keimungsinduktor ersetzt werden. Dafür wurde Sonnenblumenwurzelextrakt (SWE) als Keimungsinduktor von *O. cumana* (Abbildung 11A) verwendet. Es zeigte eine erfolgreiche konzentrationsabhängige Stimulation der Keimung. Der Median stieg durch Einsatz von 1 % (v/v) SWE von 0 % direkt auf 21,5 % Keimung an. Unter Verwendung von 5 % SWE konnte die Keimrate in diesem Versuch auf 51,6 % erhöht werden. Da mit dieser Konzentration in diesem Versuch die maximale Keimrate erreicht werden konnte, wurden jeweils 5 % SWE in allen weiteren Versuchen verwendet, wie auch für einen Vergleich mit einer *rac*-GR24

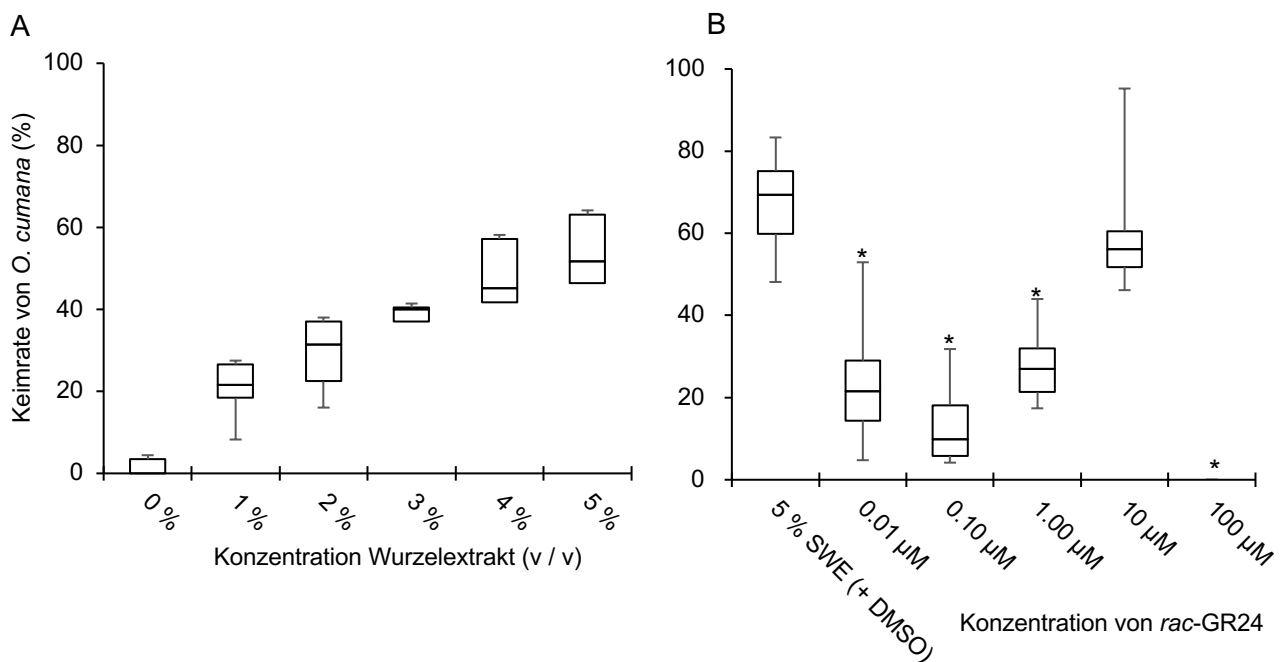


Abbildung 11: Evaluation der *O. cumana* Keimraten im Box-Plot.

Die Keimung wurde durch eine Konzentrationsreihe an Sonnenblumenwurzelextrakt (A) oder *rac*-GR24 (B) induziert. Die Auswertung der acht technischen Replikate erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops. Dafür wurde die Gesamtanzahl der im Well befindlichen *O. cumana* Samen gezählt, sowie die Anzahl der gekeimten Samen pro Well, woraus die prozentuale Keimrate errechnet wurde. A Der multiple Vergleich der verschiedenen Sonnenblumenwurzelextrakte zur Kontrollgruppe (0%) ergab nach der Dunnett- Methode für alle Gruppen ein p-Wert unter 0,001. B Für den Vergleich der *rac*-GR24 Konzentrationen mit der Kontrolle (5 % Sonnenblumenwurzelextrakt, SWE) ergab sich für alle Konzentrationen ein p-Wert unter 0,05 außer bei 10 µM *rac*-GR24 (gekennzeichnet durch einen Stern). Diese Vergleiche wurden mittels der einfaktoriellem Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode berechnet.

Konzentrationsreihe (Abbildung 11B). Die statistische Auswertung zeigt, dass die Keimrate mit 0,01, 0,1, 1 und 100 µM *rac*-GR24 signifikant geringer ausfiel als mit 10 µM. Allerdings zeigt die

Darstellung im Box Plot auch größere Varianzen und Ausreißer, als die Induktion mit SWE. Es wird demnach zur Induktion der Keimung eine relativ hohe *rac*-GR24 Konzentration benötigt und die Keimung scheint weniger stabil als mit SWE. Zusätzlich waren die Anschaffungskosten für das synthetische Strigolactone-Analog sehr hoch.

4.5 Prohexadion als Inhibitor der *O. cumana* Keimung

Nachdem bereits unter 3.1 gezeigt werden konnte, dass Prohexadion in die Wurzeln transloziert wird, sollte durch diesen Versuch analysiert werden, ob Prohexadion möglicherweise einen direkten Einfluss auf die *O. cumana* Keimung hat. Unter Einsatz von 5 % (v/v) SWE betrug die Keimrate ohne Inhibitoreinfluss 54 % (± 3 %).

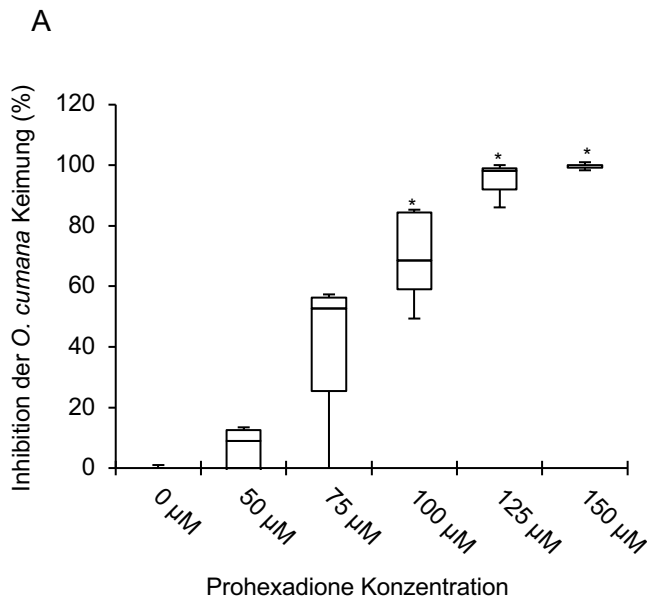
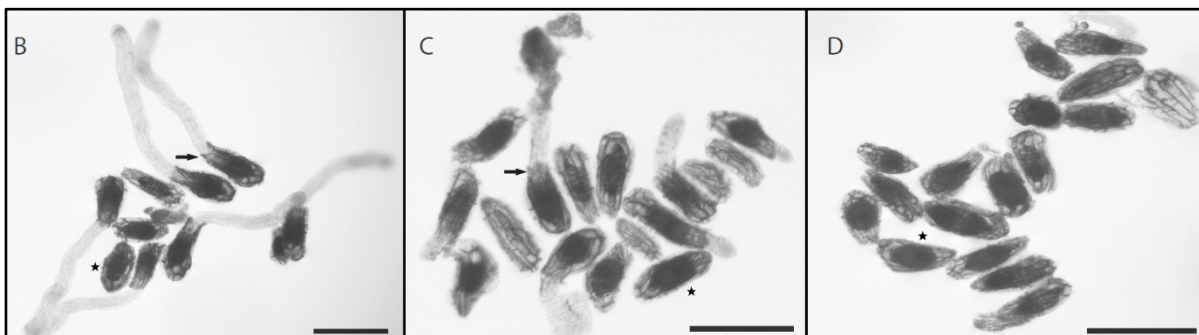


Abbildung 12: Prohexadion-induzierte Inhibition der *O. cumana* Keimung.

A. Die Verdünnungsreihe von Prohexadion wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt. Die ungehemmte Keimrate betrug 54,3% und wurde mittels 5 % (v/v) SWE induziert. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle (0 μM Prohexadion). Die statistische Evaluation wurde unter Anwendung der Dunnett-Methode durchgeführt ($p < 0,05$). **B – D.** Illustrationen der *O. cumana* Keimung gehemmt durch 0 μM (B), 50 μM (C) oder 150 μM (D) Prohexadion. Die Sterne markieren Beispiele nicht gekeimter Samen und die Pfeile markieren gekeimte Samen. Jeder Maßstabsbalken repräsentiert 500 μm .



Interessanterweise konnte die *O. cumana* Keimung durch den Einsatz von Prohexadion konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die Hemmung begann bei einer Konzentration von 50 μM und erreichte schon 53 % Hemmung bei einer Konzentration von 75 μM Prohexadion (Abbildung 12A). Die Versuchsdurchführung erbrachte einen IC_{50} von 84 μM Prohexadion (Tabelle 11), was einer Konzentration von 7 g ai / ha entspricht. Eine Behandlung der *O. cumana* Samen mit 150 μM Prohexadion konnte die totale Unterdrückung der Keimung bewirken.

Tabelle 11: IC_{50} Bestimmung von Prohexadion gegen *O. cumana* Keimung induziert mit SWE und rac-GR24.

	IC_{50} (μM)	SE
SWE	83,6	7,4
rac-GR24	72,7	0,9

Dies entsprach wiederum einer Konzentration von 12 g ai / ha mit einem Applikationsvolumen von 375 L / ha. Die höchste Konzentration an Prohexadion (150 μM) führte zu einer vollständigen Hemmung des Radikels innerhalb von fünf Tagen, während die Radikelverlängerung mit 50 μM Prohexadion (Abbildung 12C) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12B) verringert war.

Zum Vergleich wurden zusätzlich mit *rac*-GR24 stimulierte *O. cumana* Samen mit Prohexadion behandelt (Abbildung 13). Unter Einsatz von 10 μM *rac*-GR24 konnte eine zum SWE vergleichbare Keimrate von 55 % ($\pm 0,8$ %) erzielt werden. Auch in dieser Versuchsreihe konnte die *O. cumana* Keimung dosisabhängig mit Prohexadion gehemmt werden. Die Hemmung begann bei einer Konzentration von 75 μM Prohexadion und betrug bereits 57 %. Bei einer Prohexadion-Konzentration von 100 μM betrug die Hemmung bereits 96 %. Die Berechnung des IC_{50} brachte einen Wert von 73 μM (Tabelle 11) hervor, dies entsprach einer Konzentration von 6 g ai / ha. In dieser Versuchsreihe reichte eine Konzentration von 100 μM bereits zur nahezu vollständigen Inhibition aus, diese Konzentration entsprach umgerechnet 8 g ai / ha Prohexadion mit einem Applikationsvolumen von 375 L / ha. Ähnlich wie im vorherigen Versuch konnte mit 75 μM (Abbildung 13C) Prohexadion eine kürzere Radikellänge im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 13B) beobachtet werden.

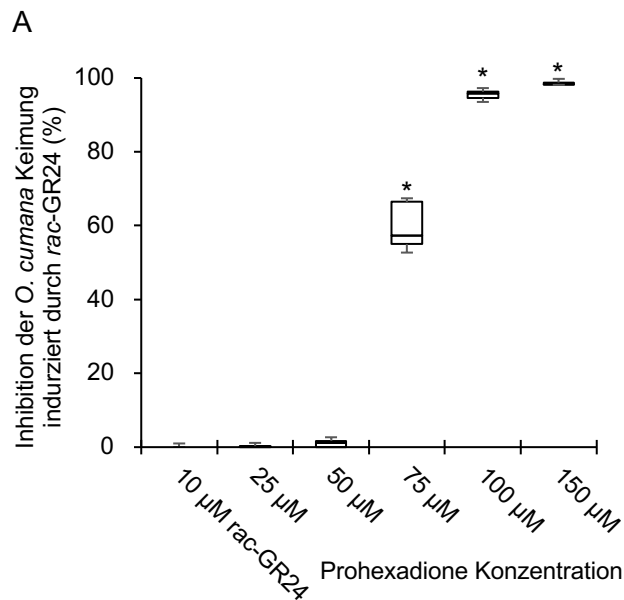
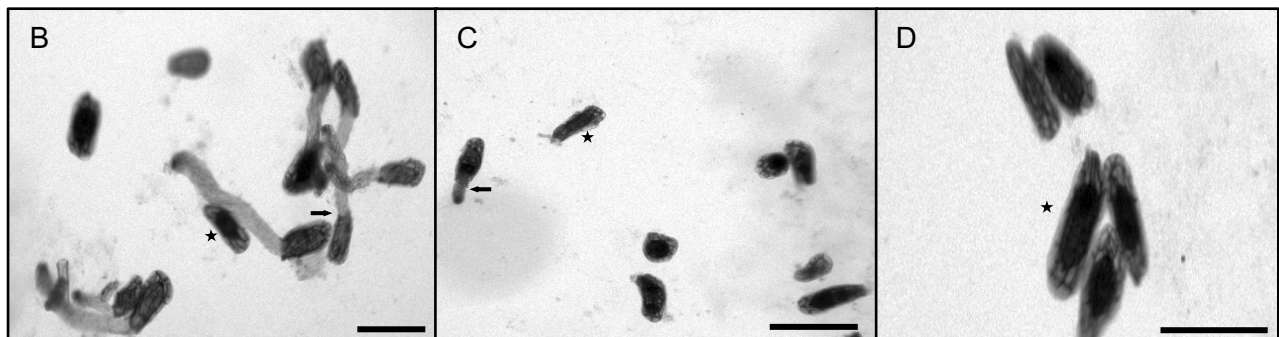


Abbildung 13: Prohexadion-Hemmung der *O. cumana* Keimung induziert durch *rac*-GR24.

A. Die Verdünnungsreihe von Prohexadion wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt. Die ungehemmte Keimrate betrug 54,97% und wurde mittels 10 μM *rac*-GR24 induziert. Die Sterne kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle (0 μM Prohexadion). Die statistische Evaluation wurde anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode durchgeführt ($p < 0,05$). **B – D.** Illustrationen der *O. cumana* Keimung gehemmt durch 0 μM (B), 75 μM (C) oder 150 μM (D) Prohexadion. Die Sterne markieren Beispiele nicht gekeimter Samen und die Pfeile markieren gekeimte Samen. Jeder Maßstabsbalken repräsentiert 500 μm .



4.6 Inhibitionseffizienz der *O. cumana* Keimung durch Prohexadion

Der *O. cumana* Befall von Sonnenblumen auf dem Feld ereignet sich in mehreren Wellen, abhängig von den optimalen Umweltbedingungen für die *O. cumana* Keimung und die folgende Penetration in die Sonnenblumenwurzel. Um diese Fragestellung zu klären wurden bereits mit Prohexadion behandelte *O. cumana* Samen erneut mit SWE behandelt. Das Ziel dabei war es herauszufinden, ob diese behandelten Samen erneut zur Keimung angeregt werden können, oder ob die Behandlung mit Prohexadion zu einer Blockade der Keimung und damit zum Tod der *O. cumana* Samen führt. Zur Illustration wurde ein Faktor zur Beurteilung der Inhibitionseffizienz gegen die *O. cumana* Keimung eingeführt (EGI Faktor siehe Kapitel 3.7). Dieser Faktor beschreibt den Unterschied der Keimung zwischen der ersten und der zweiten Keimungsinduktion mit SWE. Zur Untersuchung der Stabilität der Keimungsinduktion nach längerer erster Inkubationsphase wurde die Positiv-Kontrolle 0 μM (-/+) mitgeführt. Hier wurden die Samen nur im zweiten Durchgang mit SWE behandelt. Nach einer zwölf Tage andauernden Inkubationsphase in Flüssigkeit konnte eine Keimrate von 47,2 (\pm 3,5) % ermittelt werden (Abbildung 14). Die mit Prohexadion behandelten Samen (100 μM bzw. 200 μM) wiesen keinen signifikanten Unterschied

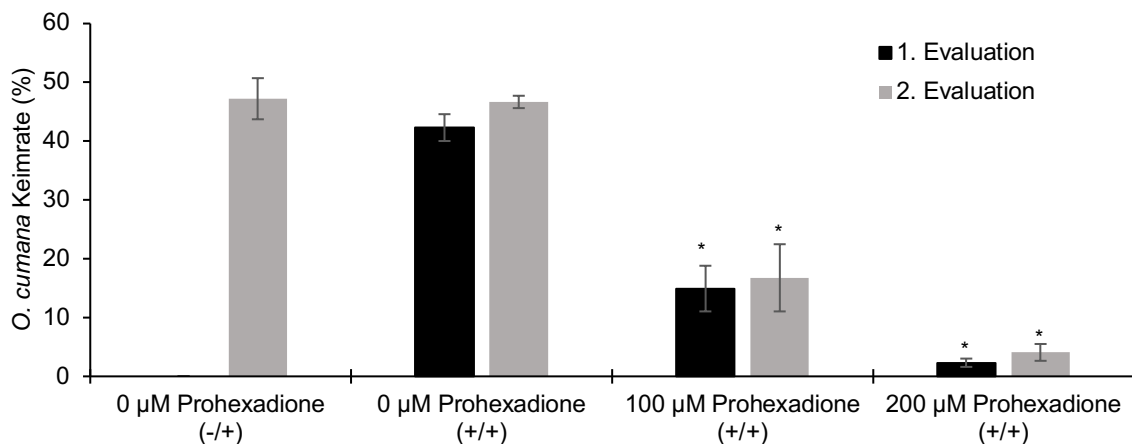


Abbildung 14: Prohexadion induzierte Effizienz der *O. cumana* Keimungsinhibition. Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten eruiert. Das + beschreibt den Zusatz von SWE, (-/+) beschreibt das Fehlen des SWE für die erste Evaluation jedoch einen Zusatz von SWE für die zweite Evaluation. Die Sterne im Graph kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (0 μM ; +/+) und der analysierten Gruppe mit einem p-Wert unter 0,05. Die statistische Evaluation wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode durchgeführt.

zwischen der ersten und zweiten Evaluation auf. Folglich konnten die durch Prohexadion inhibierten *O. cumana* Samen nicht zur Keimung stimuliert werden und die durch Prohexadion vermittelte Hemmung ist irreversibel. Die unbehandelte Kontrolle (0 μ M Prohexadion (+/+)) hingegen wies eine Keimrate von 42,3 (\pm 2,3) % zur ersten Evaluation und 46,7 (\pm 1,0) % zur zweiten Evaluation auf.

4.7 STL als Keimungsinduktoren von *O. cumana*

Die durch unterschiedliche Forscher nachgewiesene keimungsstimulierende Eigenschaft der Sesquiterpenlactone Dehydrocostus lactone, Costunolid, Tomentosin und 8-Epixanthatin auf *O. cumana* (Joel *et al.* , 2011; Raupp & Spring, 2013) wurde auch anhand des in dieser Arbeit verwendeten Saatgutes getestet. Dabei wurden die Keimraten immer mit Kontrollen wie dem Sonnenblumenwurzelextrakt und *rac*-GR24 verglichen. Die STL Costunolid und Dehydrocostus lactone wiesen eine vergleichbare Keimungsinduktion wie die der Kontrollen auf (Abbildung 15A

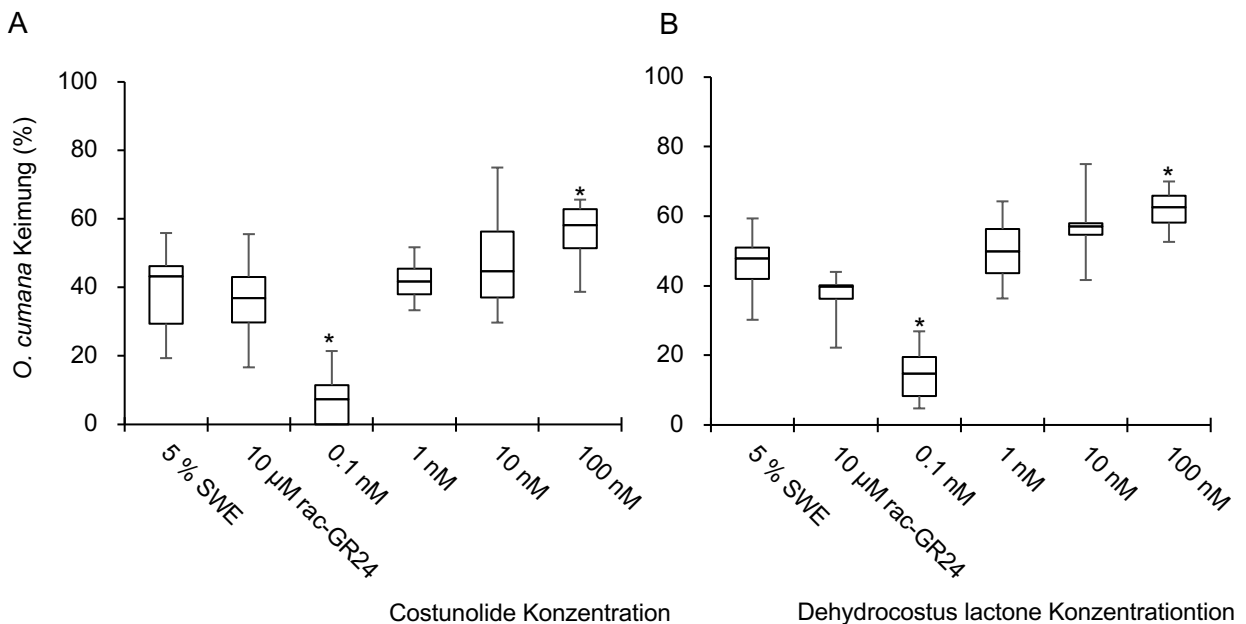


Abbildung 15: Evaluation der *O. cumana* Keimraten induziert durch STL.

Die Keimung wurde durch eine Konzentrationsreihe mit Costunolid (A) und Dehydrocostus lactone (B) induziert. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle mit 5% SWE und eine Kontrolle mit 10 μ M *rac*-GR24 mitgeführt. Die Auswertung der 8 technischen Replikate erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops. Die Sterne im Graph kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (5% SWE) und der analysierten Gruppe mit einem *p*-Wert unter 0,05. Die statistische Evaluation wurde mittels einfaktorierter Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode durchgeführt.

und B). Der Median der Kontrollen lag in der Versuchsreihe mit Costunolid bei 43 % (5 % SWE) beziehungsweise bei 39 % (*rac*-GR24). Mit steigender Costunolid-Konzentration stieg auch der Median auf eine finale Keimrate von 58 % mit 100 nM Costunolide. Diese lag zusätzlich signifikant über der Keimrate der Kontrollen. Ein ähnliches Bild ergab sich durch den Einsatz von Dehydrocostus lactone. Die Kontrollen lagen bei 48 % (5 % SWE) und 40 % (*rac*-GR24) und die Keimrate erhöhte sich unter steigender Dehydrocostus lactone Konzentration auf einen signifikant höheren Wert von 63 % im Vergleich zur 5 % SWE Kontrolle (48 %).

Raupp und Spring (2013) konnten auch durch den Einsatz von Tomentosin zwischen 0,01 und 0,1 nM eine Keimung von *O. cumana* erzeugen. In dieser Arbeit wurde eine Konzentrationsreihe von Tomentosin zwischen 0,01 nM und 100 µM getestet. Diese Versuchsreihe brachte keine Keimung der *O. cumana* Samen hervor. Eine ähnliche Situation zeichnete sich durch den Einsatz von 8-Epixanthatin ab. Auch hier konnte keine Keimung mit Konzentrationen zwischen 10 nM und 100 µM erzeugt werden. Raupp und Spring (2013) konnten jedoch zwischen 0,1 und 10 µM eine Keimung erzeugen.

4.8 Einfluss von Prohexadion auf Keimungsinduktoren von *O. cumana*

Zur Untersuchung des Einflusses von Prohexadion auf die Ausscheidung der von Raupp und Spring (2013) untersuchten STL wurden diese sowohl in den Wurzeln als auch im Exsudat von behandelten Sonnenblumen analysiert. Der Gehalt an STL in den Wurzeln und im Exsudat wurde in Nanogramm pro Gramm (ng / g) Wurzelrockgewicht analysiert. Bei der Analyse von Costunolid in der Sonnenblumenwurzel (Abbildung 16A) konnte 72 Stunden nach Applikation ein Unterschied zwischen der Behandlung mit Leerformulierung und Prohexadion festgestellt werden. Dabei lag der Median der drei biologischen Replikate mit Prohexadion bei 0,0 ng / g Wurzelrockgewicht und mit Leerformulierung bei 23,5 ng / g Wurzelrockgewicht. Im Exsudat

(Abbildung 17A) konnte dagegen kontinuierlich eine Reduktion des Medians durch den Einsatz von Prohexadion im Vergleich zur Leerformulierung beobachtet werden.

