

**Einfluss von Bodenamöben (*Acanthamoeba castellanii* Neff)
auf das Wachstum von Pflanzen und die bakterielle
Rhizosphärengemeinschaft**

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

genehmigte Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

von

Knut Kreuzer

aus Darmstadt

Referent: Prof. Dr. Stefan Scheu

Koreferent: Prof. Dr. Cornelia Ullrich-Eberius

Tag der Einreichung: 24. August 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2004

Darmstadt 2004

D 17

Für meine Familie

Arschbombe

LASSE F. KREUZER

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Rhizosphäre	4
1.2 Wurzeln und Rhizodeposite	7
1.3 Bakterien	8
1.4 Protozoen	9
1.5 VA-Mykorrhiza	10
1.6 Ziel der Arbeit	11
2 Material und Methoden	15
2.1 Organismen	15
2.1.1 Amöben	15
2.1.2 Boden-Mikroorganismen	15
2.1.3 Pflanzen	16
2.1.4 VA-Mykorrhiza	18
2.2 Auswertung	18
2.2.1 Protozoendichte	18
2.2.2 Mykorrhizierung	18
2.2.3 Zellvolumen der Bakterien	19
2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	19
2.2.5 Metabolismus der Mikroorganismen	20
2.2.6 Boden-Respiration	21
2.2.7 Wurzelarchitektur	22
2.2.8 Phytohormone	22
2.2.9 C/N-Gehalt	25
2.2.10 Nitrat und Ammonium im Boden	25
2.2.11 Statistik	26
3 Etablierung eines aeroponischen Systems zur Untersuchung des Einflusses von Amöben auf die Wurzelarchitektur, die Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme von <i>Lolium perenne</i> L. und <i>Oryza sativa</i> L. und der mikrobiellen Gemeinschaft in deren Rhizosphäre	27
3.1 Einleitung	27
3.2 Material und Methoden	30
3.3 Ergebnisse	35
3.4 Diskussion	44

4	Einfluss von Amöben auf das Pflanzenwachstum, die Stickstoffaufnahme und die Bakteriengemeinschaft in der Rhizosphäre von <i>Lolium perenne</i> L. und <i>Oryza sativa</i> L. in Systemen auf Agar	47
4.1	Einleitung	47
4.2	Material und Methoden	50
4.3	Ergebnisse	52
4.4	Diskussion	58
5	Einfluss von Amöben und VA-Mykorrhiza auf das Wachstum von <i>Lolium perenne</i> L. und <i>Plantago lanceolata</i> L. in Bodensystemen	61
5.1	Einleitung	61
5.2	Material und Methoden	63
5.3	Ergebnisse	66
5.4	Diskussion	75
6	Einfluss von Amöben auf die Aktivität von Auxin und Cytokinin in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i> Heyn. in Bodensystemen	79
6.1	Einleitung	79
6.2	Material und Methoden	82
6.3	Ergebnisse	86
6.4	Diskussion	93
7	Abschließende Diskussion	96
8	Literatur	102
Anhang		
	Abkürzungsliste	A-1
	Rezepturen	A-2
	Tabellenverzeichnis	A-6
	Abbildungsverzeichnis	A-7
	Bilder	A-9
Publikationsliste		
Lebenslauf		
Eidesstattliche Erklärung		
Danksagung		

Zusammenfassung

Die Rhizosphäre ist der eng begrenzte Raum um die Wurzel von Pflanzen, welcher von der lebenden Wurzel durch die „Rhizodeposition“, die Abgabe von leicht abbaubaren organischen Verbindungen, beeinflusst wird. Damit wird die mikrobielle Aktivität in diesem für die Pflanze hochsensiblen Bereich der Wasser- und Nährstoffaufnahme deutlich erhöht. Protozoen beweiden die Bakterien in der Rhizosphäre und fördern damit indirekt das Pflanzenwachstum, vor allem das der Wurzeln.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Nacktamöben als Modellorganismen bakterivorer Protozoen auf mikrobielle Rhizosphärengemeinschaften und das Wurzelwachstum in Experimentalsystemen mit Substraten unterschiedlicher Komplexität untersucht. Die verwendeten Systeme eigneten sich, verschiedene Fragestellungen zur Untersuchung der Wechselwirkungen in der Rhizosphäre zu untersuchen.

Die Beweidung durch Amöben veränderte die mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaften in morphologischer, metabolischer und taxonomischer Hinsicht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass beweidete Rhizosphärengemeinschaften die Rhizodeposition von verschiedenen Pflanzen artspezifisch so modifizieren, dass die Wurzeln mit veränderter Rhizodeposition eigene Mikrohabitate bilden. Darüber hinaus förderte die Amöbenbeweidung zumindest auf Agar die Dominanz von β -Proteobakterien, zu deren Gruppe viele nitrifizierende Bakterien gehören, die Nitrit zu Nitrat oxidieren. Tatsächlich trat teilweise eine erhöhte Nitrat-Konzentration in Böden mit Amöben auf.

Exogen appliziertes Nitrat fördert die Streckung der Wurzeln. Diese Wurzelstreckung in Anwesenheit von Amöben wurde bei allen untersuchten Pflanzenarten (*Lolium perenne* L., *Oryza sativa* L., *Plantago lanceolata* L. und *Arabidopsis thaliana* Heynh.) festgestellt und ist damit vermutlich ein allgemeiner Effekt von beweideten Rhizosphärengemeinschaften auf das Wurzelwachstum. Meist ging die Wurzelstreckung einher mit einer teilweise drastischen Steigerung der Anzahl der Seitenwurzeln (maximal um den Faktor fünf). Diese Effekte traten unabhängig von der Nährstoffsättigung der Pflanzen auf. Die gesteigerte Anzahl von Seitenwurzeln dürfte die nährstoffaufnahmefähige Wurzeloberfläche der Wurzelhaarzonen einer Pflanze erhöhen. Durch die zusätzliche Wurzelstreckung in Behandlungen mit Amöben kann

die Nährstoffaufnahme der Seitenwurzeln in Bodenbereichen stattfinden, in denen nicht zuvor schon die Hauptwurzel die Nährstoffe durch eigene Aufnahme abgereichert hat. Durch die Kombination von Wurzelstreckung und Seitenwurzelbildung sollten Pflanzen in Amöben-Behandlungen mehr Nährstoffe aufnehmen können. Erwartungsgemäß nahm daher der Stickstoffgehalt im Spross von *L. perenne* und die Stickstoffkonzentration im Spross von *O. sativa* zu.

Die Bildung von Seitenwurzeln kann durch Applikation von exogenem Auxin oder bestimmten wuchsfördernden Bakterien stimuliert werden. In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von beweideten Rhizosphärengemeinschaften auf die Auxin- und Cytokinin-Aktivität in der Pflanze untersucht. Der Einfluss der Amöben war in den zwei durchgeführten Versuchen nicht einheitlich. Dennoch erhöhte sich in beiden Versuchen die Anzahl der Wurzelspitzen in ähnlicher Weise. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bakteriogene Signalstoffe in der Rhizosphäre einen größeren Einfluss auf die Seitenwurzelbildung besitzen als die mittels *GUS*-Expression bestimmte Auxin- und Cytokinin-Aktivität. Da Auxin und Cytokinin in komplexe Regulationsprozesse anderer wichtiger Phytohormone wie Ethylen und Abscisinsäure involviert sind, können Amöben indirekt vermutlich den Hormonhaushalt der Pflanzen über die Aktivität der beiden untersuchten Phytohormone hinaus beeinflussen.

In Versuchen mit Amöben und VA-Mykorrhiza wurde untersucht, ob die Wirkungen dieser Organismen auf das Wachstum und die Nährstoffaufnahme von *L. perenne* und *P. lanceolata* pflanzlichen Regulationsmechanismen unterworfen sind, und ob die Bodenorganismen um die Rhizodeposite der Pflanzen konkurrieren, wie dies zuvor für Protozoen und Ekto-Mykorrhiza dokumentiert wurde. Die Ergebnisse lieferten keine eindeutigen Hinweise auf eine Konkurrenz zwischen Amöben und VA-Mykorrhiza um pflanzliche Rhizodeposite. Hinsichtlich des Pflanzenwachstums, nicht jedoch bezüglich der Stickstoffaufnahme, hoben sich die Wirkungen von Amöben und VA-Mykorrhiza sowohl bei *L. perenne* als auch bei *P. lanceolata* auf. Offensichtlich sind die beiden untersuchten Pflanzen nur zu einer Regulation der morphologischen Einflüsse der untersuchten Organismen fähig.

In einem Konkurrenzversuch wurde untersucht, ob eine unterschiedliche Plastizität im Wurzelwachstum, eine unterschiedliche Affinität zu Mykorrhiza und die im Versuch mit Monokulturen mit VA-Mykorrhiza festgestellte Förderung der Stickstoff-Aufnahme bei *P. lanceolata* und der Hemmung bei *L. perenne* die Konkurrenz beider Pflanzen

beeinflusst. Tatsächlich wurde die Konkurrenz der beiden Pflanzen, die auch im Freiland miteinander konkurrieren, durch die Behandlung mit Amöben oder Mykorrhiza zugunsten von *L. perenne* verschoben. Durch die hohe Nährstoffverfügbarkeit in diesem Versuch waren die Wirkungen der Bodenorganismen jedoch schwach ausgeprägt. Die Experimente zeigten jedoch, dass Protozoen - wie auch Mykorrhiza - das Potenzial besitzen, über eine Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft im Boden die Konkurrenz von Pflanzen zu verändern.

Die Ergebnisse der Versuche unterstützen die Hypothese, dass die Wechselwirkungen zwischen Protozoen, Mikroorganismen und Pflanzen hauptsächlich auf der Produktion von Signalstoffen basieren.

1 Einleitung

1.1 Rhizosphäre

Der Begriff „Rhizosphäre“ ist definiert als die eng begrenzte Bodenzone, die dem Einfluss der lebenden Wurzeln unterliegt, was sich in einer Stimulierung der mikrobiellen Aktivität durch pflanzliche Exsudate äußert (Hiltner 1904). Die Rhizosphäre umfasst den Boden im Umkreis von einem bis wenigen Millimetern um die Wurzel und ist die Grenzschicht zwischen Pflanzen und Boden mit intensiver Besiedlung durch Mikroflora und Mikrofauna. Die Wurzeloberfläche selbst wird Rhizoplane genannt und ist Teil der Rhizosphäre (Clark 1949). Für das pflanzliche Wachstum ist die Rhizosphäre von großer Bedeutung, da hier die Wasser- und Nährstoffaufnahme in einem Bereich höchster mikrobieller Aktivität stattfindet. Pflanzen fördern diese Aktivität durch Abgabe von sogenannten Rhizodepositen, die bis zu 40% ihres assimilierten Kohlenstoffs ausmachen können (Lynch & Whipps 1990). Diese Rhizodeposition hebt die starke Kohlenstofflimitierung der Boden-Mikroflora teilweise auf (Wardle 1992). Das „microbial-loop“-Modell nach Clarholm (1985; Abb. 1) erklärt die Förderung der potenziellen mikrobiellen Nährstoff-Konkurrenten der

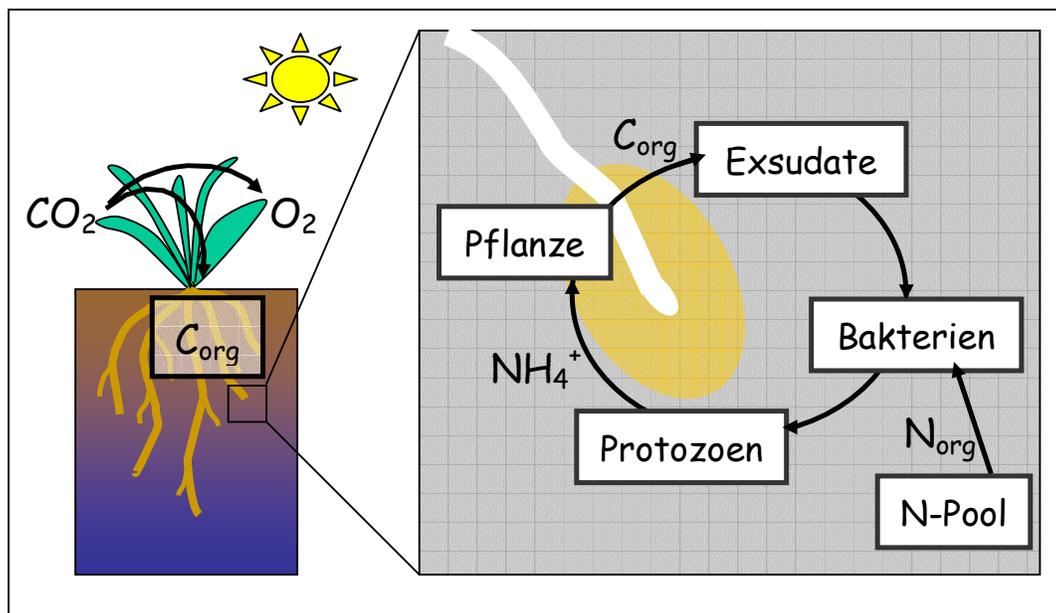


Abbildung 1: Modell des "Microbial loop" nach Clarholm (1985) zur Erklärung wuchsfördernder Effekte von Protozoen auf Pflanzen; C_{org} = organische Kohlenstoff-Verbindungen; N_{org} = organische Stickstoff-Verbindungen.

Pflanze durch die erhöhte Mobilisierung von Nährstoffen aus der bakteriellen Biomasse in den Exkreten von Protozoen, die die Bakterienrasen in der Rhizosphäre beweiden (Christensen et al. 1992, Griffiths 1994, Bonkowski et al. 2000a). Die bakterielle Gemeinschaft der Rhizosphäre wird durch die Beweidung in ihrer Zusammensetzung und Aktivität verändert (Alpei et al. 1996, Griffiths et al. 1999, Rønn et al. 2002). Die Mechanismen hierfür können vielfältig sein (Hahn & Höfle 2001): Taxa mit großer morphologischer Plastizität können ihr Zellvolumen verändern und somit der Prädation entgehen; bestimmte Taxa werden bevorzugt gefressen („selective grazing“), andere werden unverdaut ausgeschieden (Weisse 2002); manche langsam wachsende Bakterien können vom gesenkten Konkurrenzdruck und einer veränderten Nährstoffverfügbarkeit profitieren und bestimmte Arten reagieren mit starkem kompensatorischen Wachstum auf die Beweidung (Weekers et al. 1993, Posch et al. 1999). Die Beweidung kann hierdurch Bakterien fördern, die z.B. Phytohormone wie das Auxin Indol-3-Essigsäure (IES) produzieren (Bonkowski & Brandt 2002).

Pflanzen reagieren auf den Anstieg dieser Hormonbildner mit der Bildung von Seitenwurzeln, vergleichbar mit der externen Applikation von Auxin (El-Khawas & Adachi 1999, Falasca & Altamura 2003, Fukaki & Tasaka 2004). Bonkowski & Brandt (2002) haben hierzu das Modell der „hormonellen Wechselwirkungen“ aufgestellt („hormonal interactions“; Abb. 2). In diesem Modell werden die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen, Mikroorganismen und Protozoen als Rückkopplungssystem beschrieben. Die Protozoen induzieren indirekt durch die Veränderung der Bakteriengemeinschaft die Bildung neuer Seitenwurzeln und somit die Ausscheidung weiterer Exsudate. Bei starkem bakteriellem Wachstum im Bereich der Seitenwurzeln entstehen so weitere nahrungsreiche Habitate für die Protozoen. Pflanzen profitieren von der gesteigerten Seitenwurzelbildung durch die Erhöhung der Oberfläche für die Nährstoffaufnahme (siehe Kap. 1.2).

Pflanzen scheiden 10-20% des assimilierten Kohlenstoffs als Exsudate aus (siehe Kap. 1.2; Rovira 1991). Außerdem können Pflanzen jeweils bis zu 20% des assimilierten Kohlenstoffs in direkte mutualistische Beziehungen mit bakteriellen (Rhizobien) und pilzlichen (Mykorrhiza) Partnern für eine zusätzliche Versorgung mit Nährstoffen (N, P) investieren (Marschner et al. 1992, Söderström 1992, Smith & Read 1997). Die Pflanze kann vermutlich die Investition in diese Symbiosen dosieren, um die Kosten/Nutzen-Relation zu optimieren; sie ist damit in der Lage, den eigenen

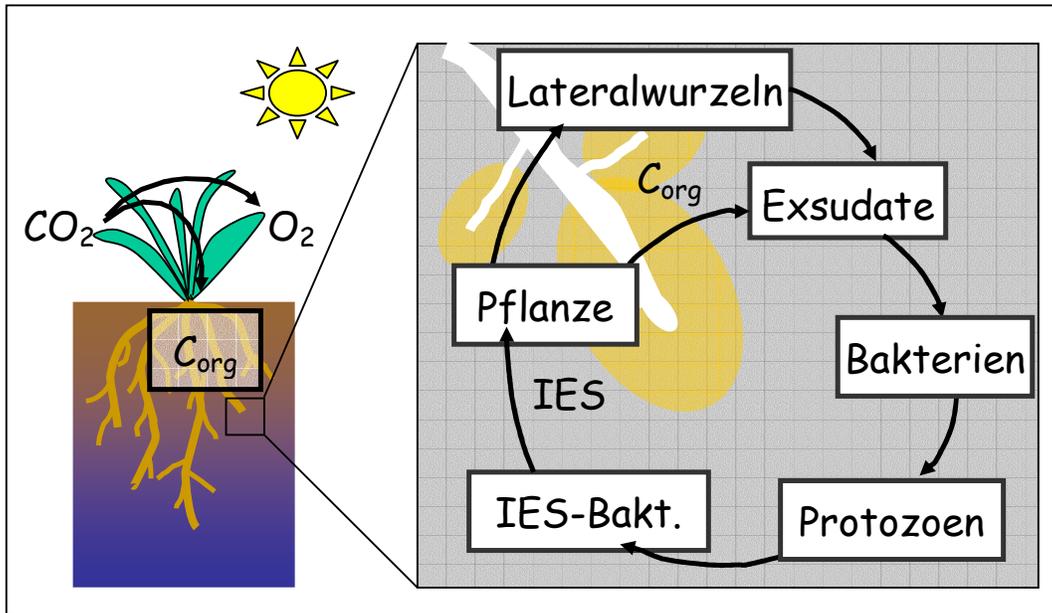


Abbildung 2: Modell der „Hormonal interactions“ nach Bonkowski & Brandt (2002) zur Erklärung wuchsfördernder Effekte von Protozoen auf Pflanzen; C_{org} = organische Kohlenstoff-Verbindungen; N_{org} = organische Stickstoff-Verbindung; IES = Indol-Essigsäure.

physiologischen Status mit der mikrobiellen Nachbarschaft in der Rhizosphäre zu koppeln (Bonkowski et al. 2001, Farrar et al. 2003).

Die Pflanze ist auf (chemische) Informationen aus der Rhizosphäre angewiesen, um Partner wie Pathogene zu erkennen und auf diese entsprechend reagieren zu können. Solche Signalstoffe wie z.B. N-Acyl-L-Homoserin-Laktone (AHL) und Phenazine spielen bei den komplexen Erkennungsmechanismen zwischen Pflanze und mikrobiellen Symbiosepartnern an der Wurzelspitze eine bedeutende Rolle („rhizosphere control points“, Bacon et al. 2002, Hirsch et al. 2003, Mathesius et al. 2003, Philips et al. 2003). Weitere bakteriogene Signalstoffe für die Pflanze sind z.B. Auxin und Nitrat (Lambrecht et al. 2000, Zhang & Forde 2000). Diese Signale können durch Protozoen modifiziert werden (Bonkowski & Brandt 2002, Griffiths et al. 2004; siehe Kap. 6).

1.2 Wurzeln und Rhizodeposite

Zu den wichtigsten Funktionen der Pflanzenwurzel gehören die mechanische Verankerung der Pflanze im Boden, die Graviperzeption, die Bildung von Cytokinin und die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen. Die Aufnahmefähigkeit ist hierbei auf die jungen Wurzeln mit durchlässiger primärer Wurzelrinde – und hierbei weitgehend auf die Wurzelhaarzone – beschränkt. Die Wurzelhaarzone folgt akropetal hinter der Wurzelspitze (mit dem meristematischen Gewebe und der vor mechanischer Verletzung schützenden Kalyptra) und hinter der Streckungszone (Streckung und Ausdifferenzierung der Zellen; Abb. 3). Die kurzlebigen Wurzelhaare sind Ausstülpungen bestimmter Rhizodermiszellen (Idioblasten) und eignen sich aufgrund ihrer großen Oberfläche und ihrer dünnen Zellwand hervorragend für den Stoffaustausch. Oberhalb der Wurzelhaarzone beschränkt sich der Kontakt zwischen dem Zentralzylinder der Wurzel mit seinem Leitgewebe und der Wurzeloberfläche auf wenige, genetisch determinierte Zellen („Durchlasszellen“). Die Seitenwurzeln werden endogen im Zentralzylinder angelegt und durchstoßen als Primordien mit ihrem meristematischem Wachstum die Wurzelrinde von innen, wobei die darüber liegenden Rindenzellen abgestoßen werden. Hormonelle Prozesse induzieren das Streckenwachstum der Primordien und führen zur Entwicklung von neuen Seitenwurzeln (Wightman et al. 1980).

Die organischen Substanzen, die von der Wurzel in die Rhizosphäre abgegeben werden (Rhizodeposite), variieren in

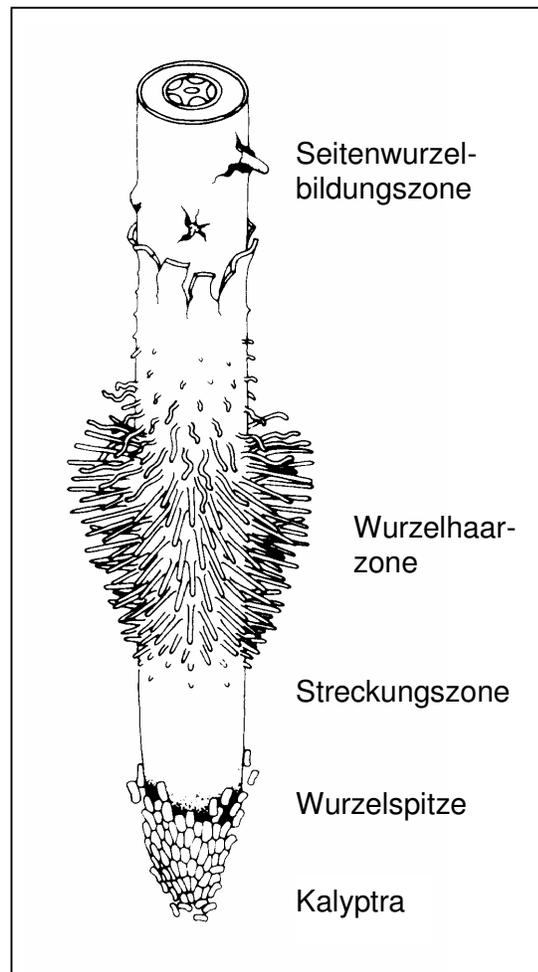


Abbildung 3: Aufbau einer primären Wurzel (nach Lüttge 1983)

ihrer chemischen und strukturellen Komplexität stark. Sie bestehen hauptsächlich aus Zuckern, Aminosäuren, Fettsäuren und anderen organischen Säuren, aber auch aus Phytohormonen, Wachstumsfaktoren und Sekundärmetaboliten. Sie werden nach der Form der Ausscheidung als Exsudate (an der Epidermis energieunabhängig abgegebene Substanzen), Sekrete (energieabhängig ausgeschiedene Substanzen), Mucilagen (schleimige Aggregate, entweder in der Kalyptra gebildet oder Abbauprodukte von Zellwänden) und Lysate (bei der Autolysis abgestoßener Zellen entstanden) klassifiziert (Curl & Truelove 1986). Entsprechend ihrer Abbaubarkeit überwiegen an der jungen Wurzelspitze leicht zersetzliche Substanzen; in der Rhizosphäre älterer Wurzelabschnitte sind dagegen hauptsächlich komplexe, schwer abbaubare organische Substanzen zu finden. An den verschiedenen Wurzelabschnitten etablieren sich Gemeinschaften von Mikroorganismen, deren metabolisches Potenzial auf die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen abgestimmt ist (Semenov et al. 1999, Jaeger et al. 1999, Yang & Crowley 2000).

1.3 Bakterien

Bakterien sind mit den Pilzen die nach Individuenzahl und Biomasse dominanten Organismengruppen im Boden (ca. 10^{12} - 10^{15} Bakterien und 10^9 - 10^{12} Pilzsporen pro m^3 Boden; Gisi et al. 1997). Generell erfüllen Bakterien und Pilze, zusammengefasst als Mikroflora, die wichtige Aufgabe der Primärzersetzung von organischem Material, bei der für das Pflanzenwachstum notwendige Nährstoffe mineralisiert werden. Die funktionelle (metabolische) Diversität der Mikroflora ist nur zum Teil geklärt, da bisher weniger als 1% der angenommenen Arten kultiviert werden konnten (Torsvik & Øvreas 2002). Eine Ursache für die hohe Diversität im Boden (mehrere Tausend Arten pro Gramm; Roselló-Mora & Amann 2001) ist seine große räumliche und zeitliche Heterogenität. Der Boden weist, in Abhängigkeit von abiotischen und biotischen Faktoren (z.B. Gesteinsart, Klima, Größenstruktur/Refugialraum der Partikel und deren Adsorptionsfähigkeit für Nähr- und Giftstoffe, Aktivität anderer Bodenorganismen und Pflanzen), charakteristische Habitateigenschaften auf, die zudem einer hohen räumlichen wie zeitlichen Fluktuation in der Verfügbarkeit von Ressourcen (Nährstoffe,

Wasser und Sauerstoff) unterliegen. Aus Sicht der Organismen stellt sich der Boden also als Mosaik von fein differenzierten Mikrohabitaten dar.

Die Rhizosphäre ist charakterisiert durch hohe Bakteriendichten: Diese sind um den Faktor 6-60 höher als im wurzelfreien Boden (Übersicht in Curl & Truelove 1986). Das Ressourcenangebot ist deshalb trotz der pflanzlichen Rhizodeposition limitiert und nur angepasste, konkurrenzstarke Arten siedeln erfolgreich in der Rhizosphäre. Die Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen in der Rhizosphäre sind seit der Evolution von Landpflanzen mit effektivem Wurzelsystem vor etwa 400 Millionen Jahren einem koevolutiven Prozess unterworfen (Phillips et al. 2003). Dieser Prozess hat ein breites Spektrum von Symbiosen (z.B. Rhizobien, Mykorrhiza) und parasitischen Beziehungen (z.B. Wurzelfäulen) hervorgebracht. In den letzten Jahren wurde eine große Zahl von Bakterien entdeckt, die das Pflanzenwachstum fördern („plant growth promoting rhizobacteria“, PGPR; Übersicht in Kapulnik & Okon 2002). Die bisher bekannten Mechanismen für die Wachsförderung sind die Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit (Arshad & Frankenberger 1998), die Stimulation des Wurzelwachstums, v. a. der Seitenwurzelbildung (Larcher et al. 2003) und die Verdrängung pathogener Konkurrenten („Biocontrol“; Bagnasco et al. 1998, Whipps 2001).

1.4 Protozoen

Als Protozoen werden mikroskopisch kleine, eukaryotische Einzeller (10-1000 μm) mit paraphyletischer Herkunft zusammengefasst (Sohlenius 1980; Hausmann & Hülsmann 1996). Aus bodenökologischer Sicht gehören Ciliaten, Flagellaten und Amöben zu den dominanten Organismengruppen. Ciliaten und Flagellaten bewegen sich mit Hilfe von Cilien bzw. Flagellen schwimmend fort. Nackt- und Schalenamöben bewegen sich durch Ausstülpungen von Pseudopodien kriechend vorwärts. Aufgrund ihrer meist ungeschützten Plasmamembran sind Protozoen auf aquatische Habitate angewiesen, wobei vor allem den Amöben ein dünner Wasserfilm wie z.B. das Haftwasser im Boden ausreicht. Verschlechtern sich die Lebensumstände (z.B. durch Trockenheit oder Nahrungsmangel), so können alle bodenlebenden Protozoen Zysten (Dauerstadien mit fester Außenhülle) bilden. Diese Zysten sind über Jahre hinweg lebensfähig; unter

geeigneten Bedingungen können sich die Protozoen umgehend exzystieren. Die im Boden lebenden Protozoen reproduzieren sich vorwiegend asexuell durch mitotische Teilung, die sich bei bestimmten Taxa unter optimalen Bedingungen in zwei bis vier Stunden wiederholen kann.

Protozoen sind mit Dichten von $1-6 \cdot 10^5$ Individuen pro Gramm Boden die dominanten Bakterienfresser im Boden (Übersicht in Bonkowski 2004). Sie sind jedoch räumlich heterogen verteilt: Gegenüber dem wurzelfreien Boden kann die Protozoendichte in der Rhizosphäre erhöht sein, da hier starkes mikrobielles Wachstum optimale Nahrungsbedingungen schafft (Faktor 2-3 und für die schnell reproduzierenden Amöben Faktor 9-20; Curl & Truelove 1986, Zwart et al. 1994, Alpei et al. 1996). Protozoen können auf kurze Entfernung Beuteorganismen wie Bakterien, Pilze, Algen, Nematoden oder andere Protozoen chemotaktisch aufsuchen, um sie zu phagozytieren (Verity 1991, Snyder 1991, Boenigk & Arndt 2002). Im Gegensatz zu bakteriophagen Nematoden können sie jedoch nur sehr eingeschränkt zu Orten hoher mikrobieller Aktivität wandern (Griffiths & Caul 1993).

1.5 VA-Mykorrhiza

Pilze im Boden lassen sich nach ihrer Ernährungsweise in saprophytische Pilze, d.h. totes organisches Material zersetzend, und Mykorrhiza-Pilze unterscheiden. Mykorrhiza-Pilze bilden direkte mutualistische Beziehungen zu höheren Pflanzen und Moosen aus (Nebel et al. 2004), bei denen der Pilz die Pflanzen mit Nährstoffen und Wasser versorgt und dafür von den Pflanzen organische Verbindungen (vor allem als Kohlenstoffquelle), erhält. Endo-Mykorrhiza penetriert die Wurzeln von nicht verholzenden Pflanzen (mit weitem Wirtsspektrum) in der Streckungszone und bildet Hyphen mit vaskulären und arbuskulären Strukturen innerhalb von Rindenzellen (VA-Mykorrhiza; Smith & Read 1997). Pilzhyphen haben mit ihrem feinen Netzwerk vor allem bei der Aufnahme von immobilisierten Ionen wie PO_4^{3-} Vorteile gegenüber den dickeren, weniger dicht verteilten Pflanzenwurzeln. Darüber hinaus kann Mykorrhiza Abwehrmechanismen gegen Wurzelpathogene und eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber abiotischen Faktoren wie Trockenheit, Frost, Salz und Schwermetallen vermitteln (Übersicht in Kottke 2002). Die Verbindung zwischen einer Mykorrhiza-Art

und dem pflanzlichen Wirt kann mutualistisch, neutral oder parasitisch ausgeprägt sein, je nach Nährstoffversorgung im Boden, Wirtspflanze und Besiedlungsdichte (Johnson et al. 1997, Gange & Ayres 1999, Klironomos 2003).

1.6 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Nacktamöbe *Acanthamoeba castellanii* Neff auf die mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaften, die Nährstoffaufnahme und das Wachstum von Pflanzen untersucht, und hierbei insbesondere deren Wirkung auf die Wurzelarchitektur. Dabei sollten verschiedene Versuchssysteme mit unterschiedlicher Substratkomplexität auf ihre Eignung hin untersucht werden, den Einfluss der Amöben auf die mikrobiellen Gemeinschaften und das Wurzelwachstum darstellen zu können. Außerdem sollten die Untersuchungen helfen, die Bedeutung von nährstoffbasierten oder signalstoffbasierten Wechselwirkungen in der Rhizosphäre aufzuklären, an denen Protozoen beteiligt sein können. Die in den einzelnen Kapiteln behandelten Fragestellungen sind in Abbildung 4 dargestellt und nachfolgend beschrieben. Die Nährstoffaufnahme einer Pflanze wird von der aufnahmefähigen Wurzeloberfläche im Bereich der Wurzelhaare und der Fähigkeit bestimmt, über diese Oberfläche Nährstoffe aufnehmen zu können. In aeroponischen Systemen sollte der Einfluss von Amöben auf diese Nährstoffaufnahmefähigkeit erstmals untersucht werden (Kap. 3). In aeroponischen Systemen wachsen Pflanzenwurzeln in einem Nebel aus Nährmedium. Eine solche Behandlung ermöglicht die Messung der Nährstoffaufnahme von vollkommen intakten Wurzelsystemen und den Bezug der Nährstoffaufnahme auf die Anzahl der Wurzelspitzen, an den die aufnahmefähige Oberfläche räumlich eng gekoppelt ist. Neben der Etablierung eines geeigneten aeroponischen Systems und der Messung von Pflanzenwachstum und Nährstoffaufnahme sollte in zwei Versuchen auch der Einfluss der Amöbenbeweidung und der Pflanzenart auf die mikrobielle Gemeinschaft auf der Wurzeloberfläche anhand der Analyse von Mustern der Substratnutzung (BIOLOG®) untersucht werden. Auch hierfür eignen sich aeroponische Systeme im besonderen Maße, da bei Verwendung des gleichen Mediums in Versuch und Messzyklus, bei dem den Mikroorganismen verschiedene Kohlenstoffquellen angeboten werden, kein zusätzlicher

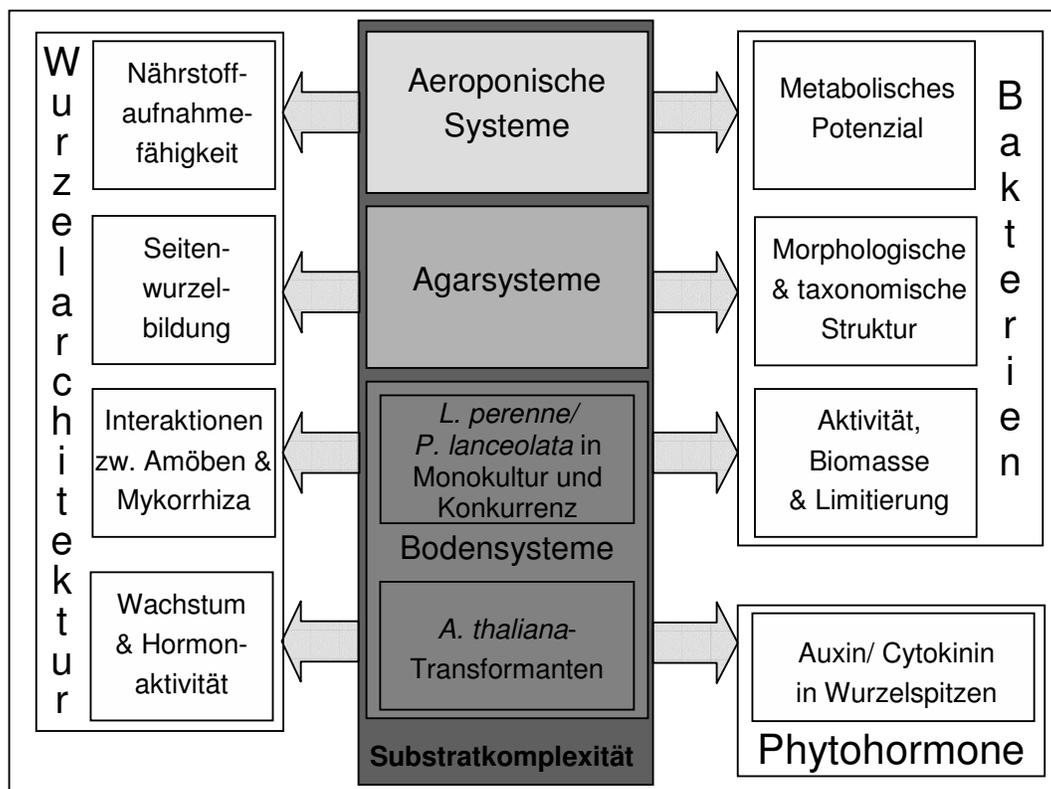


Abbildung 4: Gliederung der durchgeführten Versuche nach Untersuchungszielen und Substratkomplexität.

Kultivierungseffekt wie beispielsweise bei der Verwendung von Bodenproben entsteht. In aeroponischen Systemen steht den Mikroorganismen als einziges Habitat die Rhizoplane der Wurzeln zur Verfügung. Daher stellt ein aeroponisches System für Untersuchungen von Wechselwirkungen in der Rhizosphäre die niedrigste Komplexitätsstufe für Substrate dar. Für die Bakterien gibt es auf der Wurzeloberfläche nahezu keinen feindfreien Raum; damit dürfte der Einfluss der Amöben und der Pflanzen auf die mikrobielle Gemeinschaft in diesem System besonders stark sein. Als Modellpflanze diente allgemein das Deutsche Weidelgras *Lolium perenne* L. Dieses Gras besitzt ein fein verzweigtes, homorhizes Wurzelsystem und eine hohe Plastizität im Wurzelwachstum, um z.B. auf sich ändernde Nährstoffversorgung durch Bodenorganismen zu reagieren (z.B. Hodge et al. 1999, Kreuzer et al. 2004). Da in dem System die Nährstoffaufnahme nur von relativ großen Wurzelsystemen messbar ist, wurde zusätzlich der stärker wüchsige Reis, *Oryza sativa japonica* cv. Zhonghua11 L., eingesetzt. Der ständige Nachschub des Nährmediums sollte den Pflanzen eine optimale Nährstoffversorgung gewährleisten, wodurch in diesem System auf Nährstoffen

basierende Effekte der Amöben auf das Pflanzenwachstum reduziert sein sollten (vgl. Clarholm 1985).

In Agarsystemen sollte der Einfluss der Amöben auf das Wurzelwachstum und die Seitenwurzelbildung von *L. perenne* und *O. sativa* unter dem Gesichtspunkt einer optimierten Nährstoffaufnahme ebenso untersucht werden wie deren Einfluss auf Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft (Kap. 4). Viele Untersuchungen haben das Wurzelwachstum von *O. sativa* analysiert und bieten Anknüpfungspunkte zu dieser Arbeit. Das zweidimensionale Wachstum der Pflanzenwurzeln auf dem Agar sollte die Beobachtung des Wachstums schon im Versuchsverlauf ermöglichen. Zudem sollten sich bei Versuchende die Wurzeln leicht von der Agaroberfläche lösen lassen. Den Mikroorganismen dürften sich auf dem Agar von der Rhizodeposition der Pflanzen weniger stark beeinflusste Bereiche bieten; aber auch auf dem wenig komplexen Agar sollten Bakterien - im Gegensatz zu natürlichen Verhältnissen im Boden - keine Refugien finden, um dem Fraßdruck der Amöben zu entfliehen. Deshalb sollte der Einfluss der Amöbenbeweidung auf die Bakteriengemeinschaft auf Agar besonders groß sein. Das strukturell einfache Substrat sollte einerseits eine komplette Ablösung der Bakterienzellen erleichtern, um die Bestimmung der Volumina zu ermöglichen, und andererseits die Untersuchung kleinräumiger Verteilungsmuster verschiedener Bakterienstämme mittels der FISH-Methode zulassen.

