

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Untersuchungen zur Bedeutung der Stickstoffspeicherung in der Mykorrhiza
für die Trockenstresstoleranz verschiedener Ökotypen der Buche**

von

I. Kottke, A. Soro, A. Berger

Botanisches Institut, Spezielle Botanik
Mykologie und Botanischer Garten
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Förderkennzeichen: PEF 197004

Die Arbeiten des Programms Europäisches Forschungszentrum für Maßnahmen zur
Luftreinhaltung wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Juli 1999

Untersuchungen zur Bedeutung der Stickstoffspeicherung in der Mykorrhiza für die Trockenstresstoleranz verschiedener Ökotypen der Buche

I. Kottke, A. Soro, A. Berger, Botanisches Institut, Spezielle Botanik, Mykologie und Botanischer Garten, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Zusammenfassung

Im Rahmen des Conventwald-Projektes wurde die Sensitivität von Ökotypen der Buche auf Trockenstreß untersucht. Buchen sind obligat mykotroph, d.h. sie erhalten Wasser und Nährsalze aus dem Boden über die Pilz-Wurzel-Symbiose (Ektomykorrhiza). In den Pilzhyphen erfolgt auch eine Speicherung von Nährstoffen, insbesondere von Phosphat, stickstoffhaltigen Verbindungen (Aminosäuren und Proteinen) und Glykogen, die als Reserven für Zeiten geringer Nährstoffverfügbarkeit angesehen werden können. Die erforderlichen Kohlenhydrate für die Synthese der Aminosäuren und des Glykogens werden von der Pflanze geliefert. Erwartungsgemäß sollten daher Mykorrhizen von Buchen-Ökotypen mit höherer Trockenstresstoleranz und damit höherer Photosyntheseleistung unter Trockenstreß mehr Aminosäuren, Proteine und Glykogen speichern können als sensitive Herkünfte. Wegen des ebenfalls zu erwartenden verminderten N-Bedarfs der Pflanzen unter Trockenstreß sollte die Speicherung gegenüber Kontrollpflanzen ansteigen, solange die N-Aufnahme nicht beeinträchtigt wird. Diese Arbeitshypothesen sollten geprüft und die Speicherung auf ihre bioindikative Eignung untersucht werden.

Die Stickstoffverbindungen werden bei Überschuß vakuolär gespeichert und können lichtmikroskopisch als färbare Granula in den Pilzhyphen der Mykorrhizen erfaßt werden. Der N-Gehalt kann mittels der Elektronen Energieverlust Analyse (EELS) nachgewiesen werden. Glykogen kann nach spezifischer Kontrastierung transmissions-elektronenmikroskopisch identifiziert werden. In einem Feldexperiment wurden Buchensetzlinge unterschiedlicher Herkunft in einen Buchenhochwald (Conventwald) gepflanzt und ein Jahr später die Hälfte der Pflanzung mit einer Plastikfolie überdacht. Die Verteilungsdichte der N-haltigen Granula wurde in drei unterschiedlichen Mykorrhizotypen von 5 Buchen-Ökotypen nach drei- bzw. viermonatiger Überdachung sowie an Kontrollpflanzen bestimmt. Die Glykogenspeicherung wurde an Stichproben kontrolliert. Sie erwies sich als wenig verändert. Die N-Speicherung stieg nach viermonatiger Überdachung in den Mykorrhizen aller drei Pilzpartner tendenziell an, was auf einen verminderten Bedarf der gestreßten Pflanzen hinweist. Die Zunahme der Speicherung war für die Herkunft Forbach statistisch signifikant, für die Herkunft Conventwald ebenfalls deutlich erhöht gegenüber den anderen Herkünften. Das Ergebnis findet seine Entsprechung im erhöhten Wassernutzungskoeffizienten der beiden Schwarzwald-Herkünfte, die von der Arbeitsgruppe Lichtenthaler/Bussmann gemessen wurde. Damit läßt sich ein Zusammenhang zwischen effektiver Photosynthese und der Speicherkapazität der Mykorrhizen erkennen. Eine höhere Speicherung N-haltiger Verbindungen in den Vakuolen der Pilzhyphen kann als vorteilhaft angesehen werden. Die Befunde lassen sich daher dahingehend interpretieren, daß die beiden Schwarzwald-Herkünfte Forbach und Conventwald zumindest am Standort Conventwald von Trockenstreß weniger beeinträchtigt wurden als die Herkünfte aus Oberschwaben. Die vakuoläre N-Speicherung in den Pilzhyphen der Mykorrhizen kann nach diesen und früheren Ergebnissen boindikativ genutzt werden.

Summary

Nitrogen deposition in mycorrhizas of beech of different origin treated by drought

Research in the Conventwald project intended to select beech provenances resistant to summer drought by searching for compounds that could be used as bioindicators of drought stress resistancy. Mycorrhization plays an important part in drought stress resistancy of trees improving uptake and storage of nutrients. The ectomycorrhizal fungi store surplus of phosphate, aminoacids and proteins in the fungal vacuoles and glycogen in the cytosol, the carbon skeletons being supplied by the plant. Mycorrhizas of drought resistant beech provenances with higher photosynthetic rate were expected to store higher amounts of aminoacids/proteins in the fungal vacuoles than sensitive provenances. A general increase of N-storage was expected because of lowered N-demand by the plant under drought stress. The storage compounds can be visualized as metachromatic, vacuolar granules using light microscopy and the N-content proven by electron energy-loss spectroscopy (EELS). Glycogen can be shown by PATAg staining. The amounts of stored compounds were hypothesized to serve as bioindicator of stress resistancy.