Die Untersuchung von Dehydrocostus lactone im Wurzelgewebe (Abbildung 16B) zeigte eine höhere Konzentration durch Prohexadion. 6 Stunden nach Applikation sank der Wert jedoch, 72 Stunden nach Applikation konnten in den Wurzeln der mit Leerformulierung behandelten Pflanzen

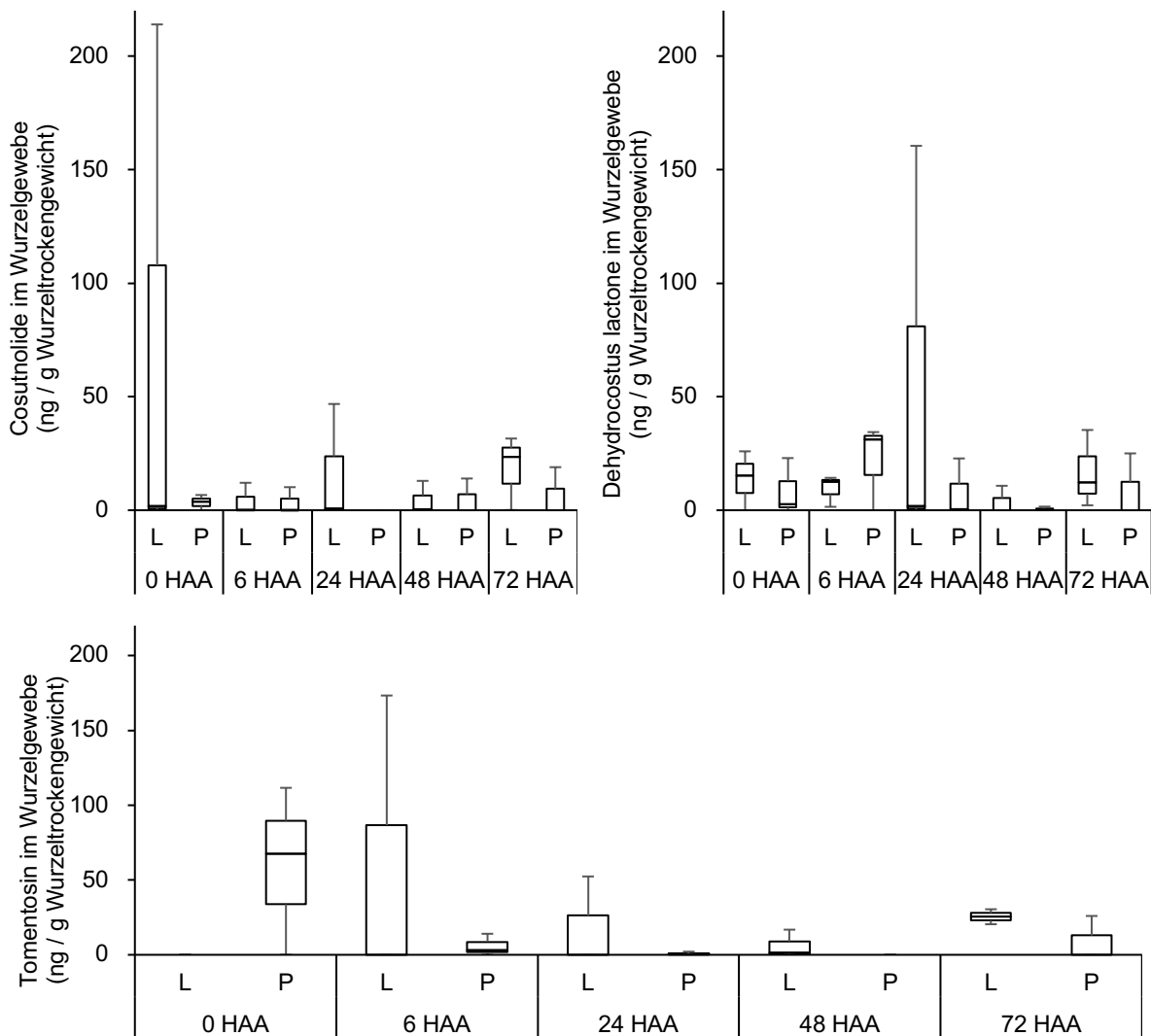


Abbildung 16: Analyse der STL-Konzentration in Sonnenblumenwurzeln nach Prohexadion-Behandlung. Es wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils fünf Wurzeln von Sonnenblumen behandelt mit 300 g ai / ha Leerformulierung (L) oder Prohexadion (P) geerntet. Dieser Versuch wurde in drei biologischen Replikaten wiederholt. In allen Proben wurden die STL Costunolid (A), Dehydrocostus lactone (B), Tomentosin (C) und 8-Epixonathin analysiert. Eine statistische Analyse beruhend auf einem zweiseitigem t-Test unter dem Vergleich der zwei Behandlungsgruppen (L und P) zum jeweiligen Zeitpunkt ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

12,3 ng / g Wurzelrockengewicht detektiert werden. Durch die Behandlung mit Prohexadion sank dieser Wert auf 0,0. Die Analyse des Exsudats lieferte keine Unterschiede zwischen den Behandlungen zu jedem Zeitpunkt (Abbildung 17B). Generell ist anzumerken, dass die gemessenen Dehydrocostus lactone Konzentrationen sehr gering waren.

Tomentosin wies zu den frühen Zeitpunkten eine höhere Konzentration in den mit Prohexadion behandelten Wurzeln auf als in den mit Leerformulierung behandelten. Dieser Effekt kehrte sich jedoch wieder um; 48 Stunden nach Applikation konnte in den Wurzeln ein Median von 1,3 ng / g Wurzelrockgewicht durch Behandlung mit Leerformulierung detektiert werden. Durch den Einsatz von Prohexadion lag dieser Wert bei 0,0. Ebenso war der Wert 72 Stunden nach Prohexadion-Applikation bei 0,0 ng / g Wurzelrockgewicht, wohingegen die Menge an

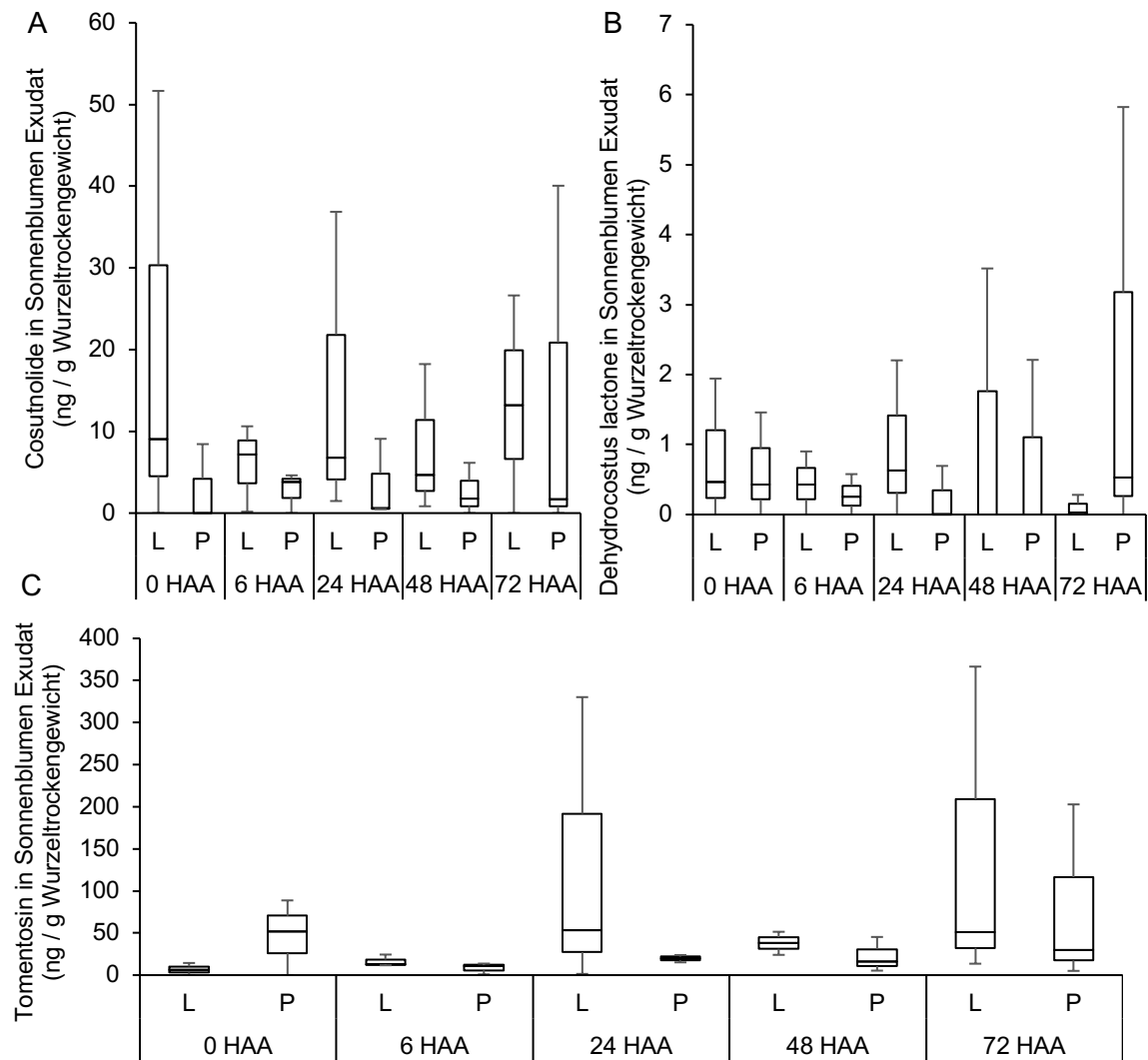


Abbildung 17: Analyse der STL-Konzentration im Sonnenblumen Exsudat nach Prohexadion Behandlung.

Es wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils fünf Exsudate von Sonnenblumen behandelt mit 300 g ai / ha Leerformulierung (L) oder Prohexadion (P) geerntet. Dieser Versuch wurde in drei biologischen Replikaten wiederholt. In allen Proben wurden die STL Costunolid (A), Dehydrocostus lactone (B), Tomentosin (C) und 8-Epixanthatin analysiert. Eine statistische Analyse beruhend auf einem zweiseitigem t-Test unter dem Vergleich der zwei Behandlungsgruppen (L und P) zum jeweiligen Zeitpunkt ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Tomentosin in den mit Leerformulierung behandelten Proben auf 25,4 ng / g Wurzelrockgewicht stieg. Im Exsudat konnte nur 24 und 48 Stunden nach Applikation eine Reduzierung der Tomentosin-Konzentration mit geringer Varianz durch Prohexadion-Behandlung gemessen werden. Dabei wurde 24 Stunden nach Applikation die mediale Tomentosin-Konzentration von 53,3 ng / g Wurzelrockgewicht (Leerformulierung) auf 20,1 ng / g Wurzelrockgewicht (Prohexadion) reduziert und 48 Stunden nach Applikation von 38,5 ng / g Wurzelrockgewicht (Leerformulierung) auf 16,2 ng / g Wurzelrockgewicht (Prohexadion).

Das STL 8-Epixanthatin konnte weder in den Wurzelproben noch in den Exsudaten detektiert werden.

Die statistische Analyse, beruhend auf einem zweiseitigen t-Test, ermittelte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Leerformulierung und Prohexadion) zum jeweiligen Zeitpunkt. Dies gilt sowohl für die Exsudat- als auch für die Wurzelproben. Deshalb wurde die Analyse beruhend auf dem Median dargestellt. Für weitere Versuche sollten die Proben vor der Analyse vereinigt werden, so dass eine größere Probenmenge entsteht und die biologische Varianz in den einzelnen Proben stärker abgedeckt und somit Ausreißer minimiert werden.

4.9 Variation der Flavonoid-Biosynthese durch Prohexadion Applikation

Aufgrund der besseren Abdeckung des Metaboloms in Blättern und der besseren Funktionalität der Methode wurden zur Analyse des Sonnenblumen-Metaboloms nur die Blätter der behandelten Sonnenblumen verwendet. Zusätzlich ergab eine Vorstudie, dass sich das Wurzelmaterial nicht zur Analyse eignet, da der Hintergrund zu viel Rauschen verursacht und somit keine signifikanten Unterschiede (Zu- und Abnahme) detektiert werden können. Daher erfolgte die Analyse nur im Blattgewebe und in drei biologischen Replikaten.

4.9.1 Multivariate Analyse der drei Datensätze

Die erste Interpretation der drei voneinander unabhängigen erhobenen Datensätze erfolgte mit Hilfe einer multivariaten Analyse. Dabei wurden die Datensätze auf grobe Gemeinsamkeiten und Unterschiede analysiert, um eventuelle Ausreißer zu identifizieren und den Datensatz zu korrigieren. Die erste Hauptkomponentenanalyse der drei biologischen Replikate (Abbildung 18A) zeigte eine hohe Übereinstimmung des Replikates I mit dem Replikate III. Einige Datenpunkte des

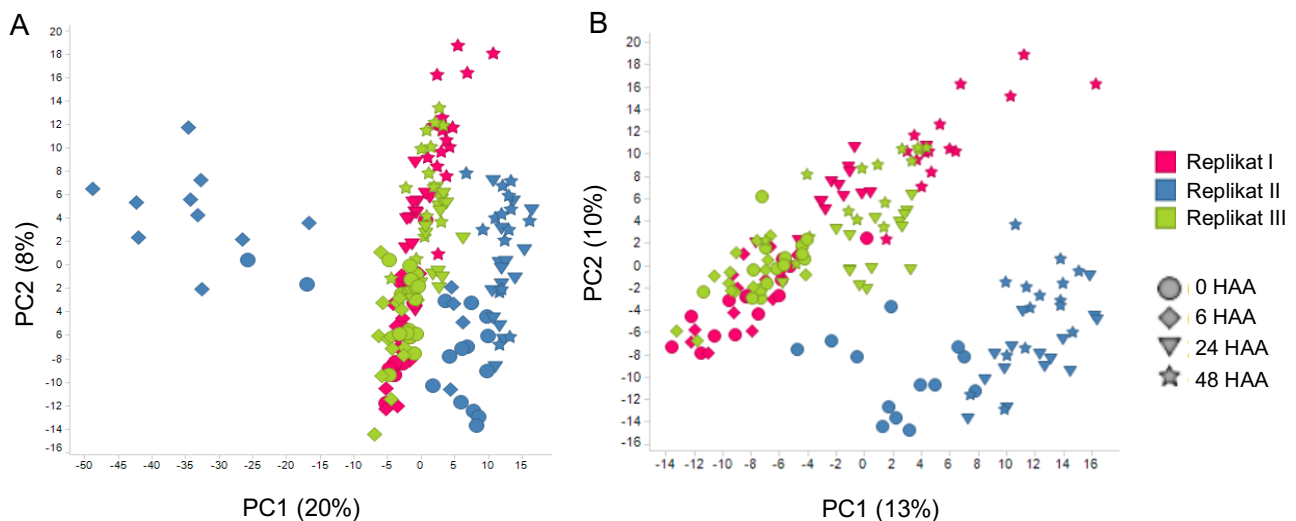


Abbildung 18: Hauptkomponenten Analyse der drei biologischen Replikate.

A. Die erste Analyse der drei Datensätze in der die Hauptkomponente 1 (PC1) gegen die Hauptkomponente 2 (PC2) aufgetragen wurde. Dabei deckte die erste Hauptkomponente 20 % Variabilität und die zweite Hauptkomponente 8 % Variabilität des Datensatzes ab. Die Symbole stellen die Erntezeitpunkte nach Applikation dar. Der Kreis steht für die Ernte 0 Stunden nach Applikation (HAA), das Quadrat für 6 HAA, das Dreieck für 24 und der Stern für 48 HAA. Die Farben separieren die drei unabhängig erhobenen Datensätze wie in der Legende beschrieben. **B.** Hauptkomponenten Analyse des bereinigten Datensatzes. Hier deckte die erste Hauptkomponente 13 % Variabilität und die zweite Hauptkomponente 10 % Variabilität des Datensatzes ab. Die Streuung fiel deutlich geringer aus, weshalb mit diesem Datensatz die restlichen Analysen durchgeführt wurden.

zweiten Replikates waren in der ersten Hauptkomponente (PC1) deutlich nach links verschoben. Von diesen zwölf Datenpunkten stammten zehn aus der Gruppe 6 HAA und zwei aus der Gruppe 0 HAA.

Dennoch war auch eine Separation der verschiedenen Zeitpunkte zu erkennen. In allen Datensätzen akkumulierten sich beispielsweise die Sterne, welche für die Ernte 48 Stunden nach Applikation standen und den erwarteten Wachstumseffekt der Sonnenblumen über die Versuchsdauer beschreibt. Aufgrund der oben beschriebenen, abweichenden Datenpunkte im zweiten Replikat, wurde dieser Datensatz auf bestimmte Markerwerte untersucht. Ein intern bekannter Markerwert der Firma BASF Metabolome Solutions GmbH war ein Mais-Auftaumarke. Dabei wird das Verhältnis von γ -Aminobuttersäure zu Threonat untersucht. Ist dieses Verhältnis größer gleich 1,4, kann von einem Auftauprozess während des Probenhandlings ausgegangen werden. Tatsächlich wiesen in diesem Datensatz 2 Proben der 0 HAA Proben und 10 Proben der 6 HAA Proben ein erhöhtes Verhältnis auf. Da somit zwei komplette Behandlungsgruppen des 6 HAA Zeitpunktes betroffen waren, wurde dieser Erntezeitpunkt komplett aus der Analyse des zweiten Replikates ausgeschlossen. Anschließend wurde eine zweite multivariate Analyse der drei Replikate durchgeführt (Abbildung 18B), welche eine deutlich geringere Abweichung in der ersten Hauptkomponente zeigte. Dennoch weicht auch hier der zweite Datensatz von Replikat I und III ab.

4.9.2 Univariate Analyse des Sonnenblumen Metaboloms

Für eine erste grobe Übersicht wurde in der univariaten Analyse die Anzahl der signifikant veränderten Metaboliten in den Ontologieklassen analysiert. Es wurde zunächst der Wachstumseffekt in der Leerformulierung begutachtet (Abbildung 19A). Durch den Vergleich jedes Zeitpunktes mit dem Kontrollzeitpunkt (0 HAA) konnten signifikante Unterschiede (gelbe Markierung in Abbildung 19A) in allen Ontologieklassen zu jedem Erntezeitpunkt detektiert werden. Um Behandlungseffekte darstellen zu können, wurde zunächst die geringe Rate (GR) mit

25 g ai / ha Prohexadion zu jedem Erntezeitpunkt auf die Leerformulierung normiert. Signifikante Änderungen der Metaboliten gab es zum Zeitpunkt 0 HAA in der Klasse der Aminosäuren, der Cofaktoren, der komplexen Lipide und Nucleobasen. Bis auf die Ontologiekategorie der Nucleobasen traten diese Effekte auch in der Normierung der hohen Rate (100 g ai / ha Prohexadion) auf die Leerformulierung auf. Einzig die Ontologiekategorie der Aminosäuren zeigte zum Zeitpunkt 6 HAA einen signifikanten Effekt. In allen anderen aufgefundenen Klassen waren keine signifikanten Unterschiede der Metaboliten mehr messbar. Die Klasse der Sekundärmetaboliten wies in der Analyse des Behandlungseffektes sowohl mit der geringen als auch mit der hohen Rate eine signifikante Änderung der Metaboliten zu den Zeitpunkten 6, 24 und 48 HAA auf. Der Effekt konnte mit der hohen Rate noch verstärkt werden. Zur genaueren Analyse der Ontologiekategorie wurde eine verfeinerte Analyse des Sekundärmetabolismus angefertigt (Abbildung 19B). Diese Analyse

A		Wachstumseffekt			Behandlungseffekt							
		6 vs. 0 HAA LF	24 vs. 0 HAA LF	48 vs. 0 HAA LF	0 HAA GR vs. LF	6 HAA GR vs. LF	24 HAA GR vs. LF	48 HAA GR vs. LF	0 HAA HR vs. LF	6 HAA HR vs. LF	24 HAA HR vs. LF	48 HAA HR vs. LF
Ontology Name	# of Metabolite	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL
Amino acids and related	78	25	28	33	14	9	0	6	15	8	6	8
Carbohydrates and related	50	18	14	24	2	2	2	5	5	1	1	4
Carotenoids and antioxidants	15	2	2	3	2	0	0	1	1	0	0	0
Cofactors and related	15	4	7	6	3	0	0	0	1	0	1	1
Complex lipids, fatty acids and related	85	19	33	44	10	2	0	5	10	2	0	6
Miscellaneous	13	1	4	5	0	0	1	0	1	0	2	1
Nucleobases and related	26	5	8	7	4	0	0	0	0	0	1	2
Organic acids	19	6	9	9	0	0	1	4	2	1	1	1
Phytohormones	14	5	6	3	0	0	1	2	1	1	3	2
Sekundärmetabolismus	64	10	14	20	1	7	8	8	3	10	10	13
Sterols and related	10	3	5	6	0	0	0	0	0	0	0	2
Unknown	190	29	42	66	5	7	7	14	11	4	9	18
Total # of Metabolite	579	127	172	226	41	27	20	45	50	27	34	58

B		Wachstumseffekt			Behandlungseffekt							
		6 vs. 0 HAA LF	24 vs. 0 HAA LF	48 vs. 0 HAA LF	0 HAA GR vs. LF	6 HAA GR vs. LF	24 HAA GR vs. LF	48 HAA GR vs. LF	0 HAA HR vs. LF	6 HAA HR vs. LF	24 HAA HR vs. LF	48 HAA HR vs. LF
Onto1	Ontology Name	# of Metabolite	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL	ALL
Sekundärmetabolismus	Alkaloids	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Sekundärmetabolismus	Chlorophyll metabolism	2	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Sekundärmetabolismus	Flavonoid metabolism	24	2	5	7	0	4	6	7	2	6	7
Sekundärmetabolismus	Heterocycles	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Sekundärmetabolismus	Phenylpropanoids	8	2	3	3	0	1	0	0	0	1	0
Sekundärmetabolismus	Simple phenols	19	3	4	6	0	2	2	1	0	3	3
Sekundärmetabolismus	Terpenoids	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 19: Übersicht signifikanter Unterschiede in Ontologieklassen.

In der Tabelle ist die Anzahl der veränderten Metaboliten bestimmter Ontologieklassen dargestellt. Zunächst wurde in einem groben Überblick über die Ontologieklassen (A) der Wachstumseffekt durch Normierung auf die 0 HAA Kontrolle dargestellt. Um den Behandlungseffekt abzubilden wurden die Behandlungen mit der geringen Rate (GR) oder höheren Rate (HR) auf die Leerformulierung (LF) normiert. Eine detailliertere Analyse (B) der auffälligen Ontologiekategorie des Sekundärmetabolismus, bewies einen hauptsächlich Behandlungseffekt auf den Flavonoid Metabolismus. Die Einfärbung der Tabelle wurde entsprechend des p-Wertes der veränderten Metaboliten dargestellt. Das kräftige Gelb steht für $p < 0,01$, das helle Gelb für $p < 0,05$ und das Grau für einen p-Wert kleiner 0,1. Die Signifikanzniveaus wiesen auf eine höhere Anzahl von signifikant veränderten Metaboliten innerhalb einer bestimmten Klasse hin, als durch Zufall erwartet.

deckte die Untergruppen der Alkaloide, des Chlorophyll-Metabolismus, Flavonoid-Metabolismus, der Heterocyclen, der Phenylpropanoide, der einfachen Phenole und Terpenoide ab.

Die Analyse des Wachstumseffektes detektierte signifikante Änderungen der Metaboliten im Flavonoid-Metabolismus, den Phenylpropanoiden und den einfachen Phenolen. Anhand der Begutachtung des Behandlungseffektes konnten nur im Flavonoid-Metabolismus signifikante Änderungen der Metaboliten detektiert werden.