In Bodensystemen wurden die Wechselwirkungen von Amöben und VA-Mykorrhiza auf das Pflanzenwachstum von *L. perenne* und *Plantago lanceolata* L. untersucht (Kap. 5). *L. perenne* und *P. lanceolata* treten in Wiesengesellschaften häufig gemeinsam auf, unterscheiden sich jedoch im Aufbau ihres Wurzelsystems und ihrer Affinität zu Mykorrhiza (Grime et al. 1987). In einem Versuch mit beiden Pflanzen in Monokulturen sollte untersucht werden, in welcher Weise Amöben und Mykorrhiza das Wachstum und die Stickstoffaufnahme der Pflanzen beeinflussen und ob Pflanzen, Amöben und VA-Mykorrhiza hierbei in ähnlicher Weise interagieren, wie dies für Ekto-Mykorrhiza von Bonkowski et al. (2001) gezeigt wurde. Im zweiten Versuch mit beiden Pflanzen in Konkurrenz sollte untersucht werden, ob Amöben und Mykorrhiza die Konkurrenz zwischen beiden Pflanzen beeinflussen können. Zusätzlich sollte der Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die gegenseitige Dichte und dazu die Atmungsaktivität und Biomasse der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden und deren Nährstofflimitierung untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten Hinweise für

den Einfluss von Amöben und VA-Mykorrhiza auf eine mögliche Konkurrenz um pflanzliche Rhizodeposite liefern. Versuche in Boden stellen für Pflanzen wie Mikroorganismen bezüglich der Substratstruktur komplexe und relativ naturnahe Systeme dar. Die Rhizosphäre kann sich hier deutlich vom umgebenden Boden differenzieren und Bakterien können in Poren Refugien vor eukaryotischen Prädatoren wie Protozoen und Nematoden finden. Solche Refugien können die Aktivität der Mikroorganismen beeinflussen (Wright et al. 1995). Zudem sind Konkurrenzversuche mit Pflanzen nur in Bodensystemen möglich, in denen eine räumliche Okkupation des Bodens und ein damit verbundener Vorteil der Ausbeutung einer begrenzten Menge an Nährstoffen möglich ist.

Ebenfalls in Bodensystemen sollte untersucht werden, ob Amöben indirekt auf die Aktivität der Phytohormone Auxin und Cytokinin in den Wurzelspitzen einwirken und wie sich der Einfluss der Amöben auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* Heynh. auswirkt (Kap. 6). Die Amöbenbeweidung kann den Anteil auxinproduzierender Bakterien in der Rhizosphäre erhöhen (Bonkowski & Brandt 2002). In zwei Versuchen sollte die Kupplung der Hormonaktivitäten in der Wurzelspitze mit den Veränderungen in der Wurzelarchitektur in Behandlungen mit Amöben untersucht werden. Hierzu wurden hormonsensitive Transformanten von *A. thaliana* Heynh. eingesetzt. Um die Herkunft des Auxins zu klären, welches vermutlich an der Förderung der Seitenwurzelbildung beteiligt ist, wurde in einem zweiten Versuch der Auxingehalt in der Wurzelspitze durch den Auxintransport-Hemmstoff NPA reduziert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Amöben auf die Verfügbarkeit von Nitrat im Boden studiert, da Nitrat wie auch bakteriogenes Auxin das Wurzelwachstum beeinflussen kann (Zhang et al. 1999). Da bei den exogenen Signalstoffen die räumliche Verteilung entlang der Wurzel von Bedeutung sein kann, wurde hier Sand oder sandiger Boden als räumlich komplexes Substrat verwendet, bei dem die Säuberung der feinen Wurzeln von *A. thaliana* ohne bedeutende Verluste noch durchzuführen war.

Mit den Untersuchungen in verschiedenen Experimentalsystemen sollten unterschiedliche Fragestellungen über Wechselwirkungen in der Rhizosphäre beantwortet werden, um das Verständnis der Mechanismen zu verbessern, durch die Amöben über Beweidung der Rhizosphärgemeinschaft das Wurzelwachstum von Pflanzen in physiologischer und morphologischer Weise beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Amöben

Nacktamöben (*Acanthamoeba castellanii* Neff) wurden aus Waldboden (Göttingen) isoliert (M. Bonkowski, mdl. Mitteilung) und in Kulturflaschen mit nativen Bakterien in 1/10 NB-NMAS und bei 5°C kultiviert. Nach Page (1988) zählen Acanthamoeben zu den häufigsten freilebenden Protozoen im Boden. Sie sind somit als bakterivore Modellorganismen geeignet.

Die Amöbenkulturen wurden vor Zugabe in den Versuchen mehrmals mit 1/10 NB-NMAS gewaschen um Bakterien zu entfernen (modifiziert nach Bonkowski & Brandt 2002). Hierzu wurden 50 ml einer geschüttelten Amöbenkultur zentrifugiert (2 min bei 1000 U/min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1/10 NB-NMAS auf 20 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach jedem Waschvorgang wurden Stichproben der Pellets auf Amöben und Bakterien überprüft.

2.1.2 Boden-Mikroorganismen

Eine Suspension einer möglichst diversen Mikroorganismengemeinschaft wurde durch mehrmalige Filtration eines Wiesenbodens hergestellt (modifiziert nach Bonkowski & Brandt 2002). Hierzu wurden ca. 10 g frischer Oberboden (A_h -Horizont) einer Wiese mit hoher pflanzlicher Diversität (Gelände des Fachbereichs Biologie, TU Darmstadt) verwendet. Die pflanzliche Diversität ist positiv mit mikrobieller Diversität korreliert (Germida et al. 1998, Stephan et al. 2000). Der Boden wurde mit NMAS aufgeschwemmt, zunächst über einen Faltenfilter (595½, Schleich & Schuell, Dassel) grob gefiltert und nachfolgend über einen 1,2, 1,8 oder 3,0 µm Filter (Millipore Corp., Bedford, USA) auf eine sterile Einwegspritze aufgezogen (= einfach gefiltert). Der letzte Filtrationsschritt wurde mit der Hälfte des Filtrats wiederholt (= zweifach gefiltert). Die einfach oder zweifach gefilterten Suspensionen wurden zur Hälfte in einer Petrischale mit 1/10 NB-NMAS vermischt und nach 5 Tagen auf Kontaminationen mit Protozoen überprüft. Die andere Hälfte der Suspensionen wurde in einer Kulturflasche

mit sterilisiertem Boden vermischt und bis zum Versuchsbeginn bei 20°C gelagert. Bei einer Lagerung länger als eine Woche wurden sterilisierte Keimlinge eingesetzt, z.B. von *P. lanceolata* (Kap. 5) oder *A. thaliana* (Kap. 5 und 6), um im Boden Rhizosphären-Mikrohabitate zu schaffen.

Für die Versuche mit Agarsystemen (Kapitel 4) wurde der Oberboden ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur angetrocknet, um die Bildung von Zysten bei Protozoen zu initiieren. Der angetrocknete Boden wurde mit 1/10 NB-NMAS 20 min geschüttelt und über einen 5,0 µm Filter (Millipore Corp., Bedford, USA) gefiltert. Vor den Versuchen wurden die Filtrate in Kulturflaschen über einen Zeitraum von 5 Tagen auf Kontaminationen mit Protozoen überprüft.

Beide Verfahren waren bei einfacher Filtration (mit 3,0 oder 5,0 µm Millipore-Filter) mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10–20% protozoenfrei. Mehrmalige Filtration, kleinere Filterporen oder längeres Antrocknen erhöhten die Erfolgsrate deutlich (z.B. bei doppelter Filtration mit 3,0 µm auf ca. 60%). Die Filtrationsprozesse wurden fünf- bis zehnfach repliziert, um mindestens ein protozoenfreies Filtrat zu erhalten. Für die Versuche wurden die protozoenfreien Filtrate mit der geringsten Störung durch die Filtrationsvorgänge als Inokulum verwendet, d.h. welche bei dem größten Porendurchmesser und den wenigsten Filtervorgängen kontaminationsfrei waren. Behandlungen werden im Folgenden als „Kontrollen“ bezeichnet, wenn sie nur mit einer diversen Bakteriensuspension inokuliert wurden (im Gegensatz zu „Amöben-Behandlung“).

2.1.3 Pflanzen

In den Versuchen wurden die Pflanzenarten *Lolium perenne*, *Oryza sativa*, *Plantago lanceolata* und *Arabidopsis thaliana* eingesetzt.

Für die Untersuchung der Wurzelarchitektur eignen sich Pflanzen mit einer großen Plastizität im Aufbau ihres Wurzelsystems. Gräser wie *L. perenne* und *O. sativa* besitzen ein homorhizes Wurzelsystem mit einer hohen Verzweigungsdichte. Mit der Durchwurzelung des Bodens durch Feinwurzeln können diese Pflanzen Nährstoffe im Boden relativ gut aufnehmen, vor allem durch zusätzliches Wurzelwachstum in nährstoffreiche Bereiche hinein (Robinson 1994, Hutchings et al. 2003). Zudem dient das Deutsche Weidelgras *L. perenne* aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung als

Modellpflanze mitteleuropäischer Gräser. Das Wurzelsystem von Reis (*O. sativa*) wurde schon ausführlich untersucht (z.B. Iijima & Kono 1991). In den Versuchen in aeroponischen Systemen (siehe Kap. 3) wurde *O. sativa* eingesetzt, da hier eine Pflanze mit möglichst großem Wurzelsystem benötigt wurde, um die Aufnahmefähigkeit von Nährstoffen aus einem Medium zu messen. Der Spitzwegerich *P. lanceolata* besitzt ein schwächer verzweigtes Wurzelsystem und ist im Freiland stark mykorrhiziert. Er tritt gemeinsam mit *L. perenne* in Fettwiesen-Gesellschaften auf. Diese Koexistenz wird wahrscheinlich durch unterschiedliche Strategien in der Nährstoffaufnahme ermöglicht. In vielen Untersuchungen wurde das Wurzelwachstum der Acker-Schmalwand *A. thaliana* analysiert. Zudem stehen bei dieser Pflanze genetisch modifizierte Transformanten zur Verfügung, mit denen die Aktivität von Phytohormonen in der Pflanze untersucht werden kann (siehe Kap. 2.2.8). Die verwendete Auxin-sensitive Transformante DR5 (Ökotyp „Columbia“ = Col 0) wurde von G. Hagen und T. J. Guilfoyle (University of Missouri-Columbia, Columbia, USA) zur Verfügung gestellt, die Cytokinin-sensitive Transformante ARR5 (Ökotyp „Wassilewskaja“ = Was) von J. J. Kieber (University of North Carolina, Wilmington, USA) und T. Schmölling (Freie Universität, Berlin).

Die Oberfläche der Samen wurde nach Hensel et al. (1990) sterilisiert. Hierbei wurden die Samen zunächst mit EtOH (70%) bei Unterdruck für ca. 3 min dehydriert und sterilisiert. Nach Abschütten des Alkohols wurden die Samen mit NaOCl (ca. 5% aktive Cl-Radikale; Merck, Darmstadt; als Netzmittel wurde ein Tropfen Brij 35 zugegeben; BDH, Poole, GB) für weitere 3 min bei Unterdruck sterilisiert. Die Samen wurden danach mehrfach mit sterilem Aqua dest. gewaschen um Chlorrückstände zu entfernen. Die Samen wurden dann vereinzelt und bei 20°C (*L. perenne*, *P. lanceolata*) oder 24°C (*O. sativa*, *A. thaliana*) in Mikrotiterplatten mit 1/10 NB-NMAS zur Keimung gebracht. Die Sterilität wurde unter einem inversen Mikroskop (100-320x Phasenkontrast; Fluovert FU, Zeiss, Jena) überprüft. *P. lanceolata* produziert bei der Keimung eine schleimige Hülle, die umgehend von vermutlich endophytischen Bakterien besiedelt wird.

2.1.4 VA-Mykorrhiza

Glomus intraradices Schenck & Smith wurde von S. Declerck (Louvain, Belgien) zur Verfügung gestellt. Dieser VA-Mykorrhizapilz wurde monoxenisch auf modifiziertem Strullu-Romand-Medium in vitro kultiviert (Chabot et al. 1992; Douds 1997; Declerck et al. 1998). *G. intraradices* ist abundant in Offenlandhabitaten und besitzt ein großes Spektrum pflanzlicher Partner. Für die Kultur in Petrischalen bei Dunkelheit und 20-25°C wurden der biotrophen Mykorrhiza Wurzelstücke von autotrophen, Ri-T-DNA-transformierten Karotten (*Daucus carota* L.) als pflanzlicher Partner angeboten.

2.2 Auswertung

2.2.1 Protozoendichte

Die Abundanz von Nacktamöben, Flagellaten und Ciliaten im Boden wurde mit einer modifizierten MPN-Methode („most probable number“; Darbyshire 1974) bestimmt. Hierzu wurden 5 g (FG) Boden mit 20 ml NMAS aufgeschwemmt und auf einem Vertikalschüttler 20 min bei 80 U/min durchmischt. Auf 96-well-Mikrotiterplatten wurden 4 oder 8 Replikate von Verdünnungsreihen mit 1/10 NB-NMAS als Nährmedium angesetzt. Die Verdünnungsreihen wurden bei 15°C inkubiert und im Verlauf der folgenden 10 Tage mit einem inversen Mikroskop (siehe oben) mehrfach auf Anwesenheit von Protozoen in den einzelnen Verdünnungsstufen untersucht. Die Dichte wurde nach Hurley & Roscoe (1983) ausgewertet.

2.2.2 Mykorrhizierung

Die Infektion von Wurzeln durch VA-Mykorrhiza wurde durch Anfärbung von Pilzhyphen und Arbuskeln im pflanzlichen Gewebe nachgewiesen (Vierheilig et al. 1998; siehe Kap. 5). Hierbei wurden die gesäuberten Wurzeln in 1N KOH kurz aufgekocht und über Nacht stehen gelassen, um Pigmente aus den Wurzeln zu lösen. Dann wurden die Wurzeln zunächst in H₂O gewaschen und in 1N HCl mit einem Tropfen Tinte (Quink permanent blue, Parker, Hamburg) angefärbt. Die Färbedauer

unterscheidet sich je nach Pflanzenart und Alter der Wurzeln zwischen 10 min und mehreren Stunden. Bei *L. perenne* und *P. lanceolata* wurden mit etwa einer Stunde Färbedauer gute Ergebnisse erzielt. Danach wurden die Wurzeln in Milchsäure:H₂O (1:1) aufgehellt, wobei nur pilzliches Gewebe stark blau gefärbt bleibt. Bei großen Wurzelmenigen muss das Entfärbebad nach einigen Stunden ausgewechselt werden. Unter dem Binokular (6,4-40x, Wild M3, Heerbrugg) wurden dann die Wurzeln nach pilzlichem Gewebe abgesucht.

2.2.3 Zellvolumen der Bakterien

Das Bakterienvolumen wurde nach Färbung mit Acridin-Orange bestimmt (AO; Gessey 1981; siehe Kap. 4). Hierbei wurden die Bakterien auf einem Vertikalschüttler (15 min bei ca. 60 U/min) in 10 ml NMAS von der Agaroberfläche gelöst. Von dieser Suspension wurde ein Aliquot 1:1 mit 2% Formalin gemischt, um die Bakterien abzutöten, und 2 ml dieser Suspension bei Unterdruck mit einem schwarzen Polycarbonat-Membranfilter (Millipore Corp., Bedford, USA) gefiltert. Die Bakterienzellen auf dem Filter wurden nachfolgend mit 1 ml AO (0,1 g/l) 2 min überschichtet, bevor das AO bei Unterdruck abgesaugt wurde. Überschüssiges AO wurde in 2 ml Isopropanol gelöst und ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurden digitale Aufnahmen der Bakterienzellen mit dem Fluoreszenzmiroskop (1000x; FITC-Filter; Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena) hergestellt. Aus 4 Aufnahmen wurden je 25 Zellen zufällig ausgewählt und vermessen. Das Zellvolumen V_{BZ} wurde nach der Formel $V_{BZ} = \pi/4 * B_{BZ}^2 * (L_{BZ} - B_{BZ}/3)$ berechnet, wobei B_{BZ} und L_{BZ} die Breite und Länge der Zelle darstellen (Krambeck et al. 1981).

2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Gesamtdichte von Eubakterien sowie die Dichten der Subgruppen α , β , γ und *Nitrospira* der Proteobakterien in der Rhizosphäre von Reis wurden mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht (siehe Kap. 4). Hierzu wurden wurzelnahe Agarstücke (4-8 mm) aus der Rhizosphäre von vier Reispflanzen (je zwei aus Kontroll- und Amöben-Behandlung) ausgeschnitten. Jedes Agarstück wurde in eine Kammer eines LabTek[®] Deckglases (Nalgene Nunc Int. Corp., Naperville, USA)

überführt und in einer Alkoholreihe mit 50, 80, 98 und erneut 98% Ethanol je 3 min entwässert. Von einem Mastermix, bestehend aus 30 µl Hybridisations-Puffer und 30 µl Markerprobe, wurden 35 µl in jede Kammer zu dem getrockneten Agar gegeben und zwölf Stunden bei 46°C inkubiert. Mit der Markerkombination „Eub mix“ (blau fluoreszierend) und „ α -1b 968“ (rot) wurden Eubakterien und α -Proteobakterien detektiert (vgl. Anhang, Bild 5); mit der Markerkombination „Gam“ (grün), „Bet“ (rot) und „Ntspa712“ (blau) wurden Zellen der γ -, β -Proteobakterien und der *Nitrospira*-Gruppe markiert (vgl. Anhang, Bild 6). Die Kammern mit den Agarstücken wurden danach bei 46° C zweimal je 7 min mit einem Waschpuffer gereinigt und auf Eis einmalig 10 s mit 200 µl H₂O_{dd} gespült. Die in Dunkelheit getrockneten Agarstücke wurden danach mit AF1 (Citifluor, London, GB) überschichtet, um ein Ausbleichen zu verhindern.

Es wurden mehrere digitale Bilder der Agaroberfläche mit einem inversen CLSM-Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena) angefertigt. Die Grünfluoreszenz (Emmissionswellenlänge 520 nm) wurde mit 490 nm, die Rotfluoreszenz (Emmissionswellenlänge 580 nm) mit 545 nm und die Blaufluoreszenz (Emmissionswellenlänge 645 nm) mit 630 nm angeregt.

Die Dichte der Bakterien wurde getrennt nach Fluoreszenz bzw. taxonomischer Gruppenzugehörigkeit mit dem Programm „ImageJ“ (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Nach Überführung des Originalbildes in ein Bild mit binärer Farbinformation wurden Partikel eines zuvor bestimmten Größenbereichs (definiert als Einzelzellen in der Bildebene) als Bakterienzellen gezählt. Kleinere Partikel wurden zu nicht auf der Bildebene liegenden Zellen erklärt, größere Partikel als Aggregat mit einer unbekanntem Zellzahl.

2.2.5 Metabolismus der Mikroorganismen

Unterschiede in der Nutzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen liefern Hinweise auf das metabolische Potenzial mikrobieller Gemeinschaften („community level physiological profile“, CLPP; Ellis et al. 1995, Garland 1996; siehe Kap. 3).

Die Bakterien der Rhizoplane wurden in einem Ultraschallbad 30 s in 20 ml ½ Hoagland’s Nährmedium von den Wurzeln gelöst (Simon et al. 2000). Durch Verdünnung mit ½ Hoagland’s wurde eine einheitliche optische Dichte (OD) der

Bakteriensuspension bei 550 nm eingestellt. Nachfolgend wurde ein Aliquot jeder Probe (150 µl) in 32 Felder einer BIOLOG EcoPlate™ (BIOLOG, Hayward, USA) pipettiert. Die Felder enthalten 31 unterschiedliche Kohlenstoff-Quellen, welche bei mikrobiellem Abbau den beigefügten transparenten Redox-Farbstoff Tetrazolium-Violett zu einem rosa Farbkomplex (Formazan) reduzieren; ein Feld ohne C-Quelle (H₂O) dient als Kontrolle. Die Zunahme der Extinktion in den Feldern durch die Bildung von Formazan wurde täglich über den Zeitraum von 5 Tagen mit einem Plattenlesegerät (SLT, Spectra, Crailsheim) bei 620 nm erfasst.

Nach Abzug der Extinktion des Feldes mit H₂O wurde die maximale Zunahme der Extinktion (logarithmiert) als Maßstab des mikrobiellen Wachstums bestimmt und der Zeitraum bis zur maximalen Zunahme der Extinktion als Messgröße der Stoffwechsel-Umstellung in der mikrobiellen Gemeinschaft und als Indikator von Prädation ermittelt (vgl. Preston-Mafham et al. 2002).

2.2.6 Boden-Respiration

Die Atmung der Boden-Mikroorganismen wurde nach Scheu (1992) in einem automatischen Respirometer gemessen (siehe Kap. 5). Hierbei wird das von den Bodenmikroorganismen produzierte CO₂ in einer KOH-Falle aufgefangen. Der im Reaktorraum entstehende Unterdruck wird von einem Sensor erfasst. Nach Detektion wird von einer Modulbox ein elektrischer Impuls an eine Platinelektrode gesendet, wodurch aus einer gesättigten CuSO₄-Lösung elektrolytisch O₂ produziert wird. Dieses O₂ wird dem Reaktorraum zugeführt. Die O₂-Konsumptionsrate (µl O₂/h*g Boden) wurde halbstündig gemessen.

Die Basalatmung (Atmung ohne Substratzugabe) wurde nach dreitägiger Akklimatisierung des Bodens bei Zimmertemperatur aus einer 20-stündigen Messreihe bei 22°C gemessen und gemittelt. Die mikrobielle Biomasse (C_{mic}) wurde nach der Methode der Substrat-induzierten Respiration (SIR; Anderson und Domsch 1978) nach Zugabe von 8 mg Glucose/g TG Boden in wässriger Lösung (= 3,2 mg C/g TG Boden) gemessen. Aus dem tiefsten Punkt der Atmungsmessung, d.h. dem Mittel über 3 Stunden vor Beginn des Wachstums (=“maximum initial respiratory response“, MIRR), wird nach Multiplikation mit dem Faktor 38 (Beck et al. 1997) der mikrobielle Kohlenstoffgehalt C_{mic} berechnet. Durch mikrobielles Wachstum steigt nachfolgend die

Respiration exponentiell an (assimilative Phase). Die spezifische Respiration wurde durch den Quotient aus Basalatmung und mikrobieller Biomasse berechnet. Zur Ermittlung der mikrobiellen Nährstofflimitierung wurde der Mittelwert der Gruppe der drei größten Steigungen (logarithmierte Werte) herangezogen. Um das Ausmaß der Nährstofflimitierung für die Mikroorganismen zu erfassen, wurde neben Glucose (C-Quelle) auch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (N-Quelle) und/oder K_2HPO_4 (P-Quelle) im Element-Verhältnis von 10:2:1 zugegeben (Anderson und Domsch 1980, Tiunov & Scheu 2000).

2.2.7 Wurzelarchitektur

Die Struktur von Wurzelsystemen wurde mit Hilfe des Programms „Winrhizo 5.0a“ (Regent Instruments Inc., Kanada) charakterisiert. Hierbei wurden gewaschene Wurzelsysteme mit einem Dia-Scanner (Größe DIN A4; „Regent 1600+“, Regent Instruments Inc., Kanada) digitalisiert und mit dem Programm „Winrhizo 5.0a“ die Wurzellänge und Anzahl der Wurzelspitzen ermittelt. Zusätzlich wurde die Länge jedes Wurzelabschnitts bestimmt und vorgegebenen Durchmesserklassen zugeordnet. Hieraus wurde das Verteilungsmuster der Wurzellänge nach Durchmesserklassen bestimmt. Verunreinigungen durch untypisch dicke Objekte wie anorganische oder organische Partikel, die sich nicht vollständig entfernen ließen, wurden herausgerechnet.

In dem ersten Versuch in Kap. 3 und dem zweiten Versuch in Kap. 4 wurden die Wurzelsysteme unter dem Mikroskop (40x; Fluovert FU, Leitz, Wetzlar) vermessen und die Zahl und Länge von Haupt- und Seitenwurzeln ermittelt. Zusätzlich wurde in dem zweiten Versuch in Kap. 4 der durchschnittliche Durchmesser der Seitenwurzeln gemessen. Nachfolgend werden die Keimwurzel und alle aus dem Samen austretenden primären Adventivwurzeln als Hauptwurzeln bezeichnet und alle von den Hauptwurzeln abzweigenden Wurzeln als Seitenwurzeln.

2.2.8 Phytohormone

Der Nachweis der Auxin- und Cytokininaktivität in Wurzeln und Wurzelspitzen wurde mit Hilfe der *A. thaliana*-Transformanten DR5 und ARR5 geführt, bei denen das Reportergen β -Glucuronidase an eine hormonspezifische Promotorsequenz gekoppelt ist (siehe Kap. 6). DR5 ist ein mutagenisiertes Auxin-sensitives Element aus dem

GH3::GUS-Promotor einer Transformante der Sojabohne und liegt in siebenfach tandemartiger Wiederholung vor (Ulmasov et al. 1997). Durch die Mutagenisierung und die Wiederholung ist die Auxin-Sensitivität der Transformanten erhöht. *ARR5* ist ein natives Cytokinin-sensitives Gen von *A. thaliana* (D'Agostino et al. 2000). Die Expression der β -Glucuronidase - und somit indirekt die Aktivität des Hormons - wird quantitativ durch Messung der Umsetzung eines nahezu farblosen Substrats zu einem indigoblauen bzw. fluoreszierenden Produkt ermittelt. Unter dem Vorbehalt, dass sich verschiedene Gewebe in ihrer Sensitivität für ein Hormon unterscheiden und somit auch die *GUS*-Expression von dieser Sensitivität beeinflusst werden kann, stellt die *GUS*-Expression ein Maß für die Hormonaktivität eines Gewebes dar (D'Agostino et al. 2000).

Histochemischer β -Glucuronidase (GUS)-Nachweis

Der histochemische β -Glucuronidase-Nachweis nach Jefferson et al. (1987) diente dem gewebespezifischen Nachweis der Hormonaktivität. Durch die nachfolgend beschriebene Auswertung von digitalisierten Wurzelspitzen ist eine vergleichende (semi-quantitative) Auswertung möglich.

β -Glucuronidase wird durch den Umsatz des Substrates X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zu dem blauen, dimerisierten Spaltprodukt (Dichloro-dibromoindigo) nachgewiesen, welches im Gegensatz zu X-Gluc nicht durch die Zellmembran diffundieren kann (Naleway 1992). Die gesäuberten Wurzeln lagerten 2 Stunden (bzw. 10 Stunden bei *DR5::GUS* im ersten Versuch von Kap. 6) in der Inkubationslösung und wurden dann in einer Lösung aus Chloralhydrat und Milchsäure (2:1; Merck, Darmstadt) aufgeheilt. Die Wurzeln wurden in Milchsäure (90%; Merck, Darmstadt) auf Objektträgern eingebettet, bei 100-facher Vergrößerung digital fotografiert (Coolpix 990 mit festgestellter Blende; Nikon, Tokio, Japan) und mit dem Programm „ImageJ“ (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet. Hierbei wurden zunächst die im Bild enthaltenen blauen und grünen Farbinformationen mit einem Rot-Filter extrahiert (RGB-Split) und die Wurzelspitzen durch Drehung der Bildfläche vertikal oder horizontal ausgerichtet. Danach wurde der Messbereich der Wurzelspitze abhängig von der Wurzeldicke und der Transformante (*ARR5*: Rechteck mit doppelter Länge wie Breite; *DR5*: Quadrat) definiert und die durchschnittliche

Farbintensität (dFI_W) gemessen (vgl. Anhang, Bild 10). Die Messwerte der dFI_W wurden um die Farbintensität des jeweiligen Hintergrundes (dFI_H) korrigiert und zur Farbintensität der jeweiligen Probe gemittelt. Ungefärbte Wurzeln wurden nicht berücksichtigt, da hier unvollständig fixiert wurde.

Fluorometrischer β -Glucuronidase (GUS)-Nachweis

Der fluorometrische β -Glucuronidase-Nachweis ist ein indirekter quantitativer Nachweis der Hormonaktivität (Naleway 1992). Zellmembranen sind für das verwendete Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG; Fluka, Buchs, Schweiz) impermeabel; deshalb muss vor der Weiterbehandlung das Pflanzengewebe mechanisch aufgeschlossen und die lösliche Proteinfraktion extrahiert werden. Um die erforderliche Mindestmenge von 50 mg FG Pflanzengewebe pro Probe zu gewährleisten, wurde der Großteil des gesamten Wurzelsystems einer Pflanze verwendet. Die Wurzeln wurden in Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Das gefrorene Gewebe wurde mit 400 μ l Extraktionspuffer versetzt und mit einem Potter-Gerät (Braun, Melsungen) mit einem Pellet-Kolben-Aufsatz aus Teflon zermahlen. Die Suspension wurde 15 min bei 10.000*g und 4°C zentrifugiert und deren Überstand in neuen Eppendorfgefäßen bei 4°C aufbewahrt. 50 μ l des Überstandes wurden mit 500 μ l des Assay-Puffers (37°C) gut durchmischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion in 100 μ l dieses Reaktionsansatzes wurden dann in 900 μ l Stop-Puffer unterbrochen. Die Fluoreszenz des bei der Reaktion entstandenen Spaltproduktes (4-Methylumbelliferon, MU; Anregungswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 455 nm) wurde mit einem Interferenzfilter (Lumineszenz Spectrometer LS 50 B, Perkin Elmer, Langen) bei einer Transmission von 450 nm gemessen; aus dem Mittelwert dreier Messungen wurde mittels der Eichgeraden (50-8000 nmol MU; Fluka, Buchs, Schweiz) die Enzymaktivität ermittelt.

Als Bezugsgröße für die Enzymaktivität diente der Gesamtproteingehalt (Popov 1975; Komplexbildung mit Amidoschwarz 10 B) und die Anzahl der Wurzelspitzen. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 10 μ l des Überstandes mit 500 μ l Gebrauchslösung versetzt, gut gemischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (13.000*g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Sediment vor dem zweiten Zentrifugationsschritt mit 500 μ l Acid I-

Waschlösung gut vermischt. Dieser Schritt wurde mit der Acid II-Waschlösung wiederholt und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde bei Zimmertemperatur angetrocknet, in 300 μl 1N NaOH gelöst und 100 μl davon in Mikrotiterplatten überführt. Die Extinktion der Flüssigkeit wurde bei 590 nm gemessen. Zur Herstellung der Eichkurve wurden BSA-Lösungen von 2 bis 10 μg BSA verwendet.

2.2.9 C/N-Gehalt

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt von Pflanzen- und Bodenmaterial wurde mit einem Elementar-Analysator (Carlo-Erba 1400, Mailand, Italien) bestimmt. Zur Analyse wurden 3-5 mg der getrockneten und gemahlten Proben in Zinn-Kapseln eingewogen. Als Standard wurde Acetanillid (Merck, Darmstadt) verwendet.

2.2.10 Nitrat und Ammonium im Boden

Vom Versuchsboden wurden 5 g FG mit 20 ml Aqua dest 20 min geschüttelt (siehe Kap. 6). Die NO_3^- - und NH_4^+ -Konzentration der Suspension wurde anschließend mit entsprechenden Elektroden (Windaus Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld) gemessen. Aus den Messwerten wurde nach den Formeln $y = -22,598 \ln(x) + 234,49$ und $y = 24,633 \ln(x) - 25,047$ und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die NO_3^- - und NH_4^+ -Konzentration des Bodens (in $\mu\text{g N/g}$ Boden) ermittelt. Durch Trocknung des Bodens und Bestimmung des Wassergehalts konnte die Konzentrationen nachträglich auf das Trockengewicht des Bodens bezogen werden.

Statt Aqua dest kann auch CaCl_2 (Endkonzentration 10 mM) zugegeben werden, um die Adsorption der Nährstoffe an organische Bodenpartikel zu verringern (McLean 1982). Im Falle wenig humoser, sandiger Böden (erster Versuch in Kap. 6) ergaben Parallelmessungen keine Unterschiede zwischen der Aqua dest- und 10 mM CaCl_2 -Behandlung.

2.2.11 Statistik

Die Daten wurden teilweise logarithmiert, um die Homogenität der Varianzen zu erhöhen. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten rück-transformiert.

Werte, die für die jeweiligen Behandlungen untypisch waren, wurden nach dem Ausreißertest (modifiziert nach Rousseeuw et al. 1999) detektiert. Hierbei wird nach der Formel $y = \text{MEDIAN}(x_1:x_n) - (3.\text{QUARTIL}(x_1:x_n) - 1.\text{QUARTIL}(x_1:x_n))*1.5$ der untere Grenzwert und nach $y = \text{MEDIAN}(x_1:x_n) + (3.\text{QUARTIL}(x_1:x_n) - 1.\text{QUARTIL}(x_1:x_n))*1.5$ der obere Grenzwert berechnet. Werte außerhalb dieser Grenzen wurden als Ausreißer definiert und bei der statistischen Auswertung vernachlässigt. Die erhobenen Daten wurden generell mit dem Programm SAS 8.2 (SAS Institute, Cary, USA) statistisch ausgewertet. Die verwendeten Analysemethoden werden in den „Material und Methoden“-Kapiteln der Experimente (siehe Kap. 3-6) separat beschrieben.

3. Etablierung eines aeroponischen Systems zur Untersuchung des Einflusses von Amöben auf die Wurzelarchitektur, die Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme von *Lolium perenne* L. und *Oryza sativa* L. und der mikrobiellen Gemeinschaft in deren Rhizosphäre

3.1 Einleitung

Die Nährstoffaufnahme einer Pflanze wird zum einen durch die zum Stoffaustausch fähige Fläche bestimmt; diese Fläche entspricht etwa der Summe der Oberflächen aller Wurzelhaarzonen. Durch Bildung von Seitenwurzeln kann die Pflanze die Anzahl ihrer Wurzelhaarzonen und somit die aufnahmefähige Fläche deutlich steigern (quantitativer Aspekt). Zum anderen wird die Nährstoffaufnahme durch die oberflächenbezogene Aufnahmefähigkeit beeinflusst. Durch physiologische Veränderungen können Pflanzen die hierbei notwendigen Prozesse regulieren und somit die Nährstoffaufnahme steuern (qualitativer Aspekt; Zhang & Forde 1998, Glass 2002).

Ekelund und Rønn (1994), Griffiths (1994) und Bonkowski (2004) haben wuchsfördernde Effekte von Protozoen auf Pflanzen beschrieben. Quantitative und qualitative Aspekte der Nährstoffaufnahme wurden bisher nicht differenziert untersucht. Die differenzierte Untersuchung des Wurzelwachstums und der Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme ist nur bei vollkommen unbeschädigten Wurzelsystemen möglich, und schon feinste mechanische Kontakte wie das Eintauchen in Flüssigkeit können Zellen der Wurzelrinde verletzen (Prosser et al. 2001). Nur das Wachstum in zerstäubtem Medium, also in aeroponischen Systemen, verhindert solche Verletzungen. In einem abschließenden Messzyklus kann die Dynamik der Nährstoff-Aufnahme von Pflanzen durch Messung der Abnahme der Nährstoffkonzentration im umgebenden Medium ermittelt werden.

Bei der Entwicklung eines neuen aeroponischen Systems sollten die Wurzeln gleichmäßig mit Nährmedium versorgt und die Pflanzen möglichst unabhängig voneinander aufgezogen werden. Diese Voraussetzungen wurden von bisher eingesetzten aeroponischen Systemen nicht erfüllt (Übersicht in Waisel 2002).

In aeroponischen Systemen werden der Wurzel und den Mikroorganismen auf der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) ständig Nährstoffe zugeführt. Bereits bei einer vergleichsweise geringen Ionen-Konzentration im Nährmedium tritt deshalb vermutlich Nährstoffsättigung ein. Mit verbessertem Nährstoffstatus des Bodens verringerten sich wuchsfördernde Effekte von Protozoen auf Pflanzen (Clarholm 1985). In aeroponischen Systemen dürften deshalb Effekte der Amöben auf das Pflanzenwachstum durch erhöhte Mineralisation von Nährstoffen - wenn überhaupt auftretend - stark verringert sein.

Die Rhizoplane ist in aeroponischen Systemen das einzige Habitat für die Mikroflora und -fauna. Sie ist die von der Pflanze am stärksten beeinflusste Zone (Curl & Truelove 1986). Artspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Rhizodeposite verändern die Diversität wie auch den Metabolismus der Gemeinschaft der Mikroorganismen (Germida et al. 1998, Benizri et al. 2002, Bertin et al. 2003). Das metabolische Potenzial von Mikroorganismen auf Gemeinschaftsebene kann mit Hilfe von Nutzungsmustern verschiedener Kohlenstoffquellen verglichen werden („community level physiological profile“, CLPP; Ellis et al. 1995, Garland 1996). Es kann einerseits direkt die Verfügbarkeit von organischen Substanzen in einem Habitat anzeigen und andererseits Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikroorganismen darstellen. Auch die Beweidung durch Protozoen verändert das CLPP (Griffiths et al. 1999, Rønn et al. 2002). Es wurde bisher nicht untersucht, ob die Beweidungseffekte der Rhizobakterien eine generelle Veränderung des CLPP hervorrufen oder, wie bei VA-Mykorrhiza, eine je nach Pflanzenart differenzierte Veränderung bewirken (Söderberg et al. 2002).

Ziel der Versuche war, ein aeroponisches System zu entwickeln, in dem Pflanzenwurzeln mechanisch unbeschädigt wachsen konnten, um in einem nachfolgenden Messzyklus die Nährstoffaufnahme der Wurzeln zu bestimmen. Hierzu wurde in einem ersten Versuch ein neuartiges aeroponisches System verwendet, bei welchem im Versuchsverlauf jedoch früh Kontaminationen durch Amöben auftraten. Daher wurde das System um zwei Sterilisationsschritte und um einen geschlossenen Kreislauf für das Medium erweitert und die Funktion in einem zweiten Versuch überprüft. Es sollte weiterhin untersucht werden, in welcher Weise indirekte Effekte durch Amöben quantitative und qualitative Aspekte der Nährstoffaufnahme, d.h. die aufnahmefähige Fläche und die Aufnahmefähigkeit selbst, bei den Gräsern *Lolium perenne* und *Oryza sativa* beeinflussen; insbesondere sollten die Veränderungen des

Wurzelwachstums unter dem Gesichtspunkt einer guten Nährstoffversorgung durch das ständig nachgelieferte Nährmedium beobachtet werden. Nachdem sich im ersten Versuch insbesondere bei *O. sativa* die Geschwindigkeit des Wachstums nach zwei Wochen deutlich verringerte, wurde im zweiten Versuch die Nährstoffkonzentration des Mediums erhöht. Darüber hinaus sollte im zweiten Versuch untersucht werden, in welcher Weise Amöben und die Pflanzenart das metabolische Nutzungsmuster der Mikroorganismen in der Rhizoplane als Indikator für Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen.