Beech seedlings of five different provenances had been planted in a beech forest one year before the experiment started. Half of the plantation was covered by a plastic folia to prevent rain fall experimentally. Mycorrhizal samples were collected three and four months later. The vacuolar N-storage pool of three different mycorrhizal types was investigated. The results revealed increased storage of vacuolar granules in all three mycorrhizal types after four months of drought stress. The increase was significant for the beech provenance Forbach but also well visible for the provenance Conventwald. The results corresponded to the higher water-use-efficiency measured for the two provenances by Lichtenthaler/Bussmann group. Higher photosynthetic efficiency was thus connected to higher storage capacity of mycorrhizas. The results may be interpreted in a way that the two provenances from the Black Forest were better adapted to the drought condition in the stand Conventwald than the provenances from southern Baden-Württemberg. The measured compounds appeared to be of bioindicative value.

1 Einleitung

Das Conventwald-Projekt unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rennenberg, Universität Freiburg, hatte zum Ziel, trockenresistente Ökotypen der Buche zu selektionieren und biochemische Parameter zu suchen, die bei Trockenstreß regulierend eingreifen oder bioindikativ genutzt werden können. Damit sollte versucht werden, der anthropogen mitbedingten Klimaveränderung und den zu erwartenden, längeren Trockenperioden durch Auswahl geeigneten Pflanzgutes rechtzeitig zu begegnen (Volkmer et al. 1997). Die obligate Mykorrhizierung trägt dabei entscheidend zur Trockenresistenz von Buchensetzlingen bei (Herrmann et al. 1992, Kottke 1998). Mykorrhizierung steigert die Photosynthese und den Wassernutzungskoeffizienten (WUE) allgemein und unter Trockenstreß, wie für verschiedene Baum-Pilz symbiosen gezeigt wurde (Guehl & Garbaye 1990, Guehl et al. 1990, 1992).

Die Pilz-Wurzel-Symbiose verbessert nicht nur die Nährstoffaufnahme sondern erlaubt auch eine Zwischenspeicherung von Nährelementen, insbesondere von Phosphat, Aminosäuren und Proteinen in Hyphenmantel und Hartigschem Netz (Finlay et al. 1989, Kottke et al. 1995, Beckmann et al. 1998, Chalot & Brun 1998). Die Speicherung von Phosphat erfolgt nach übereinstimmenden Befunden in Form von Polyphosphat in granulären Aggregaten in den Vakuolen der Pilzhyphen (Rev. Klionsky et al. 1990). Die Speicherung stickstoffhaltiger Verbindungen in den Vakuolen der Pilzhyphen von Mykorrhizen konnte mit Hilfe der Elektronen-Energieverlustanalyse kürzlich nachgewiesen werden (Kottke et al. 1995). Mit Hilfe monoklonaler Antikörpern wurden Glutaminsynthetase sowie Glutamin und Glutamat in granulären Aggregaten der pilzlichen Vakuolen lokalisiert (Brun et al. 1994, und Chalot & Brun 1998). In Untersuchungen an Hefe und an isolierten Vakuolen von *Neurospora crassa* war bereits gezeigt worden, daß basische Aminosäuren an vakuolär gespeicherte Polyphosphate binden und dadurch osmotisch inaktiv werden (Dürr et al. 1979, Cramer & Davis 1984). Infolgedessen können große Mengen an Aminosäuren in Pilzhyphen gespeichert werden. Miller (1984) zeigte *in vitro* einen Einfluß der Kationen- und Aminosäurekonzentrationen auf die Granulabildung von Polyphosphaten. Bental et al. (1990) fanden bei der halophilen Grünalge *Dunaliella salina* eine Verlängerung der Polyphosphatketten nach hyperosmotischem Schock, eine Verkürzung der Ketten zu löslichen und damit osmotisch aktiven Polyphosphatmolekülen nach hyposmotischem Schock. Damit wird deutlich, daß Präparationsverfahren den Zustand und das Erscheinungsbild der vakuolären Speicherprodukte beeinflussen. Orlovich & Ashford (1994) kritisierten die Bildung von Granula als Artefakt der chemischen Fixierung, da sie nach Kryofixierung in flüssigem Stickstoff homogen gefüllte Vakuolen in den Hyphen von *Pisolithus tinctorius* vorfanden. Nachuntersuchungen unsererseits am gleichen Pilz unter Einsatz der Hochdruckkryofixierung (Prof. Mendgen, Universität Konstanz) bestätigten diesen Befund. Gleichzeitig wurde aber an zahlreichen Hyphen ein Ausfließen des Vakuoleninhaltes beobachtet (Kottke et al. in Vorber.). Das könnte darauf hindeuten, daß die Polyphosphatketten wie beim hypoosmotischen Schock zerkleinert und osmotisch aktiv werden und infolgedessen den Tonoplasten ausfüllen bzw. durchbrechen. Die Entwässerung der Proben bei der chemischen Fixierung führt eventuell zu einer Verdichtung der Granula. Im frischen Zustand stellten Bücking et al. (1998) und eigene Nachuntersuchungen (Berger D 1998) allerdings eine ähnliche Größe der Granula in den Vakuolen fest, wie sie nach chemischer Fixierung auftritt. Die Beeinträchtigung des physiologischen Zustandes der Hyphen fällt demnach bei chemischer Fixierung geringer aus als nach Kryofixierung. Die chemische Fixierung führt darüber hinaus zu sehr konstanten Ergebnissen, während bei der Kryofixierung ein großer Teil der Hyphen, insbesondere stärker vakuolisierte, sehr schlecht fixiert wurden. Für quantitative Auswertungen der vorliegenden Art ist daher die chemische Fixierung das Gegebene. Im P- und N- Gehalt der vakuolären Depositionen unterschieden sich chemisch fixiertes und kryofixiertes Material nur unwesentlich (Turnau & Kottke in Vorber.).

