



**Einsatz von Mykorrhizapilzen
und Qualitätskomposten bei der Anzucht
von Jungpflanzen im ökologischen
Gemüse- und Zierpflanzenbau**

- SCHLUSSBERICHT TEILPROJEKT 4 -

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de

Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

Finanziert vom Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Auftragnehmer:

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.,
Fachgebiet Ökologische Land- und Pflanzenbausysteme
der Universität Kassel,
Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick (CH)

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Einsatz von Mykorrhizapilzen und Qualitätskomposten bei der Anzucht von Jungpflanzen im ökologischen Gemüse- und Zierpflanzenbau

Abschlussbericht des Forschungsprojektes 02OE306 Teil 4

**an die Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung beim
Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und
Landwirtschaft**

Vertragspartner:

- 1) Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.
- 2) Universität Kassel, Fachgebiet Ökologische Land- und Pflanzenbausysteme in Zusammenarbeit mit:
Biogarten (Flechtdorf), Weiland (Freudenthal)
- 3) Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick (CH) in
Zusammenarbeit mit:
Universität Basel, Botanisches Institut
Triton Umweltschutz GmbH, Bitterfeld
Betriebe: Schwarz (Villigen), Gerber (Fehraltorf), Flammer
(Ringwil), Neubauer (Erlen), Tischhauser (Sevelen),
Grossenbacher (Murimoos), Allemann (Frick)

Berichtersteller:

**D. Redecker, F. Oehl, A. Wiemken
Botanisches Institut der Universität Basel (CH)**

Laufzeit: 01. Juni 2002 - 31. Oktober 2003
Berichtszeitraum: 01. Juni 2002 - 31. Oktober 2003

Inhalt:

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	3
1.1. Planung und Ablauf des Projekts	3
1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand	3
2. Material und Methoden	5
2.1. Bereitstellung der 11 Basel-Elitemykorrhizastämme	5
2.2. Mikroskopische und molekulargenetische Reinheitsprüfung während der Vermehrung	5
2.3. Molekulare Untersuchungen	5
2.3.1. Probennahme der Wurzeln in Murimoos.....	5
2.3.2. Herstellung von DNA-Rohextrakten aus Sporen.....	5
2.3.4. Polymerase chain reaction.....	6
2.3.5. Klonierung.....	6
2.3.6. DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung	6
3. Ergebnisse	7
3.1. Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse	7
3.1.2. Prüfung der Mykorrhiza-Inokula auf Reinheit.....	7
3.1.3. Erstellung von DNA-Fingerprints für die Mykorrhiza-Elitestämme	9
3.1.4. Morphologische Charakterisierung der nativen Mykorrhizapopulation in zwei Versuchsfeldern.....	10
3.1.5. Molekulare Charakterisierung der Mycorrhizapilze am Standort Murimoos: native und inokulierte Pilze	10
3.2. Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse	16
4. Zusammenfassung	17
5. Gegenüberstellung der geplanten und erreichten Ziele	18
6. Literaturverzeichnis	18

Abbildungen

Abb.1: Sporenbilder der untersuchten kommerziellen Inokula.....	8
Abb.2: Restriktionsmuster von 9 ISCB-Isolaten.....	9
Abb.3: Restriktionsmuster von <i>Glomus constrictum</i> ISCB-45	9
Abb.4: Beispiele für Restriktionsmuster aus klonierten PCR-Produkten aus Wurzeln.....	11
Abb.5: Phylogenetischer Stammbaum von AM-Pilzen aus <i>Glomus</i> -Gruppe A.....	12
Abb.6: Phylogenetischer Stammbaum von AM-Pilzen aus <i>Glomus</i> -Gruppe B.....	13
Abb.7: Phylogenetischer Stammbaum von <i>Glomus constrictum</i> und verwandten Arten.....	13

Tabellen

Tabelle 1: Untersuchung der im Projekt 02OE306 eingesetzten kommerziellen Inokula von Triton/Mycosym, Biorize und PlantWorks.....	7
Tabelle 2: Im Erdbeerfeld gefundene AM-Pilzsporen.....	10
Tabelle 3: AM-Pilzsporen im Lauchfeld Murimoos.....	10
Tabelle 4: Zusammenfassung der mittels molekularer Methoden in den Lauchwurzeln in Murimoos detektierten AM-Pilze.....	16

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Im Gesamtprojekt sollte der Einsatz von arbuskulären Mycorrhizapilzen in der Jungpflanzenanzucht zur Ertragsverbesserung unter praxisnahen Bedingungen untersucht werden. Um die Wirkung der Pilz-Inokula nachvollziehen zu können, ist es notwendig, die nativen Mycorrhizapilze am Standort zu charakterisieren und den Erfolg der Inokulation zu kontrollieren. Dazu sollten molekulare und Morphologie-basierte Identifikationsmethoden eingesetzt werden. Ferner sollten die bereitgestellten Inokula auf Reinheit kontrolliert werden.

1.1. Planung und Ablauf des Projekts

Der Ablauf des Projektes folgte dem im Projektantrag aufgestellten Zeitplan.

1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Identifikation von arbuskulären Mycorrhizapilzen (AM-Pilze, Phylum Glomeromycota) basiert traditionell auf der Morphologie ihrer Sporen (Morton, 1988). Dies führt unter Feldbedingungen zu Schwierigkeiten, da keine enge Korrelation zwischen Wurzelkolonisierung durch die Pilze und der Bildung der Sporen besteht. Ihre symbiontischen Strukturen innerhalb der Wurzel lassen unter kontrollierten Bedingungen allenfalls eine Identifikation der Pilz-Familie zu (Merryweather & Fitter, 1998). Die Sporen überleben im Boden oft mehrere Jahre und geben damit keinen zuverlässigen Aufschluss über die aktuelle aktive Population. Vielmehr spiegeln sie das Inokulum-Potential des Standortes wider. Da aber auch Hyphenfragmente und kolonisierte Wurzeln als Inokulum dienen können, besteht hier die Möglichkeit, dass nichtsporulierende Arten unerkant bleiben. Viele Sporen aus Feldstandorten sind zudem meist parasitiert und damit unidentifizierbar (Redecker et al., 2003). Einen Teil dieser Probleme kann man mit der Etablierung sogenannter Fangkulturen umgehen. Dabei werden Pflanzen im Gewächshaus im Substrat vom Standort kultiviert und die Sporenproduktion über längere Zeit verfolgt (Oehl et al., 2003a). Obwohl damit die Diversität des Inokulum-Potentials eines Standorts besser ausgeschöpft werden kann, können neue Schwierigkeiten durch präferentielle Kolonisierung und Sporulation im Gewächshaus entstehen (Jansa et al., 2002).

