

**Untersuchungen
zur Diversität
arbuskulärer Mykorrhiza-Pilze
einer ausgewählten
Binnenland-Salzstelle**

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

vorgelegt von

Petra Wilde
aus Porz am Rhein

Berichtersteller:

Prof. Dr. H. Bothe

Prof. Dr. M. Bucher

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 11. 2007

„...wir kämen nicht weiter,
wenn ich dauernd auf
alte Ideen zurückgreifen würde“,
erwiderte der Gott*.

* ein kleiner Gott der Evolution

„Diversifizieren und alle Nischen füllen,
darauf kommt es an.“

TERRY PRATCHETT

(THE LAST CONTINENT)

Abstract

Salt marshes share a typical vegetation and a zonal distribution of halophytes in dependence of the salt load in soils.

The present study aimed at characterising the arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) diversity in roots of typical salt marsh plants (*Aster tripolium*, *Puccinellia distans*, *Salicornia europaea*) of a German inland potassium carbonate habitat (mining dumps of a former potash mine near Schreyahn, Hannoversches Wendland). Therefore extracted genomic DNA of colonised roots of two samplings (September 2002 and June 2003) was used to screen for AM fungi by PCR. A part of the fungal 18S rDNA and the ITS region were amplified.

A comparison of the results from morphological studies of spores isolated from the Schreyahn soil and the phylogenetic analysis of obtained clone libraries of both the part of 18S rDNA and ITS region from AMF within roots revealed that the AMF diversity within roots was lower than the spore diversity in the Schreyahn soil. DNA sequences closely related to *Glomus intraradices* are most abundant in the roots but could not be accounted for spores in the soil. Prior screening for AMF spores in several central European salt marshes showed the dominance of *Glomus geosporum* spores in saline soils. In Schreyahn *G. geosporum*-like spores could also be identified in soil adjacent to the roots of the above mentioned halophytes. Although these spores shared morphological traits with *G. geosporum* they were in general much smaller. Apparently *G. geosporum* was not the predominant coloniser within the roots investigated. Furthermore sequences of uncultured *Glomus* sp. within roots were obtained, but morphological structures like spores, which allow a closer characterisation were not found.

In case of the ITS region a group of sequences belonging to the Archaeosporaceae could be detected which was missing from the 18S rDNA clone libraries.

Kurzzusammenfassung

Salzmarschen sind durch das Auftreten charakteristischer Pflanzengemeinschaften und eine typische Zonierung der Halophyten in Abhängigkeit von der Bodensalzkonzentration gekennzeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diversität der arbuskulären Mykorrhiza (AM)-Pilze (Glomeromycota) innerhalb der Wurzeln von *Aster tripolium*, *Puccinellia distans* und *Salicornia europaea* an einer deutschen Binnenland-Salzstelle (ehemaliges Kaliabbaugebiet bei Schreyahn, Hannoversches Wendland) untersucht. Die drei ausgewählten Pflanzenspezies repräsentieren unterschiedliche Zonen des Bodensalzgradienten. Aus Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen wurde die genomische Gesamt-DNA isoliert. Die AM-Pilz-DNA wurde spezifisch mittels PCR im Bereich der ITS-Region (ITS1-5,8S rDNA-ITS2) und eines Fragmentes der 18S rDNA-Region amplifiziert. Von beiden Regionen wurden Klonbibliotheken für die mykorrhizierten Pflanzenspezies und zwei Probenentnahmezeitpunkte (September 2002 und Juni 2003) erstellt und phylogenetisch ausgewertet. Die phylogenetische Analyse ergab sowohl für das Fragment der 18S rDNA als auch für die ITS-Region eine geringere Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln im Vergleich zur Diversität der morphologisch charakterisierten AM-Sporen im Boden. Der größte Anteil der AM-Pilzsequenzen, die aus den untersuchten Halophytenwurzeln erhalten wurden, stand in naher Verwandtschaft zu *Glomus intraradices* (Glomeraceae). Sporen von *G. intraradices* konnten jedoch nicht im Boden nachgewiesen werden. Vorherigen Untersuchungen zufolge traten Sporen des AM-Pilz *Glomus geosporum* dominant im Boden zentraleuropäischer Salzmarschen auf. Auch im Boden von Schreyahn waren in großer Anzahl Sporen vorhanden, die morphologische Merkmale von *G. geosporum* aufwiesen. Allerdings waren diese in der Mehrzahl deutlich kleiner als bisher für *G. geosporum* beschrieben. Aus den Klonbibliotheken beider Regionen ließ sich ableiten, dass *G. geosporum* innerhalb der untersuchten Pflanzenwurzeln nicht der Hauptbesiedler war. Desweiteren wurden Sequenzen aus Wurzeln erhalten, die sich bislang nicht kultivierten AM-Pilzen zuordnen ließen. Morphologische Strukturen, wie z. B. Sporen, die eine nähere Identifizierung dieser bisher unkultivierten AM-Pilze ermöglichen könnten, lagen nicht vor. Eine Zuordnung von AM-Pilzsequenzen aus Wurzeln in die Verwandtschaft der Archaeosporaceae trat nur bei der Untersuchung der ITS-Region auf.

1. Einleitung	6
1.1. Allgemeine Beschreibung der Mykorrhiza	6
1.1.1. Verschiedene Formen der Mykorrhiza.....	6
1.1.2. Vorkommen der AM-Pilze	6
1.1.3. Taxonomische Einteilung der Glomeromycota	6
1.1.4. Lebenszyklus der AM-Pilze.....	6
1.2. Morphologische Charakterisierung der AM-Pilze	6
1.3. Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifizierung und Bestimmung der AM-Pilz Diversität	6
1.4. Entstehung saliner Habitats	6
1.5. Anpassungsstrategien halophiler Pflanzen an die Bodensalinität	6
1.6. Motivation der vorliegenden Arbeit	6
1.7. Experimenteller Ansatz und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	6
2. Material und Methoden	6
2.1. Binnenland-Salzstelle Schreyahn – Geographische Lage und Geschichte	6
2.2. Untersuchte Pflanzenarten und Zeitpunkte der Probenentnahmen	6
2.3. Aufarbeitung der entnommenen Proben	6
2.3.1. Messung der elektrischen Leitfähigkeit und des pH-Wertes der Bodenproben	6
2.3.2. Reinigung der Pflanzenwurzeln	6
2.3.3. Färbung der zu untersuchenden Pflanzenwurzeln mit Trypanblau	6
2.3.4. Mikroskopische Bonitierung der gefärbten Wurzeln	6
2.4. Isolierung von DNA aus Pflanzenwurzeln, AM-Pilz-Sporen und Bakterien	6
2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus Wurzeln nach Raeder und Broda	6
2.4.2. Isolierung genomischer DNA aus Wurzeln nach Doyle und Doyle.....	6
2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E.coli</i> - Kulturen	6
2.4.4. Ausfällung von DNA aus wässriger Lösung.....	6
2.4.5. Isolierung von Sporen-DNA aus den vereinigten 45 µm- und 80 µm-Siebfraktionen.....	6
2.4.6. Behandlung der isolierten Nukleinsäuren aus Pflanzenwurzeln mit Aktivkohle	6
2.4.7. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren.....	6
2.5. Isolierung von AM-Sporen aus dem Boden	6
2.5.1. Einbettung von Sporen in PVLG (Polyvinylalkohollactoglycerin) zur Herstellung von Dauerpräparaten.....	6
2.5.2. Anfärbung der Sporenwandstrukturen durch Melzers Reagenz.....	6
2.5.3. Oberflächensterilisierung von AM-Sporen	6
2.5.4. Keimungsversuch in Abhängigkeit von der K ₂ CO ₃ -Konzentration des Mediums	6
2.5.5. Keimungsversuch in Anwesenheit einer Pflanzenwurzel	6
2.6. Amplifizierung von DNA-Segmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion	6
2.6.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse der PCR-Produkte der ITS-Region.....	6
2.6.2. Auftrennung der DNA-Fragmente durch horizontale Gelelektrophorese	6
2.6.3. Elution von DNA aus Agarosegelen	6

2.6.4.	Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM®-T Easy.....	6
2.7.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>-Zellen.....	6
2.7.1.	TSS-Methode zur Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	6
2.7.2.	Rubidiumchloridmethode zur Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	6
2.7.3.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	6
2.8.	Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte	6
2.8.1.	Selektion der transformierten Klone	6
2.8.2.	Restriktion der isolierten Plasmid-DNA mit <i>EcoRI</i>	6
2.8.3.	Sequenzierung der klonierten DNA-Abschnitte	6
2.9.	Analyse der DNA-Sequenzen.....	6
2.9.1.	Zusammenfassung ähnlicher Sequenzen zu AM-Sequenzgruppen	6
2.9.2.	Phylogenetische Auswertung von DNA-Sequenzen	6
2.9.3.	Test auf chimäre Sequenzen.....	6
3.	Ergebnisse.....	6
3.1.	Untersuchung der Bodenparameter am Standort Schreyahn.....	6
3.1.1.	Bestimmung des pH-Wertes der untersuchten Bodenproben	6
3.1.2.	Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der untersuchten Bodenproben	6
3.2.	Vorkommen der AM-Pilze an der Binnenland-Salzstelle Schreyahn.....	6
3.2.1.	Ergebnisse zum prozentualen Mykorrhizierungsgrad der untersuchten Pflanzen	6
3.2.2.	Ergebnisse zur Quantifizierung der AM-Sporen aus wurzelnahen Bodenproben.....	6
3.3.	Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze anhand der Sporen am Standort Schreyahn ..	6
3.3.1.	Einblick in die AM-Diversität am Standort Schreyahn anhand der Sporenmorphologie ...	6
3.3.2.	Charakterisierung unbekannter sporenähnlicher Strukturen aus Schreyahn.....	6
3.3.3.	Charakterisierung unterschiedlicher „Sporenvarianten“ von <i>Glomus geosporum</i>	6
3.3.4.	AM-Sporen innerhalb der Wurzeln von <i>Puccinellia distans</i>	6
3.3.5.	Sporen mit Sacculus in Wurzelnahe von <i>Puccinellia distans</i>	6
3.4.	Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln in Schreyahn anhand eines Fragments der 18S rDNA.....	6
3.5.	Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln in Schreyahn anhand der ITS-Region	6
4.	Diskussion.....	6
4.1.	Untersuchte Bodenparameter des Standortes Schreyahn.....	6
4.2.	Auftreten von AM-Pilzen in Schreyahn.....	6
4.3.	Diversität der AM-Pilze am Standort Schreyahn	6
4.3.1.	Einblick in die AM-Diversität anhand der Sporen	6
4.3.2.	Diversität der AM-Pilze innerhalb der mykorrhizierten Pflanzenwurzeln.....	6
5.	Zusammenfassung	6
6.	Literatur	6
7.	Anhang.....	6

Abb. 1.1	Stammbaum der Glomeromycota nach Schüßler (2004)	6
Abb. 1.2	Darstellung der intraradikalen AM-Pilzstrukturen	6
Abb. 2.1	Geographische Lage der Binnenland-Salzstelle Schreyahn	6
Abb. 2.2	Probenentnahmestelle und untersuchte Pflanzenarten.....	6
Abb. 2.3	Keimungsversuch in Anwesenheit einer Pflanzenwurzel	6
Abb. 2.4	Lage der Primer innerhalb einer rDNA-Einheit, verändert nach White <i>et al.</i> (1990)	6
Abb. 2.5	Karte des verwendeten Klonierungsvektors	6
Abb. 3.1	Mittlere pH-Werte der untersuchten Bodenproben aus Schreyahn.....	6
Abb. 3.2	Mittlere EC-Werte der untersuchten Bodenproben aus Schreyahn	6
Abb. 3.3	Mittlere Mykorrhizierungsgrade der untersuchten Pflanzenarten aus Schreyahn.....	6
Abb. 3.4	Bestimmung der mittleren Sporendichte in wurzelnahen Bodenproben der untersuchten Pflanzenarten in Schreyahn.....	6
Abb. 3.5	Quantifizierung der <i>Vaucheria erythrospora</i> -Zygoten aus Schreyahn und Barnstorf.....	6
Abb. 3.6	Quantifizierung der AM-Sporen aus wurzelnahen Bodenproben aus Barnstorf.....	6
Abb. 3.7	Erscheinungsformen der <i>Vaucheria erythrospora</i> -Zygoten aus Schreyahn.....	6
Abb. 3.8	Fotos und RFLP-Muster von <i>Glomus geosporum</i> -Sporen aus Schreyahn	6
Abb. 3.9	AM-Sporen innerhalb der Wurzeln von <i>Puccinellia distans</i> aus Schreyahn.....	6
Abb. 3.10	Fotos der AM-Sporen mit Sacculus aus Schreyahn	6
Abb. 3.11	RFLP-Muster aus Amplifikaten der Sporen mit Sacculus.....	6
Abb. 3.12	Einordnung der AM-Sporenssequenzen aus Schreyahn in einen Stammbaum der Glomeromycota (5,8S rDNA-ITS2)	6
Abb. 3.13	Einordnung der AM-Einzelsporenssequenzen aus Schreyahn in einen 18S rDNA-Stammbaum (550 bp Fragment) der Glomeromycota	6
Abb. 3.14	Grafik der Sequenzverteilung auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 - SSU_4	6
Abb. 3.15	Einordnung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 aus Schreyahn in einen 18S rDNA-Stammbaum (550 bp Fragment) der Glomeromycota.....	6
Abb. 3.16	Grafik der Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 und SSU_2	6
Abb. 3.17	Prozentuale Verteilung der Wurzelsequenzen auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4.....	6
Abb. 3.18	Prozentuale Verteilung der Sporenssequenzen auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4.....	6
Abb. 3.19	Sequenzverteilung auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4	6
Abb. 3.20	Einordnung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 aus Schreyahn in einen 5,8S rDNA-ITS2-Stammbaum (300 bp) der Glomeromycota.....	6
Abb. 3.21	Grafik der Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4	6
Abb. 3.22	Prozentuale Verteilung der Wurzelsequenzen auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4.....	6
Abb. 3.23	Rarefaction-Analyse der 18S rDNA- und 5,8S rDNA-ITS2-Klonbibliotheken aus Schreyahn	6

Tab. 2.1	Ausgewählte Pflanzenarten	6
Tab. 2.2	Zusammensetzung des verwendeten Minimalmediums.....	6
Tab. 2.3	Liste der verwendeten Primer	6
Tab. 2.4	Verwendete Restriktionsenzyme für die ITS-Region	6
Tab. 3.1	Auflistung der anhand ihrer morphologischen Merkmale durch Dr. E. Sieverding charakterisierten AM-Sporen	6
Tab. 3.2	Sequenzidentitäten <i>Glomus geosporum</i> -ähnlicher AM-Sporen zu Sequenzen des Isolates <i>Glomus geosporum</i> BEG11 (AJ239122 bzw. AJ245637)	6
Tab. 4.1	Bodenparameter und Mykorrhizierungswerte der Salzstellen Schreyahn und Terschelling im Vergleich	6
Tab. 4.2	Sporenanzahlen verschiedener Salzstellen im Vergleich.....	6

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
BEG	<i>La Banque Européenne des Glomales</i> (Kultursammlung für Inokula der Ordnung Glomales)
bp	Basenpaar(e) (<i>base pairs</i>)
C	Cytosin
ca.	circa
cm	Zentimeter
dATP	Desoxyadenosinphosphat
dCTP	Desoxycytidinphosphat
dGTP	Desoxyguanosinphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	elektrische Leitfähigkeit (<i>electric conductivity</i>)
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Acetat, Na-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
FAA	<i>formalin/acetic acid/alcohol</i>
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunden
IGS	<i>intergenic spacer</i>
INVAM	<i>International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Kulturmedium)
LSU	große Untereinheit (<i>large subunit</i>)
m	Meter
M	Molar
Max	Maximum
Min	Minimum
min	Minute(n)

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mS	MilliSiemens
MW	Mittelwert
N	Nord
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nom. ined.	<i>nomen ineditum</i>
Ø	Durchschnitt, Mittelwert
OD	optische Dichte
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Säurestärke (<i>potentia hydrogenii</i>)
rDNA	Desoxyribonukleinsäure aus Genbereichen, die für die ribosomale RNA codieren
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSU	kleine Untereinheit (<i>small subunit</i>)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TG	Trockengewicht
T _m	Schmelztemperatur
tRFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
tRFs	terminale Restriktionsfragmente
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
Vol	Volumen
W	West
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galaktosid

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Beschreibung der Mykorrhiza

1.1.1. Verschiedene Formen der Mykorrhiza

B. Frank verwendete im Jahr 1885 erstmalig den Begriff Mykorrhiza in einer Arbeit über die Symbiose zwischen Pilzen und Bäumen. Der Begriff Mykorrhiza leitet sich aus den griechischen Wörtern *mykes* (Pilz) und *rhiza* (Wurzel) her. Frank schrieb damals, dass „gewisse Baumarten überall in ihrem gesamten Wurzelsystem mit einem Pilzmycelium in Symbiose stehen, welches ihnen Ammendienste leistet und die ganze Ernährung des Baumes aus dem Boden übernimmt“ (Frank 1885). Heute bezeichnet man diese Symbiose zwischen Bäumen und Pilzen (Basidiomyceten und Ascomyceten) als ektotrophe Mykorrhiza. Bei dieser Mykorrhizaform umgibt ein dichter Hyphenmantel des symbiontischen Pilzes die Wurzel der Wirtspflanze. Interzellulär wachsende Hyphen bilden im Rindenparenchym der Wurzel das sogenannte „Hartigische Netz“ (Hartig 1851), dabei bleibt das Pilzmycel außerhalb der Zellwände (Werner 1987). Davon zu unterscheiden ist die endotrophe Mykorrhiza. Kennzeichnend für diese Mykorrhizaform ist es, dass die Hyphen des Pilzes in der Lage sind, die Zellwände zu penetrieren und in das Lumen der Zelle einzuwachsen ohne jedoch das Plasmalemma zu durchdringen. Die endotrophe Mykorrhiza umfasst nach Werner (1987) drei Untertypen, nämlich die Orchideenmykorrhiza, die Ericaceenmykorrhiza und die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Die Symbiose der arbuskulären Mykorrhizapilze ist Thema der vorliegenden Arbeit.

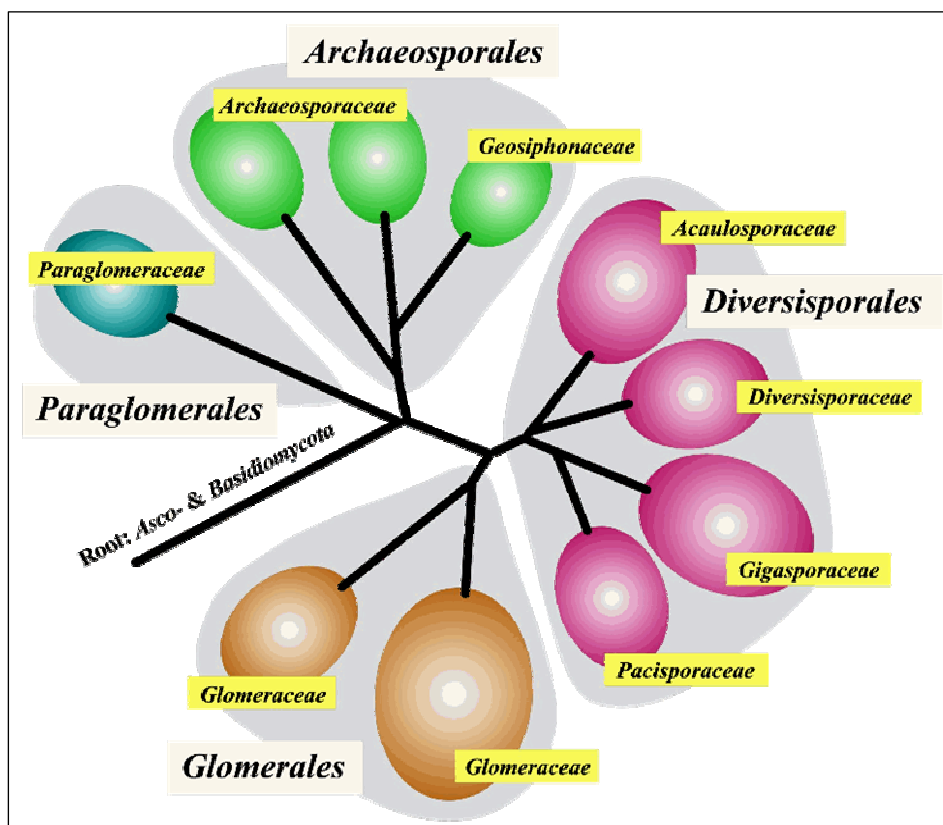
1.1.2. Vorkommen der AM-Pilze

Fossile Pilzhyphen- und Sporenfunde aus dem Ordovizium legen nahe, dass Glomerales-ähnliche Pilze bereits vor 460 Millionen Jahren existierten (Taylor *et al.* 1995; Redecker *et al.* 2000a) und eine Rolle bei der Besiedlung des Landes durch Pflanzen spielten. Heute stellt die AM eine der weit verbreitetsten Symbiosen überhaupt dar (Hayman 1982). So sind mehr als 80 % der höheren Pflanzen potentielle Wirte der AM-Pilze (Giovannetti *et al.* 1998). Die Wirtsspezifität der AM-Pilze wurde in der Vergangenheit als gering eingestuft (Werner 1987; Smith *et al.* 1997). Allerdings haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass Präferenzen der AM-Pilze in Bezug auf die Wirtspflanzen vorliegen können (Vandenkoornhuyse *et al.* 2002; Vandenkoornhuyse *et al.* 2003). In der Literatur wird in der Regel nur von wenigen nicht mykorrhizierbaren oder nur in geringem Maße mykorrhizierten Pflanzenfamilien berichtet (Harley *et al.* 1983; Peat *et al.* 1993). Dazu gehören die Familien der Brassicaceae, der Juncaceae, der Caryophyllaceae, der Chenopodiaceae, der Plumbaginaceae und der Cyperaceae.

1.1.3. Taxonomische Einteilung der Glomeromycota

Die frühere Zuordnung der AM-Pilze in die Klasse der Zygomyceten, Ordnung Glomales, beruhte hauptsächlich auf der Morphologie ihrer Sporen (Walker *et al.* 1993). Die taxonomische Klassifizierung der AM-Pilze wurde 2001 neu vorgenommen, da sich die damalige Gattung *Glomus* aufgrund von 18S rDNA-Sequenzanalysen als nicht monophyletisch erwies (Schwarzott *et al.* 2001). Die AM-Pilze werden seitdem in ein eigenes Phylum, die Glomeromycota, gestellt (Schübler *et al.* 2001a). Dieses ist unterteilt in die vier Ordnungen der Paraglomerales, Archaeosporales, Diversisporales und Glomerales mit insgesamt acht Familien (Paraglomeraceae, Archaeosporaceae, Geosiphonaceae, Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Pacisporaceae, Glomeraceae) und derzeit etwa 160 beschriebenen Arten. Die Archaeosporaceae und Glomeraceae bestehen dabei nochmals aus je zwei Untergruppen, wie in Abb. 1.1, die von Schübler (2004) entnommen wurde, dargestellt ist.

Abb. 1.1 Stammbaum der Glomeromycota nach Schübler (2004)



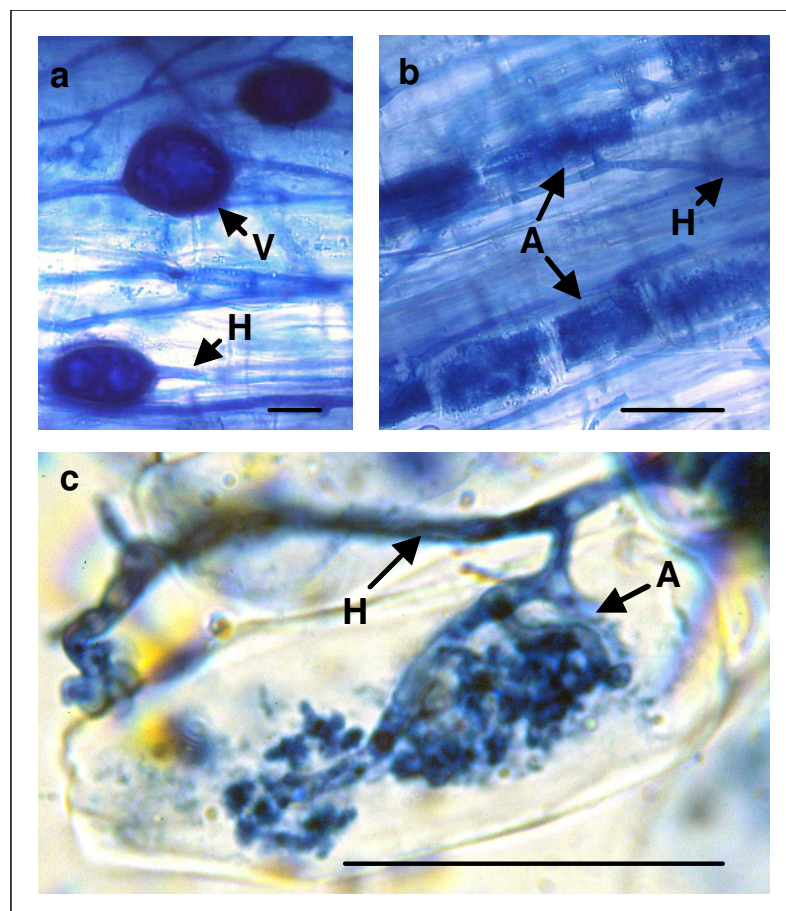
Die Abb. 1.1 zeigt die taxonomische Einteilung der Glomeromycota in die vier Ordnungen der Paraglomerales, Archaeosporales, Diversisporales und Glomerales (Schübler 2004).