Die physiologische Fähigkeit von Pilzhyphen, Polyphosphate zu speichern und an deren freien, negativen Bindungen basische Aminosäuren und metallische Kationen zu binden, ist für die Ökologie der Ektomykorrhiza wichtig. Sie erklärt die schon lange bekannte, extrem rasche und hohe Aufnahme für Phosphat und Ammonium (Finlay et al. 1989, Smith & Read 1997), eine Fähigkeit, die Vorteile im Jahreszeitenklima verschafft, wo Nährelemente nur unregelmäßig zur Verfügung stehen. Es sollte daher untersucht werden, ob und wie der vakuoläre Speicherpool der Mykorrhizen auf Trockenstreß reagiert. Bei gleichbleibendem N-Angebot und nicht beeinträchtigter Aufnahme sollte die Speicherung unter Trockenstreß zunehmen, da der Bedarf der Pflanze abnimmt. Die für die Aminosäuresynthese notwendigen Kohlenhydrate werden von

der Pflanze bezogen, wodurch die Höhe der Speicherung auch von der Photosyntheserate und dem Saccharosetransport abhängig wird und evtl. Auswirkungen auf die Glykogenspeicherung der Mykorrhizen hat (France & Reid 1983, Wingle et al. 1996, Kottke et al. in Vorbereitung). Pflanzen mit effizienterer Photosynthese könnten mehr Kohlenhydrate an die Mykorrhizen liefern und damit deren Aminosäurespeicher positiv beeinflussen. Im Rahmen des Conventwaldprojektes sollte deshalb erstmals untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen der vakuolären Stickstoffspeicherung in den Mykorrhizen und der Trockenresistenz und damit unterschiedlicher Photosynthesekapazität von Buchen unterschiedlicher Herkunft zeigen und ob sich dieser Parameter bioindikativ nutzen läßt. Die N-haltigen, vakuolären Speicherprodukte und Glykogen, getrennt von Stärke, lassen sich bisher in den Mykorrhizen nur mit den hier gewählten, mikroskopischen Verfahren erfassen. Für Buchenmykorrhizen lagen bisher keine Untersuchungen vor.

2 Material und Methoden

Die Mykorrhizen wurden während der zwei gemeinsamen Ernten der AG Rennenberg Ende August und Anfang Oktober 1997 gesammelt (Volkmer et al. 1997, Volkmer et al. 1998). Es wurden ein bis vier Buchenpflanzen der Herkünfte Conventwald, Überlingen, Ravensburg, Forbach und Zwiefalten von Kontroll- und Überdachungsfläche nach Mykorrhizatypen beerntet. Einmalig wurden vier Bäume der Provenienz Ravensburg getrennt beprobt, sonst wurden die Mykorrhizen von bis zu vier Bäumen gepoolt. Wir gingen davon aus, daß die Variabilität zwischen den Mykorrhizen den Einfluß der Einzelbäume gleicher Provenienz übersteigt und damit einschließt.

Die Mykorrhizen der drei Pilzpartner *Xerocomus chrysenteron*, *Lactarius subdulcis* und *Byssocorticium atrovirens* waren leicht identifizierbar und mehr oder weniger durchgängig vorhanden. Sie wurden daher für die quantitativen Auswertungen ausgewählt, in herkömmlicher Weise in Glutaraldehyd/Formaldehyd fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (Kottke & Oberwinkler 1988). Soweit die notwendige Anzahl an Mykorrhizen gesammelt werden konnte, wurden pro Typ und Probebaum von 10 Mykorrhizen mediane Längsschnitte angefertigt und für die lichtmikroskopische Auswertung mit Neufuchsin/Kristallviolett angefärbt. Der Farbstoff kontrastiert die vakuolären, N-haltigen Depositionen. Von ausgewählten Beispielen der drei Mykorrhizatypen wurden Ultradünnschnitte angefertigt, um den Vitalitätszustand und die Zusammensetzung der vakuolären und cytosolischen Depositionen zu überprüfen. Der Nachweis von Stickstoff in den Vakuolen erfolgte mit Hilfe der Elektronen-Energieverlust-Analyse (EELS) am TEM902, Zeiss (Beckmann et al. 1998). Zum ultrastrukturellen Nachweis von Glykogen wurde der PATAg-Test durchgeführt (Lewis & Knight 1977).

Die Quantifizierung der stickstoffhaltigen, vakuolären Depositionen erfolgte durch Auszählen der angefärbten Granula pro Hyphenmantelfläche am Lichtmikroskop nach Übertragung auf einen PC mittels einer Videokamera und Einsatz der Image-Software analySIS 3.0 (SIS-Soft-Imaging, Münster W.). Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS vers. 7.52 bez. vers. 8. Die Ergebnisse wurden als Boxplots dargestellt (Median, erstes und drittes Quartil, kleinster und größter Wert, Extremwerte nicht einbezogen; Bühl & Zöfel 1998), da diese Form der

explorativen Statistik den Verhältnissen am ehesten entsprach (Lorenz 1992). Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde entweder der student t-Test oder der U-Test nach Mann-Whitney angewandt, um paarweise auf signifikante Unterschiede zu prüfen.