Für die detaillierte Analyse wurden die Ergebnisse mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht (Abbildung 20). Zur Fokussierung auf die wichtigsten Metabolite unter den insgesamt 579 gemessenen und analysierten Metaboliten wurden in der Auswertetabelle Filter gesetzt. Daher wurden nur Metaboliten angezeigt, die eine signifikante Änderung ($p \leq 0,05$) zum Zeitpunkt 24 und 48 HAA im Vergleich der hohen Rate mit der Leerformulierung aufwiesen. Zusätzlich wurde ein Fokus auf eine zeit- und dosisabhängige Akkumulation oder Verringerung

		Behandlungseffekt							
		0 HAA	6 HAA	24 HAA	48 HAA	0 HAA	6 HAA	24 HAA	48 HAA
		GR vs. LF	GR vs. LF	GR vs. LF	GR vs. LF	HR vs. LF	HR vs. LF	HR vs. LF	HR vs. LF
METABOLITE_NAME	ONTOLOGY2_NAME	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
N,N-Dimethylarginine (ADMA)	Diverse amino acids and related	1,0772	1,0146	1,0839	1,1707	1,1587	1,497	1,4211	1,439
N,N'-Dimethylarginine (SDMA)	Diverse amino acids and related	1,0548	1,0824	1,0479	1,1229	1,1237	1,4176	1,2937	1,3031
Salicylic acid	Salicylates	1,1068	1,2441	1,3473	1,2969	1,0147	1,4309	1,5493	1,6533
Unknown (862400999)	Unknown	1,0197	1,1989	1,8904	2,4558	0,9378	1,7825	2,9171	4,4415
Eriodictyol-7-O-glucoside	Flavonoid metabolism	1,094	1,3248	2,0923	2,6149	1,0117	1,9786	3,5221	5,0795
Hesperetin	Flavonoid metabolism	1,1188	1,3837	1,2471	1,5965	1,0687	1,7376	1,906	2,6161
Hyperoside	Flavonoid metabolism	0,9421	0,8641	0,9103	0,7621	1,0094	0,9943	0,7991	0,6687
Isookanin-7-glucoside	Flavonoid metabolism	1,0645	0,9986	1,3046	2,0298	1,0701	1,3648	2,023	3,3695
Luteolin-7-O-glucoside	Flavonoid metabolism	0,989	0,782	0,8127	0,6598	1,0092	0,7594	0,7103	0,4988
Quercetin 3-(6-O-acetyl-beta-glucoside)	Flavonoid metabolism	0,9984	1,0015	0,8628	0,7911	1,1066	0,7495	0,8281	0,6668
Rhamnetin	Flavonoid metabolism	0,9369	1,2573	1,1916	1,4189	0,8441	1,0981	1,6549	1,7537
Galloylhexose	Simple phenols	1,1034	0,9024	0,8054	0,8451	0,9673	0,9404	0,812	0,778
p-Hydroxybenzoic acid	Simple phenols	1,1348	1,2167	1,3744	1,3735	1,0082	1,3606	1,5963	1,6573
Unknown (822401343)	Unknown	1,0303	1,0105	0,9427	1,2626	1,1781	1,0854	0,7606	1,2764
Unknown (852400177)	Unknown	0,8684	1,1735	1,4404	1,7343	0,7766	1,1393	1,78	2,1125
Unknown (872400371)	Unknown	0,9404	0,8761	0,6906	0,898	0,8743	0,886	0,6889	0,6528
Unknown (872400202)	Unknown	1,0351	1,1034	0,8803	0,7178	1,0216	0,9764	0,8417	0,6383
Eriodictyol	Flavonoid metabolism	1,0596	1,2655	1,5381	1,5803	1,0534	1,7152	2,3706	2,5848

pvalue < 0.05
0.05 < pvalue < 0.1
pvalue > 0.1

>1.2	>1.5	>2.0
<0.83	<0.66	<0.5

Abbildung 20: Darstellung signifikant veränderter Metaboliten ($p < 0,05$).

Für diese Auswahl an Metaboliten wurde ein Filter gesetzt. Die Bedingung war $p \leq 0,05$ für die hohe Rate (HR) vs. Leerformulierung (LF) zum Zeitpunkt 24 und 48 HAA. Des Weiteren wurden Metaboliten ohne dosisabhängige Änderung ausgeschlossen. Wie in der Legende beschrieben hatten alle fett geschriebenen Verhältnisse einen p-Wert unter 0,05. Normal geschriebene Werte besaßen einen p-Wert zwischen 0,05 und 0,1 und die hellgrauen Verhältnisse ein p-Wert größer als 0,1. Die rote Farbabstufung in der Tabelle steht für eine Akkumulation des Metaboliten die blaue Farbabstufung für eine Verringerung des Metaboliten aufgrund der Prohexadion-Behandlung.

von Metaboliten gelegt. Alle anderen Metaboliten wurden ausgeschlossen. Übrig blieben die in Abbildung 20 tabellarisch aufgelisteten Metaboliten. Ein großer Anteil an Metaboliten stammte dabei aus der Klasse des Sekundärmetabolismus, genauer des Flavonoid-Metabolismus, wie zuvor in der Analyse der Ontologieklassen ebenfalls festgestellt wurde. Ein Metabolit, der dabei zeit- und dosisabhängig akkumulierte, war Eriodictyol. Durch Behandlung mit 100 g ai / ha Prohexadion (hohe Rate) kam es ebenfalls zur Akkumulation von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) und symmetrischem Dimethylarginin (SDMA). Diese Akkumulation erhöhte sich jedoch nicht über die Zeit, sondern blieb vergleichbar zum Zeitpunkt 6 HAA. Außerdem konnte die Behandlung mit Prohexadion sowohl mit der geringen als auch mit der hohen Rate eine signifikante Akkumulation von Salicylsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure hervorrufen. Diese Akkumulation stieg unter Verwendung der hohen Rate zeitabhängig weiter an.

4.10 Interaktion der Flavanon-3-Hydroxylase mit Prohexadion

Nachdem in der Metabolismus-Studie ein Einfluss von Prohexadion auf den Flavonoid-Metabolismus nachgewiesen werden konnte, sollte der Wirkort von Prohexadion in Sonnenblumen bestätigt und näher beschrieben werden. Halbwirth *et al.* (2006) konnten bereits eine hemmende Wirkung von Prohexadion auf die F3h von *Malus domestica* und *Pyrus communis* nachweisen. Allerdings gab es noch keine Veröffentlichung zur Wirkung von Prohexadion auf dieses Enzym der Spezies Sonnenblume. Die Akkumulation von Eriodyctiol in der Metabolom-Studie unterstützt die These, dass eine hemmende Wirkung von Prohexadion auf dieses Enzym besteht. Dies sollte über eine Interaktionsstudie und einen Enzymassay *in vitro* nachgewiesen werden. Der erste Schritt dabei war die rekombinante Expression der HaF3h. Im Proteinsequenzvergleich der F3h aus *Helianthus annuus* (HELAN) mit den Sequenzen von *Nicotiana tabacum* (NIOTA), *Lycium chinense* (LYUCN), *Arabidopsis thaliana* (ARBTH), *Solanum lycopersicum* (LYPES) und *Glycine max* (GLXMA) konnten fünf konservierte Motive (Abbildung 21) für 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen identifiziert werden (Britsch *et al.*, 1993; Song *et*

```

HELAN MKHHHHHPMDMAPVSLKW-DETSLHENRFVRDEDERPKVPYKNKFSSEIPVISLKGIDDD 59
ARBTH -----MAPGTLTELAGEKSLNSKFVRDEDERPKVAYNVFSDEIPVISLAGIDD- 48
GLXMA -----MAPTAKTLTYLAQEKTLSSFFVRDEEERPKVAYNEFSDEIPVISLAGIDE- 50
LYPES ----------TSFIRDEEERPKVAYNKFSDPEIPVISLQIGIDD- 32
NIOTA -----MAPSTLTALAEKTLQTSFIRDEEERPKVAYNQFSDEIPVISLKGIDDE 49
LYUCN -----MAPSTLTALADEKTLQTSFIRDEEERPKVAYNKFSDPEIPVISLKGIDDD 49
      1:***:***** ** *:***:*** **

HELAN DGSSVDGFGSSRAEICDKIVACEDNGIFQVVDHGVDTKLLSEMTRLAREFFELPTEEKL 119
ARBTH -----VDGRREICEKIVACEDNGIFQVVDHGVDTLVLVADMTLRARDFALPPEEKL 101
GLXMA -----VDGRRREICEKIVACEDNGIFQVVDHGVDTQLVAEMTLRKAFFALPPEEKL 103
LYPES -----VNGRRSEICERIVACEDNGVGFQVIDHGVDAQLISQMTLKAFFELPPEEKL 85
NIOTA S-----GINKRGEICEKIVACEDNGIFQVVDHGVDAQLISQMTLKAFFALPPEEKL 104
LYUCN -----DGRRGEICEKIVACEDNGIFQVVDHGVDAELIKQMTLKAFFALPPEEKL 101
      ...* ** :***:***:*** ** :* :***:*** **

HELAN RFDMTGGKGGGIVSSHLQGEAVQDNIIEVITYFSYPIKARDYSFNPDKPEWRAVTEKYS 179
ARBTH RFDMSGGKGGGIVSSHLQGEAVQDNIIEVITYFSYPRNRDYSFNPDKPEGWVKVTEEYS 161
GLXMA RFDMSGAKKGGGIVSSHLQGEVQDNIIEVITYFSYPKRERDYSFNPDKPEGWRSVTEEYS 163
LYPES RFDMSGGKGGGIVSSHLQGEVQDNIIEVITYFSYPIRARDYSFNPDKPQGWIGVTEQYS 145
NIOTA RFDMSGGKGGGIVSSHLQGEVQDNIIEVITYFSYPIRARDYSFNPDKPQGWIGVTEQYS 164
LYUCN RFDMSGGKGGGIVSSHLQGEVQDNIIEVITYFSYPIRARDYSFNPDKPQGWIDVTQNY 161
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HELAN EELMGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTKACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 239
ARBTH ERLMSLACKLLEVLSEAMGLEKESLTNACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 221
GLXMA DKVMGLACKLMEVLSEAMGLEKESLTKACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 223
LYPES EKLMGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTKACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 205
NIOTA EKLMGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTKACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 224
LYUCN EKLMGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTKACVDMDQKVVVNFYPKCFQDPLTLGLKFRHTDPG 221
      :.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HELAN TITLLQDQVGGGLQTRDGGNTWITVQPIEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 299
ARBTH TITLLQDQVGGGLQTRDNGKTIWITVQPVVEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 281
GLXMA TITLLQDQVGGGLQTRDNGKTIWITVQPVVEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 283
LYPES TITLLQDQVGGGLQTKDNGKTIWITVQPVVEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 265
NIOTA TITLLQDQVGGGLQTKDNGKTIWITVQPVVEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 284
LYUCN TITLLQDQVGGGLQTKDNGKTIWITVQPVVEGAFVVLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNS 281
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HELAN NTSRLSIATFNPAPEAVVPLKIVREGEKSIHEKPIITFHEMYRKKHSDLELARLKKLAK 359
ARBTH NSSRLSIATFNPAPEATVYPLKIVREGEKALIEEPIITFAEMYRKRKMGDLELARLKKLAK 341
GLXMA NHSRLSIATFNPAPEAVVPLKIVREGEKPVMEPIITFAEMYRKRKMSKDIETARMKLAK 343
LYPES NSSRLSIATFNPAPEAVVPLKIVREGEKSIHEKPIITFADMYRKRKMSKDELELARLKKLAK 325
NIOTA NSSRLSIATFNPAPEAVVPLKIVREGEKAVMEPIITFAEMYRKRKMSKDELELARLKKLAK 344
LYUCN NSSRLSIATFNPAPEAVVPLKIVREGEKAVMEPIITFSEMYRKRKMSKDELELARLKKQAK 341
      *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HELAN EKQDLEK-----VKPIENIFA 375
ARBTH EERDHKEV-----DKPVQIFA 358
GLXMA EKHLQDLENEKHLQELDQKAKLEAKPLKEILA 375
LYPES EEKIQTE-----EAKLESKPIEILA 346
NIOTA EHQIQAEK-----AAEKAKLTKPIEILA 369
LYUCN EQIQAE-----AAGKAKLESKPIEILA 366
      *.: *****:*****:*****:*****:*****:*****
  
```

Abbildung 21: Sequenzvergleich des F3h Proteins aus unterschiedlichen Spezies.

Die synthetisierte *Helianthus annuus* Proteinsequenz (XP_022015871) enthält einen N-terminalen His-Tag und wurde mit den Sequenzen von *Nicotiana tabacum* (NP_001312012), *Lycium chinense* (AID50182), *Arabidopsis thaliana* (NP_190692), *Solanum lycopersicum* (NP_001316412) und *Glycine max* (NP_001236797) verglichen. Die Motive wurden in Rot, die konservierten Aminosäuren mit einem Stern oder Doppelpunkt markiert. Das Alignment wurde mit Hilfe von Clustal Omega durchgeführt.

al. , 2016). Diese Tatsache legte nahe, dass die verwendete HELAN Sequenz tatsächlich der F3h Familie angehört.

Die Expression wurde mittels SDS-PAGE analysiert und ist in Abbildung 22 dargestellt. In allen Fraktionen konnte eine intensive Bande zwischen 40 und 50 kDa nachgewiesen werden. Damit liegt die intensivste Bande genau im erwarteten Bereich, da das exprimierte Protein eine Größe von 42,6 kDa aufweisen sollte. Die Banden im Gesamtlisat nach Zellaufschluss und im Überstand nach Zentrifugation glichen sich von der Intensität, was für eine hauptsächlich lösliche Form des exprimierten Proteins sprach. Allerdings konnte auch noch eine deutliche Bande im Durchlauf detektiert werden. Diese Tatsache deutet eine Überladung der Säule an, weshalb nicht gebundenes Protein direkt die Säule passieren konnte. Im Waschschrift wurde nur eine sehr

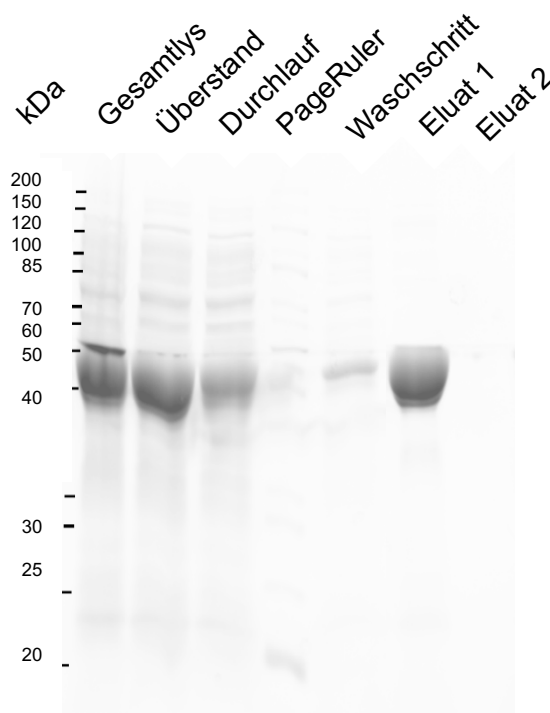


Abbildung 22: Aufreinigung der HaF3h Expression.

Die Fraktionen der Ni-IDA Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Als Größenstandard wurde der PageRuler unstained verwendet.

geringe Intensität der gewünschten Bande detektiert, anders als im ersten Eluat. Diese Probe wies eine intensive Bande in gewünschter Größe auf. Dies war der Nachweis für die erfolgreiche Expression der HaF3h mit N-terminalem His-Tag. Die Konzentration lag dabei bei 6,4 mg / mL.

4.10.1 Stabilisierung des Schmelzpunktes durch Prohexadion

Die Schmelzpunktbestimmung wurde mittels eines „Fluorescence Thermal Shift Assays“ durchgeführt (Abschnitt 3.11.6). Dabei wird über die erste Ableitung der Proteinschmelzkurve der Tiefpunkt bestimmt, welcher dem spezifischen Schmelzpunkt des Proteins unter bestimmten Bedingungen entspricht. Dieser Schmelzpunkt der *HaF3h* lag unter optimierten Bedingungen im Schnitt bei $61,3 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$ unter Verwendung des Co-Faktors 2-Oxoglutarat und bei $59,3 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ohne Co-Faktor (Tabelle 12).

Tabelle 12: Schmelzpunkte der Interaktionsanalyse zwischen der *HaF3h* und Prohexadion.
Die Schmelzpunkte wurden mit und ohne den Co-Faktor 2-Oxoglutarat eruiert.

	0 μM [$^\circ\text{C}$]	20 μM [$^\circ\text{C}$]	80 μM [$^\circ\text{C}$]
+ 2-Oxoglutarat	61,2	70,7	73,1
	61,5	70,5	72,7
	61,5	69,9	72,6
- 2-Oxoglutarat	59,2	70,6	72,8
	59,3	70,5	73,0
	59,4	70,1	72,6

Durch den Einsatz von Prohexadion änderte sich der Schmelzpunkt des Proteins deutlich. 20 μM Wirkstoff initiierten eine Schmelzpunktverschiebung um ca. $9 (\pm 0,3) ^\circ\text{C}$, dabei wurde auch der Co-Faktor 2-Oxoglutarat verwendet (Abbildung 23). In dieser Versuchsreihe erbrachte die Anwendung von 80 μM Prohexadion eine Verschiebung um $11,4 (\pm 0,3) ^\circ\text{C}$. Der Schmelzpunkt der Kontrolle ohne 2-Oxoglutarat war um ca. $2 ^\circ\text{C}$ geringer als die Kontrolle mit Co-Faktor. Unter Verwendung von Prohexadion befanden sich die Schmelzpunkte im selben Temperaturbereich wie unter Verwendung von 2-Oxoglutarat. Die Schmelzpunktverschiebung durch 20 μM Prohexadion lag bei $11,1 (\pm 0,2) ^\circ\text{C}$ und durch 80 μM Prohexadion bei $13,5 (\pm 0,1) ^\circ\text{C}$. Diese

Versuchsreihe wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt.

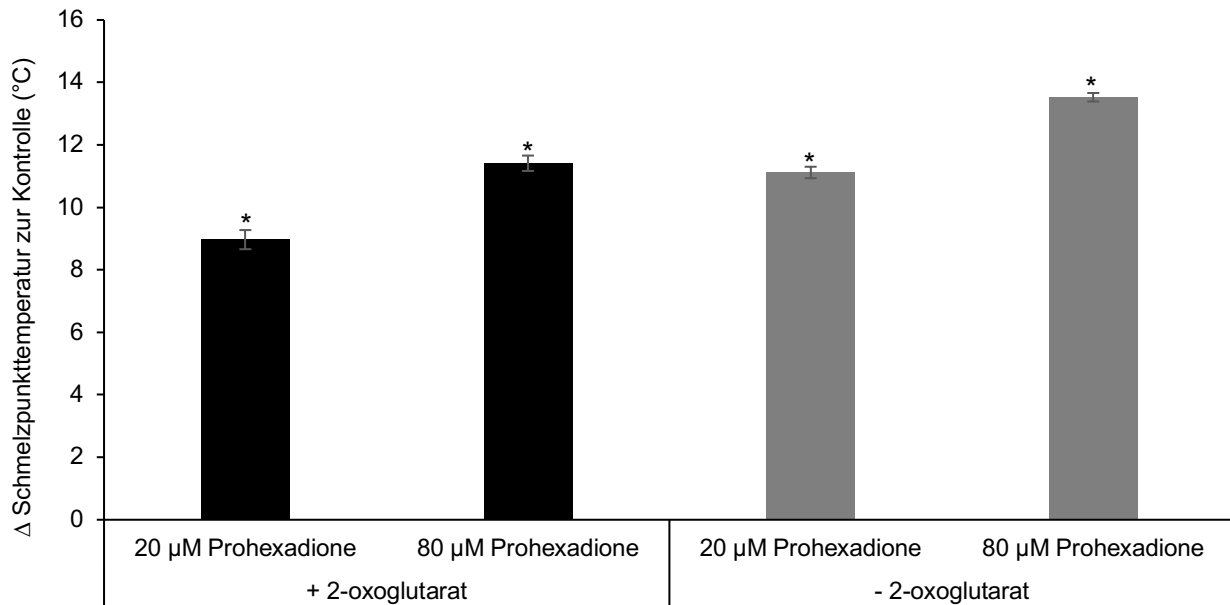


Abbildung 23: Differenz im Schmelzpunkt nach Interaktionsanalyse zwischen HaF3h und Prohexadion. Der jeweilige Kontrollschmelzpunkt wurde von den Schmelzpunkten der mit Prohexadion behandelten Proteine subtrahiert, um die Differenz zu visualisieren. Die Unterschiede der drei biologischen Replikate mit jeweils drei technischen Replikate wurden statistisch überprüft. Sie weisen zur jeweiligen Kontrolle einen p-Wert unter 0,001 (einfaktorielle Varianzanalyse unter Verwendung der Dunnett-Methode) auf. Die schwarzen Balken zeigen die Unterschiede der Schmelzpunkte mit 2-oxoglutarat als Co-Faktor und die grauen Balken ohne 2-Oxoglutarat.

4.10.2 Hemmung der Flavanon-3-Hydroxylase Aktivität *in vitro*

Zur Bestätigung der vermuteten Interaktion zwischen der HaF3h und Prohexadion wurde im nächsten Schritt ein Enzymassay entwickelt. Eine Schwierigkeit war dabei die Ähnlichkeit von Edukt und Produkt. Die zwei Substanzen unterschieden sich nur in einer zusätzlichen OH-Gruppe bei Taxifolin, weshalb eine photometrische Analyse nicht möglich war. Daher wurde der Assay an der UPLC etabliert. Nach Bestimmung der optimalen Bedingungen und einer guten Enzymaktivität

Tabelle 13: Übersicht halbmaximaler Konzentrationen zur Hemmung der HaF3h durch Prohexadion.
Zur Kalkulation der IC_{50} Werte wurde das Modell LL.4 (Log-logistic) mit dem IC_{50} als Parameter verwendet.

Replikant	IC_{50} (μM)	Mittelwert IC_{50} (μM)	Standardfehler
I	28,6	40,7	7,3
II	39,5		
III	53,9		

wurden Inhibitionsstudien mit Prohexadion durchgeführt. In Abbildung 24A ist die konzentrationsabhängige Inhibition der HaF3h durch Prohexadion graphisch dargestellt. Dabei war ein deutlicher Anstieg der HaF3h Inhibition mit steigender Prohexadion Konzentration zu beobachten. Durch eine finale Konzentration von 1 mM Prohexadion kann eine $94,9 (\pm 0,8)$ %ige Hemmung erreicht werden (Anhang Tabelle 40). Aus diesem Datensatz wurde mit Hilfe eines Vier-Parameter logistischen Modells die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) nach Seber und Wild (1989) berechnet. Aus den errechneten IC_{50} -Werten jedes biologischen Replikates wurde ein mittlerer IC_{50} von $40,7 (\pm 7,3)$ μM bestimmt (Tabelle 13).

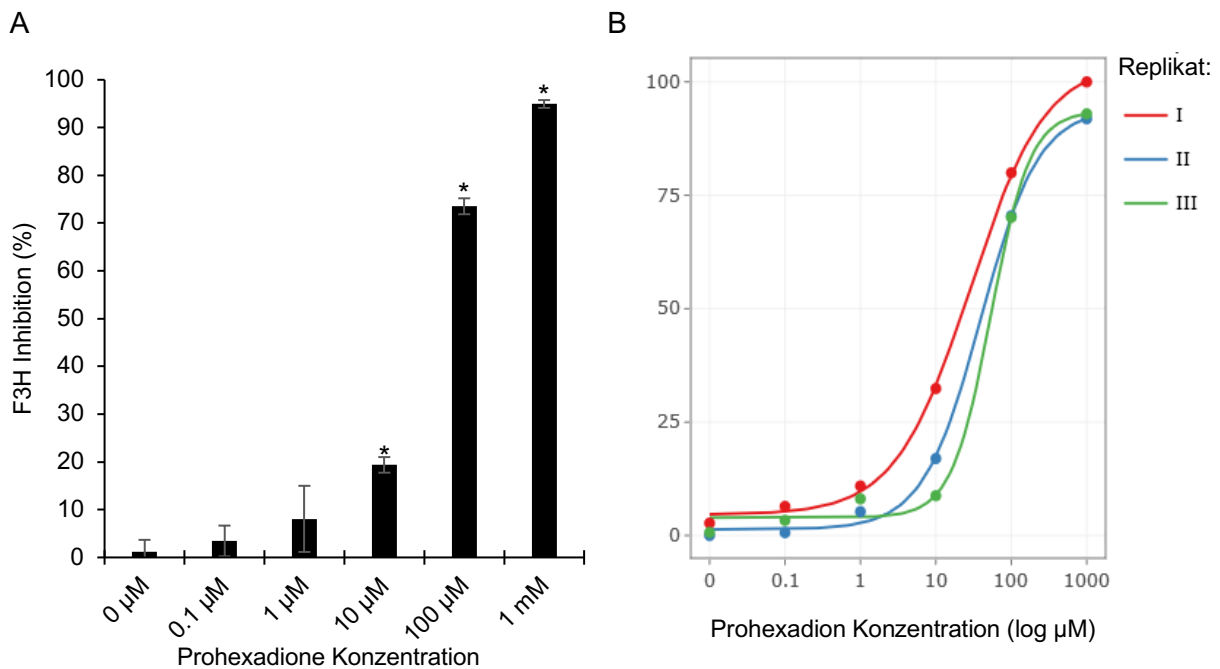


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Inhibition der HaF3h durch Prohexadion.

A. Graphische Darstellung der HaF3h Inhibition in Abhängigkeit der Prohexadion Konzentration. Die Sterne markieren die Konzentrationen, bei denen die Hemmung einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (0 μM Prohexadion) aufweist. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse ermittelt unter Verwendung der Dunnett-Methode. Die p -Werte lagen dabei unter 0,05. **B.** Logarithmische Darstellung der Inhibition der HaF3h zur Ermittlung der IC_{50} -Wert mit Hilfe des Modelles LL.4 (Log-logistic). Diese Versuchsreihe wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt mit jeweils zwei technischen Replikaten.