3.2 Material & Methoden

Versuchsaufbau

Der Aufbau des entwickelten aeroponischen Systems ist in Abb. 5 dargestellt (siehe Anhang, Bild 1). Ein System bestand aus einem zentralen Behälter, der einen Mini-Ultraschall-Nebler (Seliger GmbH, Villingen) enthielt und mit Nährmedium gefüllt wurde. Im zweiten Versuch wurden in den Behälterboden zusätzlich 4 UV-Lampen (Seliger GmbH, Villingen) eingebaut, um das Medium während des Versuchs zu sterilisieren. Die Außenwand des Behälters enthielt 8 Öffnungen im unteren Drittel, die über ein kurzes Rohr mit den zylinderförmigen Wurzelkammern verbunden waren. Die Verbindungen zwischen dem Zentralbehälter und den Wurzelkammern wurden mit

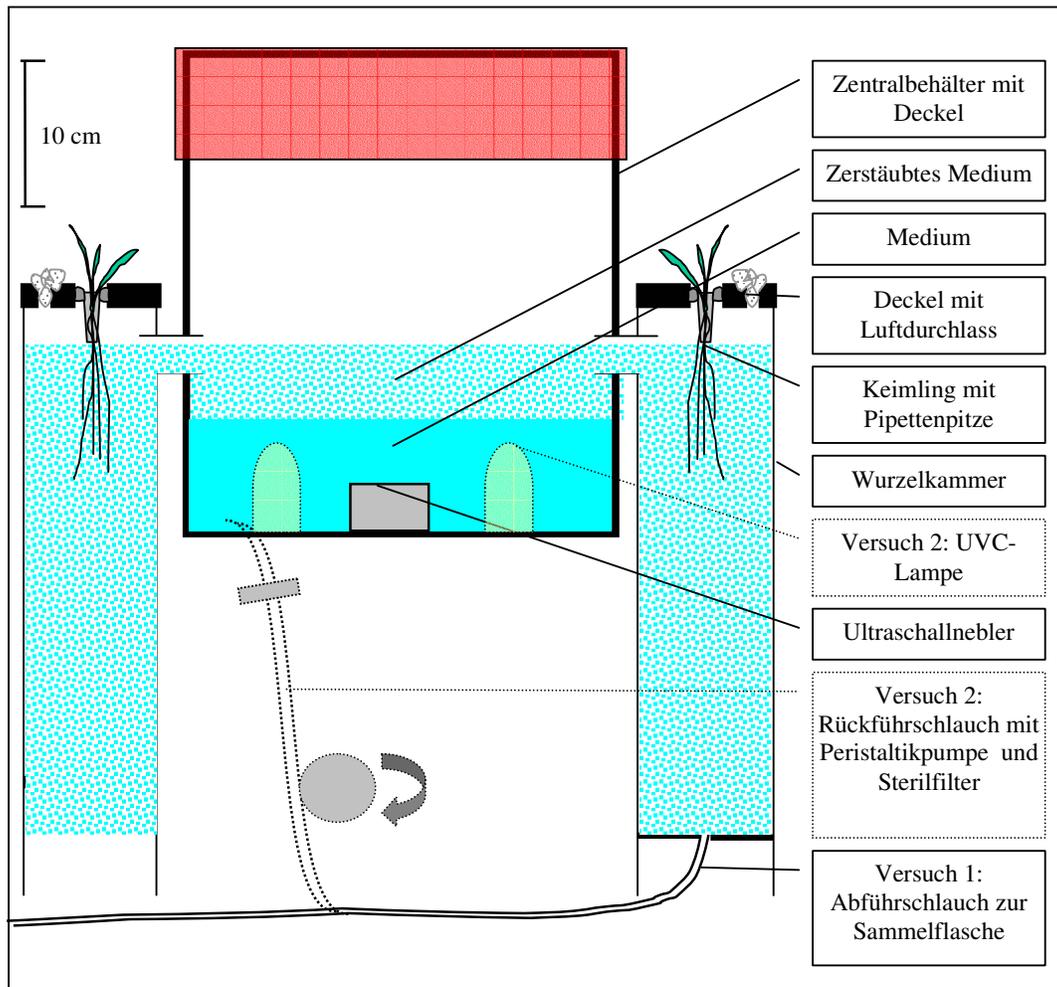


Abbildung 5: Aufbau eines aeroponischen Systems. Die Veränderungen des Aufbaus im zweiten Versuch sind gestrichelt dargestellt.

sterilisierter Teroson-Dichtungsmasse (in 70% Ethanol gelagert; Teroson GmbH, Heidelberg) abgedichtet. In den Deckeln dieser transparenten Wurzelkammern war je ein Loch für die Pflanzen und für den Luftaustausch (durch einen Wattestopfen gegen luftbürtige Kontaminationen geschützt) vorhanden. An ein Loch im Boden der Wurzelkammern schloss ein Ablaufschlauch an, der sich mit den Ablaufschläuchen der anderen sieben Wurzelkammern eines Systems zu einem Sammelschlauch vereinigte. Im ersten Versuch führte dieser Sammelschlauch in eine Waschflasche. Im zweiten Versuch war dieser Sammelschlauch über eine Peristaltikpumpe und über einen 0,2 µm-Filter (Whatman, Springfield Mill, GB) mit dem Zentralbehälter verbunden.

Das Nährmedium (Hoagland's Nr. 2 Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich, München) wurde in dem Zentralbehälter durch den Mini-Ultraschall-Nebler zerstäubt und gelangte durch die acht peripheren Öffnungen und die Verbindungsrohre in die Wurzelkammern. Das zerstäubte Medium erreichte in allen Kompartimenten eine Höhe ca. 3 cm oberhalb des Füllstandes des Nährmediums. Das an den Kammerwänden kondensierte Medium floss über den Abflussschlauch in den Sammelschlauch ab. Alle 8 Tage wurde das Medium in dem Zentralbehälter komplett ausgetauscht (ca. 3 l) und die abgelassene Nährlösung auf Kontaminationen untersucht. Der Ultraschall-Nebler wurde in 15-minütigem Turnus an- und abgestellt, um den Feuchtegrad der Rhizosphäre zu regulieren.

Im ersten Versuch wurden alle Teile vor Versuchsbeginn 60 min in Ethanol (70%) sterilisiert. Als Nährmedium wurde $\frac{1}{4}$ Hoagland's verwendet. Das verbrauchte Medium in den Sammelschläuchen lief in sterilisierte Auffangflaschen ab. Jeden zweiten Tag wurden die Auffangflaschen geleert und die abgeführte Flüssigkeitsmenge je Einheit über einen Verbindungsschlauch, dessen Anschluss zeitlich auf den Nachfüllvorgang beschränkt blieb, aus einem Zentralreservoir nachgefüllt (durchschnittlich 0,8 l/Tag und Einheit). Für jede Einheit wurde ein anderer Verbindungsschlauch verwendet, um Kontaminationen zwischen den Einzelsystemen zu vermeiden.

Im zweiten Versuch wurden alle Großteile vor Versuchsbeginn über Nacht mit UV-Strahlung behandelt und je 30 min in EtOH (70%) und NaOCl-Lösung (5% Cl-Radikale) sterilisiert. Das verbleibende NaOCl auf der Oberfläche wurde abschließend mit EtOH (50%) abgewaschen. Die Ultraschallnebler wurden an der sensiblen Membran (Oberseite) nicht mit EtOH und NaOCl behandelt, um diese nicht zu beschädigen; Schläuche und andere Kleinteile wurden mit den beiden Sterilisationsflüssigkeiten 30

min gespült. Das Nährmedium in dem Zentralbehälter ($\frac{1}{2}$ Hoagland's) wurde durch die UV-Strahlung der Lampen während des Versuchs sterilisiert. Die UV-Sterilisation wurde zu Versuchsbeginn täglich in 6 Perioden mit jeweils 2 Stunden durchgeführt und im Versuchsverlauf schrittweise auf 2 Perioden mit 1,5 Stunden verringert. Das kondensierte Medium wurde über einen Sammelschlauch durch eine Peristaltikpumpe und durch einen Sterilfilter in die Systemeinheit zurück transportiert. Das Schlauchteil innerhalb der Pumpenwalze und der Sterilfilter sind Verschleißteile und mussten periodisch ausgetauscht werden.

Sterilisierte Samen von *L. perenne* und *O. sativa* (siehe Kap. 2.1.3) wurden 3 Tage nach der Keimung auf NMAS-Agar (in Petrischalen) zur Wurzelbildung 9 Tage bis zum Versuchsstart in präparierte 1-ml-Pipettenspitzen eingesetzt (siehe Anhang, Bild 2). Diese Pipettenspitzen wurden an ihrer Spitze zugeschmolzen, zunächst mit 300 μ l Nährmedium gefüllt, zur Phasentrennung gefroren, und danach mit 1 ml 1-%igem $\frac{1}{2}$ -Hoaglands-Agar überschichtet. Die Wurzeln der Keimlinge wuchsen durch den Agar in das flüssige Nährmedium; vor Versuchsstart wurde die vordere Pipettenspitze nach sanftem Anheben des Keimlings vorsichtig abgeschnitten ohne die Wurzeln zu verletzen: das Flüssigmedium konnte abtropfen, während der Agar mit dem Keimling an der sich verengenden Spitze hängen blieb. Die nun ca. 5 mm frei hängenden Wurzelspitzen wurden mindestens 60 min in Bakteriensuspensionen mit und ohne Amöben inokuliert (siehe unten). Der Keimling wurde samt Pipettenspitze und Agar mit Teroson-Knetmasse in die zentrale Deckelöffnung der Wurzelkammer eingeklebt (siehe Anhang, Bild 3). Der Wurzelansatz des Keimlings wurde durch den Agar in der Pipettenspitze vor Austrocknung geschützt, da das zerstäubte Medium nicht bis an die Deckel-Unterkante der Wurzelkammer heranreichte. In Versuch 2 wurde jeder Keimling zusätzlich am Epikotyl in Silikonfett (Bayer, Leverkusen) eingebettet, um ihn gegen Durchrutschen in die Wurzelkammer und die Wurzeln gegen luftbürtige Kontaminationen zu schützen.

Böden mit einer diversen Bakteriengemeinschaft (siehe Kap. 2.1.2; ca. 10 g aus drei Böden gepoolt) wurden mit ca. 40 ml $\frac{1}{4}$ (Versuch 1) oder $\frac{1}{2}$ Hoagland's Nährmedium (Versuch 2) durchmischt. Der Amöben-Behandlung wurden 5 ml einer gewaschenen Amöbenkultur zu der diversen Bakteriensuspension zugegeben (siehe Kap. 2.1.1). Dem Kontroll-Inokulum wurden 5 ml einer Bakteriensuspension aus der Amöbenkultur

zugefügt, die nach zweimaliger Zentrifugation der Amöbenkultur aus dem jeweiligen Überstand gewonnen wurde (2 und 4 min, 1000 U/ min).

Die Wurzelkammern einer Einheit wurden mit Pflanzen der gleichen Amöben-Behandlung besetzt, um die Kontaminationsgefahr zu verringern. Im ersten Versuch wuchsen die Jungpflanzen 18 Tage bei 20°C und 60% rel. Luftfeuchte auf einer Lichtbank mit 700 µmol PhAR (16:8 h) bis zur Ernte. Während des Versuchs wurde jeden Tag der Längenzuwachs der längsten Wurzel von außerhalb der transparenten Wurzelkammern gemessen. Bei den geernteten Pflanzen wurde der Spross von der Wurzel getrennt, 3 Tage bei 70°C getrocknet und die Biomasse (TG) bestimmt. Die Haupt- und Seitenwurzeln wurden einzeln mit dem Mikroskop vermessen (40x; Fluorent FU, Leitz, Wetzlar). Im zweiten Versuch wuchsen die Pflanzen 35 Tage bei 20°C und 75% rel. Luftfeuchte auf einer Lichtbank mit 700 µmol PhAR (16:8 h) bis zur Ernte. Geerntet wurden hier die Pflanzenteile außerhalb des Pipettenbereichs, die nicht durch das Silikonfett verunreinigt waren. Zunächst wurde der Spross zur Bestimmung der Biomasse entfernt und dann die Bakterien von der Wurzeloberfläche abgelöst, um deren CLPP zu bestimmen (siehe Kap. 2.2.5). Diese Suspensionen wurden auch verwendet, um die Dichte der Amöben zu bestimmen (siehe Kap. 2.2.1). Der Aufbau des Wurzelsystems wurde mit dem Programm „Winrhizo“ analysiert (siehe Kap. 2.2.7).

Experimentelles Design

Die Wurzelkammern einer Systemeinheit wurden abwechselnd mit je 4 Individuen von *L. perenne* und *O. sativa* besetzt. In jede Einheit wurden nur Pflanzen der gleichen Behandlung eingesetzt. 6 Systeme standen in 3 Blöcken mit je einem Kontroll-System und einem System mit Amöben-Behandlung in einer Reihe. Somit standen in jedem der 3 Blöcke je 4 Pflanzen einer Behandlung zur Verfügung.

Jede Einheit wurde in zweitägigem Rhythmus um 90° in Uhrzeigerrichtung gedreht. Nach acht Tagen wurden die Einheiten so rotiert, dass die Blöcke untereinander und auch die Einheiten innerhalb ihres Blockes ihre Position tauschten (randomisiertes Blockdesign).

Statistische Auswertung

In Versuch 1 wurde bei beiden Pflanzenarten der tägliche Längenzuwachs der längsten Wurzel (von außen gemessen) mit einer „repeated measures“-Varianzanalyse mit „Messperiode“ als „repeated factor“ und Amöben als unabhängige Variable untersucht. Für *L. perenne* wurde zusätzlich mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht, welche der Parameter Anzahl, mittlere Länge und Gesamtlänge der Haupt- und Seitenwurzeln und Sprossbiomasse durch Amöben beeinflusst wurden. Für *O. sativa* wurde die Varianzanalyse nur mit dem Parameter Sprossbiomasse durchgeführt. Die Aufstellung in Blöcken hatte keinen signifikanten Einfluss auf den täglichen Längenzuwachs der Wurzel, weshalb dieser Faktor bei weiteren Analysen der Ergebnisse von Versuch 1 vernachlässigt wurde.

In Versuch 2 wurde für *L. perenne* und *O. sativa* mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht, ob Amöben die Parameter der Wurzelarchitektur (Gesamtlänge, Anzahl der Wurzelspitzen und Verzweigung) und die Sprossbiomasse beeinflussten. Der Einfluss der Faktoren Amöben und Pflanzenart auf das CLPP wurde mit einer Diskriminanzanalyse (DFA) untersucht und mit dem Programm „Statistika 6“ (Statsoft, Tulsa, USA) ausgewertet (vgl. Egert et al. 2004; siehe Kap. 2.2.5). Zur Berechnung der CLPP wurde die Zunahme der Extinktion des gebildeten Formazans im Bereich der maximalen Steigung logarithmiert. Die Behandlungen wurden in einer einfachen Varianzanalyse mit vier Behandlungstufen analysiert (*L. perenne*-Kontrolle, *L. perenne*-Amöben, *O. sativa*-Kontrolle und *O. sativa*-Amöben). Vor der DFA wurde zunächst mit einer multidimensionalen Skalierung (MDS) eine Distanzmatrix der Steigungswerte erzeugt. Diese Matrix ordnet die Proben in einem multidimensionalen Raum so an, dass die Konfiguration bei reduzierter Zahl der Messparameter das beste Mittel der Distanzen widerspiegelt. Bei der DFA selbst werden die Distanzen so angeordnet, dass eine maximale Unterscheidbarkeit zwischen den Behandlungen gewährleistet wird (Bortz 1989). Zusätzlich wurden die Substrate mit einer multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) der logarithmierte Wert der maximalen Zunahme der Extinktion bzw. der Zeitraum zum Erreichen der maximalen Zunahme der Extinktion auf statistische Unterschiede untersucht.

3.3 Ergebnisse

Aeroponisches System

Die aeroponischen Systeme funktionierten trotz hohem Aufwand nicht über die gesamte jeweilige Versuchsdauer hinweg. Entscheidender Faktor war das einwandfreie Funktionieren der Ultraschallnebler. Deren Membranen verschlissen im Versuchsverlauf, durchschnittlich innerhalb von zehn Tagen. Die Funktion des Ultraschall-Nebblers fiel dann innerhalb weniger Stunden von normalem Zerstäuben ab bis zum Sprudeln über dem Nebler, wodurch kein Nährmedium mehr an die Wurzeln gelangte und diese daraufhin austrocknen konnten. Ein „temporäres Luftfeuchtereservoir“ stellten die Kondensationstropfen an der Wand der Wurzelkammern dar; eine Gleichbehandlung der Pflanzen war bei längerem Ausfall der Nebler jedoch nicht mehr gewährleistet. Selbst eine halbtägliche Funktionskontrolle war bei einer unglücklichen Kombination von Kontrolltermin und Geräteausfall nicht ausreichend. Im Verlauf beider Versuche wurden alle Membranen der Nebler mindestens einmal ausgetauscht. Es konnte nicht dokumentiert werden, wie lange die Nebler jeweils funktionsuntüchtig waren und wie groß demzufolge der Trockenstress für die Pflanzen und die Mikroorganismen war. Bis zum Versuchsende überlebten jeweils 27 der eingesetzten 48 Pflanzen.

Eine optimale Neblerleistung wurde bei einem Überstand des Mediums von ca. $4 \pm 1,5$ cm erreicht: bei höherem Niveau produzierte der Nebler nur Tröpfchen, bei zu niedrigem Niveau schaltete der Nebler automatisch aus. In Versuch 1 wurde die Füllmenge auf den zweitägigen Nachfüllmodus (siehe Kap. 3.2) abgestimmt, damit eine durchgehend optimale Neblerleistung gewährleistet wurde. Dies wurde in Versuch 2 durch den geschlossenen Kreislauf erleichtert, da die Peristaltikpumpe das kondensierte Medium in den Zentralbehälter zurückführte und die in den Kammern und Schläuchen enthaltene Menge an Medium relativ gering und konstant war. In Versuch 1 wurde die Kondensationsmenge jedes Nebblers erfasst: Sie schwankte um maximal 100 ml/Tag bzw. 5% um den Mittelwert der entsprechenden Zwei-Tages-Periode, wobei kein Nebler durchgehend mehr oder weniger kondensiertes Medium produzierte.

In Versuch 1 wurde das Medium in den Zentralbehältern jeden achten Tag komplett ausgetauscht, um die Dichte von Mikroorganismen in den Behältern zu verringern. Die Ammonium- und Nitratkonzentration und der pH-Wert veränderten sich in dieser

Periode nicht. Beim Komplettausgleich wurden die ausgetauschten Medien auf Kontaminationen untersucht. Nach den ersten acht Tagen wurden bei sichtbarer Trübung der Medien in den Kontroll-Systemen Bakterien und in den Amöben-Systemen Bakterien und Amöben festgestellt. Am Ende der zweiten Periode von acht Tagen befanden sich Amöben in allen Systemen. Die Kontamination mit Amöben ähnlich den Amöben unserer Kulturen deutet auf eine systemische, interne Verunreinigung hin. Der Versuch wurde daraufhin am 18. Versuchstag beendet, um die im bisherigen Verlauf aufgetretenen Wuchsunterschiede dokumentieren zu können. An einigen Kammerwänden des Kontroll-Systems in Block 2 wurde pilzliches Wachstum festgestellt. In Versuch 2 wurde das Medium während des Versuchs erfolgreich durch die UV-Bestrahlung und den Einbau des 0,2- μm Filters in den Transportweg des Mediums sterilisiert. Die Bakteriendichte war bei der (wieder im Rhythmus von acht Tagen durchgeführten) Überprüfung auf Kontaminationen in den klaren Flüssigkeiten sehr stark herabgesetzt; Amöben wurden nur in geringer Dichte in den Zentralbehältern der Amöben-Systeme nachgewiesen. Bis zum Versuchsende von Versuch 2 blieben die Kontroll-Systeme frei von Protozoen-Kontaminationen. Während des gesamten Versuchs wurde beim Öffnen der Systeme (zum Austausch der Vernebler-Membranen und zum Nachfüllen) ein deutlicher Ozongeruch festgestellt.

Amöbendichte

Im ersten Versuch wurde die Dichte der Amöben aufgrund der Kontaminationen nicht ermittelt. Im zweiten Versuch besiedelten Amöben die Wurzelsysteme in den Amöben-Behandlungen in einer Dichte von ca. 1.300 Ind./cm² Wurzeloberfläche. Die Amöbendichte von *O. sativa*-Wurzelsystemen unterschied sich nicht von derjenigen von *L. perenne* ($F_{1,10} = 0,38$; $P = 0,5503$).

Allgemeines Pflanzenwachstum und Spross

Im ersten Versuch entwickelte sich *O. sativa* zunächst besser und produzierte vor allem eine größere Blattfläche als *L. perenne*. Ab etwa dem zehnten Versuchstag aber vergilbten die Blätter von *O. sativa* und auch der tägliche Zuwachs der längsten Wurzeln nahm nach dem zwölften Tag bis fast zum Stillstand am Erntetag ab ($F_{6,66} =$

2,56; $P = 0,0272$ für „Messperiode“ als „within subject effect“; Abb. 6). Die Wurzeln von *L. perenne* wuchsen nur in der Amöben-Behandlung während des gesamten Versuchs stetig. In der Kontroll-Behandlung hingegen stagnierte der Längenzuwachs von *L. perenne* bis zum zehnten Versuchstag und stieg dann auf das Niveau der Amöben-Behandlung an ($F_{6,72} = 3,24$; $P = 0,0071$ für die Interaktion „Messperiode*Amöben“ als „within subject effect“).

O. sativa produzierte eine deutlich größere Sprossbiomasse als *L. perenne* ($20,3 \pm 6,5$ mg gegenüber $4,1 \pm 0,5$ mg). *L. perenne* baute in Amöben-Behandlungen etwa 90% mehr Sprossbiomasse auf als in den Kontrollen ($5,34 \pm 2,58$ mg gegenüber $2,83 \pm 0,55$ mg; $F_{1,12} = 6,35$; $P = 0,0269$). Die Sprossbiomasse von *O. sativa* wurde durch die Anwesenheit von Amöben nicht verändert ($F_{1,11} = 0,39$; $P = 0,5427$).

Im zweiten Versuch entwickelten sich die Sprosse beider Pflanzenarten zunächst zufriedenstellend. Nach ca. zwei Wochen konnten jedoch keine deutlichen Zuwächse bei den Sprossen von *O. sativa* und *L. perenne* beobachtet werden. Das Wurzelwachstum während des Versuchs unterschied sich von dem Wachstum in Versuch 1 und dem Wachstum während der Anzucht: Von Versuchsbeginn an war das tägliche Wachstum deutlich verringert. Einzelne Wurzeln zeigten braun-schwarze

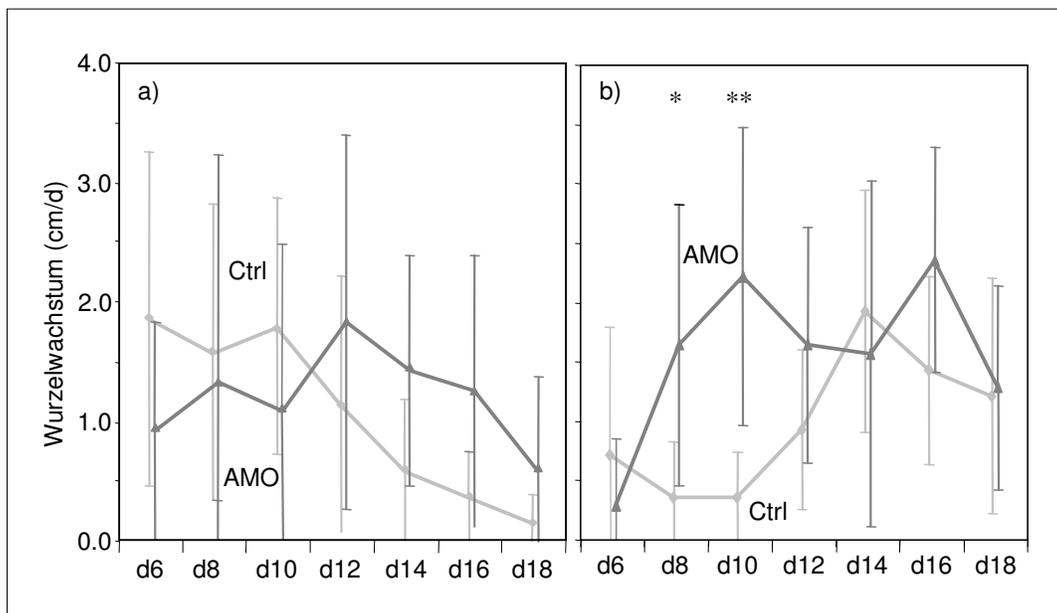


Abbildung 6: Einfluss von Amöben auf den täglichen Längenzuwachs der längsten Wurzel in cm bei *Oryza sativa* (a) und *Lolium perenne* (b) im ersten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle, helle Linien; AMO = Amöbenbehandlung, dunkle Linien. Dargestellt ist der Zeitraum von Versuchstag 6 (d6) bis zum Versuchsende (d18). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

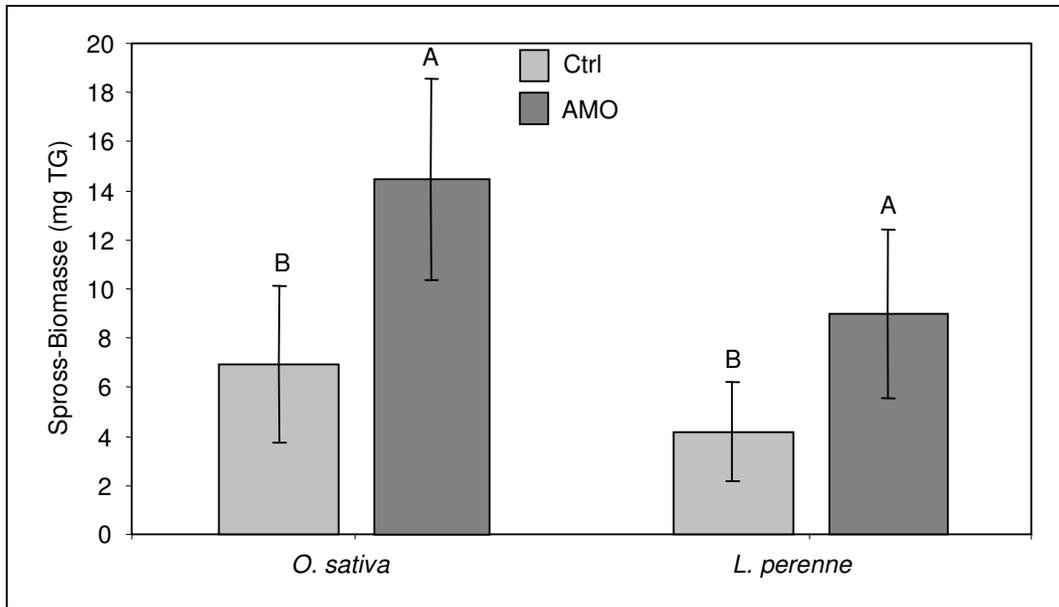


Abbildung 7: Einfluss von Amöben auf die Spross-Biomasse von *Oryza sativa* und *Lolium perenne* im zweiten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Honestly Significant Difference Test; $P < 0,05$).

Nekrosen. Auch mit schrittweiser Verringerung der UV-Bestrahlung des Mediums und somit vermutlich auch der Ozonproduktion in den Systemen von zunächst 12 (in 6 Intervallen) auf zuletzt 3 Stunden (in 2 Intervallen) verbesserte sich das Wurzelwachstum nicht.

Sowohl *L. perenne* als auch *O. sativa* erzielten in Anwesenheit von Amöben etwa die doppelte Sprossbiomasse wie in der Kontroll-Behandlung ($F_{1,9} = 7,73$; $P = 0,0214$ für *L. perenne*; $F_{1,13} = 20,16$; $P = 0,0006$ für *O. sativa*; Abb. 7).

Wurzelarchitektur

Im ersten Versuch wurden nur Daten von vitalen Individuen von *L. perenne* ausgewertet. In der Behandlung mit Amöben produzierte *L. perenne* 1,5-mal mehr Haupt- und fünfmal mehr Seitenwurzeln als in der Kontrolle (Tab. 1; Abb. 8).

Auch die Gesamtlänge der Haupt- und Seitenwurzeln nahm in Anwesenheit von Amöben um den Faktor 2 bzw. 5 zu. Die Wurzelsysteme waren in Varianten mit Amöben dichter verzweigt (1,42 Seitenwurzeln/cm Hauptwurzel gegenüber 0,67 Seitenwurzeln/cm Hauptwurzel). Haupt- und Seitenwurzeln verlängerten sich in

Anwesenheit von Amöben nicht. Auch die Wurzelbiomasse wurde durch die Anwesenheit von Amöben nicht verändert ($F_{1,12} = 2,43$; $P = 0,1453$).

In Versuch 2 förderte die Anwesenheit von Amöben das Wurzelwachstum von *L. perenne* und *O. sativa* deutlich. *O. sativa* bildete in Amöben-Behandlungen gegenüber der Kontrolle ein 2,1-fach vergrößertes Wurzelsystem mit 2,8-fach mehr Wurzelspitzen aus (Tab. 2; Abb. 9); die Verzweigung erhöhte sich von 22 ± 15 auf 45 ± 9 Wurzelspitzen pro cm Wurzel. *L. perenne* bildete in Amöben-Behandlungen ein um den Faktor 5 vergrößertes Wurzelsystem mit 1,8-fach mehr Wurzelspitzen aus; die Verzweigung erhöhte sich von 9 ± 3 auf 49 ± 10 Wurzelspitzen pro cm Wurzel.

Tabelle 1: Ergebnisse einer einfaktoriellen ANOVA zum Einfluss von Amöben (AMO) auf Parameter des Wurzelsystems von *Lolium perenne* im ersten Versuch (df =12).

Faktor	Primärwurzeln (PW)							
	Anzahl		Gesamtlänge		mittl. Länge		Gesamtwurzellänge	
	F	P	F	P	F	P	F	P
AMO	11,84	0,0055	8,04	0,0162	2,40	0,1497	7,66	0,0186

Faktor	Sekundärwurzeln (PW)							
	Anzahl		Gesamtlänge		mittl. Länge		Anz. SW/cm PW	
	F	P	F	P	F	P	F	P
AMO	15,54	0,0023	5,59	0,0376	0,03	0,8722	6,61	0,0260

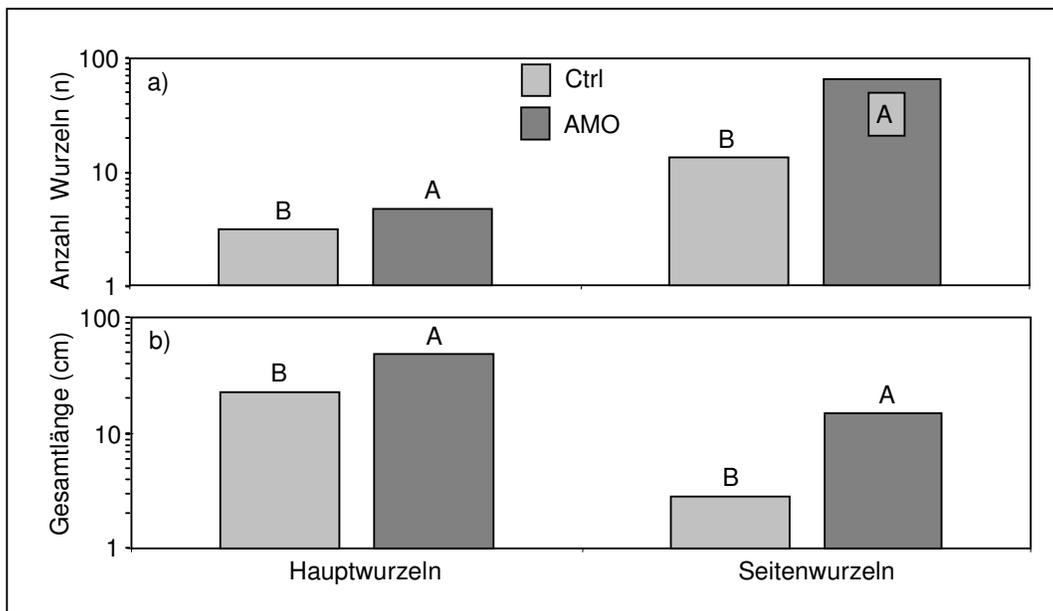


Abb. 8: Einfluss von Amöben auf die Anzahl (a) und die Gesamtlänge (b) von Haupt- und Seitenwurzeln von *Lolium perenne* im ersten Versuch (Daten rücktransformiert). Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Minimum Significant Difference Test; $P < 0,05$).

Tabelle 2: Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA zum Einfluss der blockweisen Aufstellung (BLOCK) und von Amöben (AMO) auf die Wurzellänge, die Anzahl der Wurzelspitzen und die Wurzelverzweigung von *Oryza sativa* und *Lolium perenne* im zweiten Versuch.

<i>O. sativa</i>								
Faktor	df	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen/ cm Wurzel		
		F	P	F	P	F	P	
BLOCK	2,13	6,15	0,0132	7,53	0,0067	5,68	0,0169	
AMO	1,13	27,81	0,0002	37,09	0,0001	24,25	0,0003	
BLOCK*AMO	2,13	0,85	0,4509	0,40	0,6776	0,88	0,4391	

<i>L. perenne</i>								
Faktor	df	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen/ cm Wurzel		
		F	P	F	P	F	P	
BLOCK	2,9	1,69	0,2264	0,61	0,4551	1,43	0,2621	
AMO	1,9	21,52	0,0012	42,30	0,0001	22,42	0,0011	
BLOCK*AMO	2,9	1,18	0,3062	1,29	0,2860	0,87	0,3758	

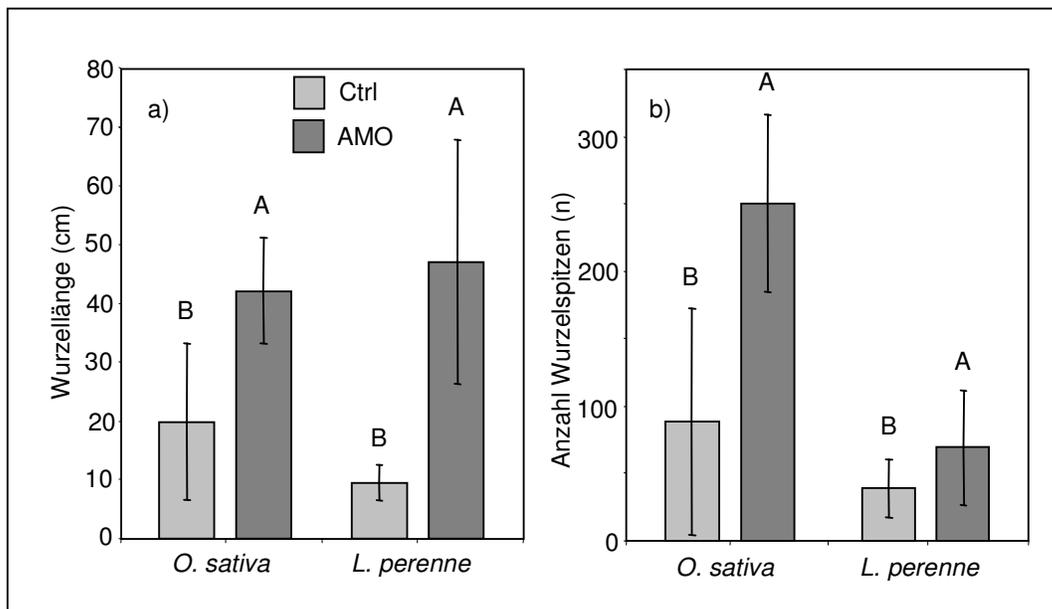


Abbildung 9: Einfluss von Amöben auf die Gesamtlänge des Wurzelsystems (a) und die Anzahl an Wurzelspitzen (b) von *Oryza sativa* und *Lolium perenne* im zweiten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Minimum Significant Difference Test; P < 0,05).

Metabolisches Potenzial der Mikroorganismen

Das metabolische Potenzial der Rhizoplane-Gemeinschaften („community level physiological profile“, CLPP) nach dem DFA-Modell der maximalen Zunahme der Extinktion von allen 31 Substraten unterschied sich jeweils zwischen Kontroll-Behandlungen und Amöben-Behandlungen auf den Wurzeln der gleichen Pflanzenart und zusätzlich zwischen den Pflanzenarten der gleichen Behandlung (Wilks´ Lambda: $F_{15,40} = 2,90$; $P = 0,0029$ für das Gesamtmodell; Tab. 3; Abb. 10).

Tabelle 3: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse zum Einfluss der Pflanzenart (*Oryza sativa*/*Lolium perenne*) und von Amöben (Ctrl/ AMO) auf das mikrobielle Muster der Substratnutzung von 31 C-Quellen (max. Zunahme der Extinktion; Quadrierte Mahalanobis-Distanzen = Distanz zw. den Zentroiden der Behandlungen; P = Signifikanzniveau der Mahalanobis-Distanzen).

		Quadrierte Mahalanobis-Distanzen			
		<i>O. sativa</i> -Ctrl	<i>L. perenne</i> -Ctrl	<i>O. sativa</i> -AMO	<i>L. perenne</i> -AMO
P	<i>O. sativa</i> -Ctrl	x	7,63	6,71	6,25
	<i>L. perenne</i> -Ctrl	0,0459	x	5,04	8,13
	<i>O. sativa</i> -AMO	0,0461	0,1715	x	9,89
	<i>L. perenne</i> -AMO	0,0575	0,0480	0,0159	x

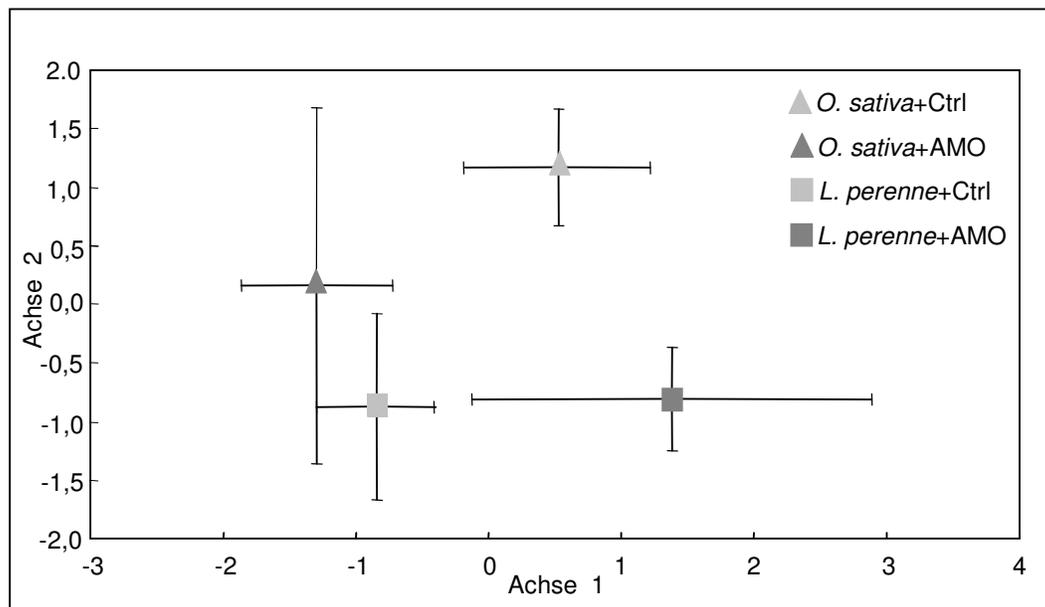


Abbildung 10: Diskriminanzanalyse Einfluss der Pflanzenart und von Amöben auf die Nutzung von 31 C-Quellen auf der Basis der maximalen Zunahme der Extinktion. Jedes Zentroid repräsentiert 6 Replikate; Zentroide \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Achse 1 erklärt 34,8% ($P < 0,01$) der Varianz, Achse 2 19,0% ($P < 0,05$).