Basierend auf der Polymerase-Kettenreaktion wurden in den letzten Jahren molekulare Methoden entwickelt, die ribosomale Gensequenzen zur Identifikation der Pilze innerhalb von kolonisierten Wurzeln ermöglichen (Helgason et al., 1998; Redecker, 2000; van Tuinen et al., 1998). Damit kann die zum Untersuchungszeitpunkt aktive AM-Pilz-Population innerhalb der Wurzeln charakterisiert werden. Entscheidend sind dabei spezifische PCR-Primer, die es erlauben, die AM-Pilzgene aus einer DNA-Mischung zu amplifizieren, die hauptsächlich von der Pflanze stammt. Dazu wurden mehrere verschiedene Regionen der ribosomalen Gene herangezogen. Diese Methoden haben zu einer

Fülle neuer Erkenntnisse über die Ökologie der arbuskulären Mycorrhizapilze unter Standortbedingungen geführt. So wurde berichtet, dass in ackerbaulich genutzten Standorten die Diversität der AM-Pilze stark eingeschränkt ist und sich auf wenige Arten der Gattung *Glomus* beschränkt (Helgason et al., 1998). Dieser Aspekt wurde ebenfalls am Botanischen Institut in Basel in Zusammenarbeit mit dem FIBL weiterverfolgt. Die Sporen aus 12 Standorten unterschiedlicher ackerbaulicher Nutzung aus dem Oberen Rheintal wurden in Fangkulturen charakterisiert. Dabei zeigte sich ein Trend zur Verarmung der AM-Pilz-Population an intensiv genutzten Standorten. Ökologische bewirtschaftete Böden zeigten eine mittlere Diversität zwischen intensiv genutzten und naturbelassenen Böden (Oehl et al., 2003a). Ein ähnlicher Trend zeigt sich in vorläufigen Ergebnissen, die aus kolonisierten Wurzeln mit molekularen Identifikationsmethoden in Basel erhalten wurden (Hijri et al., unveröffentlicht).

Die Nutzung der AM zur Verbesserung des Ertrages von Nutzpflanzen wird schon relativ lange erforscht. Ein grosses Problem dabei war die mangelnde Charakterisierung der Pilzinokula. Da diese Pilze nicht in Reinkultur anziehbar sind, vermehrt man sie zusammen mit einem pflanzlichen Wirt. Diese Kulturen sind über längere Zeiträume recht anfällig für Kontaminanten und die daraus gewonnenen Sporen beherbergen eine Vielzahl anderer Mikroorganismen (Hijri et al., 2002).

Oft angestellte Vergleiche von AM-inokulierten Pflanzen mit Pflanzen in sterilisiertem Boden sind für die Anwendung unter Feldbedingungen nicht hilfreich. Im Feld müssen sich Inokula immer auch gegen eine einheimische Population von AM-Pilzen durchsetzen und diese in ihrer Effizienz übertreffen, um eine Inokulation zu rechtfertigen. Unter natürlichen Bedingungen kommen nicht-kolonisierte Wirtspflanzen der AM kaum vor. Die in sterilem Boden angezogenen "nicht-inokulierten" Pflanzen sind daher ein artifizieller Vergleichspunkt und für die Praxis im Feld irrelevant. Lediglich bei Pflanzen, die routinemässig unter sterilen Bedingungen angezogen werden, sind solche Vergleiche nach wie vor sinnvoll.

Trotz der anerkannten Notwendigkeit, den Erfolg der Inokulation im Feld mit molekularen Methoden zu überprüfen, liegen bislang dazu nur wenige Studien vor. In einer bislang unveröffentlichten Studie in China wurde der Inokulationserfolg mit spezies-spezifischen PCR-Primern überprüft (Mary Jo Farmer et al., Vortrag auf der COST 8.38-Tagung in Köln, 2002).

Ein Problem bei der molekularen Erfolgskontrolle besteht darin, dass nah verwandte Spezies oder gar Stämme derselben AM-Pilz-Spezies mit molekularen Methoden oft nicht voneinander getrennt werden können. Die ribosomalen Gene weisen schon innerhalb einzelner Sporen eine gewisse Variationsbreite auf, so dass auch aus demselben Pilz selten genau dieselbe Sequenz zweimal erhalten wird (Redecker et al., 2003). Da es zur Zeit keine zuverlässigen molekularen Marker für bestimmte Pilzstämme gibt, kann der Inokulationserfolg nur dann gezeigt werden, wenn kein nah verwandter Pilz in der nativen Population vorhanden ist oder wenn die Kolonisierungshäufigkeit einer bestimmten Art durch das Inokulum deutlich erhöht wird.

2. Material und Methoden

2.1. Bereitstellung der 11 Basel-Elitemykorrhizastämme

Bei den Elitemykorrhizastämmen handelte es sich um folgende Arten: *Glomus mosseae* (Isolate ISCB 13, 14, 17, 19, 20, 22) *Glomus lamellosum* und ähnliche Isolate (ISCB 34, 39, 48, 49), *Glomus constrictum* (ISCB45) und *Glomus aureum* (ISCB44, Oehl et al., 2003b). Vor Projektbeginn wurden die 11 Stämme in 1 Liter Töpfen an *Plantago lanceolata* und *Hieracium pilosella* vermehrt. Das sterilisierte Substrat bestand aus einem Gemisch aus Terragreen (American Aluminium oxide, OIL DRY US SPECIAL, Type III R, < 0.125 mm, Lobbe Umwelttechnik, Iserlohn, Germany), Quarzsand und Loess (2:2:1).

2.2. Mikroskopische und molekulargenetische Reinheitsprüfung während der Vermehrung

Zu Projektbeginn (1.6.2002) wurden die 11 Stämme morphologisch auf Reinheit geprüft. Gleichzeitig wurde das Personal des FiBL in der Vermehrung der Mykorrhizastämme geschult und ca. 300 ml Inokulum an das FiBL abgegeben. Die Reinheitskontrolle beruhte methodisch auf der Isolation von Mykorrhizapilzsporen mittels Nasssiebung (Siebgrösse 80 µm), Montage auf Objektträger, Fixierung der Sporen mit einem Polyvinyl-Milchsäure-Glycerin- Präparat und Bestimmung der Sporen bei 400-facher Vergrößerung.

Am Ende der ersten Grossvermehrung im FiBL wurde, nach 5 Monaten (1.12.2002), eine zweite morphologische Reinheitskontrolle im Botanischen Institut durchgeführt und weitere Mitarbeiter des FiBL über die Techniken, die Stämme und die Vermehrung unterrichtet.

Auf Wunsch der Bietergemeinschaft wurden die kommerziellen Inokula der Firmen Triton, PlantWorks und Biorize auf Sporengehalt untersucht.

2.3. Molekulare Untersuchungen

2.3.1. Probennahme der Wurzeln in Murimoos

Unmittelbar vor der Ernte wurden Wurzelproben im Feldversuch mit Sommerlauch in Murimoos genommen, in dem ISCB13, 44, 45 und 49, sowie die kommerziellen Inokula von Triton, Biorize und Plant Works inokuliert worden waren.