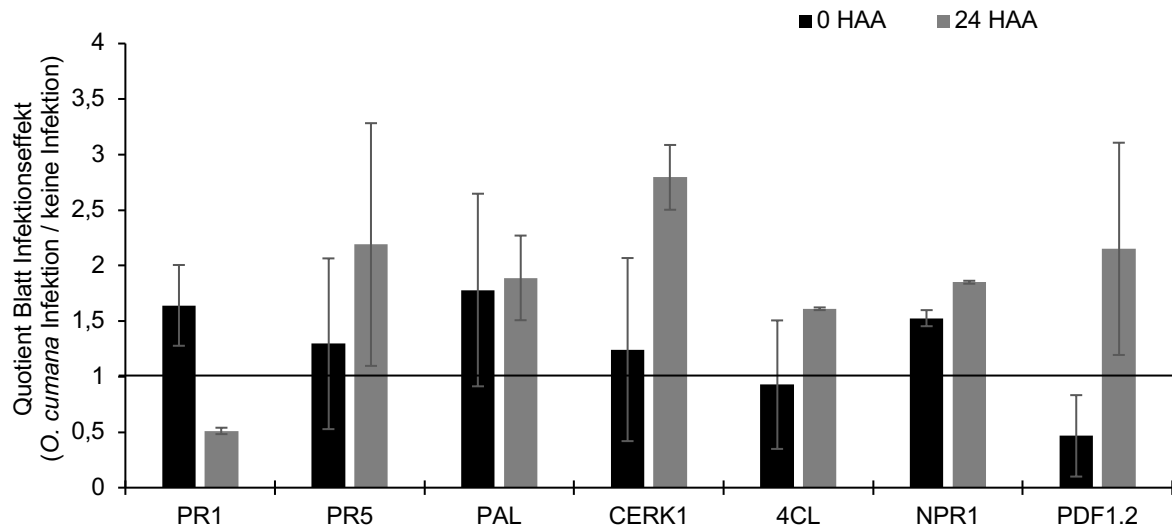
4.11 Prohexadion-induzierte Resistenz der Sonnenblume gegen *O. cumana*

Die Ergebnisse der Metabolom-Studie bekräftigten die Vermutung einer Prohexadion-induzierten Resistenz der Sonnenblume gegen *O. cumana*. Deshalb wurden verschiedene Gene untersucht, die an einer induzierten Resistenz der Pflanzen beteiligt sein können. Zuerst wurde die durch *O. cumana* hervorgerufene Transkriptregulation (Infektionseffekt: *O. cumana* Infektion / keine Infektion) untersucht (Abbildung 25A). Im zweiten Schritt wurde die durch Prohexadion-Behandlung hervorgerufene Transkriptregulation an nicht infizierten Pflanzen (Behandlungseffekt: Prohexadion / Leerformulierung) analysiert (Abbildung 25B). Ziel war es, anhand des Vergleichs von Infektionseffekt zu Behandlungseffekt herauszufinden, ob Prohexadion eine ähnliche Regulation dieser Gene auf RNA-Ebene hervorruft und die Pflanze somit auf eine bevorstehende Infektion vorbereiten kann („priming“).

Generell fällt bei der Analyse auf, dass hohe Standardfehler auftreten. Diese Studie wurde anhand von zwei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten ausgewertet. Diese technischen Replikate wurde allerdings vereint, um den Probenaufwand vertretbar zu halten. Zur Minimierung der Standardfehler sollte dieses Vorgehen verbessert werden.

Die Analyse des Blattgewebes (Abbildung 25) ergab nur einen signifikanten Unterschied zwischen Infektionseffekt (Abbildung 25A) und Behandlungseffekt (Abbildung 25B) und dieser lag bei NPR1 zum Zeitpunkt 24 HAA. Die durch Prohexadion hochregulierte Transkriptmenge ($2,2 \pm 0,03$) war signifikant höher als die durch *O. cumana* Infektion ($1,85 \pm 0,01$). Dennoch wurde die Expression in beiden Fällen, verglichen zur jeweiligen Kontrolle, hochreguliert. Die Transkriptmenge von PR1 war zum Zeitpunkt 0 HAA sowohl durch *O. cumana* Infektion als auch durch Prohexadion-Behandlung hochreguliert, allerdings mit hohen Varianzen. Zum Zeitpunkt 24 HAA jedoch war die Transkriptmenge dieses Gens durch *O. cumana* Infektion eher erniedrigt und durch Prohexadion-Behandlung immer noch leicht erhöht. Die Transkriptmenge von PR5 wurde sowohl durch *O. cumana* Infektion als auch durch Prohexadion-Behandlung nicht nennenswert reguliert. Die

A



B

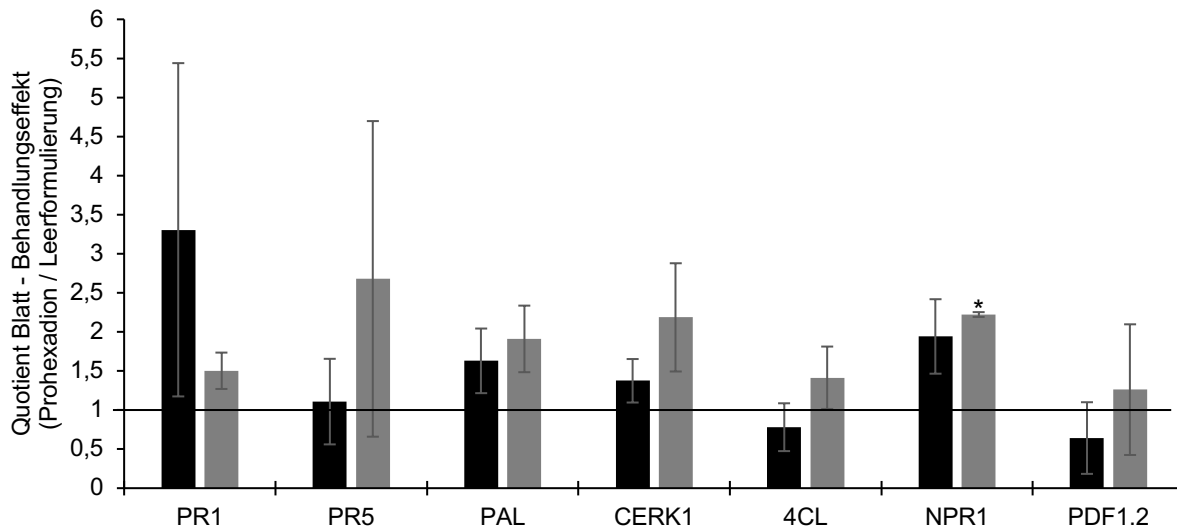


Abbildung 25: Analyse des Blattgewebes auf eine induzierte Resistenz der Sonnenblume durch Prohexadion. **A.** Infektionseffekt ausgelöst durch *O. cumana* Befall an mit 300 g ai / ha Leerformulierung behandelten Sonnenblumen. Der Quotient errechnet sich aus der Normierung der dCp Werte der infizierten Pflanzen auf die dCp Werte nicht infizierter Sonnenblumen. **B.** Behandlungseffekt ausgelöst durch Behandlung nicht infizierter Sonnenblumen mit 300 g ai / ha Prohexadion. Für die Berechnung des Quotienten wurden die dCp Werte der behandelten Pflanzen auf die dCp Werte nicht behandelten (Leerformulierung) Sonnenblumen normiert. Zum Vergleich wurden die statistisch signifikanten Unterschiede der einzelnen Gene zu jedem Zeitpunkt zwischen Infektions- und Behandlungseffekt anhand eines multiplen zweiseitigen t-Tests berechnet. Sterne markieren dabei einen p-Wert < 0,05 berechnet für zwei biologische Replikate.

Transkriptmenge der PAL wurde vor allem zum Zeitpunkt 24 HAA, sowohl durch *O. cumana* ($1,89 \pm 0,38$) als auch durch Prohexadion ($1,91 \pm 0,43$) hochreguliert. Eine ähnliche Tendenz zeigte auch die Regulation der Transkriptmenge von CERK1. Die *O. cumana* Infektion gemessen 24

Stunden nach Applikation zeigte ebenso einen positiven Effekt auf die Transkriptmenge von 4CL und PDF, welche durch die Prohexadion-Behandlung jedoch nicht hervorgerufen werden konnte.

Die Analyse wurde auch mit dem Wurzelgewebe durchgeführt (Abbildung 26). Dabei konnte anhand des durchgeführten t-Tests kein signifikanter Unterschied der Regulation der

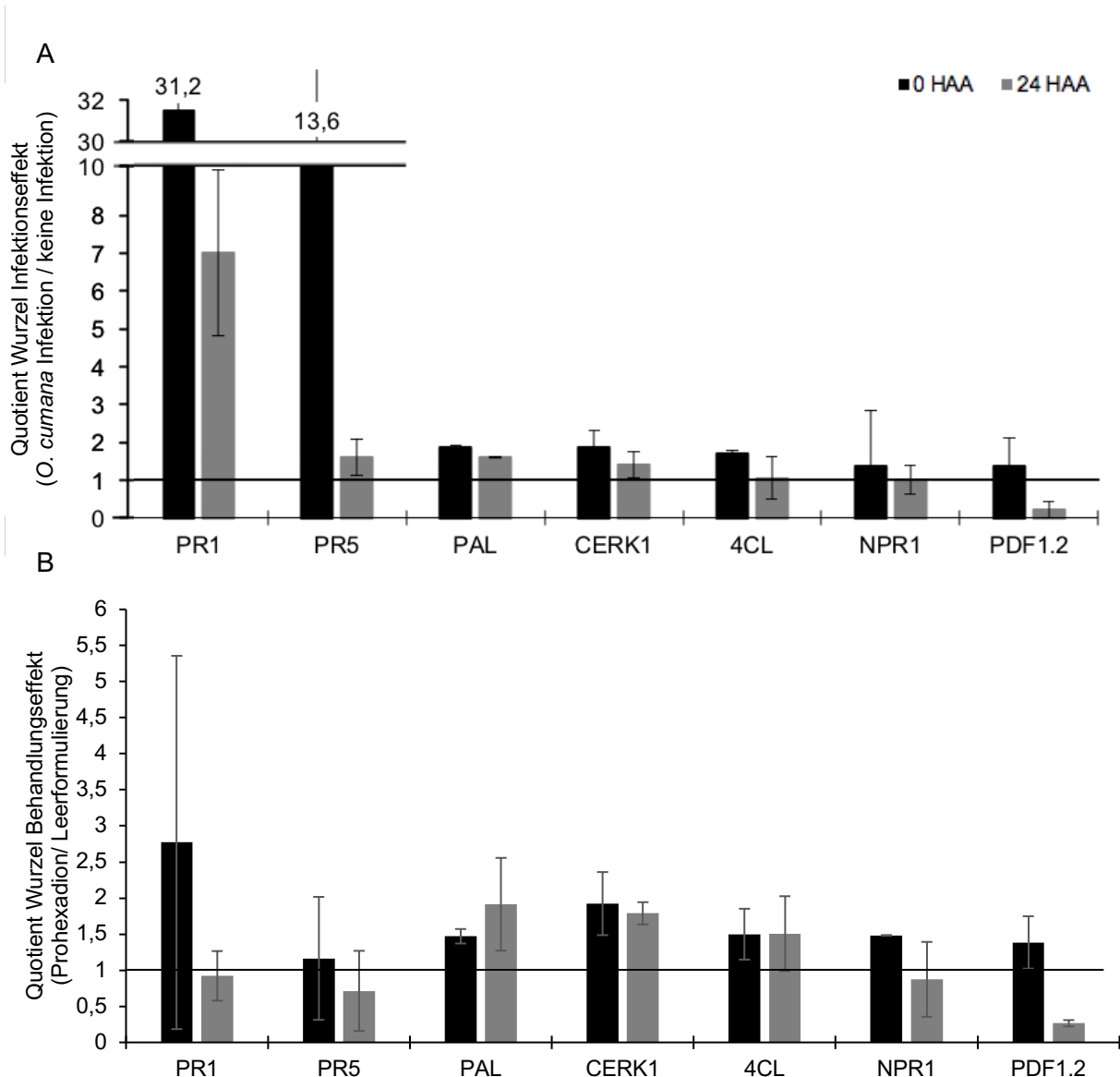


Abbildung 26: Analyse des Wurzelgewebes auf eine induzierte Resistenz der Sonnenblume durch Prohexadion. **A.** Infektionseffekt ausgelöst durch *O. cumana* Befall an mit 300 g ai / ha Leerformulierung behandelten Sonnenblumen. Der Quotient errechnet sich aus der Normierung der dCp Werte der infizierten Pflanzen auf die dCp Werte nicht infizierter Sonnenblumen. Für die bessere Darstellung wurden die Werte für PR1 und PR5 (0 HAA) verkürzt dargestellt. **B.** Behandlungseffekt ausgelöst durch Behandlung nicht infizierter Sonnenblumen mit 300 g ai / ha Prohexadion. Für die Berechnung des Quotienten wurden die dCp Werte der behandelten Pflanzen auf die dCp Werte nicht behandelten (Leerformulierung) Sonnenblumen normiert. Zum Vergleich wurden die statistisch signifikanten Unterschiede der einzelnen Gene zu jedem Zeitpunkt zwischen Infektions- und Wirkungseffekt anhand eines multiplen zweiseitigen t-Tests berechnet. Sterne markieren dabei einen p-Wert < 0,05 berechnet für zwei biologische Replikate.

Transkriptmenge zwischen Infektionseffekt und Behandlungseffekt nachgewiesen werden. Dennoch sind unterschiedliche Tendenzen zu erkennen. So ist zwar die Transkriptmenge der PR1 durch die *O. cumana* Infektion deutlich erhöht, weist aber auch hohe Varianzen zu beiden Zeitpunkten 0 HAA ($31,2 \pm 29,0$) und 24 HAA ($7,3 \pm 2,2$) auf. Dennoch kann eine Prohexadion Behandlung keine ähnliche Expressionsregulation innerhalb von 24 Stunden erzeugen. Auch die Transkriptmenge von PR5 wird durch eine *O. cumana* Infektion in beiden detektierten Zeitpunkten deutlich hochreguliert, aber auch hier kann Prohexadion keinen ähnlichen Effekt hervorrufen. Dahingegen wird die PAL durch die *O. cumana* Infektion 2-fach (0 HAA) bzw. 1,6-fach (24 HAA) hochreguliert und durch Prohexadion ebenfalls 2-fach nach 24 Stunden. Ähnlich wie die PAL verhält sich auch CERK1 nach *O. cumana* Infektion und Prohexadion-Behandlung. Dahingegen zeigt die 4CL zum Zeitpunkt 0 HAA einen leichten Effekt zur hochregulierten Transkriptmenge ($1,75 \pm 0,1$), welcher sich nach 24 Stunden ($1,1 \pm 0,6$) allerdings schon wieder reduziert hat. Zum Zeitpunkt 0 HAA ist eine leichte Tendenz zur hochregulierten Transkriptmenge ($1,5 \pm 0,4$) durch Prohexadion messbar. Die ist nach 24 Stunden allerdings nicht mehr zu erkennen. Eine Regulation der NPR1 Expression kann weder durch *O. cumana* Infektion noch durch Prohexadion-Behandlung im Wurzelgewebe nachgewiesen werden. Die Transkriptmenge der PDF1.2 ist 24 HAA runterreguliert, sowohl durch *O. cumana* Infektion ($0,2 \pm 0,2$) als auch durch Prohexadion Behandlung ($0,3 \pm 0,04$).

5 Diskussion

Die holoparasitische Blütenpflanze *O. cumana* ist ein ernstzunehmendes Problem im Sonnenblumenanbau in Ländern wie Spanien, Bulgarien, China und Frankreich (Molinero-Ruiz *et al.*, 2015). Es gibt nur wenige wirksame Ansätze zur Bekämpfung des Parasiten. Einer davon ist die chemische Behandlung von toleranten Sonnenblumen mit Imidazolinon-Herbiziden (Clearfield® System). Felddaten, in denen Prohexadion als Tankmischung zusammen mit Imazamox getestet wurde, zeigten, dass die kombinierte Anwendung von Prohexadion und Imazamox der alleinigen Anwendung von Imazamox überlegen ist, insbesondere im Hinblick auf den Ertrag (Pfenning & Bremer, 2013). Allerdings konnte Prohexadion in der Soloapplikation nicht den Parasitendruck kontrollieren. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass die Entwicklung des Wurzelparasiten verzögert wurde, da die ersten aufgelaufenen Pflanzen 42 Tage später als in der unbehandelten Kontrolle detektiert wurden. Dafür scheint der richtige Zeitpunkt, passende Umweltbedingungen und das Erreichen des Parasiten im richtigen Wachstumsstadium entscheidend für den Schutz der Sonnenblumen gegen *O. cumana* zu sein. Leider wurde in der Studie (Pfenning & Bremer, 2013) nicht die Anzahl der Haustorien analysiert, sondern nur die aufgelaufenen *O. cumana*-Pflanzen dokumentiert.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Wirkungsweise des Wachstumsregulators bestimmt werden. Dabei wurde der Effekt auf die Sonnenblume und damit ein eventuell indirekter Effekt auf die Anfälligkeit gegen *O. cumana* analysiert. Ein weiterer wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit war die Analyse eines direkten Effektes von Prohexadion auf *O. cumana*, beispielsweise durch Verteilung und Ausscheidung des Wirkstoffes aus der Wurzel und einen direkten Einfluss auf die Parasitenkeimung. Deshalb wurde zunächst die Prohexadion-Absorption und -Verteilung innerhalb der Sonnenblumen analysiert.

5.1 Prohexadion Translokation in- und außerhalb der Sonnenblume

Die Studien belegen, dass Prohexadion in Sonnenblumen systemisch verteilt wird. Der Wirkstoff wird von den Blättern in die Wurzeln transloziert und erreicht damit innerhalb weniger Stunden nach Applikation den Infektionsort von *O. cumana* (Abbildung 8). Außerdem konnte 72 Stunden nach Applikation eine Ausscheidung von 3 g ai / ha Prohexadion über die Sonnenblumenwurzel nachgewiesen werden (Abbildung 9). Dieser Wert könnte unter optimalen physiologischen Bedingungen höher sein. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass sich in der Rhizosphäre ein Gradient ausbildet und in der Nähe der Wurzeln höhere Konzentrationen von Prohexadion vorhanden sein könnten als im umgebenden Boden. Zusätzlich wurden die Sonnenblumen für die Ausscheidungsstudien nach dem Auflaufen in ein 50 ml Sammelröhrchen umgepflanzt, um die Menge des zu extrahierenden Bodens zu reduzieren. Infolgedessen unterschied sich die physiologische Entwicklung der Pflanzenbiomasse deutlich, wodurch die gesamte Blattoberfläche im Vergleich zu früheren Studien reduziert war. Aufgrund der geringeren Blattmasse war auch die applizierte Menge an Prohexadion deutlich reduziert, was folglich die ausgeschiedene Menge im Boden begrenzen könnte. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Prohexadion nicht nur ausgeschieden, sondern auch in der Pflanze metabolisiert wird. Der Metabolismus von Prohexadion in Sonnenblumen wurde in mehreren Studien analysiert. Hierfür dienen standardmäßig sogenannte „Cold metabolism“ Studien (Watson, 2013) die sich die chemische Struktur der verwendeten Substanzen zu Nutzen machen. Die Angriffspunkte für metabolisierende Enzyme wie Glutathiontransferasen (GSTs) oder Cytochrome P450 (CYP) sind bekannt und die dabei entstehenden Metaboliten können mittels hochauflösender Massenspektroskopie aufgeklärt werden. Dafür sind allerdings Elemente wie Stickstoff-, Chlor-, Fluor- oder Schwefelatome essentiell, um die Verbindungen von Interesse gegen den Hintergrund der pflanzlichen Strukturen zu detektieren. Prohexadion konnte aufgrund dieser fehlenden Elemente nicht mit dieser Methode auf den Metabolismus untersucht werden. Deshalb wurden verschiedene mögliche Stoffwechselwege für den Prohexadion-Abbau über Inhibitoren gehemmt

und nach einer Anreicherung von Prohexadion im applizierten Gewebe gesucht. Dabei brachte der Einsatz der sogenannten CYP-Inhibitoren Piperonylbutoxid (Deng & Hatzios, 2002) und Malathion (Kreuz & Fonné-Pfister, 1992), sowie der Einsatz des GST-Inhibitors Tridiphan (Boydston & Slife, 1986; Maguire *et al.*, 2019) nicht den gewünschten Erfolg. Folglich müssen diese Studien zukünftig mit radioaktiv markiertem Prohexadion durchgeführt werden, um mögliche Metaboliten des Wachstumsregulators aufzudecken.

Ein weiterer möglicher Faktor eines direkten Prohexadion-Einflusses auf die *O. cumana* Samen in der Erde könnte die Mobilität des Wachstumsregulator in der Erde sein. Dabei wurde getestet, ob der Wirkstoff die kritische Zone erreicht, in der sowohl die Sonnenblumenwurzeln als auch die *O. cumana* Samen vorkommen. Die Mobilitätsstudien hingegen zeigten, dass der Wachstumsregulator nur gering mobil war und der Hauptteil der Verbindung in der obersten Bodenschicht (0 – 2 cm) verbleibt (Abbildung 10). Da die Saattiefe der Sonnenblume bei 3 - 5 cm liegt (proplanta, 2021b), hat der direkt auf die Erde applizierte Wirkstoff keinen Einfluss auf die *O. cumana* Samen in Wurzelnähe. Außerdem enthielt die Bewässerungsprozedur in den durchgeführten Experimenten bereits mehr Wasser als in den Gebieten in denen Sonnenblumen üblicherweise angepflanzt werden. Die staatliche meteorologische Agentur von Spanien zeigte, dass der mittlere kumulative Niederschlag während des Sommers in Sevilla im Zeitraum von 1981 bis 2010 nie mehr als 5 L / mm² in einer Woche betrug (AEMET, 2020). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Wirkstoff durch Regenfälle in tiefere Bereiche des Bodens ausgewaschen wird.

Ein weiterer limitierender Faktor war die Effizienz des Extraktionsverfahrens von Prohexadion aus dem Boden, was zu der Annahme führte, dass die Gesamtmenge höher sein müsste als die in den Experimenten gemessenen. Weitere Bodenexperimente sind notwendig, um zu klären, wie lange der Pflanzenwachstumsregulator im Boden stabil ist. Der Abbau während der ersten 72 HAA wird möglicherweise durch das Bodenmikrobiom verursacht. Studien belegen eine Zunahme der mikrobiellen Aktivität mit zunehmendem Gehalt an organischem Kohlenstoff im Boden

(Gaultier *et al.*, 2008). Diese Forschungsgruppe hat außerdem gezeigt, dass der Abbau der Verbindung im Boden auch von verschiedenen anderen Faktoren wie pH-Wert, Tongehalt und Carbonatgehalt abhängt. Auffallend ist, dass bei 6 HAA 148 % Prohexadion im Vergleich zur Kontrolle zurückgewonnen wurden, was höchstwahrscheinlich durch den Bewässerungsvorgang während der Probenahme erklärt werden kann. Die Bewässerung wurde 90 min vor der Probenahme bei 0, 48 und 72 HAA durchgeführt, jedoch nicht bei der 6 HAA-Probe, da der Feuchtigkeitsgehalt für diese Probenahmen ausreichte. Aufgrund der Wasserverdunstung wurden, die nicht bewässerten 6 HAA-Proben daher mit einer geringeren Flüssigkeitsmenge extrahiert und Prohexadion könnte stärker konzentriert gewesen sein, als es bei den bewässerten Zeitpunkten der Fall war. Bei einer genaueren Quantifizierung muss zukünftig die Gesamtmasse des extrahierten Anteils berücksichtigt werden, um den Wasserverlust durch Verdunstung einbeziehen zu können. Dennoch sollte das Verhältnis mit der Kontrolle vergleichbar sein und die Anteile konnten interpretiert werden. Schlussendlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Ausscheidung des Wirkstoffes möglich ist, weshalb der direkte Einfluss von Prohexadion auf *O. cumana* eruiert werden musste.

5.2 Prohexadion als Keimungsinhibitor der *O. cumana* Keimung

Zur Bestimmung der vorherrschenden *O. cumana* Rasse im Anbaugebiet und der Determinierung des Saatgutes, welches für alle Versuche verwendet wurde, wurde zunächst die Rassenbestimmung durchgeführt. Demnach bestand das geerntete Saatgut hauptsächlich aus Samen der Rasse F, enthält aber immer eine Mixtur verschiedener Rassen, da keine sortenreine Ernte auf einem Sonnenblumenfeld gewährleistet werden kann.