Ein DFA-Modell, basierend auf der Zunahme der Extinktion von fünf Substraten, die Campbell et al. (1997) als typische Verbindungen in Wurzelexudaten charakterisieren (Äpfelsäure, D-Xylose, L-Asparagin, 4-Hydroxy-Benzoesäure und L-Threonin), besaß die größte statistische Robustheit und differenzierte die Gemeinschaft der Kontroll-Behandlung auf *O. sativa* von allen anderen Behandlungen und zusätzlich die Kontroll-Behandlung von der Amöben-Behandlung auf *L. perenne* ($F_{15,41} = 3,45$; $P = 0,0008$; Tab. 4; Abb. 11).

Tabelle 4: Ergebnisse der Diskriminanzanalyse zum Einfluss der Pflanzenart (*Oryza sativa*/*Lolium perenne*) und von Amöben (Ctrl/ AMO) auf das mikrobielle Muster der Substratnutzung der Kohlenstoffquellen Äpfelsäure, D-Xylose, L-Asparagin, 4-Hydroxy-Benzoesäure und L-Threonin (max. Zunahme der Extinktion; Quadrierte Mahalanobis-Distanzen = Distanzgröße zw. den Zentroiden der Behandlungen; P = Signifikanzniveau der Mahalanobis-Distanzen).

		Quadrierte Mahalanobis-Distanzen			
		<i>O. sativa</i> -Ctrl	<i>L. perenne</i> -Ctrl	<i>O. sativa</i> -AMO	<i>L. perenne</i> -AMO
P	<i>O. sativa</i> -Ctrl	x	9,10	16,49	7,27
	<i>L. perenne</i> -Ctrl	0,0284	x	7,75	10,21
	<i>O. sativa</i> -AMO	0,0025	0,0822	x	8,19
	<i>L. perenne</i> -AMO	0,0392	0,0249	0,0515	x

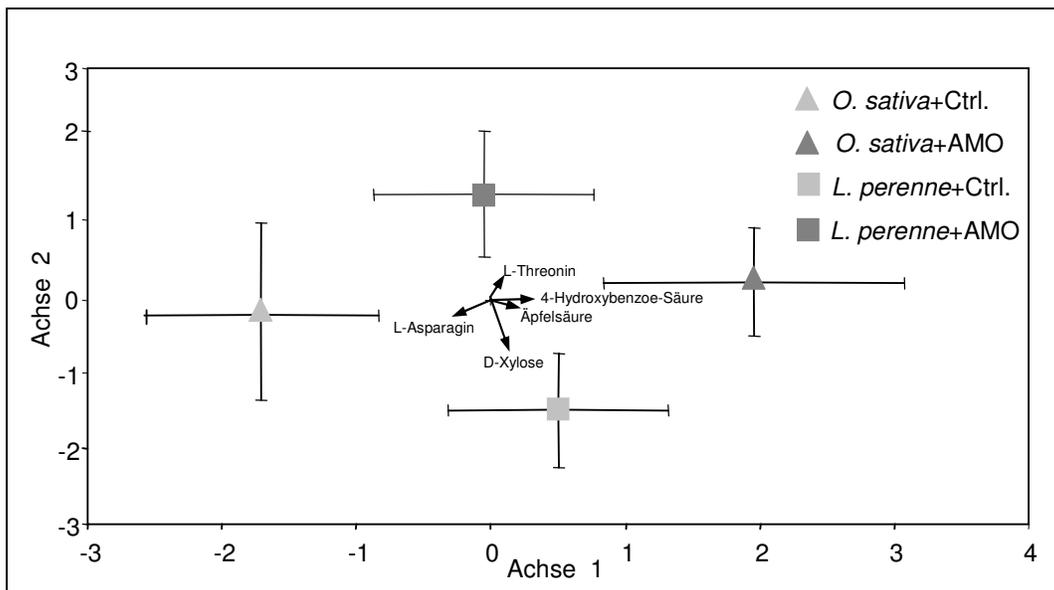


Abbildung 11: Diskriminanzanalyse zum Einfluss der Pflanzenart und von Amöben auf Nutzung von fünf Substraten auf der Basis des maximalen Anstiegs der Extinktion. Jedes Zentroid repräsentiert fünf oder sechs Replikate; Zentroide \pm SD. Pfeile: Loading der einzelnen Substrate; Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Achse 1 erklärt 38,9% ($P < 0,001$), Achse 2 erklärt 18,9% ($P < 0,05$).

Wurden die maximalen Steigungswerte für jede Kohlenstoffquelle auf Unterschiede zwischen den Behandlungen analysiert, so differenzierten sechs Kohlenstoffquellen die Rhizoplane von *O. sativa* von der Rhizoplane von *L. perenne* (Tab. 5). Wurde hingegen die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Steigung der einzelnen Kohlenstoffquellen kalkuliert, so trennten neun Kohlenstoffquellen die Kontrollen von den Amöben-Behandlungen: Bei diesen neun Substraten wurde die maximalen Steigung in den Amöben-Behandlungen später erreicht.

Tabelle 5: Ergebnisse von zweifaktoriellen Varianzanalysen zum Einfluss von Pflanzenart (SPEC) und Amöben (AMO) auf die Substratnutzung verschiedener Kohlenstoffquellen auf Basis der maximalen Steigungswerte (Steigung) oder der Zeit zum Erreichen der maximalen Steigung (Zeitpunkt; AMO*SPEC = Amöben*Pflanzenart-Interaktion; * = P < 0,05).

Kohlenstoffquelle	Steigung			Zeitpunkt		
	AMO	AMO*SPEC	SPEC	AMO	AMO*SPEC	SPEC
β-methyl-D-Glucosid				*		
D-Galactonsäure-γ-Lacton				*		
L-Arginin				*		
D-Xylose		*				
D-Galacturonsäure	*		*	*		
2-Hydroxy-Benzoesäure			*			
Tween 80				*		
L-Serin				*		
Itaconsäure			*	*		
Glycyl-L-Glutaminsäure			*			
Glucose-Phosphat				*		
Phenylethylamin		*				
Putrescin				*		

3.4 Diskussion

Die Versuche mit dem neu entwickelten aeroponischen System waren in Vorbereitung und Durchführung sehr arbeitsaufwändig und anfällig gegenüber systemischen Ausfällen trotz der Verbesserungen, die im zweiten Versuch vorgenommen wurden. Der geschlossene Kreislauf mit dem eingebauten Sterilfilter und der UV-Bestrahlung ermöglichten eine kontaminationsfreie Versuchsdurchführung über fünf Wochen. Die mit der UV-Strahlung verbundene erhöhte Ozonkonzentration in den Systemen war wahrscheinlich die Ursache für das schlechte Wurzelwachstum. In zukünftigen Versuchen sollte die Ozonkonzentration durch Verwendung von Ozonfallen (z.B. Aktivkohle) oder kontrolliertem Luftaustausch direkt nach einer UV-Strahlungsperiode (z.B. durch Einblasen von Luft über eine Waschflasche) verringert werden. Ein Komplettaustausch des Nährmediums im Acht-Tages-Turnus reicht zumindest bei Keimlingen und selbst bei großem bakteriellem Wachstum aus, um eine konstante Nährstoffkonzentration zu gewährleisten.

Abgesehen von den technischen Problemen ist das entwickelte aeroponische System offensichtlich für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Pflanzen, Mikroflora und Mikrofauna geeignet: Im zweiten Versuch etablierte sich auf den Wurzeln trotz der zwei Sterilisations-„Schritte“ im Kreislauf des Mediums (UV-Licht und Membranfilter) eine Amöbenpopulation von hoher Dichte. Mit 1.300 Amöben/cm² Wurzeloberfläche lag sie in der Größenordnung von Amöben-Dichten in der Rhizosphäre mit Boden als Substrat (ca. 18.000 Ind./cm³; Alpehi et al. 1996).

In beiden Versuchen waren sowohl das Wurzelwachstum wie auch das Sprosswachstum in Anwesenheit der Amöben erhöht. Die Seitenwurzelbildung nahm in beiden Versuchen überproportional zum Gesamtwachstum zu und resultierte im ersten und zweiten Versuch in einer um den Faktor 2 und 5 erhöhten Verzweigungsdichte bei *L. perenne*. Die Zunahme der Wurzellänge und der Seitenwurzelbildung in Anwesenheit von Amöben wurde zuvor z.B. bei Bonkowski et al. (2001) und Bonkowski & Brandt (2002) nachgewiesen. Nimmt man die Anzahl der Wurzelspitzen als Indikator für die Oberfläche der Wurzelhaarzonen, dann können Amöben die Nährstoffaufnahme zumindest über die Vergrößerung der nährstoffaufnahmefähigen Wurzeloberfläche fördern (quantitativer Aspekt der Nährstoffaufnahme). Vermutlich führten die deutlichen Wuchssteigerungen im Wurzelbereich zu einer verbesserten

Nährstoffaufnahme, die den zusätzlichen Aufbau von Sprossbiomasse von *L. perenne* und *O. sativa* förderte.

Angesichts der hohen Amöbendichten wurden die Gemeinschaften der Mikroorganismen in der Rhizoplane erwartungsgemäß von der Beweidung der Amöben - wie auch von der Pflanzenart - beeinflusst (vgl. Wieland et al. 2001). Die Analyse des metabolischen Potenzials der Mikroorganismen mit der Diskriminanzanalyse deutet darauf hin, dass sich die Mikroflora in der Rhizoplane an die pflanzenartspezifischen Rhizodeposite anpasste. In Übereinstimmung mit Campbell et al. (1997) unterschieden sich die Rhizoplanengemeinschaften von *L. perenne* und *O. sativa* vor allem durch die Nutzung von fünf Kohlenstoffverbindungen, die häufig in Exsudaten zu finden sind und offensichtlich die besondere Bedeutung für die Einnischung der Mikroorganismen auf der Rhizoplane besitzen. Auch die Beweidung der Bakterien durch Amöben führte zu deutlichen Veränderungen des CLPP, allerdings bei beiden Pflanzen ohne erkennbar einheitliche Tendenz. Möglicherweise werden die artspezifischen mikrobiellen Gemeinschaften in der Rhizoplane durch die Beweidung der Amöben derart modifiziert, dass diese beweideten Gemeinschaften bei den Pflanzenarten eine in artspezifischer Weise veränderte Exsudation induzieren. Diese veränderte Exsudation beeinflusste wiederum das CLPP. Henkes (2004) fand vergleichbare Ergebnisse bei der Analyse des Musters der Phospholipid-Fettsäuren in räumlich getrennten Wurzelabschnitten von Weizen (*Triticum aestivum* L.). Die Varianzanalyse der maximalen Zunahme der Extinktion der Kohlenstoffquellen differenzierte vor allem die Pflanzenarten voneinander. Die maximale Zunahme der Extinktion kann als Maßstab des mikrobiellen Wachstums mit einer Kohlenstoffquelle interpretiert werden. Durch dieses Ergebnis wird die Bedeutung der Pflanze auf die Mikroorganismen in der Rhizosphäre als Donor diverser Kohlenstoffquellen deutlich. Eine Varianzanalyse des Zeitraums bis zur maximalen Zunahme der Extinktion trennte Kontrollen von Amöben-Behandlungen. Dies weist auf eine Top-down-Kontrolle der Mikroorganismen durch Amöben hin, deren Gemeinschaften durch die Beweidung erst später in eine sigmoidale Wachstumsphase gelangten. Diese Top-down-Kontrolle ist durch die hohen Amöbendichte und die wenigen Refugien auf der Wurzeloberfläche erklärbar.

In Versuch 1 trat eine deutliche Förderung des Wurzelwachstums von *L. perenne* in Anwesenheit von Amöben nach nur 18 Versuchstagen auf. Das in diesem kurzen Zeitraum stark veränderte Wurzelwachstum dokumentiert eine Sensitivität von *L.*

perenne bezüglich der Prozesse in seiner Rhizosphäre in der Keimlingsphase. Allerdings war der Zeitraum, in dem die Kontrollbehandlung keine Amöben enthielt und in dem die Wuchsunterschiede zwischen den Behandlungen auftreten konnten, kürzer: Die systeminterne Kontamination der Kontroll-Behandlungen, die nach 16 Tagen festgestellt wurde, hatte vermutlich schon vor dem zehnten Tag stattgefunden. Offensichtlich war die Amöbenpopulation bis zum zehnten Tag soweit angewachsen, dass ein Beweidungseffekt indirekt die Zunahme des Wurzelwachstums verursachen konnte. Demnach existierte eine unterschiedliche Amöben-Behandlung faktisch maximal zehn Tage.

Im ersten Versuch stagnierte das Wachstum von *O. sativa* ab etwa dem zehnten Versuchstag bzw. ab dem fünfzehnten Tag nach der Keimung. In diesem Zeitraum ernährt sich ein Reiskeimling hauptsächlich von den Reserven im Samen und ist damit weitgehend unabhängig vom externen Nährstoffangebot (M. Iijima, mdl. Mitteilung). Möglicherweise konnten die Reiskeimlinge nach der Ausschöpfung interner Reserven unter den bestehenden Feuchtebedingungen und Nährstoffkonzentrationen nicht genügend Nährstoffe aufnehmen. *O. sativa* benötigt zur Nährstoffaufnahme einen hohen Wasserpartialdruck (Miyamoto et al. 2001), der im aeroponischen System eventuell fehlte. Es bleibt unklar, ob eine Erhöhung der Nährstoffkonzentration in Versuch 2 die Nährstoffaufnahme für *O. sativa* entscheidend verbesserte.

In den beiden dargestellten Versuchen war die Anzahl der Seitenwurzeln in Amöben-Behandlungen deutlich erhöht. Dadurch wurde vermutlich die Nährstoffaufnahmefähige Wurzeloberfläche aller Wurzelhaarzonen erhöht. Die Nährstoffaufnahme ist jedoch nicht ausschließlich durch diese aufnahmefähige Oberfläche definiert, sondern von weiteren, qualitativen Aspekten abhängig (Hodge et al. 1998). Da eine Bestimmung der Fähigkeit zur Nährstoffaufnahme, bezogen auf die Wurzeloberfläche, wegen des ungenügenden Pflanzenwachstums nicht durchgeführt werden konnte, bleibt der Einfluss von Amöben auf die qualitativen Aspekte der Nährstoffaufnahme weiterhin ungeklärt.

4 Einfluss von Amöben auf das Pflanzenwachstum, die Stickstoffaufnahme und die Bakteriengemeinschaft in der Rhizosphäre von *Lolium perenne* L. und *Oryza sativa* L. in Systemen auf Agar

4.1 Einleitung

Pflanzen können mit einem veränderten Wurzelwachstum auf ein variierendes Ressourcenangebot im Boden reagieren (Drew 1975, Bell & Lechowicz 1994, Welham et al. 2002). Diese Plastizität ist abhängig von der Pflanzenart und der funktionellen Gruppe der Pflanze (Crick & Grime 1987, Scherer-Lorenzen et al. 2003). Gräser (Poaceae) sind aufgrund ihres relativ stark verzweigten homorhizen Wurzelwerks mit sehr feinen Wurzeln besonders geeignet, auf (immobile) Nährstoffquellen im Boden mit verstärktem Wurzelwachstum zu reagieren (Übersicht in Fitter 2002). Die Pflanze kann die Wurzelstreckung und Lateralwurzelbildung regulieren und somit ihre Kosten/Nutzen-Relation für die Nährstoffaufnahme in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot optimieren (Fitter 2002; Dunbabin et al. 2002). Hierbei sind die Induktion und Streckung von Lateralwurzeln zwei bedeutende Prozesse bei der Entwicklung des Wurzelsystems, bei denen Auxin eine Schlüsselfunktion zugesprochen wird (Wightman et al. 1980, Casimiro et al. 2001). Direkte und indirekte Interaktionen mit Mikroorganismen in der Rhizosphäre zur Verbesserung der Nährstoffversorgung (Mykorrhiza, Amöben) können ebenfalls das Wurzelwachstum verändern (Jentschke et al. 1995, Bonkowski et al. 2001). Aufgenommene Nährstoffe werden dem Transpirationsstrom folgend im Xylem in den Spross transportiert. Pflanzenarten können entsprechend ihrer Lebensstrategie (z.B. nach Konkurrenzkraft oder Lebensdauer) auch mit dem Sprosswachstum plastisch auf ein verändertes Angebot von Nährstoffen reagieren (Bardgett & Chan 1999, Bol et al. 2002, Hodge 2003).

Auf die Bedeutung wachstumsfördernder Rhizobakterien (PGPR) wurde schon in den Kapiteln 1.1 und 1.3 eingegangen. Unter den Bodenbakterien stellen die gram-negativen Proteobakterien mit einem Anteil von über 30% in Wiesenböden eine dominante Gruppe dar (z.B. McCaig et al. 1999, Ochsenreiter 2002). Die Subgruppen der

Proteobakterien enthalten Arten mit für die Nährstoffmineralisation und für das Pflanzenwachstum bedeutenden Funktionen oder nachgewiesene PGPR (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ausgewählte Vertreter der Proteobakterien nach Subgruppen und Funktion in der Rhizosphäre. Phylogenetische Einordnung nach Balows et al. (2002).

Proteobakterien	Wichtige Vertreter	Funktion in der Rhizosphäre	Referenz
α-Subgruppe	<i>Rhizobium</i> sp., <i>Bradyrhizobium</i> sp.	Symbiotische N ₂ -Fixierung (Knöllchenbildung)	
	<i>Rhizobium radiobacter</i> , vormals <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Induktion von endogenen Wachstumsregulatoren; Tumorinduktion	
	<i>Azospirillum</i> sp.	Produzenten von Wachstumsregulatoren	El-Khawas & Adachi 1999
β-Subgruppe	<i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Nitrospira</i> sp.	Ammonium- oder Nitritoxidierer	Murase et al. 2003
γ-Subgruppe	<i>Azotobacter</i> sp.	Freie N ₂ -Fixierung	Nuruzzaman et al. 2003
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i>	Produzenten von Wachstumsregulatoren und Antibiotika, Biocontrol	Zahir et al. 2004
	<i>Xanthomonas</i> sp.	tlw. Pathogene	Da Silva et al. 2002
	<i>Enterobacter</i> sp.	Wachstumsförderung und Biocontrol	Kamensky et al. 2003
	<i>Klebsiella</i> sp.	Produzenten von Wachstumsregulatoren	El-Khawas & Adachi 1999
Nitrospira- Gruppe	<i>Nitrospira</i> sp.	Nitritoxidierer	Hovanec et al. 1998

Der Einfluss von Beweidung durch Protozoen auf die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre wurde vor allem unter morphologischen (z.B. Hahn & Höfle 2001, Jürgens & Matz 2002, Kern 2003), strukturellen und taxonomischen Gesichtspunkten untersucht (Van Hannen et al. 1999, Rønn et al. 2002). Griffiths et al. (1999) verknüpften taxonomische und metabolische Veränderungen der Gemeinschaft von

Mikroorganismen durch Protozoen-Beweidung. Die *in-situ*-Markierung taxonomischer bzw. funktioneller Gruppen der Bakterien (FISH; Wagner et al. 2003) ermöglicht die Untersuchung bakterieller Diversität in der Rhizosphäre in großer räumlicher Auflösung.

Die Versuche mit Agarsystemen dienten der Untersuchung der Veränderung des Wurzelwachstums und der Nährstoffaufnahme von zwei Gräsern (*Lolium perenne* und *Oryza sativa*) als Reaktion auf eine durch Beweidung veränderte mikrobielle Rhizosphärengemeinschaft. Hierzu wurde das Wurzelsystem der beiden Pflanzen intensiv untersucht. Auch der Einfluss der Amöben auf die Stickstoffaufnahme in den Spross wurde überprüft. Das Sprosswachstum und die Stickstoffallokation in den Spross der zwei Gräser sollten bei einem verbesserten Nährstoffstatus der Pflanzen durch Amöben gefördert werden. *L. perenne* diente als Modellpflanze mitteleuropäischer Gräser mit hoher morphologischer Plastizität. Das Wurzelsystem von Keimlingen von *O. sativa*, die als weitere Pflanze verwendet wurde, wurde in früheren Studien schon eingehend untersucht (z.B. Iijima & Kono 1991, Araki et al. 2002). Der Einfluss der Beweidung auf die Bakteriengemeinschaft auf Agar sollte wegen der fehlenden Refugien besonders groß sein. Im Versuch mit *L. perenne* wurde der Einfluss der Beweidung unter morphologischen Gesichtspunkten untersucht. Im Versuch mit *O. sativa* wurde der Einfluss der Beweidung auf die Dichte aller Eubakterien und unter taxonomischen Gesichtspunkten auf die Dichte von vier Subgruppen der Proteobakterien untersucht, denen bedeutende PGPR zugeordnet werden.

4.2 Material & Methoden

Versuchsaufbau

In dem Versuch mit *L. perenne* wurden sterile Keimlinge auf 1/10 NB-NMAS-Agar zur Keimung gebracht (20°C, 14:10 h Licht) und nach 8 Tagen auf 1-%igen 1/2-MS-Agar (Murashige & Skoog-Nährmedium; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in Petrischalen gesetzt. Den Petrischalen wurden in der Amöben-Behandlung 200 µl einer gewaschenen Amöbenkultur (ca. 100 Ind.; siehe Kap. 2.1.1) und 500 µl einer diversen Bakteriensuspension zugegeben (siehe Kap. 2.1.2). Die Kontroll-Petrischalen erhielten 700 µl der Bakteriensuspension. Die Pflanzen wuchsen bei 24°C (innerhalb der Petrischale; Raumtemperatur 20°C), einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14:10 h und einer Lichtmenge von 250 µmol PhAR. Zwischen dem 14. und 16. Versuchstag wurde das Längenwachstum der Wurzeln auf der Unterseite der Petrischale skizziert und vermessen. Nach 20 Tagen wurden die Pflanzen vorsichtig von der Agaroberfläche entfernt. Die Bakteriengemeinschaften wurden durch Aufschwemmen mit 10 ml NMAS und 30-minütiges Schütteln im Vertikalrüttler von der Agar-Oberfläche abgelöst und mit Acridin-Orange angefärbt, um das Volumen der Bakterienzellen zu bestimmen (siehe Kap. 2.2.3). Die Sprosse wurden getrocknet, gewogen, zermahlen und deren C- und N-Gehalt bestimmt (siehe Kap. 2.2.9). Die Struktur der Wurzelsysteme wurde mit dem Programm „Winrhizo“ ausgewertet (siehe Kap. 2.2.7).

In dem Versuch mit *O. sativa* wurden den 10 Petrischalen der Amöben-Behandlung mit 5 ml 1-%igen 1/10 NB-NMAS-Agar mit 500 µl einer gewaschenen Amöbenkultur (ca. 1000 Ind.) und 500 µl einer diversen Bakteriensuspension inokuliert. Die 10 Replikate der Kontrolle erhielten je 500 µl Bakteriensuspension und 1/10 NB-NMAS. Die Suspensionen wurden mit einem Drigalsky-Spatel auf dem Agar verteilt. Samen von *O. sativa* wurden direkt nach der Sterilisation in den Petrischalen unter einem kleinen Agar-Stück gegen Austrocknung geschützt und bei 24°C Temperatur innerhalb der Petrischalen (20°C Raumtemperatur), 250 µmol PhAR und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16:8 h zur Keimung gebracht.

Nach sechzehn Tagen wurden Agarstücke mit Wurzeln von 3 Petrischalen je Behandlung ausgeschnitten. Die darauf etablierten Bakterienzellen wurden mit zwei verschiedenen Kombinationen von Fluoreszenzmarkern markiert (siehe Kap. 2.2.4).

Von den restlichen Pflanzen wurde sowohl die Sprossbiomasse wie auch der C- und N-Gehalt des Sprosses bestimmt (siehe Kap. 2.2.9). Die Haupt- und Seitenwurzeln wurden unter dem Mikroskop (40x; Fluovert FU, Leitz, Wetzlar) gezählt und deren Länge und Durchmesser ermittelt.

Experimentelles Design

Die beiden Versuche wurden in einem einfaktoriellen Design mit und ohne Amöben angesetzt. Im Versuch mit *L. perenne* wurden je 6 Replikate je Behandlung angesetzt, im Versuch mit *O. sativa* waren es 10 Replikate.

Die Petrischalen wurden zufällig verteilt in 4 Reihen mit je 3 oder 5 Schalen aufgestellt und im Turnus von 3 Tagen innerhalb ihrer Reihe rotiert; die Reihen selbst wurden ebenfalls gewechselt (randomisiertes Blockdesign).

Statistische Auswertung

Die Parameter Spross- und Wurzelbiomasse, C- und N-Konzentration und N-Gehalt des Sprosses sowie die Parameter der Wurzelarchitektur wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (GLM) auf signifikante Unterschiede untersucht. Im Versuch mit *L. perenne* wurden der Wurzel-Längenzuwachs zwischen Tag 14 und 16 für einzelne Wurzeln und die gesamten Wurzelsysteme und dazu die Gesamtlänge, die Anzahl der Wurzelspitzen und die Verzweigung analysiert. Im Versuch mit *O. sativa* wurden die Anzahl, die Gesamtlänge und die durchschnittliche Länge der Hauptwurzeln und der Seitenwurzeln sowie zusätzlich die Oberfläche der Seitenwurzeln ausgewertet. Die Verteilungsmuster der Wurzel-Durchmesserklassen (Versuch mit *L. perenne*) und der Längenklassen der Seitenwurzeln (Versuch mit *O. sativa*) wurden mit einer „repeated measures“-Varianzanalyse mit „Durchmesserklasse“ bzw. „Längenkategorie“ als „repeated factor“ und Amöben als unabhängige Variable untersucht. Die Volumenklassen von Bakterienzellen wurden ebenfalls mit einer „repeated measures“-Varianzanalyse untersucht (Versuch mit *O. sativa*). Die Dichte der Bakterien in diesem Versuch wurde nach taxonomischen Gruppen getrennt mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht.

4.3 Ergebnisse

Amöben

In den Kontrollen traten keine Kontaminationen durch Protozoen auf. Die Dichte der Amöben wurde in den jeweiligen Behandlungen nicht quantifiziert. Mit dem inversen Mikroskop (100-320x Phasenkontrast; Fluovert FU, Zeiss, Jena) wurden während des Versuchs Dichten von bis zu ca. 100 Individuen/cm² festgestellt. Während zu Beginn der Versuche ausschließlich aktive Amöben zu erkennen waren, dominierten zu Versuchende jeweils Zysten.

Spross

Die beiden untersuchten Gräser reagierten unterschiedlich auf Amöben in der Rhizosphäre: *L. perenne* baute bei unveränderter N-Konzentration mehr Biomasse im Spross auf und steigerte so den N-Gehalt im Spross. Im Gegensatz dazu erhöhte sich bei *O. sativa* die N-Konzentration bei unveränderter Biomasse.

Die Sprossbiomasse von *L. perenne* nahm in Anwesenheit von Amöben von $16,1 \pm 4,7$ mg auf $23,7 \pm 2,8$ mg zu ($F_{1,10} = 11,49$; $P = 0,0069$). Die Konzentration an N (5,51% in der Amöben-Behandlung gegenüber 5,23% in der Kontrolle) und C (39,2% in Amöben-Varianten gegenüber 40,3% in den Kontrollen) wurde durch Amöben nicht signifikant verändert. Die N-Menge im Spross der Pflanzen nahm von $0,83 \pm 0,21$ mg N in den Kontrollen um 59% auf $1,32 \pm 0,18$ mg N in Amöben-Behandlungen zu ($F_{1,10} = 17,89$; $P = 0,0017$).

Die Sprossbiomasse von *O. sativa* wurde durch Amöben nicht verändert ($18,55 \pm 5,32$ mg TG in Amöben-Behandlungen gegenüber $17,74 \pm 4,98$ mg TG in der Kontrollen; $F_{1,7} = 0,06$; $P = 0,8206$). Allerdings stieg die N-Konzentration von $2,90 \pm 0,03\%$ in der Kontrolle auf $4,01 \pm 0,47\%$ in Amöben-Behandlungen ($F_{1,5} = 15,37$; $P = 0,0112$). In Anwesenheit von Amöben wurde die N-Menge im Spross der Pflanzen jedoch nicht signifikant erhöht ($0,78 \pm 0,31$ mg in Amöben-Behandlungen gegenüber $0,51 \pm 0,17$ mg in den Kontrollen; $F_{1,5} = 2,35$; $P = 0,1857$).

Wurzelarchitektur

Amöben veränderten die Wurzelarchitektur von *L. perenne* und *O. sativa*.

Bei *L. perenne* wuchs das gesamte Wurzelsystem in der Kontrolle zwischen dem 14. und 16. Versuchstag täglich um $2,6 \pm 1,7$ cm, in der Amöben-Behandlung sogar um $13,6 \pm 6,2$ cm ($F_{1,12} = 20,51$; $P = 0,0007$). Das Wachstum einzelner Wurzeln übertraf in der Amöben-Behandlung das Wachstum in der Kontrolle um den Faktor 2,6 ($6,6 \pm 1,8$ mm/d gegenüber $2,7 \pm 1,6$ mm/d in der Kontrolle; $F_{1,12} = 18,51$; $P = 0,0010$).

Gegenüber der Kontrolle bildete *L. perenne* zum Versuchsende in Anwesenheit von Amöben ein um den Faktor 1,7 vergrößertes Wurzelsystem mit 2,7-mal mehr Wurzelspitzen aus (Tab 7; Abb. 12). Auch die Verzweigung war mit Amöben tendenziell höher (3,35 Wurzelspitzen/cm Wurzel gegenüber 2,13 Wurzelspitzen/cm Wurzel in der Kontrolle).

Die Wurzelsysteme der Behandlung mit Amöben unterschied sich bei *L. perenne* in ihrer prozentualen Verteilung der Wurzeldurchmesserklassen von den Wurzelsystemen der Kontrolle ($F_{6,60} = 6,60$; $P < 0,0001$ für die Interaktion „Durchmesserklasse*Amöben“ als „within subject effect“): Sie zeichneten sich in Anwesenheit von Amöben durch einen prozentual höheren Anteil an Feinstwurzeln (Durchmesser $< 0,2$ mm) aus ($54,4 \pm 6,3\%$ gegenüber $41,3 \pm 8,2\%$ in Ctrl-Behandlungen; $F_{1,10} = 9,54$; $P = 0,0115$).

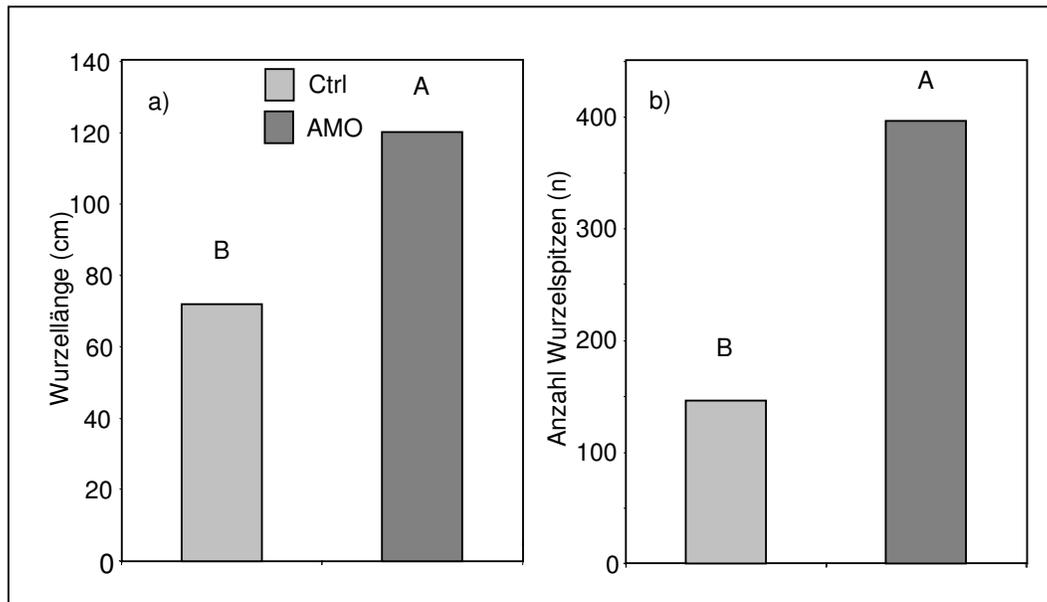


Abbildung 12: Einfluss von Amöben auf die Gesamtlänge des Wurzelsystems (a) und Anzahl an Wurzelspitzen (b) von *Lolium perenne* (Daten rücktransformiert). Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Honestly Significant Difference Test; $P < 0,05$).

Tabelle 7: Ergebnisse einer einfaktoriellen ANOVA für den Einfluss von Amöben (AMO) auf die Wurzellänge, Anzahl der Wurzelspitzen und Wurzelverzweigung von *Lolium perenne* (Daten logarithmiert).

Faktor	df	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen/ cm Wurzel	
		F	P	F	P	F	P
AMO	1,10	5,28	0,0445	10,90	0,0090	3,72	0,0824

Tabelle 8: Ergebnisse einer einfaktoriellen ANOVA für den Einfluss von Amöben (AMO) auf die Wurzellänge, Anzahl der Wurzelspitzen und Wurzelverzweigung von *Oryza sativa*; SW = Seitenwurzeln; PR = Primordien; HW = Hauptwurzeln.

Faktor	df	Anzahl HW		Anzahl PR < 4mm		Anzahl SW > 4mm	
AMO	1,7	6,18	0,0419	17,61	0,0041	14,14	0,0071
Faktor	df	mittl. Länge HW		mittl. Länge (SW + PR)		Anzahl SW/ cm HW	
AMO	1,7	5,99	0,0443	8,31	0,0236	12,32	0,0099

Die Anwesenheit von Amöben veränderte die Wurzelarchitektur von *O. sativa* hauptsächlich durch Förderung des Längenwachstums (siehe Anhang, Bild 4). Die Anzahl der Hauptwurzeln war in Behandlungen mit Amöben gegenüber den Kontrollen verringert (Tab. 8; Abb. 13); die Hauptwurzeln waren jedoch in Anwesenheit von Amöben um 40% länger; die Gesamtlänge aller Hauptwurzeln unterschied sich somit in beiden Varianten nicht signifikant ($38,2 \pm 8,8$ cm in der Kontrolle gegenüber $33,6 \pm 10,2$ cm in der Amöben-Behandlung).

Die Reispflanzen bildeten mit Amöben ein Drittel weniger Wurzelprimordien aus als in der Kontrolle (Abb. 14); von diesen Primordien entwickelten sich 25% zu Seitenwurzeln, die aus der Rhizosphäre ihrer Hauptwurzel deutlich herauswuchsen (> 4 mm). In den Kontroll-Behandlungen hingegen entwickelten sich nur 2% der Primordien zu Seitenwurzeln. Die Seitenwurzeln in den Amöben-Behandlungen waren generell länger als in der Kontrolle; Seitenwurzeln länger als 8 mm wurden nur von Pflanzen in Anwesenheit von Amöben produziert ($F_{4,28} = 10,98$; $P < 0,0001$ für die Interaktion „Längenklasse*Amöben“ als „within subject effect“; Abb. 15). Die Wurzeloberfläche der Seitenwurzeln außerhalb des Einflussbereiches der Hauptwurzeln (Distanz > 3 mm) erhöhte sich von $24,5 \pm 21,1$ mm² in den Kontrollen tendenziell auf $60,7 \pm 32,2$ mm² mit Amöben ($F_{1,7} = 4,15$; $P = 0,0809$).

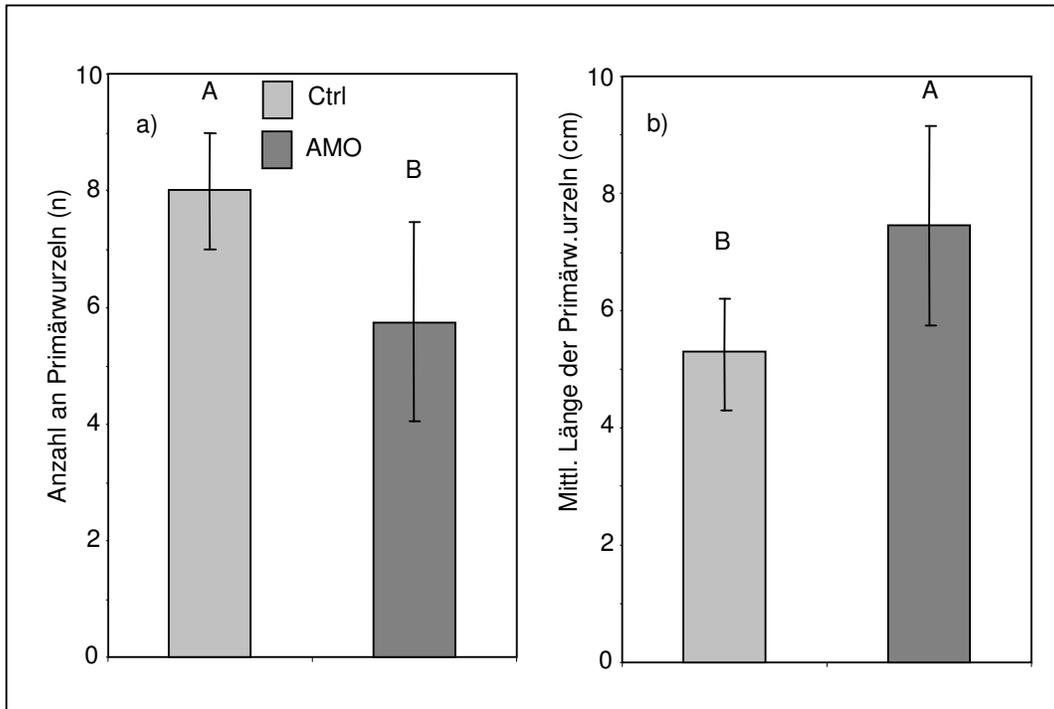


Abbildung 13: Einfluss von Amöben auf Anzahl (a) und mittlere Länge (b) von Hauptwurzeln von *Oryza sativa*; Mittelwert \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Honestly Significant Difference Test; $P < 0,05$).