2.3.2. Herstellung von DNA-Rohextrakten aus Sporen

Sporenextrakte wurden hergestellt (Redecker et al., 1997), und direkt für die Polymerase Chain Reaction (PCR) eingesetzt.

2.3.3. DNA-Extrakte aus Wurzeln

DNA aus Aliquots von jeweils 50mg wurde mit einem DNAeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Elution erfolgte in 2 x 0,05 ml Puffer. Die DNA wurde 1:10 in TE-Puffer verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4. Polymerase chain reaction

Die PCR der rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS) wurde in zwei Stufen als *nested PCR* durchgeführt (Redecker, 2000). Dabei wurde Taq-Polymerase von Amersham (Basel, Schweiz) und 2 mM MgCl₂ verwendet. Die erste Stufe wurde mit den universellen Primern NS5 and ITS4 (White et al., 1990) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde 1:100 in TE-Puffer verdünnt und für die zweite Stufe als Matrize verwendet, wobei in getrennten Reaktionen die folgenden Primerkombinationen eingesetzt wurden, die für bestimmte Untergruppen der AM-Pilze spezifisch sind (Gruppen-Nomenklatur nach (Schwarzott et al., 2001): GLOM1310- ITS4i (*Glomus* Gruppe A), LETC1670- ITS4i (*Glomus* Gruppe B), ACAU1660- ITS4i (Acaulosporaceae), ITS1F- GIGA5.8R (Gigasporaceae), ARCH1311a/b -ITS4i (*Archaeosporaceae*, *Paraglomaceae*). Daneben wurde speziell für dieses Projekt ein spezifischer Primer für *Glomus constrictum* hergestellt (LCON5.8: TTGAGGGTCGCTTAATAAAC), der zusammen mit ITS4i eingesetzt wurde. PCR-Produkte der zweiten Stufe wurden auf Agarosegelen aufgetrennt (2%:1% NuSieve/SeaKem, FMC, Rockland, USA), mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) dokumentiert (Chemidoc, BIORAD, Richmond, USA).

2.3.5. Klonierung

PCR-Produkte wurden über Nacht bei 12°C in einen pGEM-T-Vektor ligiert (Promega/Catalys, Wallisellen, Schweiz). Mittels Hitzeschock wurden kompetente *E. coli*-Bakterien (Stamm DH5alpha) damit transformiert und auf LVB-Agar mit Ampicillin (0.1 mg/l), IPTG und X-Gal ausplattiert. Weissgefärbte Kolonien wurden durch Kolonie-PCR auf korrekte Inserts getestet. PCR-Produkte der erwarteten Grösse wurden durch Restriktionsverdauung mit *Mbol* oder *Hinfl* charakterisiert und auf Agarosegelen aufgetrennt (Restriktionslängen-Polymorphismen-Analyse, RFLP). Jeweils ein Klon für jedes *Mbol*-Restriktionsmuster wurde sequenziert.

2.3.6. DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung

Die DNA-Sequenzierungsreaktion wurde mit einem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI, Foster City, USA) durchgeführt. Die Proben wurden dann auf einem ABI 310 Capillary Sequencer analysiert. Die Rohdaten beider DNA-Stränge wurden im Programm Sequence Navigator (ABI, Foster City, USA) korrigiert. Die Sequenzen wurden im Programm PAUP* 4.0 (Swofford, 2001) mit internen Datenbanken und öffentlich zugänglichen Sequenzen des jeweiligen Fragments aliniert und phylogenetisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Bereitstellung des Inokulums der Elitestämme

Zur Projektbeginn wurden 11 Mykorrhizastämme der Uni Basel für das Projekt 02OE306 zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Prüfung der Mykorrhiza-Inokula auf Reinheit

Die Reinheit war im Juni 2002 bei allen Stämmen gegeben. Nach der Grossvermehrung im FiBL konnten weiterhin 10 von 11 Stämmen also morphologisch rein eingestuft werden. Es wurde vereinbart, für die neuerliche Grossvermehrung auf die Ausgangskulturen der Uni Basel zurückzugreifen.

Die kommerziellen Inokula der Firmen Triton, PlantWorks und Biorize wiesen alle ausreichend Sporen auf und beinhalteten, wie von den Firmen angegeben, mehr als nur einen Mykorrhizastamm. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Sporenbilder der verschiedenen Inokula sind in Abb. 1 gezeigt (Sporen extrahiert aus 50 g luftgetrockneten Inokulums).

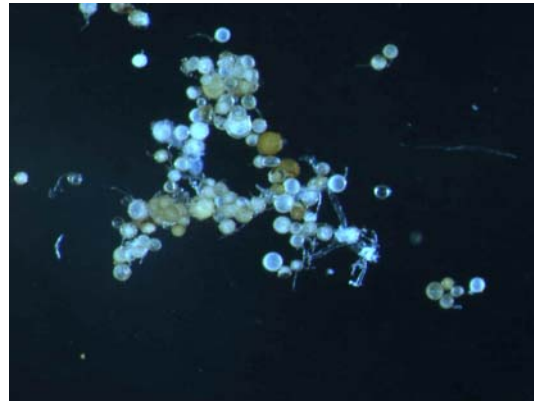
Tabelle 1: Untersuchung der im Projekt 02OE306 eingesetzten kommerziellen Inokula von Triton/Mycosym, Biorize und PlantWorks.

Inokulum	Triton/Mycosym	Biorize	PlantWorks
Substratbasis	Blähton	Terragreen	Blähton
Sporenzahl	Hoch	Mässig	Sehr hoch
Nachgewiesene Arten/Stämme	2	3	5(-6)
Sporen folgender Arten/Stämme	Viel <i>G intraradices</i> , wenig <i>G etunicatum</i>	<i>G intraradices</i> , <i>G mosseae</i> , <i>G constrictum</i>	<i>G intraradices</i> , <i>G mosseae</i> , <i>G geosporum</i> , <i>G etunicatum</i> , <i>G versiforme</i> (<i>G lamellosum/claroideum group</i>)
Bewertung des Inokulums	Gut, Dominanz von <i>G intraradices</i>	Gut, vitale Sporen von allen 3 Stämmen	Gut, viele vitale Sporen von mindestens 5 verschiedenen Glomus Arten

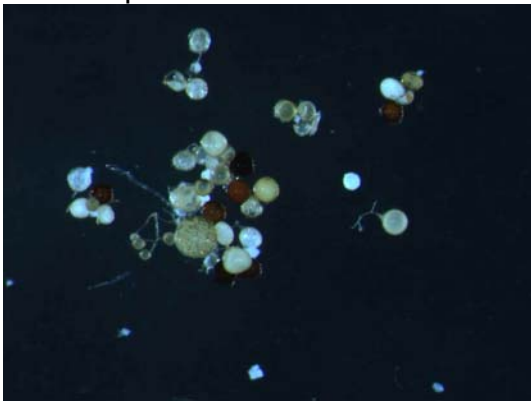
Abb.1: Sporenbilder der untersuchten kommerziellen Inokula.