Der folgende Schritt war die Validierung eines stabilen Keimungsinduktors der *O. cumana* Samen. Der Literatur zufolge wird dafür hauptsächlich das synthetische Strigolacton-Analog *rac*-GR24 verwendet (Pouvreau *et al.*, 2013; Raupp & Spring, 2013; Ye *et al.*, 2017). Die Anwendung dieser Verbindung führte im Gegensatz zur Verwendung des Sonnenblumenwurzelextrakts (SWE) zu einer zwar guten, aber variablen Keimrate (Abbildung 11). Zusätzlich wurde die Versuchsdauer

durch Einsatz von *rac*-GR24 um sieben Tage verlängert, da die Keimungsinduktion erst nach 12 statt nach fünf Tage (SWE Induktion) deutlich wurde. Demzufolge war die Keimungsinduktion mit SWE stabiler und dazu noch kostengünstiger. Dennoch wurde zum besseren Vergleich eine Prohexadion-Inhibitionsstudie mit SWE- und *rac*-GR24 induzierten *O. cumana* Samen durchgeführt. Daraus resultierten zwei unterschiedliche IC₅₀-Werte (Tabelle 11). Nach Verwendung von *rac*-GR24 induzierten *O. cumana* Samen wurde für Prohexadion ein IC₅₀ von 73 µM bestimmt. Dieser lag ungefähr 11 µM unter dem IC₅₀ der SWE induzierten Samen (84 µM). Der Einsatz von SWE entspricht jedoch eher den physiologischen Bedingungen im Feld, da die Sonnenblumenwurzeln durchaus mehr als einen Keimungsinduktor ausscheiden können. Deshalb wurde der Extrakt für weitere Studien verwendet. Schließlich konnte eine dosisabhängige Inhibierung der *O. cumana* Samen nachgewiesen und damit ein direkter Einfluss von Prohexadion bestätigt werden. Im Gegensatz dazu haben Fan *et al.* (2007) gezeigt, dass Prohexadion die Keimung von *O. cumana* bei Verwendung von Wurzelkammern nicht beeinträchtigt. Wahrscheinlich war die Menge an Prohexadion, die die Samen erreichte, in diesen Studien nicht ausreichend, während unsere *in vitro* Ergebnisse auf dem direkten Kontakt von Prohexadion und *O. cumana* basieren. Die effektive Dosis von 150 µM Prohexadion beziehungsweise 12 g ai / ha (bei 375 L / ha) blockierte die Keimung von *O. cumana* vollständig. Jedoch kann diese Applikationsrate nicht direkt auf Feldern angewendet werden, da es große Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen gibt. In Feldversuchen von Pfenning *et al.* (2013) wurden beispielsweise 100 g ai / ha Prohexadion erfolgreich gegen *O. cumana* verwendet, daher muss die Übertragungsrate von *in vitro* Versuchen auf das Feld in weiteren Studien bestimmt werden. Verschiedene Publikationen haben Keimungsinduktoren parasitärer Pflanzen, wie *rac*-GR24, auch als Erkennungssignale von arbuskulären Mykorrhizapilzen charakterisiert (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2008), von denen bekannt ist, dass sie in Symbiose mit Sonnenblumenwurzeln stehen (Davies *et al.*, 2001). Signale, die von Sonnenblumenwurzeln ausgesendet werden, dienen in erster Linie dazu, symbiotische Organismen anzulocken, wirken

aber auch als Keimungsinduktoren für parasitische Pflanzen. Daher ist es nur sinnvoll, dass die Anlockung dieser symbiotischen Verbindungen und damit auch der Befall von *O. cumana* in mehreren Wellen erfolgt, abhängig von optimalen Umweltbedingungen.

Deshalb musste auch die Effizienz der Keimungshemmung über den EGI-Faktor bestimmt werden. Diese vergleicht gekeimte Samen in zwei Induktionsszyklen, wobei die Konzentration von Prohexadion vernachlässigt werden kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass Prohexadion die Keimung von *O. cumana* mit einer Effizienz von 95 bzw. 96 % hemmt (Tabelle 14). Samen, die schon durch Prohexadion in ihrer Keimung gehemmt wurden, konnten auch durch Auswaschen des Inhibitors und Zugabe von frischem Wurzelextrakt nicht mehr zur Keimung induziert werden. Das zeigt, dass der Wachstumsregulator die *O. cumana* Keimung irreversibel hemmt.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen molekularen Wirkorte von Prohexadion, die für die Keimungsprozesse verschiedener Pflanzenarten wichtig sind, ist die terminale Keimungshemmung erklärbar. Prohexadion hemmt aufgrund struktureller Ähnlichkeit zu 2-Oxoglutarat die späten Stadien der Gibberellin-Biosynthese (Rademacher, 2015). Dies wiederum führt zu einem Ungleichgewicht des endogenen Gibberellinspiegels, wodurch ein wichtiger Schlüsselregulator der Keimungsprozesse fehlt. Die große Bedeutung von Gibberellinen während des Keimungsprozesses von Parasiten wurde von einer Forschergruppe gezeigt, welche mit der parasitären Pflanze *Phelipanche aegyptiaca* arbeitete. Yao *et al.* (2016) entdeckten eine

Tabelle 14: Kalkulierter EGI-Faktor für Prohexadion Inhibitionseffizienz gegen die *O. cumana* Keimung. Der EGI-Faktor wurde anhand der im Methodenteil beschriebenen Formel kalkuliert. Die Positiv Kontrolle (0µM) wurde ohne Prohexadion und SWE in der ersten Behandlung angesetzt. Zur zweiten Behandlung wurde dieser Kontrolle frisches SWE beigefügt. Der Standardfehler wurde anhand von drei biologischen Replikaten mit jeweils fünf technischen Replikaten kalkuliert.

		Prohexadion (µM)		
		0	100	200
SWE	1. Behandlung	-	+	+
	2. Behandlung	+	+	+
EGI	EGI-Faktor	0,00	0,95	0,96
	SE	0,00	0,07	0,03

Hochregulierung verschiedener Gibberellin-Dioxygenase-Transkripte nach Behandlung mit *rac*-GR24. Diese Enzyme, die 2-Oxoglutarat als Co-Substrat verwenden, könnten durch Prohexadion gehemmt werden. Zusätzlich wird auch diskutiert, dass Prohexadion die ACC-Oxidase hemmt, welche ACC zu Ethylen umwandelt. Der Grund dafür ist ebenso die strukturelle Ähnlichkeit zu dem Co-Substrat der ACC-Oxidase, 2-Oxoglutarat (Rademacher, 2015). Daher führt die Behandlung mit Prohexadion zu einem verringerten Ethylenspiegel, was wiederum die hemmende Wirkung von Abscisinsäure (ABA) auf die Samenkeimung begünstigt. Ein normaler Ethylenspiegel wirkt dem ABA-Effekt entgegen, indem er die ABA-Signalübertragung stört (Kucera *et al.*, 2005). Zusätzlich wurde gezeigt, dass verschiedene Ethylen-Biosynthese-Inhibitoren in der Lage waren, die Keimung von *O. ramosa* zu hemmen (Zehhar *et al.*, 2002). Eine weitere Beobachtung während der in dieser Arbeit durchgeführten Keimungsexperimente war die reduzierte Radikelelongation (Abbildung 12 und Abbildung 13) unter Prohexadion-Exposition, die ebenfalls durch die beschriebene Wirkort-Hemmung erklärt werden könnte.

5.3 Prohexadion-induzierte Variation des STL Gehalts

Striga hermonthica ist die am besten untersuchte parasitische Pflanze der Gattung *Orobanchacea*. In diesem Organismus konnten Strigolacton-Rezeptoren charakterisiert werden, die auch in *Arabidopsis* bei der Keimung eine Rolle spielen (Waters *et al.*, 2012). Diese binden Keimungsinduktoren wie Karrikin oder Strigolactone (Awad *et al.*, 2006). Das dafür verantwortliche α/β Hydrolase Gen ist HTL/KAI2 („Hyposensitive to light / karrikin insensitive 2“). In *Striga* konnten 11 HTL/KAI2 Homologe gefunden und mit einer Strigolacton-induzierten Keimung in Verbindung gebracht werden (Toh *et al.*, 2015). Nun belegen neueste Studien, dass die STL 8-Epixanthatin und Tomentosin ebenfalls in der Lage sind an solche HTL/KAI2 Rezeptoren zu binden (Rahimi & Bouwmeester, 2021). Zusätzlich stehen diese Verbindungen in Diskussion als Keimungsinduktoren von *O. cumana* zu wirken (Joel *et al.*, 2011; Raupp & Spring,

2013). Daher wurde in dieser Studie versucht einen möglichen Einfluss von Prohexadion auf die STL Konzentration im Exsudat der Sonnenblume zu analysieren. Dafür wurden zunächst die vier STL Costunolid, Dehydrocostus lactone, 8-Epixanthatin und Tomentosin als Keimungsinduktoren des in dieser Arbeit verwendeten Saatgutes evaluiert.

Die Keimung konnte allerdings nur durch Costunolid oder Dehydrocostus lactone induziert werden (Abbildung 15), nicht aber durch 8-Epixanthatin und Tomentosin. Der Unterschied zur Studie von Raupp und Spring (2013) lag in der Beschaffung der Keimungsinduktoren. In der hier vorliegenden Studie wurden die Verbindungen käuflich erworben und stammten nicht aus einem Sonnenblumen- sondern zum Beispiel einem *Inula viscosa*-Extrakt (Tomentosin). Die Forschergruppe hingegen isolierte die Verbindungen aus dem Exsudat der Sonnenblume, was möglicherweise die fehlende biologische Aktivität für die Keimung des Sonnenblumenwurzelparasiten in den hier durchgeführten Studien erklärt. Doch auch Raupp und Spring (2013) hatten Probleme statistisch signifikante Ergebnisse für 8-Epixanthatin und Tomentosin zu reproduzieren. Die beiden STL sind sich außerdem strukturell sehr ähnlich (Abbildung 27) und gehören zu den sogenannten Xanthanoliden. Möglicherweise konnte das verwendete Saatgut nicht alleine mit diesen Verbindungen zur Keimung stimuliert werden, sondern benötigt noch andere Verbindungen zur Keimungsinduktion.

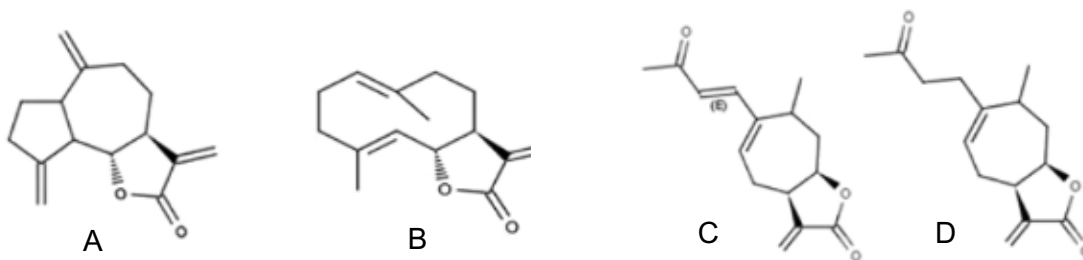


Abbildung 27: Verwendete STL für Keimungsinduktion von *O. cumana*.

A Dehydrocostus lactone gehört der Gruppe der Guaianolide an. **B.** Costunolid aus der Gruppe der Germacranolide. **C** 8-Epixanthatin und **D** Tomentosin gehören der Gruppe der Xanthanoliden an.

Dennoch wurde versucht alle vier STL nach Prohexadion-Behandlung in den Wurzeln der Sonnenblume als auch in deren Exsudat zu detektieren. Dabei fiel auf, dass die Konzentrationen

teilweise sehr gering waren im Vergleich zu anderen Studien. Vor allem Dehydrocostus lactone im Sonnenblumen Exsudat konnte nur in sehr geringen Mengen extrahiert werden. Dies könnte am Extraktionsverfahren liegen. Hier wurde mit 100 % Acetonitril sowohl die Wurzeln als auch das Exsudat extrahiert (Rao *et al.*, 2013). Spring *et al.* (2020) verwendeten jedoch Ethylacetat und Methanol. Dennoch waren auch bei Ihnen die Konzentrationen teilweise sehr gering und die Analyse von hohen Varianzen geprägt. Dies zeigt, wie schwierig die Extraktion der STL ist. Für eine erneute Studie ist es zwingend erforderlich, mindestens fünf Pflanzen für ein technisches Replikat zu vereinigen und dies dann mindestens fünfmal für eine Analyse zu wiederholen, um so die biologische Varianz in jeder Pflanze abzudecken. Diese entsteht sicherlich auch durch den veränderten Metabolismus der Sonnenblumen, der auf der Anzucht in Vermiculit und dem weiteren Wachstum in Flüssigkeit zurückzuführen sein könnte.

Dennoch brachte diese Studie erste Einblicke in die Auswirkungen der Prohexadion-Behandlung auf die wurzelendogene STL-Konzentration als auch auf die der Exsudate. Allgemein lässt sich eine reduzierende Tendenz der STL-Konzentration durch Prohexadion zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachweisen. Einzig 8-Epixanthatin konnte nicht detektiert werden, weder in den Wurzeln noch im Exsudat (Abbildung 16 und Abbildung 17). Die Daten deuten einen Einfluss von Prohexadion auf die STL Synthese oder deren Ausscheidung an, der noch intensiver untersucht werden muss. Mittlerweile sind einige Enzyme bekannt, die für die Biosynthese der oben genannten vier STL in Sonnenblume verantwortlich gemacht werden. Sie läuft über den Stoffwechselweg der Germacren-A-Säure ab. Die Herstellung der Germacren-A-Säure erfolgt über die Zwischenprodukte Farnesylpyrophosphat durch die Germacren-A-Synthase (Göpfert *et al.*, 2009) zu Germacrene A, welches schließlich durch die Germacren-A-Oxidase zu Germacren-A-Säure umgewandelt wird (Nguyen *et al.*, 2010). Durch Hydroxylierung der Germacren-A-Säure katalysiert von der Costunolid-Synthase wird zunächst Costunolid und über weitere Intermediate Dehydrocostus lactone gebildet (Álvarez-Calero *et al.*, 2018; Frey *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018). Die Xanthanolide 8-Epixanthatin und Tomentosin werden jedoch durch die Hydroxylierung der

Germacren-A-Säure mittels Germacren-A-Säure-8 β -Hydroxylase und weiter Intermediate gebildet (Ikezawa *et al.*, 2011). Dieser beschriebene Stoffwechselweg ist spezifisch für die endogenen STL und unterscheidet sich zur Trichom-spezifischen Synthese in Sonnenblumen (Spring *et al.*, 2020). Daher sollten diese beschriebenen Enzyme auf Regulation durch Prohexadion untersucht werden, um weitere Einblicke in die Wirkungsweise des Wachstumsregulators zu erhalten.

Die Ausscheidung der STL aus Sonnenblumenwurzeln ist bisher noch nicht erforscht, aber man könnte Rückschlüsse aus den Erkenntnissen der Strigolacton-Ausscheidung gewinnen. Es wurde gezeigt, dass die Strigolacton-Transporter der Familie der ABC-Transporter („ATP-binding cassette“) angehören und das speziell Pdr1 („Pleiotropic drug resistance 1“) in den hypodermalen Durchgangszellen der Wurzelspitzen von *Petunia axillaris* exprimiert wurde (Kretzschmar *et al.*, 2012). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass PaPdr1 für den gerichteten Strigolactontransport in Richtung des Sprosses als auch für die Exsudation der Strigolactone eine Rolle spielt (Sasse *et al.*, 2015). Daher sollte auch dieses Enzym auf Regulation durch Prohexadion untersucht werden, möglicherweise könnte durch eine Bindung des Wirkstoffes an den Transporter dessen Effektivität beeinflusst und damit die Strigolacton-Ausscheidung beeinflusst werden.

Dies könnte sinnvoll sein, da die Stimulation der Keimung von *O. cumana* sehr vielfältig ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl Strigolactone (Ye *et al.*, 2017) als auch Sesquiterpenlactone (Joel *et al.*, 2011; Masi *et al.*, 2019; Raupp & Spring, 2013) eine *O. cumana* Keimung induzieren können. Zusätzlich konnten STL an Strigolacton-Rezeptoren zur Keimungsinduktion binden (Rahimi & Bouwmeester, 2021), was auch eine breitere Substratazeptanz bei Pdr1 vermuten lässt.

Schlussendlich scheint *O. cumana* sehr speziell vom Sonnenblumen-Exsudat angesprochen zu werden, woran womöglich unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Keimungsinduktoren beteiligt sind. Zudem ist Prohexadion möglicherweise nicht in der Lage die Konzentration aller

STL zum gleichen Zeitpunkt zu regulieren. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich über die Wirkung von Prohexadion auf STL-Regulation keine eindeutige Aussage treffen. Aber aufgrund einer aufgezeigten Tendenz von Prohexadion, sollten die oben beschriebenen Studien zur weiteren Aufklärung durchgeführt werden.

5.4 Einfluss von Prohexadion auf das Sonnenblumen-Metabolom

Da die STL-Analyse auch keinen eindeutigen Einfluss des Wachstumsregulators auf die Sonnenblume nachweisen konnte, so musste noch geklärt werden wie Prohexadion sich anderweitig auf die Sonnenblume auswirken könnte. Daher wurde eine Analyse des Sonnenblumen-Metaboloms unter Prohexadion Einfluss erstellt. Die multivariate Analyse (Abbildung 18) ergab zunächst nach Korrektur des Datensatzes einen geringen Unterschied des II. Replikates zu den Replikaten I und III. Die Applikation der Sonnenblumen erfolgte für das erste Replikat Ende April 2018 und für das Replikat II und III Mitte Februar und Anfang März 2019. Wetteraufzeichnungen zeigen, dass Mitte Februar 2019 deutlich kühlere Temperaturen herrschten als Anfang März 2019 und Ende April 2018 (proplanta, 2021a). Trotz der Inkubation der Pflanzen in einer Klimakammer, scheint das auch einen Einfluss auf den Pflanzenstoffwechsel zu haben. Deshalb lässt sich diese Abweichung durch Temperaturunterschiede erklären und beeinflusste die weitere Analyse nicht.

Die univariate Analyse zeigte sowohl deutliche Wachstumseffekte als auch Behandlungseffekte in den unterschiedlichen Ontologie-Klassen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Ein signifikanter Behandlungseffekt einer gesamten Ontologiekategorie konnte aber nur im Flavonoid-Metabolismus dargestellt werden. Eine detaillierte Analyse mittels einfaktorieller Varianzanalyse identifizierte auch noch andere Metaboliten (Abbildung 20). So waren asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) unter Verwendung von 100 g ai / ha Prohexadion signifikant erhöht. Die Methylierung der im Protein eingebauten Arginine wird von sogenannten Protein Arginin-Methyltransferasen (PRMTs)

katalysiert (Paik *et al.*, 2007). Dabei sind die Typ I PRMTs verantwortlich für die doppelte Arginin-Methylierung des selben Stickstoffatoms, resultierend in ADMA, und die Typ II PRMTs für die doppelte Methylierung des Arginins an zwei unterschiedlichen Stickstoffatomen, woraus SDMA resultiert (Blanc & Richard, 2017; Liu *et al.*, 2010). Diese Proteinmethylierung ist in höheren Pflanzen wichtig für die Regulierung physiologischer Prozesse, wie Blütenbildung, Blattentwicklung, Tagesrhythmus und Stressreaktion (Bedford & Clarke, 2009; Hu *et al.*, 2017). Bei dem in dieser Studie gemessenen ADMA und SDMA handelt es sich jedoch um freies und nicht im Protein gebundenes Arginin, was eine erhöhte Proteolyse durch Prohexadion-Behandlung vermuten lässt. Das Phänomen einer erhöhten Protease-Aktivität konnte schon in Sonnenblumen unter Cadmium-Stress nachgewiesen werden (Pena *et al.*, 2006). Nun besteht die Möglichkeit, dass hohe Prohexadion-Konzentrationen einen proteolytischen Stress in der Sonnenblume verursachen, weshalb es zur Akkumulation von ADMA und SDMA kommt, oder diese Akkumulation deutet auf eine Stressreaktion der Pflanze hin, die möglicherweise einen Einfluss auf eine kommende *O. cumana* Infektion haben könnte. Dafür sollten in weiteren Studien *O. cumana*-infizierte Sonnenblumen auf ihren ADMA- und SDMA-Gehalt untersucht werden. Ebenso sollte der Einfluss von Prohexadion auf die PRMTs untersucht werden, um auszuschließen, dass der Wirkstoff sich auf die Proteinmethylierung direkt auswirkt.

Eine weitere Verbindung, welche durch die einfaktorielle Varianzanalyse auffiel, war die Galloylhexose (auch Glucogallin), welche zur Gruppe der Gallotannine gehört (Niemetz & Gross, 2005). Tannine konnten schon als Reaktion auf Gewebeverletzungen durch erhöhte Expression der DFR (Dihydroflavonol 4-Reduktase), einem Enzym des Flavonoid-Stoffwechsels, in *Populus tremuloides* induziert werden (Peters & Constabel, 2002). Glucogallin war aber nach Applikation von 100 g ai / ha Prohexadion signifikant reduziert. Möglicherweise spielt nur der Einfluss bestimmter DFR-regulierter Flavonoide (Liu *et al.*, 2017) dabei eine Rolle (Abbildung 28), die

durch den Einsatz von Prohexadion möglicherweise in ihrer Konzentration verringert waren und dadurch ebenso Glucogallin.

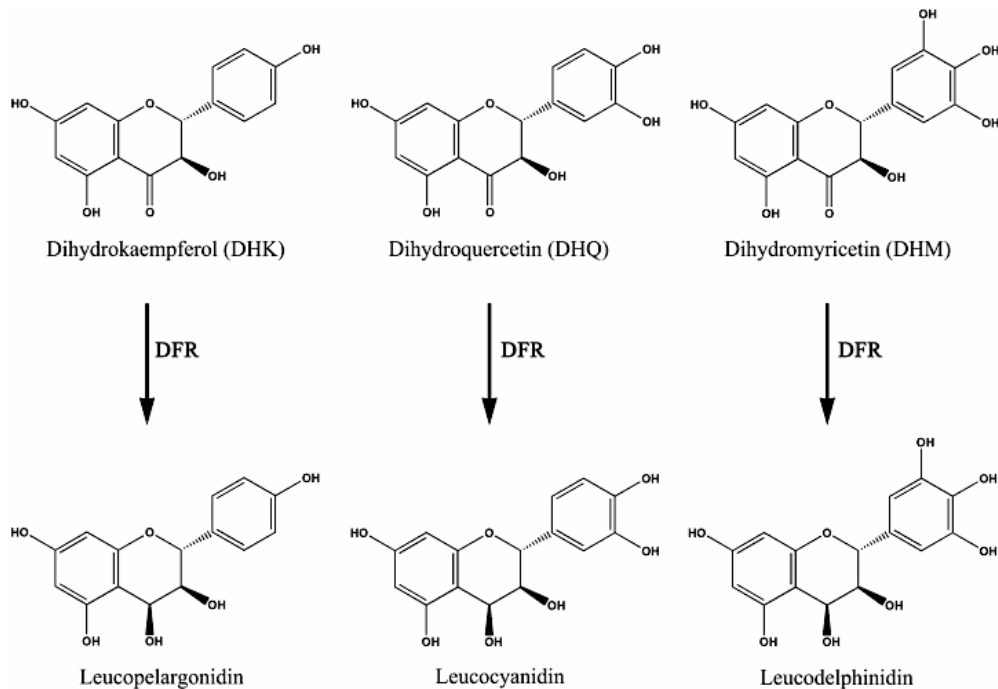


Abbildung 28: DFR katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydroflavonolen
Liu et al., 2017.

Dennoch zeigte sich der größte Effekt der Prohexadion-Behandlung im Flavonoid-Stoffwechsel der Sonnenblume (Abbildung 20). Bei einigen Flavonoiden (Hesperetin, Isookanin-7-glucosid, Rhamnetin, Eriodictyol) konnte eine signifikante Akkumulation detektiert werden. Flavonoiden konnten abwehrende Eigenschaften gegen Krankheitserreger wie *Plasmopara viticola*, *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania infantum* zugeschrieben werden (Andreu et al., 2018; Gonzalez-Coloma et al., 2012). Zusätzlich wurde postuliert, dass die Anti-*Leishmania*-Wirkung mit der Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen auf den Flavonoiden zusammenhängt (Taleb-Continil et al., 2004). In dieser Studie konnte insbesondere eine zeit- und dosisabhängige Akkumulation von Eriodictyol festgestellt werden. Dies unterstützt die These, dass die F3h als ein potentieller Wirkort von Prohexadion, wie in anderen Organismen, auch in der Sonnenblume bestätigt werden kann (Halbwirth et al., 2006; Roemmelt et al., 2003). Diese These wurde

zusätzlich durch molekulare Studien, wie der Interaktionsanalyse mittels Schmelzpunktbestimmung und einem enzymatischem Assay untermauert.

Nach erfolgreicher Expression und Isolation der *HaF3h*, wurde zunächst mittels des „Fluorescence Thermal Shift Assays“ (FTSA) eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde der Schmelzpunkt des Proteins mit und ohne den Co-Faktor 2-Oxoglutarat bestimmt, sowie mit und ohne Prohexadion. Dabei zeigte sich, dass durch den Einsatz von 2-Oxoglutarat der Schmelzpunkt des Proteins um ungefähr 2 °C deutlich erhöht wurde. Die Bindung des Co-Faktors stabilisierte das Protein. Die Zugabe von Prohexadion erbrachte Schmelzpunkte von 70°C (20 µM) und 73 °C (80 µM) unabhängig von der Zugabe des Co-Faktors (Tabelle 12). Dies spricht für eine Verdrängung des 2-Oxoglutarat durch Prohexadion. Zusätzlich konnte der Wirkort in einem klassischem Enzymassay unter Verwendung einer UPLC-Analyse, mit einem IC₅₀ von 40,7 µM bestätigt werden. Dies spricht somit für eine kompetitive Hemmung der *HaF3h* durch Prohexadion. Es ist allerdings anzumerken, dass dieser IC₅₀ sehr hoch im Vergleich zu den Werten anderer Herbizide ist (Grossmann *et al.*, 2010; Matringe *et al.*, 1989). Prohexadion wirkt in diesem Fall, jedoch auch nicht als alleiniges Herbizid, sondern als Pflanzenstärkungsmittel mit unterschiedlichen Wirkorten (Flavonoid-, Ethylen- und Gibberellin-Metabolismus) und der Fähigkeit eine systemische Abwehrreaktion der Sonnenblume zu induzieren und sie so auf pathogene Angriffe vorzubereiten.

