

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Mykorrhizierung und Stresstoleranz von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.): "Conventwaldprojekt"

von

R. Hampp, L. Shi, M. Guttenberger, U. Nehls

Institut für Botanik, Physiologische Ökologie der Pflanzen
Universität Tübingen

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

Förderkennzeichen: PEF 1 96007

Dezember 1999

Mykorrhizierung und Stresstoleranz von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.): "Conventwaldprojekt"

R. HAMPP, L. SHI, M. GUTTENBERGER, U. NEHLS
Institut für Botanik, Physiologische Ökologie der Pflanzen
Universität Tübingen (Förderkennzeichen: PEF 1.96.007)

Zusammenfassung

In einer Fallstudie (Conventwald, nahe Freiburg) wurde als Teil eines Gemeinschaftsprojektes der Universitäten Freiburg, Karlsruhe und Tübingen der Einfluss von Trockenstress auf verschiedene Ökotypen 7 (1997) bis 8 Jahre (1998) alter Buchen aus verschiedenen Regionen Baden-Württembergs (unterschiedliche Standorts- und Klimabedingungen) untersucht. Trockenstress-Bedingungen wurden dabei durch eine 3-monatige Überdachung (Mitte Juli bis Mitte Oktober) der im Freiland exponierten Jungbäume induziert. Ziel des hier vorgestellten Teilprojektes war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Art, Umfang und physiologischem Zustand der Pilz-Baumwurzel-Symbiose (Ektomykorrhiza) und der Trockenstress-Sensitivität der verschiedenen Ökotypen zu erkennen. Dabei zeigte es sich, dass es in zwei aufeinander folgenden Vegetationsperioden aufgrund klimatischer Unterschiede, und evtl von Anpassungsmechanismen der Wirtspflanzen, zu differenzierbaren Antworten auf die Behandlungsbedingungen kam. Von den 8 aufgrund morphologischer und molekulargenetischer Merkmale im Jahr 1997 identifizierten Mykorrhizotypen (*Byssocorticium atrovirens*, *Cenococcum geophilum*, *Fagihiza spinulosa*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius subdulcis*, *Russula ochroleuca*, *Sphaerozone ostiolatum*, *Xerocomus chrysenteron*) waren 3 (*B. atrovirens*, *L. subdulcis* und *X. chrysenteron*) auf der Kontroll- und der Testfläche in einem Umfang vertreten, der eine vergleichende Untersuchung ermöglichte. Von diesen waren *B. atrovirens* und *L. subdulcis* auf beiden Flächen und in bezug auf die verschiedenen Ökotypen der Buche in ähnlicher Weise verteilt. Im Gegensatz dazu war *X. chrysenteron* auf der Testfläche eindeutig häufiger und stellte im Mittel 41 % der Mykorrhizen im Vergleich zu 24 % auf der Kontrollfläche. Ein Vergleich biometrischer Parameter (VOLKMER et al. 1998) mit der Art der Mykorrhizierung zeigt, dass der lokale Ökotyp "Conventwald" unter dem applizierten Trockenstress am stärksten litt und dass diese erhöhte Sensitivität mit dem Fehlen des offensichtlich Trockenstress-toleranteren Mykorrhizotyps korreliert war. 1998 waren lediglich *L. subdulcis* und *X. chrysenteron* in einem Umfang vertreten, der eine biochemische Analyse ermöglichte. Wir nehmen daher an, dass zwischen Mykorrhiza-Typ und Trockenstress der Wirtspflanze ein enger Zusammenhang besteht.

Ein detaillierte Analyse pilzlicher und pflanzlicher Kohlenhydrate und Zuckeralkohole ergab die folgenden, interessanten Beobachtungen: In der Vegetationsperiode 1997, die mit starken Stresssymptomen auf den Behandlungsfläche verbunden war, kam es zu teilweise starken Einbrüchen im Gehalt an Speicherpolysacchariden in den Wurzeln der verschiedenen Klone (besonders Conventwald und Zwiefalten), sehr wahrscheinlich eine Folge der verringerten Nettophotosyntheserate der Buchen. Dies hatte auch in den meisten Fällen eine deutlich schlechter Kohlenhydratversorgung der Mykorrhizen zur Folge. 1998 ergab sich eine wesentlich

„physiologischere Situation“: Die Kohlenhydratversorgung der Wurzeln der stressexponierten Pflanzen war deutlich weniger beeinträchtigt, eine Folge der kaum verringerten Nettphotosyntheserate (Buschmann et al. 1999). Die einem negativeren Wasserpotential des Bodens ausgesetzten Mykorrhizen konnten unter diesen Bedingungen mit einer deutlichen, Spezies-spezifischen Anreicherung von osmotisch aktiven Zuckeralkoholen reagieren und sich damit offensichtlich vor Schäden schützen. Als Folge davon waren nur minimale Wachstumsveränderungen der stressexponierten Pflanzen zu beobachten (Volkmer et al. 1999). In der Zusammenschau belegen die Daten, dass sich Trockenstress bei Buchen offensichtlich durch die Etablierung besonders gut adaptierter Pilz/Wirt-Kombinationen verringern lässt.

Mycorrhization and Stress Tolerance of Ecotypes of Beech (*Fagus sylvatica* L.): "Conventwald" - Project

R. HAMPP, L. SHI, M. GUTTENBERGER, U. NEHLS

Summary

In a case study (Conventwald, near Freiburg, Germany) the effect of drought stress on different ecotypes of 7-year-old beech trees was investigated with regard to type and degree of mycorrhization and stress tolerance. The ecotypes originated from different areas of Baden-Württemberg and represented different types of stand and climate. Conditions of drought stress were created during two subsequent vegetation periods (1997, 1998) by covering one plot with a roof for the duration of approx. 3 months (mid of July until mid of October). Based on morphology and sequence analysis of DNA (ITS and NL primers) we identified 8 different types of ectomycorrhiza in 1997 (*Byssocorticium atrovirens*, *Cenococcum geophilum*, *Fagihiza spinulosa*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius subdulcis*, *Russula ochroleuca*, *Sphaerozone ostiolatum*, *Xerocomus chrysenteron*). Of these, three (*B. atrovirens*, *L. subdulcis*, *X. chrysenteron*) had an abundance which was sufficient for a comparative analysis. Out of this group, *B. atrovirens* and *L. subdulcis* were comparably distributed within both uncovered and covered plots. In contrast, *X. chrysenteron* represented a considerably higher percentage of all mycorrhizas on the stressed plot (41 % compared to 24 % for the control plot). A comparison of these data with a biometric analysis (VOLKMER et al. 1998) shows an interesting coincidence. The local ecotyp "Conventwald" which suffered most under the applied drought stress did not have the obviously more drought-tolerant *X. chrysenteron* type of mycorrhiza. We thus suggest a correlation between type of beech ectomycorrhiza and drought stress tolerance of the host.

A detailed analysis of plant and fungal carbohydrates and sugar alcohols indicated differences in stress responses between 1997 and 1998. In 1997, where drought stress was severe, reserve polysaccharides in roots, starch and glycogen, were decreased. This was most severe in the clones Conventwald and Zwiefalten and could be related to a respective decrease in net photosynthesis (Buschmann et al. 1998). The 1998 treatment caused a different physiological situation. During this trial carbon allocation toward the root system was less affected, and this coincided with minor decreases of rates of net photosynthesis (Buschmann et al. 1999). Under these conditions the dominating beech mycorrhizas (*Xerocomus chrysenteron*, *Lactarius subdulcis*) responded to the more negative soil water potential with the accumulation of compatible solutes in a species-specific manner: *Xerocomus chrysenteron* accumulated large amounts of arabitol while in the case of *Lactarius subdulcis* it was mannitol. This was balanced by a decrease of the pool sizes of polysaccharides. Stress-adapted mycorrhizas coincided with only minor growth reductions of the host plants. We conclude that well adapted fungus/beech combinations help in coping with drought stress.

1 Einleitung

Die in den letzten Jahren beobachtete Zunahme von Laubverlusten bei Buche und Eiche führte zu der Annahme, dass Laubholzbestände verstärkt durch Veränderungen in den Standortbedingungen beeinträchtigt werden. Wichtige Parameter sind hier vor allem Stickstoff-Eintrag und Wasserversorgung.

In einer Fallstudie wurde 1991 unter Leitung der FVA Freiburg am Beispiel des Conventwaldes damit begonnen, den Einfluss anthropogen verursachter Stoffeinträge auf Stoff-Flüsse in Misch- und Reinbeständen von Buche und Fichte zu untersuchen. Diese Arbeiten wurden in Bezug auf Buche (vorhandene Bestände und etwa 7 bis 8 Jahre alte, ausgebrachte Jungpflanzen) durch stressphysiologische Untersuchungen erweitert, die sich vor allem auf die Wirkung von Trockenstress auf biochemische Stressparameter (AG Rennenberg) und auf den Bereich Gaswechsel/Photosynthese (AG Lichtenthaler) beziehen. Der Wurzelraum als wichtige Kontaktfläche zwischen Boden (Wasser-, Nährstoffangebot) und Pflanze wurde zunächst weitgehend ausgeklammert, ist aber für die Interpretation der anderen Befunde (Stressparameter, Gaswechsel, Zuwachs etc.) von wesentlicher Bedeutung.

Buchen gehen mit ihren Feinwurzeln obligat Symbiosen (Ektomykorrhizen) mit Bodenpilzen ein. Man kann davon ausgehen, dass diese Symbiosen nicht nur wesentlich sind für die Nährstoffversorgung der Wirtspflanze (SMITH und READ 1997), sondern aufgrund der grossen resorptiven Oberfläche auch deren Wasserversorgung verbessern. Dies sollte besonders bei zunehmendem Wassermangel im Boden von Bedeutung sein. Da Buchen mit vielen verschiedenen Bodenpilzen Ektomykorrhizen bilden können, ist zu erwarten, dass es bei sich verändernden Bodenbedingungen auch zu einer veränderten Abundanz bestimmter Pilz-Wurzel-Kombinationen kommt.

Im vorliegenden Projekt wurde daher ab August 1997 in enger Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen (Probennahme etc.) die Wurzelphysiologie von 5 Ökotypen der Buche in Abhängigkeit von experimentell herbeigeführter, unterschiedlicher Wasserversorgung untersucht. Dazu wurden zunächst Art und relativer Umfang der Mykorrhizierung der Feinwurzeln bestimmt. Die morphologische Ansprache der Mykorrhizen wurde z.T. über die Vergleiche von Nukleotidsequenzen präparierter Mykorrhizen mit denen bekannter Ektomykorrhizapilze verifiziert. Über die Bestimmung von Poolgrössen pilz- und pflanzenspezifischer Zuckeralkohole und Kohlenhydrate, die auch eine Funktion als Regulatoren des osmotischen Potentials der Zellen haben, konnten zusätzlich Aussagen zur Physiologie der Mykorrhizen gemacht werden.

Die Daten zeigen, dass bestimmte Pilz-Buchenklon-Kombinationen Trockenstress besser tolerieren als andere.

2 Methoden

2.1 Exposition der Versuchspflanzen und Probennahme

Die Betreuung der Versuchspflanzen und die Erarbeitung der experimentellen Vorgaben (Versuchskonzept) erfolgte durch die Universität Freiburg, Professur für Baumphysiologie. Trockenstress wurde 1997 (10.7. bis 13.10.) und 1998 (1.7. bis 30.9.) mit Hilfe parzellenbezogener Kleindächer künstlich induziert. Stammabflusswasser älterer Bäume im Bestand wurde abgefangen, das Eindringen von Bodenoberflächenwasser durch den Einsatz von Folien oberhalb der Versuchsflächen verhindert (VOLKMER 1999). Beprobungen fanden 1997 Ende August (25.-29.) und Anfang Oktober (9.-12.), 1998 nur am Ende des Versuchszeitraumes statt. Dazu wurden gemeinsam mit der Freiburger Arbeitsgruppe von den 5 Buchenklonen (Conventwald, Überlingen, Ravensburg, Forbach und Zwiefalten) statistisch verteilt jeweils 6 Individuen entnommen. Die Proben wurden auf Eis ins Labor transportiert, gewaschen und unmittelbar danach auf Eis mikroskopiert. Aliquots wurden entnommen und für molekulargenetische und biochemische Analysen eingefroren.