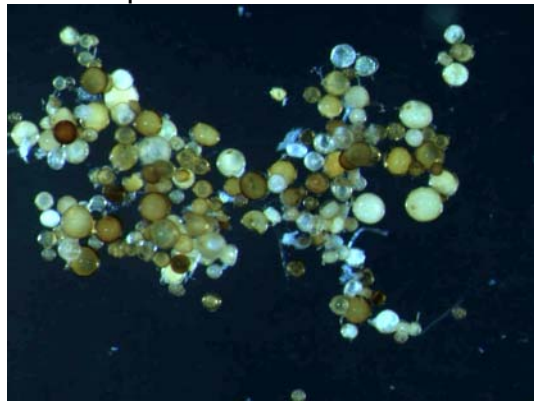
Triton: Sporen im Blähton x32



Triton: Sporenbild



Biorize: Sporenbild



Plant/Works: Sporenbild

3.1.3. Erstellung von DNA-Fingerprints für die Mykorrhiza-Elitestämme

Von 10 ISCB-Mykorrhizastämmen wurden Teile der ribosomalen DNA amplifiziert und Restriktionsmuster mit den Enzymen *MboI* und *Hinfi* erhalten (Abb.2). Dabei wiesen die beiden Isolat-Gruppen *Glomus mosseae* (Isolate ISCB 13, 14, 17, 19, 20, 22) und (*Glomus lamellosum* und ähnliche Isolate (ISCB 34, 39, 48, 49) jeweils identische Muster auf. Das Restriktionsmuster von *Glomus constrictum* ISCB45 ist in Abb.3 dargestellt.

Es wurde jeweils eine ITS-Sequenz aus jedem Isolat sequenziert. Wie erwartet, gruppieren diese Sequenzen in Stammbäumen mit anderen Sequenzen von *Glomus constrictum* (Isolat ISCB45), *Glomus mosseae* (Isolate ISCB 13, 14, 17, 19, 20, 22) (Abb.5) beziehungsweise in der *Glomus etunicatum*-Gruppe (*Glomus lamellosum* und ähnliche Isolate: ISCB 34, 39, 48, 49) (Abb.6). Aus ISCB44 konnten keine Daten erhalten werden, da nicht genügend Sporenmaterial vorlag.

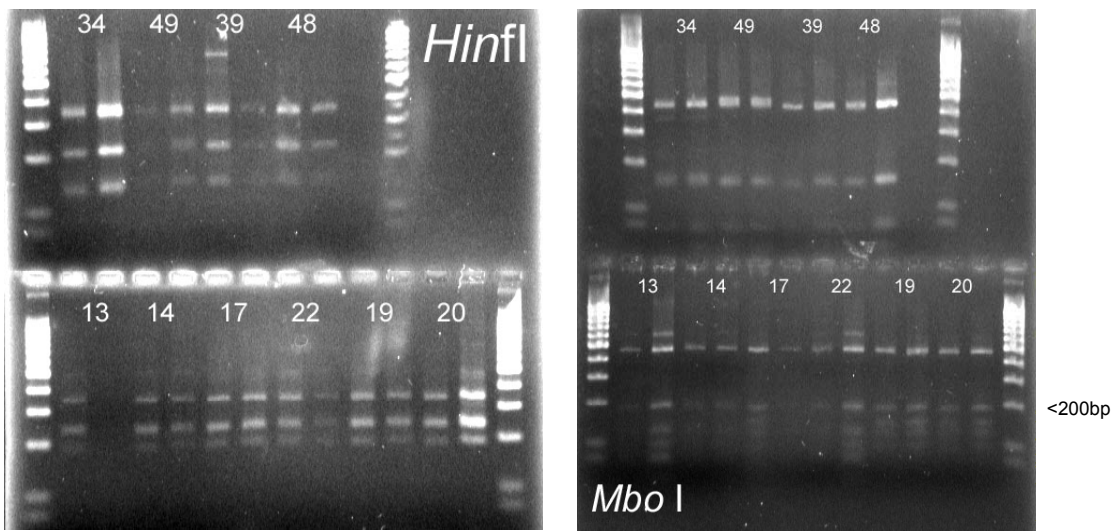


Abb.2: Restriktionsmuster von 9 ISCB-Isolaten. PCR-Produkte der Primer LETC1670-ITS4i (obere Reihen) bzw. GLOM1310-ITS4i (untere Reihen) wurden mit den Restriktionsenzymen *MboI* bzw. *Hinfi* verdaut und auf Agarosegelen aufgetrennt. Äussere Bahnen: Molekulargewichtsmarker 100-Basenpaar-Leiter

M	CON	GSP	CON	GSP	M
---	-----	-----	-----	-----	---

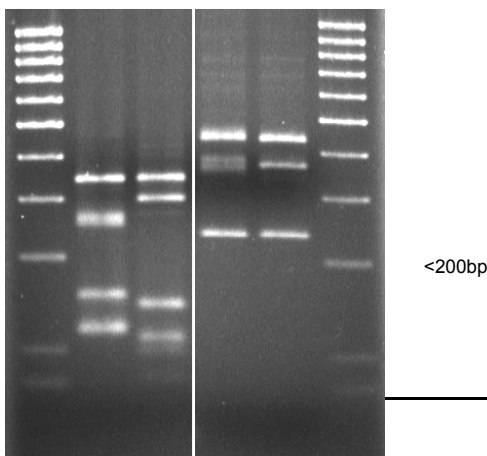


Abb.3: Restriktionsmuster von *G. constrictum* ISCB-45 (CON), sowie *G. geosporum* (GSP). PCR-Produkte der Primer GLOM1310-ITS4i (untere Reihen) wurden mit den Restriktionsenzymen *MboI* (links) bzw. *Hinfi* (rechts) verdaut und auf Agarosegelen aufgetrennt. Äussere Bahnen: Molekulargewichtsmarker 100-Basenpaar-Leiter

3.1.4. Morphologische Charakterisierung der nativen Mykorrhizapopulation in zwei Versuchsfeldern

Die in den beiden Standorten gefundenen Sporen sind in Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Im Erdbeerfeld in Frick gefundene AM-Pilzsporen

	C1	C2
häufig	<i>Archaeospora trappei</i>	<i>Archaeospora trappei</i>
charakteristisch	<i>Glomus mosseae</i> <i>G geosporum</i> <i>G etunicatum</i> <i>G constrictum</i>	<i>Glomus mosseae</i> <i>G geosporum</i> <i>G etunicatum</i> <i>G constrictum</i>
wenig häufig	<i>G diaphanum</i> <i>G intraradices</i> <i>G albidum</i>	<i>G diaphanum</i>
selten	<i>G aureum</i> <i>G invermaium</i> <i>G microcarpum</i> <i>Entrophospora infrequens</i>	<i>G aureum</i> <i>Entrophospora infrequens</i>
Anzahl	12	8

Tabelle 3: AM-Pilzsporen im Lauchfeld Murimoos: 11 AM-Pilz-Morphotypen wurden unterschieden und sind nach der Häufigkeit ihrer Sporen aufgelistet.