Bei der ersten Analyse einer möglichen Prohexadion-induzierten Abwehrreaktion der Sonnenblume zeigte die Metabolomanalyse, dass *p*-Hydroxybenzoesäure signifikant nach Prohexadion-Applikation zeit- und dosisabhängig in der Sonnenblume akkumulierte (Abbildung 20). Diese Verbindung wird *in planta* unter anderem über L-Phenylalanine und *p*-coumaroyl-CoA gebildet. Dabei spielen auch die Enzyme Pal und 4Cl eine wichtige Rolle (Batista *et al.*, 2018; Zenk & Müller, 1964). In Gurkenblättern, die mit *Pseudomonas syringae* Zellen infiltriert wurden, und in der Phloemflüssigkeit dieser Pflanze, akkumulierte *p*-Hydroxybenzoesäure, welches als mobiles Abwehrsignal gilt. Ebenso konnte in dieser Studie eine Anreicherung von Salicylsäure

festgestellt werden (Smith-Becker *et al.*, 1998). Dies konnte auch in der hier vorliegenden Studie durch Prohexadion-Behandlung nachgewiesen werden. Die Salicylsäure akkumuliert ebenso wie *p*-Hydroxybenzoesäure signifikant zeit- und dosisabhängig und steht in Verbindung mit einer systemisch erworbenen Resistenz von Pflanzen, induziert durch nekrotisierende Pathogene (Durrant & Dong, 2004; Fan & Dong, 2002; Kuć, 1982). Zusätzlich konnte schon gezeigt werden, dass eine Saatgutbehandlung der Sonnenblume mit Salicylsäure zur einer erhöhten Sonnenblumenbiomasse und zu einer Reduktion der Anzahl und Biomasse von *O. cumana* führt (Yang *et al.*, 2016). All diese Befunde lassen auf eine Prohexadion-induzierte Abwehrreaktion der Sonnenblumen schließen, was wiederum eine erhöhte Resistenz gegen *O. cumana* im Feld erklärt. Diese systemische Abwehrreaktion wurde im weiteren Verlauf der Arbeit genauer analysiert, um eventuelle Applikationszeitpunkte zu verstehen.

5.5 Prohexadion induziert Abwehrmechanismen der Sonnenblume

Die genauere Untersuchung der Prohexadion-induzierten Sonnenblumenresistenz erfolgte mittels qPCR Analyse. Dafür wurden zunächst der durch *O. cumana*-Infektion induzierte Effekt auf die

Tabelle 15: Vereinfachte Darstellung der Prohexadion und *O. cumana* induzierten Transkriptregulation. Dabei steht / für keinen nachweisbaren Effekt aufgrund hoher Varianzen oder einem Wert von 1. Eine erhöhte Regulation wurde durch + (Quotient: 1 – 2) und ++ (Quotient: ab 2,1) dargestellt. Eine verringerte Regulation wurde durch - (Quotient: 0,5 – 1) und -- (Quotient: 0,49 - 0) dargestellt.

		Blattgewebe						
		PAL	4CL	NPR1	PR1	PR5	PDF1.2	CERK1
Infektionseffekt	0 HAA	/	/	+	+	/	--	/
	24 HAA	+	+	+	-	/	/	++
Behandlungseffekt	0 HAA	+	/	+	+	/	/	+
	24 HAA	+	/	++	+	/	/	++
		Wurzelgewebe						
		PAL	4CL	NPR1	PR1	PR5	PDF1.2	CERK1
Infektionseffekt	0 HAA	+	+	/	++	++	/	+
	24 HAA	+	/	/	++	+	--	+
Behandlungseffekt	0 HAA	+	+	+	/	/	/	+
	24 HAA	+	/	/	/	/	--	+

Transkriptregulation der in Tabelle 15 aufgelisteten Gene durchgeführt. Der Erntezeitpunkt der Pflanzen spielte bei der Infektionsanalyse eine untergeordnete Rolle, da die Sonnenblumen, sowohl bei 0 HAA als auch bei 24 HAA deutliche Infektionen aufwiesen. Diese Analyse dient zunächst der Darstellung des durch *O. cumana* hervorgerufenen Effektes, um im zweiten Schritt den durch Prohexadion-Behandlung hervorgerufenen Effekt mit diesem zu vergleichen. Dabei zeigte sich, dass im Blattgewebe die Transkripte der PAL, 4CL, NPR1 und CERK1 durch *O. cumana* Infektion hochreguliert wurden (Tabelle 15). Diese Aktivierung konnten auch in resistenten Sonnenblumenlinien anderer Studien nachgewiesen werden (Sestacova *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Durch den Einsatz von Prohexadion an nicht infizierten Sonnenblumen konnte eine Hochregulierung der PAL, NPR1, PR1 und CERK1 hervorgerufen werden. Das bedeutet, dass die PAL-Expression zum einen durch Prohexadion-Behandlung aktiviert werden konnte, diese Abwehrreaktion aber auch durch eine *O. cumana* Infektion induziert wird. Eine erhöhte PAL-Aktivität steht allgemein im Zusammenhang mit einer induzierten Abwehrreaktion in Pflanzen (Huang *et al.*, 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass SA die PAL-Expression induzieren kann (Wen *et al.*, 2005). Prohexadion induziert eine Akkumulation von SA in Sonnenblumen bereits 6 Stunden nach Applikation (Abbildung 20) und eine erhöhte PAL Transkriptmenge zum Zeitpunkt 0 HAA. Dies ist durch eine 30-minütige Trockenphase in der Abdampfstrecke der Spritzkabine zu erklären. Somit könnte die PAL direkt durch Prohexadion reguliert werden und zusätzlich durch die Akkumulation der SA in der Expression induziert werden. Als weiteres Transkript konnte NPR1 sowohl durch *O. cumana* Infektion als auch durch Prohexadion-Behandlung hochreguliert werden. NPR1 ist ein wichtiger Schlüsselregulator der SAR (Grant & Lamb, 2006) und kann im Zusammenspiel mit SA und des Transkriptionsfaktor TGA2 die PR-Genexpression erhöhen (Fan & Dong, 2002). Die PR1-Transkripte waren ebenfalls durch Prohexadion-Applikation erhöht, jedoch nicht die Transkripte der PR5. Möglicherweise wurden zum Nachweis dieser Transkripte nicht die passenden Zeitpunkte gewählt. Da eine SA-Akkumulation und ein erhöhter NPR1-Proteinspiegel nötig sind, benötigt die Erhöhung der PR-

Expression wahrscheinlich länger als 24 Stunden. Die SA-Akkumulation startete unter Verwendung der geringen Rate 6 Stunden nach Prohexadion-Applikation und eine sehr deutliche NPR1-Hochregulation erst nach 24 Stunden. So liegt die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung der PR-Protein Transkriptregulation erst nach mehr als 24 Stunden nach Prohexadion-Applikation in der Sonnenblume startet. Als Vertreter der PAMP getriggerten Immunität wurde in dieser Studie noch die Regulation von CERK1 untersucht (Miya *et al.*, 2007). Auch dieser Abwehrmechanismus wird sowohl durch eine *O. cumana* Infektion als auch durch die Applikation von Prohexadion induziert (Tabelle 15). Die Analyse des Blattgewebes ergab dabei, dass Prohexadion wichtige Schlüsselkomponenten verschiedener Abwehrreaktionen aktiviert, die auch durch eine *O. cumana* Infektion hervorgerufen werden. Damit kann Prohexadion als Schutzstoff der Sonnenblume gegen *O. cumana* eingesetzt werden, da es die Sonnenblume auf den folgende Pathogen-Angriff vorbereitet. Einzig die 4CL und die PDF1.2 konnten durch Prohexadion im Blattgewebe nicht induziert werden. Die PDF1.2 wurde ebenfalls nicht durch eine *O. cumana* Infektion hochreguliert, sondern zeigt zum Zeitpunkt 0 HAA eher eine Verringerung der Transkriptmenge, welche 24 Stunden später nicht mehr nachweisbar war. Die 4CL wurde durch *O. cumana* Infektion im Blattgewebe induziert. Dieser Effekt konnte durch Prohexadion jedoch nicht hervorgerufen werden.

Der Infektionseffekt im Wurzelgewebe unterschied sich leicht im Vergleich zum Blattgewebe. Hier wurde durch eine *O. cumana* Infektion die Transkriptmenge der PAL, 4CL, PR1, PR5 und CERK1 hochreguliert. Nicht aber von NPR1 oder PDF1.2. Somit spielen die PR-Proteine im Wurzelgewebe eine wichtigere Rolle als im Blattgewebe. Dieser Effekt konnte aber auch im Wurzelgewebe zum gemessenen Zeitpunkt nicht durch Prohexadion innerhalb von 24 Stunden induziert werden. In diesem Fall wäre eine weitere Studie wichtig, die Erntezeitpunkte von 24, 48 und 72 Stunden nach Prohexadion-Applikation enthält. Dennoch rief der Wachstumsregulator im Wurzelgewebe eine erhöhte Transkriptmenge der PAL, 4CL, NPR1 und CERK1 hervor und deutet damit, wie im Blattgewebe, auf einen Prohexadion-induzierten Abwehrmechanismus hin.

Die Ergebnisse der qPCR Studien in Verbindung mit den Ergebnissen der Metabolom-Studie deuten auf eine aktivierte systemische Immunantwort durch Prohexadion-Behandlung hin. In den nächsten Schritten müsste am besten unter realen Feldbedingungen ein Applikationsprotokoll für den Wachstumsregulator erstellt werden. Es konnte schon in anderen Studien gezeigt werden, dass die *O. cumana* Infektionsrate stark vom Aussaat-Datum der Sonnenblume abhängt (Castejon-Munoz *et al.*, 1993). So könnten sich die Umweltbedingungen auf die Prohexadion-Aufnahme, -Verteilung in der Sonnenblume, als auch auf die dadurch ausgelöste Abwehrreaktion in der Sonnenblume auswirken und damit den Effekt gegen *O. cumana* positiv oder negativ beeinflussen.

Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass es sinnvoll ist Prohexadion als Pflanzenstärkungsmittel gegen *O. cumana* einzusetzen. Es wirkt zu einem kleinen Teil direkt auf den Parasiten und bereitet die Sonnenblume auf einen pathogenen Angriff vor. Dennoch muss in den folgenden Studien ein größerer Fokus auf die Feldanwendung gelegt werden, um die Umwelteinflüsse in die Ergebnisse einzubeziehen.

6 Anhang

Tabelle 16: Verbleibendes Prohexadion auf der Blattoberfläche normalisiert auf 0 HAA.

Der Standardfehler (SE) wurde anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten normalisiert.

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	95,1 (± 0,6)	61,3 (± 10,5)	33,8 (± 10,1)	24,9 (± 7,7)	19,1 (± 6,1)

Tabelle 17: Photostabilität von Prohexadion auf Glasobjektträgern.

Das Versuchsdesign wurde wie die Blattapplikation mit 2 biologischen Replikaten und jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	100 (± 2,7)	95,3 (± 2,7)	89,5 (± 0,4)	90,1 (± 4,9)	85,8 (± 4,1)
Stabilitätsfaktor	1	0,953	0,895	0,901	0,858

Tabelle 18: Menge an Prohexadion in den verschiedenen Pflanzengeweben nach Applikation von 4 µg Prohexadion pro Pflanze nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

Alle Proben wurden auf das absorbierte Prohexadion pro Zeitpunkt normalisiert. Der Standardfehler (SE) war anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Blatt (± SE)	100 (± 0)	84,8 (± 6,1)	55,4 (± 16,3)	38,4 (± 11,2)	33,4 (± 3,9)
Akropetal (± SE)	n.a.	4,9 (± 2,1)	17,6 (± 6,1)	30,6 (± 5,7)	36,3 (± 2,9)
Basipetal (± SE)	n.a.	6,3 (± 2,6)	14,2 (± 5,5)	12,4 (± 2,8)	7,5 (± 3,1)
Wurzel (± SE)	n.a.	4,0 (± 1,7)	12,9 (± 4,9)	18,6 (± 3,4)	22,8 (± 3,7)

Tabelle 19: Wiederfindung von Prohexadion in allen Pflanzen und Pflanzengeweben normalisiert auf die Kontrolle (0 HAA).

Der Standardfehler wurde anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	100 (± 0,0)	107,2 (± 3,9)	98,0 (± 8,4)	78,2 (± 10,4)	67,2 (± 7,81)

Tabelle 20: Prohexadion Exkretion der Sonnenblumenwurzeln in Erde.

Der Standardfehler (SE) wurde anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA (%)	72 HAA (%)
Spross (± SE)	99,4 (± 0,1)	76,0 (± 2,0)
Wurzel (± SE)	0,0 (± 0,0)	22,4 (± 1,5)
Erde (± SE)	0,5 (± 0,1)	1,6 (± 0,6)

Tabelle 21: Prohexadion Wiederfindung der Exkretionsstudien.

Der Standardfehler (SE) wurde anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	100,0 (± 9,7)	70,6 (± 2,3)

Tabelle 22: Wiederfindung von Prohexadion in allen Erdproben normalisiert auf die Kontrollgruppe (0 HAA). Der Standardfehler (SE) wurde anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
Mittelwert (± SE)	100,0 (± 0,0)	148,0 (± 1,6)	103,2 (± 6,1)	59,6 (± 1,6)	51,6 (± 7,3)

Tabelle 23: Prohexadion Verteilung in Erde. Alle Proben wurden auf den Mittelwert der Menge an Prohexadion zu jedem analysierten Zeitpunkt normiert.

Die Standardfehler wurden anhand von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 5 technischen Replikaten kalkuliert.

	0 HAA (%)	6 HAA (%)	24 HAA (%)	48 HAA (%)	72 HAA (%)
0 - 2 cm (± SE)	96,3 (± 0,8)	72,6 (± 2,1)	82,1 (± 2,9)	97,3 (± 0,5)	96,4 (± 0,2)
2 - 4 cm (± SE)	3,1 (± 0,7)	25,8 (± 1,4)	15,5 (± 2,7)	1,8 (± 0,3)	1,7 (± 0,1)
4 - 10 cm (± SE)	0,6 (± 0,2)	1,6 (± 0,8)	2,4 (± 0,3)	0,9 (± 0,2)	1,9 (± 0,1)

Tabelle 24: Details zur Extraktion im gentleMACS™ Dissociator.

Richtung des Mahlwerks	Umdrehungen pro Minute	Dauer (Sekunden)
Rechts	1100	3
Links	1200	1
Rechts	1600	3
Links	1300	1
Rechts	1900	3
Links	1500	1
Rechts	2200	4
Links	1900	1
Rechts	2500	4
Links	2300	1
Rechts	3000	4
Links	2800	1
Rechts	3000	3
Rechts	4000	15

Tabelle 25: Details zur Analyse von Prohexadion und den STLs am ACQUITY UPLC System.

Zeit (Min)	Fluß (mL / min)	%A	%B
Beginn	0,84	80	20
0,15	0,84	80	20
0,57	0,84	1	99
0,91	0,84	1	99
0,93	0,84	80	20
2,20	0,84	80	20

Tabelle 26: Validierung SWE als Keimungsinduktor.

Die Versuchsreihe wurde in 1 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.

	0 % (v/v)	1 % (v/v)	2 % (v/v)	3 % (v/v)	4 % (v/v)	5 % (v/v)
Minimum	0,0	10,7	3,7	15,6	31,6	40,0
1. Quartil	0,0	18,4	22,5	37,0	41,7	46,4
Median	0,0	21,5	31,4	40,0	45,1	51,6
3. Quartil	3,4	26,5	37,0	40,4	57,1	63,1
Maximum	7,7	32,0	40,7	41,7	59,1	67,9
Q1 - Minimum	0,0	7,7	18,7	21,3	10,2	6,4
Q1	0,0	18,4	22,5	37,0	41,7	46,4
Median-Q1	0,0	3,1	9,0	3,0	3,4	5,2
Q3-Median	3,4	5,0	5,6	0,4	12,0	11,5
Maximum-Q3	4,3	5,5	3,7	1,3	1,9	4,7

Tabelle 27: Validierung rac-GR24 als Keimungsinduktor.

Die Versuchsreihe wurde in 1 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.

	5 % (v/v) SWE	0,01 µM GR24	0,1 µM GR24	1 µM GR24	10 µM GR24	100 µM GR24
Minimum	48,1	4,8	4,2	17,4	46,2	0,0
1. Quartil	59,9	14,4	5,8	21,3	51,8	0,0
Median	69,4	21,5	9,8	27,1	56,1	0,0
3. Quartil	75,2	29,0	18,2	32,0	60,5	0,0
Maximum	83,3	52,9	31,8	44,0	95,2	0,0
Q1 - Minimum	11,7	9,7	1,6	3,9	5,6	0,0
Q1	59,9	14,4	5,8	21,3	51,8	0,0
Median-Q1	9,6	7,1	4,0	5,8	4,3	0,0
Q3-Median	5,7	7,4	8,4	5,0	4,4	0,0
Maximum-Q3	8,1	24,0	13,6	12,0	34,7	0,0

Tabelle 28: Inhibitionsanalyse der O. cumana Keimung (SWE induziert) durch Prohexadion.

Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.

	0 µM (%)	50 µM (%)	75 µM (%)	100 µM (%)	125 µM (%)	150 µM (%)
Minimum	0,0	-15,7	-2	49,4	86,1	98,3
1. Quartil	0,0	-6,7	25,4	59,0	92,1	99,2
Median	0,0	2,3	52,7	68,6	98,1	100
3. Quartil	0,0	5,8	56,4	84,3	99,1	100
Maximum	0,00	9,2	60,0	100	100	100
Q1 - Minimum	0,0	9,0	27,4	9,6	6,0	0,8
Q1	0,0	-6,7	25,4	59	92,1	99,2
Median-Q1	0,0	9,0	27,4	9,6	6,0	0,8
Q3-Median	0,0	3,4	3,6	15,7	1,0	0,0
Maximum-Q3	0,0	3,4	3,6	15,7	1,0	0,0

*Tabelle 29: Inhibitionsanalyse der O. cumana Keimung (rac-GR24 induziert) durch Prohexadion.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.*

	10 µM rac-GR24 (%)	25 µM (%)	50 µM (%)	75 µM (%)	100 µM (%)	150 µM (%)
Minimum	0,0	-2,4	-4,3	52,7	93,5	98,1
1. Quartil	0,0	-2,4	-3,2	55,0	94,7	98,2
Median	0,0	-2,3	-2,1	57,3	95,8	98,2
3. Quartil	0,0	-2,2	-1,5	66,4	96,3	98,8
Maximum	0,0	-2,1	-0,9	75,5	96,7	99,3
Q1 - Minimum	0,0	0,0	1,1	2,3	1,1	0,0
Q1	0,0	-2,4	-3,2	55,0	94,7	98,2
Median-Q1	0,0	0,0	1,1	2,3	1,1	0,0
Q3-Median	0,0	0,1	0,6	9,1	0,5	0,6
Maximum-Q3	0,0	0,1	0,6	9,1	0,5	0,6

*Tabelle 30: Inhibitionseffizienz der O. cumana Keimung (SWE induziert) durch Prohexadion.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 8 technischen Replikaten durchgeführt.*

	1. Evaluation	SE	2. Evaluation	SE
0 µM Prohexadion (-/+)	0,0	0,0	47,2	3,5
0 µM Prohexadion (+/+)	42,3	2,3	46,7	1,0
100 µM Prohexadion (+/+)	14,9	3,9	16,8	5,7
200 µM Prohexadion (+/+)	2,3	0,7	4,1	1,4

*Tabelle 31: Costunolid als Keimungsinduktor von O. cumana.
Die Versuchsreihe wurde in 1 biologischen Replikaten mit 8 technischen Replikaten durchgeführt.*

	5 % (v/v) SWE	10 µM GR24	0,1 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Minimum	19,4	16,7	0,0	33,3	29,7	38,7
1. Quartil	29,4	29,8	0,0	38,0	37,1	51,4
Median	43,3	36,9	7,3	41,7	44,7	58,1
3. Quartil	46,2	43,1	11,5	45,4	56,4	62,8
Maximum	55,9	55,6	21,4	51,7	75,0	65,6
Q1 - Minimum	10,1	13,2	0,0	4,7	7,4	12,7
Q1	29,4	29,8	0,0	38,0	37,1	51,4
Median-Q1	13,9	7,1	7,3	3,7	7,6	6,7
Q3-Median	2,9	6,2	4,1	3,7	11,7	4,7
Maximum-Q3	9,6	12,5	10,0	6,3	18,6	2,8

Tabelle 32: Dehydrocostos lactone als Keimungsinduktor von O. cumana..

Die Versuchsreihe wurde in 1 biologischen Replikat mit 8 technischen Replikaten durchgeführt.

	5 % (v/v) SWE	10 µM GR24	0,1 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Minimum	30,2	22,2	4,8	36,4	41,7	52,6
1. Quartil	41,9	36,3	8,3	43,6	54,6	58,2
Median	47,9	39,7	14,8	49,9	57,1	62,5
3. Quartil	51,0	40,2	19,6	56,3	58,1	66,0
Maximum	59,4	44,0	26,9	64,3	75,0	70,0
Q1 - Minimum	11,7	14,0	3,6	7,3	12,9	5,6
Q1	41,9	36,3	8,3	43,6	54,6	58,2
Median-Q1	5,9	3,4	6,4	6,3	2,5	4,3
Q3-Median	3,1	0,5	4,9	6,4	1,0	3,5
Maximum-Q3	8,4	3,8	7,3	8,0	16,9	4,0

Tabelle 33: Costunolid Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.

Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
1. Quartil	0,9	1,9	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	11,8	0,0
Median	1,7	3,8	0,0	0,0	0,7	0,0	0,2	0,0	23,5	0,0
3. Quartil	107,8	5,2	6,0	5,1	23,8	0,0	6,6	7,0	27,5	9,5
Maximum	213,9	6,7	12,1	10,2	46,8	0,0	12,9	14,0	31,6	19,0
Q1 - Minimum	0,9	1,9	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	11,7	0,0
Q1	0,9	1,9	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	11,8	0,0
Median-Q1	0,9	1,9	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	11,7	0,0
Q3-Median	106,1	1,5	6,0	5,1	23,0	0,0	6,3	7,0	4,1	9,5
Maximum-Q3	106,1	1,5	6,0	5,1	23,0	0,0	6,3	7,0	4,1	9,5

Tabelle 34: Costunolid Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.

Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,0	0,2	0,0	1,5	0,5	0,8	0,0	0,0	0,0
1. Quartil	4,5	0,0	3,7	1,9	4,1	0,5	2,7	0,9	6,6	0,8
Median	9,0	0,0	7,2	3,8	6,8	0,6	4,6	1,7	13,2	1,7
3. Quartil	30,4	4,2	8,9	4,2	21,8	4,8	11,4	3,9	19,9	20,9
Maximum	51,7	8,4	10,6	4,6	36,9	9,1	18,2	6,2	26,6	40,1
Q1 - Minimum	4,5	0,0	3,5	1,9	2,7	0,1	1,9	0,9	6,6	0,8
Q1	4,5	0,0	3,7	1,9	4,1	0,5	2,7	0,9	6,6	0,8
Median-Q1	4,5	0,0	3,5	1,9	2,7	0,1	1,9	0,9	6,6	0,8
Q3-Median	21,3	4,2	1,7	0,4	15,0	4,2	6,8	2,2	6,7	19,2
Maximum-Q3	21,3	4,2	1,7	0,4	15,0	4,2	6,8	2,2	6,7	19,2

*Tabelle 35: Dehydrocostus lactone Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.*

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
1. Quartil	7,6	1,4	7,0	15,6	0,9	0,2	0,0	0,0	7,2	0,0
Median	15,1	2,8	12,5	31,3	1,7	0,4	0,0	0,0	12,3	0,0
3. Quartil	20,5	12,9	13,4	32,8	81,1	11,6	5,4	0,8	23,8	12,5
Maximum	25,9	23,0	14,3	34,4	160,5	22,8	10,8	1,6	35,3	25,0
Q1 - Minimum	7,6	1,4	5,5	15,6	0,9	0,2	0,0	0,0	5,0	0,0
Q1	7,6	1,4	7,0	15,6	0,9	0,2	0,0	0,0	7,2	0,0
Median-Q1	7,6	1,4	5,5	15,6	0,9	0,2	0,0	0,0	5,0	0,0
Q3-Median	5,4	10,1	0,9	1,6	79,4	11,2	5,4	0,8	11,5	12,5
Maximum-Q3	5,4	10,1	0,9	1,6	79,4	11,2	5,4	0,8	11,5	12,5

*Tabelle 36: Dehydrocostus lactone Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.*

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1. Quartil	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Median	0,5	0,4	0,4	0,3	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
3. Quartil	1,2	0,9	0,7	0,4	1,4	0,3	1,8	1,1	0,2	3,2
Maximum	1,9	1,5	0,9	0,6	2,2	0,7	3,5	2,2	0,3	5,8
Q1 - Minimum	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Q1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Median-Q1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
Q3-Median	0,7	0,5	0,2	0,2	0,8	0,3	1,8	1,1	0,1	2,6
Maximum-Q3	0,7	0,5	0,2	0,2	0,8	0,3	1,8	1,1	0,1	2,6

*Tabelle 37: Tomentosin Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.*

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1. Quartil	0,0	33,8	0,0	1,6	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
Median	0,0	67,6	0,0	3,3	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
3. Quartil	0,0	89,6	86,6	8,7	26,2	1,1	9,0	0,0	0,5	13,0
Maximum	0,0	111,6	173,3	14,1	52,4	2,1	16,8	0,0	1,0	26,0

Q1 - Minimum	0,0	33,8	0,0	1,6	0,0	0,0	0,6	0,0	2,5	0,0
Q1	0,0	33,8	0,0	1,6	0,0	0,0	0,6	0,0	22,9	0,0
Median-Q1	0,0	33,8	0,0	1,6	0,0	0,0	0,6	0,0	2,5	0,0
Q3-Median	0,0	22,0	86,6	5,4	26,2	1,0	7,8	0,0	2,5	13,0
Maximum-Q3	0,0	22,0	86,6	5,4	26,2	1,0	7,8	0,0	2,5	13,0

*Tabelle 38: Tomentosin Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.
Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit 5 technischen Replikaten durchgeführt.*

	0 HAA (ng)		6 HAA (ng)		24 HAA (ng)		48 HAA (ng)		72 HAA (ng)	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
Minimum	0,0	0,1	11,7	0,9	1,4	15,2	24,1	5,3	13,6	5,0
1. Quartil	3,1	26,1	12,2	5,7	27,4	17,6	31,3	10,8	32,4	17,5
Median	6,3	52,2	12,6	10,5	53,3	20,1	38,5	16,2	51,3	29,9
3. Quartil	10,3	70,5	18,5	12,1	191,8	22,0	45,0	30,8	208,9	116,4
Maximum	14,4	88,8	24,4	13,7	330,2	23,8	51,5	45,3	366,5	202,8
Q1 - Minimum	3,1	26,0	0,4	4,8	25,9	2,5	7,2	5,4	18,9	12,5
Q1	3,1	26,1	12,2	5,7	27,4	17,6	31,3	10,8	32,4	17,5
Median-Q1	3,1	26,0	0,4	4,8	25,9	2,5	7,2	5,4	18,9	12,5
Q3-Median	4,1	18,3	5,9	1,6	138,5	1,8	6,5	14,5	157,6	86,4
Maximum-Q3	4,1	18,3	5,9	1,6	138,5	1,8	6,5	14,5	157,6	86,4

Tabelle 39: Entstandene Fragmente durch Elektrospray Ionisierung mittels TRIPLE QUAD API 5500.