Die Standorts- und Klimadaten zur Herkunft der verschiedenen Ökotypen sind in VOLKMER (1999) zusammengefasst. Hier sind auch die Versuchsbedingungen detailliert dargestellt.

2.2. Art und Umfang der Mykorrhizierung

Zur morphologischen Identifizierung und prozentualen Abschätzung des Umfangs der Mykorrhizierungsgrades wurden die Wurzelproben nach der Beprobung auf Eis mikroskopiert. Nach einer groben Vorsortierung wurden Aliquots für eine exakte Bestimmung (Mykorrhiza-Atlas (AGERER 1995); DNA-Analyse) entnommen.

Die molekulargenetische Identifizierung der Mykorrhiza-Pilze erfolgte auf der Basis von Sequenzvergleichen von DNA-Abschnitten, die für ribosomale RNA kodieren. Dazu wurde DNA aus gefrorenen Mykorrhizen nach Homogenisation in flüssigem N₂ mit 500 µl eines 50 mM TRIS-Puffers (pH 8, mit EDTA, SDS; vgl. HENRION et al. 1992) extrahiert (1 h bei RT). Die unlöslichen Bestandteile wurden pelletiert (14.000 g; RT; 15 min) und der Überstand für 1 h mit 10 U RNase A bei 37°C inkubiert. DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M Na-Acetat und 1 ml kaltem Ethanol präzipitiert und nach 30 min/4°C pelletiert (14.000 g/10 min). Die DNA wurde in 50 µl doppelt destilliertem Wasser gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zur Identifikation der pilzlichen Symbionten auf dem Niveau der Species wurden mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) die durch die Primer ITS1, ITS4, ITS1f und ITS4b gekennzeichneten rDNA-Abschnitte amplifiziert (vgl. WHITE et al. 1990; BRUNS et al. 1992). Die Identifikation auf dem Niveau der Familie/Gattung/Art erfolgte über die mittels der Primer NL1 und NL4 amplifizierten Bereiche der 28S-Untereinheit der rRNA.

Die Identifikation der durch die Primer erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch Analyse der DNA-Sequenz mit Hilfe eines ABI-Sequenzers (373A DNA sequencer, Perkin Elmer; ABI

PRISM; dye terminator cycle sequencing ready reaction kit, Fa. Perkin Elmer). Die Auswertung der Sequenziergele wurde mit gerätespezifischer Software durchgeführt.

Zur Identifikation der Pilze und ihrer phylogenetischen Verwandtschaft wurden die Programme Clustal W (multipler Sequenzvergleich) und BLASTN (NCBI; aus dem Internet; Berechnung der Sequenzähnlichkeit) verwendet. Eine Sequenzidentität von mehr als 95% kennzeichnet eng verwandte Gattungen bzw. Arten.

2.3. Bestimmung der Inhaltsstoffe

Alle Analysen wurden an Wurzelproben/Mykorrhizen durchgeführt, die nach Homogenisation in gefrorenem Zustand (fl. Stickstoff) homogenisiert (Mikrodismembrator, Braun, Melsungen) und anschliessend gefriergetrocknet worden waren. Die Quantifizierung von Stärke/Glycogen erfolgte enzymatisch (OUTLAW und MANCHESTER 1979), die der löslichen Zucker und Zuckeralkohole nach Extraktion in 65% Äthanol mittels HPLC (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie; SCHAEFFER et al. 1995).

Ergosterin, als Marker pilzlicher Membranen, wurde nach Extraktion mit reinem Äthanol ebenfalls über HPLC bestimmt (SCHAEFFER et al. 1995).

3 Ergebnisse

3.1 Auf den Flächen identifizierte Pilzpartner

In der Tabelle 1 sind die auf den Flächen aufgrund morphologischer und molekularer Merkmale identifizierten Mykorrhiza-Pilze zusammengefasst. Generell fiel auf, dass die Mykorrhizierung der Feinwurzeln sehr unterschiedlich war und dass die Zahl verschiedener Mykorrhizen am Wurzelsystem einer individuellen Buche stark variierte. Wir nehmen dies als Hinweis darauf, dass die verschiedenen Buchenklone auch untereinander möglicherweise unterschiedlichen Bodenverhältnissen ausgesetzt waren und dass diese Variabilität durch die lange Trockenperiode vor Versuchsbeginn noch verstärkt wurde.

Tabelle 1. Identifizierte Buchenmykorrhizen

<i>Byssocorticium</i> c.f. <i>atrovirens</i>	<i>Lactarius</i> c.f. <i>subdulcis</i>
<i>Cenococcum</i> <i>geophilum</i>	<i>Russula</i> <i>ochroleuca</i>
<i>Fagihiza</i> <i>spinulosa</i>	<i>Sphaerozone</i> <i>ostiolatum</i>
<i>Laccaria</i> <i>amethystina</i>	<i>Xerocomus</i> c.f. <i>chrysenteron</i>

3.2 Vergleich der Häufigkeiten des Auftretens (1997)

In Tabelle 2 sind die in der 2. Probennahme (1997; Ende des Vergleichs ohne / mit Ausschluss einer Zufuhr von Niederschlagswasser) identifizierten Mykorrhizen für die beiden Flächen und die verschiedenen Buchenklone zusammengefasst. Wegen der Heterogenität der Proben wurde nur die Verteilung der Buchenmykorrhizen genauer analysiert, die am häufigsten vorkamen, nämlich die mit den Pilzpartnern *Byssocorticium c.f. atrovirens*, *Lactarius c.f. subdulcis* und *Xerocomus c.f. chrysenteron* (Tab. 3).

Tab. 2. Vorkommen von Mykorrhizen in Abhängigkeit von verschiedenen Buchenklonen und der Behandlung (Kontrolle: nicht abgedeckt; Testpflanzen: abgedecktes Areal). Die Daten stammen aus der Probennahme beim Abschluss des Experiments. Zu Beginn des Trockenstress-Experiments waren keine Unterschiede in der Verteilung zu erkennen. (Nummer: Identifizierung individueller Jungpflanzen; %: geschätzter Anteil aller an einem Wurzelsystem vorgefundenen Mykorrhizen)

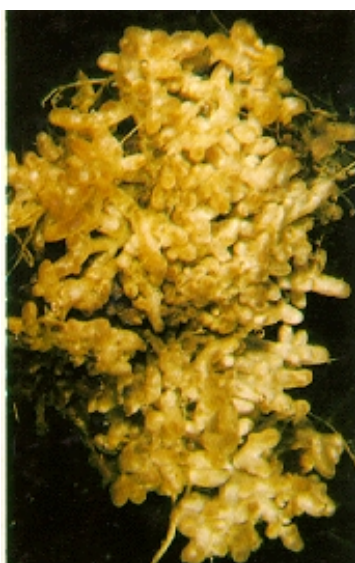
Klon / Nummer	Kontrolle	Anteil (%)	Nr.	Testpflanzen	Anteil (%)
Conventwald / 120	<i>Lactarius subdulcis</i>	90	227	<i>Cenococcum geoph.</i>	50
387	<i>Lactarius subdulcis</i>	30		<i>Byssocorticium atrovir.</i>	25
	<i>Fagihiza spinulosa</i>	30	128	<i>Lactarius subdulcis</i>	80
	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	10		<i>Russula ochroleuca</i>	10
	<i>Sphaerozone ostiolatum</i>	10	495	<i>Fagihiza spinulosa</i>	40
565	n.d.	98		<i>Lactarius subdulcis</i>	30
Überlingen / 409	n.d.	60	6A	n.d.	50
	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	10		<i>Xerocomus chrysent.</i>	30
191	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	60		<i>Byssocorticium atrovir.</i>	15
			78	<i>Xerocomus chrysent.</i>	75
			206	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	50
Ravensburg / 364	<i>Xerocomus chrysent.</i>	25	234	<i>Xerocomus chrysent.</i>	90
	n.d.	60	224	<i>Xerocomus chrysent.</i>	30
571				n.d.	30
480	<i>Xerocomus chrysent.</i>	40		n.d.	30
	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	30	267	<i>Lactarius subdulcis</i>	75
				<i>Xerocomus chrysent.</i>	15
			527	n.d.	40
				<i>Xerocomus chrysent.</i>	15
				<i>Laccaria amethystina</i>	15
Forbach / 256	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	20	200	<i>Lactarius subdulcis</i>	40
66	<i>Lactarius subdulcis</i>	90		<i>Byssocorticium atrovir.</i>	30
47	<i>Lactarius spec</i>	80	356	verschiedene, nichts dominierend	
504	<i>Laccaria amethystina</i>	40			
	<i>Sphaerozone ostiolatum</i>	10			
390	n.d. (wie 409-1)	90			
593	<i>Byssocorticium atrovir.</i>	30			
	<i>Lactarius subdulcis</i>	20			
	<i>Sphaerozone ostiolatum</i>	20			

Zwiefalten / 167	n.d. (wie 124-1)	25	308	Byssocorticium atrovir.	60
93	Xerocomus chrysenteron	20	124	n.d. (rusty)	70
	Lactarius subdulcis	20		Lactarius subdulcis	25
	Russula ochroleuca	15	556	n.d. (rusty)	60
	Byssocorticium atrovir.	10		Xerocomus chrysenteron	30
583	verschiedene, wenig				
533	Byssocorticium atrovir.	75			
	Lactarius subdulcis	10			

Tab. 3. Verteilung der dominierenden Mykorrhizen zwischen den Versuchsflächen. Auf der Kontrollfläche wurde das Wurzelsystem von 18, auf der Testfläche von 15 Buchen untersucht (Werte \pm Standardabweichung; die Werte in () geben die Anzahl von Wurzelsystemen mit dem jeweiligen Pilzpartner an).

Mykorrhiza-Partner	Kontrollfläche Anteil in %		Testfläche (Trockenstress) Anteil in %	
	der mit dem betr. Pilz myk. Buchen	aller Buchen	der mit dem betr. Pilz myk. Buchen	aller Buchen
Lactarius c.f. subdulcis	50 \pm 35 (7)	19	50 \pm 26 (5)	17
Byssocorticium c.f. atrovirens	34 \pm 25 (7)	13	36 \pm 19 (5)	12
Xerocomus c.f. chrysenteron	24 \pm 12 (4)	5	41 \pm 29 (7)	19

Abb.1. Zwei der am häufigsten vorgefundenen Mykorrhizen, von denen die mit *Lactarius subdulcis* keine, die mit *Xerocomus chrysenteron* eine Reaktion auf Trockenstress zeigte.



*Xerocomus
chrysenteron*



*Lactarius
subdulcis*

Ein Vergleich der Häufigkeit dieser drei Mykorrhizen (vgl. Abb. 1 für *Lactarius subdulcis* und *Xerocomus chrysenteron*) in Bezug auf die jeweilige Pflanze und in Bezug auf alle untersuchten

Pflanzen einer Behandlungsvariante (Tab. 3) zeigte interessante Unterschiede. Während, trotz der sehr variablen Verteilung, die Mittelwerte der Häufigkeit (%) für *Byssocorticius atrovirens* und *Lactarius subdulcis* für beide Behandlungen fast identisch sind, zeigt *Xerocomus chrysenteron* auf der "noch trockneren" Fläche (überdachtes Areal) prozentual einen deutlich höheren Anteil.

3.3 Molekulargenetische Identifizierung der Mykorrhizen

In Fällen, in denen Mykorrhizen aufgrund morphologischer Merkmale nicht eindeutig zuzuordnen waren, versuchten wir über einen Vergleich von Nukleotidsequenzen (für ribosomale RNA kodierenden DNA-Abschnitte; ITS-Primer) eine Zuordnung zu erreichen. Abb. 2 und 3 zeigen die Ergebnisse eines Vergleichs der betreffenden Nukleotid-Sequenz der unbekanntem Pilz-DNA mit den in einer Datenbank (NCBI; National Library of Medicine, USA; Database Service: BLAST, basic local alignment search tool) gespeicherten Sequenzen von Pilz-DNAs. In Abb. 2 sind die Suchergebnisse nach abnehmender Übereinstimmung geordnet (höchste "score"-Zahl bzw. niederster E-Wert (variiert von 0 bis 1) = höchste Übereinstimmung). Im gewählten Beispiel handelt es sich bei dem zu identifizierenden Pilz sehr wahrscheinlich um *Tomentella ramosissima*. Abb. 3 zeigt die für diesen Pilz ermittelte, Übereinstimmung der Nukleotidsequenz für den DNA-Abschnitt, der für die 5,8 S ribosomale RNA kodiert.