AM-Pilz-Spezies		Anmerkungen
<i>G geosporum</i>	häufig	
<i>G mosseae</i>	häufig	
<i>G diaphanum</i>	häufig	
<i>G etunicatum</i>	mässig	
<i>Ar trappei</i>	mässig	
<i>G intraradices</i>	?	weitgehend zersetzte Sporen, daher schwierig zu quantifizieren
<i>P occultum/G albidum</i>	mässig	
<i>G constrictum</i>	selten	
<i>G fasciculatum</i>	selten	
<i>G versiforme</i> -ähnlich	selten	
<i>G caledonium</i>	sehr selten	

3.1.5. Molekulare Charakterisierung der Mykorrhizapilze am Standort Murimoos: native und inokulierte Pilze

Wurzelproben wurden aus dem Erdbeer- wie auch dem Lauchstandort entnommen und die DNA extrahiert. Die Erdbeerwurzeln waren zum Teil stark lignifiziert oder abgestorben. Aus der erhaltenen DNA konnten trotz mehrfacher Versuche keine PCR-Produkte erhalten werden. Dies deutet auf die Anwesenheit phenolischer Verbindungen hin, die enzymhemmend wirken können. Da die Lauch-Proben

vielversprechender erschienen, wurde sich im folgenden ganz auf diese Proben konzentriert.

Aus zwei Feldwiederholungen in Murimoos wurden jeweils zwei Wurzelproben analysiert, die mit ISCB13, 44, 45 und 49 inokuliert worden waren. Daneben wurden aus vier Kontroll-Plots jeweils zwei Wurzelproben untersucht, um die native AM-Population zu charakterisieren. Insgesamt wurden PCR-Produkte aus 21 Wurzelproben aus 12 Parzellen erhalten.

Insgesamt wurden 172 Klone erhalten und durch Restriktionsanalyse (RFLP) charakterisiert (siehe Beispiel Abb.4). In der Regel wurden zwischen 10 und 30 Klone pro Parzelle untersucht. Dadurch wurden 24 verschiedene *Mbol*-RFLP-Typen definiert. Am weitesten verbreitet war *Glomus*-Gruppe A (Primer GLOM1310), zu der *Glomus intraradices*, *mosseae*, *geosporum*, und *constrictum* gehören (115 Klone aus 20 Proben). Aus *Glomus*-Gruppe B (Primer LETC1670), zu der *Glomus etunicatum* und *lamellosum* gehören, wurden 10 Klone erhalten. Die restlichen Klone entfallen auf den Primer CON5.8, der für *Glomus constrictum* erstellt wurde. Repräsentative Klone für jeden RFLP-Typ wurden sequenziert und aus den Sequenzen phylogenetische Stammbäume errechnet (Abb.5-7).

Im Gegensatz zu den direkt analysierten PCR-Produkten aus den Wurzeln oder Sporen (z.B. Abb.2), umfasst bei den klonierten PCR-Produkten jede dieser Spezies mehrere RFLP-Typen (z.B. neun in *G. intraradices*). Das ist darin begründet, dass der Klonierungsprozess die Sequenzvarianten innerhalb des Organismus vereinzelt und diese Varianten verschiedene Restriktionsmuster haben können.

Keine PCR-Produkte wurden von den Gigasporaceae, Acaulosporaceae, Paraglomaceae oder Archaeosporaceae erhalten, so dass sich die native Population weitgehend auf *Glomus*-Gruppe A zu beschränken scheint.

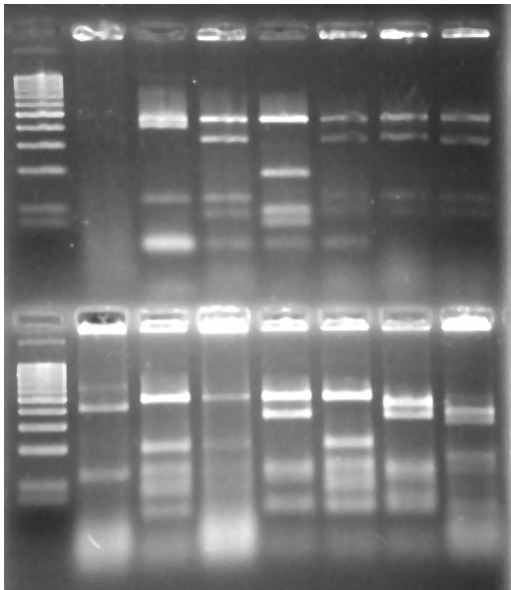


Abb.4: Beispiele für Restriktionsmuster aus klonierten PCR-Produkten aus Wurzeln mit den Primern GLOM1310-ITS4i.