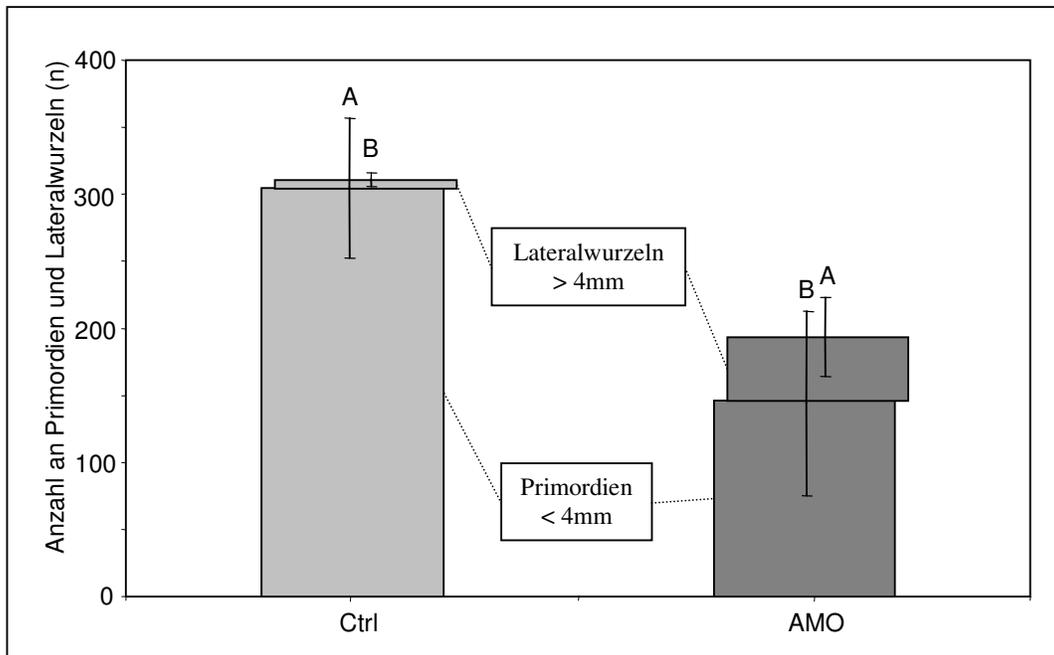


Abbildung 14: Einfluss von Amöben auf die Initiation von Primordien und die Streckung von Primordien zu Seitenwurzeln bei *Oryza sativa*; Mittelwert \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Honestly Significant Difference Test; $P < 0,05$).

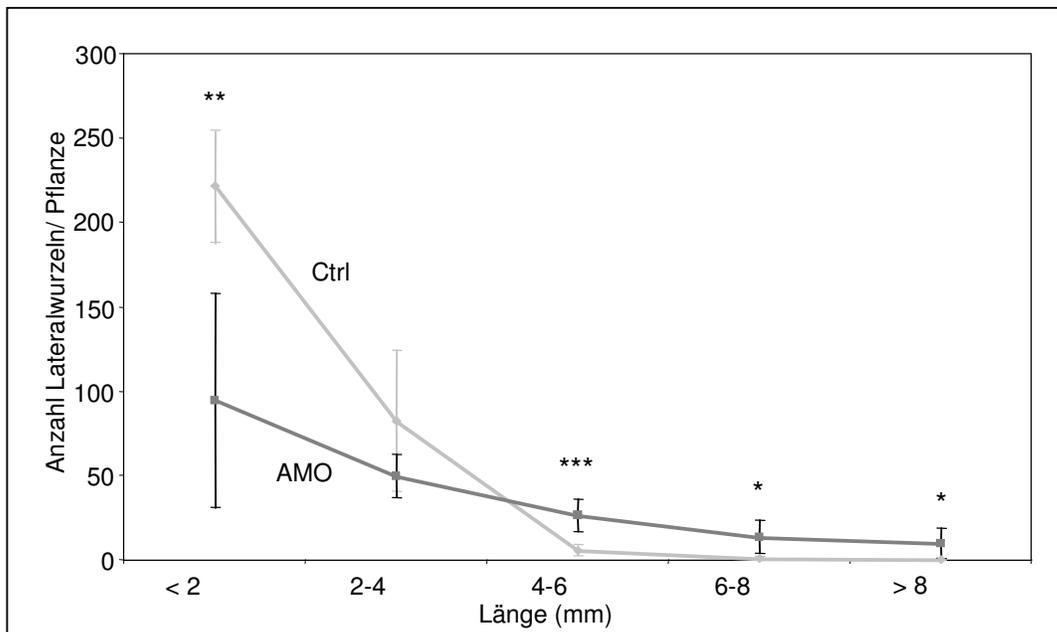


Abbildung 15: Einfluss von Amöben auf die Verteilung von Seitenwurzeln von *Oryza sativa* nach Längenklassen; Mittelwert \pm SD. Ctrl = Kontrolle, helle Linien; AMO = Amöbenbehandlung, dunkle Linien. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Struktur der Bakteriengemeinschaft

In dem Versuch mit *L. perenne* setzte sich in Anwesenheit von Amöben die Bakteriengemeinschaft durchschnittlich aus Zellen mit geringerem Volumen zusammen ($0,06 \pm 0,02 \mu\text{m}^3$ gegenüber $0,10 \pm 0,04 \mu\text{m}^3$ in der Kontrolle; $F_{1,12} = 4,94$; $P = 0,0462$). Das Verteilungsmuster der Volumenklassen dokumentiert eine generelle Verschiebung der Bakterien in der Amöben-Behandlung hin zu kleineren Zellvolumina ($F_{5,60} = 2,53$; $P = 0,0380$ für die Interaktion „Volumenklasse*Amöben“ als „within subject effect“; Abb. 16).

In dem Versuch mit *O. sativa* stieg die Anzahl der Eubakterien in Anwesenheit von Amöben gegenüber der Kontrolle um den Faktor 2,7 ($F_{1,5} = 9,91$; $P = 0,0254$; Abb. 17a; siehe Anhang, Bild 5). Der Anteil der α -Proteobakterien an allen markierten Eubakterien verringerte sich in Behandlungen mit Amöben von 44 auf 4%, jedoch war dieser Rückgang nicht signifikant ($F_{1,5} = 1,99$; $P = 0,2179$). In beweideten Gemeinschaften erhöhte sich die Dichte der β -Proteobakterien ($F_{1,10} = 8,43$; $P = 0,0151$; Abb. 17b) und verringerte sich die Dichte der Zellen der *Nitrospira*-Gruppe ($F_{1,10} = 10,97$; $P = 0,0050$), während die Dichte der γ -Proteobakterien nicht signifikant abnahm ($F_{1,10} = 1,17$; $P = 0,3051$; siehe Anhang, Bild 6).

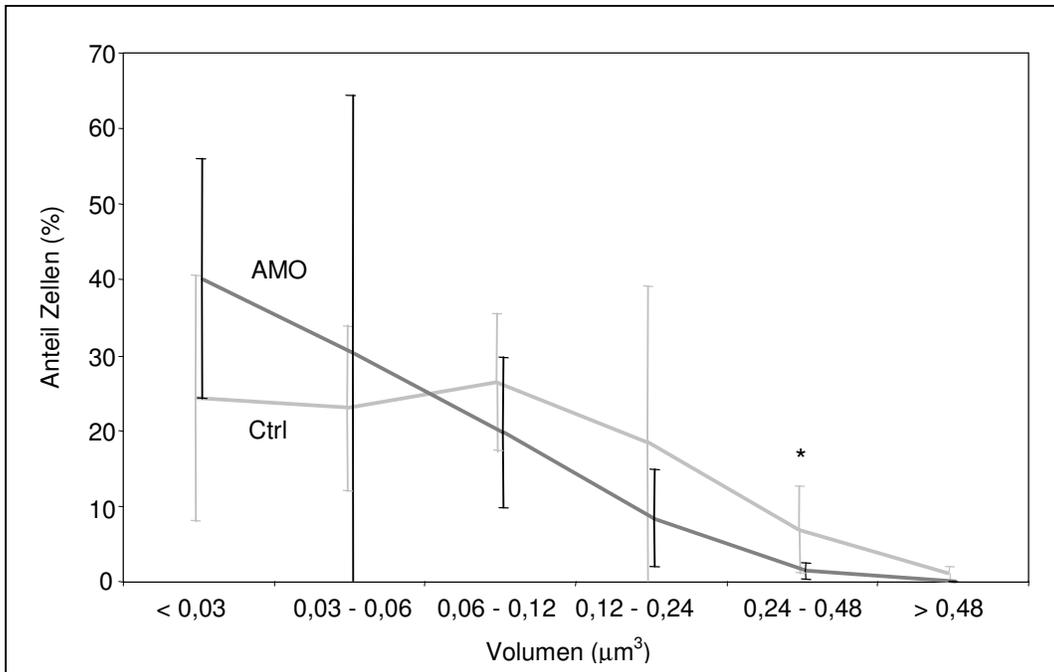


Abbildung 16: Einfluss von Amöben auf die Verteilung der Bakterienzellen nach Volumenklassen; Mittelwert \pm SD. Ctrl = Kontrolle, helle Linien; AMO = Amöbenbehandlung, dunkle Linien. * = $P < 0,05$.

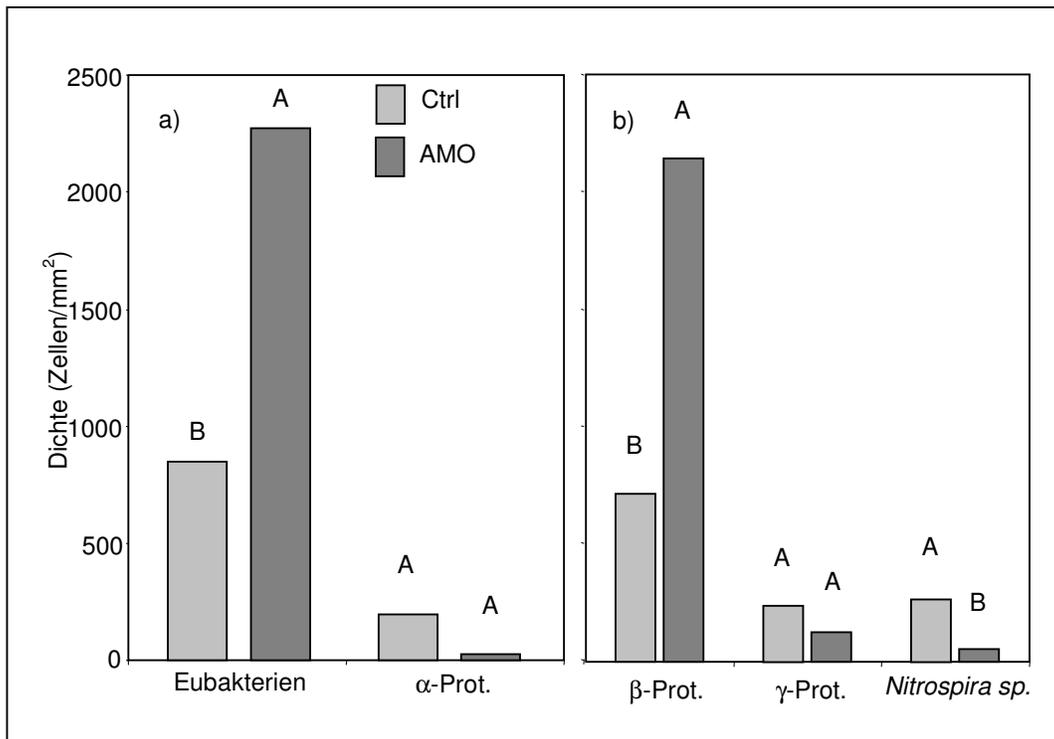


Abbildung 17: Einfluss von Amöben auf die Dichte von Eubakterien und α -Proteobakterien a) und auf die Dichte von β -, γ -Proteobakterien und der *Nitrospira*-Gruppe b) in der Rhizosphäre von *O. sativa* (Daten rücktransformiert). Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant abweichende Mittelwerte (Tukey's Honestly Significant Difference Test; $P > 0,05$).

4.4 Diskussion

Die Beweidung der Amöben veränderte erwartungsgemäß die Wurzelarchitektur von *L. perenne* und *O. sativa*. *L. perenne* reagierte auf Agar mit zusätzlichem Längenwachstum und einer Zunahme an Wurzelspitzen auf Amöben in der Rhizosphäre. Ähnliche Effekte von Amöben traten bei *L. perenne* und *O. sativa* in aeroponischen Systemen auf (Kap.) und wurden von Bonkowski & Brandt (2002) bei Kresse (*Lepidium sativum* L.) auf Agar nachgewiesen. In dem Versuch mit *O. sativa* auf Agar hingegen war die Bildung (Produktion) von Haupt- und Seitenwurzeln in Amöben-Behandlungen verringert, aber die Längenzunahme der Wurzeln war mit Amöben stärker ausgeprägt. Besonders deutlich beeinflussten Amöben die Produktion und Längenzunahme der Wurzelprimordien.

Zudem beeinflussten die Amöben die bakterielle Gemeinschaft. Im Versuch mit *L. perenne* bestand die beweidete Bakteriengemeinschaft hauptsächlich aus kleineren Zellen. Dieses Ergebnis kann interpretiert werden als Förderung von Taxa mit größerer morphologischer Plastizität, die dem Fraßdruck der Amöben durch Bildung kleinerer (oder größerer) Zellen ausweichen können (Hahn & Höfle 2001; Jürgens & Matz 2002). Das geringere durchschnittliche Zellvolumen in den beweideten Gemeinschaften könnte auch durch einen erhöhten Anteil jüngerer, nachwachsender Zellen erklärt werden. In dem Versuch von Alpehi et al. (1996) förderte die Protozoenbeweidung den mikrobiellen Umsatz und die respiratorische Aktivität der Rhizosphärengemeinschaft von *Hordelymus europaeus* L.

Im Versuch mit *O. sativa* nahm wider Erwarten die Zahl der markierten Eubakterien in beweideten Bakteriengemeinschaften zu. Die Eubakterien dominieren in terrestrischen Bodensystemen: beispielsweise wurden in den Bakteriengemeinschaften im Versuch mit *L. perenne* und *P. lanceolata* in Monokulturen (Kap. 5) keine Archaeobakterien nachgewiesen (R. Bartossek, mdl. Mitteilung). In vielen anderen Versuchen verringerten Protozoen die bakterielle Biomasse (z.B. Wardle & Yeates 1993, Bonkowski et al. 2000b, siehe Kap. 6). Möglicherweise profitierten hier bestimmte Bakteriengruppen innerhalb der Eubakterien - wie die β -Proteobakterien - von einer selektiven Beweidung der Amöben. Offensichtlich waren die beweideten Bakteriengemeinschaften auf Agar fast ausschließlich aus β -Proteobakterien zusammengesetzt. Mögliche Ursachen hierfür sind eine für die Prädatoren ungeeignete

Zellform/-grösse (siehe oben), ein verstärktes kompensatorisches Wachstum (Weekers et al. 1993), eine erneute Ausscheidung (Weisse et al. 2002) oder die Produktion von Signalstoffen oder Toxinen (Boenigk & Arndt 2002, Matz et al. 2004). Bevorzugte Gruppen von Beuteorganismen wiederum besitzen auf der glatten Agaroberfläche wenige Refugien und können deshalb stark dezimiert werden; hierzu zählen offensichtlich die α -Proteobakterien und die Bakterien der *Nitrospira*-Gruppe. In der durch Beweidung geförderten Gruppe der β -Proteobakterien sind viele nitrifizierende Taxa enthalten. Womöglich wurde durch die Amöbenbeweidung auch in Agarsystemen die Dichte der Nitrifizierer erhöht, wie dies Griffiths (1989) und Alpehi et al. (1995) in Bodensystemen fanden. Die Reduktion der α -Proteobakterien kontrastiert allerdings mit den Ergebnissen von Rønn et al. (2002). In deren Experiment profitierten von der Beweidung durch Protozoen. Allerdings wurden in diesem Versuch Flagellaten als Bakterienfresser eingesetzt. Tatsächlich unterscheiden sich verschiedene Protozoengruppen in ihrem Fressverhalten (Boenigk & Arndt 2002, Weisse 2002).

Die Aussagen über Veränderungen in den Bakteriengemeinschaften durch Amöben können hier nur für fest im Agar verankerte Bakterien gemacht werden, da die Agarstücke für die FISH-Färbung mehrfach gespült wurden. Die Ergebnisse der FISH-Färbung sollten daher nur in qualitativer Hinsicht als Verschiebung in der Dominanz einzelner Gruppen interpretiert werden.

Möglicherweise steigerten *L. perenne* und *O. sativa* in Behandlungen mit Amöben den N-Gehalt bzw. die N-Konzentration in den Sprossen durch die Aufnahme von Nitrat, das von nitrifizierenden β -Proteobakterien produziert wurde. Bei beiden Pflanzen können auch die Veränderungen in der Wurzelarchitektur in Anwesenheit von Amöben eine gesteigerte N-Aufnahme durch einen Anstieg der nährstoffaufnahmefähigen Wurzeloberfläche erklären (quantitativer Aspekt der Nährstoffaufnahme, siehe Kap. 3.1). Ort der Nährstoffaufnahme ist die an die Wurzelspitze anschließende Wurzelhaarzone (Lüttge et al. 1988, Glass 2002). Die Zunahme von Wurzelspitzen wird daher für *L. perenne* wahrscheinlich die nährstoffaufnahmefähige Oberfläche vergrößern. Aber nicht allein die Anzahl der Wurzelspitzen fördert die Nährstoffaufnahme der Pflanzen. Durch fortgesetztes Längenwachstum müssen junge Seitenwurzeln aus einer Zone des erhöhten Nährstoffmangels herauswachsen, die die Hauptwurzel durch die Nährstoffaufnahme in ihrer Umgebung geschaffen hat, um einen eigenen Beitrag zur Nährstoffversorgung der Pflanze leisten zu können. Diese Zone

besitzt je nach Mobilität der Ionen einen unterschiedlichen Durchmesser von einem bis wenigen Millimetern (Übersicht in Glass 2002). In Amöbenbehandlungen war die Anzahl dieser Seitenwurzeln deutlich höher als in der Kontrolle; auch die zur Nährstoffaufnahme fähige Wurzeloberfläche der Hauptwurzeln war (als glatte Oberfläche berechnet) mit Amöben um den Faktor 2,5 größer als in den Kontrollen.

Für die Entwicklung der Jungpflanze ist neben der aktuell erhöhten Nährstoffaufnahme die verbesserte räumliche Erschließung des Bodens durch sich streckende Seitenwurzeln von Bedeutung. Bei Reis werden dünne und kurze Seitenwurzeln des „S“-Typs und dickere, längere Seitenwurzeln des „L“-Typs unterschieden (Iijima & Kono 1991, Tanaka et al. 1995). Nur Seitenwurzeln des „L“-Typs können sich weiter verzweigen und so weitere Bereiche zur Nährstoffaufnahme erschliessen. *O. sativa* bildete diese „L“-Typ-Wurzeln offensichtlich nur in Anwesenheit von Amöben. Damit besaßen Wurzelsysteme die Voraussetzung für eine Fortführung der gesteigerten Nährstoffaufnahme über das untersuchte Keimlingsstadium hinaus.

Wie bei den Veränderungen des Wurzelwachstums reagierten die beiden untersuchten Pflanzen auch bei Wachstum und Stickstoffmenge des Sprosses unterschiedlich auf Amöben: *L. perenne* baute mit dem zusätzlich zur Verfügung stehenden Stickstoff bei konstanter N-Konzentration zusätzliche Biomasse auf. Diese Strategie kann dem Gras in Konkurrenzsituationen, wie sie in typischen Wiesengesellschaften von *L. perenne* auftreten, Vorteile im Kampf um Licht bringen. *O. sativa* hingegen steigerte bei erhöhter N-Verfügbarkeit in Behandlungen mit Amöben und bei unveränderter Sprossbiomasse die N-Konzentration im Gewebe. Eventuell speicherte Reis den Stickstoff für die Samenbildung.

In zukünftigen Studien könnte die Analyse bakterieller Rhizosphären-Gemeinschaften nach funktionellen Gesichtspunkten (z.B. das Ammonium-Monooxygenase-Gen *AmoA* als Marker für NH_4^+ -oxidierende Bakterien; z.B. Holmes et al. 1995, Purkhold et al. 2000) wertvolle Hinweise für den Einfluss von Amöben auf das Wachstum und die Nährstoffversorgung der Pflanzen liefern.

5 Einfluss von Amöben und VA-Mykorrhiza auf das Wachstum von *Lolium perenne* L. und *Plantago lanceolata* L. in Bodensystemen

5.1 Einleitung

Pflanzen geben relativ große Mengen ihres assimilierten Kohlenstoffs in die Rhizosphäre ab, die maximal bis zu 40% des gesamten assimilierten Kohlenstoffs betragen kann (Lynch & Whipps 1990). Die Aufwendungen zur Bildung der direkten Symbiose mit VA-Mykorrhiza können für die Pflanze zudem bis zu 20% des netto fixierten Kohlenstoffs betragen (Söderström 1992, Smith & Read 1997; siehe Kap. 1.5). Diese Zahlen verdeutlichen, dass unterirdische Prozesse und Interaktionen in der Rhizosphäre für die Pflanze relativ energieaufwendig sind. Das Kohlenstoffbudget für den Aufbau von Sprossbiomasse oder Verteidigungsstrukturen wird dadurch beträchtlich verringert.

In den bisher beschriebenen Versuchen in den Kapiteln 3 und 4 und auch in Untersuchungen anderer Autoren wurde gezeigt, dass Protozoen die Ausbildung eines größeren und verzweigteren Wurzelsystems fördern (Übersicht in Bonkowski 2004). Die Zunahme an Wurzelspitzen bedeutet eine erhöhte Rhizodeposition. Als hauptsächlich leicht abbaubare Kohlenstoffquellen fördern die Rhizodeposite das Wachstum und die Aktivität der Mikroorganismen (Alphei et al. 1996). Von diesem erhöhten mikrobiellen Wachstum profitieren wiederum die Protozoen (Bonkowski & Brandt 2002). Mit einem verzweigteren Wurzelsystem vergrößert sich die aufnahmefähige Fläche der Pflanze. Dadurch kann die Pflanze mehr Stickstoff aufnehmen (siehe Kap. 4).

Mykorrhiza hingegen fördert hauptsächlich die Aufnahme von Phosphor. Das Mycel des Pilzes fungiert als bedeutende Erweiterung des Wurzelwerks, um Quellen von eher immobilen Nährstoffen (vor allem Phosphate, aber auch Ammonium; Hodge et al. 2001) zu erschließen. Die Effizienz der Mykorrhiza ist abhängig von dem Grad der Mykorrhizierung der Pflanzenwurzel (Fitter & Merryweather 1992), der Pflanzenart (Van der Heijden et al. 2003) und der Nährstoffverfügbarkeit für die Pflanzen (z..B. Chambers et al. 1980). Im Gegensatz zu Amöben führt die Mykorrhiza meist zu einer Reduktion der Wurzelsystems, wodurch sich die Kosten für den Aufbau eines eigenen Wurzelsystems verringern (Lerat et al. 2003).

Erstmals wurden die Interaktionen von Pflanzen mit Mykorrhiza und Protozoen von Jentschke et al. (1995) und Bonkowski et al. (2001) mit Ekto-Mykorrhiza untersucht. Bonkowski et al. (2001) zeigten hierbei einen „trade-off“ in der Kohlenstoff-Allokation zwischen Ekto-Mykorrhiza und Protozoen bei Fichten auf.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte untersucht werden, ob ähnliche Interaktionen zwischen Pflanzen, Protozoen auch mit VA-Mykorrhiza bestehen. Dabei wurde der wechselseitige Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf das Wachstum und die Stickstoffaufnahme von in Monokulturen wachsenden *Lolium perenne* und *Plantago lanceolata* untersucht. Diese Pflanzenarten besitzen eine unterschiedliche Wurzelstruktur und sind im Freiland unterschiedlich stark mykorrhiziert (Fransson et al. 2003, Hodge 2003). *P. lanceolata* besitzt gegenüber *L. perenne* ein weniger stark verzweigtes Wurzelsystem, ist im Freiland stark mykorrhiziert und kann einen großen Teil seines Nährstoffbedarfs durch die Assoziation mit Mykorrhiza decken (Grime et al. 1987). Daher sollte *P. lanceolata* vor allem von der Mykorrhiza profitieren. *L. perenne* sollte mit seinem fein verzweigten Wurzelsystem stärker auf Amöben reagieren können. Zudem ist das Gras weniger intensiv mykorrhiziert. Da die Pflanzen wahrscheinlich nicht gleichermaßen von Amöben und Mykorrhiza profitieren, sollten Amöben und Mykorrhiza die Konkurrenz der auch im Freiland gemeinsam anzutreffenden Arten beeinflussen (vgl. Klironomos 2003, Van der Heijden 2003). Diese Fragestellung sollte im zweiten Versuch in einem Konkurrenzversuch überprüft werden.

Zusätzlich sollte der gegenseitige Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die Atmungsaktivität und Biomasse der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden und deren Nährstofflimitierung untersucht werden, um herauszufinden, ob Amöben und Mykorrhiza um pflanzliche Rhizodeposite konkurrieren.

Material & Methoden

Versuchsaufbau

In beiden Versuchen wurde Oberboden einer Ackerbrache (Roßdorf) aus einer Tiefe von 5-20 cm verwendet. Dieser wurde gesiebt (Maschenweite 4 mm) und für eine Stunde autoklaviert. Im Versuch mit Monokulturen wurden 150 g (TG) Boden in Versuchsgefäße mit einer gasdurchlässigen Membran im Deckel (260 ml-Kulturflaschen; Nunc A/C, Roskilde, Dänemark; siehe Anhang, Bild 7) eingefüllt und mit 10 ml NMAS auf 15% Bodenfeuchte angefeuchtet. Im Konkurrenzversuch wurde 250 g TG mit 15% Bodenfeuchte in transparente „OS 140“-Boxen (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande) eingefüllt. Dies sind zylinderförmige, transparente Versuchsgefäße mit einem Volumen von ca. 500 ml und einem gaspermeablen Gazestreifen im transparenten Deckel (siehe Anhang, Bild 9). Zur Etablierung der Mikroflora wurden die Böden des Konkurrenzversuchs zwei Monate bei 20°C gelagert.

In jedem Versuchsgefäß wurde ein Pflanzloch vorbereitet, in das in der Mykorrhiza-Behandlung ca. 1 cm² große Agarstücke mit Hyphen und Sporen des VA-Mykorrhiza-Pilzes *G. intraradices* (auf modifiziertem Romand-Strullu-Medium) in die Pflanzlöcher eingesetzt wurden. Die Variante ohne Mykorrhiza erhielt keine Agarstücke (Versuch mit Monokulturen) oder Agarstücke ohne Mykorrhiza (Konkurrenzversuch).

Boden mit einer diversen mikrobiellen Gemeinschaft wurde mit NMAS 1:1 vermischt und 20 min geschüttelt (siehe Kap. 2.1.2). Allen Versuchsgefäßen wurden 1 ml (Versuch mit Monokulturen) oder 5 ml (Konkurrenzversuch) des Überstandes zugegeben. Den Behandlungen mit Amöben wurden in 120 µl (Versuch mit Monokulturen) oder 250 µl (Konkurrenzversuch) einer gewaschenen Amöbenkultur etwa 1000 Amöben zugegeben (siehe Kap. 2.1.1). Den Kontrollen wurden 120 oder 250 µl einer protozoenfreien Bakteriensuspension aus der Amöbenkultur zugefügt, die nach zweimaliger Zentrifugation der Amöbenkultur aus dem jeweiligen Überstand gewonnen wurde (2 und 4 min, 1000 U/min).

Sterilisierte Samen von *L. perenne* und *P. lanceolata* (siehe Kap. 2.1.3) wurden zur Überprüfung der Sterilität in Mikrotiterplatten separiert und bei 20°C in 1/10 NB-NMAS zur Keimung gebracht. Im Versuch mit Monokulturen wurde 5 Tage nach der Keimung je ein Same in die Kulturflaschen eingesetzt. Verwendet wurden hier Keimlinge von *P. lanceolata* mit einer Schleimhülle ohne (endophytische) Bakterienbesiedlung. Im Konkurrenzversuch wurden je 2 sterilisierte Samen von *L.*

perenne und *P. lanceolata* 8 oder 5 Tage nach der Keimung in die Versuchsgefäße eingesetzt. Hier besiedelten vermutlich endophytische Bakterien umgehend die Schleimhüllen von einigen der oberflächen-sterilisierten Samen von *P. lanceolata*. Um den Bakterieneintrag für alle Versuchsgefäße ähnlich zu gestalten, wurden alle *P. lanceolata*-Samen vor dem Versuchsstart in einer Petrischale in NMAS für 30 min sanft geschüttelt. Bei 22°C in den Versuchsgefäßen (Raumtemperatur 20°C), einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14:10 h und einer Lichtmenge von 250 µmol PhAR wuchsen die Pflanzen 40 Tage (Versuch mit Monokulturen) oder 25 Tage (Konkurrenzversuch) bis zur destruktiven Ernte. Der Konkurrenzversuch wurde vorzeitig abgebrochen, da der tägliche Blattzuwachs bei *L. perenne* zu stagnieren begann.

Von jeder Pflanze wurde die Sprossbiomasse bestimmt. Die Wurzeln wurden vorsichtig von Bodenpartikeln gesäubert und zum Nachweis der Mykorrhizierung mit Tinte angefärbt (siehe Kap. 2.2.2). Im Konkurrenzversuch konnten die Wurzelsysteme der vier Pflanzen nicht quantitativ getrennt werden. Dennoch konnten unter dem Binokular viele Wurzeln einer Art zugeordnet werden. In diesem Versuch wurden die Arbuskel in den Wurzelzellen ausgezählt, wobei die mykorrhizierten Wurzeln bestmöglich einer Pflanzenart zugeordnet wurden. Danach wurde die Architektur der Wurzelsysteme mit dem Programm „Winrhizo“ vermessen (siehe Kap. 2.2.7) und die Wurzelbiomasse bestimmt. Bodenproben wurden zunächst bei 5°C gelagert und dann 3 Tage bei 20°C akklimatisiert, bevor die mikrobielle Respiration gemessen wurde (siehe Kap. 2.2.5).

Experimentelles Design

Der Versuch mit Monokulturen wurde in einem dreifaktoriellen Design mit den Faktoren Pflanzenart (*L. perenne* oder *P. lanceolata*), Amöben (mit und ohne) und Mykorrhiza (mit und ohne) mit insgesamt 40 Versuchsgefäßen in 8 Varianten mit je 5 Replikaten angesetzt. Im Konkurrenzversuch wurden 28 Versuchsgefäße in einem zweifaktoriellen Design mit den Faktoren Amöben und Mykorrhiza in 4 Varianten mit je 7 Replikaten angesetzt.

Die Versuchsgefäße wurden zufällig verteilt in 4 Reihen mit je 7 oder 10 Gefäßen aufgestellt und im Turnus von 3 Tagen innerhalb ihrer Reihe rotiert; die Reihen selbst wurden ebenfalls gewechselt (randomisiertes Blockdesign).

Statistische Auswertung

Im Versuch mit Monokulturen wurde mit einer dreifaktoriellen Varianzanalyse untersucht, ob die Pflanzenart, Amöben oder Mykorrhiza die Parameter der Biomasse (Gesamt-, Spross- und Wurzelbiomasse und Spross/Wurzel-Verhältnis), des Nährstoffgehalts (C- und N-Konzentration und C/N-Verhältnis des Sprosses) sowie der Wurzelarchitektur (Gesamtlänge, Anzahl Wurzelspitzen, Verzweigung) beeinflussen. In leichter Abwandlung wurde im Konkurrenzversuch mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht, ob Amöben und/oder Mykorrhiza die Parameter der Biomasse (gesamte Biomasse, gemeinsame Spross- und Wurzelbiomasse sowie Spross/Wurzel-Verhältnis, dazu Sprossbiomasse von *L. perenne* und *P. lanceolata*) sowie Parameter der Wurzelarchitektur (Gesamtlänge, Anzahl Wurzelspitzen, Verzweigung) beeinflussen.

In den Versuchen wurden die Basalatmung der Mikroorganismen, deren Biomasse C_{mic} und spezifische Respiration in Böden mit *L. perenne* mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse auf statistische Unterschiede durch die Behandlungen mit Amöben und Mykorrhiza untersucht. Die Nährstofflimitierung der Mikroorganismen wurde mit einer vierfaktoriellen Varianzanalyse auf statistische Unterschiede der Faktoren Amöben, Mykorrhiza, N- und P-Limitierung bestimmt.

Mit ein- bzw. zweifaktoriellen Varianzanalysen wurde die Abhängigkeit der Populationsdichte der Amöben von der Anwesenheit von Mykorrhiza und der Pflanzenart (nur im Versuch mit Monokulturen) untersucht. Im Konkurrenzversuch wurde zudem die Abhängigkeit der Anzahl von Arbuskeln (zugeordnet zu *L. perenne*, *P. lanceolata* oder nicht zuzuordnende Wurzeln) von der Anwesenheit der Amöben untersucht.

5.1 Ergebnisse

Amöbendichte

Im Versuch mit Monokulturen war die Population der Amöben in Anwesenheit von Mykorrhiza signifikant größer ($8,3 \cdot 10^4$ Ind./g Boden) als in der Behandlung ohne Mykorrhiza ($3,0 \cdot 10^4$ Ind./g Boden; $F_{1,14} = 7,57$; $P = 0,0156$). Die Pflanzenart veränderte die Dichte der Amöben nicht signifikant ($F_{1,14} = 2,56$; $P = 0,1320$).

Im Konkurrenzversuch bauten die Amöben Populationen einer Dichte von $4,8 \cdot 10^4$ Ind./g TG Boden auf. Die Dichte wurde hier durch Mykorrhiza nicht verändert ($F_{1,11} = 0,01$; $P = 0,9300$).

Kontaminationen mit Flagellaten traten im Versuch mit Monokulturen in 9 von 20 Versuchsgefäßen auf, die mit *P. lanceolata* besetzt waren. Gefäße mit *L. perenne* blieben hingegen kontaminationsfrei. Im Konkurrenzversuch wurden Flagellaten in 5 der 28 Gefäße nachgewiesen. Ausreissertests (siehe Kap. 2.2.11) konnten bei Pflanzen mit Flagellaten keine Wuchsbesonderheiten feststellen.

Mykorrhizierung

Im Versuch mit Monokulturen wurde die Mykorrhizierung qualitativ dokumentiert. In allen Mykorrhiza-Behandlungen wurden Arbuskeln und intraradikale Hyphen festgestellt. Allerdings waren sowohl Arbuskeln wie Hyphen sehr heterogen verteilt und nicht häufig.

Im Konkurrenzversuch kamen Arbuskeln fast ausschließlich in Wurzeln vor, die sicher *P. lanceolata* zuzuordnen waren. Insgesamt wurden pro Wurzelsystem $34,9 \pm 23,5$ Arbuskeln in Wurzeln von *P. lanceolata* festgestellt und nur $1,4 \pm 1,8$ Arbuskeln in Wurzeln von *L. perenne*. In Anwesenheit von Amöben verringerte sich die Zahl der Arbuskeln pro Wurzelsystem von $54,4 \pm 18,2$ auf $26,4 \pm 11,1$ Arbuskeln ($F_{1,24} = 12,05$; $P = 0,0020$).

Pflanzliche Biomasse und N-Gehalt

In beiden Versuchen unterschieden sich beide Pflanzenarten im Aufbau pflanzlicher Biomasse unabhängig von der Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza.

In der Monokultur produzierte *L. perenne* eine Sprossbiomasse von $143,8 \pm 15,8$ mg TG und eine Wurzelbiomasse von $13,4 \pm 3,5$ mg TG, *P. lanceolata* hingegen eine Sprossbiomasse von $135,0 \pm 9,6$ mg TG und eine Wurzelbiomasse von nur $7,0 \pm 2,8$ mg TG. Das durchschnittliche Spross/Wurzel-Verhältnis war 12,0 für *L. perenne* und 24,2 für *P. lanceolata*.

Im Konkurrenzversuch dominierte *L. perenne* und produzierte mit durchschnittlich $86,4 \pm 8,4$ mg etwa die vierfache Sprossbiomasse (TG) wie *P. lanceolata* mit $19,2 \pm 4,3$ mg. Die N-Konzentration im Spross von *L. perenne* unterschied sich nicht von der N-Konzentration in *P. lanceolata*, jedoch wurde die N-Konzentration in beiden Pflanzen durch Mykorrhiza unterschiedlich beeinflusst (siehe unten). Die C-Konzentration wurde von keinem der untersuchten Faktoren beeinflusst.

Die Faktoren Amöben und Mykorrhiza beeinflussten das Spross- und Wurzelwachstum beider Pflanzenarten (Tab. 9). Im Versuch mit Monokulturen hemmte die Anwesenheit von Amöben oder Mykorrhiza bei beiden Pflanzenarten den Aufbau von Sprossbiomasse gegenüber der Kontrolle, während in der Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza die gesamte Sprossbiomasse nahezu unverändert blieb (Amöben*Mykorrhiza Interaktion für die Sprossbiomasse; Abb. 18). Die Wurzelbiomasse wurde von den untersuchten Faktoren gegensätzlich zur Sprossbiomasse beeinflusst: tendenziell förderte die Anwesenheit von Amöben oder Mykorrhiza den Aufbau von Sprossbiomasse gegenüber der Kontrolle, während in der Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza wiederum die Wurzelbiomasse unbeeinflusst blieb.

Tabelle 9: Ergebnisse einer dreifaktoriellen ANOVA zum Einfluss der Pflanzenart (SPEC), von Mykorrhiza (MYK) und Amöben (AMO) auf Gesamt-, Spross- und Wurzelbiomasse und auf das Spross/Wurzel-Verhältnis von *Plantago lanceolata* u. *Lolium perenne* in Monokulturen (df = 32).