STL	Fragment	Retentionszeit
	93.000	0,74
8-Epixonthatin (247.000 Da)	201.000	0,74
	211.000	0,74
Dehydrocostus lacton (231.000 Da)	115.000	0,78
	157.000	0,78
	195.000	0,78
Tomentosin (249.000 Da)	145.000	0,67
	185.000	0,67
Costunolid (233.000 Da)	91.000	0,77
	115.000	0,77
	131.000	0,77

Tabelle 40: Prozentuale Hemmung der HaF3h durch Prohexadion.

Die Versuchsreihe wurde in 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten durchgeführt.

Prohexadion	Hemmung (%)	Standardfehler (SE)
0 µM	1,13	2,55
0,1 µM	3,45	3,22
1 µM	8,07	6,92
10 µM	19,37	1,63
100 µM	73,52	1,67
1 mM	94,93	0,82

Tabelle 41: Infektionseffekt auf Transkriptmenge ausgelöst durch O. cumana.

Die Versuchsreihe wurde in 2 biologischen Replikaten im Blattgewebe und Wurzelgewebe durchgeführt.

	PR1	SE	PR5	SE	PAL	SE	CERK1	SE	4CL	SE	NPR1	SE	PDF1.2	SE	
Blattgewebe															
0 HAA	1,6	0,4	1,3	0,8	1,8	0,9	1,2	0,8	0,9	0,6	1,5	0,1	0,5	0,4	
24 HAA	0,5	0,0	2,2	1,1	1,9	0,4	2,8	0,3	1,6	0,0	1,9	0,0	2,2	1,0	
Wurzelgewebe															
0 HAA	31,2	29,0	13,6	10,3	1,9	0,1	1,9	0,5	1,8	0,1	1,4	1,4	1,4	0,8	
24 HAA	7,3	2,2	1,7	0,5	1,7	0,0	1,5	0,4	1,1	0,6	1,0	0,4	0,2	0,2	

Tabelle 42: Wirkstoffeffekt auf Transkriptmenge ausgelöst durch Prohexadion-Behandlung.

Die Versuchsreihe wurde in 2 biologischen Replikaten im Blattgewebe und Wurzelgewebe durchgeführt.

	PR1	SE	PR5	SE	PAL	SE	CERK1	SE	4CL	SE	NPR1	SE	PDF1.2	SE	
Blattgewebe															
0 HAA	3,3	2,1	1,1	0,5	1,6	0,4	1,4	0,3	0,8	0,3	1,9	0,5	0,6	0,5	
24 HAA	1,5	0,2	2,7	2,0	1,9	0,4	2,2	0,7	1,4	0,4	2,2	0,0	1,3	0,8	
Wurzelgewebe															
0 HAA	2,8	2,6	1,2	0,9	1,5	0,1	1,9	0,4	1,5	0,4	1,5		1,4	0,4	
24 HAA	0,9	0,3	0,7	0,6	1,9	0,6	1,8	0,2	1,5	0,5	0,9	0,5	0,3	0,0	

Tabelle 43: RNA Konzentrationen für qPCR Studie.

Biolog. Replikat	Ernte-Zeitpunkt [HAA]	Applikation	Gewebe	Infektion	Konzentration [ng / mL]	Gesamt RNA [ng / Ansatz]
	0	Leerformulierung	Blatt	w / o	144	505,5
	6	Leerformulierung	Blatt	w / o	57	501,7
	24	Leerformulierung	Blatt	w / o	156	499,8
	0	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	86	497,9
	6	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	42	415,8
	24	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	109	500,9
	0	Prohexadion	Blatt	w / o	50	500,3
	6	Prohexadion	Blatt	w / o	90	503,2
	24	Prohexadion	Blatt	w / o	145	493,9
	0	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	68	500,0
	6	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	89	498,4
	24	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	99	504,0
	0	Leerformulierung	Blatt	w / o	202	505,6
	6	Leerformulierung	Blatt	w / o	193	500,7
	24	Leerformulierung	Blatt	w / o	175	507,4
	0	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	102	497,8
	6	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	173	501,3
	24	Leerformulierung	Blatt	<i>O. cumana</i>	126	503,7
	0	Prohexadion	Blatt	w / o	171	495,3
	6	Prohexadion	Blatt	w / o	191	497,7
	24	Prohexadion	Blatt	w / o	185	498,6
	0	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	103	504,1
	6	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	104	499,1
	24	Prohexadion	Blatt	<i>O. cumana</i>	145	493,3
	0	Leerformulierung	Wurzel	w / o	19	188,6
	6	Leerformulierung	Wurzel	w / o	33	329,7
	24	Leerformulierung	Wurzel	w / o	27	269,0
	0	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	18	180,5
	6	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	53	498,0
	24	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	109	503,0
	0	Prohexadion	Wurzel	w / o	41	410,3
	6	Prohexadion	Wurzel	w / o	52	501,9
	24	Prohexadion	Wurzel	w / o	37	374,0
	0	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	76	496,5
	6	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	121	495,0
	24	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	87	503,2
	0	Leerformulierung	Wurzel	w / o	18	181,8
	6	Leerformulierung	Wurzel	w / o	40	400,1
	24	Leerformulierung	Wurzel	w / o	22	217,4
	0	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	103	504,8
	6	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	15	153,4
	24	Leerformulierung	Wurzel	<i>O. cumana</i>	42	417,7
	0	Prohexadion	Wurzel	w / o	42	424,9
	6	Prohexadion	Wurzel	w / o	12	120,7
	24	Prohexadion	Wurzel	w / o	32	317,8

0	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	195	507,7
6	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	66	501,0
24	Prohexadion	Wurzel	<i>O. cumana</i>	30	301,5

*Tabelle 44: Zyklus-Programm der qPCR.
Es wurden 45 Zyklen (Schritt 2.- 4.) durchgeführt.*

Schritt	Temperatur	Dauer (MM:SS)
1.	95°C	15:00
2.	95°C	00:10
3.	60°C	00:20
4.	72°C	00:20
5.	95°C	00:10
6.	65°C	00:00
7.	97°C	0,11 °C /S
8.	40°C	unendlich

7 Verzeichnisse der Abbildungen, Tabellen und Abkürzungen

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der parasitischen Lebensweise im Reich der Orobanchacea Familie.....	1
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>O. cumana</i>	3
Abbildung 3: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Prohexadion-Calcium und 2-Oxoglutarsäure.	8
Abbildung 4: Model von Fan & Dong (2002) für den regulatorischen Mechanismus von TGA2 in SAR-assoziierten Gen-Expression.	11
Abbildung 5: HaF3h im pET24-N-His Vektor.	21
Abbildung 6: Proteinlängenstandard.....	23
Abbildung 7: Katalysierte Reaktion der F3h.	39
Abbildung 8: Absorption und Verteilung von Prohexadion in Sonnenblumen.	45
Abbildung 9: Exkretion von Prohexadion aus Sonnenblumenwurzeln.	48
Abbildung 10: Verteilung und Stabilität von Prohexadion in Erde.	49
Abbildung 11: Evaluation der <i>O. cumana</i> Keimraten im Box-Plot.	52
Abbildung 12: Prohexadion-induzierte Inhibition der <i>O. cumana</i> Keimung.	53
Abbildung 13: Prohexadion-Hemmung der <i>O. cumana</i> Keimung induziert durch rac-GR24.....	55
Abbildung 14: Prohexadion induzierte Effizienz der <i>O. cumana</i> Keimungsinhibition.	56
Abbildung 15: Evaluation der <i>O. cumana</i> Keimraten induziert durch STL.....	57
Abbildung 16: Analyse der STL-Konzentration in Sonnenblumenwurzeln nach Prohexadion-Behandlung.....	59
Abbildung 17: Analyse der STL-Konzentration im Sonnenblumen Exsudat nach Prohexadion Behandlung.....	61
Abbildung 18: Hauptkomponenten Analyse der drei biologischen Replikate.	63
Abbildung 19: Übersicht signifikanter Unterschiede in Ontologieklassen.....	65
Abbildung 20: Darstellung signifikant veränderter Metaboliten ($p < 0,05$).	66
Abbildung 21: Sequenzvergleich des F3h Proteins aus unterschiedlichen Spezies.	68

Abbildung 22: Aufreinigung der HaF3h Expression.....	69
Abbildung 23: Differenz im Schmelzpunkt nach Interaktionsanalyse zwischen HaF3h und Prohexadion.....	71
Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Inhibition der HaF3h durch Prohexadion.	72
Abbildung 25: Analyse des Blattgewebes auf eine induzierte Resistenz der Sonnenblume durch Prohexadion.....	74
Abbildung 26: Analyse des Wurzelgewebes auf eine induzierte Resistenz der Sonnenblume durch Prohexadion.....	75
Abbildung 27: Verwendete STL für Keimungsinduktion von <i>O. cumana</i>	84
Abbildung 28: DFR katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydroflavonolen Liu et al., 2017.....	89

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....	15
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	18
Tabelle 3: Verwendete Primer für qPCR Analyse.....	22
Tabelle 4: Liste verwendeter Datenbanken.....	23
Tabelle 5: Liste der verwendeten Software.....	24
Tabelle 6: Versuchsansatzes zur Interaktionsanalyse der HaF3h und Prohexadion.	38
Tabelle 7: Komponentenreihenfolge für in-vitro Aktivitätsnachweis der HaF3h.	40
Tabelle 8: Liste der verwendeten Gene.....	43
Tabelle 9: Kalkulierte Absorption von Prohexadion.	46
Tabelle 10: Evaluierung der <i>O. cumana</i> Rassendeterminierung.....	51

Tabelle 11: IC ₅₀ Bestimmung von Prohexadion gegen <i>O. cumana</i> Keimung induziert mit SWE und rac-GR24.	54
Tabelle 12: Schmelzpunkte der Interaktionsanalyse zwischen der HaF3h und Prohexadion.	70
Tabelle 13: Übersicht halbmaximaler Konzentrationen zur Hemmung der HaF3h durch Prohexadion.....	72
Tabelle 14: Kalkulierter EGI-Faktor für Prohexadion Inhibitionseffizienz gegen die <i>O.cumana</i> Keimung.....	82
Tabelle 15: Vereinfachte Darstellung der Prohexadion und <i>O. cumana</i> induzierten Transkriptregulation.	91
Tabelle 16: Verbleibendes Prohexadion auf der Blattoberfläche normalisiert auf 0 HAA.....	95
Tabelle 17: Photostabilität von Prohexadion auf Glasobjektträgern.	95
Tabelle 18: Menge an Prohexadion in den verschiedenen Pflanzengewebe nach Applikation von 4 µg Prohexadion pro Pflanze nach unterschiedlichen Zeitpunkten.....	95
Tabelle 19: Wiederfindung von Prohexadion in allen Pflanzen und Pflanzengewebe normalisiert auf die Kontrolle (0 HAA).	95
Tabelle 20: Prohexadion Exkretion der Sonnenblumenwurzeln in Erde.....	95
Tabelle 21: Prohexadion Wiederfindung der Exkretionsstudien.	95
Tabelle 22: Wiederfindung von Prohexadion in allen Erdproben normalisiert auf die Kontrollgruppe (0 HAA).	96
Tabelle 23: Prohexadion Verteilung in Erde. Alle Proben wurden auf den Mittelwert der Menge an Prohexadion zu jedem analysierten Zeitpunkt normiert.....	96
Tabelle 24: Details zur Extraktion im gentleMACS™ Dissociator.....	96
Tabelle 25: Details zur Analyse von Prohexadion und den STLs am ACQUITY UPLC System.	96
Tabelle 26: Validierung SWE als Keimungsinduktor.	97
Tabelle 27: Validierung rac-GR24 als Keimungsinduktor.	97
Tabelle 28: Inhibitionsanalyse der <i>O. cumana</i> Keimung (SWE induziert) durch Prohexadion.	97

Tabelle 29: Inhibitionsanalyse der <i>O. cumana</i> Keimung (rac-GR24 induziert) durch Prohexadion.	98
Tabelle 30: Inhibitionseffizienz der <i>O. cumana</i> Keimung (SWE induziert) durch Prohexadion. ...	98
Tabelle 31: Costunolid als Keimungsinduktor von <i>O. cumana</i>	98
Tabelle 32: Dehydrocostus lactone als Keimungsinduktor von <i>O. cumana</i>	99
Tabelle 33: Costunolid Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.	99
Tabelle 34: Costunolid Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.	99
Tabelle 35: Dehydrocostus lactone Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.	100
Tabelle 36: Dehydrocostus lactone Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.....	100
Tabelle 37: Tomentosin Wurzelanalyse nach Prohexadion-Behandlung.	100
Tabelle 38: Tomentosin Exsudatanalyse nach Prohexadion-Behandlung.	101
Tabelle 39: Entstandene Fragmente durch Elektrospray Ionisierung mittels TRIPLE QUAD API 5500.....	101
Tabelle 40: Prozentuale Hemmung der HaF3h durch Prohexadion.	102
Tabelle 41: Infektionseffekt auf Transkriptmenge ausgelöst durch <i>O. cumana</i>	102
Tabelle 42: Wirkstoffeffekt auf Transkriptmenge ausgelöst durch Prohexadion-Behandlung. ...	102
Tabelle 43: RNA Konzentrationen für qPCR Studie.	103
Tabelle 44: Zyklus-Programm der qPCR.	104

7.3 Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Coumarate-CoA ligase
ACN	Acetonitril
ARBTH	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CERK1	Chitin elicitor receptor kinase 1

DAT	Days after treatment (Tage nach Behandlung)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGI	efficiency of germination inhibition (Inhibitionseffizienz)
Em	Emission
Ex	Exzitation
F3h	Flavanon-3-Hydroxylase
GLXMA	<i>Glycine max</i>
GR	Geringe Rate (25 g ai / ha)
GVO	Genetisch veränderter Organismus
H ₂ O	Wasser
HAA	Hours after application (Stunden nach Applikation)
HCOOH	Ameisensäure
HELAN	<i>Helianthus annuus</i>
HR	Hohe Rate (100 g ai / ha)
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
Hz	Hertz
LF	Leerformulierung (100 g ai / ha)
LYPES	<i>Solanum lycopersicum</i>

LYUCN	<i>Lycium chinense</i>
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
NaOCl	Natriumhypochlorit
NIOTA	<i>Nicotiana tabacum</i>
NPR1	nonexpresser of PR genes
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PDF	Plant Defensin
PHDC	Prohexadion-Calcium
PR	Pathogenesis-related
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SA	Salicylsäure
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SWE	Sonnenblumenwurzelextrakt
upm	Umdrehungen pro Minute

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken die mir in der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Eine genauere Auflistung dieser tollen Menschen ist aufgrund des Datenschutzes hier nicht möglich. Aber ich denke es fühlen sich die richtigen Leute angesprochen.

Vielen Dank für eine wunderbare Zeit.

9 Literaturverzeichnis

- AEMET. (2020). *State Meterological Agency - Spanish Government*.
<http://www.aemet.es/en/portada>
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827.
<https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Álvarez-Calero, J. M., Ruiz, E., López-Pérez, J. L., Jaraíz, M., Rubio, J. E., Jorge, Z. D., Suárez, M., & Massanet, G. M. (2018). 15-Hydroxygermacranolides as Sources of Structural Diversity: Synthesis of Sesquiterpene Lactones by Cyclization and Rearrangement Reactions. Experimental and DFT Study. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(10), 5480–5495. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00407>
- Aly, R., Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Golan, S., & Kleifeld, Y. (2009). Broomrape (*Orobanche cumana*) Control in Sunflower (*Helianthus annuus*) with Imazapic. *Weed Technol.*, 15, 306–309. [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2001\)015\[0306:BOCCIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2001)015[0306:BOCCIS]2.0.CO;2)
- Andreu, V., Levert, A., Amiot, A., Cousin, A., Aveline, N., & Bertrand, C. (2018). Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(30), 29971–29982.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1320-z>
- Anil, K., Das, S., & Podile, A. R. (2013). Induced Defense in Plants: A Short Overview. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, 84. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0279-2>
- Antonova, T. S. (2014). The history of interconnected evolution of *Orobanche cumana* Wallr. and sunflower in the Russian federation and Kazakhstan. *Helia*, 37(61), 215–225.
<https://doi.org/10.1515/helia-2014-0017>
- Awad, A. A., Sato, D., Kusumoto, D., Kamioka, H., Takeuchi, Y., & Yoneyama, K. (2006). Characterization of Strigolactones, Germination Stimulants for the Root Parasitic Plants *Striga* and *Orobanche*, Produced by Maize, Millet and Sorghum. *Plant Growth Regul.*, 48(3), 221. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0009-3>
- BASF. (2020). *Regalis® Label*. BASF.
https://www.agro.basf.co.za/Documents/products_files/ander_files/regalisENG.pdf

- Batista, A. N. L., Batista Jr, J. M., Souza-Moreira, T. M., Valentini, S. R., Kato, M. J., Zanelli, C. F., & Furlan, M. (2018). Biosynthetic insights into *p*-hydroxybenzoic acid-derived benzopyrans in *Piper gaudichaudianum*. *J. Braz. Chem. Soc.*, *29*(5), 1105–1114.
- Beam, J. B., & Askew, S. D. (2007). Fate of Prohexadione Calcium in Annual Bluegrass (*Poa annua*) and Three Turfgrasses. *Weed Sci.*, *55*, 541–545.
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell*, *33*(1), 1–13. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013)
- Bennett, J. R., & Mathews, S. (2006). Phylogeny of the parasitic plant family *Orobanchaceae* inferred from phytochrome A. *Am. J. Bot.*, *93*(7), 1039–1051. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.7.1039>
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., Séjalon-Delmas, N., Becard, G., Jauneau, A., Roux, C., & Sejalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiol.*, *148*(1), 402–413. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121400>
- Bizjak, J., Weber, N., Mikulic-Petkovsek, M., Alam, Z., Thill, J., Stich, K., Halbwirth, H., & Veberic, R. (2013). Polyphenol gene expression and changes in anthocyanins and polyphenols in the skin of 'Braeburn' apples after the autumn application of prohexadione-calcium. *Plant Growth Regul.*, *71*(3), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9823-6>
- Blanc, R. S., & Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular Cell*, *65*(1), 8–24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003)
- Boydston, R. A., & Slife, F. W. (1986). Alteration of Atrazine Uptake and Metabolism by Tridiphane in Giant Foxtail (*Setaria faberi*) and Corn (*Zea mays*). *Weed Sci.*, *34*(6), 850–858. [https://doi.org/DOI: 10.1017/S0043174500067990](https://doi.org/DOI:10.1017/S0043174500067990)
- Britsch, L., Dedio, J., Saedler, H., & Forkmann, G. (1993). Molecular characterization of flayanone 3 β -hydroxylases: Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *Eur. J. Biochem.*, *217*(2), 745–754. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18301.x>
- Brown, R. G. S., Kawaide, H., Yang, Y. Y., Rademacher, W., & Kamiya, Y. (1997). Daminozide and prohexadione have similar modes of action as inhibitors of the late stages of gibberellin

- metabolism. *Physiol. Plant.*, 101(2), 309–313. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010208.x>
- Castejon-Munoz, M., Romero-Munoz, F., & Garcia-Torres, L. (1993). Effect of planting date on broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Weed Res.*, 33(2), 171–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1993.tb01930.x>
- Chang, M., & Lynn, D. G. (1986). The haustorium and the Chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.*, 12(2), 561–579. <https://doi.org/10.1007/bf01020572>
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J., & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.*, 7(5), 210–216. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02244-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02244-6)
- Costa, G., Andreotti, C., Bucchini, F., Sabatini, E., Bazzi, C., Malaguti, S., & Rademacher, W. (2001). Prohexadione-Ca (Apogee®): Growth Regulation and Reduced Fire Blight Incidence in Pear. *HortScience*, 36(5), 931–933. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.5.931>
- Cumming, G., Fidler, F., & Vaux, D. L. (2007). Error bars in experimental biology. *J. Cell Biol.*, 177(1), 7–11. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611141>
- Davies, F. J., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N., & Saraiva Grossi, J. A. (2001). Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Plant Physiol.*, 158(6), 777–786. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00311>
- Delavault, P., Montiel, G., Brun, G., Pouvreau, J. B., Thoiron, S., & Simier, P. (2017). Communication Between Host Plants and Parasitic Plants. In G. Becard (Ed.), *Adv. Bot. Res.* (Vol. 82, pp. 55–82). Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.10.006>
- Delavault, P., & Thalouarn, P. (2002). The obligate root parasite *Orobanche cumana* exhibits several *rbcL* sequences. *Gene*, 297(1–2), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00868-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00868-5)
- Deng, F., & Hatzios, K. K. (2002). Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 74(2), 102–115. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00151-7](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00151-7)
- Dimitrijevic, A., & Horn, R. (2018). Sunflower Hybrid Breeding: From Markers to Genomic

- Selection. *Front Plant Sci.*, 8, 2238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02238>
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Duca, M., Glijin, A., & Acciu, A. (2013). The biological cycle of sunflower broomrape. *Journal of Plant Development*, 20, 71–78. [http://www.botanica.uaic.ro/docs/Journal of Plant Development2013.pdf](http://www.botanica.uaic.ro/docs/Journal_of_Plant_Development2013.pdf)
- Duriez, P., Vautrin, S., Auriac, M. C., Bazerque, J., Boniface, M. C., Callot, C., Carrère, S., Cauet, S., Chabaud, M., Gentou, F., Lopez-Sendon, M., Paris, C., Pegot-Espagnet, P., Rousseaux, J. C., Pérez-Vich, B., Velasco, L., Bergès, H., Piquemal, J., & Muños, S. (2019). A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana*. *Nature Plants*, 5(12), 1211–1215. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0556-z>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. In *Annu. Rev. Phytopathol.* (Vol. 42, pp. 185–209). <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Fan, & Dong, X. (2002). In Vivo Interaction between NPR1 and Transcription Factor TGA2 Leads to Salicylic Acid–Mediated Gene Activation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(6), 1377 LP – 1389. <https://doi.org/10.1105/tpc.001628>
- Fan, Z.-W., Buschmann, H., & Sauerborn, J. (2007). Prohexadione-calcium induces sunflower (*Helianthus annuus*) resistance against the root parasitic weed *Orobanche cumana*. *Weed Res.*, 47(1), 34–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2007.00536.x>
- Fernández-Martínez, J. M., Pérez-Vich, B., & Velasco, L. (2015). Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). In E. Martínez-Force, N. T. Dunford, & J. J. B. T.-S. Salas (Eds.), *Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 129–155). AOCS Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50011-8>
- Frey, M., Klaiber, I., Conrad, J., & Spring, O. (2020). CYP71BL9, the missing link in costunolide synthesis of sunflower. *Phytochemistry*, 177, 112430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112430>
- García-Torres, L., López-Granados, F., & Castejón-Munoz, M. (1994). Pre-emergence herbicides for the control of broomrape (*Orobanche cernua* Loeﬂ.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Weed Res.*, 34(6), 395–402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1994.tb02035.x>