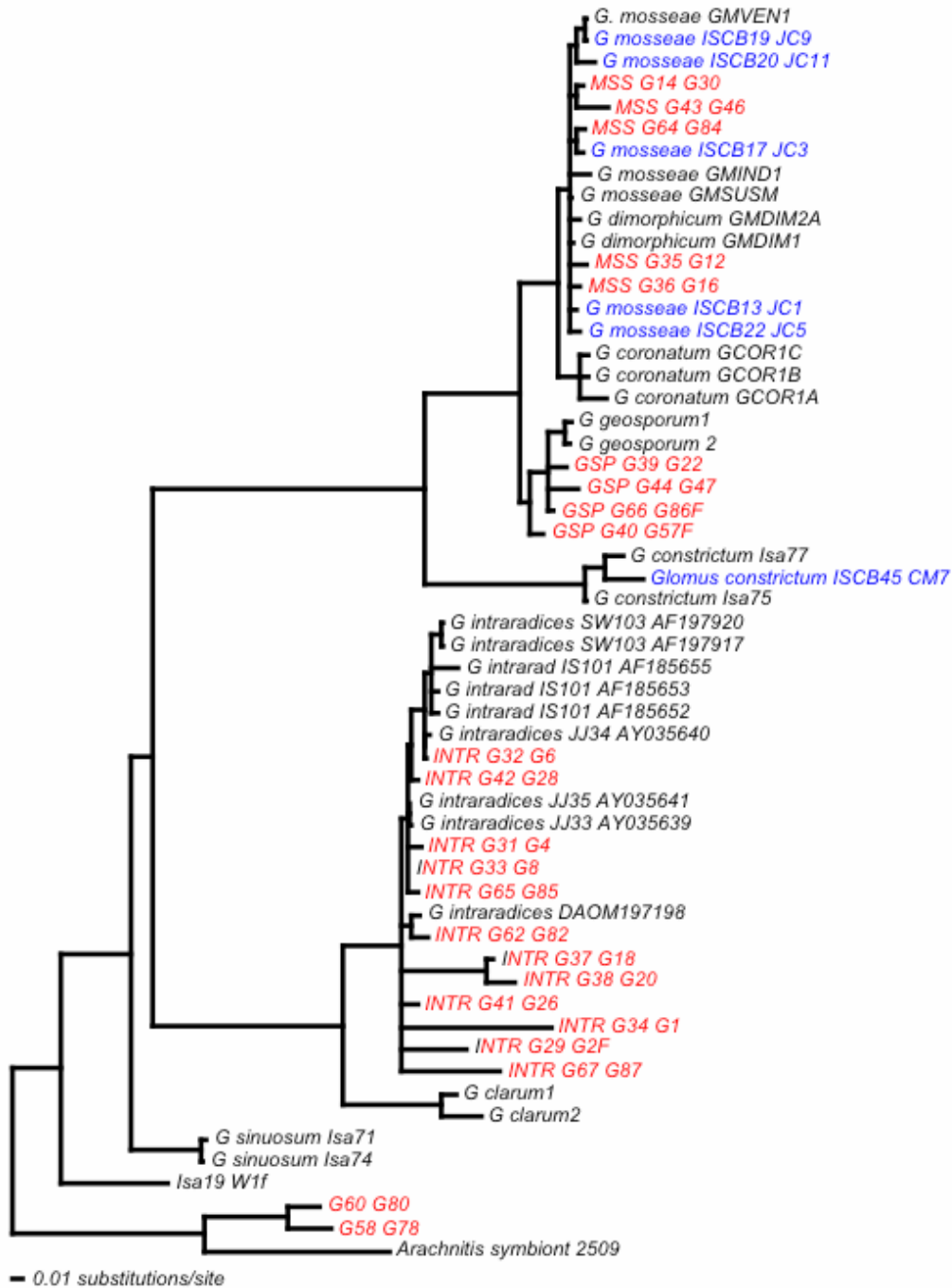


Abb.5 Phylogenetischer Stammbaum, errechnet aus ITS2 und 5.8SrDNA-Sequenzen von AM-Pilzen aus *Glomus*-Gruppe A. Die jeweiligen PCR-Produkte waren in der Regel mit dem spezifischen Primer GLOM1310 erhalten worden und stellen Repräsentanten von RFLP-Typen dar. Sequenzen aus Sporen der ISCB-Isolate sind in blau dargestellt, Sequenzen aus Wurzelproben in rot. Der Baum wurde mit der Neighbor-joining-Methode erhalten.

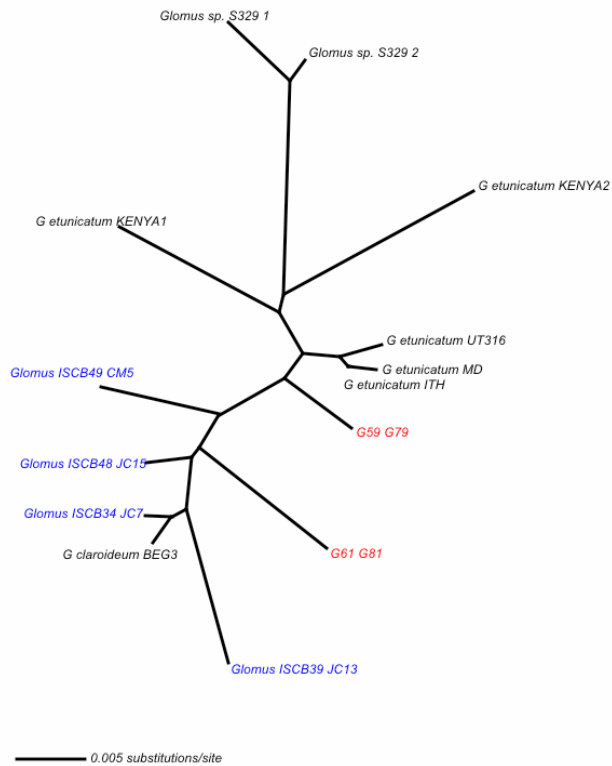


Abb.6: Phylogenetischer Stammbaum, errechnet aus ITS1/2 und 5.8SrDNA-Sequenzen von AM-Pilzen aus *Glomus*-Gruppe B. Die jeweiligen PCR-Produkte waren mit dem spezifischen Primer LETC1670 erhalten worden und stellen Repräsentanten von RFLP-Typen dar. Sequenzen aus Sporen der ISCB-Isolate sind in blau dargestellt, Sequenzen aus Wurzelproben in rot. Der Baum wurde mit der Neighbor-joining-Methode erhalten.

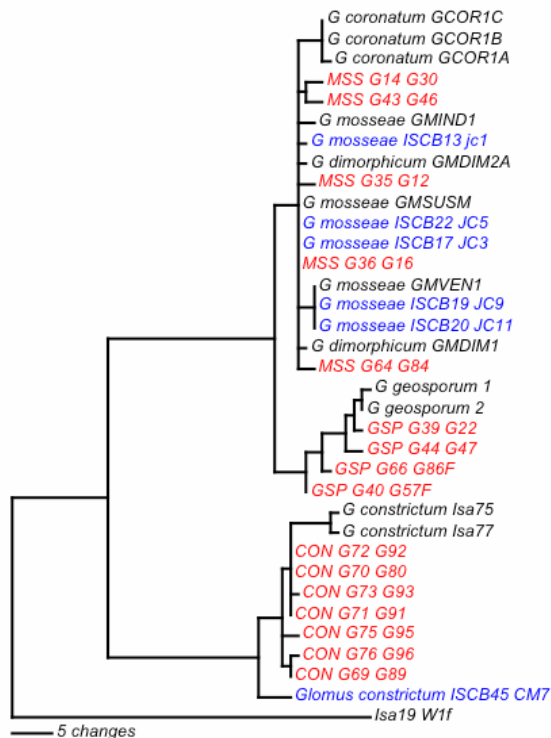


Abb.7: Phylogenetischer Stammbaum von *Glomus constrictum* und verwandten Arten (*Glomus*-Gruppe A). Alle mit dem *Glomus-constrictum*-spezifischen Primer CON5.8 erhaltenen Sequenzen gehören tatsächlich zu dieser Art.

Ausgewertet wurde hier nur das DNA-Teilstück, das mit CON5.8 amplifiziert wurde, und entsprechende Referenz-Sequenzen aus anderen Spezies. Sequenzen aus Sporen der ISCB-Isolate sind in blau dargestellt, Sequenzen aus Wurzelproben in rot.