Die Speicherung von Glykogen wurde an Stichproben als vorhanden oder fehlend im Zusammenhang mit der Stickstoffspeicherung bewertet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zustand von Wurzelsystemen und Mykorrhizen

Die Pflanzen ließen sich trotz des steinigten Geländes relativ vollständig entnehmen, da die Wurzelsysteme kaum über das Pflanzloch hinausgewachsen waren und darin ein gutes Feinstwurzelsystem entwickelt hatten. Die umgepflanzte Naturverjüngung aus dem Conventwald zeigte allerdings durchweg ein sehr schwaches Wurzelsystem, was auf den Pflanzschock zurückgeführt werden muß (Herrmann et al. 1992). Die Feinstwurzeln aller Herkünfte waren durchweg mykorrhiziert, wobei die drei Mykorrhizapartner, *Xerocomus chrysenteron*, *Lactarius subdulcis* und *Byssocorticium atrovirens*, fast an allen Pflanzen vorkamen (Hampp et al. 1998). Diese Mykorrhizapartner sind typische Buchenbegleiter (Agerer 1987-1998).

Die licht- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, daß die Mykorrhizen überwiegend in gutem, funktionsfähigem Zustand waren. Vertrocknung wurde nicht beobachtet. Die Mykorrhizen von *Lactarius subdulcis* waren i. d. R. zusätzlich mit einem Ascomyceten assoziiert, bei dem es sich wahrscheinlich um *Leucoscypha leucotricha* handelte (Brand 1992). Alle drei Mykorrhizatypen zeigten die N-haltigen, vakuolären Depositionen und speicherten Glykogen. Im Ascomyceten wurden sehr fein verteilte Glykogen-Granula gefunden, während sie in den drei Basidiomyceten in der bekannten, sternförmigen Zusammenlagerung auftraten. In *Byssocorticium atrovirens* waren die N-haltigen Depositionen i. d. R. kleine Granula, die in größerer Zahl in den Vakuolen lagen, während bei *Xerocomus chrysenteron* und *Lactarius subdulcis* wenige aber größere Granula gefunden wurden. Die Anzahl der Granula erlaubt daher keinen unmittelbaren Rückschluß auf die Menge des vakuolär gespeicherten Stickstoffs. Die Anzahl der Granula pro Hyphenmantelfläche dient in dieser Untersuchung nur als Indikator für eine relative Ab- bzw. Zunahme der Speicherung.

Wie bereits aus früheren Untersuchungen bekannt (Kottke et al. 1995, Beckmann et al. 1998), war auch in diesem Material die vakuoläre Speicherung vom Entwicklungszustand der Mykorrhizen und der Pilzhyphen abhängig. Mit zunehmender Ausdifferenzierung des Hyphenmantels, verbunden mit dem Absterben der Wurzelrindenzellen, nahm die N-Speicherung zu, die Glykogenspeicherung hingegen ab. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Laborexperimenten mit *Amanita muscaria*-*Picea abies* Mykorrhizen erzielt (Berger A 1998). Da die Mykorrhizen aus dem Conventwald naturgemäß von unterschiedlichem Alter und Entwicklungszustand waren, ergab sich eine relativ hohe Variabilität der Speicherkapazität (Abb. 1). Der Einfluß von Umweltfaktoren (Herkunft, Trockenstreß und Erntezeitpunkt) kann nur dann herausgefiltert werden, wenn er diese Variabilität übersteigt.

Speicherung N-haltiger Granula in den Vakuolen der Pilzhyphen

Die Anzahl vakuolär gespeicherter N-Granula der drei Pilzpartner war tendenziell aber nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 1). Die Pilzpartner blieben daher bei den weiteren Auswertungen unberücksichtigt. In früheren Untersuchungen auf den Flächen des ARINUS-Projektes hatten wir deutliche Unterschiede in der Speicherkapazität der Mykorrhizen von verschiedenen Pilzpartnern festgestellt (Beckmann et al. 1998, Kottke et al. 1998).

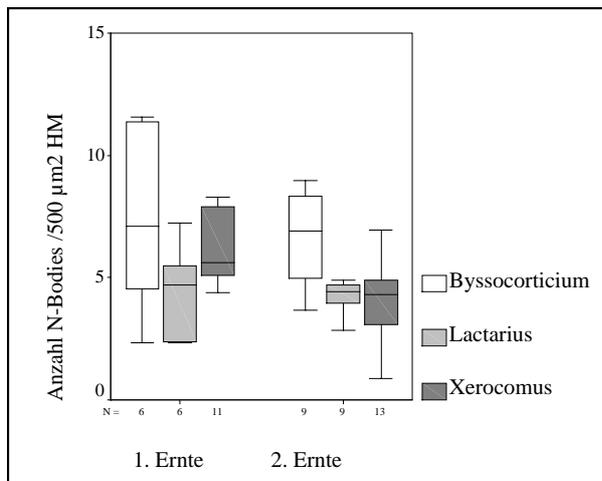


Abb. 1 Unterschiede zwischen den Mykorrhizotypen unabhängig von den Behandlungen

Faßt man alle Meßdaten der N-Depositionen bezüglich der Buchenherkünfte zusammen, ohne Berücksichtigung der Behandlungen und der Pilzarten, so zeigen sich Unterschiede, die teilweise auf dem 0.05 bzw. 0.01 Niveau signifikant sind (Abb. 2, Tab. 1). Demnach speichern Mykorrhizen der Herkunft Conventwald signifikant mehr als Mykorrhizen der Herkünfte Überlingen, Ravensburg und Zwiefalten und Mykorrhizen der Herkunft Forbach ebenfalls signifikant mehr als Mykorrhizen der Herkünfte Ravensburg und Zwiefalten. Die erhöhte Speicherung der Herkünfte Forbach und Conventwald zeigt sich auch in der Reaktion auf den Trockenstreß zum zweiten Erntezeitpunkt (Abb. 3, Tab. 2).