1.1.4. Lebenszyklus der AM-Pilze

Die Sporen der AM-Pilze werden überwiegend vom extraradikalen Pilzmycel im Boden gebildet. Es gibt aber auch seltene Fälle, z. B. bei *Glomus intraradices*, bei denen es auch innerhalb der Pflanzenwurzel zur Sporenbildung kommt. Die Sporen können bis zu mehrere tausend Kerne enthalten (Viera *et al.* 1990; Hosny *et al.* 1998). Es ist noch ungeklärt, ob die Sporen homo- oder heterokaryotisch sind (Pawlowska *et al.* 2004; Bever *et al.* 2005). Unter geeigneten äußeren Bedingungen bilden AM-Sporen sogenannte Keimschläuche aus, die zu mehrere Zentimeter langen Hyphen auswachsen können. Treffen diese allerdings nicht innerhalb weniger Tage auf eine Pflanzenwurzel, die einen potentiellen Partner darstellt, sterben die Hyphen wieder ab und die Spore kehrt in den Ruhezustand zurück (Bago *et al.* 1998). Zu den pflanzlichen Signalsubstanzen, die bei der Partnerfindung eine Rolle spielen, scheinen Strigolactone aus der Gruppe der Sesquiterpene zu gehören. Akiyama *et al.* (2005) konnten 5-Desoxy-Strigol aus Wurzelexsudaten von *Lotus japonicus* isolieren und als einen der sogenannten *branching factors* identifizieren. Strigolactone können schon in sehr geringer Konzentration die Hyphenverzweigung von keimenden *Gigaspora margarita*-Sporen anregen. Die Verzweigung der Hyphen stellt einen der ersten Schritte der pilzlichen Wirtserkennung dar. Zu Beginn einer erfolgreichen Besiedlung schwellen die Pilzhyphen, bei Kontakt mit der Wurzeloberfläche, zu sogenannten Appressorien an und wachsen über diese in die Wurzel ein. Die Hyphen der AM-Pilze breiten sich in der Epidermis und im Rindenparenchym der Wirtswurzel sowohl intra- als auch interzellulär aus. Der Zentralzylinder und das Apikalmeristem werden nicht besiedelt. Die Pilzhyphen durchdringen die Zellwände der Wirtszelle, aber nicht das Plasmalemma (Harley *et al.* 1983). Typisch (und namensgebend) für die AM-Pilze ist die intrazelluläre Ausbildung von Arbuskeln, bei denen es sich um fein verzweigte, bäumchenartige Hyphenstrukturen handelt (siehe Abb. 1.2, b und c). Diese werden komplett von der pflanzlichen Plasmamembran umgeben, die somit zur periarbuskulären Membran wird. Auf diese Weise vergrößert sich die Protoplastenoberfläche der Wirtszelle. Die Arbuskel haben eine Lebensdauer von wenigen Tagen bis zu zwei Wochen (Werner 1987). Zwischen Pilz und periarbuskulärer Membran ist die apoplasmatische Matrix entstanden. Über diese Matrix findet überwiegend der Stoffaustausch zwischen den beiden Symbiosepartnern statt (Bonfante-Fasolo 1984; Gianinazzi-Pearson 1996). Eine zusätzliche Struktur, die von 80 % der AM-Spezies ausgebildet wird, sind die Vesikel (Smith *et al.* 1997). Diese entstehen durch Hyphenanschwellungen des intraradikalen Pilzmycels (siehe Abb. 1.2, a). Sie dienen der Speicherung der aufgenommenen Assimilate und weisen einen hohen Lipidanteil auf (Werner 1987). Die arbuskuläre Mykorrhiza bietet als mutualistische Beziehung Vorteile für beide Partner. Die AM-Pilze werden von der Wirtspflanze mit bis zu 20 % des fixierten Kohlenstoffes versorgt (Hayman 1982; Jakobsen *et al.* 1990). Der Pilz bekommt die Kohlenhydrate in Form von Hexosen (Shachar-Hill *et al.* 1995; Solaiman *et al.* 1997), die von den Hyphen aufgenommen werden können (Douds *et al.* 2000). Ein Vorteil für die Pflanze besteht in der effektiveren Aufnahme von Phosphat, Stickstoff und Mikronährelementen (Werner 1987). Des Weiteren steht durch das extraradikale Pilzmycel (Kothari *et al.* 1991) ein weitaus größeres Bodenvolumen für die Wasseraufnahme zur Verfügung, als es ausschließlich durch die Pflanzenwurzeln der Fall wäre. Zusätzliche Vorteile sind die erhöhte Resistenz gegenüber pathogenen Pilzen und Nematoden (Dehne 1982), sowie die Übertragung von

Schwermetalltoleranz (Hildebrandt *et al.* 1999; Kaldorf *et al.* 1999). Außerdem deuten die Ergebnisse von Ouziad *et al.* (2006) darauf hin, dass die AM-Pilze die Regulation der pflanzlichen Genexpression, z. B. von Aquaporinen, unter Salzstress beeinflussen. Dadurch wirken sie auf den pflanzlichen Wasserhaushalt. Während die meisten Pflanzen nur unter Stressbedingungen oder Nährstofflimitation eine Symbiose mit AM-Pilzen eingehen, geht man davon aus, dass die AM-Pilze ihren Lebenszyklus nicht ohne Wirtspflanze vervollständigen können, also obligat biotroph leben (Smith *et al.* 1997). Allerdings konnte vor kurzem (Hildebrandt *et al.* 2006) gezeigt werden, dass das Wachstum von *Glomus intraradices* SY 167 in Abwesenheit einer Wirtswurzel durch zwei *Paenibacillus validus*-Isolate bis zur Bildung von fertilen Sporen stimuliert werden konnte, die wiederum in der Lage waren Karottenwurzeln zu kolonisieren. In diesem Fall wurde der pilzliche Lebenszyklus ohne den pflanzlichen Wirt vollendet.

Abb. 1.2 Darstellung der intraradikalen AM-Pilzstrukturen



Die Abb. 1.2 stellt AM-Pilzstrukturen innerhalb einer (mit Trypanblau) angefärbten *Aster tripolium*-Wurzel dar. In Bild a sind Vesikel (V), in Bild b mehrere Arbuskel (A) an Hyphen (H) zu erkennen. Bild c zeigt eine aus dem Gewebeverband gelöste Wurzelzelle mit einem Arbuskel. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils 50 μm .

1.2. Morphologische Charakterisierung der AM-Pilze

Die morphologische Bestimmung von AM-Pilzen bereitet einige Probleme, da keine Fruchtkörper, wie z. B. bei den Basidiomyceten ausgebildet werden. Die „traditionelle“ Klassifizierung von AM-Pilzen erfolgt anhand der Morphologie ihrer Sporen (Gerdemann *et al.* 1974; Walker *et al.* 1993). Allerdings ist die Charakterisierung der AM-Sporen einzig aufgrund morphologischer Kriterien sehr schwierig, da sich die Sporen oftmals äußerlich sehr ähneln und sich die morphologischen Merkmale im Laufe der Sporen-Ontogenese ändern (Clapp *et al.* 1995; Redecker *et al.* 2003). Es gibt weltweit nur wenige Spezialisten, die über entsprechende Kenntnisse und Erfahrung verfügen. Daher ist es wichtig, die morphologische Gruppenzuordnung auf DNA-Ebene zu überprüfen. Auch die Unterscheidung von intraradikalen AM-Pilz-Strukturen ist auf Spezies-Ebene visuell kaum möglich und muss daher durch molekularbiologische Untersuchungsmethoden erfolgen.

1.3. Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifizierung und Bestimmung der AM-Pilz Diversität

Die molekularbiologischen Methoden zur Analyse von AM-Pilzpopulationen in Pflanzenwurzeln oder anhand von Sporen im Boden basieren häufig auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.* 1985). Oftmals werden die rRNA-Gene als Zielbereich für Sequenzanalysen gewählt, denn sie sind ubiquitär verbreitet und liegen hoch repetitiv vor, was die Anzahl der Matrizen erhöht. Die rRNA-Gene sind einerseits stark konserviert, so dass die Verwendung von Universalprimern (Simon *et al.* 1992) möglich ist. Andererseits bieten sich durch die ITS (*internal transcribed spacer*)-Regionen hoch variable Bereiche, so dass genetische Varianzen mittels PCR, anschließender RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)-Analyse und/oder Sequenzierung der Amplifikate, festgestellt werden können (Lloyd-MacGilp *et al.* 1996; Redecker *et al.* 1997; Landwehr *et al.* 2002; Renker *et al.* 2003). Auch die Regionen der 18S rDNA (Helgason *et al.* 1998; Chelius *et al.* 1999; Helgason *et al.* 1999; Daniell *et al.* 2001; Schwarzott *et al.* 2001; Schüßler *et al.* 2001b; Wirsel 2004) und 28S rDNA (Van Tuinen *et al.* 1998; Jacquot *et al.* 2000; Kjølner 2000; Kjølner *et al.* 2001; Turnau *et al.* 2001; Rosendahl *et al.* 2004; Stukenbrock *et al.* 2005b) enthalten ausreichend variable Bereiche, so dass sie für vergleichende Sequenz-Analysen herangezogen werden. Allerdings gibt es im Vergleich zur ITS- und 18S rDNA-Region eine verhältnismäßig geringe Anzahl verfügbarer 28S rDNA Sequenzdaten, so dass für ökologische Ansätze, z. B. Diversitätsuntersuchungen von Umweltproben mittels vergleichender Sequenzanalyse, die Bereiche der ITS- oder 18S rDNA-Region besser geeignet erscheinen als die der 28S rDNA (Renker *et al.* 2003).

1.4. Entstehung saliner Habitate

Die salinen Böden der Erde machen über 7 % der Landoberfläche aus (Jain *et al.* 1989). Der erhöhte Bodensalzgehalt von Küstengebieten und Binnenland-Salzstellen ist auf natürliche Salzvorkommen zurückzuführen. Aber auch durch anthropogene Maßnahmen, beispielsweise durch das winterliche Streuen von Salz bei Eisglätte, kann die Bodensalinität ansteigen. Binnenland-Salzstellen sind durch oberflächennahe Salzlagerstätten entstanden. Gelangt das Salz durch natürliche Vorgänge an die Oberfläche, handelt es sich um eine primäre Binnenland-Salzstelle. Bei einer sekundären Binnenland-Salzstellen sind anthropogene Einflüsse, beispielsweise der Bergbau, dafür verantwortlich. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Binnenland-Salzstelle bei Schreyahn in Niedersachsen existiert aufgrund des dort bis 1926 betriebenen Kalisalzbergbaus. (Guder *et al.* 1998) beschreiben die Halden der Kalisalzindustrie sogar als „die wichtigsten sekundären Binnenland-Salzstellen“. Der Verlust des deutschen Kalimonopols Anfang der 20er Jahre führte zu einer zeitnahen Entstehung zahlreicher Kalihalden. Diese wurden von Guder *et al.* (1998) zu vergleichenden Untersuchungen, z.B. zur Ausbreitungsdynamik der binnenländischen Salzvegetation, anhand von 16 Kalihalden im nördlichen Harzvorland herangezogen.

1.5. Anpassungsstrategien halophiler Pflanzen an die Bodensalinität

Hohe Salzkonzentrationen im Boden können physiologische Funktionsstörungen bei Pflanzen bewirken, die sich in einer Wachstumsbeeinträchtigung äußern. Neben der toxischen Wirkung der Ionen, wird durch das negative Wasserpotential des Bodens die Wasserabsorption durch die Wurzel behindert. Daraus kann Trockenstress resultieren (Stocker 1928). Pflanzen, die in solchen salinen Habitaten leben können, werden als Halophyten bezeichnet. Die Artenzahl einer Pflanzengesellschaft ist unter extremen Standortbedingungen im Allgemeinen niedrig (Strasburger *et al.* 1998). So werden von den meisten Autoren insgesamt nur 26 Arten zur Gruppe der typischen Salzpflanzen in Mitteleuropa gerechnet (Horst *et al.* 1976).

Halophyten haben unterschiedliche Mechanismen zur Anpassung entwickelt. So kann das Salz von einigen Pflanzen in der Vakuole angereichert und durch vermehrte Wasseraufnahme ein Verdünnungseffekt erzielt werden (z. B. *Salicornia europaea*). Dieser Mechanismus wird als Sukkulenz bezeichnet. Bei anderen wird das Salz durch Drüsen ausgeschieden (z. B. *Armeria maritima*, *Limonium vulgare*) oder durch den Abwurf von Blasenhaaren (z. B. *Atriplex littoralis*) abgegeben. Eine weitere Möglichkeit ist das Abstoßen von Organen, die Salz akkumuliert haben (z. B. *Aster tripolium*, *Plantago maritima*). Einige Vertreter der Poaceae können durch einen erhöhten Verdunstungsschutz dem Trockenstress in salinen Habitaten entgegenwirken. Diese Gräser schützen sich vor dem Austrocknen durch das Einrollen ihrer Blätter (Verringerung der Blattoberfläche und „Abschirmung“ der Stomata).

Die unterschiedlich ausgeprägte Toleranz der verschiedenen Halophyten resultiert in einer charakteristischen Zonierung der Salzflora, die abhängig vom Bodensalzgradienten ist. Binnenland-

Salzstellen weisen ähnliche Pflanzengesellschaften wie die salinen Habitats der Küste auf. Das trifft auch auf die in dieser Arbeit untersuchte Binnenland-Salzstelle Schreyahn zu, obwohl dort als Salz Kaliumcarbonat anstelle von Natriumchlorid im Boden dominiert. Typische Halophyten der Küste, wie beispielsweise *Salicornia europaea* (Queller), *Aster tripolium* (Salzaster), *Juncus gerardii* (Salz-Binse), *Spergularia marina* (Salz-Schuppenmiere), *Glaux maritima* (Strand-Milchkraut), *Triglochin maritimum* (Strand-Dreizack) oder *Puccinellia distans* (Gemeiner Salzschwaden) haben sich auch in Schreyahn angesiedelt. An der Küste tritt allerdings neben *Puccinellia distans* das Andelgras *Puccinellia maritima* weitaus häufiger auf. Anscheinend spielt bei der Besiedlung eines salinen Habitats nicht die spezielle Ionenzusammensetzung der Salze, sondern das osmotische Potential des Bodens und somit die physiologische Trockenheit eine Rolle (Schimper 1898). Sowohl in Schreyahn als auch an ungarischen Alkalisalzstellen (mit Na_2CO_3 bzw. Na_2SO_4 als Bodensalz) konnte die typische, in Abhängigkeit von der Bodensalzkonzentration zonierte Salzflora der Küsten und NaCl-Binnenland-Salzstellen beobachtet werden (Landwehr *et al.* 2002). Die ursprüngliche Besiedlung der isoliert liegenden Binnenland-Salzstellen durch die Halophyten ist möglicherweise auf die Samenverbreitung durch Zugvögel zurückzuführen.

1.6. Motivation der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Diversität der AM-Pilzpopulation typischer Halophyten des deutschen Binnensalzstandortes Schreyahn im Hannoverschen Wendland (Niedersachsen) untersucht werden.

Das Auftreten von AM-Pilz-Sporen und die Mykorrhizierung von Pflanzen an feuchten und salinen Habitats wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wird von einer Behinderung bzw. Hemmung des AM-Pilzwachstums und somit der Mykorrhizierung von Pflanzen durch hohe Salzkonzentrationen berichtet (Kim *et al.* 1985; Juniper *et al.* 1993; McMillen *et al.* 1998; Knolle 2004). Andererseits konnten wiederholt mykorrhizierte Pflanzenwurzeln und AM-Sporen im Boden saliner Habitats nachgewiesen werden, wie die Untersuchungen an europäischen Salzstandorten der Küste und des Binnenlandes (Rozema *et al.* 1986; Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Stodden 2004; Manal 2006) sowie an der indischen Küste (Sengupta *et al.* 1990) und der Alvord-Wüste in Oregon (Ho 1987) zeigten. So wiesen Halophyten, z. B. *Aster tripolium* (Asteraceae), *Artemisia maritima* (Asteraceae) oder *Plantago maritima* (Plantaginaceae) arbuskuläre Mykorrhizen auf. Auch *Salicornia europaea*, ein Vertreter der als nicht oder nur gering mykorrhizierbar geltenden Familie der Chenopodiaceae, wurde in der Vergangenheit mykorrhiziert vorgefunden (Hildebrandt *et al.* 2001). Das Vorkommen von AM-Pilz-Sporen in Salzböden bzw. die Mykorrhizierung von Halophyten wirft die Frage auf, ob die AM-Pilze den Pflanzen dieser Extremstandorte zu einer erhöhten Toleranz bei Salzstress bzw. dem daraus resultierenden physiologischen Trockenstress verhelfen können. Dahinter verbirgt sich ein enormes Anwendungspotential im Hinblick auf die Rekultivierung von Gebieten, die durch eine zu hohe Bodensalinität landwirtschaftlich unbrauchbar geworden sind.

Ein Einfluss von AM-Pilzen auf Pflanzen unter Salz- bzw. Trockenstress konnte sowohl von Ouziad *et al.* (2006) als auch von Porcel *et al.* (2006) beobachtet werden. Beide Autoren konnten eine

Veränderung im pflanzlichen Wasserhaushalt zeigen. Ouziad *et al.* (2006) setzten Tomaten unter Salzstress als Versuchspflanzen ein, während von Porcel *et al.* (2006) Sojabohnen und Kopfsalat unter Trockenstress untersucht wurden. In beiden Veröffentlichungen wird eine Herunterregulierung der PIP (*plasma membrane intrinsic protein*)-Aquaporin-Gen-Expression beschrieben, die bei den mykorrhizierten Pflanzenwurzeln deutlich stärker ausfiel als bei den nichtmykorrhizierten Kontrollpflanzen. Scheloske *et al.* (2004) zeigten einen Einfluss von AM-Pilzen auf die NaCl-Verteilung innerhalb des Wurzelgewebes von *Aster tripolium* unter Salzstress durch PIXE (*proton induced X-ray emission*)-Messungen.

In Bezug auf Schwermetalle konnte eine Toleranzvermittlung durch AM-Pilze auf Pflanzen nachgewiesen werden (Hildebrandt *et al.* 1999; Kaldorf *et al.* 1999). Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass ein AM-Pilzisolat vom natürlichen schwermetallbelasteten Standort eine höhere Toleranz vermitteln konnte, als AM-Pilze, die von einem unbelasteten Standort isoliert wurden (Hildebrandt *et al.* 1999). Auch die Charakterisierung und Isolierung der „effektivsten“ AM-Pilzgruppe aus den natürlichen salinen Habitaten ist erstrebenswert. Eine „effektive“ AM-Pilzgruppe, die ubiquitär und vor allem unabhängig von der speziellen Ionen-Zusammensetzung des vorliegenden Bodensalzes Halophyten besiedelt, könnte auf eine Toleranzvermittlung durch AM-Pilze bei physiologischer Trockenheit hindeuten.

Unter diesem Aspekt stellt die ehemalige Kali-Abraumhalde Schreyahn ein besonders interessantes Untersuchungsgebiet dar, weil dort Kaliumcarbonat (K_2CO_3) als Salz im Boden dominiert. Während es sich bei den oben erwähnten salinen Habitaten der Küste und des Binnenlandes überwiegend um NaCl oder auch Na_2CO_3 bzw. Na_2SO_4 Salzstellen handelt, liegt im Vergleich dazu in Schreyahn sowohl ein Austausch der Kationen als auch der Anionen vor. Die charakteristische Salzflora in Schreyahn zeigt, dass die spezielle Ionen-Zusammensetzung des Bodensalzes anscheinend keinen Einfluss auf die Pflanzenwelt hat. Daraus ergibt sich die Frage, ob und welche Unterschiede und/oder Parallelen sich in der AM-Pilzpopulation von Schreyahn im Vergleich zu den zuvor erwähnten salinen Habitaten darlegen.

In der Vergangenheit wurde vermutet, dass der AM-Pilz *Glomus geosporum* bei der Vermittlung von Salz- bzw. Trockentoleranz an Salzstandorten eine Rolle spielt. In den untersuchten europäischen, salinen Habitaten trat *Glomus geosporum* als dominierender Sporentyp im Boden auf (Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Janetta 2001; Landwehr *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004). Zunächst wurde in einem Gewächshausversuch mit *Glomus geosporum* als Inokulum eine Steigerung des Pflanzenwachstums unter erhöhten Salzkonzentrationen beobachtet (Janetta 2001). Allerdings konnte dieser Effekt in nachfolgenden Wachstumsversuchen nicht bestätigt werden (Wilde 2002; Knolle 2004). Die Rolle von *Glomus geosporum* bei der Vermittlung von Salz- bzw. Trockentoleranz erscheint seitdem fraglich.

Das Vorkommen bestimmter AM-Sporen in der Nähe einer Wurzel bedeutet keinesfalls, dass zwangsläufig eine Besiedlung dieser Wurzel durch eben diese AM-Pilze erfolgt ist. Es ist ebenso möglich, dass andere Pflanzen in der Nachbarschaft kolonisiert wurden. Auch aus der Abwesenheit von Sporen kann nicht auf die intraradikale AM-Pilzpopulation rückgeschlossen werden, denn es könnte der Fall vorliegen, dass ein sehr effektiver Wurzelbesiedler gar nicht oder zum Untersuchungszeitpunkt nicht sporuliert hat (Sanders *et al.* 1996).

Von Interesse war auch eine mögliche Änderung der pilzlichen Diversität entlang des Salzgradienten im Boden von Schreyahn. Deshalb wurden Halophyten mit unterschiedlich ausgeprägter Salztoleranz untersucht (*Aster tripolium*, *Puccinellia distans* und *Salicornia europaea*), die sich in der Vergangenheit als mykorrhiziert erwiesen hatten (Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Stodden 2004; Manal 2006) und unterschiedliche Konzentrationsstufen innerhalb des Bodensalzgradienten repräsentieren.

Eine weitere Frage war, ob sich die für Extremstandorte typische eingeschränkte pflanzliche Artenvielfalt des untersuchten Binnensalzstandortes auch in der Diversität der AM-Pilze widerspiegelt. Es ist bekannt, dass einerseits die Diversität der AM-Pilze die Zusammensetzung von Pflanzengesellschaften beeinflusst (Van der Heijden *et al.* 1998a; Van der Heijden *et al.* 1998b), andererseits sich die pflanzliche Artenvielfalt aber auch auf die Vielfalt der AM-Pilze auswirken kann (Johnson *et al.* 2003).

1.7. Experimenteller Ansatz und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Diversität der AM-Pilzpopulation der Binnenland-Salzstelle Schreyahn wurde anhand von drei halophilen Pflanzenarten (*Aster tripolium*, *Puccinellia distans* und *Salicornia europaea*) untersucht. Die Pflanzenentnahme erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Eine Besiedlung dieser Pflanzenarten durch AM-Pilze war bereits in früheren Arbeiten festgestellt worden (Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Stodden 2004; Manal 2006). Zunächst wurde der Mykorrhizierungsgrad der zu untersuchenden Pflanzenwurzeln und die Sporendichte in Wurzelnähe bestimmt, um das Vorkommen von AM-Pilzen in Schreyahn zu überprüfen. Ein erster Einblick in die Diversität der AM-Pilze am Standort wurde über eine morphologische Charakterisierung der Sporen in Wurzelnähe ermöglicht (vorgenommen von Dr. E. Sieverding). Aus der An- oder Abwesenheit von AM-Sporen im wurzelnahen Boden kann jedoch nicht auf die intraradikale AM-Pilzpopulation rückgeschlossen werden, wie unter Abschnitt 1.6 ausführlich dargelegt wurde.

Deshalb richtete sich das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit auf die molekularbiologische Charakterisierung der AM-Pilz-Diversität innerhalb der Wurzeln. Mittels PCR wurde die AM-Pilz-DNA im Bereich der ITS- und der 18S rDNA-Region amplifiziert. Es wurden von beiden Regionen Klonbibliotheken für die verschiedenen Pflanzenarten und die zwei Probenentnahmezeitpunkte erstellt und phylogenetisch ausgewertet. Diese zweifache Vorgehensweise diente einerseits der Absicherung, andererseits der Ergänzung, da weder das 18S- noch das ITS-System die Glomeromycota komplett erfassen.

Die Zielsetzungen und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit können folgendermaßen zusammengefasst werden:

1. Untersuchung der AM-Pilz Diversität am Standort Schreyahn
 - Spiegelt sich die eingeschränkte pflanzliche Artenvielfalt in einer Reduktion der AM-Pilz Diversität wider?
 - Gibt es in der Diversität der Wurzelkolonisierer eine Abhängigkeit vom Bodensalzgradienten bzw. von der Pflanzenspezies?
 - Zeigen sich Unterschiede zwischen der Sporen- und intraradikalen AM-Diversität?
 - Ändert sich die Artenzusammensetzung mit der Zeit, d. h. sind Unterschiede zwischen den zwei Probenentnahmezeitpunkten zu erkennen?
 - Gibt es einen Hauptkolonisierer an salinen Habitaten und was zeigt der Vergleich mit anderen Salzstellen?

2. Effektivität der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden
 - Wie verhalten sich die Aussagen zur AM-Diversität nach Erstellung von Klonbibliotheken aus den Bereichen der ITS- und 18S rDNA-Region zueinander, d. h. sind die beiden angewandten Primersysteme gleich effektiv?

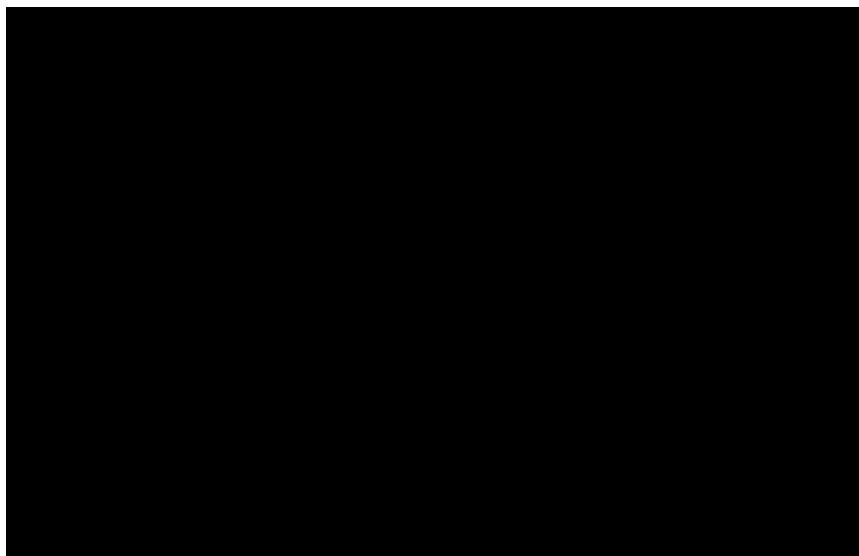
2. Material und Methoden

2.1. Binnenland-Salzstelle Schreyahn – Geographische Lage und Geschichte

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Binnenland-Salzstelle befindet sich im niedersächsischen Landkreis Lüchow-Dannenberg (Hannoversches Wendland), in Nachbarschaft zum Rundlingsdorf Schreyahn (rote Markierungen, Abb. 2.1). Die geographischen Koordinaten der Salzstelle wurden mit GPS 12 (Garmin, Kansas, USA) ermittelt: 52° 55,887'N, 11° 04,608'E.

Bis 1926 wurde im Probenentnahmegebiet Kalisalzbergbau betrieben. Das seit 1968 unter Naturschutz stehende, 9,75 ha große Gebiet, deckt sich weitgehend mit dem früheren bergbaulichen Betriebsgelände. Die Salzstelle wird landschaftlich geprägt durch einen 1,3 ha großen „Salzsee“ und zwei Rückstandshalden (Horst *et al.* 1976). In den Rückstandshalden solcher ehemaliger Abbaugelände kommen häufig auch Steinsalz und Sulfate vor, je nach Verfahrensart der Kaliindustrie (Guder *et al.* 1998). Somit ist anzunehmen, dass neben dem dominierenden Kaliumcarbonat auch noch andere Salzarten im Boden des Standortes vorliegen. Dennoch weist der Standort die typische, in Abhängigkeit von der Bodensalzkonzentration, zonierte Salzflora der Küsten und NaCl-Binnenland-Salzstellen auf. Diese Zonierung konnte aber auch an ungarischen Alkalisalzstellen beobachtet werden (Landwehr *et al.* 2002).