Abb. 2. rDNA-Sequenzvergleich einer unbekanntem Probe mit den in einer Datenbank (NCBI, USA) abgespeicherten Sequenzen (Software: BLASTN)

Sequences producing significant alignments:					Score (bits)	E Value
gi	1857511	gb	U83480	TRU83480	Tomentella ramosissima ITS1, 5.8S...	1259 0.0
gi	1857513	gb	U83482	TSU83482	Tomentella sp. 'LT56' Tomentella ...	827 0.0
gi	1857514	gb	U83483	TCU83483	Tomentella cinerascens ITS1, 5.8S...	811 0.0
gi	1857498	gb	U83467	TSU83467	Thelephoraceae sp. 'Taylor #2' IT...	799 0.0
gi	1857502	gb	U83471	TSU83471	Thelephoraceae sp. 'Taylor #9' IT...	761 0.0
gi	1857503	gb	U83472	TSU83472	Thelephoraceae sp. 'Taylor #5' IT...	755 0.0
gi	1857501	gb	U83470	TSU83470	Thelephoraceae sp. 'Taylor #6' IT...	730 0.0
gi	1857508	gb	U83477	TSU83477	Thelephoraceae sp. 'Taylor #12' I...	720 0.0
gi	1857507	gb	U83476	TSU83476	Thelephoraceae sp. 'Taylor #7' IT...	686 0.0
gi	1857506	gb	U83475	TSU83475	Thelephoraceae sp. 'Taylor #11' I...	672 0.0
gi	1857500	gb	U83469	TSU83469	Thelephoraceae sp. 'Taylor #10' I...	668 0.0
gi	1930068	gb	U92537	TSU92537	Tomentella sp. 'LT97' ITS1, 5.8S ...	666 0.0
gi	1857497	gb	U83466	TSU83466	Thelephoraceae sp. 'Taylor #3' IT...	632 e-179
gi	1857504	gb	U83473	TSU83473	Thelephoraceae sp. 'Taylor #1' IT...	630 e-179
gi	1857510	gb	U83479	TSU83479	Thelephoraceae sp. 'Taylor #8' IT...	630 e-179
gi	1857499	gb	U83468	TSU83468	Thelephoraceae sp. 'Taylor #4' IT...	615 e-174
gi	1857509	gb	U83478	TSU83478	Thelephoraceae sp. 'Taylor #13' I...	613 e-173
gi	1857518	gb	U83487	TAU83487	Thelephora americana ITS1, 5.8S r...	583 e-164
gi	1857512	gb	U83481	TSU83481	Tomentella sublilacina ITS1, 5.8S...	571 e-161
gi	1857505	gb	U83474	TSU83474	Thelephoraceae sp. 'Taylor #14' I...	545 e-153
gi	1857515	gb	U83484	TPU83484	Thelephora penicillata ITS1, 5.8S...	517 e-145
gi	1857517	gb	U83486	TTU83486	Thelephora terrestris ITS1, 5.8S ...	515 e-144
gi	1857516	gb	U83485	TRU83485	Thelephora regularis ITS1, 5.8S r...	359 3e-97
gi	2289056	gb	U66448	OOU66448	Omphalina obscurata small subunit...	287 8e-76
gi	2289040	gb	U66429	ALU66429	Arrhenia lobata small subunit rib...	285 3e-75
gi	2289039	gb	U66428	AAU66428	Arrhenia auriscalpium small subun...	285 3e-75
gi	608487	gb	U15973	VVU15973	Volvariella volvacea 5.8S rRNA gen...	281 5e-74
gi	2289055	gb	U66447	OLU66447	Omphalina luteovitellina small su...	281 5e-74
gi	2289051	gb	U66445	OEU66445	Omphalina ericetorum small subuni...	278 8e-73
gi	2612843	gb	U63476	TBU63476	Trichaptum bifforme 18S ribosomal ...	274 1e-71

gi	2612842	gb	U63473	TBU63473	Trichaptum biforme 18S ribosomal ...	274	1e-71
gi	1002764	gb	U33082	LNU33082	Lentinula novaehollandiae isolate ...	274	1e-71
gi	1002755	gb	U33073	LLU33073	Lentinula lateritia isolate DSH 9...	274	1e-71
gi	1002763	gb	U33081	LNU33081	Lentinula novaehollandiae isolate ...	274	1e-71
gi	1002762	gb	U33080	LEU33080	Lentinula edodes isolate TMI-1148...	274	1e-71
gi	2351601	gb	U85318	LHU85318	Leucoagaricus hortensis internal ...	272	5e-71
gi	1785799	emb	Y08749	PA383858S	P.avenae 5.8S rRNA gene, strain...	272	5e-71
gi	2351602	gb	U85319	LHU85319	Lepiota humei internal transcribe...	272	5e-71
gi	2351620	gb	U85337	CMU85337	Chlorophyllum molybdites internal...	272	5e-71
gi	2351595	gb	U85312	MRU85312	Macrolepiota rachodes internal tr...	272	5e-71
gi	2351611	gb	U85328	LAU85328	Lepiota acutesquamosa internal tr...	270	2e-70
gi	2289066	gb	U66436	PGU66436	Phaeotellus griseopallidus small ...	270	2e-70
gi	1002752	gb	U33070	LLU33070	Lentinula lateritia isolate DSH 9...	268	8e-70
gi	1785800	emb	Y10236	PADNASPA	P.avenae 28S rRNA, 18S rRNA & 5....	268	8e-70
gi	1002767	gb	U33085	LLU33085	Lentinula lateritia isolate TMI-1...	266	3e-69
gi	2351617	gb	U85334	CCU85334	Coprinus comatus internal transcr...	266	3e-69
gi	2921	emb	X63130	LERRNAITS	L.edodes 5.8S rRNA gene	266	3e-69
gi	1002772	gb	U33090	LLU33090	Lentinula lateritia isolate TMI-6...	266	3e-69
gi	2289046	gb	U66435	HCU66435	Hygrocybe citrinopallida small su...	266	3e-69
gi	2351594	gb	U85311	MCU85311	Macrolepiota colombiana internal ...	264	1e-68

Abb. 3. rDNA-Sequenzvergleich. Im Beispiel ist ein Sequenzvergleich der Pilz-DNA aus Abb. 2 mit der von *Tomentella ramosissima* dargestellt.

```

gi|1857511|gb|U83480|TRU83480 Tomentella ramosissima ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and ITS2,
complete sequence
Length = 687

Score = 1259 bits (635), Expect = 0.0
Identities = 657/662 (99%), Positives = 657/662 (99%), Gaps = 2/662 (0%)

Query: 1 tccgtaggtgaaccctgcggaaggatcattaccgaaccgctgacacgagttggtgctggt 60
      |||
Sbjct: 28 tccgtaggtgaacc-tgcggaaggatcattactgaaccgctgacacgagttggtgctggt 86

Query: 61 ctccaaacgggggcatgtgcacgctctgtttgtgcatccactcacacctgtgcacettct 120
      |||
Sbjct: 87 ctccaaacgggggcatgtgcacgctctgtttgtgcatccactcacacctgtgcacettct 146

Query: 121 gtagttctgtggctgggggactcgtcctcctgctgtggttctgctctttacactcacgc 180
      |||
Sbjct: 147 gtagttctgtggctgggggactcgtcctcctgctgtggttctgctctttacactcacgc 206

Query: 181 tgtgataaagtctaataatggaatgcatgccgcggtttaacgcaataacaatacaactttcagca 240
      |||
Sbjct: 207 tgtgataaagtctaataatggaatgcatgccgcggtttaacgcaataacaatacaactttcagca 266

Query: 241 acggatctcttggtctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaaatgtgaa 300
      |||
Sbjct: 267 acggatctcttggtctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaaatgtgaa 326

Query: 301 ttgcagaattcagtgaaatcatcgaatctttgaacgcaccttgccgctttggctattccg 360
      |||
Sbjct: 327 ttgcagaattcagtgaaatcatcgaatctttgaacgcaccttgccgctttggctattccg 386

```

```

Query: 361 aagggcatgcctgtttgagtatcatgaacatctcaactcctcacggttcgcccgtgatga 420
          |||
Sbjct: 387 aagggcatgcctgtttgagtatcatgaacatctcaactcctcacggttcgcccgtgatga 446

Query: 421 gcttggactttgggggtcttgccggcctgcgggtcggctcctctcaaatgaatcagcttg 480
          |||
Sbjct: 447 gcttggactttgggggtcttgccggcctgcaggctcggctcctctcaaatgaatcagcttg 506

Query: 481 ccggtgtttggtggcgtcacaggtgtgataactatctacgcttgggtttccgccaggt 540
          |||
Sbjct: 507 ccggtgtttggtggcgtcacaggtgtgataactatctacgcttgggtttccgccaggt 566

```

Auf dieser Grundlage haben wir mit Material der Probennahme 1998 versucht, die Pilzpartner der dominierenden Mykorrhizen, *L. subdulcis*, *B. atrovirens* und *X. chrysenferon*, zu identifizieren und mittels quantitativer PCR mengenmässig zu erfassen.

3.4 Identifikation/Quantifizierung von Symbiosepilzen in Wurzelsystemen mit molekularen Methoden

Die bereits unter 3.3 angesprochene Amplifikation der, für einen gegebenen Organismus charakteristischen ITS-Region der genomischen DNA wird heute routinemässig in vielen Labors zur Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen eingesetzt. Soll neben der reinen Identifikation des Pilzpartners auch dessen mengenmässiges Vorkommen in einem Wurzelsystem bestimmt werden, muss diese Methode quantifizierbar sein. Da es dazu noch kaum Arbeiten gibt, haben wir versucht, diese neue Technik in das Projekt einzubringen. Dabei sind wir wie folgt vorgegangen: Es wurden Spezies-spezifische Primer entworfen, die die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 594 (*X. chrysenferon*), 496 (*B. atrovirens*) und 476 bp (*L. subdulcis*) erlauben. Mit Hilfe dieser Primerpaare wird aus einem Gemisch genomischer DNA verschiedener Spezies selektiv die ITS-Region nur einer Spezies amplifiziert. Zur Quantifizierung der ITS-DNA, die mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert wird, müssen in den Reaktionsansatz DNA-Standards zugegeben werden, deren DNA-Gehalt bekannt ist und die Eigenschaften haben, die denen der zu bestimmenden DNA-Fragmente möglichst ähnlich sind. Dazu wurden aus den betreffenden Fragmenten mit geeigneten Restriktionsenzymen Abschnitte mit einer Länge von 90 bp herausgeschnitten. Die entsprechend gekürzten DNA-Fragmente werden entsprechend der Original-DNA amplifiziert, lassen sich durch ihr verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese jedoch klar von der Original-DNA unterscheiden. Setzt man nun definierte Mengen dieser DNA dem unbekanntem Extrakt (z.B. DNA aus Gesamtwurzelsystemen) zu, kommt es zu einem Konkurrenzverhalten (Kompetition) zwischen Original-DNA und gekürzter DNA um die Amplifikation durch die DNA-Polymerase, d.h. je mehr Standard zugegeben wird, desto weniger DNA aus der Probe wird amplifiziert. Solange sich die Amplifikationsrate im linearen Bereich befindet, bleibt die Menge an Amplifikationsprodukt der Proben-DNA konstant und die der Standard-DNA steigt mit zunehmender Kopienzahl an. Dabei wird eine Konzentration erreicht, bei der die Banden beider Amplifikationsprodukte gleich intensiv sind, d.h. die Kopienzahl der Standard-DNA

entspricht der der unbekanntes Proben-DNA. Wird der lineare Bereich überschritten, nimmt die Intensität der Bande der Proben-DNA mit steigender Standard-DNA-Menge ab.