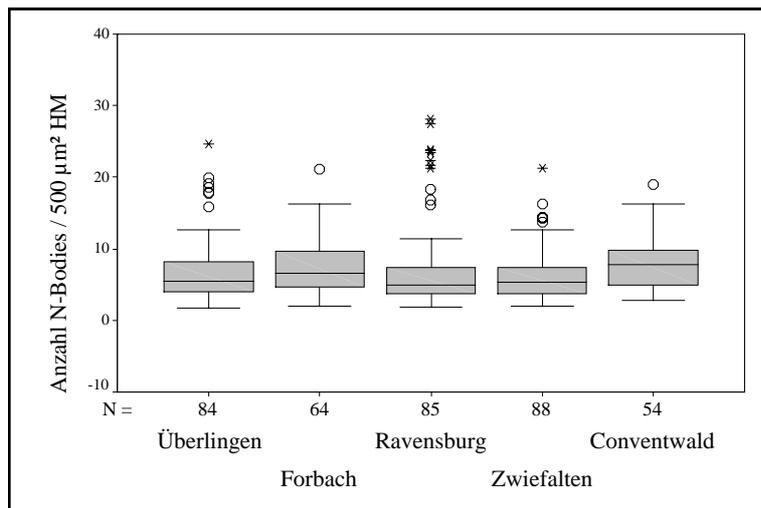


Abb. 3 Unterschiede zwischen den Buchenherkünften ohne Berücksichtigung von Behandlung und Pilzart

Tabelle 1 Signifikanztest der Unterschiede zwischen den Buchenherkünften ohne Berücksichtigung von Behandlung und Pilzart (* p = 0.05; ** p = 0.01; *** p = 0.001)

	Forbach	Ravensburg	Zwiefalten	Convent-
Überlingen	0.108	0.508	0.615	0.018*
Forbach		0.037*	0.025*	0.506
Ravensburg			0.798	0.006**
Zwiefalten				0.002*

Sieht man sich den Einfluß der Behandlungen an, bei denen durch zwei- bzw. dreimonatige Überdachung der Pflanzung ein Trockenstreß erreicht werden sollte, die nicht überdachten Flächen jedoch in den ersten beiden Monaten (Juli/August) auch nur sehr geringe Niederschläge verzeichneten, ergeben sich keine einheitlichen Tendenzen (Abb. 3 und Tab. 2). Die hier dargestellten, unterschiedlichen Tendenzen wurden aber im Einzelnen von den drei Pilzarten in gleicher Weise nachgezeichnet (nicht wiedergegeben).

Die Mykorrhizen der Herkunft Überlingen zeigen nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Behandlungen und den Beprobungen. Bei den Mykorrhizen der Herkunft Forbach, Ravensburg und Conventwald war Ende August (1. Ernte) eine höhere Speicherung auf der Kontrollfläche gegenüber der Überdachung festzustellen, die aber nur für die Herkunft Ravensburg signifikant war. Bei der Herkunft Zwiefalten ist zum gleichen Probenahmetermin eine signifikante Abnahme der Speicherung auf der Kontrollfläche zu beobachten. Beim zweiten Probenahmetermin, Anfang Oktober, sind die Speichertendenzen bei den Herkunft Forbach, Ravensburg und Conventwald gegenläufig zum ersten Termin, d.h. die Speicherung ist auf der Kontrollfläche geringer als unter der Überdachung. Der Unterschied ist für die Herkunft Forbach signifikant (Tab. 2), für die Herkunft Conventwald, gemessen am Median, deutlich, jedoch wegen der hohen Variabilität nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen den beiden Probetermen sind auf der

Kontrollfläche für die Herkünfte Forbach, Ravensburg und Zwiefalten hoch bis höchst signifikant (Tab. 2).

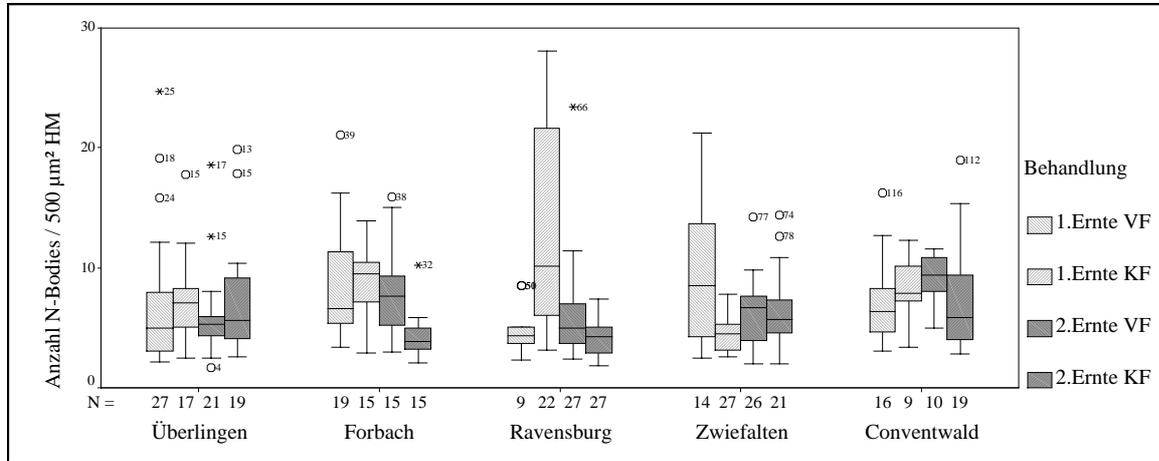


Abb. 3 Einfluß von Behandlung und Probenahmezeitpunkt auf die Mykorrhizen der unterschiedlichen Buchenherkünfte