Abb. 2.1 Geographische Lage der Binnenland-Salzstelle Schreyahn



Die Abb. 2.1 zeigt links die Lage des Standortes innerhalb Deutschlands, rechts einen detaillierten Kartenausschnitt des Landkreises Lüchow-Dannenberg (Standort jeweils rot markiert). Der Maßstab der Deutschlandkarte beträgt ca. 1 : 10.000.000; der des Kartenausschnittes ca. 1 : 10.000 (Quelle: www.Stadtplandienst.de).

2.2. Untersuchte Pflanzenarten und Zeitpunkte der Probenentnahmen

Die untersuchten Pflanzenarten, deren Wurzeln zur DNA-Isolierung eingesetzt und deren Mykorrhizierungsgrad bestimmt wurden, waren *Aster tripolium*, *Puccinellia distans* und *Salicornia europaea* (Tab. 2.1). Diese Pflanzen wurden für die Untersuchungen ausgewählt, weil sie verschiedene Konzentrationsstufen innerhalb des Bodensalzgradienten widerspiegeln (Ellenberg 1963), wie in Abb. 2.2 dargestellt ist. Hinzu kommt, dass sowohl Salzstellen der Küste, als auch des Binnenlandes in früheren Arbeiten mykorrhizierte Vertreter von *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* aufwiesen (Renne 1999; Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Stodden 2004; Manal 2006). Auch Exemplare von *Salicornia europaea*, aus der als nicht mykorrhizierbar geltenden Familie der Chenopodiaceae, wurden vereinzelt in der Vergangenheit an einer Salzstelle mykorrhiziert vorgefunden (Hildebrandt *et al.* 2001).

Die Proben wurden im September 2002 und im Juni 2003 mit Genehmigung der Naturschutzbehörde (Bezirksregierung Lüneburg) entnommen. Der Entwicklungsstand der Versuchspflanzen wies einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Entnahmezeitpunkten auf: Die Salzaster stand im September 2002 in voller Blüte und die Quellerflur zeigte bereits die herbstliche Rotfärbung (siehe Abb. 2.2, links). Im Juni 2003 hingegen war im Asterbestand noch keine Knospenbildung zu erkennen und die Quellerzone erschien einheitlich grün. Die Pflanzen wurden mit den Wurzelballen bis zu einer Tiefe von etwa 20 cm entnommen und nach dem Transport bis zur Verarbeitung bei ca. 6 °C gelagert.

Abb. 2.2 Probenentnahmestelle und untersuchte Pflanzenarten

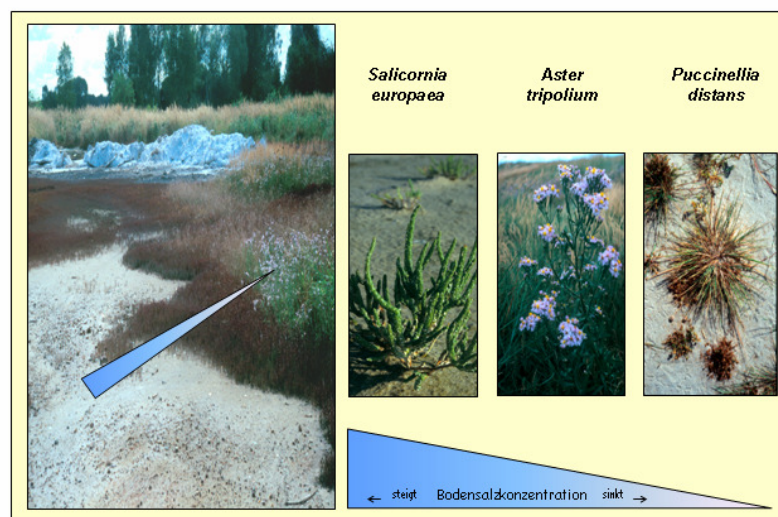


Abb. 2.2 zeigt links die Probenentnahmestelle mit der typischen Zonierung der halophilen Pflanzen in Abhängigkeit von dem Salzgradienten im Boden (blauer Balken). Rechts sind Exemplare der drei untersuchten Pflanzenarten abgebildet. Die Fotos wurden im September 2002 (von Prof. H. Bothe) aufgenommen.

Tab. 2.1 Ausgewählte Pflanzenarten

Pflanzenart		Familie
<i>Puccinellia distans</i> Parl.	Gemeiner Salzschwaden	Poaceae
<i>Aster tripolium</i> L.	Salzaster	Asteraceae
<i>Salicornia europaea</i> L.	Queller	Chenopodiaceae

Tab. 2.1 listet die untersuchten Pflanzenarten und deren Familienzugehörigkeit auf.

2.3. Aufarbeitung der entnommenen Proben

2.3.1. Messung der elektrischen Leitfähigkeit und des pH-Wertes der Bodenproben

Von jeder Bodenprobe wurden ca. 50 g Trockengewicht (bei 105 °C, 12 h getrocknet) gemörsert, gesiebt und mit H₂O_{bidest.} gesättigt, um eine homogene Bodenpaste für die Messung zu erhalten. Eine Probe galt als gesättigt, wenn eine mit einem Spatel gezogene Furche nach kurzem Anstoßen der Schale sofort wieder verschwand. Die mit Wasser gesättigten Proben wurden dann für die pH-Wert- und Leitfähigkeitsmessungen eingesetzt. Die Messungen erfolgten mit dem Universalgerät Multi 340i (Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, D-82362 Weilheim) nach Anleitung des Herstellers. Die vom Hersteller bereits vorgenommene Eichung des Gerätes (pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit) wurde mittels Referenzlösungen überprüft.

2.3.2. Reinigung der Pflanzenwurzeln

Die Wurzeln der Versuchspflanzen wurden zunächst unter fließendem Leitungswasser gründlich von anhaftender Erde befreit und darauffolgend vorsichtig mit Hilfe einer Präpariernadel getrennt. Auf diese Weise konnten Wurzeln entfernt werden, die nicht eindeutig der jeweiligen Versuchspflanze zuzuordnen waren. Die Dominanz einzelner Pflanzenarten in den jeweiligen Zonen unterschiedlicher Bodensalzkonzentration minimierte darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit, dass Wurzeln verschiedener Pflanzenarten ineinander wachsen konnten.

2.3.3. Färbung der zu untersuchenden Pflanzenwurzeln mit Trypanblau

Ein Teil der gereinigten Wurzeln der Versuchspflanzen wurde sofort gefärbt oder zur Fixierung (bis zum Zeitpunkt der Färbung) in Schnappdeckelgläschen überführt, die 5 ml FAA (Formalin/Acetic Acid/Alcohol)-Fixierlösung enthielten.

Zusammensetzung der FAA-Fixierlösung nach (Phillips *et al.* 1970):

45,85 % H₂O

45,85 % (v/v) Ethanol

6 % (v/v) Formaldehyd

2,3 % (v/v) Eisessig

Die Wurzelfärbung mit Trypanblau (C.I. 23850; Direct Blue 14; Sigma) ermöglicht die Erkennung der AM-Pilzstrukturen (siehe Abb. 1.2) und somit die Bonitierung, d. h. die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades (Phillips *et al.* 1970).

Zusammensetzung der Färbelösung:

0,05 % (w/v) Trypanblau,

gelöst in Lactoglycerol (1:1:1 Lactat, Glycerin, H₂O)

Zunächst wurden die Wurzeln für 25 min in 10 % KOH bei 90 °C inkubiert, was eine Aufhellung der Wurzeln bewirkte. Anschließend wurden die Wurzeln wiederholt mit Leitungswasser gewaschen und danach für 30 min in der Trypanblau-Färbelösung angefärbt. Die Entfärbung der Proben erfolgte in 50 % (v/v) Glycerin-H₂O. Die Pilzstrukturen behielten hierbei die blaue Farbe, nur das Pflanzengewebe wurde entfärbt.

Die mit Trypanblau gefärbten Wurzelstücke wurden auf einen Objektträger überführt. Unter dem Mikroskop (Zeiss PM 6) wurden die Wurzelstücke bei 125facher Vergrößerung auf die Präsenz von AM-Pilzstrukturen (Arbuskel, Vesikel, Mycel) hin untersucht.

2.3.4. Mikroskopische Bonitierung der gefärbten Wurzeln

Zur Bonitierung, also zur mikroskopischen Bestimmung des Verpilzungsgrades der Wurzelstücke, wurde die von Schmitz *et al.* (1991) modifizierte „grid-line-intersect“ Methode (Ambler *et al.* 1977) angewendet. Dazu wurden die nach der oben beschriebenen Methode gefärbten Wurzelstücke auf einem Objektträger verteilt und unter dem Mikroskop (Zeiss PM 6) bei 125facher Vergrößerung betrachtet. Jedes im Bildausschnitt – entsprechend 1,4 mm Wurzellänge – sichtbare Wurzelstück wurde auf die Existenz von AM-Pilzstrukturen (Arbuskel, Vesikel, Innenmycel) hin überprüft. Ein Wurzelstück galt als mykorrhiziert, wenn mindestens eine der AM-Pilzstrukturen zu erkennen war. Der prozentuale Gesamtmykorrhizierungsgrad ermittelt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der infizierten

Wurzelsegmente zur Gesamtmenge der betrachteten Wurzelstücke. Berechnet wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes. Um statistisch relevante Werte zu erhalten, wurden ca. 300 Wurzelstücke untersucht.

2.4. Isolierung von DNA aus Pflanzenwurzeln, AM-Pilz-Sporen und Bakterien

Die DNA-Isolierung aus den Pflanzenwurzeln erfolgte zunächst nach der Methode von Raeder *et al.* (1985), wurde aber durch die Methode von Doyle *et al.* (1990) ersetzt, als sich diese in Hinblick auf die isolierte DNA-Menge als ergiebiger erwies.

2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus Wurzeln nach Raeder und Broda

Das geerntete, pflanzliche Material wurde mit flüssigem Stickstoff in einer vorgekühlten Schale zu einem feinen Pulver gemörsert. Je 500 mg dieses Pulvers wurden mit 5 ml eines 1:1 Gemisches aus Extraktionspuffer und PCI (Tris-Acetat (TE, s.u.) gesättigtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v)) homogenisiert, in Reaktionsgefäße überführt, kurz ausgeschüttelt und 15 min bei 13000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 µl/ml 100x RNase-Lösung versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ausschütteln mit dem gleichen Volumen PCI und 10 min Zentrifugation bei 18300 *g* wurde die Oberphase abpipettiert.

Extraktionspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8,5
 250 mM NaCl
 25 mM EDTA
 0,5 % (w/v) SDS
 0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8
 1 mM EDTA

RNase-Lösung (100x): 10 mg/ml RNase A (Merck) gelöst in
 15 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Eventuell vorhandene DNasen wurden durch 15 min Inkubation bei 100 °C denaturiert.

2.4.2. Isolierung genomischer DNA aus Wurzeln nach Doyle und Doyle

Etwa 500 mg pflanzliches Wurzelmaterial wurde im vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Danach wurden 5 ml 60 °C warmer CTAB-Puffer hinzugegeben, bis zum Auftauen weitergemörsert und die Mischung anschließend auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Nach 30 min Inkubation bei 60 °C, unter gelegentlichem leichtem Schütteln, erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen PCI. Die anschließende Zentrifugation bei 18300 *g* dauerte 15 min. Daraufhin wurde die Oberphase abgenommen und mit dem gleichen Volumen CI (Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1, v/v) ausgeschüttelt. Diese Ansätze wurden 5 min bei 18300 *g* zentrifugiert und die wässrige Oberphase im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

CTAB-Puffer: 2% (w/v) CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid; Sigma)
 1,4 M NaCl
 20 mM EDTA
 100 mM Tris/HCl pH 8,0

2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* - Kulturen

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach der von Birnboim *et al.* (1979) publizierten Methode durchgeführt. Die ausgewählten Bakterienkolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C herangezogen. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden je 1,5 ml dieser Kulturen 2 min bei 18300 *g* zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension der Bakterien in 100 µl BD1, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei RT. Daraufhin wurden 200 µl BD2 hinzugefügt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl BD3 betrug die Inkubationszeit auf Eis ebenfalls 5 min. Das Präzipitat wurde dann für 10 min bei 18300 *g* zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen PCI versetzt. Nach 10 min Zentrifugation bei 18300 *g* wurde die wässrige Oberphase abgenommen.

BD1: 50 mM Glukose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris/HCl pH 8,0

BD2: 0,2 M NaOH
 1 % SDS

BD3: 5 M Kaliumacetat
 mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt

LB-Medium: 10 g/l Bacto Trypton (Difco)
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl

2.4.4. Ausfällung von DNA aus wässriger Lösung

Die isolierte DNA konnte durch Zugabe von Alkohol aus der wässrigen Lösung gefällt werden. Zur DNA-Lösung wurden ein Zehntel Volumen Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) und entweder 0,7 Volumen Isopropanol oder 2,5 Volumen Ethanol gegeben. Nach ca. 1 h Inkubation bei -20 °C wurde für 25 min zentrifugiert (18300 g, 4 °C, Sigma 2K15). Nach Waschen mit 500 µl Ethanol (70 %) und erneuter Zentrifugation für 10 min, erfolgte die Trocknung in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac Sc 100, Savant, Farmingdale, USA) für ca. 10 min. Die DNA wurde in 50 µl H₂O_{dest., steril} aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.5. Isolierung von Sporen-DNA aus den vereinigten 45 µm- und 80 µm-Siebfraktionen

Aus 10 g Boden (Frischgewicht) wurden die AM-Sporen mittels einer Siebkolonne ihrer Größe nach fraktioniert (siehe Abschnitt 2.5). Die ausgewaschenen Sporen aus den 45 µm- und 80 µm-Fractionen wurden vereinigt und 5 min bei 18000 g abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion mit dem UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) nach Herstellerangaben (alternatives Protokoll) mit folgenden Abweichungen: Anstelle einer Bodenprobe wurden die vereinigten Sporenfraktionen eingesetzt. Nach Zugabe der Lösung S2 wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und der nachfolgende Zentrifugationsschritt erfolgte für 15 min bei 18300 g.

2.4.6. Behandlung der isolierten Nukleinsäuren aus Pflanzenwurzeln mit Aktivkohle

Im Boden können PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-inhibierende Stoffe, wie z. B. Huminsäuren, enthalten sein (Tebbe *et al.* 1993; Abu Al-Soud *et al.* 1998). Solche PCR-Inhibitoren können durch Zugabe von Aktivkohle aus der DNA-Lösung entfernt werden (Vroh Bi *et al.* 1996). Dazu wurden je 50 µl DNA-Lösung mit 2 mg Aktivkohle versetzt, gemischt und ca. 10 min auf Eis inkubiert. Durch zweimaliges Abzentrifugieren der Ansätze bei 18300 g für jeweils 5 min wurde die Aktivkohle wieder aus der Lösung entfernt.

2.4.7. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch eine photometrische Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt werden. Nach Sambrook *et al.* (1989) entspricht eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA. Weiterhin lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren durch die Messung der OD bei 280 nm bestimmen. Liegt das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0, ist die gemessene Nukleinsäure so rein, dass sie für weitere Untersuchungen eingesetzt werden kann (Sambrook *et al.* 1989).

2.5. Isolierung von AM-Sporen aus dem Boden

Die Isolierung der AM-Sporen erfolgte wie bei Esch *et al.* (1994) beschrieben. Zunächst wurde etwa 10 g Frischgewicht (FG) Boden aus Wurzelnähe in ca. 1 l Wasser aufgeschlämmt, damit sich die Sporen durch gründliches Rühren vom Substrat lösten. Danach durchlief das Wasser-Substrat-Gemisch eine Siebkolonne mit absteigender Porenweite (1 mm; 0,5 mm; 80 µm; 45 µm). Die in den 80 µm- und 45 µm-Sieben aufgefangenen Fraktionen wurden jeweils mit Wasser in Petrischalen gespült und danach auf Glaszentrifugenbecher verteilt. Anschließend wurden diese Suspensionen durch leichtes Schwenken aufgewirbelt und mit dem gleichen Volumen einer 70 % (w/v) Saccharoselösung unterschichtet. Das gelang mit Hilfe einer Spritze, an deren Ende sich ein ca. 5 cm langer Kunststoffschlauch befand. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 1400 g (Hettich Rotixa KS). Die Sporen befanden sich nach der Zentrifugation in der Wasser-Saccharose-Grenzschicht und konnten daher mit einer Spritze abgesaugt werden. Anschließend wurden die Sporen in dem 45 µm-Sieb gründlich mit Wasser abgespült, um die Saccharose zu entfernen und daraufhin mit Wasser in eine Petrischale gespült. Mit einer Pasteurpipette konnten die Sporen unter dem Binokular bei 40facher Vergrößerung von kleinen Wurzel- und Schmutzpartikeln getrennt werden. Dazu wurde die Spitze der Pipette über einer Bunsenbrennerflamme fein ausgezogen und das andere Ende mit einem Gummischlauch zum Pipettieren mit dem Mund versehen. Die Sporen wurden bei 4 °C in Wasser gelagert.

2.5.1. Einbettung von Sporen in PVLG (Polyvinylalkohollactoglycerin) zur Herstellung von Dauerpräparaten

Dauerpräparate von AM-Sporen wurden hergestellt, indem die Sporen zunächst in einem Wassertropfen auf einen Objektträger gebracht wurden. Nachdem das Wasser verdunstet war, wurde ein Tropfen PVLG auf die Sporen gegeben und möglichst luftblasenfrei ein Deckgläschen aufgesetzt.

PVLG-Lösung: 10 ml H₂O_{dest.}
 10 ml Lactat
 1 ml Glycerin
 1,66 g Polyvinylalkohol (PVA)

Wasser, Lactat und Glycerin wurden zuerst in einem dunklen Reaktionsgefäß gemischt, dann erfolgte die Zugabe des PVA. Die Lösung inkubierte bis zur kompletten Auflösung des PVA bei 70 °C im Heizblock (DriBlock DB1, Techne, Cambridge, UK) und wurde gelegentlich geschüttelt (Quelle: INVAM-Homepage).

2.5.2. Anfärbung der Sporenwandstrukturen durch Melzers Reagenz

Um die Wandstrukturen der Sporen (ein wichtiges morphologisches Merkmal) sichtbar zu machen, wurde das PVLG mit Melzers Reagenz (1:1) vermischt und – wie unter Abschnitt 2.5.1 beschrieben – angewendet (Quelle: INVAM-Homepage). Durch leichte Druckausübung auf das noch nicht ausgehärtete Dauerpräparat konnten einige Sporen aufgebrochen werden. So waren die einzelnen Sporenwandstrukturen besser sichtbar und für Melzers Reagenz leichter zugänglich.

Melzers Reagenz: 20 ml H₂O_{dest.}
 1,5 g Kaliumjodid
 0,5 g Jod
 22 g Chloralhydrat

2.5.3. Oberflächensterilisierung von AM-Sporen

Die Oberflächensterilisierung der Sporen wurde nach einem modifizierten Verfahren zur Sterilisierung von Wurzelsegmenten durchgeführt (Gryndler *et al.* 1997). Zunächst wurden die Sporen in 0,1 % MgSO₄ Lösung fünfmal für 2 min gewaschen. Danach erfolgte eine vierstündige Inkubation bei RT in 10 ml der folgenden Antibiotikallösung:

Neomycinsulfat (Sigma)	5 mg/l
Penicillin G (Kaliumsalz, Sigma)	5 mg/l
Streptomycinsulfat	5 mg/l
Tetracyclinhydrochlorid (Boehringer Mannheim)	2,5 mg/l
Tween80 (Sigma)	50 µl/l

Anschließend wurden die Sporen für 6 min in einer 0,3 % NaOCl-Lösung inkubiert und dann solange mit sterilem H₂O gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrgenommen werden konnte.

Die in den nachfolgenden Abschnitten 2.5.4 und 2.5.5 beschriebenen Methoden wurden durchgeführt, weil Beobachtungen zur Keimung der AM-Sporen bei einer morphologischen Charakterisierung hilfreich sein können. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war unbekannt, dass Zygoten von *Vaucheria erythrospora* vorlagen. Stattdessen wurde vermutet, dass es sich um die Sporen eines bislang unbekanntes AM-Pilzes handeln könnte, der auf diese Weise näher charakterisiert werden sollte.

2.5.4. Keimungsversuch in Abhängigkeit von der K_2CO_3 -Konzentration des Mediums

Unmittelbar nach der Oberflächensterilisierung (siehe Abschnitt 2.5.3) wurden *Vaucheria erythrospora*-Zygoten in Petrischalen überführt, die Minimalmedium enthielten. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tab. 2.2 aufgeführt. Das hier verwendete modifizierte Minimalmedium unterschied sich von dem Minimalmedium, das von Bécard *et al.* (1988) beschrieben wurde, durch den Zusatz von 10 mM MES (Sigma) als puffernde Substanz und der Reduktion der Mangan-, Kupfer-, Molybdän- und Zinkkonzentration um 50 %. Diese Änderungen sollten zu einer besseren Keimungsfähigkeit bei AM-Pilzen führen. Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt und das Medium vor Verwendung für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Es wurden Ansätze mit fünf unterschiedlichen Salzkonzentrationen (je 0; 0,25; 0,5; 1; 2 % K_2CO_3) vorbereitet und anschließend 10 bis 20 *V. erythrospora*-Zygoten pro Petrischale überführt. Die Petrischalen wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und zweimal wöchentlich auf eine beginnende Keimung hin überprüft.

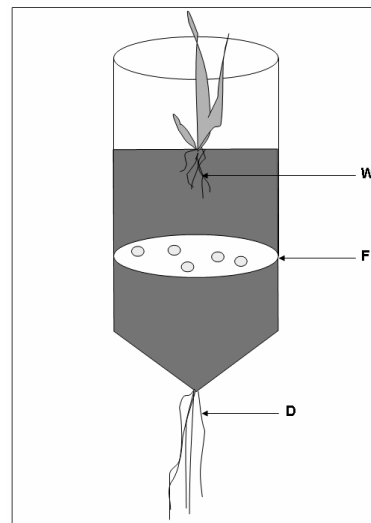
Tab. 2.2 Zusammensetzung des verwendeten Minimalmediums

	Konzentration [mg/l]		Konzentration [mg/l]
MgSO ₄ x H ₂ O	731	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,065
KNO ₃	80	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,0012
KCl	65	Glycin	3
KH ₂ PO ₄	4,8	Thiaminhydrochlorid	0,1
Ca(NO ₃) ₂ x H ₂ O	288	Pyridoxalhydrochlorid	0,1
NaFeEDTA	8	Nicotinsäure	0,5
KI	0,75	Myo-Inosit	50
MnCl ₂ x 4H ₂ O	3	Saccharose	10000
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1,3	MES	1952
H ₃ BO ₃	1,5	Bacto Agar (Difco)	8000

2.5.5. Keimungsversuch in Anwesenheit einer Pflanzenwurzel

Um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Pflanzenwurzeln für die Keimung der *V. erythrospora*-Zygoten notwendig sein könnte, wurden etwa zwei Wochen alte Keimlinge von *Plantago maritima* in Plastikröhrchen mit Substrat eingesetzt. Unterhalb der Pflanzenwurzeln wurde ein Filterpapier mit ca. 50 bis 100 darauf liegenden *V. erythrospora*-Zygoten platziert (siehe Abb. 2.3). Das Substrat bestand bei fünf Ansätzen aus einem autoklavierten 1:1 Gemisch aus Lecaton und Einheitserde. Bei weiteren fünf Ansätzen wurde Boden der *Puccinellia distans*-Proben aus Schreyahn aus dem Jahr 2003 autoklaviert und als Substrat verwendet. Die Röhrchen waren über einer Schale mit Wasser angebracht. Ein Docht, der jeweils durch den Boden der Röhrchen geführt wurde, sollte konstante Feuchtigkeit gewährleisten. Nach ca. drei Monaten wurden die Pflanzenwurzeln angefärbt (siehe Abschnitt 2.3.3) und auf eine Mykorrhizierung hin untersucht.

Abb. 2.3 Keimungsversuch in Anwesenheit einer Pflanzenwurzel



Die Abb. 2.3 zeigt die Positionierung der *V. erythrospora*-Zygoten in Nähe der Wurzeln.

W = Pflanzenwurzel; F = Filterpapier mit darauf ausgelegten Zygoten; D = Docht

2.6. Amplifizierung von DNA-Segmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht es, DNA-Sequenzabschnitte mittels sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer zu amplifizieren (Saiki *et al.* 1985). Üblicherweise besteht eine PCR aus den Wiederholungen dreier Schritte: Zunächst wird die DNA denaturiert, d. h. die doppelsträngigen Moleküle werden durch Hitzeeinwirkung aufgeschmolzen. Dann erfolgt die Primer-Bindung (*annealing*) an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge unter Temperaturerniedrigung. Im dritten Schritt kommt es zur DNA-Synthese (Elongation), indem die hybridisierten Primer an ihren 3'-Enden durch die DNA-Polymerase verlängert werden. Durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* sind die Wiederholungen dieser Schritte möglich, ohne dass das Enzym denaturiert wird. Die anfangs eingesetzte Matrizen-DNA wird auf diese Weise exponentiell vervielfacht.

Für je eine PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß auf Eis vorbereitet:

- 35 µl H₂O_{dest., steril}
- 5 µl (10x) Thermopuffer (Promega)
- 4 µl MgCl₂ (Promega)
- 4 µl dNTP-Mix, je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Eppendorf)
- 1 µl fwd. Primer (50 pmol)
- 1 µl rev. Primer (50 pmol)
- 1 µl DNA als Matrize (10-50ng) bzw. je eine zerquetschte AM-Spore
- 0,2 µl (2 U) *Taq*-DNA-Polymerase (Promega)

Die Vorbereitung der Ansätze erfolgte auf Eis, um eine vorzeitige DNA-Synthese oder unspezifische Primerbindungen zu vermeiden. Die Durchführung der PCR-Experimente erfolgte mit einem „Personal Cycler Version 3.02“ (Biometra) unter Verwendung folgender Programme:

Programm 1		Programm 2	
1. 94 °C	2 min	1. 94 °C	2 min 30 sec
2. 94 °C	30 sec	2. 94 °C	30 sec
3. 54 °C	30 sec	3. 58 °C	1 min
4. 72 °C	1 min	4. 72 °C	1 min 30 sec
5. 72 °C	10 min	5. 72 °C	10 min
Heizdeckel auf 105 °C;		Heizdeckel auf 105 °C;	
Die Schritte zwei bis vier		Die Schritte zwei bis vier	
wurden 35mal wiederholt.		wurden 30mal wiederholt.	