Das Prinzip der Messung ist in Abb. 4 an einem praktischen Beispiel dargestellt. Die Kopienzahl des aus *L. subdulcis* amplifizierten DNA-Fragments mit einer Länge von 476 bp bleibt mit zunehmender Menge des um 90 bp verkürzten Standards (386 bp) zunächst konstant. Dabei wird eine Kopienzahl erreicht, bei der die Intensität der Standard-DNA-Bande derjenigen der Probe entspricht. Über eine photometrische Ausmessung der (fluoreszierenden) Banden und nach Korrektur für die massenabhängige Fluoreszenz ergibt sich in diesem Beispiel, dass die Intensität beider Reihen von Banden bei einer Anzahl von 238 Kopien der Standard-DNA identisch ist, also 238 Kopien des DNA-Fragments von *Lactarius subdulcis* im Extrakt vorhanden waren. Nach Überschreiten des linearen Bereichs, kommt es zur Konkurrenz zwischen beiden DNA-Fragmenten: die Intensität der Bande der Proben-DNA nimmt ab, die der Standard-DNA zu (Abb. 4; die 3 Spuren links vor der rechten Marker-Reihe).

In Abb. 5 ist das Verhältnis der Fluoreszenz von Probe (DNA-Fragment von *L. subdulcis*; immer in der selben Konzentration zugegeben) zu Standard (in steigender Konzentration) gegen die Kopienzahl des Standards logarithmisch aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der x-Achse identifiziert die Standard-Konzentration, die der DNA-Menge der Probe entspricht (Verhältnis = 1:1; $\log 1 = 0$). Die Methode funktioniert mit allen 3 Pilzen, einzeln und im Gemisch (*nicht gezeigt*).

Abb. 4. Quantitative, kompetitive PCR mit dem 476 bp DNA-Fragment von *Lactarius subdulcis* in Gegenwart einer unterschiedlichen Anzahl von Kopien der um 90 bp verkürzten Kompetitor und nach elektrophoretischer Trennung. Die begrenzenden Spuren links und rechts enthalten Marker-DNA unterschiedlicher Länge. Die Färbung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid.

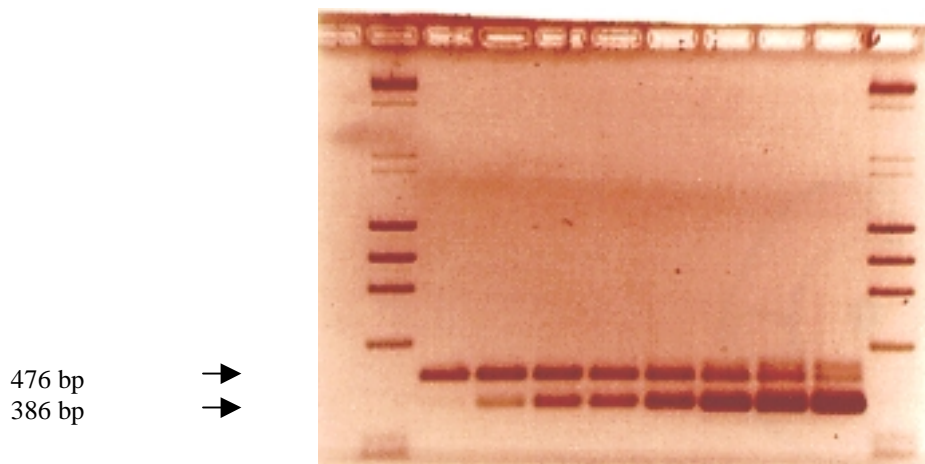
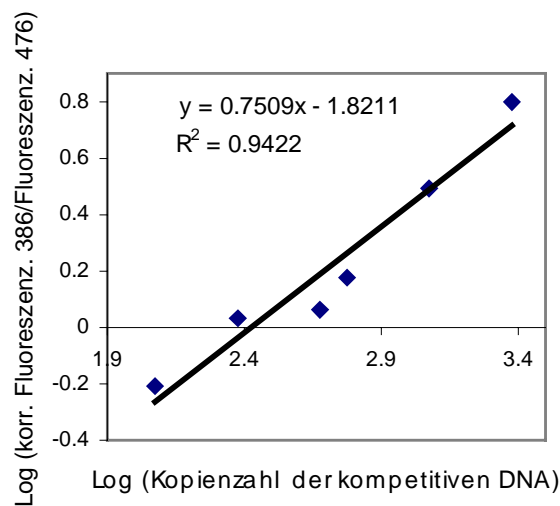


Abb. 5. Verhältnis der Fluoreszenz von Probe (pilzliches DNA-Fragment, immer in der selben Konzentration zugegeben) zu DNA-Standard (in steigender Konzentration) gegen die Kopienzahl des Standards logarithmisch aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der x-Achse identifiziert die Standard-Konzentration, die der DNA-Menge der Probe entspricht (Verhältnis = 1:1; $\log 1 = 0$).



Wir können auf dieser Grundlage die drei am Standort Conventwald dominierenden Pilz-Partner der Buchen-Mykorrhizen aus dem Gesamtextrakt der jeweiligen Wurzel objektiv identifizieren und quantifizieren. Dies war mit rein mikroskopischen Untersuchungen bisher nicht möglich.

3.5 Kohlenhydrat-Status der Mykorrhizen

Die im folgenden dargestellten Daten beziehen sich ebenfalls auf 2 verschiedene Vegetationsperioden mit sehr unterschiedlichen klimatischen Bedingungen. Die 1997 beprobten Pflanzen zeigten generell stärker ausgeprägte Stresssymptome (VOLKMER et al. 1998; PANTEL et al. 1998; HAMPP et al. 1998) als die der folgenden Vegetationsperiode 1999. Dies wurde als eventuelle Anpassungsreaktion der im Vorjahr bereits belasteten Buchenklone diskutiert.

Probennahme 1997

In Tab. 4 sind die Gehalte verschiedener Kohlenstoffverbindungen in Feinwurzeln der jeweiligen Ökotypen, bezogen auf Trockengewicht, dargestellt. Abb. 6 zeigt, dass die Anteile an Trehalose und Mannit, wichtige intermediäre Zwischenspeicher für Kohlenhydrate in Pilzzellen, in Wurzeln Trockenstress-sensitiver Ökotypen (Conventwald, Zwiefalten) verringert sind, während die Unterschiede in den weniger sensitiven Klonen (Ravensburg, Forbach, Überlingen) gegenüber der Kontrolle nicht signifikant sind. Entsprechendes gilt für die Gehalte der betreffenden Wurzelsysteme an Stärke/Glycogen.

Wir folgern daraus, dass der verringerte Gehalt an Speicher-Kohlenstoffverbindungen in Wurzeln sensitiver Ökotypen auf eine stärkere Beeinträchtigung der Allokation von Photoassimilaten in den Wurzelraum zurückzuführen ist. Dieses führt generell zu einer Verminderung der Mykorrhizierung, begünstigt aber offensichtlich Mykorrhizen, die mit weniger Photoassimilat auskommen.

Tab. 4. Gegenüberstellung der an Wurzelproben der verschiedenen Ökotypen der Buche gemessenen Metaboliten. Kontrolle = nicht überdachte Bäume. Werte \pm S.D. (n = 3-4)

Parameter	Kontrolle (Überlingen)	Behandlung (Überlingen)
Inositol (nmol/mgDW)	22.6 \pm 39.3	43.1 \pm 35.7
Mannitol	72.2 \pm 64.4	57.2 \pm 73.2
Trehalose	16.6 \pm 9.28	28.6 \pm 24.8
Glucose	81.1 \pm 40.7	63.7 \pm 57.5
Fructose	41.6 \pm 21.3	44.9 \pm 33.0
Saccharose	25.6 \pm 11.4	31.8 \pm 4.8
Stärke+Glycogen (nmol/mgDW)	76.4 \pm 51.7	67.9 \pm 31.5
Ergosterin (μ g/mgDW)	1.1 \pm 0.5	1.2 \pm 0.25

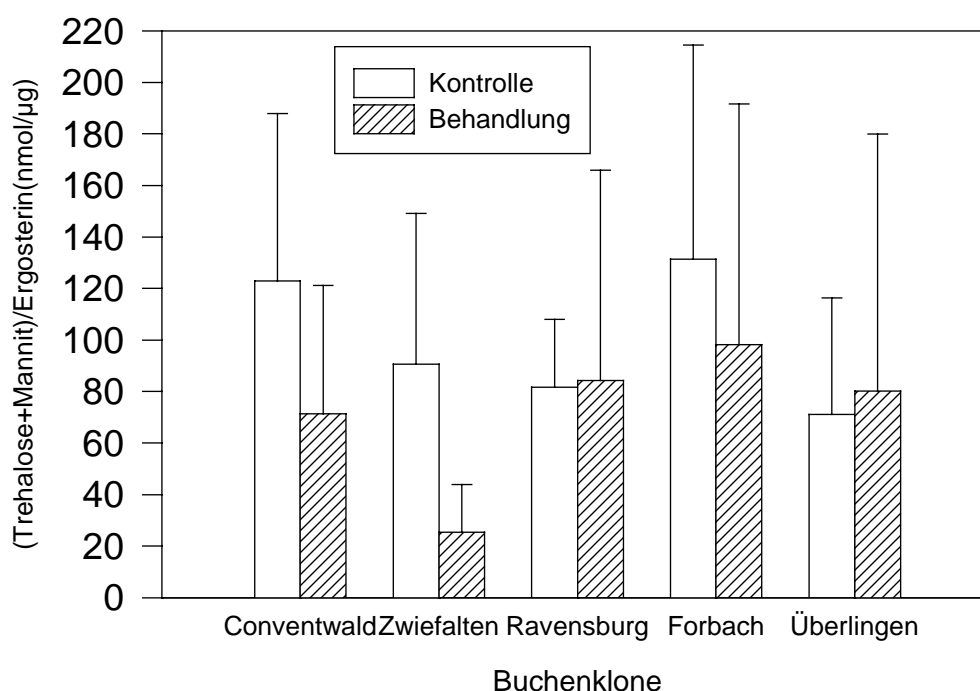
Parameter	Kontrolle (Forbach)	Behandlung (Forbach)
Inositol (nmol/mgDW)	13.0 \pm 12.2	16.3 \pm 19.6
Mannitol	93.3 \pm 41.2	80.1 \pm 77.3
Trehalose	33.4 \pm 20.9	20.7 \pm 23.2
Glucose	61.2 \pm 23.2	49.1 \pm 7.4
Fructose	34.3 \pm 2.6	32.6 \pm 10.5
Saccharose	23.8 \pm 21.8	24.1 \pm 32.0
Stärke+Glycogen (nmol/mgDW)	74.1 \pm 23.3	52.3 \pm 28.1
Ergosterin (μ g/mgDW)	1.1 \pm 0.4	1.0 \pm 0.1

Parameter	Kontrolle (Ravensburg)	Behandlung (Ravensburg)
Inositol (nmol/mgDW)	24.5 ± 0.6	38.1 ± 25.7
Mannitol	67.1 ± 4.0	80.4 ± 99.1
Trehalose	18.9 ± 7.1	30.7 ± 33.9
Glucose	93.5 ± 21.8	101.2 ± 54.9
Fructose	48.7 ± 21.1	39.1 ± 12.6
Saccharose	14.2 ± 15.9	30.3 ± 27.7
Stärke+Glycogen (nmol/mgDW)	64.2 ± 23.5	66.2 ± 9.6
Ergosterin (µg/mgDW)	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.4

Parameter	Kontrolle (Zwiefalten)	Behandlung (Zwiefalten)
Inositol (nmol/mgDW)	25.1 ± 14.3	29.4 ± 11.3
Mannitol	95.4 ± 83.5	34.1 ± 30.1
Trehalose	22.3 ± 16.9	11.0 ± 11.7
Glucose	63.0 ± 35.3	38.1 ± 10.4
Fructose	32.1 ± 13.6	34.8 ± 10.8
Saccharose	22.6 ± 19.3	22.4 ± 13.9
Stärke+Glycogen (nmol/mgDW)	71.8 ± 33.0	36.6 ± 7.0
Ergosterin (µg/mgDW)	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.3

Parameter	Kontrolle (Conventwald)	Behandlung (Conventwald)
Inositol (nmol/mgDW)	0	17.2 ± 1.2
Mannitol	103.7 ± 56.4	51.1 ± 18.7
Trehalose	31.7 ± 17.8	11.8 ± 1.5
Glucose	44.0 ± 30.8	78.7 ± 66.3
Fructose	40.1 ± 17.2	27.3 ± 4.4
Saccharose	36.2 ± 30.8	9.7 ± 1.7
Stärke+Glycogen (nmol/mgDW)	85.6 ± 8.6	42.8 ± 0.8
Ergosterin (µg/mgDW)	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.4