- Gaultier, J., Farenhorst, A., Cathcart, J., & Goddard, T. (2008). Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content. *Soil Biol. Biochem.*, 40(1), 217–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.003>
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., ... Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 5(10).
- Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Golan, S., & Kleifeld, Y. (2003). Control of *Orobanche crenata* and *Orobanche aegyptiaca* in parsley. *Crop Prot.*, 22(2), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00152-7)
- Goldwasser, Y., Hershenhorn, J., Plakhine, D., Kleifeld, Y., & Rubin, B. (1999). Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 54(3), 87–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0191>
- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., Martínez-Díaz, R., Zuñiga, G. E., Contreras, R. A., Cabrera, R., & Burillo, J. (2012). Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Ind. Crops Prod.*, 37(1), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.025>
- Göpfert, J. C., MacNevin, G., Ro, D.-K., & Spring, O. (2009). Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitate glandular trichomes. *BMC Plant Biol.*, 9(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-86>
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, 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. *The Plant Cell*, 8(4), 629 LP – 643. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.629>
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9(4), 414–420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.013>
- Griggs, D. L., Hedden, P., Temple-Smith, K. E., & Rademacher, W. (1991). Inhibition of gibberellin 2 β -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry*, 30(8), 2513–2517. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85091-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85091-D)

- Grossmann, K., Niggeweg, R., Christiansen, N., Looser, R., & Ehrhardt, T. (2010). The herbicide saflufenacil (Kixor™) is a new inhibitor of protoporphyrinogen IX oxidase activity. *Weed Sci.*, 58(1), 1–9. <https://doi.org/10.1614/WS-D-09-00004.1>
- Halbwirth, H., Fischer, T. C., Schlangen, K., Rademacher, W., Schleifer, K.-J., Forkmann, G., & Stich, K. (2006). Screening for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: Flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase. *Plant Science*, 171(2), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.014>
- Heap, I. (1993). *The International Herbicide-Resistant Weed Database*. <http://www.weedscience.org>
- HRAC. (2021). *HRAC Website - HRAC Mode of Action Classification 2020 Map*. <https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2020-map%0A>
- Hu, J., Yang, H., Mu, J., Lu, T., Peng, J., Deng, X., Kong, Z., Bao, S., Cao, X., & Zuo, J. (2017). Nitric Oxide Regulates Protein Methylation during Stress Responses in Plants. *Molecular Cell*, 67(4), 702-710.e4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.031>
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.-H., Yu, J.-Q., & Chen, Z. (2010). Functional Analysis of the Arabidopsis *PAL* Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress. *Plant Physiol.*, 153(4), 1526 LP – 1538. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157370>
- Ikezawa, N., Göpfert, J. C., Nguyen, D. T., Kim, S.-U., O'Maille, P. E., Spring, O., & Ro, D.-K. (2011). Lettuce costunolide synthase (*CYP71BL2*) and its homolog (*CYP71BL1*) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21601–21611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216804>
- Joel, D. M., Chaudhuri, S. K., Plakhine, D., Ziadna, H., & Steffens, J. C. (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobancha cumana*. *Phytochemistry*, 72(7), 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.037>
- Joel, D. M., & Losner-Goshen, D. (1994). The attachment organ of the parasitic angiosperm *Orobancha cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Can. J. Bot.*, 72(5), 564–574.
- Kazmin, D., Edwards, R. A., Turner, R. J., Larson, E., & Starkey, J. (2002). Visualization of proteins

- in acrylamide gels using ultraviolet illumination. *Anal Biochem*, 301(1), 91–96. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5488>
- Keyes, W. J., Taylor, J. V., Apkarian, R. P., & Lynn, D. G. (2001). Dancing Together. Social Controls in Parasitic Plant Development. *Plant Physiol.*, 127(4), 1508–1512. <https://doi.org/10.1104/PP.010753>
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., & Miller, T. D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1078–1082.
- Kohler, A., Schwindling, S., & Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128(3), 1046–1056. <https://doi.org/10.1104/pp.010744>
- Kretzschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J. B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H. J., & Martinoia, E. (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483(7389), 341–344. <https://doi.org/10.1038/nature10873>
- Kreuz, K., & Fonné-Pfister, R. (1992). Herbicide-insecticide interaction in maize: Malathion inhibits cytochrome P450-dependent primisulfuron metabolism. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 43(3), 232–240. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575\(92\)90036-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575(92)90036-Y)
- Kroschel, J. (2001). *A technical manual for parasitic weed research and extension*. (J. Kroschel (ed.); 1st ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0005-5>
- Krupp, A., Heller, A., & Spring, O. (2019). Development of phloem connection between the parasitic plant *Orobancha cumana* and its host sunflower. *Protoplasma*, 256(5), 1385–1397. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01393-z>
- Krupp, A., Rücker, E., Heller, A., & Spring, O. (2015). Seed Structure Characteristics of *Orobancha cumana* Populations. *Helia*, 38(62), 1–14. <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0034>
- Kuč, J. (1982). Induced Immunity to Plant Disease. *BioScience*, 32(11), 854–860. <https://doi.org/10.2307/1309008>
- Kucera, B., Cohn, M. A., & Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed

- dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.*, 15(4), 281–307.
<https://doi.org/10.1079/SSR2005218>
- Kuijt, J. (1970). The Biology of Parasitic Flowering Plants. *Science*, 168(3935), 1081–1082.
<https://doi.org/10.1126/science.168.3935.1081>
- Layton, C. J., & Hellinga, H. W. (2010). Thermodynamic analysis of ligand-induced changes in protein thermal unfolding applied to high-throughput determination of ligand affinities with extrinsic fluorescent dyes. *Biochemistry*, 49(51), 10831–10841.
<https://doi.org/10.1021/bi101414z>
- Lerner, F., Pfenning, M., Picard, L., Lerchl, J., & Hollenbach, E. (2020). Prohexadione calcium is herbicidal to the sunflower root parasite *Orobanche cumana*. *Pest Manage. Sci.*, 77(4), 1893–1902. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.6216>
- Lins, R. D., Colquhoun, J. B., Cole, C. M., & Mallory-Smith, C. A. (2005). Postemergence small broomrape (*Orobanche minor*) control in red clover. *Weed Technol.*, 19(2), 411–415.
<https://doi.org/10.1614/WT-04-175R1>
- Liu, Lu, F., Cui, X., & Cao, X. (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61(1), 395–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091939>
- Liu, Q., Beyraghdar Kashkooli, A., Manzano, D., Pateraki, I., Richard, L., Kolkman, P., Lucas, M. F., Guallar, V., de Vos, R. C. H., Franssen, M. C. R., van der Krol, A., & Bouwmeester, H. (2018). Kauniolide synthase is a P450 with unusual hydroxylation and cyclization-elimination activity. *Nat. Commun.*, 9(1), 4657. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06565-8>
- Liu, Xiang, M., Fan, Y., Yang, C., Zeng, L., Zhang, Q., Chen, M., & Liao, Z. (2017). A Root-Preferential DFR-Like Gene Encoding Dihydrokaempferol Reductase Involved in Anthocyanin Biosynthesis of Purple-Fleshed Sweet Potato. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8, p. 279).
- Louarn, J., Boniface, M. C., Pouilly, N., Velasco, L., Pérez-Vich, B., Vincourt, P., & Muñoz, S. (2016). Sunflower resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) is controlled by specific qtls for different parasitism stages. *Frontiers in Plant Science*, 7(590), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00590>
- Ma, Y., Jia, J., An, Y., Wang, Z., & Mao, J. (2013). Potential of Some Hybrid Maize Lines to Induce Germination of Sunflower Broomrape. *Crop Sci.*, 53, 260.

<https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0197>

- Maguire, W. J., Call, C. W., Cerbu, C., Jambor, K. L., & Benavides-Montes, V. E. (2019). Comprehensive Determination of Unregulated Pesticide Residues in Oregon *Cannabis* Flower by Liquid Chromatography Paired with Triple Quadrupole Mass Spectrometry and Gas Chromatography Paired with Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 67(46), 12670–12674. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01559>
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*, 26(4), 403–410. <https://doi.org/10.1038/82521>
- Masi, M., Fernández-Aparicio, M., Zatout, R., Boari, A., Cimmino, A., & Evidente, A. (2019). Inuloxin E, a New Seco-Eudesmanolide Isolated from *Dittrichia viscosa*, Stimulating *Orobanche cumana* Seed Germination. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(19), 3479. <https://doi.org/10.3390/molecules24193479>
- Matringe, M., Camadro, J. M., Labbe, P., & Scalla, R. (1989). Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.*, 260(1), 231–235. <https://doi.org/10.1042/bj2600231>
- Mitkov, A., Yanev, M., Neshev, N., Tonev, T., Joița-Păcureanu, M., & Cojocaru, F. (2019). Efficacy against broomrape and selectivity of imazamox-containing herbicides in sunflower. *Romanian Agricultural Research*, 2019(36), 1–7.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., & Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(49), 19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
- Molinari, S., Fanelli, E., & Leonetti, P. (2014). Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant Pathol.*, 15(3), 255–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12085>
- Molinero-Ruiz, L., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Pacureanu-Joita, M., Bulos, M., Altieri, E., & Domínguez, J. (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(4), 1–19. <https://doi.org/10.5424/sjar/2015134-8080>

- Nakayama, I., Kamiya, Y., Kobayashi, M., Abe, H., & Sakurai, A. (1990). Effects of a plant-growth regulator, prohexadione, on the biosynthesis of gibberellins in cell-free systems derived from immature seeds. *Plant Cell Physiol.*, 31(8), 1183–1190.
- Nawrath, C., & Métraux, J. P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell*, 11(8), 1393–1404. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1393>
- Nguyen, D. T., Göpfert, J. C., Ikezawa, N., Macnevin, G., Kathiresan, M., Conrad, J., Spring, O., & Ro, D.-K. (2010). Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in asteraceae. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16588–16598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111757>
- Niemetz, R., & Gross, G. G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, 66(17), 2001–2011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.009>
- Paik, W. K., Paik, D. C., & Kim, S. (2007). Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem. Sci.*, 32(3), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.01.006>
- Parker, C. (2009). Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag Sci*, 65(5), 453–459. <https://doi.org/10.1002/ps.1713>
- Pena, L. B., Pasquini, L. A., Tomaro, M. L., & Gallego, S. M. (2006). Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science*, 171(4), 531–537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.06.003>
- Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. P., Manners, J. M., & Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell*, 8(12), 2309–2323. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.12.2309>
- Pérez-de-Luque, A., Jorrín, J. V., & Rubiales, D. (2004). Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica*, 32(1), 21. <https://doi.org/10.1007/BF02980855>
- Pérez-Vich, B., Akhtouch, B., Knapp, S. J., Leon, A. J., Velasco, L., Fernández-Martínez, J. M., & Berry, S. T. (2004). Quantitative trait loci for broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 109(1), 92–102.

<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1599-7>

Peters, D. J., & Constabel, C. P. (2002). Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *The Plant Journal*, 32(5), 701–712. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01458.x>

Pfenning, M., & Bremer, H. (2013). *Method of controlling parasitic weeds with mixtures comprising herbicidal acetolactate synthase inhibitors and plant growth regulators*. <https://patents.google.com/patent/WO2013037735A1/en?q=WO+2013%2F037735>

Pfenning, M., Palfay, G., & Guillet, T. (2008). The CLEARFIELD® technology - A new broad-spectrum post-emergence weed control system for European sunflower growers. *J. Plant Dis. Prot.*, 21(21), 649–653.

Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., & Van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57(3), 123–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0291>

Pineda-Martos, R., Pujadas-Salvà, A. J., Fernández-Martínez, J. M., Stoyanov, K., Velasco, L., & Pérez-Vich, B. (2014). The genetic structure of wild *Orobanche cumana* Wallr. (*Orobanchaceae*) populations in eastern Bulgaria reflects introgressions from weedy populations. *Sci. World J.*, 2014, 150432. <https://doi.org/10.1155/2014/150432>

Pineda-Martos, R., Velasco, L., Fernández-Escobar, J., Fernández-Martínez, J. M., & Pérez-Vich, B. (2013). Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers. *Weed Res.*, 53(4), 279–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/wre.12022>

Poulin, R., & Morand, S. (2000). The Diversity of Parasites. *The Quarterly Review of Biology*, 75(3), 277–293.

Pouvreau, J. B., Gaudin, Z., Auger, B., Lechat, M. M., Gauthier, M., Delavault, P., & Simier, P. (2013). A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-32>

proplanta. (2021a). *Agrarwetter Rheinland-Pfalz - Rückblick*. <https://www.proplanta.de/agrarwetter/rheinland-pfalz/rueckblick/05-03-2019/>

- proplanta. (2021b). *Aussaat von Sonnenblumen*.
https://www.proplanta.de/Sonnenblume/Sonnenblumenaussaat_Pflanze1149008468.html
- Pustovoi, V. S. (1966). *Selection, seed culture and some agrotechnical problems of sunflower*. (transl. from the Russian in 1976).
- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *51*, 501–531.
- Rademacher, W. (2014). Prohexadione-Ca and Trinexapac-Ethyl: Similarities in Structure but Differences in Biological Action. *Acta Hortic.*, *1042*, 33–41.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1042.3>
- Rademacher, W. (2015). Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *J. Plant Growth Regul.*, *34*(4), 845–872. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9541-6>
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J.-S., Nicolas, P., & Bouzidi, M. (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J. Exp. Bot.*, *56*, 2683–2693.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri261>
- Rahimi, M., & Bouwmeester, H. (2021). Are sesquiterpene lactones the elusive KARRIKIN-INSENSITIVE2 ligand? *Planta*, *253*(2), 54. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03571-x>
- Rao, R. N., Raju, S., & Babu, K. (2013). HPLC Determination of costunolide as a marker of *Saussurea lappa* and its herbal formulations. *Int. J. Res. Pharm. Chem.*, *3*(1), 99–107.
- Raupp, F. M., & Spring, O. (2013). New Sesquiterpene Lactones from Sunflower Root Exudate as Germination Stimulants for *Orobanche cumana*. *J. Agric. Food Chem.*, *61*(44), 10481–10487. <https://doi.org/10.1021/jf402392e>
- Rispail, N., Dita, M. A., González-Verdejo, C., Pérez-De-Luque, A., Castillejo, M. A., Prats, E., Román, B., Jorrín, J., & Rubiales, D. (2007). Plant resistance to parasitic plants: Molecular approaches to an old foe: Research review. *New Phytologist*, *173*(4), 703–712.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01980.x>
- Roemmelt, S., Treutter, D., Speakman, J. B., & Rademacher, W. (1999). Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. *Acta Hortic.*, *489*, 359–364.

- Roemmelt, S., Zimmermann, N., Rademacher, W., & Treutter, D. (2003). Formation of novel flavonoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry*, 64(3), 709–716. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00389-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00389-3)
- Sala, C., Bulos, M., Echarte, M., Whitt, S., Budziszewski, G., William, Howie, Singh, B., & Weston, B. (2008). Development of CLHA-Plus: a novel herbicide tolerance trait in sunflower conferring superior imidazolinone tolerance and ease of breeding. *17th International Sunflower Conference, Córdoba, Spain (2008)*, 489–494.
- Sasse, J., Simon, S., Gübeli, C., Liu, G.-W., Cheng, X., Friml, J., Bouwmeester, H., Martinoia, E., & Borghi, L. (2015). Asymmetric Localizations of the ABC Transporter PaPDR1 Trace Paths of Directional Strigolactone Transport. *Current Biology*, 25(5), 647–655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.015>
- Sauerborn, J., Buschmann, H., Ghiasi, K. G., & Kogel, K.-H. (2002). Benzothiadiazole Activates Resistance in Sunflower (*Helianthus annuus*) to the Root-Parasitic Weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology*, 92(1), 59–64. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.59>
- Seber, G. A. F., & Wild, C. J. (1989). Multiresponse Nonlinear Models. In *Nonlinear Regression* (pp. 529–562). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471725315.ch11>
- Sestacova, T., Gisca, I., Cucereavii, A., Port, A., & Duca, M. (2016). Expression of defence-related genes in sunflower infected with broomrape. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 30(4), 685–691. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1179591>
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E. J., Midland, S. L., Sims, J. J., & Keen, N. T. (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.*, 116(1), 231–238. <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.231>
- Song, X., Diao, J., Ji, J., Wang, G., Guan, C., Jin, C., & Wang, Y. (2016). Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco. *Plant Physiol. Biochem.*, 98, 89–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.011>
- Spring, O., Schmauder, K., Lackus, N. D., Schreiner, J., Meier, C., Wellhausen, J., Smith, L. V., & Frey, M. (2020). Spatial and developmental synthesis of endogenous sesquiterpene lactones

supports function in growth regulation of sunflower. *Planta*, 252(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03409-y>

Taleb-Continil, S. H., Salvador, M. J., Balanco, J. M. F., Albuquerque, S., & De Oliveira, D. C. R. (2004). Antiprotozoal Effect of Crude Extracts and Flavonoids Isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, 18(3), 250–254. <https://doi.org/10.1002/ptr.1431>

Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., & Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manage. Sci.*, 61(3), 246–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.993>

Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., & Junot, C. (2015). Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J. Proteome Res.*, 14(8), 3322–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>

Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(25), 15107–15111. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>

Toh, S., Holbrook-Smith, D., Stogios, P., Onopriyenko, O., Lumba, S., Tsuchiya, Y., Savchenko, A., & Mccourt, P. (2015). Structure-function analysis identifies highly sensitive strigolactone receptors in *Striga*. *Science*, 350, 203–207. <https://doi.org/10.1126/science.aac9476>

van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36(1), 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>

Waters, M. T., Nelson, D. C., Scaffidi, A., Flematti, G. R., Sun, Y. K., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012). Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development*, 139(7), 1285 LP – 1295. <https://doi.org/10.1242/dev.074567>

Watson, D. G. (2013). A rough guide to metabolite identification using high resolution liquid chromatography mass spectrometry in metabolomic profiling in metazoans. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 4, e201301005–e201301005. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301005>

- Wen, P.-F., Chen, J.-Y., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Wan, S.-B., & Huang, W.-D. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science*, *169*(5), 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.06.011>
- Westwood, J. H., Yoder, J. I., Timko, M. P., & DePamphilis, C. W. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci.*, *15*(4), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.004>
- Wolfe, A. D., & DePamphilis, C. W. (1997). Alternate paths of evolution for the photosynthetic gene *rbcl* in four nonphotosynthetic species of *Orobanche*. *Plant Mol. Biol.*, *33*(6), 965–977. <https://doi.org/10.1023/A:1005739223993>
- Worsham, A. D. (1987). Germination of witchweed seeds. In *Parasitic weeds in agriculture*. (pp. 45–61). CRC Press Inc.
- Yang, C., Hu, L. Y., Ali, B., Islam, F., Bai, Q. J., Yun, X. P., Yoneyama, K., & Zhou, W. J. (2016). Seed treatment with salicylic acid invokes defence mechanism of *Helianthus annuus* against *Orobanche cumana*. *Ann. Appl. Biol.*, *169*(3), 408–422. <https://doi.org/10.1111/aab.12311>
- Yang, C., Xu, L., Zhang, N., Islam, F., Song, W., Hu, L., Liu, D., Xie, X., & Zhou, W. (2017). iTRAQ-based proteomics of sunflower cultivars differing in resistance to parasitic weed *Orobanche cumana*. *Proteomics*, *17*(13–14). <https://doi.org/10.1002/pmic.201700009>
- Yao, Z., Tian, F., Cao, X., Xu, Y., Chen, M., Xiang, B., & Zhao, S. (2016). Global transcriptomic analysis reveals the mechanism of *Phelipanche aegyptiaca* seed germination. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms17071139>
- Ye, X., Zhang, M., Dong, S., & Ma, Y. (2017). Conditioning duration and agents involved in broomrape seeds responding to germination stimulants. *Plant Growth Regul.*, *81*(2), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0199-2>
- Ye, X., Zhang, M., Zhang, M., & Ma, Y. (2020). Assessing the Performance of Maize (*Zea mays* L.) as Trap Crops for the Management of Sunflower Broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). In *Agronomy* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/agronomy10010100>
- Yoder, K. S., Miller, S. S., & Byers, R. E. (1999). Suppression of Fireblight in Apple Shoots by Prohexadione-calcium following Experimental and Natural Inoculation. *HortSci*, *34*(7), 1202–1204. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.34.7.1202>

- Yoshida, S., Cui, S. K., Ichihashi, Y., & Shirasu, K. (2016). The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *The Annual Review of Plant Biology*, 67, 643–667. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111702>
- Zehhar, N., Ingouff, M., Bouya, D., & Fer, A. (2002). Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobanche ramosa* germination. *Weed Res.*, 42(6), 464–469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2002.00306.x>
- Zenk, M., & Müller, G. (1964). Biosynthese von *p*-Hydroxybenzoesäure und anderer Benzoessäuren in höheren Pflanzen. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 19 b, 398–405. <https://doi.org/10.1515/znb-1964-0508>
- Zwanenburg, B., Mwakaboko, A. S., & Kannan, C. (2016). Suicidal germination for parasitic weed control. *Pest Manag Sci*, 72(11), 2016–2025. <https://doi.org/10.1002/ps.4222>

10 Lebenslauf

Franziska Lerner

Name Franziska Lerner (geb. Reuter)
Anschrift Saarstr. 172 | 76870 Kandel
Tel. 0174 / 8705006
E-Mail lernerfranziska@gmail.com
geb. 20. Juli 1990
Land Deutschland



Praktische Qualifikationen

- | | |
|-------------------|--|
| 12/2016 – heute | BASF SE - Abteilung APR/HE
Doktorandin <ul style="list-style-type: none">Aufklärung der Wirkungsweise von Prohexadione calicum (PHDC) gegen den Sonnenblumen Wurzelparasiten <i>O. cumana</i>. |
| 12/2015 - 12/2016 | BASF SE - Abteilung APR/HE
Projektarbeit mit anschließender Masterarbeit: <ul style="list-style-type: none">Biochemische Charakterisierung der Transaldolasen und der Ferredoxin-NADP+-Reduktase als potentielle Wirkorte einer phytotoxischen Substanz. |
| 04/2015 - 05/2015 | Arbeitsgruppe Unden - Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Projekt: <ul style="list-style-type: none">Interaktionsstudien zwischen verschiedenen anaeroben und aeroben Membranproteinen von <i>E. coli</i>. |
| 02/2015 - 03/2015 | Arbeitsgruppe Wolfrum - Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Projekt: <ul style="list-style-type: none">Induktion des Überlesens zweier nonsense Mutationen im BBS1-Protein mittels Gentamycin und PTC124 und Überprüfung einer Interaktion mit BBS9. |
| 02/2014 - 03/2014 | BASF SE
Experimentelle Toxikologie und Ökologie |
| 05/2013 - 09/2013 | BASF SE - Abteilung APR/HE
Projekt: <ul style="list-style-type: none">Ausarbeitung biochemischer und physiologischer Testmethoden im Rahmen der Wirkortbestimmung neuer Herbizide. |

11/2012 - 05/2013 AbbVie GmbH & Co.KG Abteilung GPRD-R&D Biochemical Biomarkers
 Projekt:
 • Identifizierung eines potentiellen Biomarkers in Cerebrospinal
 Flüssigkeit (CSF) für die neurodegenerative Alzheimer Krankheit.

Ausbildung

12/2016 - heute **BASF SE und Johannes Gutenberg-Universität Mainz**
 Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

10/2014 - 12/2016 **Johannes Gutenberg-Universität Mainz**
 Abschluss: Master of Science Biologie (Note: 1,3)

10/2013 - 04/2014 **Technische Universität Kaiserslautern**
 Studium der Toxikologie (Master of Science)

09/2009 - 11/2012 **Johannes Gutenberg-Universität Mainz**
 Abschluss: Bachelor of Science Molekulare Biologie (Note: 1,7)

09/2006 - 06/2009 **Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Karlsruhe; Elisabeth-Selbert-
 Schule**
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)

Kenntnisse und Fähigkeiten

Sprachen Deutsch: Muttersprache
 Englisch: Gut
 Französisch: Grundkenntnisse

PC-Kenntnisse MS Office: Outlook, PowerPoint, Excel, Word, OneNote, SharePoint
 EndNote, Web of Science, Scopus
 SigmaPlot 12.5
 Analyst 1.6.3

Soft Skills Sehr gute Präsentationserfahrung
 Sehr selbständige und strukturierte Arbeitsweise
 Hohes Maß an Motivation und Lernbereitschaft
 Talent für Planung und Organisation

Führerschein Klasse B

Fort- und Weiterbildungen

07/2018	4th International Symposium on Broomrape Bukarest, Rumänien
	Vortrag: "The effect of prohexadione calcium against the sunflower root parasite <i>Orobancha cumana</i> ."
06/2017	14th World Congress on Parasitic Plants Asilomar Conference Grounds, United States
	Poster: "Induced resistance of sunflowers against <i>O. cumana</i> by plant growth regulators."

Ferien- und Aushilfsjobs

08/2008 - 11/2008	Aushilfe bei Fun Forest GmbH
07/2009 - 08/2009 08/2010 - 09/2010	Ferienaushilfe bei NK Großflächen Vertr.Ges. Nord mbH
06/2011 - 04/2012	Mini-Job bei NK Großflächen Vertr.Ges. Nord mbH
05/2014 - 09/2014	Ferienbeschäftigte bei Daimler AG
01/2015 - 05/2015	Mini-Job bei Frank Riedel (Jet Tankstelle)
05/2015 - 11/2015	Werkstudentin bei abcr GmbH

Hobbys

TSV Kandel	ehrenamtliche Handballtrainerin der F-Jugend
VdH Hagenbach	ehrenamtliche Trainerin für Turnierhundesport