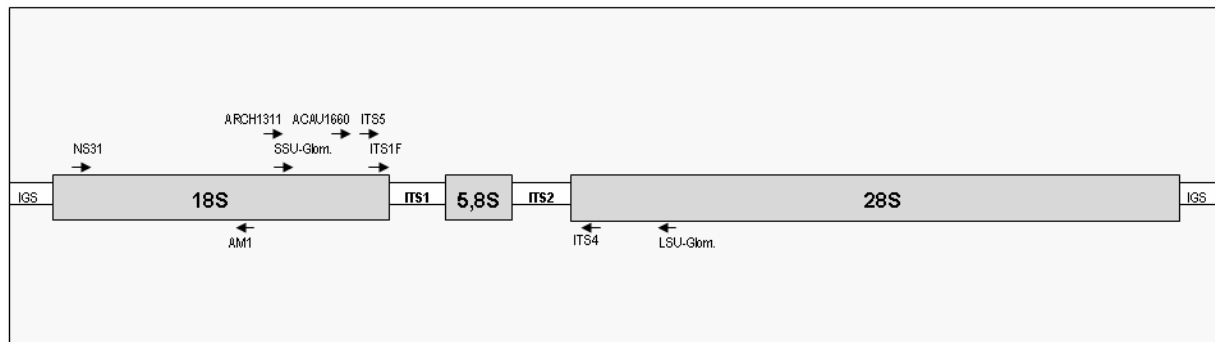
Die verwendeten Primer (Tab. 2.3) binden alle im Bereich der rRNA-Gene (siehe Abb. 2.4). Diese Gene liegen hochrepetitiv vor, was die Anzahl der Matrizen erhöht. Weiterhin sind diese Gene hoch konserviert, somit ist die Verwendung von Universalprimern (Simon *et al.* 1992) möglich. Andererseits sind die ITS (*internal transcribed spacer*)-Regionen hoch variabel, und auch die 18S rDNA enthält ausreichend variable Bereiche, so dass genetische Varianzen festgestellt werden können.

Tab. 2.3 Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz	T _m [°C]	Referenz
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	51	White <i>et al.</i> (1990))
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	50	White <i>et al.</i> (1990)
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	49	Gardes <i>et al.</i> (1993)
AM1	GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA	57	Helgason <i>et al.</i> (1998)
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	57	Simon <i>et al.</i> (1992)
LSU-Glom.	CTTCAATCGTTTCCCTTTCA	49	Renker <i>et al.</i> (2003)
SSU-Glom.	ATTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	56	Renker <i>et al.</i> (2003)
ACAU1660	TGAGACTCTCGGATCGG	50	Redecker (2000c)
ARCH1311	TGCTAAATAGCCAGGCTGY	51-52	Redecker (2000c)

Die Primersequenzen sind in 5´-3´-Richtung angegeben. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Ark synthetisiert. Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer sind nach Angaben des Herstellers aufgeführt. Die Primer wurden in H₂O_{dest., steril} resuspendiert (Endkonzentration: 50 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert. Für PCR-Reaktionen mit den Primern AM1 und NS31 wurde das Programm 2, für alle anderen das Programm 1 eingesetzt.

Die Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln der untersuchten Pflanzen wurde anhand des ITS-Bereiches mit einer „nested“ PCR-Methode nach Renker *et al.* (2003) untersucht. Parallel dazu wurde ein Fragment der 18S rDNA (Helgason *et al.* 1998) amplifiziert. Beide Methoden sollten pflanzliche und pilzliche Kontaminanten-DNA weitgehend diskriminieren, aber möglichst alle Vertreter der Glomeromycota erfassen.

Abb. 2.4 Lage der Primer innerhalb einer rDNA-Einheit, verändert nach White *et al.* (1990)

Die Abb. 2.4 zeigt die schematische Darstellung einer rDNA-Einheit (nicht maßstabsgetreu). Die Pfeilspitzen symbolisieren die 3'-Enden der Primer. IGS = *intergenic spacer*)

Bei der Durchführung einer PCR-Reaktion mit AM-Sporen wurden diese zunächst einzeln mit einer ausgezogenen Pasteurpipette auf einen mit Ethanol gereinigten Objektträger überführt. Nachdem das Wasser vorsichtig abgezogen wurde, wurden die Sporen mittels einer an der Spitze zugeschmolzenen Pasteurpipette zerquetscht. Die zerquetschte Spore wurde in 4 µl Reaktionsansatz aufgenommen und in den restlichen Ansatz pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen sterilen Mineralöles (Sigma) überschichtet, um das Verdunsten des Wassers zu vermeiden, da kein Heizdeckel benutzt wurde. Falls in die PCR-Reaktion 1 µl DNA als Matrize eingesetzt wurde, war kein Mineralöl nötig, da in diesen Fällen der Heizdeckel des Cyclers auf 105 °C temperiert wurde. Der Einsatz von Mineralöl anstelle des temperierten Heizdeckels bei PCR-Reaktionen mit AM-Sporen erwies sich in Bezug auf die Amplifikationsrate als erfolgreicher, ebenso wie das sogenannte „hot start“-Verfahren (U. Hildebrandt, persönliche Mitteilung). Darunter ist zu verstehen, dass – nach einer Denaturierungsphase von 5 min bei 95 °C – die Zugabe der *Taq*-DNA-Polymerase innerhalb von 2 min bei 92 °C erfolgte. So können sowohl die Inaktivierung des Enzyms, als auch unspezifische Amplifikationen während der Denaturierungsphase verhindert werden.

2.6.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse der PCR-Produkte der ITS-Region

Die mittels PCR amplifizierte DNA-Bereiche der hochvariablen ITS-Region wurden durch verschiedene Restriktionsenzyme verdaut. Jedes verdaute Amplifikat ergibt auf dem Gel ein spezifisches Bandenmuster aus Restriktionsfragmenten. Durch den Vergleich dieser Muster können Variationen in den Nukleotidsequenzen ermittelt werden.

Restriktionsansatz: 8 µl PCR-Ansatz
 1 µl Restriktionsenzym
 1 µl Reaktionspuffer

Tab. 2.4 **Verwendete Restriktionsenzyme für die ITS-Region**

Restriktions- endonuklease	Erkennungs- sequenz
<i>AluI</i>	AG↓CT
<i>BsuRI</i>	GG↓CC
<i>Hinfi</i>	G↓ANTC
<i>HpaII</i>	C↓CGG
<i>TaqI</i>	T↓CGA

Die Tab. 2.4 zeigt die verwendeten Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas), sowie die Erkennungssequenz der Enzyme in der DNA. Die Inkubationstemperatur für alle verwendeten Restriktionsenzyme lag bei 37 °C, mit Ausnahme von *TaqI* (65 °C). Der Verdau erfolgte in einem Heizblock (DriBlock DB1, Techne, Cambridge, UK). Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Die Pfeile symbolisieren die Schnittstelle.

Zu jeder Probe wurden 5 min vor Ablauf der Reaktion 2 µl Blaumarker pipettiert, während der Heizblock auf 65 °C temperiert wurde. Auf diese Weise sollte es zur Denaturierung der Restriktionsenzyme kommen, damit die DNA anschließend besser in das Gel einlaufen konnte.

2.6.2. Auftrennung der DNA-Fragmente durch horizontale Gelelektrophorese

Nach Beendigung einer PCR-Reaktion bzw. nach einem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente nach ihren unterschiedlichen Größen, unter Anwendung einer horizontalen Gelelektrophorese, aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurden Agarosegele (1-2 %) hergestellt, indem Agarose in TAE-Puffer (s.u.) aufgekocht und dadurch gelöst wurde. Weiterhin wurde der Agarose Ethidiumbromid zugesetzt (0,5 µg/ml). Dieses interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und ermöglicht so, durch Fluoreszenz unter UV-Licht, den Nachweis der DNA. Je 8 µl der PCR- bzw. 10 µl der Restriktionsansätze wurden mit 1 µl Blaumarker [0,1% (w/v) Bromphenolblau in 50 % (v/v) Glycerin] gemischt und auf ein Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde eine 100-bp-DNA-Leiter (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas) benutzt. Zur Mengenabschätzung der DNA diente die MassRuler Low Range DNA Ladder (Fermentas). Nach 30 bis 45minütiger Gelelektrophorese bei 10 V/cm wurden mittels einer Intas-Geldokumentationsanlage, unter UV-Licht, Bilder der Gele aufgenommen.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 2 mM Eisessig
 1 mM EDTA (pH 8, gelöst in Eisessig)

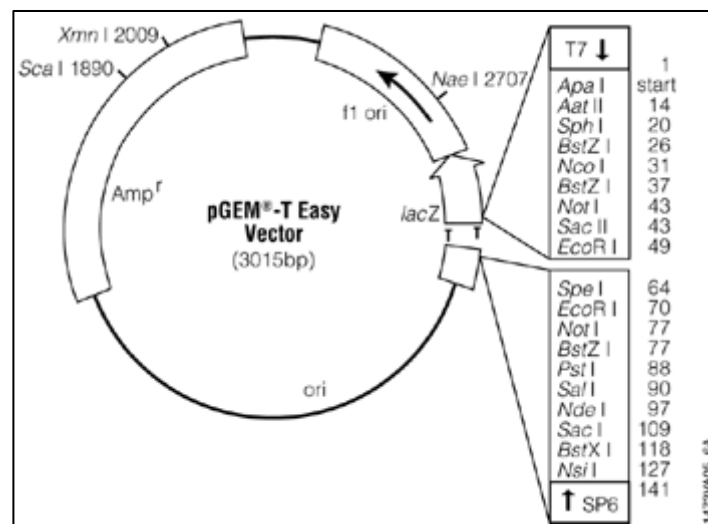
2.6.3. Elution von DNA aus Agarosegelen

Die PCR-Amplifikate der erwarteten Größe wurden vor der Klonierung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.6.4. Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pGEM®-T Easy

Die Ligationen wurden mit dem pGEM®-T Easy Vektor System (Promega, Mannheim) durchgeführt. Dieser linearisiert vorliegende Vektor besitzt an beiden Enden einzelne, überhängende Desoxythymidin-Nukleotide (siehe Abb. 2.5). Durch die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase werden an die 3'-Enden der PCR-Amplifikate ungepaarte Desoxyadenin-Nukleotide addiert. So können sich zwischen den komplementären Enden von Amplifikat und Vektor AT-Basenpaare ausbilden.

Abb. 2.5 Karte des verwendeten Klonierungsvektors



Die Abb. 2.5 stellt eine nach Herstellerangaben vereinfachte Karte des Klonierungsvektors pGEM®-T Easy (3015 bp) dar.

Ligationsansatz:

- 6 µl H₂O_{dest., steril}
- 1 µl 10 x Ligationspuffer
- 1 µl pGEM®-T Easy Vektor (50 ng)
- 1 µl PCR-Produkt
- 1 µl T4 DNA-Ligase

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.7. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden entweder mit der TSS- oder mit der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt, je nachdem ob *E. coli* XL1-Blue- oder *E. coli* DH5 α -Zellen zur Verfügung standen.

2.7.1. TSS-Methode zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Anleitung von Chung *et al.* (1993) modifiziert. Es wurden 2 ml LB-Medium, dem Tetracyclin (50 μ g/ml) zugefügt wurde, mit *E. coli* XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*) F'[*proAB⁺ lacZ^f lacZ* Δ M15Tn10(*tet*)] (Sambrook *et al.* 1989) bezogen von Stratagene, Heidelberg) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Dieser Kultur wurden 400 μ l entnommen und damit 40 ml LB-Medium angeimpft. Die Anzucht erfolgte auf einem Schüttler bei 37 °C, bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,3. Nach einer Zentrifugation bei 1000 *g* für 5 min wurden die Bakterien in 4 ml eiskalten TSS-Puffer aufgenommen. Danach folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert (100 μ l) und in Flüssigstickstoff eingefroren.

TSS-Puffer: 5 g PEG 8000 (Polyethylenglykol, Merck)
 mit LB-Medium auf 45 ml auffüllen
 0,75 ml MgCl₂ (2 M)
 pH 6,5 (HCl)
 Lösung steril filtrieren (0,2 μ m)
 2,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck)
 mit sterilem LB-Medium auf 50 ml auffüllen

2.7.2. Rubidiumchloridmethode zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Alternativ wurden transformationskompetente Zellen mit der Rubidiumchloridmethode erzeugt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie von *E. coli* DH5 α (*supE44 Δ lacU169* (ϕ 80 *lacZ Δ M15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1*) ((Sambrook *et al.* 1989), Quelle: Stratagene, Heidelberg) in ein Reagenzglas mit 5 ml Ψ b-Medium (s. u.) überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (300 rpm) inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 100 ml vorgewärmtes (37 °C) Ψ b-Medium gegeben. Die Kultur wurde etwa 2 h bis zu einer optischen Dichte von OD_{550nm} = 0,48 auf einem Rundschüttler bei 37 °C angezogen. Anschließend wurde die Kultur in auf Eis vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C für 10 min in einer Kühlzentrifuge (Hettich Rotixa KS) sedimentiert (2000 *g*). Die nachfolgenden Schritte erfolgten alle auf Eis in einem Kühlraum (4 °C): Die sedimentierten Zellen wurden in 15 ml TfB1 (s. u.) durch Schwenken vorsichtig resuspendiert und dann 2 h auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 2000 *g*, 4 °C) wurden die pelletierten Zellen in 2 ml TfB2 resuspendiert und als 100 μ l-Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Ψb-Medium:	20 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefeextrakt 4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 750 mg KCl (10 mM) pH 7,6 (1 M KOH) mit H ₂ O _{bidest.} auf 1 Liter auffüllen, 20 min bei 120 °C autoklavieren
TfB1:	1210 mg RbCl ₂ (100 mM) 990 mg MnCl ₂ x 4 H ₂ O (50 mM) 200 mg Kaliumacetat (30 mM) 150 mg CaCl ₂ x 2 H ₂ O (10 mM) 15 ml Glycerin pH 5,8 (0,2 M Essigsäure) mit H ₂ O _{bidest.} auf 100 ml auffüllen
TfB2:	220 mg CaCl ₂ x 2 H ₂ O (75 mM) 20 mg RbCl ₂ (10 mM) 40 mg MOPS (10 mM) pH 7,0 (NaOH) mit H ₂ O _{bidest.} auf 20 ml auffüllen

Die Lösungen TfB1 und TfB2 wurden steril-filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

2.7.3. Transformation kompetenter *E. coli* - Zellen

Für die Transformationen wurden 100 µl kompetente Zellen (*E. coli* XL1-Blue oder DH5α, Lagerung bei -80 °C) 5 min auf Eis aufgetaut und mit je 2 µl Ligationsansatz versetzt. Es folgte darauf eine 20minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C ausgesetzt, um die Permeabilität der Bakterienzellwände für die Plasmid-DNA zu erhöhen (Sambrook *et al.* 1989).

2.8. Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

2.8.1. Selektion der transformierten Klone

Die verwendeten kompetenten *E.coli*-Zellen besitzen kein vollständiges *lacZ*-Gen. Aufgrund dieser Deletion sind die Zellen nicht in der Lage, funktionsfähige β-Galaktosidase zu exprimieren. Durch Komplementation, d. h. durch Transformation mit einem Plasmid, welches für das fehlende α-Peptid kodiert, ist es den Zellen möglich, eine aktive β-Galaktosidase zu bilden (Sambrook *et al.* 1989). Die

Induktion des *lacZ*-Gens erfolgt durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid). Um die Aktivität der β -Galaktosidase nachzuweisen, benutzt man das künstliche Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galaktopyranosid). Dieses wird von der β -Galaktosidase zu dem blauen Farbstoff 5-5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umgesetzt. Somit sind Kolonien, die eine β -Galaktosidase-Aktivität besitzen, blau gefärbt. Kolonien, die ein Plasmid mit einem Insert im Leseraster des β -Galaktosidase-Genes enthalten, erscheinen weiß. Weiterhin wird eine Selektion der transformierten Zellen durch ein Resistenzgen des Vektors für Ampicillin ermöglicht. Da die Zellen auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (1,2 %, 30 ml) ausplattiert wurden, wuchsen nur plasmidhaltige Klone heran. Ampicillin wurde in das ca. 60 °C warme Medium gegeben (100 μ g/ml). Später wurden auf die erstarrten Platten 20 μ l X-Gal (20 mg/ml) und 4 μ l IPTG (200 mg/ml) mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen.

Die transformierten Zellen wurden mit 900 μ l LB-Medium verdünnt und 1,5 h bei 37 °C geschüttelt. In dieser Zeit sollte die durch die Transformation erworbene Ampicillinresistenz exprimiert werden. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 18300 *g* zentrifugiert und in 100 μ l LB-Medium resuspendiert. 90 μ l dieser Bakteriensuspension wurden direkt ausplattiert. Zu den restlichen 10 μ l wurden 90 μ l LB-Medium gegeben. Diese Verdünnung wurde ebenfalls ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Die Zellen der positiven, weißen Kolonien wurden mit einer Impföse in 5 ml LB-Medium überführt, das Ampicillin (100 μ g/ml) enthielt, und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Isolierung der Plasmide wurde unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

2.8.2. Restriktion der isolierten Plasmid-DNA mit *EcoRI*

Durch einen *EcoRI*-Verdau mit anschließender Gelelektrophorese können die Klone selektiert werden, die ein Insert in der Größe des eingesetzten PCR-Produktes enthalten. Das ist möglich, da die beiden *EcoRI*-Schnittstellen des verwendeten pGEM[®]-T Easy-Vektors nahe der Klonierungsstelle liegen (siehe Abb. 2.5), in die das Insert im Erfolgsfall ligiert wird.

Restriktionsansatz: 5 μ l Plasmid-DNA
1 μ l *EcoRI* (MBI-Fermentas)
2 μ l 10 x RNase
ad 20 μ l H₂O

Der Restriktionsansatz wurde 1,5 h bei 37 °C in einem Heizblock (DriBlock DB1, Techne, Cambridge, UK) inkubiert.

2.8.3. Sequenzierung der klonierten DNA-Abschnitte

Vor der Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA einem RNase-Verdau unterzogen, dazu wurde folgender Ansatz vorbereitet:

45 µl Plasmid-DNA
 20 µl Y+/Tango-Puffer (MBI Fermentas)
 133 µl H₂O_{steril}
 2 µl 10x RNase

Die Inkubationszeit betrug 1h bei 37 °C im Heizblock. Danach wurde die Plasmid-DNA mit dem gleichen Volumen eines PCI-Gemisches (25:24:1) extrahiert und es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei RT und 18300 *g*. Anschließend wurde die wässrige Oberphase mit dem gleichen Volumen eines CI-Gemisches (24:1) extrahiert. Die in der wässrigen Oberphase enthaltene DNA wurde dann mit 2,5 Volumen 100 % Ethanol sowie einem Zehntel Volumen Kaliumacetat (3 M, pH 4,8) versetzt und für 20 min bei -20 °C gefällt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation wurde die pelletierte DNA in 70 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 50 µl H₂O_{dest., steril} resuspendiert.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt. Die Ansätze wurden folgendermaßen in Mikroreaktionsgefäßstreifen (je 0,2 ml) zusammenpipettiert:

2 µl Big Dye v1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)
 1 µl Sequenzierpuffer (Applied Biosystems)
 1 µl Primer (Sp6rev oder T7forw)
 1 µl Plasmid-DNA (1-50 ng)
 5 µl H₂O_{dest., steril}

Eingesetzte Primer (in 5´-3´-Richtung):

SP6-Primer (reverse): TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C

T7-Primer (forward): GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

Diese beiden Primer binden auf verschiedenen Seiten und auf den zueinander komplementären Strängen des Vektors pGEM[®]-T Easy, nahe der Klonierungsstelle (siehe Abb. 2.5). Durch Anwendung beider Primer kann das Insert in beide Richtungen sequenziert werden.

PCR-Bedingungen:

96 °C	30 sec	Denaturierung
50 °C	15 sec	Annealing
60 °C	4 min	Elongation

Diese drei Schritte wurden in 36 Zyklen wiederholt. Der Heizdeckel des Cyclers wurde auf 105 °C vorgeheizt. Nach der Sequenz-PCR wurde jedem Ansatz 10 µl H₂O_{dest., steril} zugefügt. Die Sequenzierung der PCR-Fragmente wurde entweder mit einem ABI 377 oder ABI Prism 3100 Genetic

Analyser durchgeführt (beide Applied Biosystems, Sequenzierlabore der Medizinischen Fakultät oder des Genetischen Institutes der Universität zu Köln).

2.9. Analyse der DNA-Sequenzen

Zunächst wurden die anhand der Primer SP6 und T7 in beiden Richtungen erhaltenen Sequenzen eines Inserts mittels der Elektropherogramme manuell überprüft, verglichen und gegebenenfalls korrigiert. Ermöglicht wurde diese Bearbeitung durch das Programm BioEdit Version 7.0.0 (Hall 1999). Zu der so ermittelten Sequenz wurden dann homologe DNA-Sequenzen gesucht, was mit Hilfe der Datenbank „GenBank“ (Benson *et al.* 2000) unter Benutzung des Suchprogramms BLAST 2.0 (Altschul *et al.* 1990) geschah. Der BLAST-Server ist über die NCBI-Homepage (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zugänglich. Die homologen Sequenzen konnten dann mit dem Programm ClustalX 1.83 (Thompson *et al.* 1997) einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen werden, indem ein Alignment erstellt und ausgewertet wurde.

2.9.1. Zusammenfassung ähnlicher Sequenzen zu AM-Sequenzgruppen

Sequenzen, die eine sehr ähnliche Basenabfolge aufwiesen, wurden zu sogenannten AM-Sequenzgruppen zusammengefasst. Auf diese Weise sollte der Einfluss von PCR- und Sequenzierfehlern herabgesetzt und die Übersichtlichkeit innerhalb der Stammbäume erhöht werden. Für die Definition der AM-Sequenzgruppen wurden im Fall der 18S rDNA ca. 510 bp lange Sequenzen eingesetzt, die der Länge des PCR-Amplifikates ohne die Primer entsprachen. Im Bereich der ITS-Region wurde ein ca. 300 bp langes Fragment herangezogen, das der 5,8S rDNA zuzüglich eines Teils der ITS2-Region entsprach. Die Sequenzen wurden in ein Alignment gestellt (ClustalX; (Thompson *et al.* 1997)) und für eine manuelle Korrektur in BioEdit Version 7.0.0 (Hall 1999) importiert. Die Quantifizierung der Sequenzunterschiede erfolgte durch die Erstellung einer DNA-Sequenzidentitätsmatrix (BioEdit Version 7.0.0; (Hall 1999)). DNA-Sequenzen, die eine paarweise Identität von $\geq 98,2\%$ (18S rDNA-Fragment), bzw. $\geq 90,5\%$ (5,8S rDNA + ITS2) aufwiesen, wurden der gleichen AM-Sequenzgruppe zugewiesen. In die Phylogramme wurden jeweils „Stellvertreter-Sequenzen“ aus den AM-Sequenzgruppen eingerechnet.

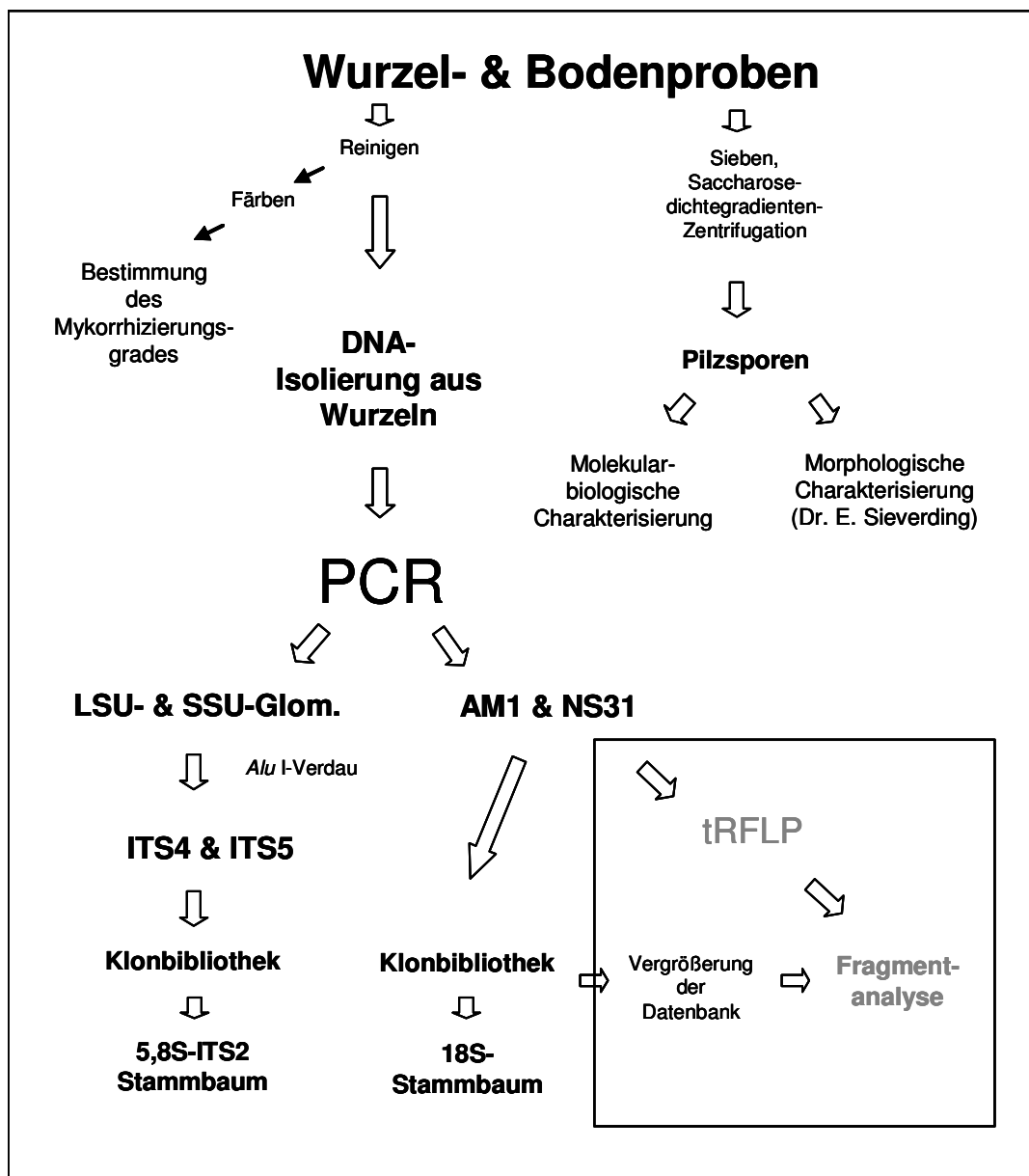
2.9.2. Phylogenetische Auswertung von DNA-Sequenzen

Nach der Auswertung eines Alignments wurde ein Stammbaum auf Grundlage von „neighbour joining“ (NJ) berechnet. Die Verzweigungsstruktur des erhaltenen Baumes wurde durch eine so genannte Bootstrap-Analyse auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Dabei wurden tausend Stammbäume aus tausend willkürlich gewählten Teildatensätzen erstellt, die dann zu einem Baum zusammengefasst wurden. Jeder Verzweigung wurde ein Bootstrap-Wert zugeordnet, der angab, wie viele der tausend Einzel-Stammbäume dieselbe Verzweigung besaßen. Nur Bootstrap-Werte über 50 % wurden als signifikant angesehen. Mit dem Programm Tree View (Win 32) 1.6.6 (Page 1996) erfolgte die Wurzelung der Phylogramme und eine erste graphische Bearbeitung. Die graphische Endversion der Phylogramme wurde mit dem Programm PowerPoint 2003 (Microsoft) erstellt.