Abb. 6. Gehalte der Wurzeln verschiedener Klone (unbedacht = Kontrolle) an den pilzspezifischen Verbindungen Trehalose und Mannit. Durch den Bezug auf Ergosterin (ein Bestandteil der pilzlichen Membran) werden nur lebende Hyphen berücksichtigt. Werte \pm S.D. (n = 3-4)



Probennahme 1998

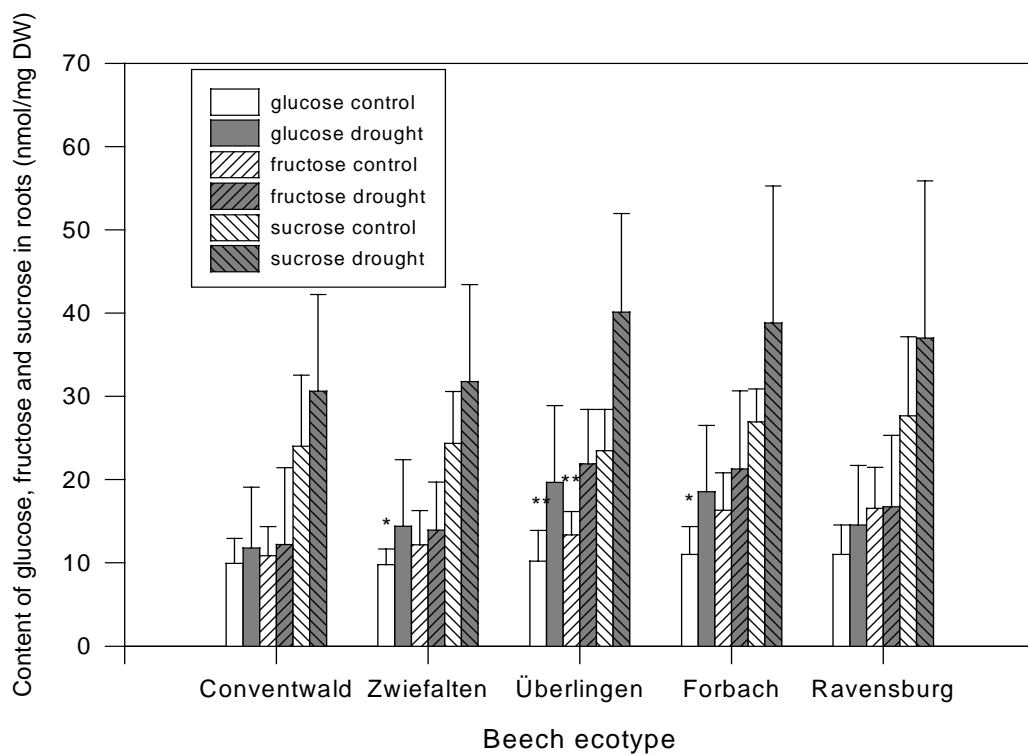
Eine wesentlich andere Situation ergibt sich für die Vegetationsperiode 1998. Die Netto-Photosyntheserate der evtl. besser stressadaptierten Pflanzen wurde in diesem Behandlungszeitraum, mit Ausnahme des Conventwald-Klons, durch die Bedachung kaum beeinträchtigt (Buschmann et al. 1999). Man kann daher davon ausgehen, dass auch die in geringerem Umfang mit Wasser versorgten Buchen ihrem Wurzelsystem genügend Photoassimilate zur Verfügung stellen und damit ihre pilzlichen Symbiosepartner besser versorgen konnten.

Aufgrund der vergleichbaren Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Buchenmykorrhizen auf beiden Versuchsflächen wurden die Bestimmungen von Inhaltsstoffen weitgehend an *Lactarius*- und *Xerocomus*-Mykorrhizen durchgeführt. Generell war der Gehalt an pilzspezifischen Zuckern und Zuckeralkoholen in Mykorrhizen der Behandlungsfläche deutlich erhöht. Wir interpretieren dies als Antwort eines vitalen symbiontischen Systems auf ein stärker negatives Wasserpotenzial der Bodenlösung.

Gesamtes Feinwurzelsystem

Alle untersuchten Klone der überdachten Fläche zeigten gesteigerte Saccharose-Gehalte (signifikant für den Klon Überlingen; Abb. 7). Die Hexosen Glucose und Fructose waren in den Klonen Überlingen und Forbach ebenfalls signifikant erhöht.

Abb. 7.: Vergleich der Gehalte löslicher Zucker in Feinwurzeln der verschiedenen Buchenklone.



Die Gehalte an Speicherpolysacchariden (Glycogen, Stärke) liessen keine behandlungsspezifischen Veränderungen erkennen (Abb. 8).

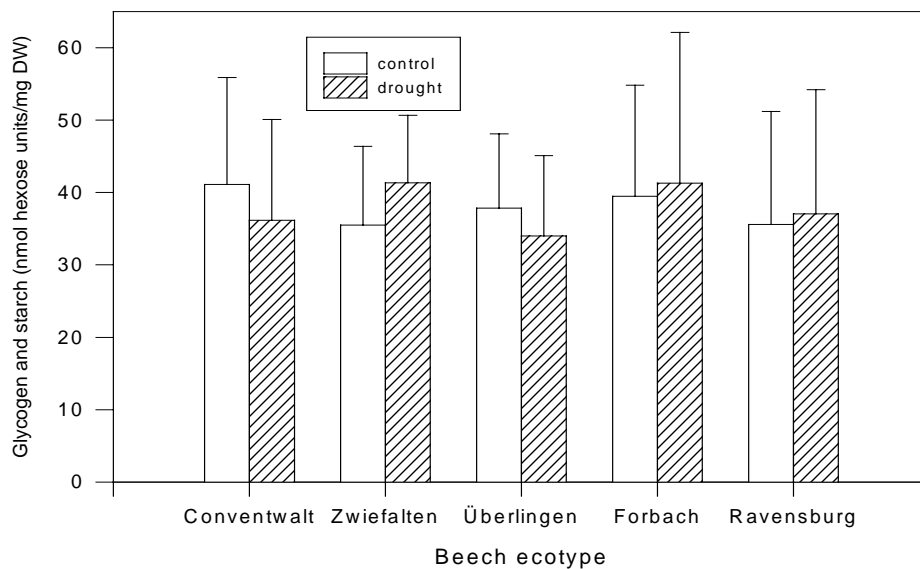


Abb. 8.: Vergleich der Gehalte an Speicherpolysacchariden in Feinwurzeln der verschiedenen Buchenklone.

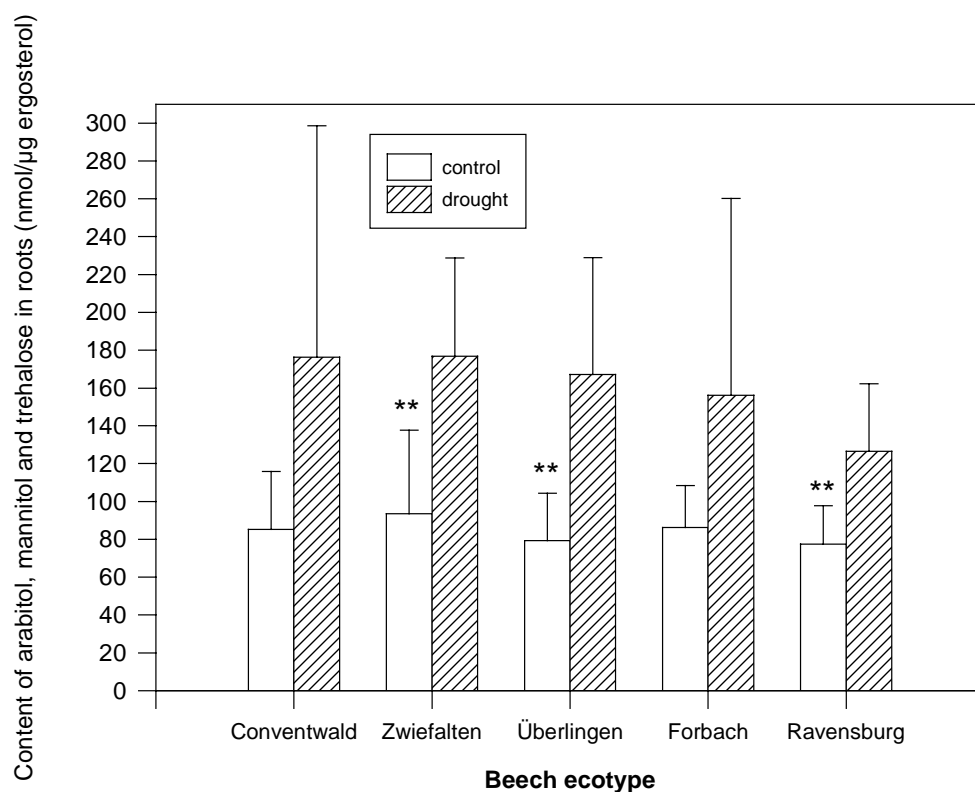


Abb. 9.: Vergleich der Gehalte pilzspezifischer Verbindungen in Feinwurzeln der verschiedenen Buchenklone.

Die pilzspezifischen Verbindungen Arabit, Mannit und Trehalose zeigten, bezogen auf den Pilzmarker Ergosterin, auf der Behandlungsfläche durchgehend gesteigerte Werte (Abb. 9).

Mykorrhizen

Zur Charakterisierung der Metabolitgehalte der Mykorrhizen wurden diese vom Wurzelsystem der individuellen Klone einzeln gesammelt und gepoolt extrahiert und analysiert.

Lactarius subdulcis

Abb. 10 zeigt behandlungsspezifische Veränderungen in den Zucker- und Zuckeralkoholgehalten dieser Mykorrhizen. Mit Ausnahme von Ravensburg sind in allen Klonen die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose z.T. erheblich erhöht. Unter den pilzspezifischen Verbindungen fällt Mannit auf (Abb. 11). Die Menge dieses Zuckeralkohols ist gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, während die von Trehalose verringert ist. Arabit ist nur in geringen Konzentrationen vorhanden und lässt keine wesentlichen Behandlungseffekte erkennen.

Da Mannit bei allen Klonen einen Anteil von etwa 90% der gesamten pilzspezifischen Kohlenstoffverbindungen erreicht (Abb. 11) bevorzugt *L. subdulcis* offensichtlich Mannit als Osmoticum und damit als Schutz vor einem zunehmend negativer werdenden Wasserpotential im Boden. Die Anreicherung von Mannit geht offensichtlich zu Lasten des Disaccharids Trehalose (vgl. Abb. 10) und nicht der Speicherkohlenhydrate, da die Gehalte an Stärke bzw. Glycogen nicht auffällig verändert sind (Abb. 12)

Abb. 10.: Vergleich der Gehalte pilzspezifischer Verbindungen in Mykorrhizen mit *Lactarius subdulcis*

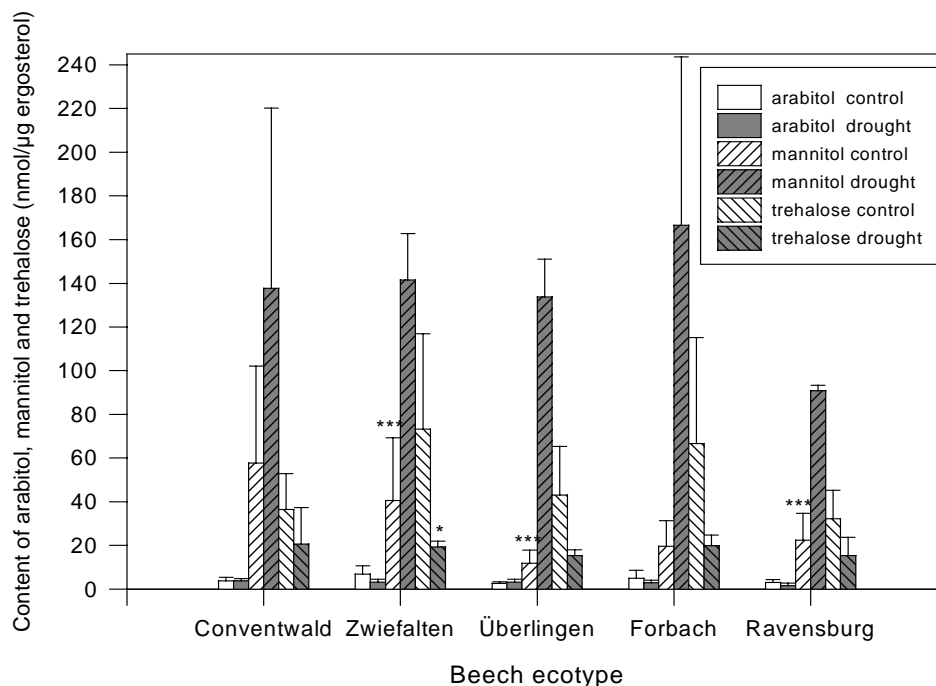


Abb. 11.: Prozentualer Anteil von Mannit am Gesamt-Gehalt der analysierten pilzspezifischen Verbindungen in Mykorrhizen mit *Lactarius subdulcis*.