Faktor	Gesamt-Biomasse		Spross-Biomasse		Wurzel-Biomasse		Spross/Wurzel-Verh.	
	F	P	F	P	F	P	F	P
SPEC	22,88	0,0001	10,50	0,0028	33,13	0,0001	13,03	0,0010
MYK	1,88	0,1801	1,87	0,1807	0,03	0,8639	0,50	0,4835
AMO	0,01	0,9463	0,01	0,9604	0,01	0,9564	0,67	0,4179
SPEC*MYK	0,73	0,3991	0,75	0,3932	0,01	0,9461	0,27	0,6045
SPEC*AMO	2,02	0,1648	1,10	0,3031	2,04	0,1624	0,99	0,3275
AMO*MYK	8,65	0,0060	12,95	0,0011	3,42	0,0737	2,82	0,1026
SPEC*AMO*MYK	2,41	0,1307	3,36	0,0760	0,58	0,4531	0,06	0,8143

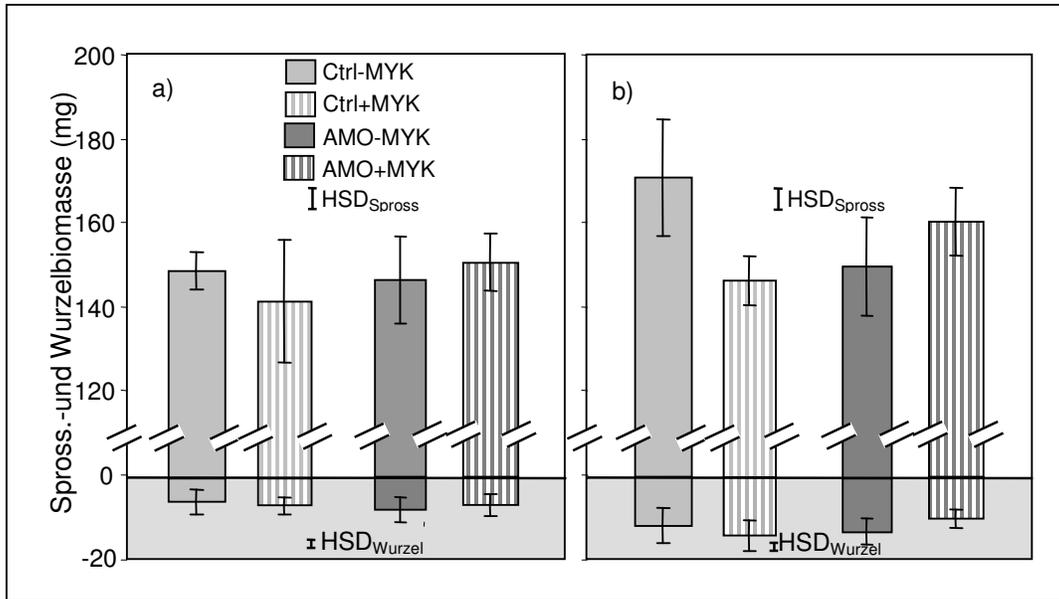


Abbildung 18: Einfluss von Mykorrhiza und Amöben auf die Spross- und Wurzelbiomasse von *Plantago lanceolata* (a) und *Lolium perenne* (b) in Monokulturen; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Im Konkurrenzversuch dagegen erhöhte sich die gesamte Biomasse in Amöben- und Mykorrhiza-Behandlungen gegenüber der Kontrolle ($114,4 \pm 9,2$ mg TG) auf $120,7 \pm 5,7$ mg bzw. $122,2 \pm 10,0$ mg TG, blieb aber in der kombinierten Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza unverändert ($114,2 \pm 6,3$ mg TG; signifikante Amöben*Mykorrhiza Interaktion; Tab. 10). Amöben und Mykorrhiza beeinflussten die gesamte Sprossbiomasse und hier maßgeblich die Sprossbiomasse von *L. perenne* (Abb. 19). In diesem Versuch wurde die Sprossbiomasse von *P. lanceolata*, wie auch die gesamte Wurzelbiomasse und das Spross/Wurzel-Verhältnis, durch die untersuchten Faktoren nicht verändert.

Tabelle 10: Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA zum Einfluss von Mykorrhiza (MYK) und Amöben (AMO) auf Gesamt-, Spross- und Wurzelbiomasse von *Plantago lanceolata* und *Lolium perenne* im Konkurrenzversuch und auf das Spross/Wurzel-Verhältnis (df = 22).

Faktor	Biomasse											
	Gesamt		Spross gesamt		Spross <i>L. perenne</i>		Spross <i>P. lanceolata</i>		Wurzel		Spross/Wurzel-Verhältnis	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
MYK	0,07	0,7980	0,43	0,5189	0,52	0,4795	0,08	0,7864	1,19	0,2874	2,02	0,1689
AMO	0,05	0,8274	0,55	0,4653	0,08	0,7787	0,54	0,4718	2,13	0,1585	1,90	0,1821
MYK*AMO	5,12	0,0339	4,87	0,0380	3,83	0,0631	0,01	0,9917	0,35	0,5604	0,06	0,8109

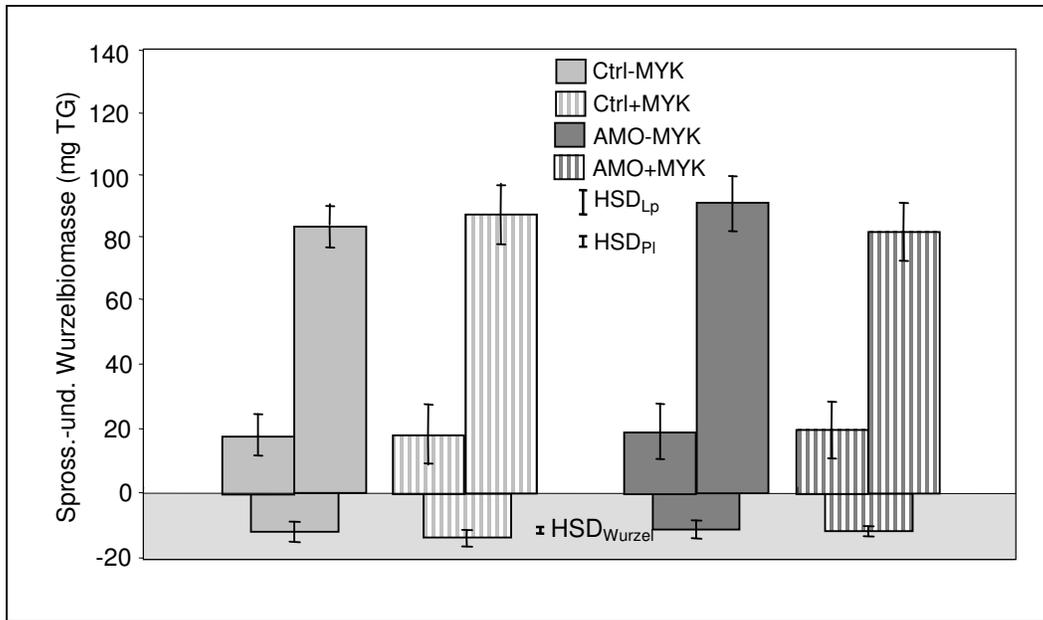


Abbildung 19: Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die Sprossbiomasse von *Plantago lanceolata* (linke Balken) und *Lolium perenne* (rechte Balken) und deren gemeinsame Wurzelbiomasse im Konkurrenzversuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$); Lp = *Lolium perenne*; Pl = *Plantago lanceolata*.

In Mykorrhiza-Varianten war die N-Konzentration des Sprosses von *P. lanceolata* gegenüber der Kontrolle von $4,56 \pm 0,38\%$ auf $5,51 \pm 0,70\%$ erhöht, die N-Konzentration des Sprosses von *L. perenne* jedoch von $4,90 \pm 0,85\%$ auf $4,54 \pm 0,30\%$ erniedrigt (Pflanzenart*Mykorrhiza Interaktion: $F_{1,31} = 10,12$; $P = 0,0039$). Der N-Gehalt des Sprosses wurde in ähnlicher Weise durch die Pflanzenart und Mykorrhiza verändert (Pflanzenart*Mykorrhiza Interaktion: $F_{1,31} = 8,85$; $P = 0,0058$; Abb. 20). Amöben beeinflussten die N-Konzentration in den Sprosses nicht ($F_{1,31} = 2,18$; $P = 0,1581$).

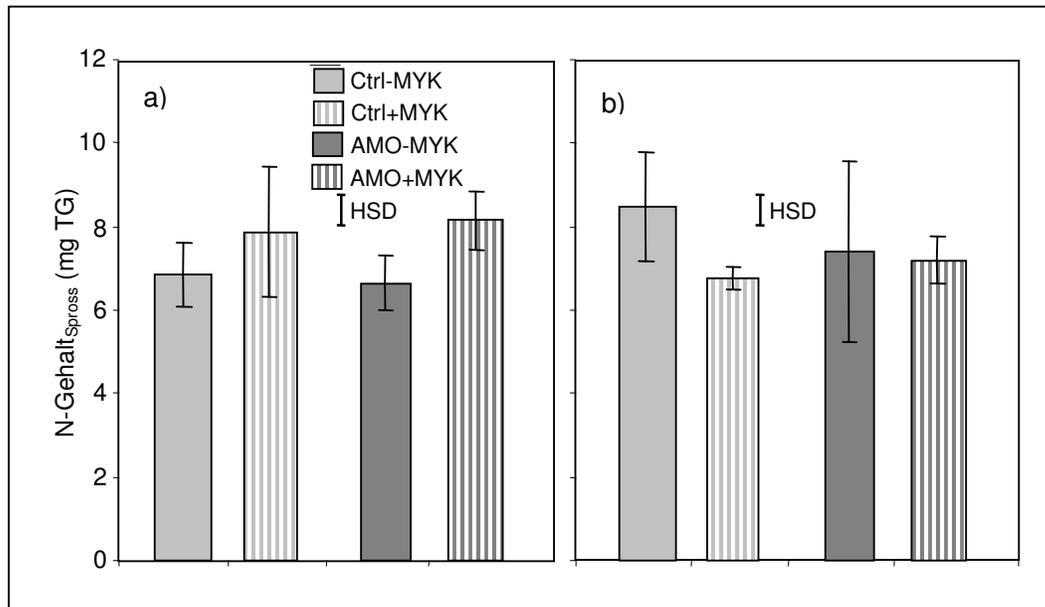


Abbildung 20: Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf den N-Gehalt im Spross von *Plantago lanceolata* (a) und *Lolium perenne* (b) in Monokulturen; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Wurzelarchitektur

Die Wurzelsysteme von *P. lanceolata* und *L. perenne* unterschieden sich grundlegend: Getrennt gewachsen war das Wurzelsystem von *P. lanceolata* 40% länger ($3,70 \pm 0,73$ m Gesamtlänge gegenüber $2,61 \pm 0,47$ m bei *L. perenne*; Tab. 11). *L. perenne* bildete dagegen mehr als doppelt so viele Wurzelspitzen aus (770 ± 195 gegenüber 344 ± 80 bei *P. lanceolata*), woraus eine deutlich höhere Verzweigung resultierte ($2,98 \pm 0,70$ Wurzelspitzen/cm Wurzel bei *L. perenne* gegenüber $0,97 \pm 0,31$ Wurzelspitzen/cm Wurzel bei *P. lanceolata*).

Tabelle 11: Ergebnisse einer dreifaktoriellen ANOVA zum Einfluss der Pflanzenart (SPEC), von Mykorrhiza (MYK) und Amöben (AMO) auf die Wurzellänge, Anzahl der Wurzelspitzen und die Verzweigung von *Plantago lanceolata* und *Lolium perenne* in Monokulturen ($df = 30$).

Faktor	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen/ cm Wurzel	
	F	P	F	P	F	P
SPEC	36,98	0,0001	68,94	0,0001	111,97	0,0001
MYK	1,63	0,2119	0,04	0,8361	0,02	0,8932
AMO	9,19	0,0050	1,07	0,3099	0,45	0,5053
SPEC*MYK	2,76	0,1069	0,01	0,9412	0,36	0,5558
SPEC*AMO	0,87	0,3582	0,11	0,7430	0,47	0,4979
AMO*MYK	0,01	0,9182	1,78	0,1916	0,71	0,4052
SPEC*AMO*MYK	0,66	0,4226	0,14	0,7135	0,01	0,9560

In Anwesenheit von Amöben besaßen *L. perenne* und *P. lanceolata* ein um 16 bzw. 21% längeres Wurzelsystem (Abb. 21). Die Anwesenheit von Mykorrhiza hingegen beeinflusste die Länge der Wurzelsysteme beider Pflanzen nicht.

Im Konkurrenzversuch konnten die Wurzeln nach der Mykorrhiza-Färbung teilweise den Arten zugeordnet werden: Wurzeln von *P. lanceolata* blieben nach der Entfärbung im gesamten Querschnitt bläulich gefärbt, während Wurzeln von *L. perenne* nur im Bereich der Leitbündel und Wurzelspitzen leicht angefärbt blieben. Eine vollständige Trennung gelang jedoch nicht. Nach eigenen Schätzungen dominierte *L. perenne* in der Produktion der Wurzeln mindestens in ähnlichem Maße gegenüber *P. lanceolata* wie beim Aufbau von Sprossbiomasse (Faktor 4, siehe oben). Zudem bildete der Parameter Gesamtwurzellänge die Ergebnisse der Wurzelbiomasse ab. Die Pflanzen bildeten in Amöben- oder Mykorrhiza-Behandlungen um 23% bzw. 17% längere Wurzelsysteme aus als in der Kontrolle; in der kombinierten Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza hingegen war die Gesamtwurzellänge dagegen nur um 4% erhöht (Amöben*Mykorrhiza Interaktion; $F_{1,22} = 5,33$; $P = 0,0308$; Abb. 22).

Die Anzahl der Wurzelspitzen und die Wurzelverzweigung blieben in beiden Versuchen in den Amöben- und Mykorrhiza-Behandlungen unverändert (z.B. im Konkurrenzversuch: $F_{1,22} = 0,10$; $P = 0,7522$ für die Anzahl der Wurzelspitzen und $F_{1,22} = 0,03$; $P = 0,8730$ für die Verzweigung).

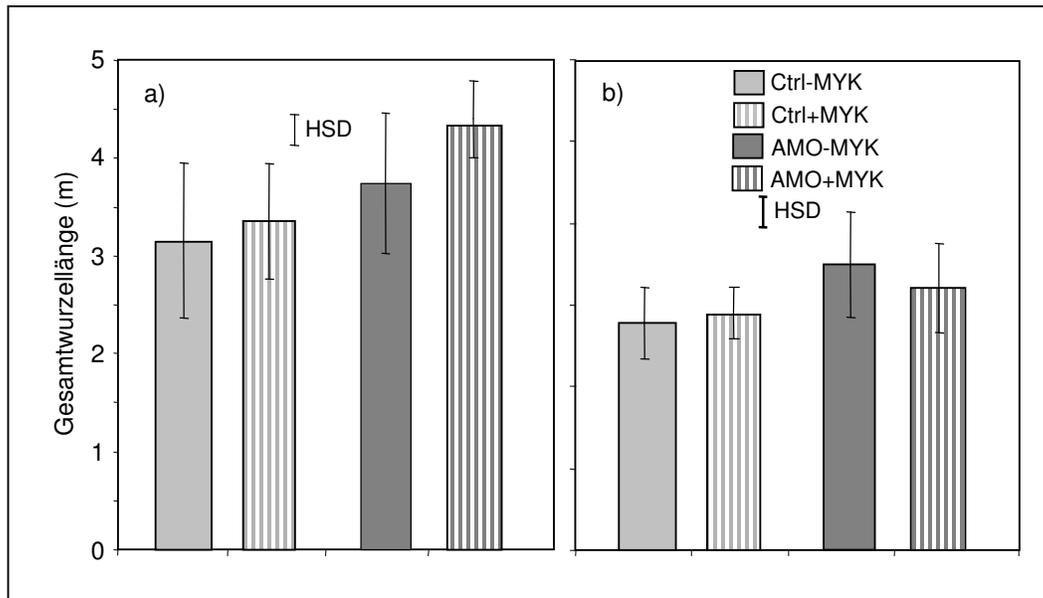


Abbildung 21: Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die Gesamtlänge der Wurzelsysteme von *Plantago lanceolata* (a) und *Lolium perenne* (b) in Monokulturen; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

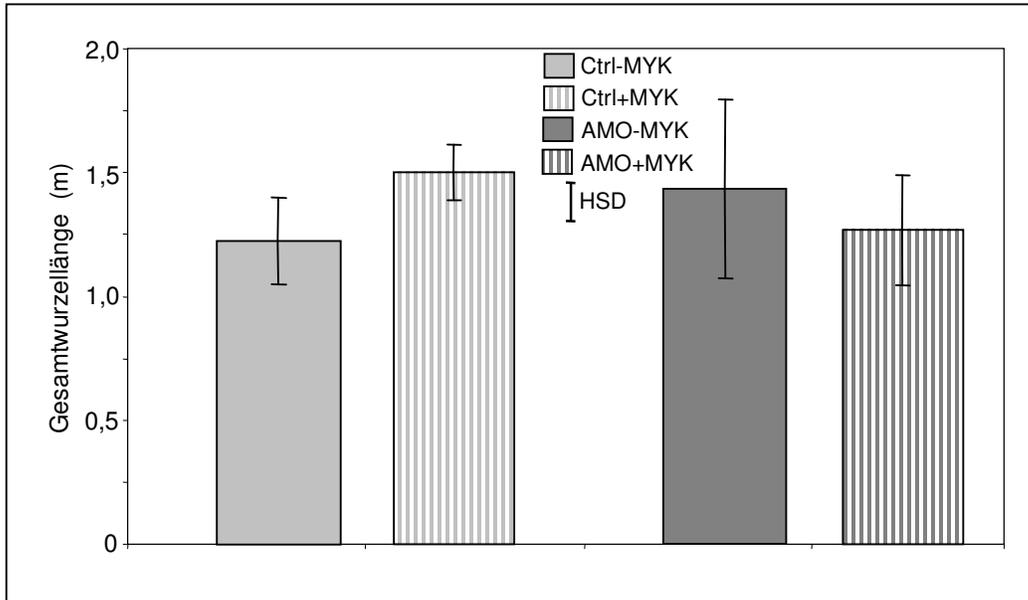


Abbildung 22: Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die Gesamtlänge der Wurzelsysteme von *Plantago lanceolata* und *Lolium perenne* im Konkurrenzversuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Mikrobielle Respiration

Im Versuch mit Monokulturen wurden nur Böden von *L. perenne* untersucht, da in Böden von *P. lanceolata* Kontaminationen mit Flagellaten aufgetreten waren.

In beiden Versuchen war die mikrobielle Respiration in Behandlungen mit Amöben verringert, wenn im Boden keine Mykorrhiza vorhanden war. Wurde der Boden mit Amöben und Mykorrhiza beimpft, so wurde die Basalatmung der Mikroorganismen nicht verändert. Im Konkurrenzversuch hatte auch Mykorrhiza allein einen negativen Effekt auf die Basalatmung (Amöben*Mykorrhiza Interaktion; im Versuch mit Monokulturen: $F_{1,16} = 4,73$; $P = 0,0450$; im Konkurrenzversuch: $F_{1,24} = 12,61$; $P = 0,0017$; Abb. 23). Amöben und Mykorrhiza beeinflussten in beiden Versuchen die mikrobielle Biomasse in unterschiedlicher Weise. In dem Versuch mit Monokulturen verringerten Amöben die mikrobielle Biomasse von $706 \pm 94 \mu\text{g } C_{\text{mic}}/\text{g TG Boden}$ in den Kontrollen auf $513 \pm 95 \mu\text{g } C_{\text{mic}}/\text{g TG Boden}$ ($F_{1,16} = 20,69$; $P = 0,0003$). Im Konkurrenzversuch nahm in Behandlungen mit Mykorrhiza die mikrobielle Biomasse von $559 \pm 119 \mu\text{g } C_{\text{mic}}/\text{g TG Boden}$ auf $452 \pm 110 \mu\text{g } C_{\text{mic}}/\text{g TG Boden}$ ab ($F_{1,24} = 5,64$; $P = 0,0267$). Hier verringerten Amöben die mikrobielle Biomasse nicht signifikant ($F_{1,24} = 0,53$; $P = 0,1259$).

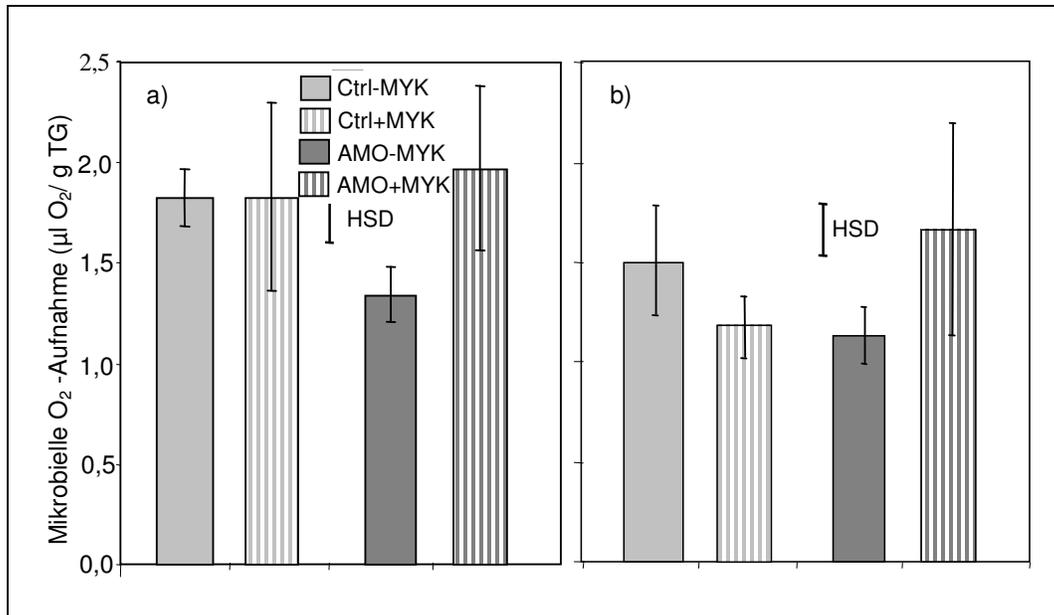


Abbildung 23: Einfluss von Amöben und Mykorrhiza auf die mikrobielle Basalatmung in der Rhizosphäre von *Lolium perenne* in Monokultur (a) und der Mischkultur von *Plantago lanceolata* und *Lolium perenne* (b); Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; MYK = VA-Mykorrhiza-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Die spezifische Respiration, ein Maß für den metabolischen Umsatz der Mikroorganismen, wurde im Versuch mit Monokulturen durch die Amöbenbeweidung tendenziell stimuliert, und zwar von $2,6 \pm 0,7$ ml O₂/g C_{mic} in Kontrollen auf $3,3 \pm 1,0$ ml O₂/g C_{mic} ($F_{1,16} = 3,06$; $P = 0,0995$). Im Konkurrenzversuch blieb die spezifische Respiration in Anwesenheit von Mykorrhiza ($2,3 \pm 0,6$ ml O₂/g C_{mic}) oder Amöben ($2,1 \pm 0,5$ ml O₂/g C_{mic}) gegenüber der Kontrolle ($2,7 \pm 0,5$ ml O₂/g C_{mic}) unverändert, stieg aber bei der Kombination von Mykorrhiza und Amöben deutlich an ($4,5 \pm 2,1$ ml O₂/g C_{mic}; Mykorrhiza*Amöben Interaktion; $F_{1,24} = 9,82$; $P = 0,0047$).

Entsprechend dem Einfluss der Organismen auf die mikrobielle Biomasse in den jeweiligen Versuchen veränderten Amöben im Versuch mit Monokulturen und Mykorrhiza im Konkurrenzversuch den mikrobiellen Nährstoffstatus. So waren im Versuch mit der Monokultur von *L. perenne* die Mikroorganismen in Amöbenbehandlungen weniger stark C-limitiert als in der Kontrolle ($0,094 \pm 0,008$ in Amöben+C gegenüber $0,108 \pm 0,016$ in Kontrolle+C für logarithmierte maximale Steigungen). Allerdings waren die Mikroorganismen in Amöbenbehandlungen im Gegensatz zur Kontrolle N-limitiert ($0,106 \pm 0,010$ bei Amöben+CN und $0,108 \pm 0,012$

in Kontrolle+CN; Amöben*N Interaktion, $F_{1,57} = 6,28$; $P = 0,0151$). Das mikrobielle Wachstum war stärker N- als P-limitiert ($0,113 \pm 0,008$ bei CN- und $0,106 \pm 0,017$ bei CP-Zugabe gegenüber $0,096 \pm 0,009$ bei C-Zugabe), wobei gleichzeitige N- und P-Zugabe das mikrobielle Wachstum hemmte ($0,100 \pm 0,010$ bei CNP-Zugabe; N*P Interaktion, $F_{1,57} = 20,64$; $P < 0,0001$).

Im Konkurrenzversuch war das mikrobielle Wachstum insgesamt mit $0,051$ gegenüber dem Wachstum in der Monokultur mit $0,104$ deutlich geringer durch C, N und P limitiert. Dennoch wurde das mikrobielle Wachstum von Mykorrhiza und den zusätzlich zu Glucose als Kohlenstoffquelle applizierten Nährstoffen beeinflusst (Tab. 12). Das mikrobielle Wachstum war in Mykorrhiza-Behandlungen weniger stark limitiert ($0,053 \pm 0,008$ gegenüber $0,048 \pm 0,010$ in der Kontrolle). Das mikrobielle Wachstum war P-limitiert, aber nicht N-limitiert ($0,056 \pm 0,008$ bei CP- und $0,041 \pm 0,005$ bei CN-Zugabe gegenüber $0,048 \pm 0,008$ bei C-Zugabe). Dennoch fand das größte mikrobielle Wachstum bei einer Zugabe von C, N und P statt ($0,057 \pm 0,008$; N*P Interaktion).

Tabelle 12: Ergebnisse einer vierfaktoriellen ANOVA für den Einfluss von Amöben (AMO) und Mykorrhiza (MYK) und der zusätzlichen Zugabe von Stickstoff (N) und Phosphor (P) auf den maximalen Anstieg der mikrobiellen Respiration in der assimilativen Phase nach C-Substratinduktion im Konkurrenzversuch (Daten logarithmiert und aus einer dreistündigen Messperiode gemittelt; $df = 84$).

Faktor	Steigung		Faktor	Steigung		Faktor	Steigung	
	F	P		F	P		F	P
AMO	2,96	0,7980	AMO*N	0,29	0,0339	AMO*MYK*N	2,61	0,7787
MYK	15,02	0,8274	AMO*P	2,64	0,7787	AMO*MYK*P	0,65	0,2874
N	3,82	0,8274	MYK*N	1,49	0,4795	AMO*N*P	0,63	0,5604
P	74,80	0,0631	MYK*P	0,12	0,0631	MYK*N*P	1,39	0,1585
AMO*MYK	0,01	0,0339	N*P	10,21	0,1585	AMO*MYK*N*P	0,39	0,5604

5.2 Diskussion

Pflanzen interagieren unter hohem Energieaufwand mit Mikroorganismen in der Rhizosphäre (z.B. Lynch & Whipps 1990, Rovira 1991). Einige dieser Mikroorganismen wie Protozoen und Mykorrhiza induzieren dabei Veränderungen im Wachstum und bei der Nährstoffaufnahme der Pflanzen. In vorhergehenden Versuchen in aeroponischen Systemen und auf Agar förderten Amöben das Wurzelwachstum (siehe Kap. 3 und 4). Auch in den hier dargestellten Versuchen mit Bodensystemen produzierten sowohl *L. perenne* als auch *P. lanceolata* mit Amöben und ohne Mykorrhiza eine tendenziell größere Wurzelbiomasse mit signifikant längerem Wurzelsystem. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Versuchen war hier jedoch die Verzweigungsdichte des Wurzelsystems in Behandlungen mit Amöben nicht erhöht. Möglicherweise wurden trotz sorgfältiger Auswaschung der Wurzeln aus dem Boden vor allem Feinstwurzeln abgerissen. Eventuell können dadurch die bedeutendsten Veränderungen in der Wurzelarchitektur in Behandlungen mit Amöben nicht dargestellt werden. Amöben förderten vor allem die Bildung von Feinstwurzeln bei *L. perenne* auf Agar, wo bei der Ernte keine Wurzeln abgerissen wurden (siehe Kap. 4). Jedenfalls unterschieden sich die Veränderungen in der untersuchten Wurzelarchitektur zwischen beiden Pflanzen qualitativ wie quantitativ kaum.

Entgegen der Ergebnisse in dem Versuch mit Agarsystemen förderten Amöben weder die Sprossbiomasse noch die N-Aufnahme in den Spross. Allerdings sind auch Ergebnisse anderer Untersuchungen bezüglich der Förderung der N-Aufnahme mit Protozoen widersprüchlich (Übersicht in Bonkowski 2004). Eine zusätzliche Verfügbarkeit von Nährstoffen durch Protozoen sollte besonders bei der starken N-Limitierung des Bodens im Versuch mit Monokulturen einen besonders deutlichen Einfluss auf Wachstum und Nährstoffaufnahme haben (vgl. „microbial loop“, Clarhom 1985). Hierfür wurden jedoch keine Hinweise gefunden.

In Assoziationen mit Mykorrhiza kann die Pflanze von dem pilzlichen Partner mit Nährstoffen, vor allem Phosphor, versorgt werden. Die fein verzweigten Hyphen ergänzen dabei die Wurzeln effizient bei der Nährstoffaufnahme. Daher ist die Wurzelbildung mykorrhizierter Pflanzen häufig reduziert (Lerat et al. 2003). Im Gegensatz dazu war hier die Biomasse in Mykorrhiza-Behandlungen ohne Amöben bei beiden Pflanzen in Monokulturen tendenziell erhöht. Möglicherweise ist die Stimulation

des Wurzelwachstums bei *L. perenne* und *P. lanceolata* eine artspezifische Ausprägung der Assoziation mit *G. intraradices*.

Trotz einer schwach ausgeprägten Kolonisation bei *L. perenne* beeinflusste die Mykorrhiza den Stickstoffgehalt im Spross des Grases. Möglicherweise konkurrierte die Mykorrhiza mit der Pflanze um Stickstoff (Wurst et al. 2004). Offenbar ist die Anzahl an Arbuskeln in Wurzeln kein guter Indikator für die Quantifizierung von Wechselwirkungen zwischen Pilz und Pflanze (vgl. Grime et al. 1987). Im Gegensatz zu *L. perenne* erhöhte Mykorrhiza die Stickstoffversorgung beim stärker mykorrhizierten *P. lanceolata*. Die Mykorrhiza kann die Stickstoffversorgung von Pflanzen direkt über die Versorgung durch das Mycel (Hodge et al. 2001) oder indirekt durch Förderung von PGPR verbessern (Hogde 2000). Die unterschiedliche Stickstoffbilanz der Assoziation mit *G. intraradices* kann unter Konkurrenzbedingungen im Freiland Vorteile für *P. lanceolata* gegenüber *L. perenne* bringen. Im Gegensatz zur Stickstoffbilanz wurde das Wachstum der beiden Pflanzen von *G. intraradices* nicht unterschiedlich beeinflusst.

Bei vielen Parametern des Pflanzenwachstums interagierten Amöben und Mykorrhiza in auffälliger Weise: So waren in den Monokulturen in Anwesenheit von Amöben oder Mykorrhiza die Sprossbiomasse tendenziell erniedrigt und die Wurzelbiomasse signifikant erhöht. In der kombinierten Behandlung mit Amöben und Mykorrhiza war diese Allokation der Biomasse in den Wurzelbereich nicht ausgeprägt. Eine ähnliche „morphologische Kompensation“ von Amöben- und VA-Mykorrhiza-Einflüssen dokumentierten Henkes (2004) beim Wachstum von Weizen (*Triticum aestivum* L.) bzw. Jentschke et al. (1995) und Bonkowski et al. (2001) mit Ekto-Mykorrhiza bei Fichten (*Picea abies* Karst.). Pflanzen verschiedener Familien scheinen unabhängig von der Art der Mykorrhizierung die morphologischen Veränderungen - als Reaktion auf die Mikroorganismen in der Rhizosphäre - regulieren zu können (vgl. Denison et al. 2003). Diese Regulation des Pflanzenwachstums beeinflusste offensichtlich die veränderte Nährstoffbilanz der Pflanzen mit Mykorrhiza nicht, da im Bezug auf die Stickstoffaufnahme die Mykorrhiza nicht mit Amöben nicht interagierte. Dies lässt auf getrennte Regulationsmechanismen von Wachstum und Nährstoffaufnahme bei Pflanzen schließen (vgl. quantitative und qualitative Aspekte der Nährstoffaufnahme, siehe Kap. 3; Hodge et al. 1998).

Konkurrierten beide Pflanzen miteinander, so dominierte *L. perenne* oberirdisch wie unterirdisch deutlich. In den Monokulturen hingegen bauten die beiden Pflanzen etwa gleich große Sprossbiomassen auf. Möglicherweise profitierte das Gras mit seinem

feinverzweigten Wurzelsystem von der niedrigeren Nährstofflimitierung des Bodens im Konkurrenzversuch. Diese geringere Limitierung bestand trotz zweimonatiger Lagerung des Bodens vor Versuchsbeginn, mit der die Nährstoffe, die durch die Autoklavierung freigesetzt wurden, wieder immobilisiert werden sollten. Im Gegensatz zum Versuch mit Monokulturen beeinflussten Amöben und Mykorrhiza im Konkurrenzversuch das oberirdische Wachstum von *P. lanceolata* nicht. Auch das Sprosswachstum von *L. perenne* war unter Konkurrenzbedingungen verändert: In Behandlungen mit Mykorrhiza oder Amöben war das Sprosswachstum in der Monokultur erniedrigt, in Konkurrenz jedoch erhöht. Wie im Versuch mit Monokulturen waren die Einflüsse von Amöben und Mykorrhiza auf die Sprossbiomasse im kombinierten Ansatz nicht ausgeprägt. Das Wurzelwachstum des Grases war wiederum in beiden Versuchen (im Konkurrenzversuch dominierte *L. perenne*) in der gleichen Weise durch Amöben oder Mykorrhiza gefördert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Einfluss von Protozoen und Mykorrhiza auf die Konkurrenz zwischen *L. perenne* und *P. lanceolata* im Freiland nicht vorhersagen. Allerdings verringert die hohe Nährstoffverfügbarkeit im Konkurrenzversuch die Aussagekraft der Ergebnisse.

Bei der Nährstoffaufnahme und dem Wachstum der Pflanzen spielt die Konkurrenz der Mikroorganismen um Nährstoffe im Boden eine bedeutende Rolle. Protozoen können hierbei durch Beweidung die Konkurrenzkraft der Pflanze steigern, während Mykorrhiza als Konkurrent die saprophytischen Mikroorganismen verringern kann (z.B. Bonkowski 2000b, Wamberg et al. 2003). In den beiden dargestellten Versuchen wurde die mikrobielle Atmung durch Amöben alleine und im Konkurrenzversuch durch Mykorrhiza alleine verringert. In diesen Behandlungen bildete *L. perenne* (als dominante Art im Konkurrenzversuch) längere Wurzelsysteme aus. Soweit untersucht, förderten diese längeren Wurzelsysteme die Nährstoffaufnahme nur in Anwesenheit von Mykorrhiza. Bezüglich der mikrobiellen Atmung kompensierten sich die Effekte von Amöben und Mykorrhiza in beiden Versuchen, obwohl sich Amöben und Mykorrhiza gegenseitig nicht direkt negativ beeinflussten. In der Monokultur förderte die Mykorrhiza offensichtlich sogar die Amöbenpopulation. Ein „trade-off“ der Pflanze bezüglich der C-Allokation in die Rhizosphäre zwischen Amöben und Mykorrhiza, wie sie bei den Untersuchungen mit Ekto-Mykorrhiza nachgewiesen wurde (Jentschke et al. 1995, Bonkowski et al. 2001), konnte bei diesen Versuchen mit VA-Mykorrhiza nicht dokumentiert werden.

Dennoch interagierten Amöben und VA-Mykorrhiza offensichtlich hinsichtlich der Aktivität der Mikroorganismen im Boden. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt aufgrund dieser Untersuchungen unklar; da er jedoch möglicherweise das Wurzelwachstum der Pflanzen beeinflusst, kann die intensive Erforschung dieses Mechanismus helfen, die komplexen Vorgänge zwischen den verschiedenen Organismengruppen in der Rhizosphäre weiter zu entschlüsseln.

6 Einfluss von Amöben auf die Aktivität von Auxin und Cytokinin in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* Heyn. in Bodensystemen

6.1 Einleitung

Phytohormone regulieren Wachstum und Entwicklung von Pflanzen. Die Wirkung der Phytohormone wird jedoch vom Gewebe und seinem Entwicklungszustand wie auch von der eigenen Konzentration (und der Konzentration der Derivate) und der Konzentration antagonistischer und synergistischer Phytohormone bestimmt („hormonal crosstalk“, Rodrigues-Pousada et al. 1999). Das Phytohormon Auxin (Indol-3-Essigsäure und deren Derivate) wird vor allem im Apikalmeristem des Sprosses und in jungen Blättern gebildet (Lüttge et al. 1998). Es ist in eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie z.B. Streckungswachstum (Darwin 1880), Erhalt der Apikaldominanz beim Spross (Thimann & Skoog 1933), Seitenwurzelbildung (Himanen et al. 2002) und gravitropem Wuchs der Wurzel (Rashotte et al. 2000) involviert. In der Wurzel wird Auxin zu einem geringen Teil selbst gebildet, zum größeren Teil wird Auxin von der Sprossspitze polar basipetal transportiert (Garrido et al. 2002) und kann mit Transporthemmstoffen wie z.B. NPA (1-Naphthylphthalam-Säure) unterbrochen werden, wodurch die Seitenwurzelbildung effektiv verringert wird (Reed et al. 1998, Casimiro et al. 2001). Cytokinine sind bekannte Antagonisten des Einflusses von Auxin auf das Wachstum von Seitenwurzeln (Wightman et al. 1980); sie werden bevorzugt in der Wurzelspitze, aber auch im gesamten Phloem produziert. Die Expression der Cytokininbiosynthese-Gene (Isopentenyltransferase, *IPT*) wird durch Cytokinine selbst, Auxin und Nitrat reguliert (Miyawaki et al. 2004).

Signalstoffe, auf die sowohl die Pflanze wie auch die Mikroorganismen in deren Rhizosphäre reagieren, ermöglichen eine Art regulatorischer Kommunikation in der Rhizosphäre zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Partnern („rhizosphere control points“; siehe Kap. 1.1). Hierbei ist erst teilweise geklärt, welche Mechanismen diese Signalstoffe in der Pflanze und in der Rhizosphäre bewirken. Beispielsweise kann Nitrat, von nitrifizierenden Bakterien produziert, in der Pflanze sowohl systemisch als

Nährstoff als auch lokal als Signalstoff fungieren, welches die Streckung der Wurzeln stimuliert (Zhang et al. 1999).

Die Veränderungen der Wurzelarchitektur in Behandlungen mit Amöben, vor allem die gesteigerte Wurzelverzweigung, sind vergleichbar mit der Applikation von Auxin (Gaspar et al. 2002) oder der Wirkung von PGPR, die über Signalstoffe das Wurzelwachstum verändern können (Ashgar et al. 2002). Tatsächlich begünstigt die Beweidung durch Amöben eine relative Zunahme auxinbildender Bakterien (Bonkowski & Brandt 2002). Im selben Versuch war die Länge und Anzahl der Seitenwurzeln von *Lepidum sativum* L. drastisch erhöht. Bonkowski und Brandt (2002) vermuteten daher, dass Amöben selektiv bestimmte PGPR fördern, die über die Abgabe von Auxin das Wurzelwachstum stimulieren. Die in den Kapiteln 3 und 4 beschriebenen Versuche haben Veränderungen sowohl in der Wurzelarchitektur als auch in der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft bestätigt.

Mit dem Einsatz des GUS-Reportergens bietet sich die Möglichkeit, die Anwesenheit bzw. Aktivität der Phytohormone Auxin (Transformante DR5) und Cytokinin (Transformante ARR5) mit der spezifischen Expression des Enzyms β -Glucuronidase nachzuweisen. Die Konzentration der freien Phytohormone kann näherungsweise mit dem fluorometrischen Nachweis für das gesamte Wurzelsystem quantifiziert werden (Jefferson et al. 1987). Mit histochemischen Methoden ist der qualitative Nachweis der GUS-Expression gewebespezifisch bis auf Zellebene möglich (z.B. Aloni et al. 2003).