2.9.3. Test auf chimäre Sequenzen

Es ist möglich, dass in einer PCR chimäre Amplifikate entstehen können, bei denen der 5'- und der 3'-Teil von unterschiedlichen „Elternsequenzen“ stammen. Zur Überprüfung der erhaltenen Sequenzen auf solche Fälle wurde zunächst ein "multiple sequence alignment" erstellt (ClustalX; (Thompson *et al.* 1997). Daraufhin wurden NJ-Phylogramme für die vordere und hintere Hälfte des Sequenzbereiches getrennt berechnet. Konnten diese beiden Phylogramme dann nicht in allen Hauptgruppen eine Deckung aufweisen, galt das als ein Hinweis auf chimäre Sequenzen. Zusätzlich können die Alignments mit dem Programm Bellerophon (Huber *et al.* 2004) auf chimäre Sequenzen überprüft werden.

Abb. 2.6 Schematische Zusammenfassung des experimentellen Ansatzes



Die Abb. 2.6 stellt eine schematische Zusammenfassung der Probenaufarbeitung und des experimentellen Ansatzes dar. Der hervorgehobene Bereich ist als Ausblick auf weitere Untersuchungen zu verstehen.

3. Ergebnisse

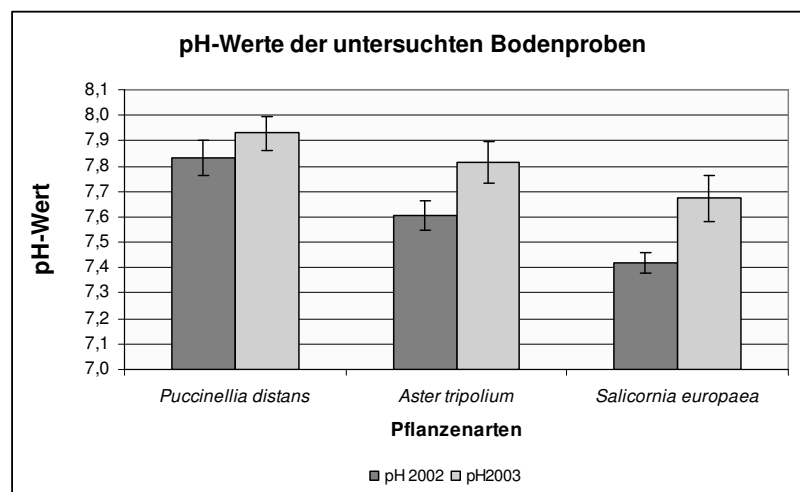
3.1. Untersuchung der Bodenparameter am Standort Schreyahn

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenarten (*Aster tripolium*, *Puccinellia distans*, *Salicornia europaea*) stammen von der Binnenland-Salzstelle Schreyahn in Niedersachsen (siehe Abb. 2.1). Zunächst wurden der pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit (EC, *electric conductivity*) des Bodens als wesentliche Standortparameter bestimmt.

3.1.1. Bestimmung des pH-Wertes der untersuchten Bodenproben

Der pH-Wert des Bodens wurde für beide Probeentnahmezeitpunkte im September 2002 und im Juni 2003 bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die pH-Werte aus jeweils fünf wurzelnahen Bodenproben pro untersuchter Pflanzenart gemittelt. Der Vergleich der mittleren pH-Werte in den Jahren 2002 und 2003 ist in Abb. 3.1 dargestellt.

Abb. 3.1 Mittlere pH-Werte der untersuchten Bodenproben aus Schreyahn



Die Abb. 3.1 zeigt den Vergleich der mittleren pH-Werte mit Standard-Abweichung im September 2002 (dunkelgrau) und im Juni 2003 (hellgrau). Es wurden jeweils fünf wurzelnahen Bodenproben pro Pflanzenart untersucht.

Der mittlere pH-Wert lag im September 2002 bei $7,61 \pm 0,06$ für *Aster tripolium*, bei $7,83 \pm 0,07$ für *Puccinellia distans* und bei $7,42 \pm 0,04$ für *Salicornia europaea*. Auch im Jahr 2003 wiesen die gemittelten pH-Werte der Bodenproben aus der Wurzelnähe von *P. distans* den höchsten Wert mit $7,93 \pm 0,07$ auf. Der Wert von *S. europaea* war mit $7,67 \pm 0,09$ der niedrigste, während der pH-Wert der *A. tripolium*-Probe mit $7,82 \pm 0,08$ zwischen diesen beiden Ergebnissen lag. Somit war zu beiden

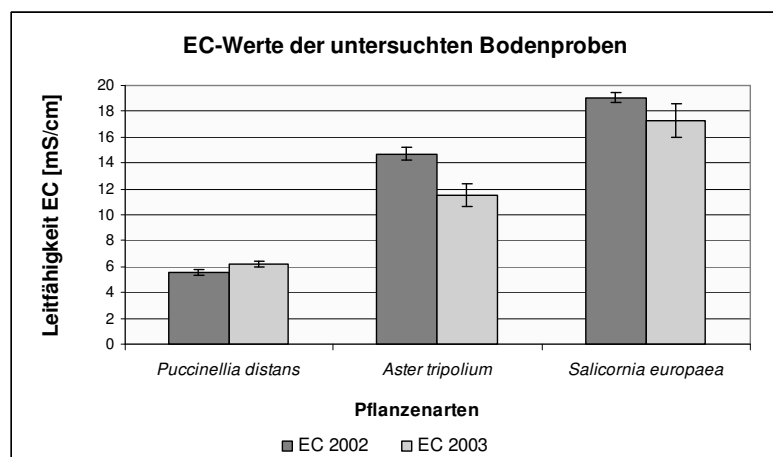
Untersuchungszeitpunkten der gemittelte pH-Wert der Bodenproben von *P. distans* der höchste und der von *S. europaea* der niedrigste (siehe Abb. 3.1).

3.1.2. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der untersuchten Bodenproben

Die drei untersuchten Pflanzenarten wurden so gewählt, dass sie unterschiedliche Zonen des Bodensalzgradienten repräsentierten (siehe Abb. 2.2). Die Bodensalinität kann anhand der elektrischen Leitfähigkeit [mS/cm] erfasst werden, da diese proportional zu der Konzentration der gelösten Ionen im Boden ist.

Die elektrische Leitfähigkeit wurde für beide Untersuchungszeitpunkte (September 2002 und Juni 2003) anhand wurzelnaher Bodenproben bestimmt.

Abb. 3.2 Mittlere EC-Werte der untersuchten Bodenproben aus Schreyahn



Die Abb. 3.2 zeigt den Vergleich der mittleren EC-Werte mit Standard-Abweichung im September 2002 (dunkelgrau) und im Juni 2003 (hellgrau). Es wurden jeweils fünf wurzelnaher Bodenproben pro Pflanzenart untersucht.

Die Abb. 3.2 zeigt einen Anstieg der gemittelten EC-Werte von der *Puccinellia distans*- zu der *Salicornia europaea*-Zone für beide Zeitpunkte. Im September 2002 betragen die gemittelten EC-Werte der *P. distans*-Zone $5,5 \pm 0,2$ mS/cm, im Juni 2003 waren es $6,2 \pm 0,2$ mS/cm. In der *S. europaea*-Zone lagen die Werte 2002 bei $19,0 \pm 0,4$ mS/cm bzw. 2003 bei $17,2 \pm 1,3$ mS/cm. Der EC-Wert der *A. tripolium*- Bodenproben lag im September 2002 bei $14,7 \pm 0,5$ mS/cm, im Juni 2003 bei $11,5 \pm 0,9$ mS/cm und somit zu beiden Untersuchungszeitpunkten zwischen denen von *P. distans* und *S. europaea*. Im Gegensatz zu den beiden anderen Pflanzenarten übertraf der *P. distans*-Wert von 2003 mit $6,2 \pm 0,2$ mS/cm den aus dem Jahr 2002 mit $5,5 \pm 0,2$ mS/cm.

Im vegetationsfreien Zentrum der Salzstelle stieg der EC-Wert auf $37,9 \pm 2,1$ mS/cm an. Dieser Wert wurde im Rahmen einer Diplomarbeit über die Bakteriendiversität der Binnenland-Salzstelle Schreyahn (Eilmus 2005) ermittelt und ist deshalb nicht in Abb. 3.2 dokumentiert.

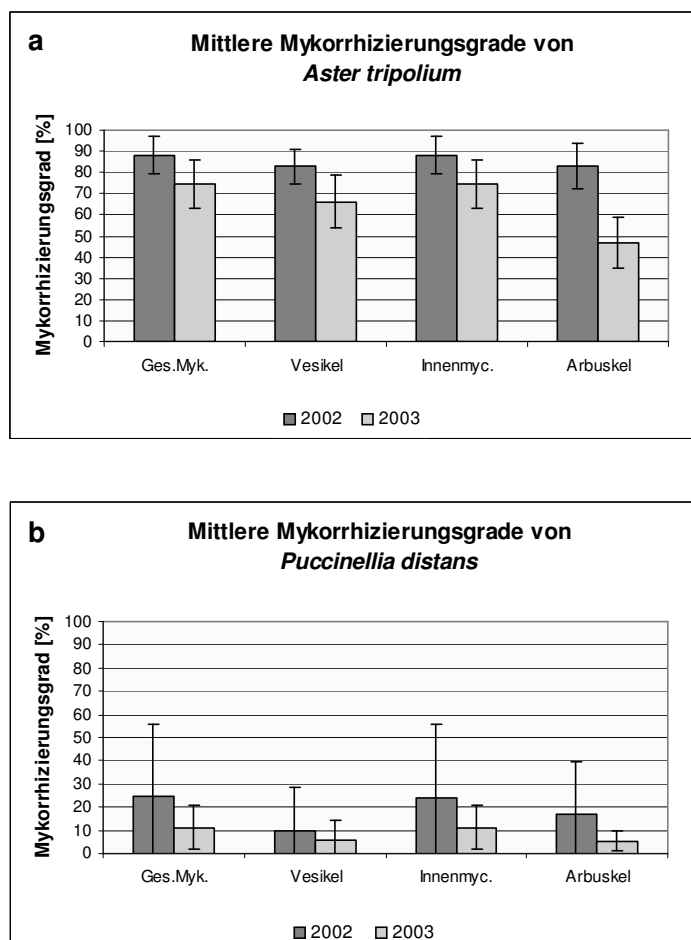
3.2. Vorkommen der AM-Pilze an der Binnenland-Salzstelle Schreyahn

Ob AM-Pilze am Standort Schreyahn vorkommen, wurde zunächst durch die Bestimmung des prozentualen Mykorrhizierungsgrades der Pflanzenwurzeln (siehe Abschnitt 2.3.4) und der AM-Sporendichte im wurzelnahen Boden überprüft.

3.2.1. Ergebnisse zum prozentualen Mykorrhizierungsgrad der untersuchten Pflanzen

Zwischen den drei untersuchten Pflanzenarten waren deutliche Unterschiede in Hinblick auf die Höhe des Mykorrhizierungsgrades zu erkennen. Die Wurzelproben von *Aster tripolium* zeigten eine mittlere Gesammykorrhizierung von $88 \pm 9\%$ im September 2002 und $74 \pm 12\%$ im Juni 2003 (siehe Abb. 3.3 a). Bei *Puccinellia distans* (Abb. 3.3 b) lag der Wert für die mittlere Gesammykorrhizierung bei $24 \pm 31\%$ im Jahr 2002, bzw. bei $11 \pm 9\%$ im Jahr 2003. Die Wurzeln der untersuchten Exemplare von *Salicornia europaea* (2002: $n = 7$; 2003: $n = 12$) wiesen keine sichtbaren AM-Pilzstrukturen auf. *S. europaea* gehört zur Familie der Chenopodiaceae, die als nicht mykorrhizierbar gilt.

Abb. 3.3 Mittlere Mykorrhizierungsgrade der untersuchten Pflanzenarten aus Schreyahn



Die Abb. 3.3 (vorherige Seite) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Mykorrhizierungsgrades im September 2002 (dunkelgrau) und im Juni 2003 (hellgrau) im Vergleich.

In Grafik a handelt es sich um die Werte von *Aster tripolium* (2002: n = 7; 2003: n = 22), in b um die Werte von *Puccinellia distans* (2002: n = 7; 2003: n = 18). n = Anzahl der untersuchten Exemplare

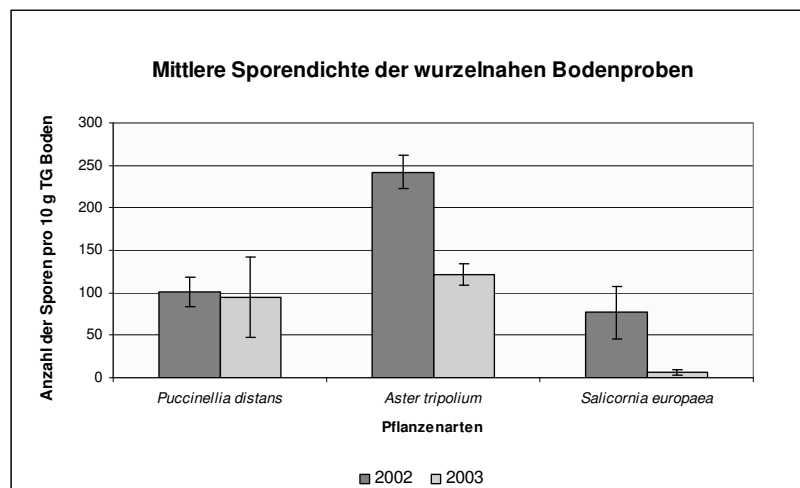
Neben der Gesamtmykorrhizierung (Ges.Myk.) wird auch der prozentuale Anteil an Vesikeln, Innenmycel (Innenmyc.) und Arbuskeln dargestellt.

Im September 2002 entsprach die Anzahl der Vesikel ($83 \pm 8\%$) bei *A. tripolium* der Anzahl der Arbuskel ($83 \pm 11\%$), im Juni 2003 hingegen lagen mehr Vesikel ($66 \pm 12\%$) als Arbuskel ($47 \pm 12\%$) vor. Bei *P. distans* überwog im September 2002 der Anteil an Arbuskeln ($17 \pm 23\%$) gegenüber den Vesikeln ($10 \pm 18\%$) und im Juni 2003 konnten mit $6 \pm 8\%$ bzw. $5 \pm 4\%$ etwa gleich viele Vesikel wie Arbuskel beobachtet werden. Für *A. tripolium* lagen die gemittelten Mykorrhizierungsdaten insgesamt für September 2002 höher als für Juni 2003. Trotz der hohen Standardabweichungen zeichnet sich diese Tendenz für *P. distans* ebenfalls ab.

3.2.2. Ergebnisse zur Quantifizierung der AM-Sporen aus wurzelnahen Bodenproben

Die Anzahl der AM-Sporen wurde für die beiden Untersuchungszeitpunkte (im September 2002 und im Juni 2003) anhand von fünf wurzelnahen Bodenproben (je 10 g Trockengewicht [TG] Boden) pro untersuchter Pflanzenart bestimmt und gemittelt.

Abb. 3.4 Bestimmung der mittleren Sporendichte in wurzelnahen Bodenproben der untersuchten Pflanzenarten in Schreyahn



Die Abb. 3.4 zeigt den Vergleich der mittleren Sporengesamtanzahl mit Standardabweichung pro 10 g Trockengewicht (TG) Boden im September 2002 (dunkelgrau) und im Juni 2003 (hellgrau). Es wurden jeweils fünf wurzelnahen Bodenproben pro Pflanzenart untersucht.

Im Jahr 2002 wurde eine Zunahme der Sporendichte von der *Puccinellia distans*-Zone mit 101 ± 18 pro 10 g TG Boden auf die *Aster tripolium*-Zone (242 ± 20) ermittelt (Abb. 3.4). Zur *Salicornia europaea*-Zone fiel die Sporenanzahl auf 77 ± 31 pro 10 g TG Boden ab. Die Mittelwerte für Juni 2003

zeigten eine Zunahme der Sporenanzahl im Boden von *P. distans* von 95 ± 47 auf 121 ± 12 in der *A. tripolium*-Zone und eine Abnahme auf 6 ± 3 pro 10 g TG Boden zur *S. europaea*-Zone. Die Mittelwerte für die Sporendichte lagen im September 2002 bei allen drei Pflanzenarten höher als die entsprechenden Werte im Juni 2003.

3.3. Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze anhand der Sporen am Standort Schreyahn

Anhand der unter Abschnitt 3.2 beschriebenen Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades und der Sporendichte im Boden konnte das Vorkommen von AM-Pilzen am Standort Schreyahn gezeigt werden. Im weiteren Verlauf galt es zu klären, welche AM-Spezies in Schreyahn vorkommen, bzw. welche AM-Pilze die Wurzeln der untersuchten Pflanzenarten besiedeln.

3.3.1. Einblick in die AM-Diversität am Standort Schreyahn anhand der Sporenmorphologie

Eine Identifizierung der AM-Pilze, die nur auf den morphologischen Merkmalen der Sporen basiert, ist unsicher und schwierig, da die Sporen während ihrer Entwicklung oder aufgrund von Standortbedingungen bezüglich ihrer Größe und Farbe variabel sind. Einige AM-Spezies sind auch in der Lage, mehr als einen Sporentyp auszubilden (Smith *et al.* 1997; Redecker *et al.* 2003).

Dennoch erscheint eine, durch einen Experten vorgenommene, morphologische Charakterisierung der im Boden auftretenden AM-Sporen sinnvoll, um einen ersten Einblick in die Diversität der AM-Pilze am Standort zu erhalten. Die anhand ihrer morphologischen Sporenmerkmale durch Dr. E. Sieverding identifizierten AM-Spezies der Binnenland-Salzstelle Schreyahn für die Probenentnahmen im September 2002 und im Juni 2003 sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Die zeitaufwändige, morphologische Charakterisierung der isolierten Sporen durch Dr. E. Sieverding konnte nur einmal für jeden Probeentnahmezeitpunkt durchgeführt werden. In Tab. 3.1 sind in fester Schrift diejenigen Spezies hervorgehoben, deren Sporen zu beiden Entnahmezeitpunkten in den wurzelnahen Bodenproben der drei untersuchten Pflanzenarten identifiziert werden konnten. Die Sporen des AM-Pilzes *Glomus invermaium* kamen zwar zu beiden Untersuchungszeitpunkten vor, im September 2002 wurden sie allerdings bei *Aster tripolium* und im Juni 2003 bei *Salicornia europaea* nachgewiesen. *Glomus etunicatum*-Sporen befanden sich 2002 in den Bodenproben von *A. tripolium* und *S. europaea*, 2003 nur bei *A. tripolium*. Sporen von *Glomus fasciculatum* konnten 2002 und 2003 bei *A. tripolium* entdeckt werden, bei *S. europaea* aber nur im Jahr 2003. Sowohl bei den *Puccinellia distans*-, als auch bei den *S. europaea*-Bodenproben konnten zu beiden Untersuchungszeitpunkten jeweils vier AM-Spezies gefunden werden. Die Bodenproben von *A. tripolium* hingegen wiesen eine Spezies-Anzahl von dreizehn im Jahr 2002 und eine Anzahl von fünf Spezies im Jahr 2003 auf.

Tab. 3.1 Auflistung der anhand ihrer morphologischen Merkmale durch Dr. E. Sieverding charakterisierten AM-Sporen

AM-Sporen isoliert aus dem wurzel-nahen Boden von:	Probenentnahme September 2002	Probenentnahme Juni 2003
<i>Aster tripolium</i>	<i>Glomus geosporum</i> <i>Glomus geosporum</i> „klein“ <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus fasciculatum</i> <i>Glomus diaphanum</i> <i>Glomus invermaium</i> <i>Glomus hadleyi</i> nom. ined. <i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus coronatum</i> <i>Glomus laccatum</i> <i>Glomus vesiculiferum</i> <i>Glomus constrictum</i> <i>Glomus versiforme</i> <i>Glomus claroideum</i> oder <i>Glomus maculosum</i>	<i>Glomus geosporum</i> <i>Glomus geosporum</i> „klein“ <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus fasciculatum</i> <i>Paraglomus occultum</i> <i>Archaeospora trappei</i> oder <i>Acaulospora myriocarpa</i>
<i>Puccinellia distans</i>	<i>Glomus geosporum</i> <i>Glomus geosporum</i> „klein“ <i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus vesiculiferum</i> <i>Glomus constrictum</i>	<i>Glomus geosporum</i> <i>Glomus geosporum</i> „klein“ <i>Glomus halonatum</i> <i>Glomus pansihalos</i> (nicht eindeutig) <i>Glomus rubiforme</i> (Fragment)
<i>Salicornia europaea</i>	<i>Glomus geosporum</i> <i>Glomus geosporum</i> „klein“ <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus versiforme</i> <i>Glomus claroideum</i> oder <i>Glomus maculosum</i>	<i>Glomus invermaium</i> <i>Glomus fasciculatum</i> <i>Glomus hoi</i> <i>Archaeospora trappei</i> (nicht eindeutig)

Die Tab. 3.1 listet die von Dr. E. Sieverding anhand ihrer morphologischen Merkmale charakterisierten AM-Sporen am Standort Schreyahn im September 2002 und im Juni 2003 auf. In fetter Schrift hervorgehoben sind die AM-Spezies, deren Sporen zu beiden Entnahmezeitpunkten in Wurzelnähe der drei Pflanzenarten charakterisiert werden konnten.

Die Sporen des AM-Pilzes *Glomus geosporum* konnten in allen untersuchten Bodenproben aus Schreyahn identifiziert werden, mit Ausnahme der Probe von *S. europaea* aus dem Jahr 2003. Am Standort Schreyahn wurde eine Variante von *G. geosporum*-Sporen charakterisiert, die in Tab. 3.1 als *G. geosporum* „klein“ aufgeführt wird. Dieser Sporentyp wies zwar morphologische Merkmale von *G. geosporum* auf, war aber im Durchschnitt deutlich kleiner. Auf Untersuchungen zu den Sporen der Variante *G. geosporum* „klein“ wird in Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen.

3.3.2. Charakterisierung unbekannter sporenähnlicher Strukturen aus Schreyahn

Ein erster Einblick in die Diversität der AM-Pilze am Standort Schreyahn wurde durch eine morphologische Charakterisierung (siehe Abschnitt 3.3.1) der AM-Sporen, vorgenommen durch Dr. E. Sieverding, ermöglicht. Dabei fiel die hohe Anzahl (im Mittel 100 - 900 pro 10 g TG Boden) eines bislang unbekanntem Typs von sporenähnlichen Strukturen auf. Diese zunächst als „Salzsporen“ bezeichneten Strukturen, waren an den Küstenstandorten, die in der Vergangenheit von der Arbeitsgruppe untersucht worden waren, nicht beobachtet worden. Sie kamen jedoch an einer deutschen NaCl-Binnenland-Salzstelle (Barnstorf, Landkreis Wolfenbüttel) vor. Deshalb sollte geklärt werden, ob es sich um die Sporen eines speziellen „Binnenland-Salzstellen-AM-Pilzes“ handeln könnte. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden diese sogenannten Salzsporen als Zygoten der Alge *Vaucheria erythrospora* identifiziert. Dieser Sachverhalt war allerdings zu Beginn der folgenden Untersuchungen noch nicht bekannt.

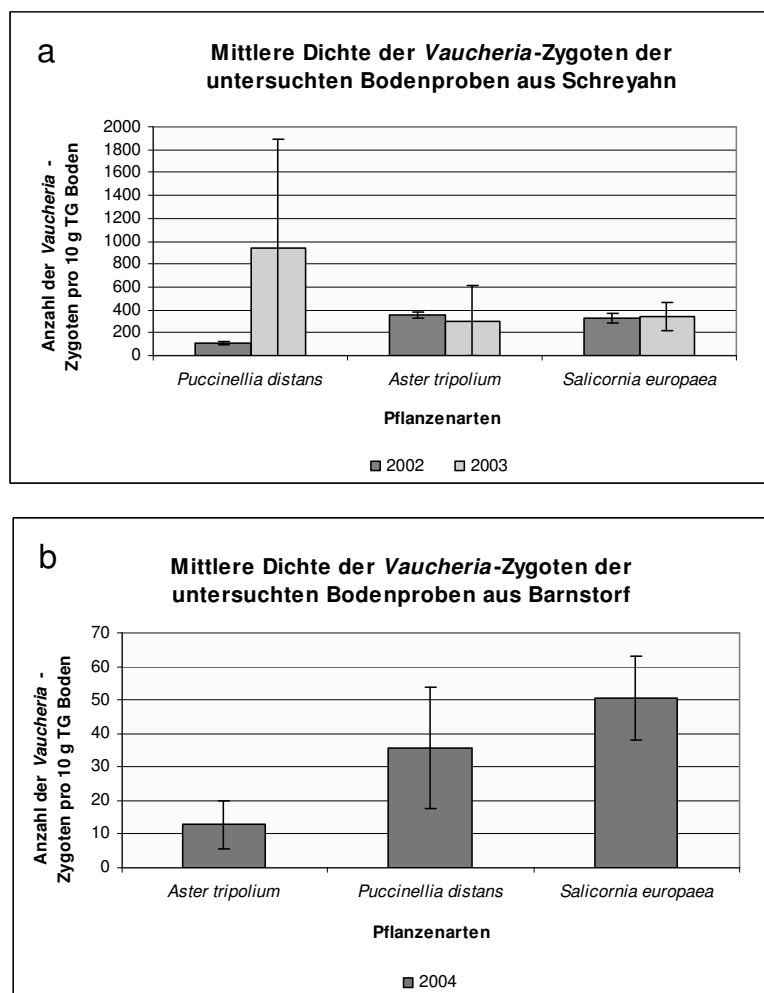
Die leicht ellipsoiden „Salzsporen“ (etwa 66 x 84 µm) traten sowohl mit weißlicher, als auch mit gelber, orange-brauner und dunkelbrauner Wandfärbung auf (siehe Abb. 3.7 a). Ein Großteil der aus dem Boden isolierten „Salzsporen“ besaß im Zentrum eine rot-braun pigmentierte Zone, in Abb. 3.7 als „Pigmentfleck“ bezeichnet. Zunächst wurde die Anzahl der „Salzsporen“ aus Schreyahn und Barnstorf im wurzelnahen Boden bestimmt und mit den erhaltenen Daten für die AM-Sporen verglichen.