Tabelle 2 Signifikanztest zum Einfluß der Behandlung und der Probenahme (1997) auf die Mykorrhizen der verschiedenen Buchenherkünfte (* $p = 0.05$; ** $p = 0.01$; *** $p = 0.001$; V Versuchsfläche, K Kontrollfläche)

	Überlingen	Forbach	Ravensburg	Zwiefalten	Conventwald
1. Ernte: V/K	0.177	0.354	0.003*	0.005**	0.251
2. Ernte: V/K	0.573	0.002**	0.105	1.000	0.056
V: 1./2. Ernte	0.787	0.945	0.615	0.071	0.053
K: 1./2. Ernte	0.827	0.000***	0.000***	0.006**	0.172

Ein paarweiser Vergleich der Herkünfte zeigt ähnliche Unterschiede (Tab. 3), wie sie in Abb. 2 und Tab. 1 bereits vorgestellt wurden. Signifikante Unterschiede sind zu beiden Ernteterminen auf der Kontrollfläche wesentlich häufiger als auf der Versuchsfläche festzustellen, sind aber für kein Vergleichspaar durchgängig.

Tabelle 3 Paarweiser Vergleich der Herkünfte bezüglich Erntetermin (1997) und Behandlung (* p = 0.05; ** p = 0.01; *** p = 0.001; V Versuchsfläche, K Kontrollfläche)

Vergleich der Herkünfte	1. Ernte V	1. Ernte K	2. Ernte V	2. Ernte K
Überlingen/Forbach	0.048*	0.040*	0.058	0.017*
Überlingen/Ravensburg	0.517	0.042*	0.779	0.013*
Überlingen/Zwiefalten	0.143	0.001***	0.363	0.979
Überlingen/Conventwald	0.209	0.164	0.002**	0.977
Forbach/Ravensburg	0.006*	0.366	0.057	0.813
Forbach-Zwiefalten	0.733	0.000***	0.086	0.003**
Forbach/Conventwald	0.403	0.77	0.144	0.015*
Ravensburg/Zwiefalten	0.083	0.000***	0.563	0.003**
Ravensburg/Convent-	0.095	0.379	0.005**	0.006**
Zwiefalten/Conventwald	0.131	0.000***	0.005**	0.936

Für die Herkunft Ravensburg, 2. Ernte, Versuchsfläche wurden die Mykorrhizen von *Xerocomus chrysenteron* von vier Bäumen exemplarisch untersucht. Zwischen drei Bäumen zeigten sich keine Unterschiede. Die Mykorrhizen des vierten Baum speicherten signifikant mehr vakuoläre Granula. In der Gesamtauswertung schlägt das allerdings nicht durch (Abb. 4). Es wird deshalb davon ausgegangen, daß die Beschränkung auf einen Baum nur bedingt toleriert werden kann, Mischproben aber zulässig sind.

Die Speicherung von Glykogen war in den exemplarisch untersuchten Mykorrhizen fast durchweg zu beobachten. Hyphenzellen mit einer großen Zahl von N-Granula enthielten aber teilweise kein Glykogen. Nur in einer Mykorrhiza von *Xerocomus chrysenteron* (1. Ernte, Überlingen, Kontrollfläche) wurde kein Glykogen nachgewiesen. An anderen Mykorrhizen der gleichen Aufsammlung konnte das aber nicht bestätigt werden. Das Stickstoffangebot im Conventwald war offensichtlich nicht so hoch, daß es die Glykogenspeicherung beeinträchtigt hätte. Letzteres wurde an Mykorrhizen aus stickstoffbelasteten Kiefern (Holopainen & Heinonen-Tanski 1993) und in Kulturen beobachtet (Kottke et al. in Vorber.).

4 Vergleich mit den Ergebnissen der anderen am Conventwald-Projekt beteiligten Arbeitsgruppen

Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Probenahmeterminen 1997 in dem von uns gemessenen Kompartiment deuten darauf hin, daß der beabsichtigte Unterschied im Trockenstreß zum ersten Probezeitpunkt nicht in der gewünschten Weise eingetreten war. Wegen fehlenden Niederschlags waren die Pflanzen auf der Kontrollfläche evtl. etwas stärker gestreßt als die Pflanzen unter der Überdachung, in der sich auf Grund der herabgesetzten Verdunstung evtl. eine ausreichende Bodenfeuchte halten konnte. An den Mykorrhizen zumindest war keine auffallende Trockenheit zu beobachten. Bezüglich der physiologischen Streßparameter zeigten sich zum ersten Erntetermin keine Reaktionen (Volkmer et al. 1998). Die auf Chlorophyllgehalt

bezogene Photosynthese war aber unter der Überdachung verringert (Pantel et al. 1998). Obwohl Kontroll-Pflanzen und Behandlung nicht signifikant unterschiedlich groß waren, lag die Terminaltrieblänge unter der Überdachung deutlich über der auf der Freifläche (Volkmer et al. 1998). Der gesteigerte Zuwachs könnte zu einem erhöhten N-Bedarf geführt haben, der bei gleichzeitig geringerer Photosynthese die Speicherung in den Mykorrhizen vermindern würde. Die durchweg nicht signifikanten Unterschiede zum ersten Erntetermin sollten aber nicht überbewertet werden.