Der Baum ist einer der 500 kürzesten Bäume, die in PAUP*4 unter dem Parsimonie-Kriterium erhalten wurden.

In den Wurzeln der Pflanzen aus Negativ-Kontrollen wie aus inokulierten Pflanzen dominierten *Glomus intraradices* (65% aller Proben) und *Glomus mosseae* (50% aller Proben). Vereinzelt fand sich *Glomus geosporum* (15% aller Proben). *Glomus mosseae* war in nahezu sämtlichen Parzellen vorhanden, inclusive der Negativkontrollen. Daher kann hier kein eindeutiger Inokulationserfolg von ISCB13 gezeigt werden.

Sequenzen von *Glomus constrictum* wurden nicht unter den Klonen gefunden, die mit dem gruppenspezifischen Primer GLOM1310 erhalten wurden. Da an dieser Art ein besonderes Interesse bestand, weil sie als ISCB45 inokuliert worden war, wurde zusätzlich ein PCR-Primer speziell für diese Art konstruiert. Mit diesem Primer wurde *Glomus constrictum* in mehreren Wurzelproben nachgewiesen, auch in Parzellen, wo diese Art nicht inokuliert worden war. Dies deutet darauf hin, dass diese Art gegenüber den anderen Spezies aus *Glomus* Gruppe A eine relativ geringe Kolonisierungsrate aufwies, so dass die Wahrscheinlichkeit, *G. constrictum* unter den Klonen zu finden, die jeweils aus einem GLOM1310-PCR-Produkt charakterisiert wurden, zu gering war. Ein eindeutiger Inokulationseffekt für ISCB45 konnte aus der Verteilung der positiven Proben nicht abgeleitet werden.

Sequenzen mit enger Verwandtschaft zu *Glomus lamellosum* (ISCB49, *Glomus*-Gruppe B), die von diesem Pilz stammen könnten, wurden in einer der beiden analysierten Parzellen nachgewiesen, die mit dieser Art inokuliert worden waren. Damit kann auch bei dieser Art kein durchgehender Inokulationserfolg nachgewiesen werden. Es wäre jedoch hilfreich, mehr Wurzelproben aus den ISCB49-inokulierten Parzellen zu untersuchen, was in der Kürze der Zeit nicht geleistet werden konnte.

Alle charakterisierten Arten von AM-Pilzen aus den ISCB-Inokula, mit der möglichen Ausnahme von *G. lamellosum*, waren bereits in der nativen Population vorhanden. In den mit ISCB45 und ISCB13 inokulierten Parzellen war keine merkliche Erhöhung der Kolonisierung mit den Inokulum-Arten festzustellen. Insbesondere war auch mit der empfindlicheren Methode mittels eines speziellen Primers, *Glomus constrictum* nicht in allen Proben aus den ISCB45-Parzellen nachzuweisen.

Dies steht in Übereinstimmung mit der eher schwachen Kolonisierungsrate des ausgepflanzten Lauchs, die offensichtlich nicht ausreichte, damit sich dieser Stamm gegen die native Population durchsetzen konnte.

Tabelle 4: Zusammenfassung der mittels molekularer Methoden in den Lauchwurzeln in Murimoos detektierten AM-Pilze. INT=*G. intraradices*, MSS=*G. mosseae*, GSP=*G. geosporum*, (CON)= *G. constrictum* (mit speziellem PCR-Primer), G. sp.= unbekannter *Glomus*-Sequenztyp, der mit AM-Symbionten aus *Arachnitis uniflora* (Bidartondo et al., 2002) verwandt ist (siehe G60/G80 und G58/G78 in Abb.5), ETC= *G. etunicatum/lamellosum*-Gruppe.

Parzelle (inokulierte Art):	Probe	INT	MSS	GSP	(CON)	G. sp.	ETC
ISCB13-I	a	+			+		
(<i>G. mosseae</i>)	b	+	+				
ISCB13-III	a		+		+		
(<i>G. mosseae</i>)	b	+	+				
ISCB44-I	a	+					
(<i>G. aureum</i>)	b	+	+				
ISCB44-III	a	+					
(<i>G. aureum</i>)							
ISCB45-I	a		+				
(<i>G. constrictum</i>)	b	+	+				
ISCB45-III	a	+	+		+		
(<i>G. constrictum</i>)	b	+			+		
ISCB49-I	a	+	+	+		+	+
(<i>G. lamellosum</i>)	b		+	+		+	+
ISCB49-III	a					+	
(<i>G. lamellosum</i>)	b						
Kontr.A-I	a	+			+		
	b	+			+		
Kontr.B-IV	a	+			+		
	b	+			+		
Kontr.B-III	a						
	b	+	+		+		
Kontr.A-V	a	+	+		+		
	b		+	+	+		

In den ISCB44-Parzellen wurden lediglich *G. intraradices* und *G. mosseae*, die beiden in der nativen Population häufigsten Arten, detektiert. Unabhängig von der Identität von ISCB44, von dem keine DNA-Sequenzen vorlagen, ist ein Inokulationserfolg für diese Isolat daher nicht nachweisbar.

Die molekularen Daten stimmen weitgehend mit den Sporen-Untersuchungen überein, die das Vorhandensein von *G. geosporum*, *G. mosseae* und *G. intraradices* in diesem Feld zeigen. Von den als Sporen häufigen Arten wurde nur *Ar. trappei* nicht gefunden, zu *G. diaphanum* gibt es keine DNA-Sequenzen. Diskrepanzen sind dadurch zu erklären, dass die Sporen von früher im Feld vorhandenen Pflanzen stammen können.

Die vorhandenen Daten geben keine Hinweise darauf, dass die native AM-Pilzpopulation von den Inokula verdrängt werden könnte.

3.2. Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse

Die Verwendung molekularer Methoden zur Kontrolle des Inokulationserfolgs stellte eine technische Innovation dar. Nach unserem Kenntnisstand zum ersten Mal wurden die inokulierten AM-Pilze in einem Feldversuch im Zusammenhang mit einer Gesamtaufnahme der nativen Population untersucht. Exemplarisch wurden die Möglichkeiten und Grenzen des methodischen Ansatzes aufgezeigt. Die DNA-Fingerprints ermöglichen eine Wiedererkennung der Inokula in kolonisierten Wurzeln, sofern nicht dieselbe oder nah verwandte Spezies im Boden bereits vorhanden sind. Dies entspricht der Auflösung der derzeitig verfügbaren molekularen Markergene. Die Ergebnisse zeigen keine deutlichen Hinweise, dass sich die untersuchten Inokula in nachweisbarem Ausmass durchsetzen konnten. Der methodische Ansatz wird dennoch für zukünftige Feldstudien wegweisend sein. Bei einer stärkeren Kolonisierung durch die Inokulumstämme ISCB45 und ISCB49 wäre dies wohl möglich gewesen. Die Intensität der Inokulation erscheint deswegen als möglicher in Zukunft optimierbarer Parameter.