An der Binnenland-Salzstelle Barnstorf war mit steigendem Bodensalzgehalt ein Anstieg der „Salzsporen“-Anzahl von 13 ± 7 (*Aster tripolium*) auf 36 ± 18 (*Puccinellia distans*) und dann auf 51 ± 12 (*Salicornia europaea*) pro 10 g TG Boden zu erkennen (siehe Abb. 3.5 b), während die AM-Sporenanzahl (siehe Abb. 3.6) von 126 ± 22 (*A. tripolium*) auf 53 ± 5 (*P. distans*) bzw. 36 ± 11 (*S. europaea*) pro 10 g TG Boden absank. In Schreyahn lag die „Salzsporen“-Anzahl für die Bodenproben von *P. distans* bei 112 ± 13 (für 2002), bzw. 937 ± 959 (für 2003) pro 10 g TG Boden. Die *A. tripolium*-Zone wies im Jahr 2002 eine Anzahl von 350 ± 30 und im Jahr 2003 eine Anzahl von 303 ± 307 „Salzsporen“ pro 10 g TG Boden auf. Die Werte von *S. europaea* lagen 2002 bei 328 ± 36 und 2003 bei 343 ± 119 pro 10 g TG Boden (siehe Abb. 3.5 a). Die bis dahin ausschließliche Beobachtung dieser „Salzsporen“ in Schreyahn und Barnstorf ließ die Vermutung zu, dass es sich um einen bisher unbekanntem aber erfolgreichen Kolonisierer innerhalb der Salzpflanzenwurzeln an Binnenlandsalzstellen handeln könnte. Deshalb war es ein Ziel diesen „Salzsporentyp“ zu identifizieren und innerhalb der Wurzeln nachzuweisen.

Beobachtungen zur Keimung von AM-Sporen können als morphologisches Kriterium hilfreich sein und werden auch bei den Spezies-Beschreibungen der INVAM (*International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi*) als Identifizierungshilfe aufgeführt. Deshalb erfolgten zur Charakterisierung der „Salzsporen“ Keimungsversuche auf Minimalmedium- und Wasseragar-Platten, die mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (je 0; 0,25; 0,5; 1; 2 % K_2CO_3) angesetzt wurden. Die „Salzsporen“ wurden oberflächensterilisiert, etwa zehn pro Platte ausplattiert, die Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur für zehn bis zwölf Wochen gelagert und zweimal wöchentlich kontrolliert. Es konnte jedoch keine Keimung festgestellt werden. Um auszuschließen, dass pflanzliche Substanzen zur Keimung notwendig sind, wurde je eine ca. 10 Tage alte Wirtspflanze

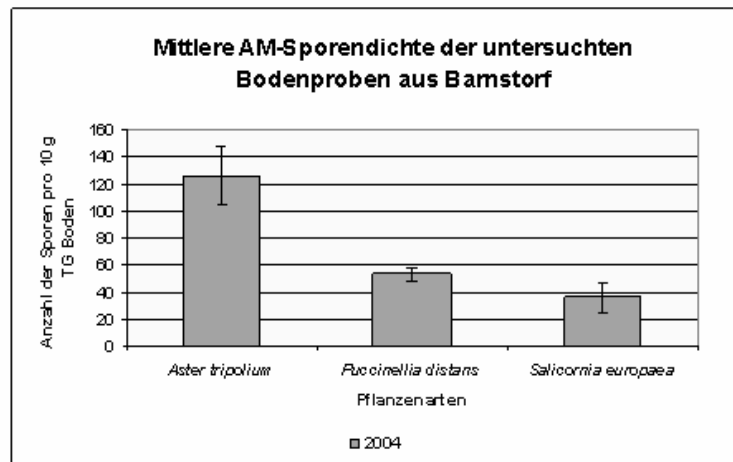
(*Plantago maritima*) mit etwa fünfzig „Salzsporen“ in Nähe der Wurzeln angezogen. Das Substrat bestand entweder aus einem autoklavierten Gemisch aus Lecaton und Einheitserde oder es wurde autoklavierter Boden aus Schreyahn eingesetzt (siehe Abschnitt 2.5.5). Nach ca. drei Monaten wurden die Pflanzenwurzeln auf eine Mykorrhizierung hin untersucht. Es konnte keine Besiedlung beobachtet werden. Zur molekularbiologischen Charakterisierung erfolgten PCR-Versuche mit AM-Pilz-spezifischen und universellen Primern, die jedoch ohne positive Ergebnisse verliefen. Es wurden sowohl einzelne, als auch mehrere „Salzsporen“ jeweils in die PCR eingesetzt, um eine eventuell zu geringe DNA-Menge auszuschließen. Die möglicherweise im Boden enthaltenen PCR-inhibierenden Stoffe sollten durch Anwendung des UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) entfernt werden (siehe Abschnitt 2.4.5). Dazu wurden etwa hundert isolierte „Salzsporen“ anstatt einer Bodenprobe zur DNA-Isolierung eingesetzt.

Abb. 3.5 Quantifizierung der *Vaucheria erythrospora*-Zygoten aus Schreyahn und Barnstorf



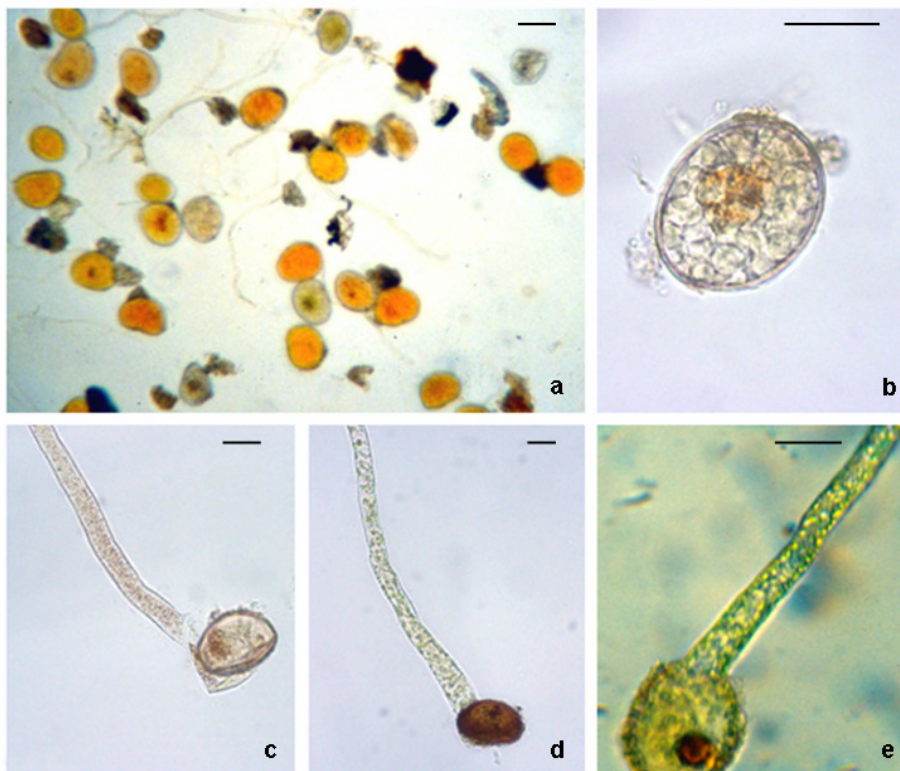
Die Abb. 3.5 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtanzahl der *Vaucheria*-Zygoten pro 10 g TG (Trockengewicht) Boden. In Abb. a) sind die Werte der Binnenland-Salzstelle Schreyahn aus den Jahren 2002 (dunkelgrau) und 2003 (hellgrau) dargestellt, in b) die der Binnenland-Salzstelle Barnstorf aus dem Jahr 2004. n = 5

Abb. 3.6 Quantifizierung der AM-Sporen aus wurzelnahen Bodenproben aus Barnstorf



Die Abb. 3.6 zeigt den Vergleich der mittleren Sporengesamtanzahl pro 10 g TG (Trockengewicht) Boden im Jahr 2004 der wurzelnahen Bodenproben (n = 5) aus Barnstorf pro untersuchter Pflanzenart mit Standardabweichung.

Abb. 3.7 Erscheinungsformen der *Vaucheria erythrospora*-Zygoten aus Schreyahm



Die Abb. 3.7 zeigt in
a: einige Farbvarianten der Zygoten, teils mit und teils ohne Pigmentfleck
b : eine isolierte Zygote mit Pigmentfleck
c und d: Zygote mit auswachsendem Keimschlauch, nach ca. 21tägiger Inkubation in Leitungswasser
e: wie c und d, aber mit deutlich erkennbarer Grünfärbung der plastidären Strukturen
Die schwarzen Balken entsprechen in a 100 µm, in b-e jeweils 50 µm.
Alle hier dargestellten Zygoten befanden sich in Leitungswasser.

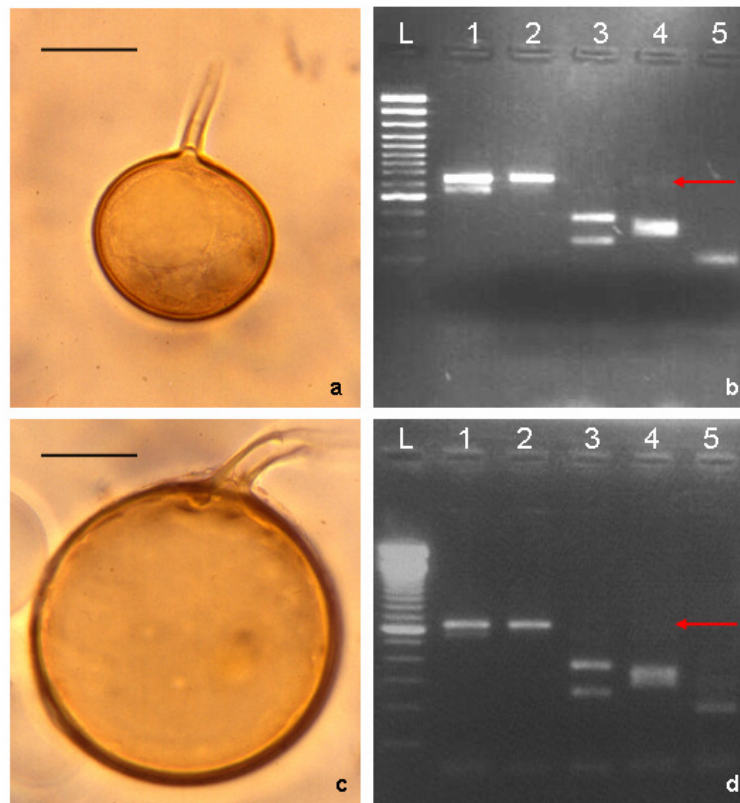
Ein Amplifikat aus einer „Salzspore“ hätte möglicherweise zur direkten Identifizierung oder aber zur Entwicklung von spezifischen Primern für den „Salzsporen-Pilz“ führen können um ihn als Kolonisierer innerhalb der Salzpflanzenwurzeln nachzuweisen.

Erst nach einer zehn- bis vierzehntägigen Inkubation bei 4 °C in Leitungswasser konnte das Auswachsen einer grünen „keimschlauchartigen“ Struktur festgestellt werden, so dass es sich eindeutig nicht um pilzliche Sporen handeln konnte. Die „Salzsporen“ der Binnenland-Salzstellen Schreyahn und Barnstorf konnten daraufhin als auskeimende Zygoten von *Vaucheria erythrospora* aus der Klasse der Xanthophyceae charakterisiert werden (Dr. K.-H. Linne von Berg, Köln, persönliche Mitteilung).

3.3.3. Charakterisierung unterschiedlicher „Sporenvarianten“ von *Glomus geosporum*

Es wurde bereits erwähnt (siehe 3.3.1), dass in Schreyahn Sporen des AM-Pilzes *Glomus geosporum* morphologisch charakterisiert werden konnten. In der Tab. 3.1 wird neben *G. geosporum* zusätzlich noch *G. geosporum* „klein“ für beide Untersuchungszeitpunkte aufgeführt. Diese *G. geosporum*-„Variante“ wies laut Dr. E. Sieverding zwar gleiche morphologische Merkmale wie *G. geosporum* auf, war aber im Durchschnitt deutlich kleiner. Zum Vergleich sind die beiden *G. geosporum*-„Varianten“ in Abb. 3.8 a und c dargestellt. Die durchschnittliche Größe für *G. geosporum*-Sporen beträgt nach der Beschreibung von Walker aus dem Jahr 1982, (Schenck *et al.* 1990) 110 - 290 µm, während die „kleinen“ *Glomus geosporum*-Sporen aus Schreyahn einen Durchmesser von 80 - 130 µm (Mittelwert: 110 µm ± 10,5; n = 20) aufwiesen. Die mögliche Annahme, dass es sich dabei um junge *G. geosporum*-Sporen handeln könnte, trifft nicht zu (Dr. E. Sieverding, mündliche Mitteilung). Zur weiteren Charakterisierung wurde ein PCR-Amplifikat (ca. 620 bp) aus dem ITS-Bereich einer „kleinen“ *G. geosporum*-Spore, wie sie unter Abb. 3.8 a dargestellt ist, mit fünf Restriktionsenzymen verdaut. Diese sogenannte RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)-Analyse ermöglicht eine erste molekularbiologische Absicherung bzw. Überprüfung der morphologischen Charakterisierung, denn ein RFLP-Muster (siehe Abb. 3.8 b und d) aus der hochvariablen ITS-Region kann die Zuordnung zu einer bestimmten AM-Pilz-Spezies ermöglichen (Redecker *et al.* 1997), falls Referenzmuster vorliegen. Das Amplifikat wurde mit den Primern ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990) erhalten, die PCR wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Das in Abb. 3.8 d dargestellte RFLP-Muster wurde aus einem Amplifikat (mit den Primern ITS4 und ITS5) einer *G. geosporum*-ähnlichen Spore aus Schreyahn erstellt, die einen Durchmesser ≥ 150 µm aufwies. Die beiden erhaltenen Restriktionsmuster sind nahezu identisch mit dem Muster, das von einer Spore des Isolats *G. geosporum* BEG11 (Hildebrandt *et al.* 2001) erhalten wurde.

Abb. 3.8 Fotos und RFLP-Muster von *Glomus geosporum*-Sporen aus Schreyahn



Die Abb. 3.8 zeigt in

a: ein Foto einer isolierten AM-Spore aus Schreyahn, die als Typ *Glomus geosporum* „klein“ charakterisiert wurde.

b: ein RFLP-Muster, das aus einer AM-Spore aus Schreyahn des gleichen Typs erhalten wurde, wie er in a dargestellt ist.

c: ein Foto einer isolierten AM-Spore aus Schreyahn, die als *Glomus geosporum* ($\geq 150 \mu\text{m}$) charakterisiert wurde.

d: ein RFLP-Muster, das aus einer AM-Spore aus Schreyahn des gleichen Typs erhalten wurde, wie er in c dargestellt ist.

Die schwarzen Balken entsprechen jeweils $50 \mu\text{m}$. Es wurden jeweils $8 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und für 45 min bei 10 V / cm aufgetrennt. Die Höhe der 600 bp-Bande ist jeweils durch einen roten Pfeil markiert. Reihenfolge der eingesetzten Restriktionsenzyme:

1 = *AluI*, 2 = *BsuRI*, 3 = *HinfI*, 4 = *HpaII*, 5 = *TaqI*, L = 100 bp-Leiter

Da eine Übereinstimmung im Restriktionsmuster noch keine hinreichende Bedingung für eine sichere molekularbiologische Charakterisierung darstellt, wurden die aus den Sporen erhaltenen Amplifikate sequenziert. Die zwischen den beiden ITS-Regionen liegende Sequenz der 5,8S rDNA und ein Teil der ITS2-Region (insgesamt ca. 300 bp) wurden einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die erhaltenen Sequenzen in ein Alignment mit weiteren AM-Sequenzen, bezogen aus GenBank (NCBI) gestellt, welche die Hauptgruppen der Glomeromycota repräsentieren. In einem Alignment werden die homologen Sequenzen so angeordnet, dass die größtmögliche Anzahl übereinstimmender Positionen untereinander steht. Die aus Schreyahn erhaltenen Sequenzen wurden in den in Abb. 3.12 dargestellten Stammbaum eingerechnet. Zusätzlich wurden Sequenzen integriert,

die in vorangegangenen Arbeiten aus *G. geosporum*-Sporen von Salzstellen der Küste und des Binnenlandes (Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Manal 2006) erhalten wurden. In den 5,8S-ITS2-Stammbaum (Abb. 3.12) konnten insgesamt zehn Sequenzen aus *G. geosporum*-ähnlichen Einzelsporen aus Schreyahn eingerechnet werden (grau unterlegt). Davon gehörten fünf zur „kleinen“ Variante und fünf hatten einen Durchmesser über 150 µm. Drei der „kleinen“ Sporen wurden aus Wurzelstückchen herauspräpariert. Auf diese Sporen wird nachfolgend in Abschnitt 3.3.4 eingegangen. Alle zehn Sequenzen konnten in die Familie der Glomeraceae, in die Gattung *Glomus*, Untergruppe Aa (Schwarzott *et al.* 2001) eingeordnet werden. Die Sequenzidentitäten der aus Schreyahn isolierten *G. geosporum*-ähnlichen AM-Sporen zu einer Sequenz des Isolates *G. geosporum* BEG11 (AJ239122) liegen im 5,8S rDNA-ITS2-Bereich zwischen 89,4 und 93,5 % und sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.2 Sequenzidentitäten *Glomus geosporum*-ähnlicher AM-Sporen zu Sequenzen des Isolates *Glomus geosporum* BEG11 (AJ239122 bzw. AJ245637)

<i>Glomus geosporum</i> -ähnliche AM-Sporen, isoliert aus Schreyahn	Sequenzidentität zu <i>Glomus geosporum</i> BEG11 (AJ239122 bzw. AJ245637) in %	
	5,8S rDNA-ITS2	18S
<i>Glomus</i> sp. „Schreyahn, Boden“	90,8 - 93,5 (5)	98,8 - 99,4 (6)
<i>Glomus</i> sp. „Schreyahn, Boden, klein“	91,8 - 92,8 (2)	99,4 (1)
<i>Glomus</i> sp. „Schreyahn, Wurzel, klein“	89,4 - 90,8 (3)	n.d.

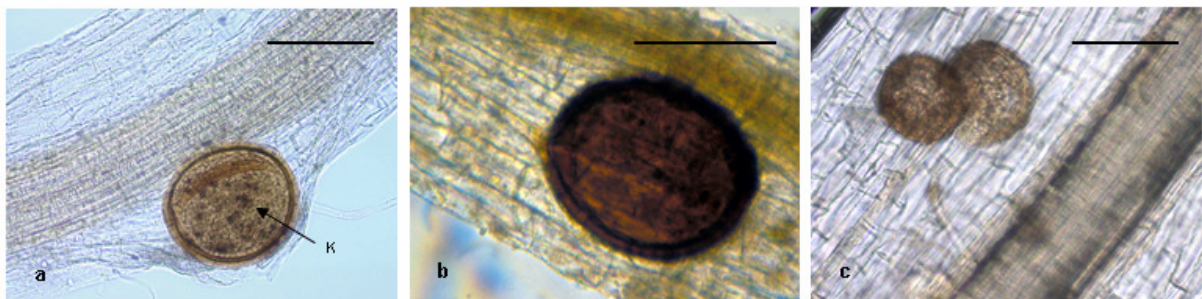
Tab. 3.2 vergleicht die Sequenzidentitäten des 5,8S rDNA-ITS2-Bereichs (ca. 300 bp) und eines Fragments des 18S rDNA-Bereichs (550 bp) von Sporesequenzen aus Schreyahn und Sequenzen von *Glomus geosporum* BEG11 (AJ239122 bzw. AJ245637) aus GenBank. n.d. = nicht durchgeführt

Zum Vergleich und zur weiteren Ergänzung wurde die Einzelsporen-PCR mit den *G. geosporum*-ähnlichen AM-Sporen zusätzlich mit den Primern AM1 und NS31 (Helgason *et al.* 1998) durchgeführt. Auf diese Weise wurde ein etwa 550 bp langes Fragment der 18S rDNA amplifiziert. Für den 18S rDNA-Stammbaum (Abb. 3.13) gab es keine entsprechenden Vergleichsequenzen aus zuvor in der Arbeitsgruppe untersuchten Salzstellen. Der 18S rDNA-Stammbaum (Abb. 3.13) enthält acht Sequenzen (grau unterlegt), die aus *G. geosporum*-ähnlichen Sporen aus Schreyahn stammen. Die in der Abb. 3.13 fett markierte Sequenz wurde aus einer Spore des Typs *G. geosporum* „klein“ erhalten. Von den acht Sequenzen fallen sieben in die Familie Glomeraceae A, Gattung *Glomus*, Untergruppe Aa (Schwarzott *et al.* 2001), während eine Sequenz („S_6/2 *Glomus* sp. Schreyahn“) in die Familie Glomeraceae B eingeordnet wurde. Die Übereinstimmung der Sequenz „S_6/2 *Glomus* sp. Schreyahn“ zu *G. geosporum* BEG11 (AJ245637) betrug 89,4 % und ist in Tabelle 3.2 nicht aufgeführt. Die Sequenzidentitäten der anderen sieben Schreyahn-Sequenzen aus der Gruppe *Glomus* Aa zu *G. geosporum* BEG11 (AJ245637) sind in Tab. 3.2 aufgelistet und liegen zwischen 98,8 und 99,4 %.

3.3.4. AM-Sporen innerhalb der Wurzeln von *Puccinellia distans*

In einigen Fällen konnte die Ausbildung von AM-Sporen innerhalb der Wurzeln von *Puccinellia distans* dokumentiert werden (siehe Abb. 3.9 a-c). Die dunklen „Flecken“, die auf der Spore in Abb. 3.9 a zu erkennen sind, rühren wahrscheinlich von pilzlichen Kontaminationen her (Dr. E. Sieverding, mündliche Mitteilung), die nicht weiter untersucht wurden. Die in den Abb. 3.9 a-c dargestellten Sporen wurden von Dr. E. Sieverding mit hoher Sicherheit der Variante *Glomus geosporum* „klein“ zugeordnet. Aus drei Wurzelstückchen von *P. distans* konnten einzelne Sporen herauspräpariert werden, die morphologisch den unter Abb. 3.9 a-c dargestellten Sporen sehr ähnelten.

Abb. 3.9 AM-Sporen innerhalb der Wurzeln von *Puccinellia distans* aus Schreyahn



Die Abb. 3.9 zeigt in a, b und c AM-Sporen, die sich innerhalb der Wurzeln von *Puccinellia distans* befinden. Das Wurzelstück in Bild a ist in PVLG fixiert, die dunklen „Flecken“ sind Kontaminationen (K). Die Wurzelstücke in den Bildern b und c liegen in Wasser. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils 100 µm.

Mit diesen Sporen wurde jeweils einzeln eine PCR mit den Primern ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990) durchgeführt, wie unter Abschnitt 2.6 beschrieben. Aus den erhaltenen Amplifikaten konnten Sequenzen ermittelt und anschließend in denselben 5,8S-ITS2-Stammbaum (siehe Abb. 3.12) eingerechnet werden, wie die unter 3.3.3 beschriebenen *G. geosporum*-Sporeensequenzen aus dem Boden aus Schreyahn. Sie fallen ebenfalls in die Familie der Glomeraceae, in die Gattung *Glomus*, Untergruppe Aa (Schwarzott *et al.* 2001). Die Sequenzidentität zu *G. geosporum* BEG11 (AJ239122) liegt zwischen 89,4 - 90,8 %. Diese Werte sind niedriger als die der Sequenzen, die aus frei im Boden vorliegenden „kleinen“ Sporen stammen (91,8 – 92,8 %; siehe Tab. 3.2).

3.3.5. Sporen mit Sacculus in Wurzelnähe von *Puccinellia distans*

Es wurden vereinzelt farblose, hyaline AM-Sporen aus wurzelnahen Bodenproben von *Puccinellia distans* isoliert, die einen Durchmesser von ca. 45 µm aufwiesen und einen säckchenartigen Anhang (Sacculus) besaßen (siehe Abb. 3.10 a-c). Nach morphologischer Begutachtung der Abb. 3.10 a-c wurde von Dr. E. Sieverding in Betracht gezogen, dass es sich um Sporen von *Archaeospora trappei* oder *Acaulospora myriocarpa* handeln könnte.

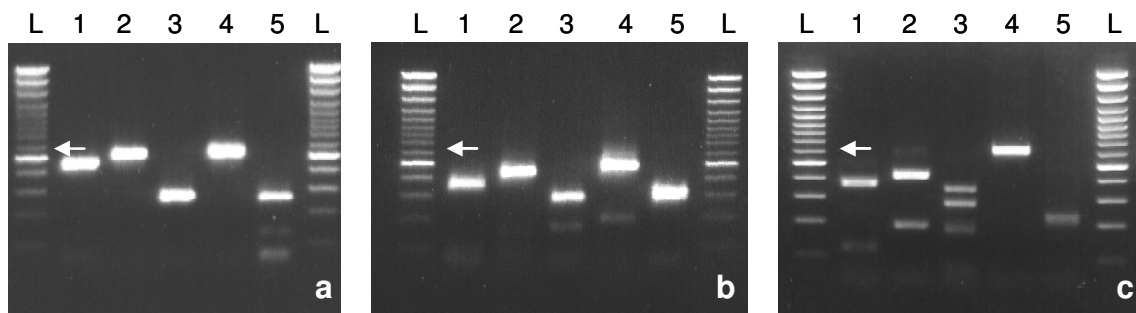
Abb. 3.10 Fotos der AM-Sporen mit Sacculus aus Schreyahn



Die in der Abb. 3.10 a-c abgebildeten Sporen (Sp) besitzen alle einen Sacculus (Sa), befinden sich in Leitungswasser und wurden aus Wurzelnähe von *Puccinellia distans* isoliert. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils 50 µm.

Mittels PCR wurden weder mit den universellen Primern ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990), noch mit den AM-Pilz-spezifischen Primern AM1 und NS31 (Helgason *et al.* 1998) Amplifikate aus Einzelsporen des unter Abb. 3.10 a-c dargestellten Typs erhalten. Auch mit den Primerkombinationen ARCH1311 bzw. ACAU1660 und ITS4 (Redecker 2000c), die spezifisch den ITS-Bereich einiger Arten der Archaeosporaceae, Acaulosporaceae und Paraglomeraceae amplifizieren sollten, konnten keine Amplifikate erhalten werden. Erst durch eine „nested“ PCR-Methode (Renker *et al.* 2003) wurden zwei Amplifikate aus Einzelsporen erhalten. Dabei wurde der PCR mit den Primern ITS4 und ITS5 eine PCR mit der Primerkombination LSU-Glom. und SSU-Glom. (Renker *et al.* 2003) vorgeschaltet. Ein weiteres Amplifikat wurde mit einer sogenannten „Sammelsporen-PCR“ erhalten. Damit ist gemeint, dass etwa 50 in einem Reaktionsgefäß vereinigte Sporen mit Sacculus in 30 µl PCR-Puffer zerquetscht wurden und davon 1 µl in die erste PCR eingesetzt wurde. Die drei nach der „nested“ PCR erhaltenen Amplifikate wiesen Größen zwischen ca. 520 bis 650 bp auf. Mit diesen drei Amplifikaten wurde eine RFLP-Analyse durchgeführt. Es lag jedoch keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten RFLP-Mustern von AM-Pilzen vor.