Bis zur zweiten Probenahme im Oktober fielen Niederschläge, so daß die Behandlung zu einer geringeren Wasserversorgung als auf der Kontrollfläche geführt hat (Volkmer et al. 1998). Aus diesen Unterschieden kann man die Folgerung ziehen, daß unter Trockenstreß ein tendenzieller Anstieg der N-Speicherung in den Mykorrhizen erfolgte, der auf einen verminderten N-Bedarf der Pflanze zurückgeführt werden kann. Auf Grund der hohen Variabilität in diesem Feldversuch und des auch zum zweiten Erntetermin geringen Trockenstresses lassen sich die Tendenzen trotz einer Gesamtprobenzahl von 375 Mykorrhizen nur für die Herkunft Forbach statistisch absichern. Sie sind aber auch für die Herkunft Conventwald deutlich.

Die Abhängigkeit der vakuolären N-Speicherung von der Versorgung mit Kohlenhydraten wird interessanter Weise durch die Korrelation mit dem Wassernutzungskoeffizienten (WUE, Verhältnis von Nettophotosynthese zu Transpiration) der Herkünfte gestützt (Pantel et al. 1998, Buschmann et al. 1999). Die Herkunft Conventwald zeigte 1997 und 1998, die Herkunft Forbach 1998 eine verbesserte WUE unter Trockenstreß. Guehl & Garbaye (1990, 1992) fanden einen engen Zusammenhang zwischen WUE und der Effektivität der Mykorrhizierung durch unterschiedliche Pilzarten unter Trockenstreß.

Im Falle der Herkunft Forbach ist die bessere WUE mit einem längeren Hauptsproß und einer größeren Blattfläche und damit insgesamt besseren Leistungsfähigkeit gekoppelt (Pantel et al. 1998, Volkmer et al. 1997). Die Herkunft Conventwald reagierte zusätzlich mit gesteigertem Prolingehalt auf die Streßsituation (Volkmer et al. 1998).

Keine so gute Korrelation kann für die Herkunft Ravensburg hergestellt werden, die ebenfalls eine gute Photosyntheseleistung aufwies und 1997 als resisitente Variante favorisiert wurde (Pantel et al. 1998). In unseren Untersuchungen fiel zum ersten Probenahmetermin 1997 auf der Kontrollfläche eine hohe Speicherrate, allerdings mit starker Schwankung bei dieser Herkunft auf.

Die Herkünfte Überlingen und Zwiefalten werden von den anderen Arbeitsgruppen (Volkmer et al. 1998, Volkmer & Rennenberg 1999, Pantel et al. 1998, Buschmann et al. 1999) als weniger leistungsfähig eingestuft. Beide zeigten 1998 eine Abnahme der WUE unter Trockenstreß und nur eine geringe Zunahme des Prolingehalts. Tendenziell liegen sie unter der Herkunft Forbach. Zwiefalten hatte die geringste Nettophotosynthese. Diese Ergebnisse lassen sich zu dem von uns gemessenen Parameter der N-Speicherung in Beziehung setzen.

Da das Sproß-Wurzel-Verhältnis bei allen Herkünften gleich war (Volkmer et al. 1998, Volkmer & Rennenberg 1999), fiel die Größe der Pflanze in Bezug auf die Versorgung der Mykorrhizen nicht ins Gewicht. Die Speicherung von N-haltigen Reservestoffen in den einzelnen

Mykorrhizen stellte sich so als ein Faktor dar, der von den biometrischen Parametern ziemlich unabhängig war.

Schlußfolgerung

Freilandversuche sind gegenüber Laborversuchen immer mit zahlreichen Unsicherheiten belastet, die zu hohen Variabilitäten führen. Im Falle der vorliegenden Ergebnisse waren das ein relativ geringer Unterschied zwischen Behandlung und Kontrolle bezüglich des zu untersuchenden Trockenstresses und ein geringes Stickstoffangebot. Die insgesamt geringe vakuoläre Speicherung ließ nur eine eingeschränkte Unterscheidung der Buchenherkünfte zu. Die im Bereich der vakuolären N-Speicherung der Mykorrhizen gefundenen Unterschiede korrelieren aber zu Ergebnissen der Photosynthesmessungen. Die beiden Herkünfte aus dem Schwarzwald, Forbach und Conventwald, waren bezüglich der N-Speicherung unter Trockenstreß den oberschwäbischen Herkünften zumindest am Standort Conventwald überlegen.

Die vakuoläre N-Speicherung erwies sich in dieser Untersuchung als überraschend sensitiv und aussagefähig bezüglich der Sproß-Wurzel-Interaktion. Die im Vergleich zu N-Düngungsversuchen in Topfkulturen (Kottke et al. 1995) geringe Häufigkeit der Granula und die dadurch bedingte starke Schwankung, erschwerte allerdings die Auswertungen. Dieser bisher noch wenig untersuchte Parameter könnte sich nach den bisher vorliegenden Ergebnissen aber als brauchbarer Indikator insbesondere unter erhöhten N-Applikationen empfehlen.

Literatur

Agerer, R. (1987-1998) Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd

Beckmann S, Haug I, Kottke I, Oberwinkler F (1998) Stickstoffdeposition in den Mykorrhizen der Fichte. in: Raspe S, Feger KH, Zöttl HW (Hrsg.) Ökosystemforschung im Schwarzwald. Auswirkungen von atmosphärischen Einträgen und Restabilisierungsmaßnahmen auf den Wasser- und Stoffhaushalt von Fichtenwäldern. Verbundprojekt ARINUS. ecomed Verlagsges., Landsberg, S. 325-335

Bental M, Pick U, Avron M, Degani H (1990) Metabolic studies with NMR spectroscopy of the alga *Dunaliella salina* trapped within agarose beads. Eur. J. Biochem. 188: 111.116

Berger A (1998) Untersuchungen zur Speicherung von Glykogen als Reaktion auf den Anstieg der atmosphärischen CO₂-Konzentration. Zulassungsarbeit Tübingen