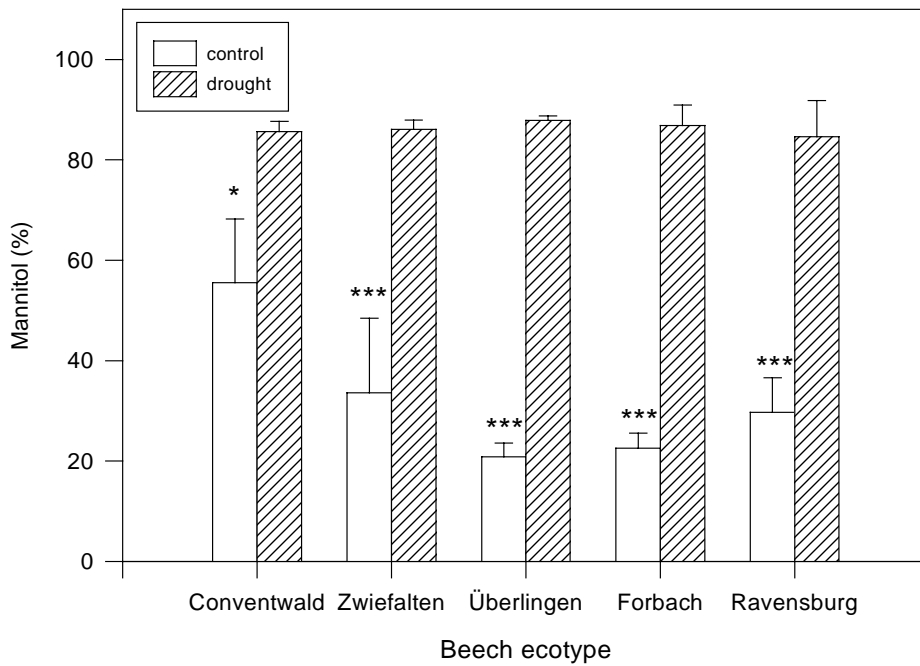
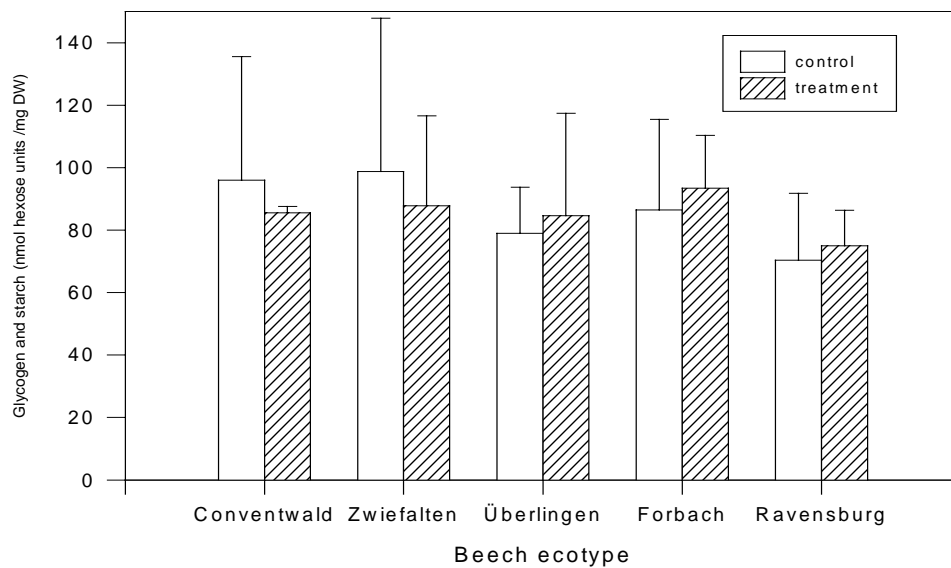


Abb. 12.: Vergleich der Gehalte an Speicherpolysacchariden (Stärke und Glykogen) in Mykorrhizen mit *Lactarius subdulcis*.



Xerocomus chrysenteron

Im Gegensatz zu *Lactarius* ist für *Xerocomus* offensichtlich eine andere Strategie verwirklicht: Dieser Pilz weist auf den behandelten Flächen eine enorme Steigerung des Arabit-Gehaltes auf (Abb. 13). Der Anteil dieses Zuckeralkohols erreicht hier im Mittel etwa 70% aller mengenmässig ins Gewicht fallenden pilzspezifischen Zucker/Zuckeralkohole (Abb. 14). Mannit und Trehalose sind dagegen unter verringerter Wasserversorgung abgesenkt, kompensieren aber nicht die Erhöhung des Arabit-Pools (Abb. 13). Glucose und Fructose als in beiden Organismen (Pilz und Wirt) auftretende Zucker, sowie Saccharose, die nur im Wirt vorkommt, sind durchgängig in allen behandelten Klonen erhöht (Abb. 15). In Übereinstimmung mit diesen Befunden sind die Gehalte der Speicherkohlenhydrate Glycogen (Pilz) und Stärke (Wirt) abgesenkt, z.T. bis auf 50% der Kontrollwerte (Zwiefalten, Forbach, Ravensburg; Abb. 16). Dies legt die Annahme nahe, dass in dieser Mykorrhiza die Speicherkohlenhydrate teilweise hydrolysiert wurden, um daraus osmotisch aktive Moleküle bereitzustellen. Dieses Verhalten unterscheidet sich damit deutlich von dem von *L. subdulcis*.

Abb. 13.: Vergleich der Gehalte pilzspezifischer Verbindungen in Mykorrhizen mit *Xerocomus chrysenteron*

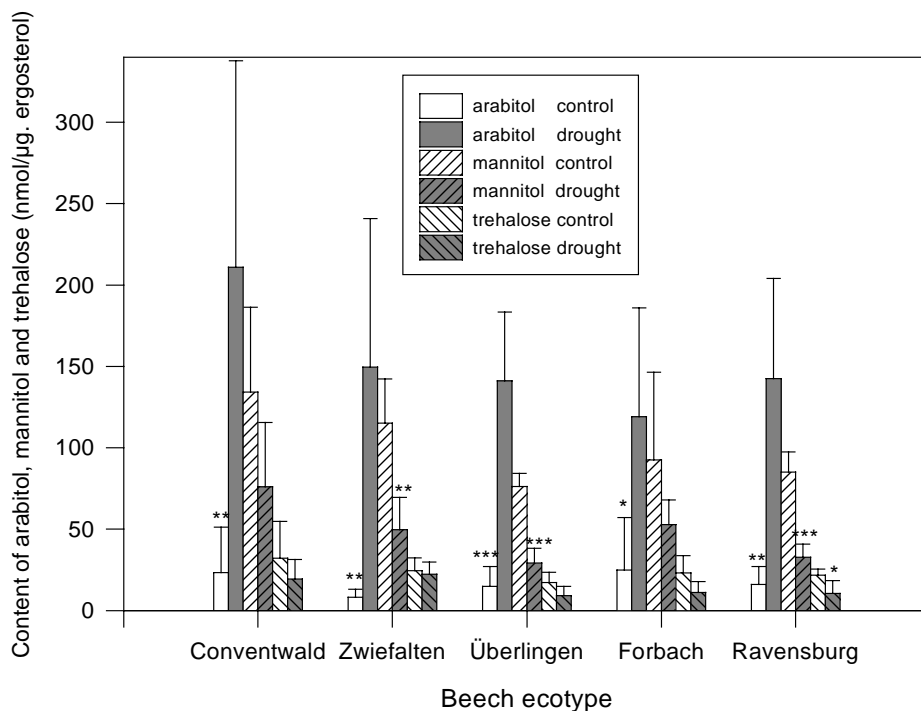


Abb. 14.: Protentualer Anteil von Arabitol am Gesamtgehalt der analysierten pilzspezifischen Verbindungen in Mykorrhizen mit *Xerocomus chrysenteron*

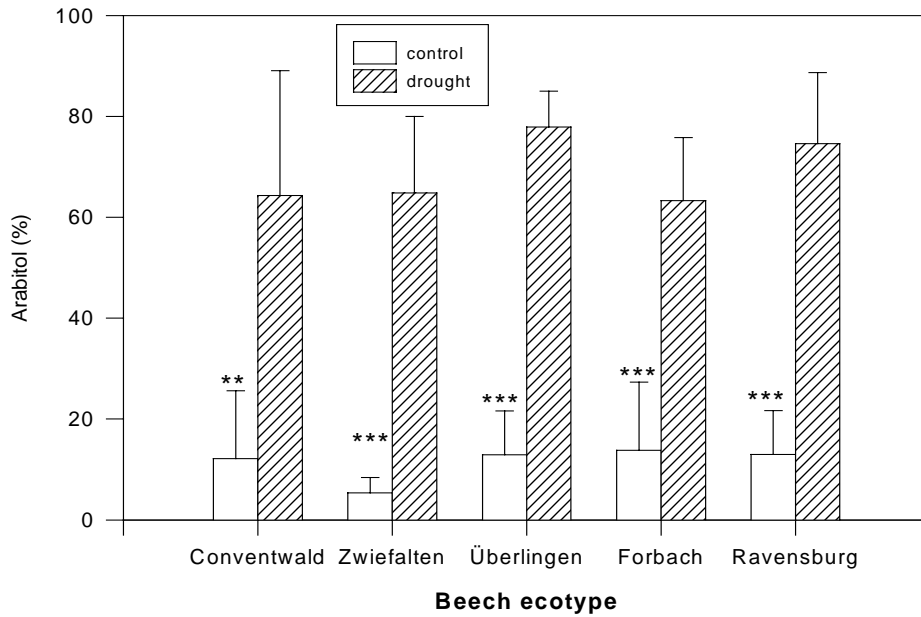
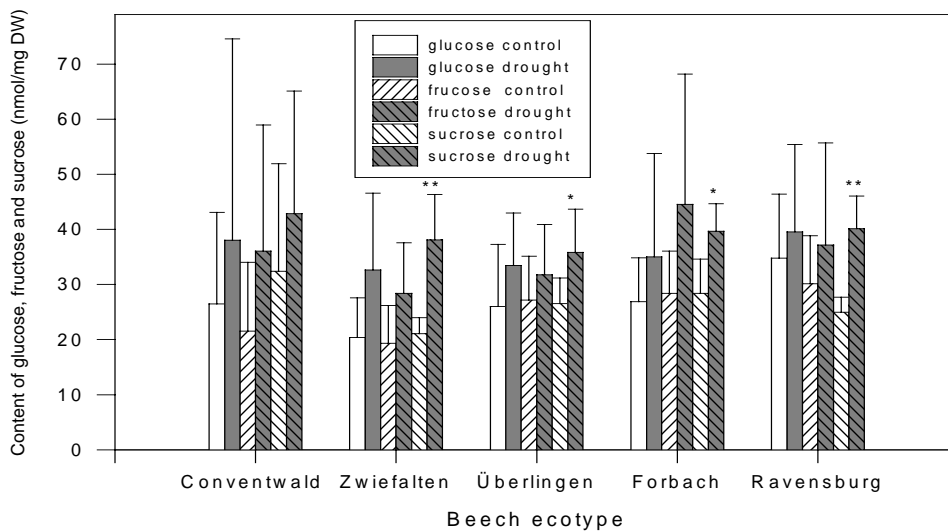


Abb. 15.: Vergleich der Gehalte an löslichen Kohlenhydraten in Mykorrhizen mit *Xerocomus chrysenteron*