In zwei Versuchen wurde die Frage untersucht, ob Amöben in der Rhizosphäre die interne Auxin- und Cytokininaktivität in den Wurzelspitzen beeinflussen. Hierzu wurden Transformanten von *A. thaliana* als Modellpflanze verwendet, bei denen die Hormonaktivität mittels des sensitiven GUS-Reportergens sichtbar gemacht werden kann. In beiden Versuchen wurden die GUS-Expression sowohl bei Keimlingen und Altpflanzen untersucht, um den Einfluss von Amöben auf entwicklungspezifische Muster der Hormonaktivitäten zu überprüfen. Zusätzlich wurde in den Versuchen die Kopplung von physiologischen Veränderungen, hier der Hormonaktivität in den Wurzelspitzen, und morphologischen Veränderungen des Wurzelwachstums untersucht. Außerdem wurde in beiden Versuchen der Einfluss von Amöben auf die Ammonium- und Nitratverfügbarkeit im Boden untersucht, da Nitrat sowohl die Seitenwurzelbildung als auch die Produktion von Phytohormonen beeinflussen kann. Da Auxin hauptsächlich im Spross gebildet wird und von dort in die Wurzel transportiert wird, sollte durch

Applikation von NPA in einem zweiten Versuch der basipetale Auxintransport in die Wurzelspitze verringert werden. Ziel war es hierbei, den Einfluss der Amöben auf die Hormonaktivität und die Wurzelarchitektur auch bei erniedrigtem Auxin-Niveau im Gewebe zu untersuchen, um die Frage zu klären, ob das zu einer verstärkten Wurzelverzweigung mit Amöben führende Auxin intern vom Spross oder extern von Bakterien gebildet wird.

Daneben sollte im zweiten Versuch der Phänotypus der Transformanten ARR5 mit ihrem Ökotyp „Wassilewskija“ verglichen werden, um die im ersten Versuch festgestellten phänotypische Unterschiede zwischen ARR5 und DR5 auf den Ökotyp oder die Transformation zurückführen zu können.

6.2 Material und Methoden

Versuchsaufbau

Im ersten Versuch wurde Sandboden vom ehemaligen August-Euler-Flugplatz in Griesheim (C/N-Verhältnis 12, Bodenfeuchte 10%) verwendet. Der Boden wurde gesiebt (Maschenweite 4 mm) und 30 min autoklaviert. 150 g FG Boden wurden in 110 durchsichtige Versuchsgefäße mit gasdurchlässiger Membran im Deckel eingefüllt (260 ml-Kulturflaschen „Nunclon“, Nunc A/C, Roskilde, Dänemark siehe Anhang, Bild 8). Im zweiten Versuch wurde Oberboden einer Ackerbrache aus 5-20 cm Tiefe verwendet (Roßdorf). Dieser wurde ebenfalls gesiebt und eine Stunde autoklaviert. 285 g FG Boden mit 15% Bodenfeuchte wurden in durchsichtige „OS 140“-Boxen (siehe Kap. 5) eingefüllt.

Die sterilisierten Böden wurden mit 5 ml einer diversen Bakteriensuspension re-inokuliert (siehe Kap. 2.1.2). Die Amöben-Behandlungen wurden zusätzlich mit 500 µl einer gewaschenen Amöbenkultur beimpft (siehe Kap. 2.1.1); den Kontrollen wurde 500 µl 1/10 NB-NMAS zugegeben.

Im ersten Teil von Versuch 1 wurden sterilisierte Samen der Transformanten ARR5 (Cytokinin-sensitiv) und DR5 (Auxin-sensitiv) auf 1-%igem NMAS-Agar in Mikrotiterplatten 4 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Samen keimten im Schwachlicht (150 µmol PhAR, 10:14 h, 24°C). Die Keimlinge wurden 3 Tage nach Keimungsbeginn in 70 Versuchsflaschen (je 3 Pflanzen für 3 unterschiedliche Erntetermine) eingesetzt. Die kleinen Keimlinge wurden sehr sorgfältig eingesetzt, um die sehr kurzen Wurzeln in der Flasche mit Boden zu bedecken, ohne den gesamten Keimling zu überdecken. Dennoch überlebten nur 38 der insgesamt 210 Pflanzen. Nach 2 Wochen wurde die Lichtmenge auf 250 µmol PhAR erhöht und nach 3 Wochen 5 ml steriles Aqua dest zugegeben. Nach 6 Wochen wurden die Pflanzen destruktiv geerntet (= Altpflanzen). Für den zweiten Teil von Versuch 1 wurden weitere 40 Versuchsgefäße 5 Wochen bei 20°C gelagert und dann sterilisierte und stratifizierte Samen der beiden Transformanten zusammen mit jeweils 0,5 ml sterilem Aqua dest eingesetzt. Auch diese Samen wurden unter oben beschriebenen Schwachlichtbedingungen zur Keimung gebracht. Der Keimungserfolg lag hier bei 90%. Nach 2 Wochen wurden die Keimlinge destruktiv geerntet (= Keimlinge). Die Hormonaktivität konnte an den ausgestochenen und

gesäuberten Wurzeln von 31 Keimlingen bestimmt werden. Bei 5 Keimlingen wurden die Wurzelspitzen entweder beim Ausstechen oder im Waschprozess abgetrennt.

Im zweiten Versuch wurden je 3 sterilisierte Samen von ARR5 (Cytokinin-sensitiv), DR5 (Auxin-sensitiv) und „Wassilewskija“ (dem Ökotypen von ARR5) in den Versuchsgefäßen bei 4°C 4 Tage stratifiziert und anschließend unter den oben beschriebenen Schwachlicht-Bedingungen zur Keimung gebracht. „Wassilewskija“-Pflanzen gediehen jedoch schlecht und wurden nicht ausgewertet. Nach 7 Tagen wurde die Lichtmenge auf 250 µmol PhAR erhöht. Zeitgleich wurde das Epikotyl von 2 der (maximal) 3 Transformanten-Keimlingen stengelumfassend mit 5 µM NPA-Lanolin-Paste behandelt. Diese Konzentration ist die niedrigste von Reed et al. (1998) verwendete NPA-Konzentration, die das Wurzelwachstum von *A. thaliana* beeinflusste. NPA wurde zuvor in 70% EtOH gelöst und dann mit autoklavierter Lanolin-Paste homogen vermischt. Bei der Behandlung mit Lanolinpaste wurden einige der Keimlinge verletzt. Ein dritter Keimling je Versuchsgefäß blieb als Reserve (bei eventueller NPA-Überdosierung) unbehandelt.

Drei Tage nach Applikation von NPA wurde je ein Keimling pro Versuchsgefäß mittels Stechrohr (4 cm Durchmesser) vorsichtig mit dem umgebenden Boden ausgestochen (= Keimlinge). Beim Säubern der Wurzeln wurden die Wurzelspitzen von 6 Keimlingen abgetrennt. Deshalb standen beim ersten Erntetermin nur Wurzelspitzen von 34 Keimlingen zur Verfügung, wobei bei DR5 in der Behandlung mit Amöben und +NPA nur ein Individuum zur Auswertung kam.

Die unbehandelten Jungpflanzen (ohne Lanolinpaste) wurden nach 2 Wochen ausgestochen, um Wuchskonkurrenten zu den heranwachsenden, NPA-behandelten Jungpflanzen zu eliminieren. Nach insgesamt 7 Wochen wurden 51 Altpflanzen destruktiv geerntet (= Altpflanzen). Die Böden wurden im Versuchsverlauf durch Zugabe von insgesamt 30 ml Aqua dest in der 3. und 5. Woche feucht gehalten.

Während des ersten Versuchs wurde der Zeitpunkt des Blühbeginns erfasst. Zum Versuchsende beider Versuche wurden die Anzahl der Blütenansätze und die Sprossbiomasse bestimmt und beim zweiten Versuch zusätzlich die Anzahl der Rosettenblätter. Die Hormonaktivität in den Wurzelspitzen der Keimlinge (in beiden Versuchen) und der Altpflanzen im ersten Versuch wurde mit dem histochemischen GUS-Nachweis untersucht (siehe Kap. 2.2.7; siehe Anhang, Bild 10). Hierzu wurden die Wurzeln vorsichtig im Wasserbad gesäubert und in einem zweiten Reinigungsschritt

mit einer Pinzette von Streupartikeln befreit. Die Wurzelarchitektur der Altpflanzen wurden danach mit dem Programm „winrhizo“ vermessen (siehe Kap. 2.2.7). Nicht gefärbte Wurzeln wurden nicht verwertet, da diese Wurzeln offensichtlich nicht vollständig fixiert wurden. Es wurden digitale Bilder von 1-7 Wurzelspitzen je Keimling und 10 zufällig ausgesuchte Wurzelspitzen je Altpflanze digital ausgewertet. Bei den Altpflanzen im zweiten Versuch wurde zunächst das Frischgewicht bestimmt und dann das Wurzelsystem geteilt: Ein Großteil der Wurzeln wurde für die fluorometrische GUS-Bestimmung und zur Bestimmung des Proteingehalts verwendet und homogenisiert (siehe Kap. 2.2.8). 5-12% des Wurzelsystems wurden erneut gewogen und mit der Software „Winrhizo“ ausgewertet (siehe Kap. 2.2.7). Die „Winrhizo“-Daten wurden anhand des Frischgewicht-Anteils auf das gesamte Wurzelsystem übertragen. Zur Überprüfung dieser Extrapolation wurden vor der Auftrennung der Wurzeln digitale Bilder von den kompletten Wurzelsystemen der DR5-Transformanten angefertigt und diese ebenfalls mit „Winrhizo“ ausgewertet. Hierbei korrelierten die Ergebnisse von Extrapolation und digitalen Vorlagen nicht. Daher wurden nur die „Winrhizo“-Datensätze der kompletten Wurzelsysteme der Transformanten DR5 statistisch ausgewertet.

Experimentelles Design

Im ersten Teil von Versuch 1 wurden für jede der zwei Transformanten 17 Kulturflaschen mit Amöbeninokulum und 18 Kulturflaschen als Kontrollen angesetzt. Im zweiten Teil des Versuchs wurden die beiden Amöben-Behandlungen (mit und ohne) für jede Transformante 10-fach repliziert.

Im zweiten Versuch wurden 89 Versuchsgefäße verwendet, wovon 45 mit Amöben inokuliert wurden. 40 der Versuchsgefäße wurden mit der Transformante ARR5 besetzt, 34 mit der Transformante DR5 und 15 mit dem Wildtyp „Was“. Die Hälfte der Transformanten-Keimlinge wurde mit NPA-Lanolin behandelt, die andere Hälfte mit Lanolin ohne NPA. In beiden Versuchen wurden die Versuchsgefäße zufällig verteilt in 6 Reihen aufgestellt und im Turnus von 3 Tagen innerhalb ihrer Reihe rotiert; die Reihen selbst wurden ebenfalls gewechselt (randomisiertes Blockdesign).

Statistische Auswertung

Im ersten Versuch wurden die Parameter der Blühphänologie (Blühbeginn und Anzahl der Blütenanzahl) und der Sprossbiomasse sowie die Parameter der Wurzelarchitektur (Gesamtlänge, Anzahl der Wurzelspitzen und Verzweigung) mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (GLM) auf statistische Unterschiede in den Behandlungen mit Amöben und mit den zwei Transformanten untersucht. Mit zweifaktoriellen Varianzanalysen der Faktoren Pflanzenalter und Amöben bzw. Pflanzenalter und Transformante wurden die histochemisch bestimmte GUS-Farbtintensität der Wurzelspitzen der beiden Transformanten und die Amöbendichte im Boden untersucht.

Im zweiten Versuch wurde bei den Keimlingen wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse die Faktoren Amöben und NPA-Behandlung auf statistische Unterschiede in der histochemisch bestimmten GUS-Farbtintensität der Wurzelspitze untersucht. In diesem Versuch wurde bei den Altpflanzen mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht, welche der Faktoren Amöben und NPA-Behandlung die Parameter Blütenanzahl und die Sprossbiomasse bei den zwei Transformanten beeinflussen. Für die DR5-Altpflanzen wurden zusätzlich Parameter der Wurzelarchitektur (Gesamtlänge, Anzahl Wurzelspitzen und Verzweigung) und der fluorometrisch bestimmten GUS-Aktivität pro Wurzelspitze untersucht. Bei den ARR5-Altpflanzen wurde zusätzlich der Parameter GUS-Aktivität pro Proteingehalt auf den Einfluss von Amöben und NPA untersucht.

Die Parameter der N-Konzentration im Boden der Altpflanzen (N-NO_3^- , N-NH_4^+ , N_{gesamt} , $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ -Verhältnis) wurden in beiden Versuchen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (GLM) auf statistische Unterschiede durch den Faktor Amöben untersucht.

6.3 Ergebnisse

Amöbendichte

In beiden Versuchen wurde keine Kontamination der Kontrollböden festgestellt. In den Amöben-Behandlungen bauten Amöben nur Populationen von geringer Dichte auf. Im ersten Versuch war die Dichte in der Rhizosphäre von Altpflanzen mit 3200 Amöben/g TG Boden deutlich größer als in der Rhizosphäre von Keimlingen mit 1800 Amöben/g TG Boden ($F_{1,29} = 6,61$, $P = 0,0158$). Im zweiten Versuch wurden bei Altpflanzen sogar nur 800 Amöben/g TG Boden gezählt.

Spross

Die beiden verwendeten Transformanten ARR5 (Ökotyp „Wassilewskija“) und DR5 (Ökotyp „Columbia“) unterschieden sich hinsichtlich ihrer Phänologie deutlich: Im ersten Versuch begann die Transformante ARR5 ab Versuchstag 31 zu blühen und bildete bis zur Ernte 66% mehr Blüten aus (50 ± 20) als DR5, die ab Tag 36 zu blühen begann (30 ± 17 ; $F_{1,33} = 12,37$; $P = 0,0013$ für die Anzahl der Blüten). DR5 hingegen produzierte eine größere Blattrosette ($23,8 \pm 8,6$ Rosettenblätter gegenüber $13,3 \pm 8,0$ Rosettenblättern bei ARR5 im zweiten Versuch; $F_{1,42} = 20,00$; $P < 0,0001$). Die Spross-Biomasse beider Transformanten unterschied sich im ersten Versuch nicht, im zweiten Versuch baute ARR5 eine um 68% höhere Biomasse auf als DR5 ($54,8 \pm 25,1$ mg gegenüber $32,6 \pm 24,1$ mg bei DR5; $F_{1,42} = 9,35$; $P = 0,0040$). Im zweiten Versuch förderte die NPA-Behandlung die Produktion von Rosettenblättern von ARR5, während NPA bei DR5-Transformanten die Produktion tendenziell hemmte (NPA*Transformanten-Interaktion; $F_{1,42} = 3,96$; $P = 0,0533$).

Wurzelarchitektur

Amöben in der Rhizosphäre von *A. thaliana* führten zu starken Veränderungen der Wurzelarchitektur. Im ersten Versuch nahm die Gesamtwurzellänge in Amöben-Behandlungen signifikant zu, wobei die Zunahme bei der Auxin-sensitiven Transformante DR5 28% und bei ARR5 sogar 63% betrug (Tab. 13; Abb. 24a). Gegenüber den Kontrollen (176 ± 81) bildeten die Pflanzen in Anwesenheit von

Amöben (332 ± 129) etwa doppelt so viele Wurzelspitzen aus (Abb. 24b). Die Verzweigung des Wurzelwerkes nahm von $3,3 \pm 0,9$ Wurzelspitzen/cm Wurzel in Kontroll-Behandlungen auf $4,5 \pm 1,1$ Wurzelspitzen/cm Wurzel in Amöben-Behandlungen zu.

Tabelle 13: Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA zum Einfluss von Amöben (AMO) und Transformante bzw. Ökotyp (PLA) auf Wurzellänge, Anzahl der Wurzelspitzen und Verzweigung von *Arabidopsis thaliana* im ersten Versuch.

Faktor	df	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen / cm Wurzel	
		F	P	F	P	F	P
AMO	1,33	4,87	0,0346	11,54	0,0018	10,07	0,0033
PLA	1,33	0,01	0,9039	1,30	0,2620	1,88	0,1793
AMO*PLA	1,33	0,69	0,4111	0,04	0,8517	1,58	0,2175

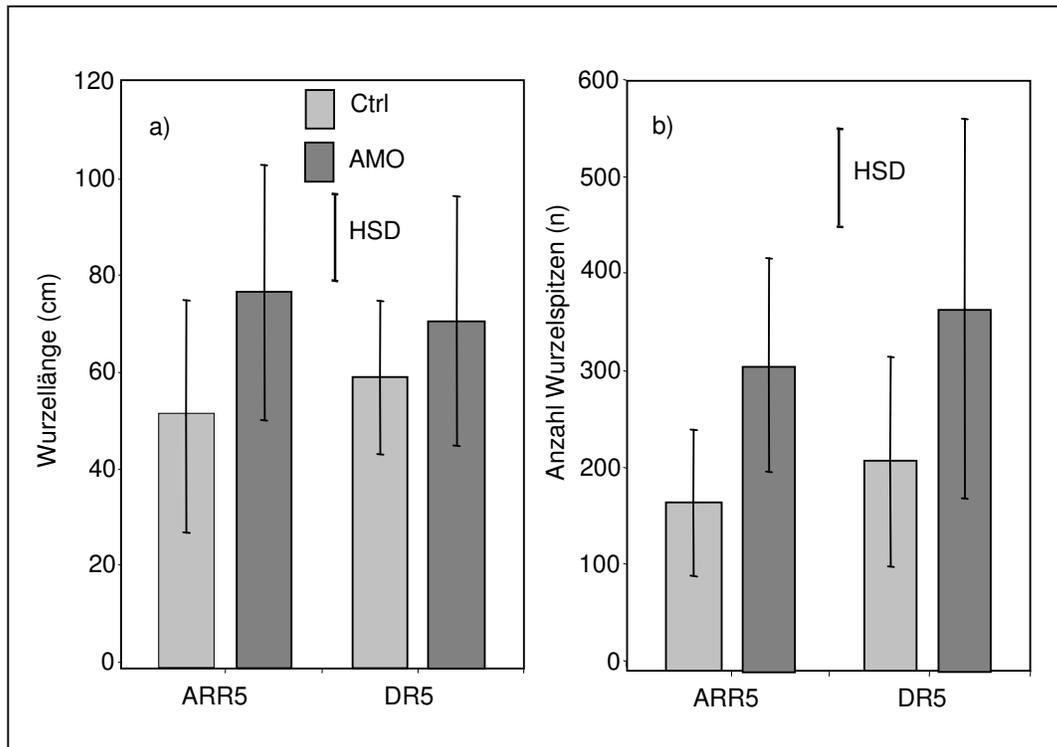


Abbildung 24: Einfluss von Amöben auf die Gesamtlänge des Wurzelsystems (a) und die Anzahl an Wurzelspitzen (b) der Transformanten ARR5 und DR5 im ersten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Im zweiten Versuch förderte sowohl die Anwesenheit von Amöben wie auch die Applikation von NPA die Bildung von Seitenwurzeln: Gegenüber der Kontrolle produzierten die Pflanzen in allen anderen Behandlungen etwa 50% mehr Wurzelspitzen (Tab 14; Abb. 25). Pflanzen steigerten die Wurzelverzweigung hingegen nur bei NPA-Behandlung von $1,00 \pm 0,14$ Wurzelspitzen/cm Wurzel in den Kontrollen auf $1,21 \pm 0,25$ Wurzelspitzen/cm Wurzel. Die Wurzellänge wurde von keinem der untersuchten Faktoren verändert.

Tabelle 14: Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA zum Einfluss der Behandlung mit NPA (NPA) und Amöben (AMO) auf die Wurzellänge, die Anzahl der Wurzelspitzen und die Verzweigung der Transformanten DR5.

Faktor	df	Wurzellänge		Wurzelspitzen		Wurzelspitzen / cm Wurzel	
		F	P	F	P	F	P
AMO	1,19	1,80	0,1957	5,61	0,0286	0,45	0,0033
NPA	1,19	0,08	0,7847	7,47	0,0132	6,71	0,0179
AMO*NPA	1,19	1,68	0,2098	8,14	0,0102	1,64	0,2152

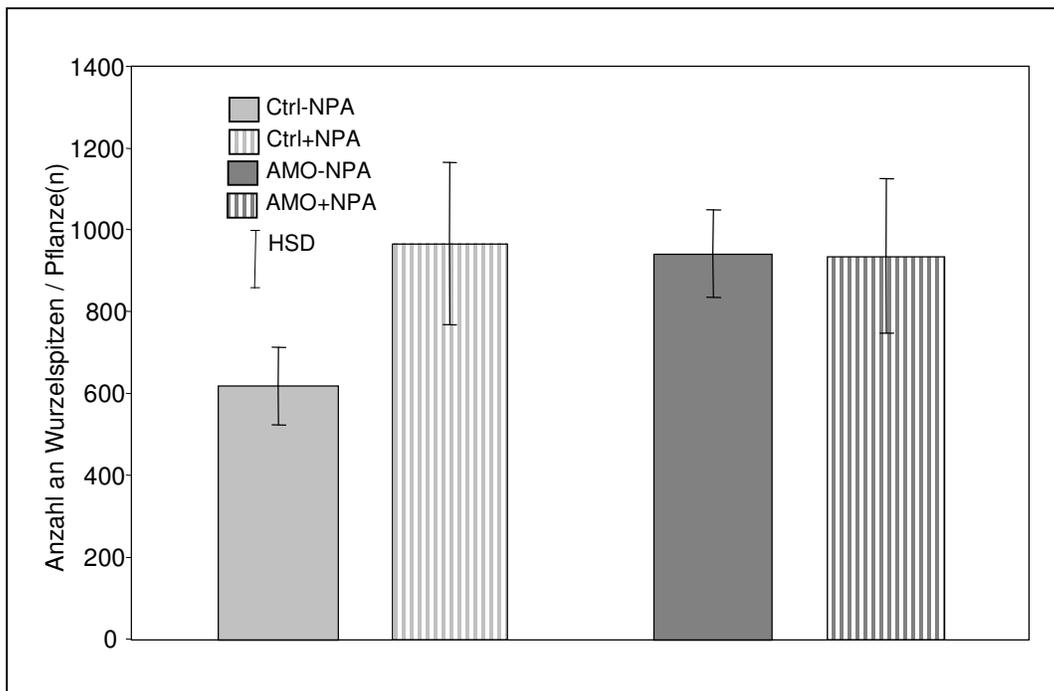


Abbildung 25: Einfluss von Amöben und NPA-Behandlung auf die Anzahl an Wurzelspitzen der Transformanten DR5 im zweiten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; NPA = NPA-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

GUS-Expression

Die Anwesenheit von Amöben führte zu Veränderungen in der GUS-Expression der hormonsensitiven Transformanten DR5 und ARR5.

Im ersten Versuch war die Cytokinin-sensitive *ARR5::GUS*-Expression in den Wurzelspitzen von Amöben-Behandlungen erhöht, und zwar unabhängig vom Alter der Pflanzen ($F_{1,27} = 20,11$; $P < 0,0001$; Abb. 26); die Auxin-sensitive *DR5::GUS*-Expression wurde in Anwesenheit von Amöben nicht verändert ($F_{1,24} = 0,71$; $P < 0,4066$). Bei beiden Transformanten war die GUS-Expression in den Wurzelspitzen der Keimlinge gegenüber den Wurzelspitzen der Altpflanzen um den Faktor 1,75 erhöht (ARR5: $F_{1,27} = 29,87$; $P < 0,0001$; DR5: $F_{1,24} = 46,37$; $P < 0,0001$).

Im zweiten Versuch hingegen war die *DR5::GUS*-Expression in Wurzelspitzen in Anwesenheit von Amöben und durch die Hemmung des basipetalen Auxin-Transports mit NPA verringert (Tab. 15, Abb. 27). Dieses Muster in Wurzelspitzen trat sowohl bei der histochemischen Bestimmung der GUS-Expression bei Keimlingen als auch bei der fluorometrisch bestimmten GUS-Expression bei Altpflanzen auf.

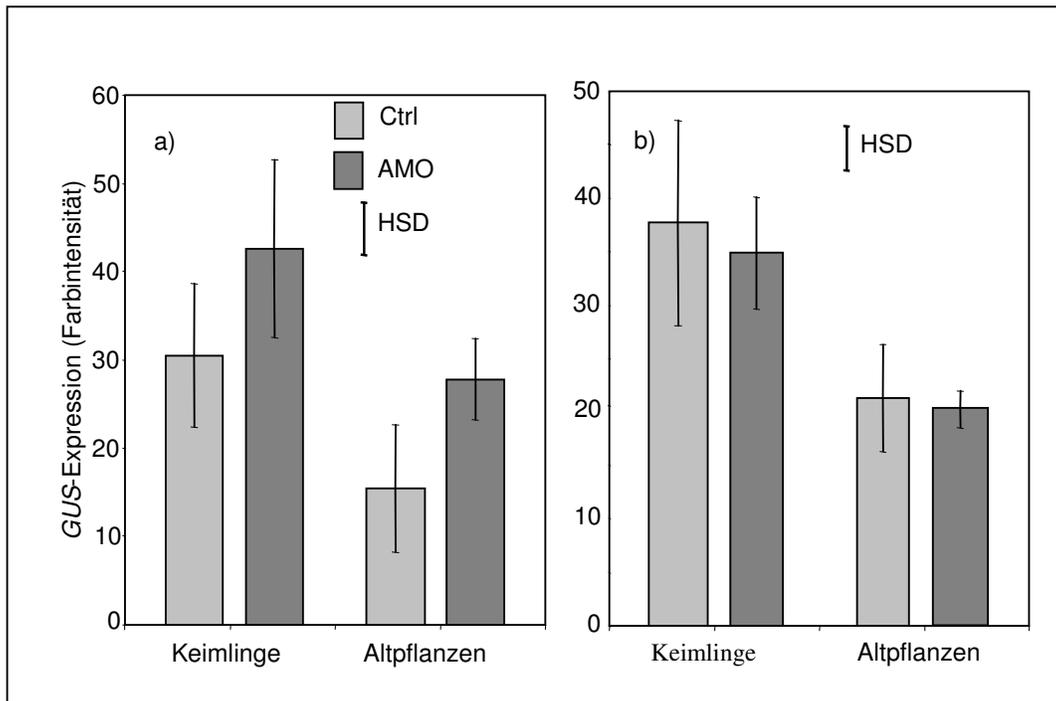


Abbildung 26: Einfluss von Amöben auf die GUS-Expression der Cytokinin-sensitiven Transformante ARR5 (a) und der Auxin-sensitiven Transformante DR5 (b) im ersten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Die mit der histochemisch ermittelten *DR5::GUS*-Expression bestimmte Farbintensität x_{FI} kann mit der Formel $y_{EZ}=(0,0219x_{FI}-0,1153)*z_{AF}$ in die GUS-Enzymaktivität y_{EZ} (in mmol MU/h*Wurzelspitze) umgerechnet werden, wobei z_{AF} den im ersten Versuch ermittelten Altersfaktor der Pflanze darstellt (1,75 für Keimlinge und 1,0 für Altpflanzen; Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden: $R^2=0,76$).

In diesem Versuch war auch die *ARR5::GUS*-Expression in Anwesenheit von Amöben oder durch die Hemmung des basipetalen Auxin-Transports mit NPA verringert (Abb. 28). Wurden jedoch Amöben und NPA-Behandlung kombiniert, so war die histochemisch bestimmte *ARR5::GUS*-Expression in Wurzelspitzen von Keimlingen weniger stark verringert. Bei der fluorometrisch bestimmten *ARR5::GUS*-Expression der Wurzeln der Altpflanzen war die GUS-Aktivität in der kombinierten Behandlung sogar gegenüber der Kontrolle leicht erhöht (signifikante Amöben*NPA Interaktionen, Tab. 15).

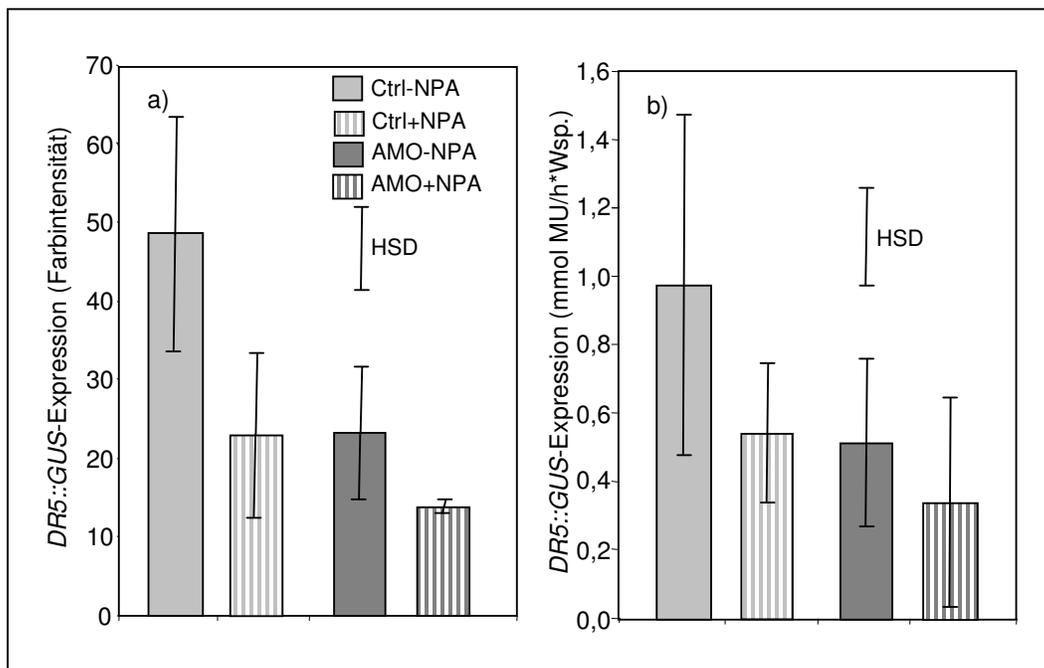


Abbildung 27: Einfluss von Amöben und NPA-Behandlung auf die *DR5::GUS*-Expression in Wurzelspitzen von Keimlingen (a) und Altpflanzen (b) im zweiten Versuch. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; NPA = NPA-Behandlung; Wsp = Wurzelspitze; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Tabelle 15: Ergebnisse von zweifaktoriellen Varianzanalysen zum Einfluss der Behandlung mit NPA (NPA) und Amöben (AMO) auf die als Farbintensität und GUS-Aktivität gemessene Expression von *DR5::GUS* und *ARR5::GUS* im zweiten Versuch.

<i>DR5::GUS-Expression</i>						
Faktor	df	Farbintensität (Keimling)		df	Aktivität/ Wurzelspitze	
		F	P		F	P
AMO	1,15	5,55	0,0363	1,22	5,98	0,0244
NPA	1,15	8,79	0,0118	1,22	4,99	0,0377
AMO*NPA	1,15	0,80	0,3891	1,22	1,07	0,3137

<i>ARR5::GUS-Expression</i>						
Faktor	df	Farbintensität (Keimling)		df	Aktivität/ Proteingehalt	
		F	P		F	P
AMO	1,17	1,16	0,2987	1,16	0,59	0,4752
NPA	1,17	0,50	0,4929	1,16	1,28	0,2779
AMO*NPA	1,17	6,29	0,0251	1,16	11,36	0,0050

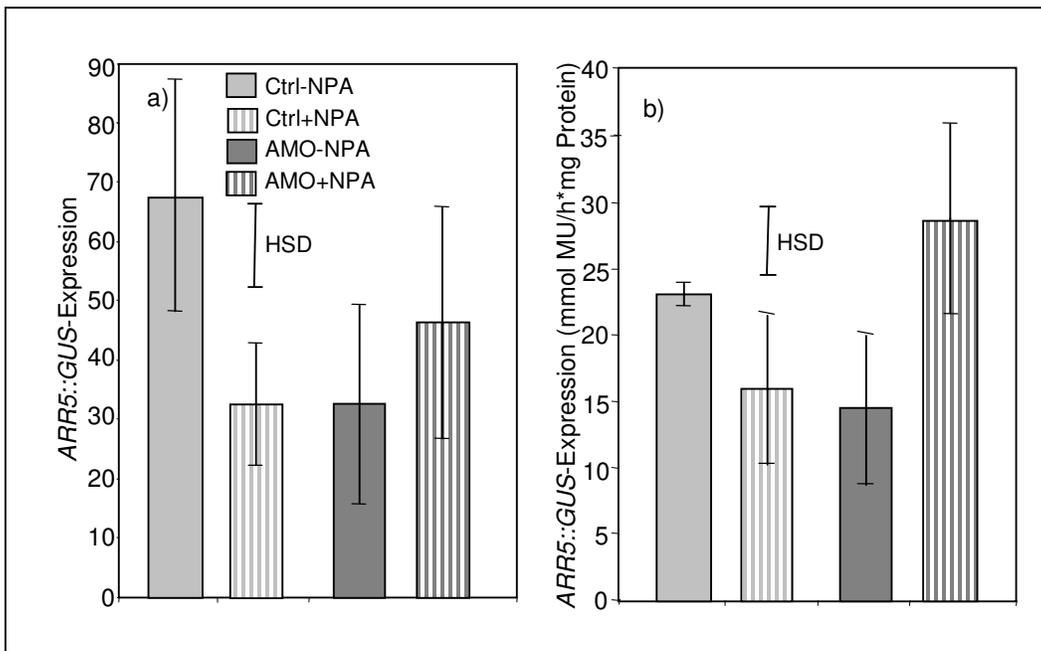


Abbildung 28: Einfluss von Amöben und NPA-Behandlung auf die *ARR5::GUS*-Expression in Wurzelspitzen von Keimlingen (a) und Expression bezüglich des Proteingehalts von Altpflanzen (b) im zweiten Versuch; Mittelwerte \pm SD. Ctrl = Kontrolle; AMO = Amöbenbehandlung; NPA = NPA-Behandlung; HSD = Tukey's Honestly Significant Difference Test ($P < 0,05$).

Stickstoff im Boden

In beiden Versuchen beeinflussten Amöben die Gesamtkonzentration an mineralischem Stickstoff nicht. Dennoch war im ersten Versuch die Nitrat-Konzentration in Anwesenheit von Amöben von $1,5 \pm 0,5$ auf $2,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g NO}_3^-/\text{mg Boden (TG)}$ erhöht ($F_{1,33} = 4,66$; $P = 0,0390$), die Konzentration von Ammonium hingegen von $9,1 \pm 2,0$ auf $7,6 \pm 1,7$ $\mu\text{g NH}_4^+/\text{mg Boden (TG)}$ verringert ($F_{1,33} = 5,70$; $P = 0,0234$). Im zweiten Versuch beeinflussten Amöben weder die Nitrat- noch die Ammonium-Konzentration ($2,4 \pm 0,5$ $\mu\text{g NO}_3^-/\text{mg Boden TG}$ und $17,2 \pm 2,6$ $\mu\text{g NH}_4^+/\text{mg Boden TG}$).

6.4 Diskussion

In den vorhergehenden Versuchen in Kap. 3 und 4 wurde die Förderung des Wurzelwachstums und besonders der Seitenwurzelbildung in Anwesenheit von Amöben beschrieben. Ähnliche Veränderungen der Wurzelarchitektur bewirken die Applikation von Auxin oder PGPR (z.B. Gaspar et al. 2002, Ashgar et al. 2002). In den beiden hier dargestellten Versuchen wurde erstmalig der Einfluss von Amöben in der Rhizosphäre auf den internen Hormonstatus der Pflanze dokumentiert. Parallel dazu erhöhte sich die Verzweigung des Wurzelsystems von *A. thaliana* mit Amöben trotz einer starken genetischen Determination der Seitenwurzelbildung (Casimiro et al. 2001, Falasca & Altamura 2003). Die Gesamtwurzellänge war je nach Transformante mit Amöben teilweise signifikant (ARR5) erhöht. Die Wurzelarchitektur von *Lepidium sativum* (Bonkowski & Brandt 2002), *L. perenne* und *O. sativa* (Kapitel 3 und 4) wurde von Amöben in ähnlicher Weise beeinflusst. Die Wurzelarchitektur derjenigen Transformanten, die in beiden Versuchen untersucht wurde (DR5), wurde in beiden Versuchen durch die Behandlung mit Amöben in ähnlicher Weise verändert.

Bei der Regulation des Wurzelwachstums wurde die Schlüsselrolle von Auxin und Cytokinin bereits mehrfach belegt und diskutiert (Wightman et al. 1980, Übersicht in Gaspar et al. 2002). Hierbei fördern bestimmte Konzentrationen von extern appliziertem Auxin die Entwicklung von Seitenwurzeln, während Cytokinin die Seitenwurzelbildung hemmt (Hinchee & Rost 1986, Coenen & Lomax 1997). Tatsächlich beeinflussten Amöben die Auxin-sensitive *DR5::GUS*-Expression im zweiten Versuch und die Cytokinin-sensitive *ARR5::GUS*-Expression in beiden Versuchen. Im Nachfolgenden wird die GUS-Expression als indirektes Maß der Hormonaktivität angesehen (vgl. D'Agostino et al. 2000). Trotz der vergleichbaren Veränderungen der Wurzelarchitektur bei Pflanzen mit Amöben war im zweiten Versuch die Aktivität sowohl von Auxin wie von Cytokinin verringert, im ersten Versuch jedoch blieb die Auxin-Aktivität bei erhöhter Cytokinin-Aktivität unverändert. Das in den Wurzelspitzen gemessene Auxin besteht hauptsächlich aus basipetal transportiertem Auxin (Rashotte et al. 2000) und kann die Seitenwurzelbildung stimulieren (Reed et al. 1998). Da die Veränderungen in der Wurzelarchitektur jedoch nicht mit den Hormon-Aktivitäten in der Wurzelspitze korrelieren, sind die Hormonaktivitäten in der Wurzelspitze offensichtlich nicht an der Regulation des Seitenwurzelwachstums unmittelbar (fördernd) beteiligt (vgl. Casimiro

et al. 2001). Ergebnisse des zweiten Versuchs unterstützen diese Hypothese: Zwar wurde mit der Hemmung des basipetalen Auxintransports durch die NPA-Applikation erwartungsgemäß die Auxin-Aktivität in der Wurzelspitze gehemmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Reed et al. (1998) und Casimiro et al. (2001) wurde trotz der verringerten Auxin-Aktivität in den NPA-Behandlungen die Seitenwurzelbildung angeregt. Die mit der GUS-Expression in den Wurzelspitzen nachgewiesene Hormon-Aktivität korreliert offensichtlich weder positiv noch negativ mit der Seitenwurzelbildung. Wahrscheinlich ist das durch die *DR5::GUS*-Expression nachgewiesene, systemische Auxin nicht unmittelbar an der Seitenwurzelbildung beteiligt. Statt dessen könnten exogene, lokale Signalstoffe, deren Produktion durch die Amöbenbeweidung vermutlich gefördert wird, einen wesentlichen Anteil an der Bildung von Seitenwurzeln besitzen.