Berger D (1998) Der Einfluß von Kulturbedingungen und Präparation auf die Bildung metachromatischer, P und N haltiger, vakuolärer Granula im Myzel des Erbsenstrelings *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Zulassungsarbeit Tübingen

Brand, F. (1992) Mixed associations of fungi in ectomycorrhizal roots. in: Read, DJ, Lewis, DH, Fitter, AH, Alexander, IJ (eds.) Mycorrhizas in ecosystems, CAB International, Wallingford, pp. 142-147

Brun, A., Chalot, M., Duponnois R., Botton, B. (1994) Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 5: 139-144

Bühl A, Zöfel P (1998) SPSS für Windows Version 7.5, Addison-Wesley Longman Verlag, Bonn

Buschmann C, Bilke S, Pantel S, Butterer T, Enk A, Längle T, Wenzel O, Lichtenthaler HK (1999) Einfluß von Trockentreß auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) - Unterschiede in der Trockenempfindlichkeit. <http://bwplus.fzk.de/diskpef99/lichtenthaler.lichtenthaler.htm>

Chalot M, Brun A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 21-44

Cramer CL, Davis RH (1984) Polyphosphate-cation interactions in the amino acid-containing vacuole of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chemistry* 259: 5152-5157

Dürr M, Urech K, Boller Th, Wiemken A, Schwenke J, Nagy M (1979) Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* 121: 109-175

Finlay RD, Ek H, Odham G, Söderström B (1989) Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytol.* 113: 47-55

France RC, Reid CP (1983) Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Can.J. Bot.* 61: 864-984

Guehl JM, Mousain D, Falconet G, Gruez J (1990) Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L. seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. *Ann. Sci. For.* 47: 91-100

Guehl JM, Garbaye J (1990) The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water use efficiency and response of transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. *Ann. Sci. For.* 21: 551-563

Guehl JM, Garbaye J, Wartinger A (1992) The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. In: Resd DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds.) *Mycorrhizas in ecosystems*, CAB International, pp.323-332

Hampp R, Shi L, Guttenberger M (1998) Mykorrhizierung und Streßtoleranz der Buche *Fagus sylvatica* L.). <http://bwplus.fzk.de/diskpef98/hampp/hampp.htm>

Herrmann, S., Ritter, T., Kottke, I., Oberwinkler, F. (1992) Steigerung der Leistungsfähigkeit von Forstpflanzen (*Fagus sylvatica* L. und *Quercus robur* L.) durch kontrollierte Mykorrhizierung. Allg. Forst- u. J.-Ztg. 163: 72-79

Holopainen T and Heinonen-Tanski H. (1993) Effects of different nitrogen sources on the growth of Scots pine seedlings and the ultrastructure and development of their mycorrhizae. Can. J. For. Res. 23: 362-372

Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. Microbiol. Rev. 54: 266-292

Kottke (1998) Das Einmaleins des Miteinander- Pilz-Wurzel-Symbiosen. In: Der Schönbuch. Mensch und Wald in Geschichte und Gegenwart. Hrsg. Gamer-Wallert I, Lorenz S. ATTEMPTO Verlag, S. 142-152

Kottke I, Holopainen T, Alanen E, Turnau K (1995) Deposition of nitrogen in vacuolar bodies of *Cenococcum geophilum* Fr. mycorrhizas as detected by electron energy loss spectroscopy. New Phytol. 129: 411-416

Kottke, I., Oberwinkler, F. (1988) Comparative studies on the mycorrhization of *Larix decidua* and *Picea abies* by *Suillus grevillei*. Trees 2: 115-128

Kottke I, Qian XM, Pritsch K, Haug I, Oberwinkler F (1998) *Xerocomus badius*-*Picea abies*, an ectomycorrhiza of high activity and element storage capacity in acidic soil. Mycorrhiza 7: 267-275

Lewis PR, Knight DP (1977) Staining methods for sectioned material. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford

Lorenz RJ (1992) Grundbegriffe der Biometrie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Sena, New York

Miller JJ (1984) *In vitro* experiments concerning the state of polyphosphate in the yeast vacuole. Can. J. Microbiol. 30: 236-246

Orlovich, D.A., Ashford, A.E. (1993) Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Protoplasma 173: 91-102

Pantel S, Speck B, Wenzel O, Buschmann C, Lichtenthaler HK (1998) Einfluß von Trockenstreß auf Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) <http://bwplus.fzk.de/diskpef98/lichtenthaler/lichtenthaler.htm>

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal Symbiosis. 2 nd ed., Academic Press, San Diego, London ect. ISBN 0-12-652840-3

Volkmer C, Weber P, Rennenberg H (1997) Untersuchungen zur Streß-Sensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). I. Versuchsaufbau und Zielsetzung des Conventwald-Projekts. FZKA-PEF 153: 93-109, Forschungszentrum Karlsruhe

Volkmer C, Eiblmeier M, Weber P, Rennenberg H (1998) Untersuchungen zur Streß-Sensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). II. Erste Ergebnisse aus dem Conventwaldprojekt. <http://bwplus.fzk.de/diskpef98/rennenberg/rennenberg.htm>

Volkmer C, Rennenberg H (1999) Untersuchungen zur Streß-Sensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). III. Ergebnisse des Dachexperiments Conventwald. <http://bwplus.fzk.de/diskpef98/rennenberg/rennenberg.htm>

Wingler A, Wallenda T, Hampp R (1996) Mycorrhiza formation on Norway spruce (*Picea abies*) roots affects the pathway of anaplerotic CO₂ fixation. *Physiologia Plantarum* 96: 699-705