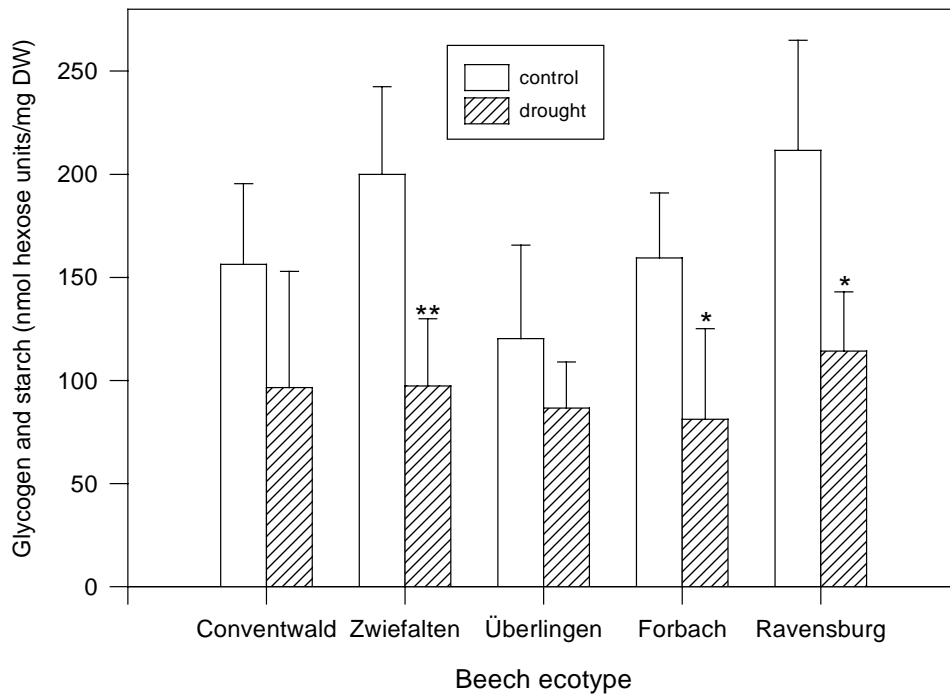


Abb. 16.: Vergleich der Gehalte an Speicherpolysacchariden (Stärke und Glykogen) in Mykorrhizen mit *Xerocomus chrysenteron*

Umfang der Mykorrhizierung

Als Mass für den Anteil stoffwechselaktiver Pilze in den einzelnen Mykorrhizen wurde der Ergosterin-Gehalt bestimmt. Dieser ist für die beiden dominierenden Mykorrhizen für beide Behandlungsvarianten identisch (Abb. 17). Leichte Unterschiede ergeben sich nur in der Tendenz: die verringerte Wasserversorgung scheint den Grad der *Lactarius*-Mykorrhizierung etwas zu steigern (Conventwald, Überlingen; Abb. 18), während der Ergosteringehalt der *Xerocomus*-Mykorrhizen leicht abnimmt (Abb. 19).

Abb. 17.: Ergosterin-Gehalte als Mass für den Pilzanteil in den verschiedenen Feinwurzelsystemen.

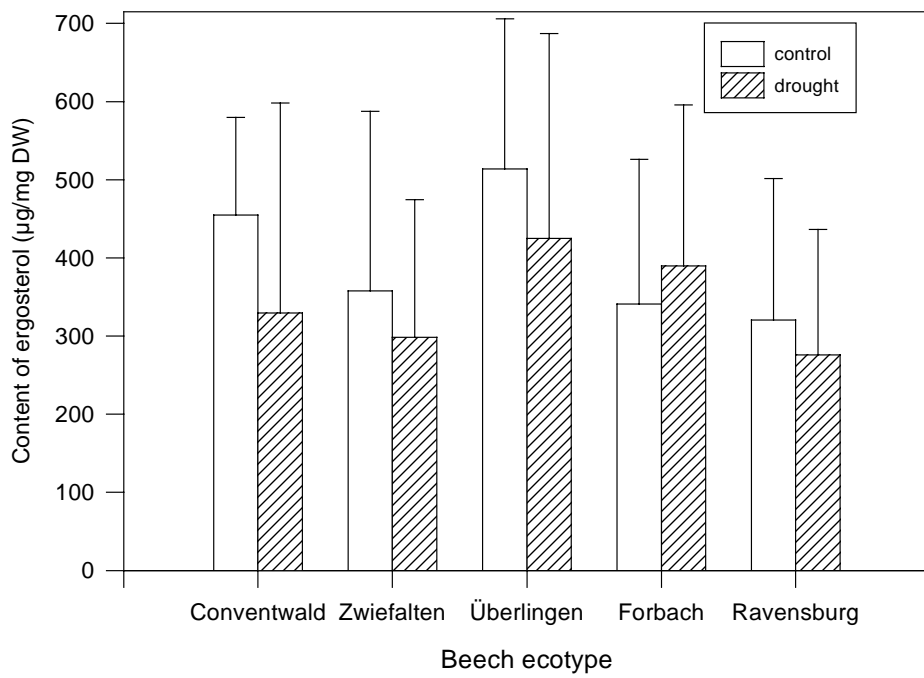


Abb. 18.: Ergosterin-Gehalte in Mykorrhizen mit *Lactarius subdulcis*

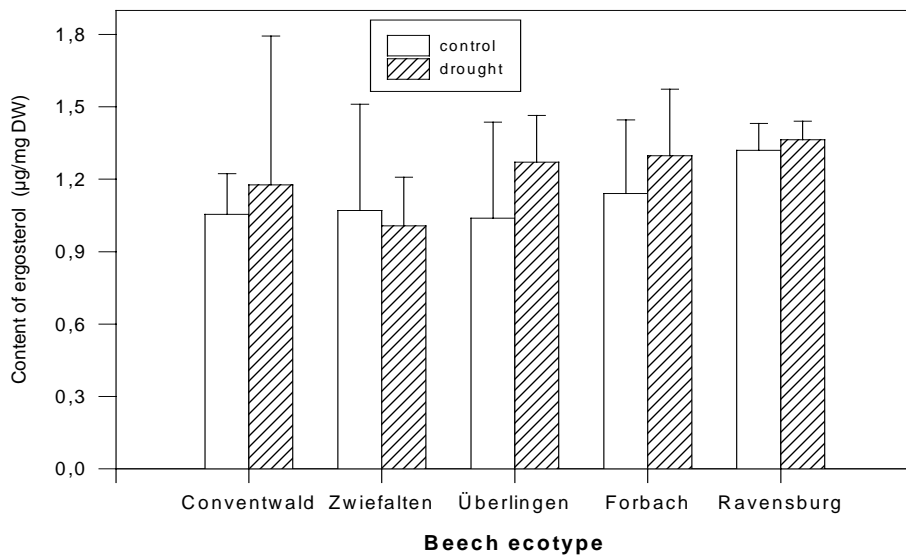
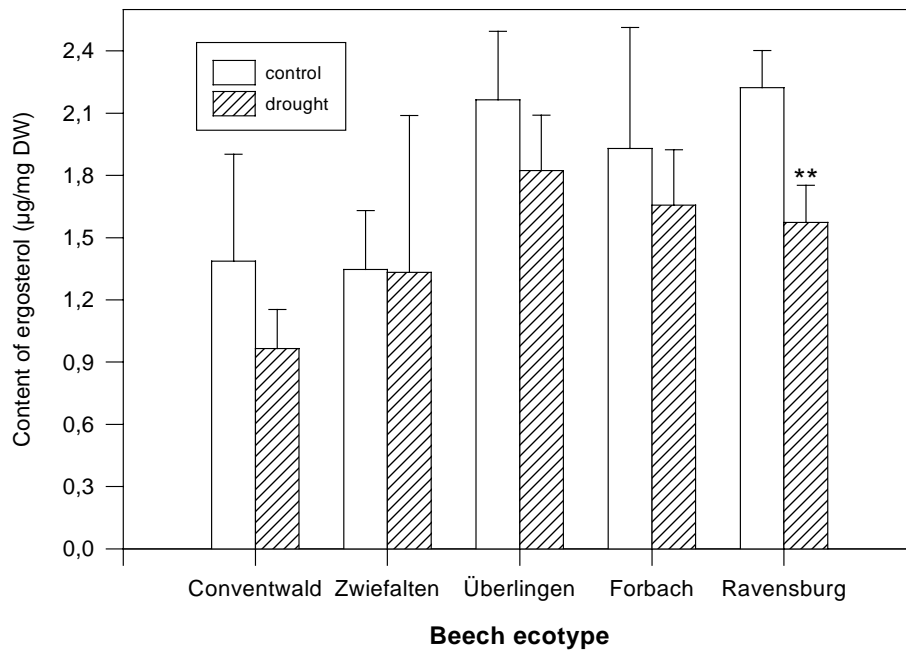


Abb. 19.: Ergosterin-Gehalte in Mykorrhizen mit *Xerocomus chrysenteron*



4 Diskussion

Es existieren bisher nur wenige Untersuchungen zum Einfluss einer Mykorrhizierung auf den Wasserstatus der Wirtspflanzen und damit auf die mögliche Verringerung von Trockenstress-Reaktionen (vgl. HAMPP & SCHAEFFER 1999). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass eine Mykorrhizierung (Endomykorrhiza) die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln erhöht, was im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollen zu einem verringerten stomatären Widerstand und damit zu einer erhöhten Photosyntheserate führen dürfte (ANDERSEN & RYGIEWICZ 1991; VARMA 1995).

Ausgangspunkt unseres Versuchskonzepts war daher folgende Arbeitshypothese: Buchen mit guter Mykorrhizierung sind weniger anfällig gegenüber Trockenstress als solche ohne. Begründung: eine bessere Wasser-(und Nährsalz-)versorgung unter Wasser-limitierenden Bedingungen erlaubt eine höhere Photosyntheserate, die letztlich wieder dem Wurzelbereich zugute kommt.

Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte im Freilandversuch Conventwald, in dem Sommertrockenheit durch Überdachung eines Teil der Versuchspflanzen künstlich induziert bzw. verstärkt wurde.

Abdeckungen, auch wenn gut lichtdurchlässig, haben immer Abweichungen im Temperatur- und Strahlungsklima zur Folge. Um derartige Einflüsse und Veränderungen im Stoffeintrag möglichst gering zu halten, wurden die Folien zwischen den etwa 3-monatigen Experimentphasen abgebaut. Die Folien verringerten die direkt einfallende Strahlung um bis zu 20% (VOLKMER 1999). Die wechselnde Beschattung durch Kronen von Altbuchen (sehr heterogene Lichtverhältnisse) überwog an beiden Standorten jedoch den Einfluss der Folie. Unter den bedachten Flächen waren die Bodentemperaturen um bis zu 1,8°C (5 cm Tiefe) erhöht (VOLKMER 1999).

Massnahmen zur Verhinderung eines Eintrags von Bodenoberflächenwasser aufgrund der Hanglage der Versuchspartellen sind in VOLKMER (1999) detailliert beschrieben.

Zur Beurteilung unserer Ergebnisse sind Messungen biochemischer Stressparameter an den Versuchspflanzen wichtig. Diese wurden von der AG Rennenberg in verschiedener Form erfasst (siehe VOLKMER 1999): Die Pflanzen der überdachten Areale wiesen im Versuchszeitraum 1997 mit etwa -2 MPa ein deutlich negativeres (pre-dawn) Wasserpotential als die der Kontrollflächen auf. Auch 1998 waren deutliche Unterschiede zwischen Buchen der Kontroll- und der Behandlungsfläche vorhanden (- 0,55 gegenüber -1,41 MPa), obwohl der Trockenstress im Vergleich zu 1997 insgesamt geringer war (-1,41 gegenüber bis zu -2,4 MPa). Dies äusserte sich auch in einem in 1997 geringeren Wassergehalt der Blätter. Biochemische Indikatoren für Stress-Situationen (Gehalt an Malondialdehyd als Indikator für oxidativen Stress, Elektrolytleitfähigkeit als Mass für die Permeabilität von Membranen, Anreicherung von Prolin als nicht-toxischem Osmotikum) unterstützen diese Beobachtung. Interessanterweise war der Boden im zweiten Versuchszeitraum entgegen der verringerten Trockenstress-Symptome der Versuchspflanzen deutlich stärker ausgetrocknet. VOLKMER (1999) diskutiert dies als mögliche Folge einer verbesserten Stressadaptation der Versuchspflanzen (erhöhte Durchwurzelungstiefe etc.).