Diese exogenen Signalstoffe, die von der beweideten Rhizosphärengemeinschaft offensichtlich (vermehrt) produziert werden, beeinflussen über die Auxin-Aktivität in der Wurzelspitze hinaus den gesamten Hormonstatus von *A. thaliana*: Zumindest die Produktion von Cytokinin wird durch die Amöben indirekt beeinflusst und damit wahrscheinlich die gesamten hormonellen Wechselwirkungen der Pflanze (Rodrigues-Pousada et al. 1999). Durch die Reduktion des basipetalen Auxin-Transports durch NPA-Behandlung wurde die Cytokininproduktion negativ beeinflusst. Dies weist auf die bekannte enge Verzahnung der Auxin- und Cytokinin-Aktivitäten hin (Strabala et al. 1996; Coenen & Lomax 1997). Die hohe Cytokinin-Produktion bei gleichzeitig stark erniedrigter systemischer Auxin-Aktivität in der Behandlung mit Amöben und NPA (siehe Abb. 27 und 28) dokumentiert die Interaktion externer Signale mit dem Hormonhaushalt der Pflanze. Amöben können über die selektive Förderung von Bakteriengemeinschaften, die vermehrt Signalstoffe produzieren, nicht nur die Morphologie, sondern auch die Physiologie beeinflussen. Die Wirkung der externen Signalstoffe auf den pflanzlichen Hormonhaushalt sind offensichtlich unabhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzen, da die Muster des Einflusses von Amöben auf die Auxin- und Cytokinin sowohl bei Keimlingen als auch bei Altpflanzen auftraten.

Ein potentieller Signalstoff, der vor allem das Längenwachstum der Wurzeln beeinflussen kann, ist Nitrat (Zhang et al. 1999). In den durchgeführten Versuchen war jedoch der Einfluss der Amöben auf die Nitrat-Konzentration uneinheitlich: In dem mageren Sandboden des ersten Versuchs war die Nitratkonzentration in Amöben-

Behandlungen deutlich erhöht, in dem etwas fetteren Boden im zweiten Versuch wurde sie durch Amöben nicht verändert. Eventuell war im zweiten Versuch die Amöbendichte zu niedrig, um die Nitratkonzentration im Boden quantitativ zu erhöhen. In anderen Untersuchungen förderte die Protozoenbeweidung selektiv nitrifizierende Bakterien, die Nitrit zu Nitrat oxidieren (Griffiths 1989, Alpei et al. 1996). Möglicherweise beeinflusste im zweiten Versuch der höhere Gehalt an Nitrat und vor allem an Ammonium im Boden die Bildung und Aktivität von Auxin und Cytokinin (Kudayarova et al. 1997, Miyawaki et al. 2004).

Für die weitere Erforschung der Wirkungsmechanismen von bakteriogenen Signalstoffen in der Rhizosphäre bedarf es Messmethoden von bedeutend höherer räumlicher und quantitativer Auflösung. Möglicherweise stellt sich dabei heraus, dass die Beweidung der Rhizosphärengemeinschaften durch Protozoen einen Schlüsselmechanismus für eine Signalstoff-basierte Kommunikation zwischen den Organismen in der Rhizosphäre darstellt.

7 Abschließende Diskussion

Wechselwirkungen zw. Protozoen und Bakterien in der Rhizosphäre

Die Wechselwirkungen zwischen Bodenorganismen in der Rhizosphäre spielen sich in einem für Pflanzen hochsensiblen Bereich der Nährstoff- und Wasseraufnahme ab. Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft können daher einen bedeutenden Einfluss auf die Nährstoffaufnahme und somit das Wachstum von Pflanzen besitzen.

In allen Untersuchungen förderten Nacktamöben als Modellorganismen für bakterivore Protozoen das Wachstum der Pflanzen, vor allem das Wurzelwachstum. Wuchsfördernde Effekte von Protozoen auf Pflanzen wurden zuvor schon mehrfach belegt (Übersicht in Bonkowski 2004). Offensichtlich beeinflussen Protozoen durch Beweidung der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft das Pflanzenwachstum, indem sie wuchsfördernde Bakterien (PGPR, „plant growth promoting rhizobacteria“) selektiv fördern (Ashgar et al. 2002). Tatsächlich konnten Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften durch die Amöbenbeweidung mehrfach dokumentiert werden: Die Beweidung förderte vermutlich Bakterien mit hoher morphologischer Plastizität oder hohen Reproduktionsraten (siehe Kap. 4). Untersuchungen des metabolischen Potenzials der Rhizosphärengemeinschaften auf *L. perenne* und *O. sativa* belegten den Einfluss der Beweidung auf die Mikroorganismen unter funktionellen Gesichtspunkten (siehe Kap. 3). Zudem konnte gezeigt werden, dass β -Proteobakterien in beweideten Bakteriengemeinschaften auf Agar dominierten. Zu dieser Subgruppe werden viele nitrifizierende Bakterien gezählt, welche die Stickstoffversorgung von Pflanzen durch Oxidation von Nitrit zu Nitrat verbessern können (siehe Kap. 4; vgl. Griffiths 1989, Alpehi et al. 1996). Die Beweidung durch Amöben hat zudem das Potenzial, die Bakteriendichte zu verringern, und zwar vor allem in der Rhizoplane, die arm an Refugien ist (siehe Kap. 3, Young & Ritz 1998). Die Beweidung kann damit eventuell in unmittelbarer Nähe der Pflanzenwurzel potenzielle mikrobielle Nährstoff-Konkurrenten zurückdrängen. In komplexeren Substraten wie Boden konnte eine solche Top-down-Kontrolle nur in einem Versuch nachgewiesen werden (siehe Kap. 5). Vermutlich boten dort die Poren der Bodenpartikel ausreichend Refugien für die Bakterien; außerdem war der Anteil der verringerten Rhizosphären-/

Rhizoplanengemeinschaften an den untersuchten Bodenproben offensichtlich zu gering, um in einer „Mischprobe“ aus Rhizosphären- und Nicht-Rhizosphären-Boden die mikrobielle Biomasse signifikant zu verringern.

Einfluss von Protozoen auf das Pflanzenwachstum

Parallel zu den durch die Beweidung veränderten Rhizosphärengemeinschaften wurde durch die Amöbenbehandlung das Wurzelwachstum aller untersuchten Pflanzen beeinflusst. Neben der geförderten Wurzelstreckung wurde vor allem die Bildung von Seitenwurzeln stimuliert. Diese Veränderungen wurden zuvor schon von Bonkowski & Brandt (2002) beschrieben. Die höhere Anzahl von Seitenwurzeln erhöhte vermutlich die zur Nährstoffaufnahme fähige Wurzeloberfläche im Bereich der Wurzelhaarzone, da die Anzahl der Wurzelspitzen und die Oberfläche der Wurzelhaarzone eng korreliert sind. Eine vergrößerte aufnahmefähige Wurzeloberfläche sollte wiederum die Nährstoffaufnahme der Pflanzen verbessern. Tatsächlich war in den Untersuchungen mit Agarsystemen der Stickstoffgehalt von *L. perenne* und die Stickstoffkonzentration von *O. sativa* in Behandlungen mit Amöben erhöht (siehe Kap. 4).

Für eine erhöhte Nährstoffaufnahme muss sowohl eine zusätzliche Seitenwurzelbildung mit einer verstärkten Streckung der Wurzel einhergehen, damit die in der Wurzelhaarzone einer jungen Wurzel außerhalb der nährstoffabgereicherten Zone um die Hauptwurzel zusätzliche Nährstoffe aufnehmen kann. So förderte vermutlich die erhöhte Streckung der Seitenwurzeln - selbst bei geringerer Anzahl an Seitenwurzeln – die Nährstoffaufnahme bei *O. sativa* in Amöbenbehandlungen (siehe Kap. 4, Abb. 29).

Die beweideten Bakteriengemeinschaften beeinflussten das Wurzelwachstum durch die Kombination von Wurzelstreckung und Seitenwurzelbildung in den meisten, aber nicht allen hier dargestellten Versuchen. So wurde bei *O. sativa* auf Agar und bei *L. perenne* und *P. lanceolata* in Boden die Bildung der Seitenwurzeln mit Amöben nicht stimuliert. Unabhängig von Pflanzenart und Experimentalsystem enthielten möglicherweise die mikrobiellen Inokula dieser Versuche nicht die Bakterien, welche, durch die Beweidung gefördert, Signalstoffe für die Stimulation der Seitenwurzelbildung produzieren.

Zu den Signalstoffen, welche die Seitenwurzelbildung stimulieren, zählt Auxin, während externes Nitrat vor allem die Streckung der Wurzeln fördert (Zhang et al. 1999, Gaspar et al. 2002). Tatsächlich war in der Behandlung mit Amöben im ersten Versuch mit *A. thaliana* die Nitratkonzentration erhöht (siehe Kap. 6). Zudem förderte

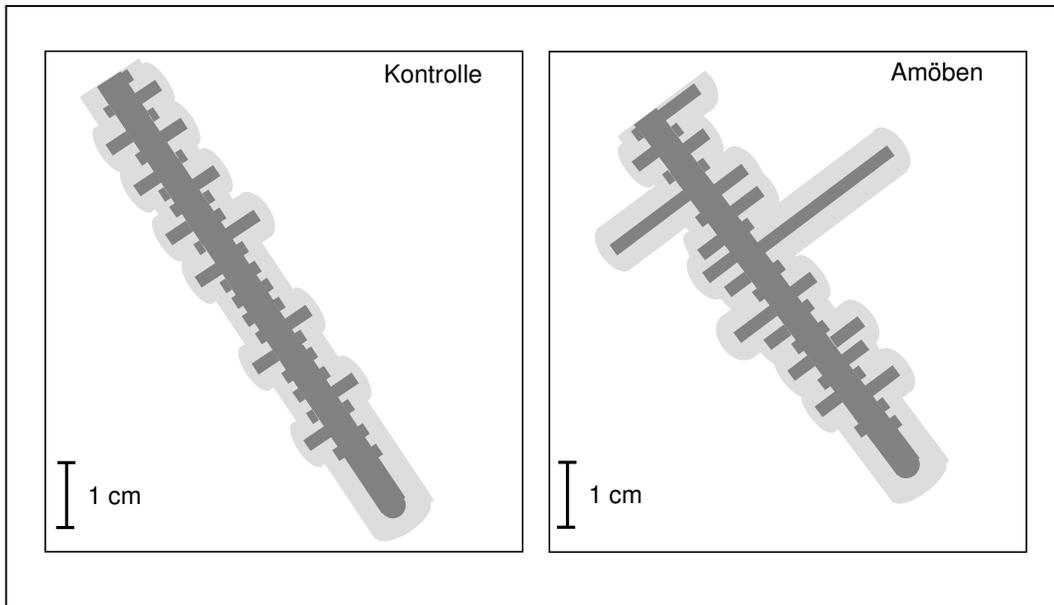


Abbildung 29: Schema der Seitenwurzelsbildung, Seitenwurzels Streckung und mögliche Zonen der Nährstoffaufnahme (3 mm Radius) an einer typischen Hauptwurzel von *Oryza sativa* ohne und mit Amöben (zur durchschnittliche Anzahl der Seitenwurzeln siehe Kap. 4, vgl. Abb. 15).

die Amöbenbeweidung zumindest auf Agar die Dominanz die Gruppe der β -Proteobakterien, zu der viele Nitrifizierer zählen (siehe Kap. 4). Untersuchungen anderer Autoren bestätigen diese Ergebnisse (Griffiths 1989, Alpei et al. 1996). Möglicherweise beeinflussten Amöben die Wurzelstreckung über ein verbessertes Nitratangebot. Dieses erhöhte Nitratangebot entstand entsprechend der Verteilung der nitrifizierenden Bakterien womöglich so lokal begrenzt, dass eine veränderte Konzentration in Bodenproben nicht in jedem Versuch gemessen werden konnte (zweiter Versuch in Kap. 6).

Auxin, das neben Pflanzen auch von Bakterien produziert werden kann, stimuliert (in bestimmten Konzentrationen) die Seitenwurzelsbildung. Bonkowski & Brand (2002) fanden heraus, dass die Amöbenbeweidung der mikrobiellen Rhizosphärengemeinschaft den Anteil auxinproduzierender Bakterienstämme erhöht. In Versuchen mit Transformanten von *A. thaliana* konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass die beweideten Rhizosphärengemeinschaften die Aktivität von Auxin in der Pflanze und vermutlich auch deren gesamten Hormonhaushalt beeinflussen, da sich auch die Aktivität von Cytokinin in Behandlungen mit Amöben verändert (siehe Kap. 6). Diese beiden Phytohormone sind wiederum in komplexe Regulationsmechanismen

mit anderen Phytohormonen wie z.B. Ethylen und Abscisinsäure eingebunden (Rodrigues-Pousada et al. 1999). Allerdings wurde die Aktivität des vom Spross in die Wurzel transportierten, systemischen Auxins und des in der Wurzelspitze produzierten Cytokinins in den beiden durchgeführten Versuchen nicht einheitlich von den beweideten Rhizosphärengemeinschaften verändert. So war z.B. die Auxin-Aktivität in den Wurzelspitzen im ersten Versuch mit Amöben unverändert, im zweiten Versuch hingegen verringert. Dennoch war in beiden Versuchen die Seitenwurzelbildung in Behandlungen mit Amöben in gleicher Weise deutlich erhöht. Diese Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass die untersuchten Hormonaktivitäten in der Wurzelspitze (durch GUS-Expression), die im Fall von Auxin eher den systemischen Hormonstatus der Pflanze abbilden, an der Stimulation der Seitenwurzelbildung nicht unmittelbar beteiligt sind. Stattdessen induzieren vermutlich bakteriogene Signalstoffe maßgeblich die Bildung von Seitenwurzeln. Diese Hypothese wird durch das Ergebnis untermauert, dass selbst bei herabgesetzter systemischer Auxin-Aktivität (nach Transporthemmung mit NPA) die Seitenwurzelbildung von den externen Signalstoffen gefördert wird (siehe Kap. 6). Die Ursachen für die unterschiedlichen Reaktionen der Cytokinin- und systemischen Auxin-Aktivität auf die beweideten Rhizosphärengemeinschaften und deren Signalstoffe in den beiden Versuchen liegen möglicherweise an unterschiedlichem Nitrat- und Ammoniumgehalt der Böden. Ammonium, das im zweiten Versuch in annähernd doppelter Konzentration im Boden vorhanden war als im ersten Versuch, hemmt z.B. die Expression des Enzyms Isopentenyltransferase (*IPT*), welches an der Biosynthese von Cytokinin beteiligt ist (Miyawaki et al. 2004).

Der Einfluss des durch die beweideten Rhizosphärengemeinschaften veränderten physiologischen Status der Pflanze äußerte sich auch in einer modifizierten Rhizodeposition. Zumindest lassen die Ergebnisse der untersuchten metabolischen Potenziale vermuten, dass verschiedene Pflanzenarten (hier *L. perenne* und *O. sativa*) die Abgabe ihrer Exsudate unter dem Einfluss von Amöben artspezifisch und qualitativ verändern (siehe Kap. 3). Damit werden wiederum die Rhizosphärengemeinschaften, die diese Exsudate als Kohlenstoffquelle nutzen, maßgeblich verändert. Ähnliche Hinweise lieferten Analysen von Fettsäure-Mustern in der Untersuchung von Henkes (2004).

Wechselwirkungen zw. Protozoen und VA-Mykorrhiza

Bonkowski et al. (2001) fanden, dass Wechselwirkungen zwischen Protozoen und Ekto-Mykorrhiza die Nährstoffversorgung und das Wachstum von *P. abies* fördern, freilebende Mikroorganismen und Ekto-Mykorrhiza aber um pflanzlichen Kohlenstoff konkurrieren. In den durchgeführten Versuchen wurden nur bedingt Hinweise für eine Konkurrenz bei der Interaktion von Amöben und VA-Mykorrhiza gefunden (geringere Mykorrhizierung in Behandlungen mit Amöben). Hinsichtlich des Pflanzenwachstums, nicht jedoch bezüglich der Stickstoffaufnahme, hoben sich die Wirkungen von Amöben und VA-Mykorrhiza sowohl bei *L. perenne* als auch bei *P. lanceolata* auf. Offensichtlich wirkten zwischen Pflanze, Protozoen und hier mit VA-Mykorrhiza ähnliche Regulationsmechanismen auf das Pflanzenwachstum wie bei Bonkowski et al. (2001) mit Ekto-Mykorrhiza.

Wider Erwarten beeinflussten Amöben und VA-Mykorrhiza in Monokulturen das Wachstum von *P. lanceolata* und *L. perenne* in ähnlicher Weise. In dem durchgeführten Konkurrenzversuch (siehe Kap. 5) hingegen profitierte *L. perenne* von der Anwesenheit von Amöben oder VA-Mykorrhiza gegenüber *P. lanceolata*. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen Protozoen und VA-Mykorrhiza die Konkurrenz von Pflanzen beeinflussen können. Allerdings kann ein verbessertes Nährstoffangebot im Boden offenbar den Einfluss der Bodenorganismen auf die Konkurrenz deutlich vermindern.

Verwendung von Experimentalsystemen unterschiedlicher Komplexität

Der Einfluss von Amöben bzw. amöbenbeweideten Rhizosphärengemeinschaften wurde in drei Experimentalsystemen mit unterschiedlicher Komplexität des Substrats durchgeführt (Aeroponisches System, Agarsystem, Bodensystem). In allen Komplexitätsstufen förderte die Behandlung mit Amöben das Pflanzenwachstum, vor allem durch gesteigerte Wurzelstreckung und Stimulation der Seitenwurzelbildung. Offenbar lassen sich Wechselwirkungen zwischen Amöben, Mikroorganismen und Pflanzen in Experimentalsystemen untersuchen, bei denen das Substrat auf die Rhizoplane beschränkt ist, ohne dabei wesentliche Aspekte der Wechselwirkungen zu verlieren. In den aeroponischen Systemen förderte die Behandlung mit Amöben das Wurzelwachstum auch bei ständigem Nachschub des Nährmediums. Dies deutet darauf

hin, dass lokal produzierte Signalstoffe, die für die Seitenwurzelbildung von größerer Bedeutung sind als der systemische Auxingehalt, trotz ständigem Abtropfen des Haftwassers die lokale Seitenwurzelbildung induzierten. Darüber hinaus waren die Effekte der amöbenbeweideten Rhizosphärengemeinschaften auch bei weitgehender Nährstoffsättigung vorhanden. Dies unterstützt die Hypothese von Bonkowski & Brandt (2002), dass die Wechselwirkungen zwischen Protozoen, Mikroorganismen und Pflanzen auf der mikrobiellen Produktion von Signalstoffen beruht.

Schlussbetrachtung

Die Beweidung der mikrobiellen Gemeinschaften durch Protozoen ist offensichtlich eine bedeutende Einflussgröße für die Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Pflanzen in der Rhizosphäre. Aus Sicht der Bakteriengemeinschaft kann die Beweidung an sich die Aktivität der Bakterien, z.B. durch kompensatorisches Wachstum, fördern. Zusätzlich kann die Selektivität der Beweidung die mikrobielle Diversität beeinflussen. Da sich offensichtlich in Anwesenheit von Amöben die pflanzliche Rhizodeposition ändert, induzieren Protozoen die Entstehung neuer Mikrohabitate in den Rhizosphären verschiedener Pflanzenarten, die wiederum von spezifischen mikrobiellen Gemeinschaften besiedelt werden können. Zudem existiert im Boden als komplexem Substrat vermutlich ein Beweidungsgradient, der von der Rhizoplane zum wurzelfreien Boden hin abnimmt. Dieser Beweidungsgradient könnte zur Heterogenität des Habitats Boden und damit zum Erhalt der hohen mikrobiellen Diversität im Boden beitragen.

Aus Sicht der Pflanze ist der entscheidende Faktor der Protozoenbeweidung die Produktion von bakteriogenen Signalstoffen. Diese unterscheiden sich von denjenigen unbeweideter mikrobieller Gemeinschaften und verändern das Wachstum des Wurzelsystems in ähnlicher Weise wie die Applikation von Auxin und Nitrat. Zukünftige Untersuchungen sowohl der Signalketten innerhalb der Pflanze, die zu den dargestellten Veränderungen des Hormonhaushalts führten, als auch der von der pflanzlichen Exsudation ausgehenden Signale für die Bodenorganismen sind notwendig, um die Wechselwirkungen in der Rhizosphäre weiter aufzuklären.

8 Literatur

- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* 216:841-853
- Alphei J, Bonkowski M, Scheu S (1996) Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia* 106:111-126
- Anderson JPE, Domsch KH (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10:215-221
- Anderson JPE, Domsch KH (1980) Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Science* 130:211-216
- Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M (2002) Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. *Plant Production Science* 5:286-293
- Arshad M, Frankenberger WT (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy* 62:45-151
- Ashgar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A (2002) Relationship between in vitro production of auxin by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils* 35:231-237
- Bacon MA, Davies WJ, Mingo D, Wilkinson S (2002) Root Signals. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 461-470
- Bagnasco P, De la Fuente L, Gualtieri G, Noya F, Arias A (1998) Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1317-1322
- Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KHe (2002) *The prokaryotes*. Springer, New York
- Bardgett RD, Chan KF (1999) Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1007-1014
- Beck T, Joergensen RG, Kandeler E, Makeschin F, Nuss E, Oberholzer HR, Scheu S (1997) An inter-laboratory comparison of ten different ways of measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1023-1032
- Bell G, Lechowicz MJ (1994) Spatial heterogeneity at small scales and how plants respond to it. In: Caldwell MM, Pearcy RW (eds) *Exploitation of environmental heterogeneity by Plants*. Academic Press, New York, pp 325-347

- Benizri E, Dedourge O, Dibattista-Leboeuf C, Piutti S, Nguyen C, Guckert A (2002) Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology* 21:261-265
- Bertin C, Yang XH, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256:67-83
- Boenigk J, Arndt H (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:465-480
- Bol R, Ostle NJ, Petzke KJ (2002) Compound specific plant amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values differ with functional plant strategies in temperate grassland. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165:661-667
- Bonkowski M (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162:617-634
- Bonkowski M, Brandt F (2002) Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biology and Biochemistry* 34:1709-1715
- Bonkowski M, Cheng W, Griffiths BS, Alphei J, Scheu S (2000a) Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology* 36:135-147
- Bonkowski M, Griffiths B, Scrimgeour C (2000b) Substrate heterogeneity and microfauna in soil organic 'hotspots' as determinants of nitrogen capture and growth of ryegrass. *Applied Soil Ecology* 14:37-53
- Bonkowski M, Jentschke G, Scheu S (2001) Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway spruce seedlings (*Picea abies* Karst.), mycorrhiza (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) and naked amoebae (protozoa) . *Applied Soil Ecology* 18:193-204
- Bortz J (1989) *Statistik für Sozialwissenschaftler*. Springer, Berlin
- Brewster DT, Spiers AG, Hopcroft DH (1997) Biocontrol of *Phytophthora cactorum* in vitro with *Enterobacter aerogenes*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25:9-18
- Campbell CD, Grayston SJ, Hirst DJ (1997) Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 30:33-41
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13:843-852
- Chabot S, Bécard G, Piche Y (1992) Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* 84:315-321

- Chambers CA, Smith SE, Smith FA (1980) Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist* 85:47-62
- Christensen H, Griffiths BS, Christensen S (1992) Bacterial incorporation of tritiated thymidine and populations of bacteriophagous fauna in the rhizosphere of wheat. *Soil Biology and Biochemistry* 24:303-309
- Clarholm M (1985) Possible roles for roots, bacteria, protozoa and fungi in supplying nitrogen to plants. In: Fitter, AH (ed): *Ecological interactions in soil*. Blackwell, Oxford, pp 355-365
- Clark FE (1949) Soil microorganisms and plant roots. *Advances in Agronomy* 1:241-248
- Coenen C, Lomax TL (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* 2:351-356
- Crick JC, Grime JP (1987) Morphological plasticity and mineral nutrient capture in two herbaceous species of contrasted ecology. *New Phytologist* 107:403-414
- Curl EA, Truelove B (1986) *The rhizosphere*. Springer, New York
- Da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, Do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Clapina LP, Cicarelli RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira Ambn, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MTM, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C, De Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID, Dos Santos MT, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP (2002) Comparison of the Genomes of Two *Xanthomonas* Pathogens With Differing Host Specificities. *Nature* 417:459-463
- Darbyshire JF, Wheatley RE, Greaves MP, Inkson RHE (1974) A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol* 11:465-475
- Darwin C (1880) *The Power of Movement in Plants*. Murray, London
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C (1998) Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* 90:579-585
- Denison RF, Bledsoe C, Kahn M, O'Gara F, Simms EL, Thomashow LS (2003) Cooperation in the rhizosphere and the "free rider" problem. *Ecology* 84:838-845
- Douds DD (1997) A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture

- with Ri T-DNA-transformed carrot coots. *Mycorrhiza* 7:57-61
- Dunbabin VM, Diggle AJ, Rengel Z, van Hugten R (2002) Modelling the interactions between water and nutrient uptake and root growth. *Plant and Soil* 239:19-38
- D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* 124:1706-1717
- Egert M, Marhan S, Wagner B, Scheu S, Friedrich MW (2004) Molecular profiling of 16S R-RNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta : Lumbricidae). *FEMS Microbiology Ecology* 48:187-197
- Ekelund F, Ronn R (1994) Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiological Reviews* 15:321-353
- El-Khawas H, Adachi K (1999) Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils* 28:377-381
- Ellis RJ, Thompson IP, Bailey MJ (1995) Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiology and Ecology* 16:9-17
- Falasca G, Altamura MM (2003) Histological analysis of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings. *Plant Systems* 137:265-273
- Farrar J, Hawes M, Jones D, Lindow S (2003) How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology* 84:827-837
- Fitter A (2002) Characteristics and Functions of Root System. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 15-32
- Fitter AH, Merryweather JW (1992) Why are some plants more mycorrhizal than others? An ecological enquiry. In: Read, DJ, Lewis, DH, Fitter, AH, and Alexander, IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Wallingford, pp 26-36
- Fransson AM, Van Aarle IM, Olsson PA, Tyler G (2003) *Plantago lanceolata* L. and *Rumex acetosella* L. differ in their utilisation of soil phosphorus fractions. *Plant and Soil* 248:285-295
- Fukaki H, Tasaka M (2004) Auxin-regulated lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45:17
- Gange AC, Ayres RL (1999) On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant 'benefit'. *Oikos* 87:615-621
- Garland JL (1996) Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biology and Biochemistry* 28:223-230

- Garrido G, Guerrero JR, Cano EA, Acosta M, Sánchez-Bravo J (2002) Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* 114:303-312
- Gaspar T, Hausman J-F, Faivre-Rampant O, Kevers C, Dommes J (2002) Auxins in the Biology of Roots. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 383-403
- Germida JJ, Siciliano SD, de Freitas JR, Seib AM (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26:43-50
- Gessey GG, Costeron JW (1981) Applikation of epifluorescence microscopy to the enumeration of aquatic bacteria concentrated on membrane filters. In: Dutka, BJ (ed) *Membrane filtration: Applications, techniques and problems*. Marcel Dekker, New York, pp 253-264
- Gisi U., Schenker R, Schulin R, Stadelmann FX, Sticher H. (1997) *Bodenökologie*, 2. Auflage. Thieme, Stuttgart
- Glass ADM (2002) Nutrient absorption by plant roots: regulation of uptake to match plant demand. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 571-586
- Griffiths BS (1989) Enhanced nitrification in the presence of bacteriophagous protozoa. *Soil Biology and Biochemistry* 21:1045-1051
- Griffiths BS (1994) Soil nutrient flow. In: Darbyshire JF (ed) *Soil protozoa*. CAB International, Wallingford, pp 65-92
- Griffiths BS, Bonkowski M, Dobson G, Caul S (1999) Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa. *Pedobiologia* 43:297-304
- Griffiths BS, Caul S (1993) Migration of bacterial-feeding nematodes, but not protozoa, to decomposing grass residues. *Biology and Fertility of Soils* 15:201-207
- Griffiths BS, Christensen S, Bonkowski M (2004) Microfaunal interactions in the rhizosphere: how nematodes and protozoa link above- and below-ground processes. In: Cardon ZG and Whitbeck JL (eds) *The rhizosphere - an ecological perspective*. Elsevier, Amsterdam, im Druck
- Grime JP (1994) The role of plasticity in exploiting environmental heterogeneity. In: Caldwell MM, Pearcy RW (eds) *Exploitation of environmental heterogeneity by plants*. Academic Press, New York, pp 1-19
- Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ (1987) Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* 328:420-422

- Hahn MW, Höfle MG (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 35:113-121
- Hausmann K, Hülsmann N (1996) *Protozoology*. Thieme, Stuttgart
- Henkes G (2004) Einfluss von Protozoen und Mykorrhiza auf das Wachstum von Weizen in einem Splitroot-Experiment. Diplomarbeit TU Darmstadt
- Hensel M, Bieleit G, Meyer R, Jagnow G (1990) A reliable method for the selection of axenic seedlings. *Biology and Fertility of Soils* 9:281-282
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98:59-78
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* 14:2339-2351
- Hinchee MAW, Rost TI (1986) The control of lateral root development in cultured pea seedlings I. The role of seedlings organs and plant growth regulators. *Botanical Gazette* 147:137-147
- Hirsch AM, Bauer WD, Bird DM, Cullimore J, Tyler B, Yoder JI (2003) Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84:858-868
- Hoagland DR, Arnon DI (1938) The waterculture method for growing plants without soil. *Californian Agricultural Station Number Circular* 347:1-39
- Hodge A (2000) Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology* 32:91-96
- Hodge A (2003) Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization. *New Phytologist* 157:303-314
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413:297-299
- Hodge A, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH (1999) Why plants bother: root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete. *Plant, Cell and Environment* 22:811-820
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter AH (1998) Root proliferation, soil fauna and plant nitrogen capture from nutrient-rich patches in soil. *New Phytologist* 139:479-494

- Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiology Letters* 132:203-208
- Hurley MA, Roscoe ME (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *Journal of Applied Bacteriology* 55:159-164
- Hovanec TA, Taylor LT, Blakis A, Delong EF (1998) Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 258-264
- Hutchings MJ, John EA, Wijesinghe DK (2003) Toward understanding the consequences of soil heterogeneity for plant populations and communities. *Ecology* 84:2322-2334
- Iijima M, Kono Y (1991) Interspecific differences of the root system structures of four cereals species as affected by soil compaction. *Japanese Journal of Crop Science* 60:130-138
- Jaeger CH, Lindow SE, Miller S, Clark E, Firestone MK (1999) Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and Tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2685-2690
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6:3901-3907
- Jentschke G, Bonkowski M, Godbold DL, Scheu S (1995) Soil protozoa and forest tree growth: non-nutritional effects and interaction with mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils* 19:263-269
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585
- Jürgens K, Matz C (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:413-434
- Kamensky M, Ovadis M, Chet I, Chernin L (2003) Soil-borne strain Ic14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35:323-331
- Kapulnik Y, Okon Y (2002) Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 869-885
- Kaye JP, Hart SC (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution* 12:139-143

- Kern C (2003) Versuche zum Einfluss von Protozoenbeweidung auf die Bakteriengemeinschaft und das Pflanzenwachstum. Forschungspraktikum, TU Darmstadt
- Klironomos JN (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292-2301
- Kottke I (2002) Mycorrhiza - Rhizosphere Determinants of Plant Communities. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 917-932
- Krambeck C, Krambeck H-J, Overbeck J (1981) Microcomputer assisted biomass determination of plankton bacteria on scanning electron micrographs. *Applied and Environmental Microbiology* 42:142-149
- Kreuzer K, Bonkowski M, Langel R, Scheu S (2004) Decomposer animals (Lumbricidae, Collembola) and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne* (Poaceae) and *Trifolium repens* (Fabaceae). *Soil Biology and Biochemistry*, im Druck
- Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8:298-300
- Larcher M, Muller B, Mantelin S, Rapior S, Cleyet-Marel JC (2003) Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytologist* 160:119-125
- Lerat S, Lapointe L, Gutjahr S, Piche Y, Vierheilig H (2003) Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. *New Phytologist* 157:589-595
- Lüttge U (1983) *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 15A. Springer, Heidelberg
- Lüttge U, Kluge M, Bauer G (1988) *Botanik*. VCH, Basel
- Lynch JM, Whipps JM (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129:1-10
- Mantelin S, Touraine B (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* 55:27-34
- Marschner H (1992) Nutrient dynamics at the soil-root interface (Rhizosphere). In Read DJ, Lewis DH, Fitter AH and Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems*. C.A.B. International, Wellington, pp 3-12
- Mathesius U, Mulders S, Gao MS, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1444-1449

- Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jürgens K (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1593-1599
- McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1721-1730
- McLean EO (1982) Soil pH and lime requirement. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds) *Methods of Soil Analysis II*. American Society of Soil Sciences, Madison, p 199
- Miyamoto N, Steudle E, Hirasawa T, Lafitte R (2001) Hydraulic conductivity of rice roots. *Journal of Experimental Botany* 52:1835-1846
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* 37:128-138
- Murase J, Itoh K, Kano M, Kimura M (2003) Molecular analysis of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations in surface layers of a submerged paddy soil microcosm. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:909-913
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Naleway JJ (1992) Histochemical, spectrophotometric and fluorometric GUS substrates. In: Gallagher SR (ed) *GUS protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression*. Academic Press, San Diego, pp 61-76
- Nebel M, Kreier H-P, Preußing M, Weiß M, Kottke I (2004) Symbiotic fungal associations of liverworts are the possible ancestors of mycorrhizae. In: Agerer R, Piepenbring X and Blanz P (eds) *Frontiers in Basidiomycote Mycology*. IHW-Verlag, Eching, pp 339-360
- Nuruzzaman M, Ashrafuzzaman M, Islam MZ, Islam MR (2003) Field efficiency of biofertilizers on the growth of Okra (*Abelmoschus Esculentus* [(L.) Moench]). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166:764-770
- Ochsenreiter T (2002) Molekular-ökologische und genomische Studien zur Charakterisierung von nicht kultivierten Archäen und Acidobakterien. Dissertation, TU Darmstadt
- Page FC (1976) An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. *Freshwater Biological Association, Ambleside*
- Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside*
- Phillips DA, Ferris H, Cook DR, Strong DR (2003) Molecular control points in rhizosphere food webs. *Ecology* 84:816-826

- Popov N, Schmitt S, Mathies H (1975) Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten. *Acta Biologica et Medica Germanica* 34:1441-1446
- Posch T, Simek K, Vrba J, Pernthaler S, Nedoma J, Sattler B, Sonntag B, Psenner R (1999) Predator-induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology* 18:235-246
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles: a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42:1-14
- Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT (2001) Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* 52:113-121
- Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia-oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5368-5382
- Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122:481-490
- Reed RC, Brady SR, Muday GK (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 118:1369-1378
- Robinson D (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127:635-674
- Rodrigues-Pousada R, Van Caeneghem W, Chauvaux N, Van Onckelen H, Van Montagu M, Van Der Straeten D (1999) Hormonal cross-talk regulates the *Arabidopsis thaliana* 1- Aminocyclopropane-1-Carboxylate synthase gene 1 in a developmental and tissue-dependent manner. *Physiologia Plantarum* 105:312-320
- Ronn R, McCaig AE, Griffiths BS, Prosser JI (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6094-6105
- Roselló-Mora R, Amann R (2001) The species concept for procaryotes. *FEMS Microbiological Reviews* 25:39-67
- Rousseeuw PJ, Ruts I, Tukey JW (1999) The bagplot: a bivariate boxplot. *The American Statistician* 53:382-387
- Rovira AD (1991) Rhizosphere research - 85 years of progress and frustration. In: Kleister DL and Cregan PB (eds) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 3-13

- Scherer-Lorenzen M, Palmborg C, Prinz A, Schulze ED (2003) The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands. *Ecology* 84:1539-1552
- Scheu S (1992) Automated measurement of the respiratory response of soil microcompartments: active microbial biomass in earthworm faeces. *Soil Biology and Biochemistry* 24:1113-1118
- Semenov AM, van Bruggen AHC, Zelenev VV (1999) Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microbial Ecology* 37:116-128
- Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B (2002) Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215:229-238
- Simon HM, Dodsworth JA, Goodman RM (2000) Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology* 2:495-505
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- Snyder RA (1991) Chemoattraction of a bacterivorous ciliate to bacteria surface compounds. *Hydrobiologia* 215:205-213
- Sohlenius B (1980) Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Oikos* 34:186-194
- Stephan A, Meyer AH, Schmid B (2000) Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology* 88:988-998
- Strabala TJ, Wu YH, Li Y (1996) Combined effects of auxin transport inhibitors and cytokinin: Alterations of organ development in tobacco. *Plant and Cell Physiology* 37:1177-1182
- Söderberg KH, Olsson PA, Baath E (2002) Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology* 40:223-231
- Söderström B (1992) The ecological potential of the ectomycorrhizal mycelium. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH and Alexander, IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Wallington, pp 77-83
- Tanaka S, Yamauchi A, Kono Y (1995) Root-system morphology of 4 rice cultivars - response of different component roots to nitrogen application. *Japanese Journal of Crop Science* 64:148-155
- Thimann KV, Skoog F (1933) Studies on the growth hormone of plants: III. The inhibiting action of the growth hormone on bud development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 19:714-716
- Tiunov AV, Scheu S (2000) Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biology and Biochemistry* 32:265-275

- Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5:240-245
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/Iaa proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971
- Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72
- Van Der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plants. *New Phytologist* 157:569-578
- Verity PG (1991) Feeding in planktonic protozoans: Evidence for non-random acquisition of prey. *Journal of Protozoology* 38:69-76
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64:5004-5007
- Wagner M, Horn M, Daims H (2003) Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 6:302-309
- Waisel Y (2002) Aeroponics: A Tool for Root Research Under Minimal Environmental Restrictions. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) *Plant roots - the hidden half*. Marcel Dekker, New York, pp 323-331
- Wamberg C, Christensen S, Jakobsen I, Muller AK, Sorensen SJ (2003) The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry* 35:1349-1357
- Wang JG, Bakken LR (1997) Competition for nitrogen during mineralization of plant residues in soil: microbial response to C and N availability. *Soil Biology and Biochemistry* 29:163-170
- Wardle DA (1992) A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews* 67:321-358
- Wardle DA, Yeates GW (1993) The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems: evidence from decomposer food-webs. *Oecologia* 93:303-306
- Weekers PH, Bodelier PLE, Wijen JPH, Vogels GD (1993) Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2317-2319

- Weisse T (2002) The significance of inter- and intraspecific variation in bacterivorous and herbivorous protists. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:327-341
- Welham CVJ, Turkington R, Sayre C (2002) Morphological plasticity of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to spatial and temporal resource heterogeneity. *Oecologia* 130:231-238
- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511
- Wieland G, Neumann R, Backhaus H (2001) Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5849-5854
- Wightman F, Schneider EA, Thimann KV (1980) Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. *Physiologia Plantarum* 49:303-314
- Wright DA, Killham K, Glover LA, Prosser JI (1995) Role of pore size location in determining bacterial activity during predation by protozoa in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3537-3543
- Wurst S, Langel R, Reineking A, Bonkowski M, Scheu S (2003) Effects of earthworms and organic litter distribution on plant performance and aphid reproduction. *Oecologia* 137:90-96
- Wurst S, Dugassa-Gobena D, Langel R, Bonkowski M, Scheu S (2004) Combined effects of earthworms and vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant and aphid performance. *New Phytologist* 163: 169-176
- Yang C-H, Crowley DE (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* 66:345-351
- Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT (2004) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy* 81:97-168
- Zhang H, Forde B.G. (2000) Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51:51-59
- Zhang HM, Forde BG (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409
- Zhang HM, Jennings A, Barlow PW, Forde BG (1999) Dual pathways for the regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6529-6534
- Zwart KB, Kuikman PJ, Van Veen JA (1994) Rhizosphere protozoa: Their significance in nutrient dynamics. In: Darbyshire JF (eds) *Soil protozoa*. CAB International, Wallingford, pp 93-121