Abb. 3.11 RFLP-Muster aus Amplifikaten der Sporen mit Sacculus



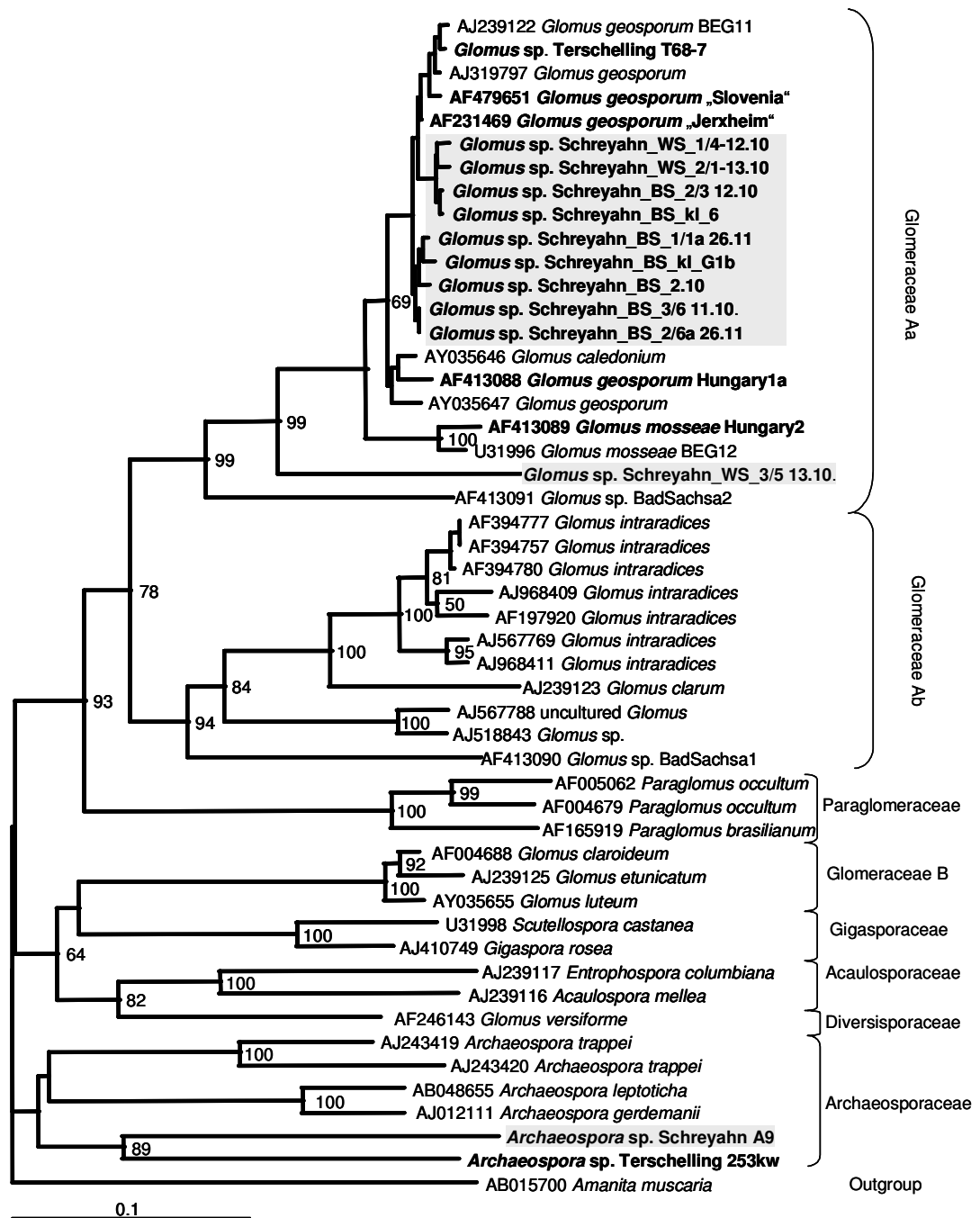
Die Abb. 3.11 a-c zeigt RFLP-Muster. Die Höhe der 600 bp-Banden ist jeweils durch einen weißen Pfeil markiert. Reihenfolge der eingesetzten Restriktionsenzyme:

1 = *AluI*, 2 = *BsuRI*, 3 = *HinfI*, 4 = *HpaII*, 5 = *TaqI*, L = 100 bp-Leiter

Die in die jeweilige RFLP-Analyse eingesetzten Amplifikate stammten bei a und b aus Einzelsporen, bei c aus einer „Sammelsporen-PCR“. Es wurden jeweils 10 µl Reaktionsansatz pro Spur auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und für 45 min bei 10 V / cm aufgetrennt.

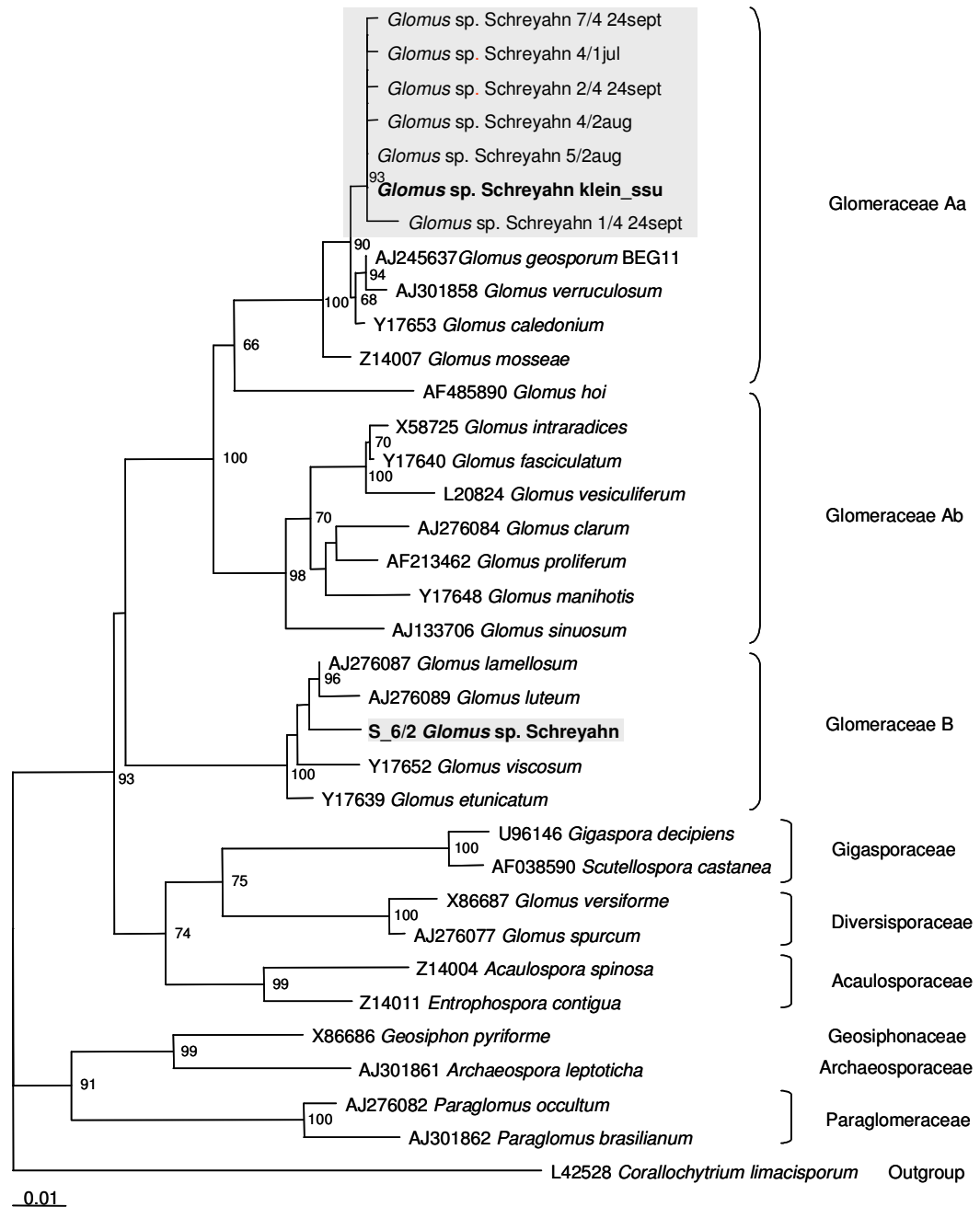
Die unter Abb. 3.11 a und b dargestellten RFLP-Muster stammten von den beiden Einzelsporenamplicaten. Nach erfolgter Sequenzierung ergab ein durchgeführter „BLAST search“ (Version 2.0; (Altschul *et al.* 1990)), dass die höchsten Sequenzidentitäten zu Datenbankeinträgen von Basidiomyceten vorlagen. So bestand bei einer der Sequenzen eine Übereinstimmung von 99 % zu *Dioszegia hungarica* (AB049614; 471 Übereinstimmungen bei 473 bp) und bei der anderen wurde eine Sequenzidentität von 97 % zu *Datronia mollis* (AF516557; 430 Übereinstimmungen bei 442 bp) aufgezeigt. Das unter Abb. 3.11 c dargestellte Restriktionsmuster wurde durch Verdau des „Sammelsporen“-Amplifikates erhalten. Die erhaltene Sequenz gruppiert sich in die Familie der Archaeosporaceae und trägt die Bezeichnung „*Archaeospora* sp. Schreyahn A9“ im 5,8S rDNA-ITS2-Stammbaum (Abb. 3.12). Die höchste Sequenzidentität von 95 % nach „BLAST search“ konnte zu einem Datenbankeintrag von *Archaeospora trappei* (AJ243420) aufgezeigt werden, allerdings nur für den relativ kleiner Bereich (161 Übereinstimmungen bei 169 bp) der 5,8S rDNA. Die Sequenzidentität für den Bereich 5,8S-ITS2 lag hingegen nur bei 40,6 %. Zum Vergleich wurde in den Stammbaum (Abb. 3.12) eine Sequenz (*Archaeospora* sp. Terschelling 253kw) miteingerechnet, die aus einer Einzelspore eines holländischen Küstenstandortes (Salzmarsch von Terschelling) erhalten wurde (Manal 2006). Dieser Sporentyp wurde von Dr. E. Sieverding morphologisch ebenfalls den Archaeosporaceae zugeordnet. Die Sequenzidentität zwischen „*Archaeospora* sp. Terschelling 253kw“ und „*Archaeospora* sp. Schreyahn A9“ beträgt 94 % für die 5.8S rDNA und 66,2 % für den Bereich 5,8S rDNA-ITS2.

Abb. 3.12 Einordnung der AM-Sporesequenzen aus Schreyahn in einen Stammbaum der Glomeromycota (5,8S rDNA-ITS2)



Das NJ-Phylogramm in Abb. 3.12 zeigt die Verwandtschaft von 11 Sporen-Sequenzen (5,8S rDNA-ITS2, ca. 300 bp) aus Schreyahn (grau unterlegt; GenBank-Zugriffsnummern: EU359253-56, 58, 60, 61, 63, 64, 68, 69) zu 39 GenBank-Sequenzen, die die Hauptgruppen der Glomeromycota repräsentieren und Sequenzen, die in vorangegangenen Arbeiten über andere Salzstandorte erhalten wurden (nur fett gedruckt; GenBank-Zugriffsnummern: EU350743, EU350761). WS = Spore isoliert aus Wurzel; BS = Spore isoliert aus Boden; BS_kl = „kleine“ Spore isoliert aus Boden. Der Balken gibt einen Unterschied von 10 auf 100 bp an. Nur Bootstrap-Werte über 60 % (1000 Wiederholungen) wurden an den Knoten angegeben. Zur Wurzelung wurde eine Sequenz von *Amanita muscaria* (Basidiomycetes) gewählt.

Abb. 3.13 Einordnung der AM-Einzelsporeensequenzen aus Schreyahn in einen 18S rDNA-Stammbaum (550 bp Fragment) der Glomeromycota



Das NJ-Phylogramm in Abb. 3.13 zeigt die Verwandtschaft von 8 Einzelsporen-Sequenzen (550 bp Fragment der 18S rDNA) aus Schreyahn (grau unterlegt; GenBank-Zugriffsnummern: DQ264054, 55, 57, 58, 59, 62, 63) zu 27 GenBank-Sequenzen, die die Hauptgruppen der Glomeromycota repräsentieren. Der Balken gibt einen Unterschied von 1 auf 100 bp an. Nur Bootstrap-Werte über 60 % (1000 Wiederholungen) wurden an den Knoten angegeben. Zur Wurzelung wurde eine Sequenz von *Corallochytrium limacisporum* (L42528) gewählt.

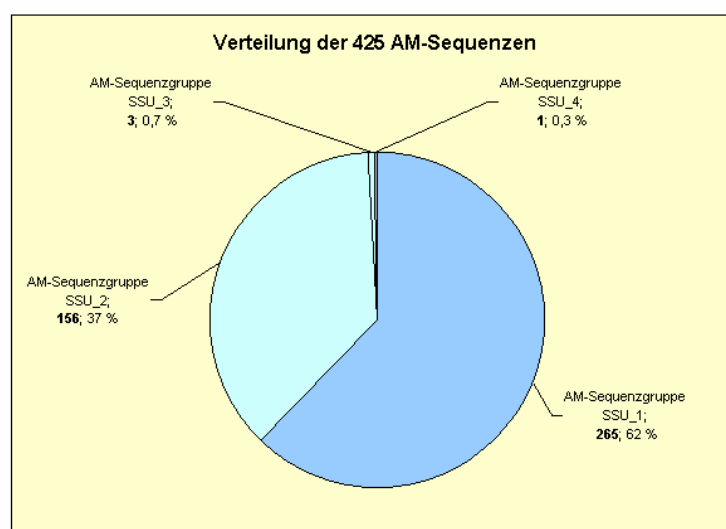
3.4. Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln in Schreyahn anhand eines Fragments der 18S rDNA

Nachdem ein erster Einblick in die AM-Sporen-Diversität am Standort Schreyahn erhalten werden konnte, wurde die Zusammensetzung der wurzelbesiedelnden AM-Pilze molekularbiologisch untersucht. Zunächst wurde eine PCR im Bereich der 18S rDNA mit der Primerkombination AM1 und NS31 (Helgason *et al.* 1998) durchgeführt. Der Primer AM1 ist pilzspezifisch und diskriminiert die pflanzliche DNA, die mengenmäßig gegenüber der pilzlichen DNA (etwa 5 %) überwiegt (Toth *et al.* 1991). Pro Untersuchungszeitpunkt (September 2002 und Juni 2003) konnten aus je drei Exemplaren von *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* PCR-Amplifikate der erwarteten Größe von ca. 550 bp erhalten werden.

Die zur DNA-Isolierung eingesetzten *A. tripolium*-Exemplare wiesen 2002 Mykorrhizierungsgrade zwischen 95-97 % auf, 2003 zwischen 81-82 %. Die ausgewählten Exemplare von *P. distans* waren 2002 zwischen 50-70 % mykorrhiziert, im Jahr 2003 zwischen 15-20 %. Die Wurzeln von *Salicornia europaea* zeigten nach Anfärbung keine AM-Pilzstrukturen und es wurden keine PCR-Amplifikate in der erwarteten Größe erhalten.

Da aus den PCR-Ansätzen mit den Einzelsporen nur acht AM-Amplifikate hervorgingen (siehe Abschnitt 3.3.3), wurde anstelle von Einzelsporen sogenannte „Sporengruppen“-DNA in die PCR eingesetzt, um den Datensatz für die Sporen zu erhöhen. Unter „Sporengruppen“-DNA ist zu verstehen, dass die vereinigten Sporen der 45- und 80 µm-Siebfraktionen aus 10 g FG einer wurzelnahen Bodenprobe in das UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) eingesetzt wurden. Auf diese Weise sollten eine zu geringe DNA-Menge und das Auftreten PCR-inhibierender Stoffe vermieden werden.

Abb. 3.14 Grafik der Sequenzverteilung auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 - SSU_4



Die Abb. 3.14 zeigt die Verteilung der 425 AM-Sequenzen (18S rDNA-Fragment) auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 - SSU_4. Es sind die Anzahl (fett) und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der jeweiligen AM-Sequenzgruppe angegeben.

Insgesamt wurden für den 18S rDNA-Bereich 425 AM-Sequenzen aus einzelnen Sporen (8), Sporengruppen (89) und Wurzeln (328) erhalten. Um diese 425 AM-Sequenzen aus Schreyahn übersichtlich in einen Stammbaum einrechnen zu können, wurden die Sequenzen, die eine paarweise Sequenzidentität von $\geq 98,2\%$ aufwiesen, in eine Sequenzgruppe gestellt. Auf diese Weise bildeten sich vier Gruppen, die im Weiteren als AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 bezeichnet werden.

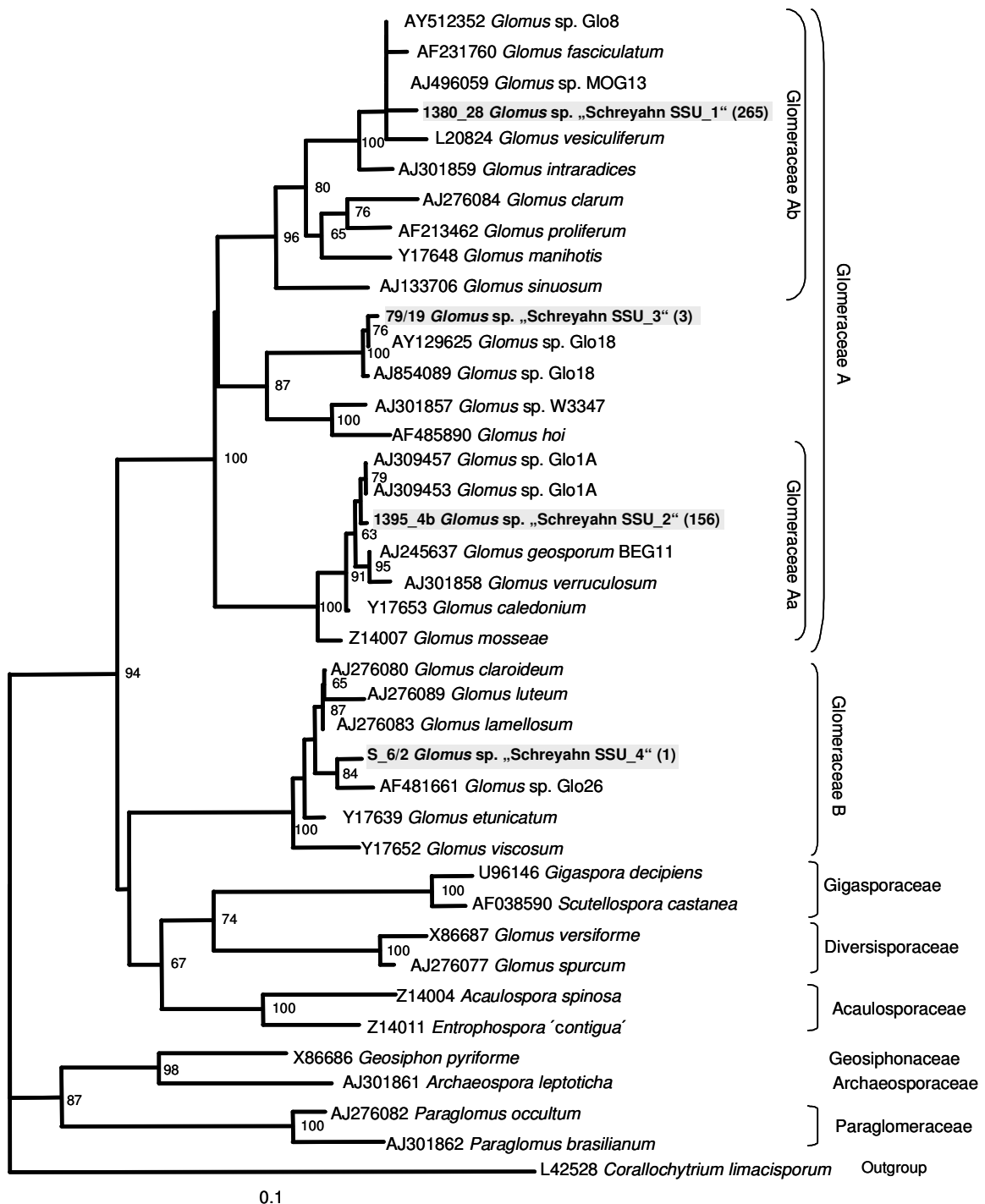
Die Abb. 3.14 zeigt, dass ein Großteil der Sequenzen (421) sich auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 (265) und SSU_2 (156) verteilte. Die AM-Sequenzgruppe SSU_3 enthält drei Sequenzen, die alle aus dem Jahr 2002 aus den Wurzeln eines *A. tripolium*-Exemplares stammen. Die AM-Sequenzgruppe SSU_4 besteht aus einer Einzelsporeensequenz.

Eine phylogenetische Einordnung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 aus Schreyahn in ein NJ-Phylogramm (18S rDNA; 550 bp) der Glomeromycota ist in Abb. 3.15 dargestellt. Vor den Bezeichnungen der AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 ist eine stellvertretende Sequenz angegeben und in Klammern ist die Anzahl der Sequenzen aus denen die Gruppe besteht aufgeführt. Die anderen Sequenzen, die sich in dem Stammbaum befinden, wurden aus GenBank (NCBI) bezogen und bilden Referenzsequenzen für die Hauptgruppen der Glomeromycota. Des Weiteren wurden zu den AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 aus Schreyahn die zwei Datenbankeinträge mit der höchsten Sequenzidentität nach „BLAST search“ (Version 2.0; (Altschul *et al.* 1990)) eingerechnet. Signifikante Bootstrapwerte über 60 % wurden an den Knoten angegeben.

Die erhaltenen AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 aus Schreyahn ordnen sich folgendermaßen in den unter Abb. 3.15 dargestellten Stammbaum der Glomeromycota ein:

Die AM-Sequenzgruppe SSU_1 platziert sich in die *Glomus*-Gruppe Ab (Schwarzott *et al.* 2001), nah verwandt zu *Glomus fasciculatum* (AF231760) und *Glomus intraradices* (AF301859). Die Sequenzidentitäten liegen bei 98,4 % bzw. 98 %. Die höchste Sequenzidentität von SSU_1 besteht jedoch zu zwei Sequenzen unkultivierter AM-Pilze, *Glomus* sp. MOG13 (AJ496059) und *Glomus* sp. Glo8 (AY512352) mit jeweils 99,2 %. AM-Sequenzgruppe SSU_2 fällt in die Untergruppe *Glomus* Aa (Schwarzott *et al.* 2001), die beiden nächstverwandten Sequenzen sind *Glomus* sp. Glo1A (AJ309453 und AJ309457) mit jeweils 99,8 %. Die Sequenzidentität von SSU_2 zu einer Sequenz des Isolates *Glomus geosporum* BEG11 (AJ245637) liegt bei 99,4 %. Die AM-Sequenzgruppe SSU_3 befindet sich zwar am Hauptast der Glomeraceae A, aber an einem Nebenzweig zur *Glomus*-Gruppe Ab, der nicht durch einen signifikanten Bootstrapwert abgesichert ist. Sequenzen von *Glomus* sp. Glo18 (AY129625 und AJ854089) weisen eine Identität von jeweils 99,8 bzw. 99,6 % zu SSU_3 auf. An einem Nachbarzweig befindet sich eine Sequenz von *Glomus hoi* (AF485890) mit 94,8 % Sequenzidentität zu SSU_3. Die AM-Sequenzgruppe SSU_4 aus Schreyahn fällt in die Gruppe B der Glomeraceae, und besitzt jeweils 98,4 % Sequenzidentität zu Sequenzen von *Glomus claroideum* (AJ276080), *Glomus lamellosum* (AJ276087) und *Glomus* sp. Glo26 (AF481661).

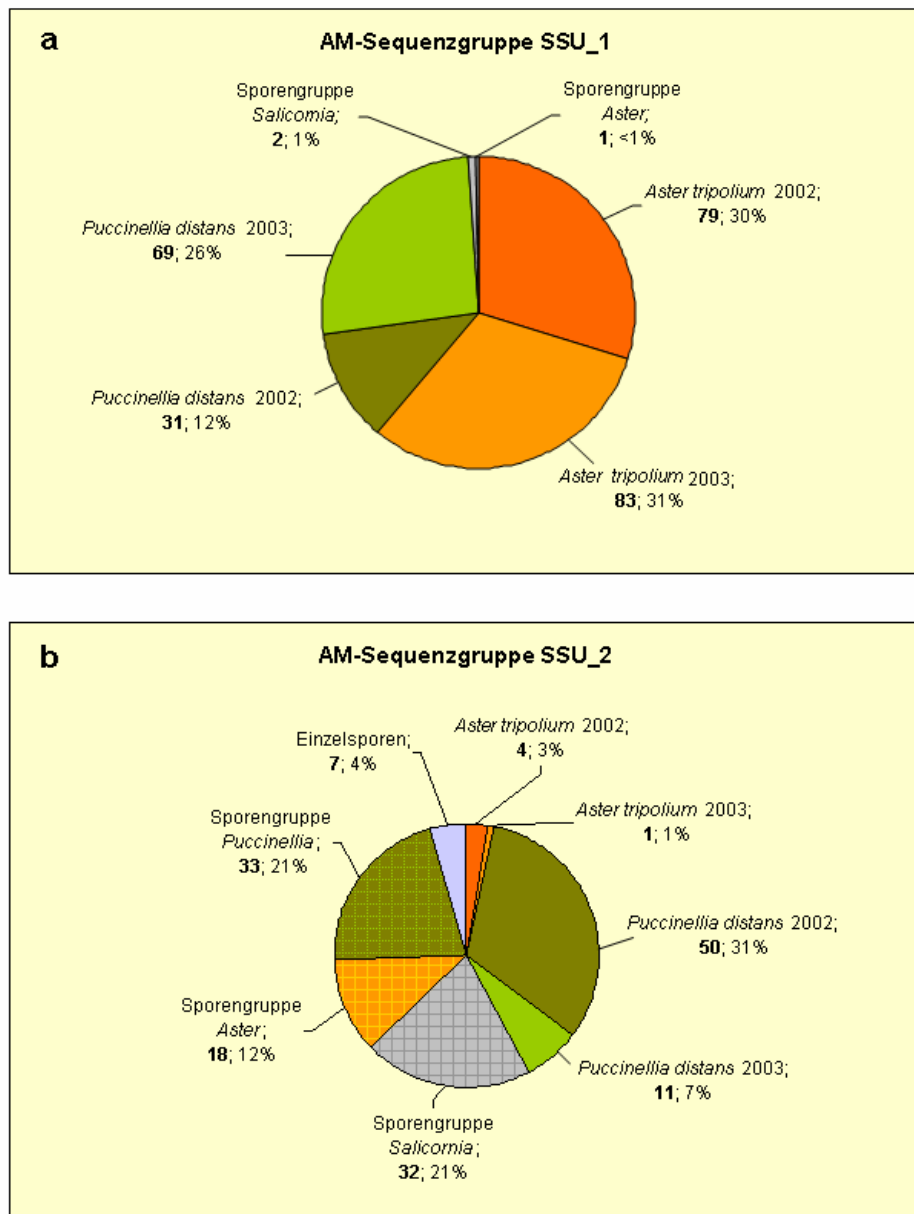
Abb. 3.15 Einordnung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 aus Schreyahn in einen 18S rDNA-Stammbaum (550 bp Fragment) der Glomeromycota



Die Abb. 3.15 zeigt die Einordnung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4 (grau unterlegt, GenBank-Zugriffsnummern: AY955325, DQ263837, DQ263783, DQ264059) aus Schreyahn in ein NJ-Phylogramm der Glomeromycota (18S rDNA, 550 bp Fragment). In Klammern ist jeweils die Anzahl der Sequenzen pro AM-Sequenzgruppe aus Schreyahn aufgeführt. Die anderen Sequenzen stammen aus GenBank. Nur Bootstrap-Werte über 60 % (1000 Wiederholungen) wurden an den Knoten angegeben. Der Balken zeigt einen Unterschied von 10 auf 100 bp an. Zur Wurzelung wurde eine Sequenz von *Corallochytrium limacisporum* (L42528) eingesetzt.