Unsere Daten stützen die oben dargestellte Arbeitshypothese in etwas abgewandelter Form, wobei die jeweiligen klimatischen Bedingungen von nicht zu unterschätzender Bedeutung zu sein scheinen:

- (a) Unter ausgeprägten Trockenstress-Bedingungen (Proben von 1997) sind Ökotypen der Buche, die mit bestimmten Pilzen eine Symbiose eingehen können, gegenüber Trockenstress weniger anfällig.
- (b) Kann die Wirtspflanze trotz Trockenstress in ausreichendem Umfang Photoassimilate für den Wurzelbereich zur Verfügung stellen, kommt es zu Anpassungsreaktionen der mykorrhizierten Feinwurzeln: das stärker negative Wasserpotential der Bodenlösung wird durch die Anreicherung von osmotisch wirksamen Zuckeralkoholen in den Pilzhyphen kompensiert, und damit die Mykorrhiza offensichtlich funktionsfähig gehalten.

Diese Annahmen werden durch die im folgenden zusammengefassten Beobachtungen gestützt.

Zu (a):

In den Untersuchungen der ersten Versuchsperiode (1997) zu Blattmasse, Spross- und Wurzelgewicht (vgl. VOLKMER et al. 1998) unterschied sich der Ökotyp "Conventwald" jeweils deutlich von den 4 Ökotypen aus dem Genressourcenprogramm. Als Folge der Trockenstress-Behandlung verfügte dieser nur noch über 1/5 der Biomasse der anderen Ökotypen (vor

Behandlungsbeginn: 1/3) und wies zudem eine deutliche Zunahme im Spross/Wurzel-Verhältnis von etwa 0,6 (Kontrolle) auf nahezu 1,0 auf. Diese starke Zunahme war bei den anderen Ökotypen nicht zu beobachten.

Ein Vergleich mit der Art der Mykorrhizierung zeigte eine interessante Übereinstimmung mit dieser, für den Ökotyp "Conventwald" spezifischen Abweichung. Mykorrhizen mit *X. chrysesteron*, die im Mittel aller Ökotypen als einzige ihren prozentualen Anteil unter Trockenstress deutlich steigerten, waren bei den untersuchten "Conventwald"-Buchen nicht nachzuweisen. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass diese Art von Mykorrhiza in der Wasserversorgung der Wirtspflanze effektiver ist und dieser damit eine höhere Zuwachsrates unter einem negativeren Boden-Wasserpotential gestattet.

Zu (b):

Die 8-jährigen Buchen der Versuchsperiode 1998 zeigten zwar etwas veränderte Phänotypen (kleinere, dafür aber eine grössere Anzahl von Blättern bei erhöhter Gesamtblattfläche; BUSCHMANN et al. 1999), insgesamt jedoch weniger stark ausgeprägte Schadsymptome, sowohl was Untersuchungen zu Photosynthese und Wasserhaushalt als auch biometrische Parameter anbelangt. So war die Gesamtbiomasse z.T. sogar erhöht (Klone Forbach, Ravensburg, Überlingen) und das Spross/Wurzel-Verhältnis leicht gesteigert (VOLKMER und RENNENBERG 1999; unter Wasserstress würde man eine relative Zunahme der Wurzelbiomasse erwarten).

Auch im Wurzelbereich waren keine auffälligen Veränderungen erkennbar. Licht- und TEM-Untersuchungen zeigten, dass die Mykorrhizen überwiegend in gutem, funktionsfähigem Zustand waren (KOTTKE et al. 1999).

Unabhängig davon waren bei den verschiedenen Klonen dennoch Trockenstress-Symptome zu beobachten, wie z.B. ein stärker negatives „pre-dawn“-Wasserpotential und ein erhöhter Prolin-Gehalt der Blätter (besonders beim Klon Conventwald; VOLKMER und RENNENBERG 1999). Prolin ist eine Aminosäure, die eine ausgeprägte Hydrathülle bildet und dadurch Proteine unter Wassermangel stabilisiert. Pflanzen antworten auf Wassermangel deshalb mit der Anreicherung solcher bzw. generell das osmotische Potential des Zellsaftes erhöhenden Substanzen. Dazu gehören auch Zucker und Zuckeralkohole.

Unsere Analysen an den entsprechenden Mykorrhizen zeigen ganz klar, dass die Pilzpartner in gleicher Weise reagieren: in allen Wurzelproben/Mykorrhizen der Trockenstress-Variante waren pilzspezifische Zuckeralkohole in ihren Konzentrationen stark erhöht. Zusätzlich war ein Anstieg der Stickstoff-Speicherung in den Mykorrhizen zu beobachten (KOTTKE et al. 1999), was sich auch im Gesamtgehalt nicht-löslicher N-Verbindungen niederschlug (VOLKMER 1999). Die Herkunft dieses Stickstoffs, ob über eine Aufnahme aus dem Boden durch die Mykorrhizapilze, oder, wie von VOLKMER vorgeschlagen, über einen basal gerichteten Transport im Wirt bzw. eine geringere apikale Verlagerung im Xylem als Folge einer reduzierten Transpirationsrate, bleibt offen.

Die für den Versuchszeitraum 1998 präsentierten Daten belegen eindeutig die Vitalität der Wurzelsysteme in bezug auf gezielte Stoffwechselreaktionen zum Schutz vor Wassermangel, es lassen sich daraus aber keine Klon-spezifischen Unterschiede in der Trockenstress-Resistenz herausarbeiten. Dafür war die Trockenstress-Belastung möglicherweise nicht hoch genug.

Die Zielsetzung des Projekts, nämlich Trockenstress-resistente Buchenklone zu identifizieren, lässt sich besser mit der ersten Probennahme erreichen. Hier war die Belastung der Wirtspflanzen hoch genug, um eine verringerte Photoassimilat-Allokation in den Wurzelbereich hervorzurufen und damit die Pilz/Wurzel-Symbiose, deren Entwicklung von der Versorgung mit Kohlenhydraten abhängt, nachhaltig zu beeinträchtigen. Als unter diesen Bedingungen besonders widerstandsfähig erwiesen sich Kombinationen von Buchenklonen mit *X. chrysesteron* als Symbiosepartner. Der besonders empfindliche Ökotyp „Conventwald“ war mit diesem Pilz kaum vergesellschaftet.

Wir schliessen daraus, dass für die Stresstoleranz der jeweiligen Klone der optimale Mykorrhiza-Partner eine wesentliche Rolle spielt.

In der Literatur gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Mykorrhizen die Trockenstress-Toleranz der Wirtspflanzen erhöhen können (z.B. Übersichtsbeitrag von KOIDE 1993), wobei die vom Pilzpartner angereicherten Verbindungen variieren (in Mais-Mykorrhizen z.B. Trehalose; SCHELLENBAUM et al. 1998). Im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Kontrollen ist dies oft mit verbessertem Wachstum verbunden. Durch die grössere resorptive Oberfläche mykorrhizierter Wurzelsysteme wird nicht nur die Wasser- sondern auch die Nährstoffversorgung verbessert (vgl. Übersicht in HAMPP et al. 2000). Dies könnte ein Grund für die kaum vorhandenen Wachstumsunterschiede auf den beiden Behandlungsflächen sein (Probennahme 1998; VOLKMER und RENNENBERG 1999).

Schlussfolgerungen

Die Mykorrhizierung scheint einen wesentlichen Beitrag zur Trockenstress-Resistenz von Ökotypen der Buchen zu leisten. Dies erfolgt auf zweierlei Art, (a) durch die je nach Ökotyp unterschiedliche Fähigkeit Symbiosen mit offensichtlich besonders Trockenstress-resistenten Pilzarten einzugehen und (b) durch die ausgeprägte Anreicherung osmotisch wirksamer Verbindungen in mykorrhizierten Wurzeln.

Danksagung

Wir sind Frau Volkmer (Freiburg) und Frau Dr. Kottke (Tübingen) für die Hilfe bei der Probennahme, bzw. bei der Identifizierung der Mykorrhiza-Pilze zu Dank verpflichtet. Besonders erwähnen möchten wir jedoch die Hilfe von zeitweise bis zu 14 Mitarbeitern des Lehrstuhls, die parallel zur Probennahme in Freiburg an 4 aufeinander folgenden Tagen jeweils bis zu über 12 h lang bei der Sortierung der Mykorrhizen mit Hilfe von Stereomikroskopen selbstlos geholfen haben. Dem PEF danken wir für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- AGERER, R. (1995) Colour Atlas of Ectomycorrhizae, Einhorn-Verlag E. Dietenberger, Schwäbisch-Gmünd
- ANDERSEN, C.P., RYGIWICZ, P.T. (1991) Stress interactions and mycorrhizal plant response: understanding carbon allocation priorities. *Environm. Poll.* 73, 217-244
- BLAST: Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- BUSCHMANN, C., BILKE, S., BUTTERER, T., ENK, A., LÄNGLE, T., WENZEL, O., LICHTENTHALER, H.K. (1999) Einfluss von Trockenstress auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) – Unterschiede in der Trockenstressempfindlichkeit. FZKA/PEF-Berichte:
<http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef99/lichtenthaler/lichtenthaler.htm>
- ClustalW: THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680.
- GARDES, M, BRUNS, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118
- HAMPP, R., SCHAEFFER, C. (1995) Mycorrhiza - Carbohydrate and Energy metabolism. In: Mycorrhiza, Varma, A., Hock, B. (Herausg.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 267-296
- HAMPP, R., SHI, L., GUTTENBERGER, M. (1998) Mykorrhizierung und Streßtoleranz von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.) – Erste Ergebnisse aus dem „Conventwaldprojekt“. FZKA-PEF-Berichte:
<http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef98/hampp/hampp.htm>
- HAMPP, R, NEHLS, U., WALLEDA, T. (2000) Physiology of mycorrhiza. *Progress in Botany*, Springer-Verlag, in press
- HENRION, B., LE TACON, F., MARTIN, F., (1992) Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122, 289-298
- KOIDE, R.T. (1993) Physiology of the mycorrhizal plant. *Advances in Plant Pathology* 9, 33-54
- KOTTKE, I., SOORO, A., BERGER, A. (1999) Untersuchungen zur Bedeutung der stickstoffspeicherung in der Mykorrhiza für die Trockenstresstoleranz verschiedener Ökotypen der Buche. KfK-PEF
- OUTLAW, W:H:, JR., MANCHESTER J. (1979) Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology* 64, 79-82
- PANTEL, S., SPECK, B., WENZEL, O., BUSCHMANN, C., LICHTENTHALER, H.K. (1998) Einfluß von Trockenstreß auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). FZKA/PEF-Berichte:
<http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef98/lichtenthaler/lichtenthaler.htm>
- SCHAEFFER, C., WALLEDA, T., GUTTENBERGER, M., HAMPP, R. (1995) Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings. *New Phytol.* 129, 417-424
- SCELLENBAUM, L., MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A., SCHÜEPP, H. (1998) Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: Changes in the pools of non-

- structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytol.* 138, 59-66
- SMITH, S.E, READ, D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- SHI, L., NEHLS, U., HAMPP, R. (1999) Mykorrhizierung und Streßtoleranz von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). FZKA-PEF-Berichte:
<http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef99/hampp/hampp.htm>
- VARMA, A. (1995) Ecophysiology and application of arbuscular mycorrhizal fungi in arid soils. In (Varma, A., Hock, B., eds) *Mycorrhiza. Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 561-591
- WHITE, T.J., BRUNS, T, LEE, S., TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, pp. 315-322. Academic Press, New York
- VOLKMER, C., WEBER, P, RENNENBERG, H. (1998) Untersuchungen zur Stress-Sensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). II. Erste Ergebnisse aus dem Conventwaldprojekt. FZKA-PEF-Berichte:
<http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef98/rennenberg/rennenberg.htm>
- VOLKMER, C. (1999) Untersuchungen zur Stress-Sensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). Dissertation, Forstwissenschaftliche Fakultät der Universität Freiburg
- VOLKMER, C., RENNENBERG, H. (1999) Untersuchungen zur Stresssensitivität von Ökotypen der Buche (*Fagus sylvatica* L.). III. Ergebnisse des Dachexperiments Conventwald. FZKA-PEF-Berichte: <http://bwplus.fzk.de/pef/diskpef99/rennenberg/rennenberg.htm>