4. Zusammenfassung

Problemstellung: Die erfolgreiche Inkulation mit arbuskulären Mykorrhizapilzen ist unter Feldbedingungen mit herkömmlichen mikroskopischen Methoden nicht direkt nachprüfbar.

Zielsetzung: An einem Feldstandort des Projektes sollten native und inokulierte arbuskuläre Mykorrhizapilze innerhalb der Wurzeln der jeweiligen Nutzpflanzen mit molekularen Identifikationsmethoden charakterisiert werden. Daneben sollte die native Sporen-Population durch mikroskopische Untersuchung erfasst werden.

Durchführung und Ergebnisse:

Inokula der Basler Elitemycorrhizastämme wurde bereitgestellt. Diese und andere verwendet Inokula wurden auf Reinheit kontrolliert.

Von 10 Basler ISCB-Elitemycorrhizastämmen wurden DNA-Fingerprints erstellt. Dazu wurden aus den jeweiligen Sporen DNA-Fragmente durch *nested polymerase chain reaction* erhalten, die die rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS) sowie Teile der 18S-rDNA-Untereinheit umfassten. Diese wurden mit den Restriktionsenzymen *Mbol* und *Hinfl* geschnitten und auf Agarosegels aufgetrennt, um charakteristische Fragmentmuster zu erhalten. Daneben wurde aus jedem Isolat eine ITS-Region sequenziert und phylogenetisch ausgewertet. Wie erwartet, gruppieren diese Sequenzen in Stammbäumen mit anderen Sequenzen von *Glomus constrictum* (Isolat ISCB45), *Glomus mosseae* (Isolate ISCB 13, 14, 17, 19, 20, 22) beziehungsweise in der *Glomus etunicatum*-Gruppe (*Glomus lamellosum* und ähnliche Isolate: ISCB 34, 39, 48, 49). Innerhalb der letzteren beiden Isolat-Gruppen wiesen alle Isolate identische Restriktionsmuster auf.

Unmittelbar vor der Ernte wurden Wurzelproben im Feldversuch mit Sommerlauch in Murimoos genommen, in dem ISCB13, 44, 45 und 49, sowie die kommerziellen Inokula von Triton, Biorize und Plant Works inokuliert worden waren. Mit den oben angeführten Methoden wurde die in diesen Wurzeln vorhandene arbuskuläre Mykorrhiza (AM) charakterisiert. Insgesamt wurden aus zwei Feldwiederholungen jeweils zwei Wurzelproben analysiert, die mit ISCB13, 44, 45 und 49 inokuliert worden waren. Daneben wurden aus vier Kontroll-Plots jeweils zwei Wurzelproben untersucht, um die native AM-Population zu charakterisieren. Insgesamt wurden aus 20 Wurzelproben PCR-Produkte erhalten. In den Wurzeln der Pflanzen aus Negativ-Kontrollen wie aus inokulierten Pflanzen dominierten *Glomus intraradices* (65% aller Proben) und *Glomus mosseae* (50% aller Proben) aus der sogenannten *Glomus*-Gruppe A. Vereinzelt fand sich aus derselben Gruppe *Glomus geosporum* (15% aller Proben). *Glomus mosseae* war in nahezu sämtlichen Parzellen vorhanden, inklusive der Negativkontrollen. *Glomus constrictum* wurde mittels eines speziell konstruierten PCR-Primers in mehreren inokulierten und nicht-inokulierten Parzellen nachgewiesen. Sequenzen mit starker Ähnlichkeit zu *Glomus lamellosum* (ISCB49, *Glomus*-Gruppe B) wurden in einer der beiden analysierten Parzellen nachgewiesen, die mit dieser Art inokuliert worden waren.

Keine PCR-Produkte wurden von den Gigasporaceae, Acaulosporaceae, Paraglomaceae oder Archaeosporaceae erhalten, so dass sich die native Population weitgehend auf *Glomus* Gruppe A zu beschränken scheint.

Die Sporenpopulation wurde an zwei Standorten morphologisch charakterisiert.

Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse: Die DNA-Fingerprints ermöglichen eine Wiedererkennung der Inokula in kolonisierten Wurzeln, sofern nicht dieselbe oder nah verwandte Spezies im Boden bereits vorhanden sind.

5. Gegenüberstellung der geplanten und erreichten Ziele

Wie geplant, wurden ISCB-Isolate termingerecht zur Verfügung gestellt und auf Reinheit kontrolliert. 10 der 11 Isolate wurden durch DNA-Fingerprints und ITS-Sequenzen charakterisiert. Die fehlenden DNA-Daten des fehlenden Isolats ISCB44 haben keinen Einfluss auf die Schlussfolgerungen der Feldstudie. Die AM-Pilz-Sporen in den kommerziellen Inokula wurden zusätzlich zur ursprünglichen Planung charakterisiert. Die native Population wurde in zwei Feldstandorten morphologisch bestimmt. Im Arbeitsplan war offengelassen, ob der Inokulationserfolg in einem Erdbeer- oder Lauchfeld molekular kontrolliert werden sollte. Aus verschiedenen methodischen Gründen wurde das Lauchfeld ausgewählt. Wie geplant, wurden die dortigen native und inokulierten Pilze mit molekularen Methoden charakterisiert. Zusätzlich zum Standard-Methodenspektrum wurde ein spezieller PCR-Primer für *Glomus constrictum* erstellt. Wie im Projektantrag erläutert, ist ein Inokulationserfolg nur nachweisbar, wenn keine nahverwandten Pilze in der nativen Population vorhanden sind. Dies war wahrscheinlich nur für ISCB44 gegeben.

6. Literaturverzeichnis

- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Domínguez L, Sérsic A, Leake JR & Read DJ (2002) Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419**, 389-393.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH & Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**, 431.
- Hijri M, Redecker D, Macdonald-Comber Petetot JA, Voigt K, Wöstemeyer J & Sanders IR (2002) Identification and isolation of two Ascomycete fungi from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4567-4573.
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR & Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* **12**, 225-234.
- Merryweather J & Fitter A (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist* **138**, 117-129.

- Morton JB (1988) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* **32**, 267-324.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T & Wiemken A (2003a) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2816-2824.
- Oehl F, Wiemken A & Sieverding E (2003b) *Glomus aureum*, a new sporocarpic arbuscular mycorrhizal fungal species from european grasslands. *Journal of Applied Botany* **77**, in press.
- Redecker D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* **10**, 73-80.
- Redecker D, Hijri I & Wiemken A (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica* **38**, 113-124.
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C & Werner D (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1756-1761.
- Schwarzott D, Walker C & Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 190-197.
- Swofford DL (2001) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A & Gianinazzi-Pearson V (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25 rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* **7**, 879-887.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols, a guide to methods and applications* (eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ), pp. 315-322. Academic Press.