Um die Zusammensetzungen der AM-Sequenzgruppen SSU_1 und SSU_2 übersichtlich darzustellen, wurden Kreisdiagramme (Abb. 3.16) gewählt. An jedem Segment sind jeweils die untersuchte Pflanzenart, der Untersuchungszeitpunkt, die Anzahl und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der AM-Sequenzgruppe angegeben.

Abb. 3.16 Grafik der Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 und SSU_2



Die Abb. 3.16 a und b zeigen jeweils die Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen SSU_1 und SSU_2. Die AM-Sequenzgruppe SSU_1 besteht aus 265, die AM-Sequenzgruppe SSU_2 aus 156 Sequenzen. Bei den Wurzelsequenzen sind die Pflanzenart und das Untersuchungsjahr angegeben. Die Sporendaten (Einzelsporen und Sporengruppen) stammen alle aus dem Jahr 2003. Bei den Sporengruppen ist durch den Pflanzengattungsnamen bezeichnet, aus welchem wurzelnahen Boden die Sporen stammen. Des Weiteren sind die Anzahl und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der jeweiligen AM-Sequenzgruppe angegeben.

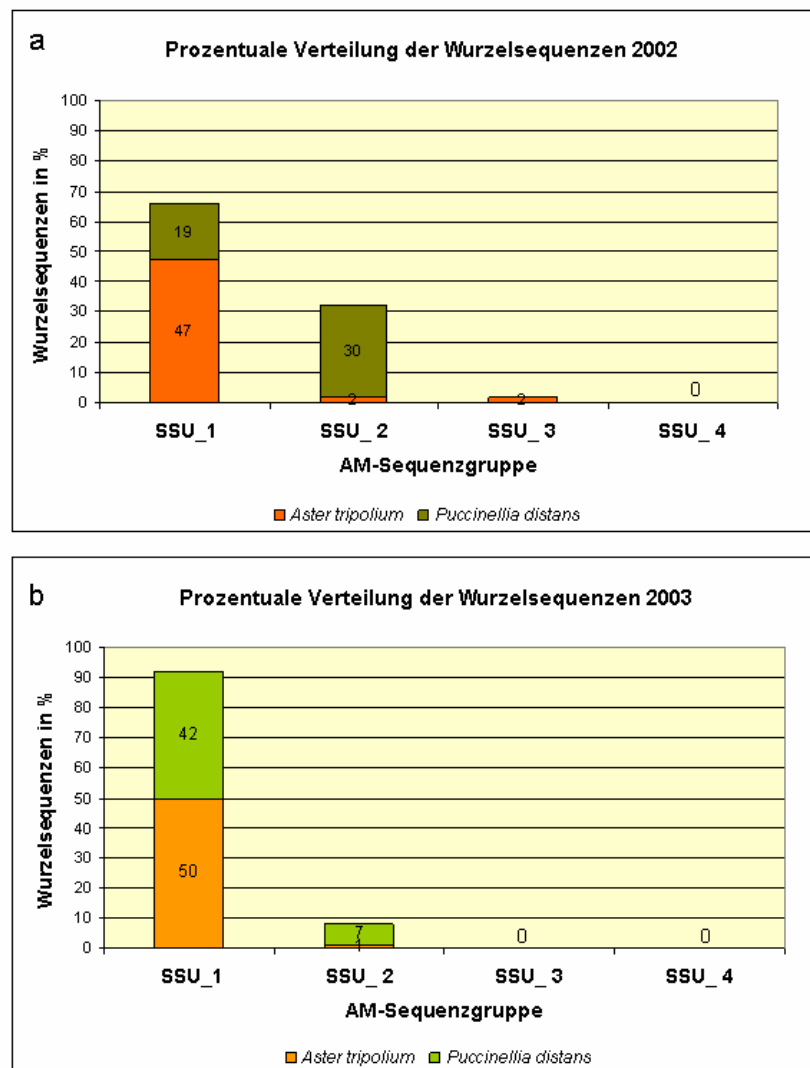
In AM-Sequenzgruppe SSU_1 (Abb. 3.16 a) machen die Sequenzen, die aus den Wurzeln von *A. tripolium* (2002 und 2003) erhalten wurden, mit 30 % bzw. 31 % die größten Anteile aus. Das drittgrößte Segment wird mit 26 % von Wurzelsequenzen aus *P. distans* (2003) gebildet. Die Wurzelsequenzen des Jahres 2002 aus *P. distans* stellen 12 % der AM-Sequenzgruppe SSU_1.

1 % bzw. weniger als 1 % der Sequenzen der AM-Sequenzgruppe SSU_1 wurden von Sporengruppen aus *S. europaea*- bzw. *A. tripolium*-Boden erhalten. In AM-Sequenzgruppe SSU_2 bilden sieben Einzelsporesequenzen eines der Segmente mit 4 %. Den größten Anteil an AM-Sequenzgruppe SSU_2 (Abb. 3.16 b) haben mit 31 % die Wurzelsequenzen von *P. distans* (2002), während die Sequenzen aus dem Jahr 2003 von *P. distans* nur 7 % stellen. Die AM-Sequenzgruppe SSU_2 setzt sich zu 54 % aus den Sporengruppensequenzen zusammen. Die Sporengruppensequenzen aus dem wurzelnahen Boden von *S. europaea* und *P. distans* haben beide einen Anteil von 21 %, die aus dem *A. tripolium*-Boden nehmen 12 % ein. Die kleinsten Segmente im Kreisdiagramm der AM-Sequenzgruppe SSU_2 bilden die Wurzelsequenzen von *A. tripolium* aus dem Jahr 2002 (3 %) und 2003 (1 %).

In Abb. 3.17 a und b wird ausschließlich die prozentuale Verteilung der erhaltenen Wurzelsequenzen aus dem 18S rDNA-Bereich zu den beiden Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Im Jahr 2002 machen 167 Wurzelsequenzen die 100 % aus, im Jahr 2003 werden sie aus 164 Wurzelsequenzen gebildet.

In die AM-Sequenzgruppe SSU_1 fallen im Jahr 2002 66 % der Sequenzen. Davon sind 47 % *A. tripolium*-Wurzelsequenzen und 19 % stammen aus Wurzeln von *P. distans*. Auch im Jahr 2003 bilden 50 % der *A. tripolium*-Wurzelsequenzen die AM-Sequenzgruppe SSU_1, aber auch die Sequenzen aus *P. distans* stellen in dieser Gruppe 42 %, so dass die AM-Sequenzgruppe SSU_1 im Jahr 2003 von 92 % der Wurzelsequenzen gebildet wird. Die AM-Sequenzgruppe SSU_2 ist 2002 mit 32 % etwa halb so groß wie Gruppe SSU_1, hier bilden die Sequenzen aus *P. distans* einen Anteil von 30 %, während die *A. tripolium*-Wurzelsequenzen nur 2 % stellen. 2003 wird die AM-Sequenzgruppe SSU_2 von 8 % der Sequenzen gebildet, die zum Großteil aus den Wurzeln von *P. distans* (7 %) stammen. Die AM-Sequenzgruppe SSU_3 kommt ausschließlich 2002 vor und hat mit nur drei Sequenzen aus *A. tripolium* einen Anteil von 2 % der Wurzelsequenzen dieses Zeitpunktes. Bei den Wurzelsequenzen ist die AM-Sequenzgruppe SSU_4 nicht vertreten.

Abb. 3.17 Prozentuale Verteilung der Wurzelsequenzen auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4

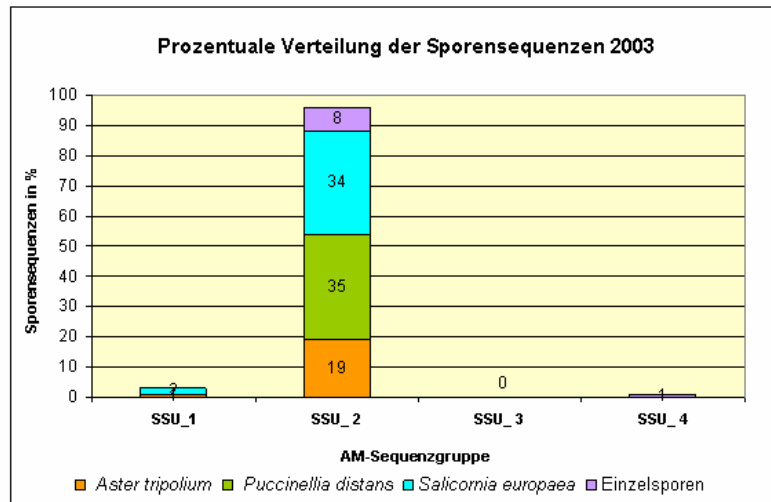


Die Abb. 3.17 zeigt die prozentuale Aufteilung der Wurzelsequenzen (in a für das Jahr 2002 und in b für das Jahr 2003) aus *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 - SSU_4. Im Jahr 2002 werden die 100 % aus 167, im Jahr 2003 aus 164 Wurzelsequenzen gebildet.

Die separate Betrachtung der prozentualen Verteilung der Sporesequenzen auf die AM-Sequenzgruppen ist in Abb. 3.18 dargestellt. Alle Sporesequenzen stammen aus dem Jahr 2003. Im Gegensatz zu den Wurzelsequenzen (siehe Abb. 3.17 a und b) wird bei den Sporen die AM-Sequenzgruppe SSU_1 von nur 3 % der Sequenzen gebildet. Davon stammen 2 % aus Sporengruppen des wurzelnahen Bodens von *S. europaea* und 1 % von Sporen aus *A. tripolium*-Boden. Während bei den Wurzeln die AM-Sequenzgruppe SSU_2 aus 32 % (2002), bzw. 8 % (2003) der Sequenzen bestand, sind es bei den Sporen 96 %. Diese 96 % setzen sich zusammen aus den Sequenzen der *S. europaea*-Sporengruppe mit 34 %, zu 35 % aus denen der *P. distans*-Sporengruppe und zu 19 % aus den Sporengruppen-Sequenzen von *A. tripolium*. Die Einzelsporen wurden aus wurzelnahem Boden von *P. distans* isoliert und bilden einen Anteil von 8 % in der AM-Sequenzgruppe SSU_2. Die AM-Sequenzgruppe SSU_4, die nur aus einer Einzelsporesequenz

besteht, macht 1 % der gesamten Sporenssequenzen aus. Es wurden keine Sporenssequenzen erhalten, die in Gruppe SSU_3 fielen.

Abb. 3.18 Prozentuale Verteilung der Sporenssequenzen auf die AM-Sequenzgruppen SSU_1 bis SSU_4



Die Abb. 3.18 stellt die prozentuale Verteilung der Sporenssequenzen aus Schreyahn aus dem Jahr 2003 auf die AM-Gruppen SSU_1 - SSU_4 dar. Die 100 % setzen sich aus 97 Sporenssequenzen zusammen.

Aster tripolium, *Puccinellia distans* und *Salicornia europaea* bezeichnen hier aus welchen wurzelnahen Bodenproben die „Sporenggruppen“ jeweils isoliert wurden.

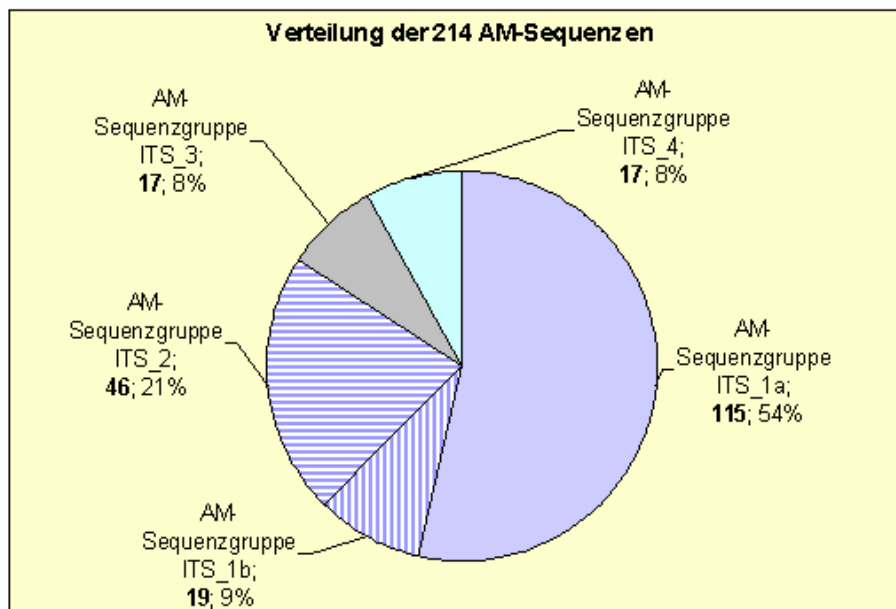
3.5. Ergebnisse zur Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln in Schreyahn anhand der ITS-Region

Eine weitere Möglichkeit um die Diversität der AM-Pilze innerhalb der Wurzeln molekularbiologisch zu untersuchen, bot ein sogenanntes „nested“ PCR-Verfahren nach Renker *et al.* (2003). Bei dieser Methode wurde zunächst eine PCR mit den Primern LSU-Glom. und SSU-Glom. durchgeführt, die die pflanzliche DNA diskriminieren (siehe 2.6). Das Produkt aus dieser PCR wurde als Matrizen-DNA in die darauf folgende PCR mit den Primern ITS4/ITS5 eingesetzt und die Pilz-DNA im Bereich der ITS-Region amplifiziert (ca. 600 bp). Die Lage der Primer ist in Abb. 2.4 dargestellt. Zwischen den beiden PCR-Reaktionen erfolgte ein *AluI*-Verdau, denn kontaminierende Pilze, die nicht zu den Glomeromycota gehören, besitzen meist eine Schnittstelle für *AluI* und werden so in der zweiten PCR nicht mehr mitamplifiziert (Renker *et al.* 2003).

Aus je drei Exemplaren von *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* wurden für den Probeentnahmepunkt September 2002 bzw. Juni 2003 PCR-Amplifikate der erwarteten Größe von ca. 600 bp erhalten. PCR-Reaktionen, die mit Wurzel-DNA von *Salicornia europaea* durchgeführt wurden, lieferten keine sichtbaren PCR-Produkte. Es handelte sich um dieselben Pflanzenexemplare, die auch für die Untersuchungen im 18S rDNA-Bereich (siehe 3.4) eingesetzt wurden. Es konnten insgesamt 385 Sequenzen aus der ITS Region erhalten werden. 214 (56 %) dieser Sequenzen stammten von

AM-Pilzen, während 171 Sequenzen (44 %) Nicht-AM-Pilzen (Basidiomyceten) zugeordnet werden konnten. Von diesen Basidiomyceten-Sequenzen wiesen 122 keine *AluI*-Schnittstelle auf. Die Abb. 3.19 zeigt eine Zuordnung der 214 AM-Sequenzen auf 5 AM-Sequenzgruppen (ITS_1a, b bis ITS_4). Diese Gruppierung ermöglicht eine übersichtliche Darstellung der AM-Sequenzen im Phylogramm (Abb. 3.20). Das Kriterium für die Zugehörigkeit zu einer AM-Sequenzgruppe war eine paarweise Sequenzidentität von $\geq 90,5\%$ im Bereich der 5,8S rDNA zuzüglich eines Teils der ITS2-Region (ca. 300bp). Die Sequenzen der gesamten ITS-Region (ITS1-5,8S rDNA-ITS2) sind für eine sichere Einordnung in einen phylogenetischen Stammbaum zu variabel, d. h. sie sind oftmals unterschiedlich lang und lassen sich daher nur schlecht in ein Alignment stellen. Die Gruppen ITS_1a und ITS_1b clustern zwar beide inmitten von *G. intraradices*-Sequenzen in der *Glomus*-Gruppe Ab (Schwarzott *et al.* 2001), aber die Unterteilung wurde vorgenommen, da die Sequenzidentität zwischen den beiden Subgruppen nur bei 86,5 % liegt und damit das Gruppenkriterium nicht erfüllte.

Abb. 3.19 Sequenzverteilung auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4



Die Abb. 3.19 zeigt die Verteilung der 214 AM-Sequenzen auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4. Es sind die Anzahl und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der jeweiligen AM-Sequenzgruppe angegeben.

Die AM-Sequenzgruppe ITS_1 nimmt insgesamt mit 134 Sequenzen (63 %) den Großteil der AM-Sequenzen ein, wie unter Abb. 3.19 dargestellt ist. Davon bildet Subgruppe ITS_1a mit 115 Sequenzen einen Anteil von 54 %. Die Gruppe ITS_1b besitzt 19 Sequenzen und damit 9 % aller erhaltenen AM-Sequenzen. Sequenzgruppe ITS_2 bildet die zweitgrößte Gruppe mit 46 Sequenzen (21 %). Die AM-Sequenzgruppen ITS_3 und ITS_4 sind mit jeweils 17 Sequenzen bzw. 8 % gleich groß.

Eine phylogenetische Einordnung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 aus Schreyahn in einen Stammbaum der Glomeromycota ist in Abb. 3.20 dargestellt. Die Anzahl der Sequenzen pro Gruppe ist in Klammern hinter und eine stellvertretende Sequenz vor der jeweiligen Gruppenbezeichnung angegeben. Alle anderen Sequenzen, die sich in dem Stammbaum befinden, wurden aus GenBank

bezogen und bilden Referenzsequenzen für die Hauptgruppen der Glomeromycota. Des Weiteren wurden zu den AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 aus Schreyahn die zwei nach „BLAST search“ (Version 2.0; Altschul et al., 1997) nächst-verwandten GenBank-Sequenzen eingerechnet. Signifikante Bootstrapwerte über 60 % wurden an den Knoten angegeben. Die erhaltenen AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 aus Schreyahn fallen in die Familien der Glomeraceae und Archaeosporaceae.

Die AM-Sequenzgruppen ITS_1a und ITS_1b fallen beide in *Glomus*-Gruppe Ab der Glomeraceae (Schwarzott et al. 2001) und weisen die höchsten Sequenzidentitäten zu Datenbankeinträgen von *Glomus intraradices* auf. Im Fall von Gruppe ITS_1a zeigen Sequenzeinträge von *G. intraradices* (AF394780 und AF197920) eine Identität von 86,1 bzw. 85,9 %. Bei Gruppe ITS_1b sind es *G. intraradices*-Sequenzen (AJ968411 und AJ968409) mit einer Identität von 88,1 und 85,6 %. Die AM-Sequenzgruppe ITS_2 hat die höchste Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen von *Glomus geosporum* „Jerxheim“ (AF231469) mit 97,8 % und *G. geosporum* (AJ319797) mit 97,4 %. Zu *G. geosporum* BEG11 (AJ239122) besteht eine Sequenzidentität von 96,2 %. Somit fällt AM-Sequenzgruppe ITS_2 in die Glomeraceae, *Glomus*-Gruppe Aa (Schwarzott et al. 2001). Die AM-Sequenzgruppe ITS_3 befindet sich an einem Nebenast zur *Glomus*-Gruppe Ab, inmitten eines Clusters von Sequenzeinträgen bislang unkultivierter AM-Pilze. Die beiden Datenbankeinträge mit den höchsten Sequenzidentitäten sind AJ567788 (uncultured *Glomus* sp.) mit 95,3 % und AJ518843 (*Glomus* sp.) mit 94,6 %. Die AM-Sequenzgruppe ITS_4 fällt in die Verwandtschaft der Archaeosporaceae. Die höchste Ähnlichkeit besteht zu Datenbankeinträgen von *Archaeospora* sp. (AJ515175) und *Archaeospora trappei* (AJ243419) mit 68,1 bzw. 67,9 %.

Um die Zusammensetzungen der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 übersichtlich darzustellen, wurden Kreisdiagramme (Abb. 3.21a-e) gewählt. An jedem Segment sind jeweils die untersuchte Pflanzenart, der Untersuchungszeitpunkt, die Anzahl und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der AM-Sequenzgruppe angegeben. In der AM-Sequenzgruppe ITS_1a (Abb. 3.21a) nehmen Sequenzen aus den Wurzeln von *P. distans* (2002 und 2003) jeweils 30 bzw. 33 % ein. Zwei weitere Anteile werden von *A. tripolium*-Sequenzen gebildet. Diese stellen 20 (2002) bzw. 32 % (2003) der AM-Sequenzgruppe ITS_1a. Die AM-Sequenzgruppe ITS_1b (Abb. 3.21b) setzt sich folgendermaßen zusammen: Jeweils 21 % der Sequenzen wurden aus Wurzeln von *P. distans* aus dem Jahr 2002 bzw. 2003 erhalten. Der größte Anteil (58 %) der Sequenzen stammt aus *A. tripolium*-Wurzeln aus dem Jahr 2003. Sequenzen aus *A. tripolium*-Wurzeln aus dem Jahr 2002 sind in dieser Gruppe nicht vertreten. In AM-Sequenzgruppe ITS_2 (Abb. 3.21c) wird das größte Segment mit 63 % der Sequenzen innerhalb dieser Gruppe von *P. distans* aus dem Jahr 2002 gesellt. Wesentlich kleinere Anteile haben Sequenzen aus *A. tripolium*-Wurzeln aus dem Jahr 2002 mit 11 %, bzw. aus *P. distans*-Wurzeln (2003) mit 4 %. Des Weiteren machen 10 Sequenzen, die aus Einzelsporen erhalten wurden, in Gruppe ITS_2 einen Anteil von 22 % aus. AM-Sequenzgruppe ITS_3 (Abb. 3.21d) besteht aus 17 Sequenzen, die alle aus Wurzeln von *A. tripolium* des Jahres 2002 erhalten wurden. Sequenzen aus Wurzeln von *P. distans* aus dem Jahr 2002 bilden mit 88 % den Hauptanteil der AM-Sequenzgruppe ITS_4 (Abb. 3.21e). Zusätzlich beinhaltet die AM-Sequenzgruppe ITS_4 eine Sequenz (6 %) aus *A. tripolium* (2002) und eine aus einer Sammelsporen-PCR der Sporen mit Sacculus (siehe 3.3.5).

Abb. 3.20 Einordnung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4 aus Schreyahn in einen 5,8S rDNA-ITS2-Stammbaum (300 bp) der Glomeromycota

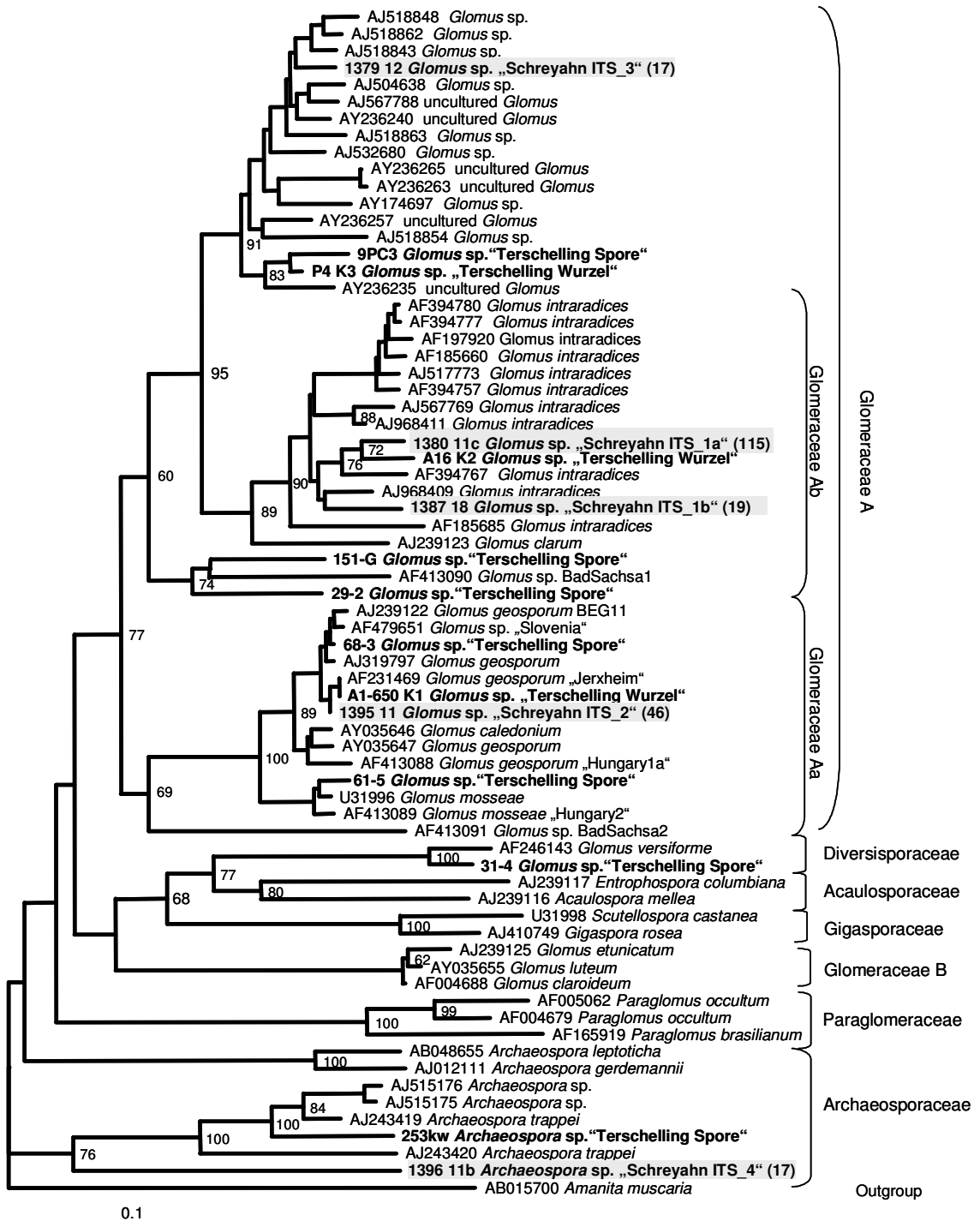
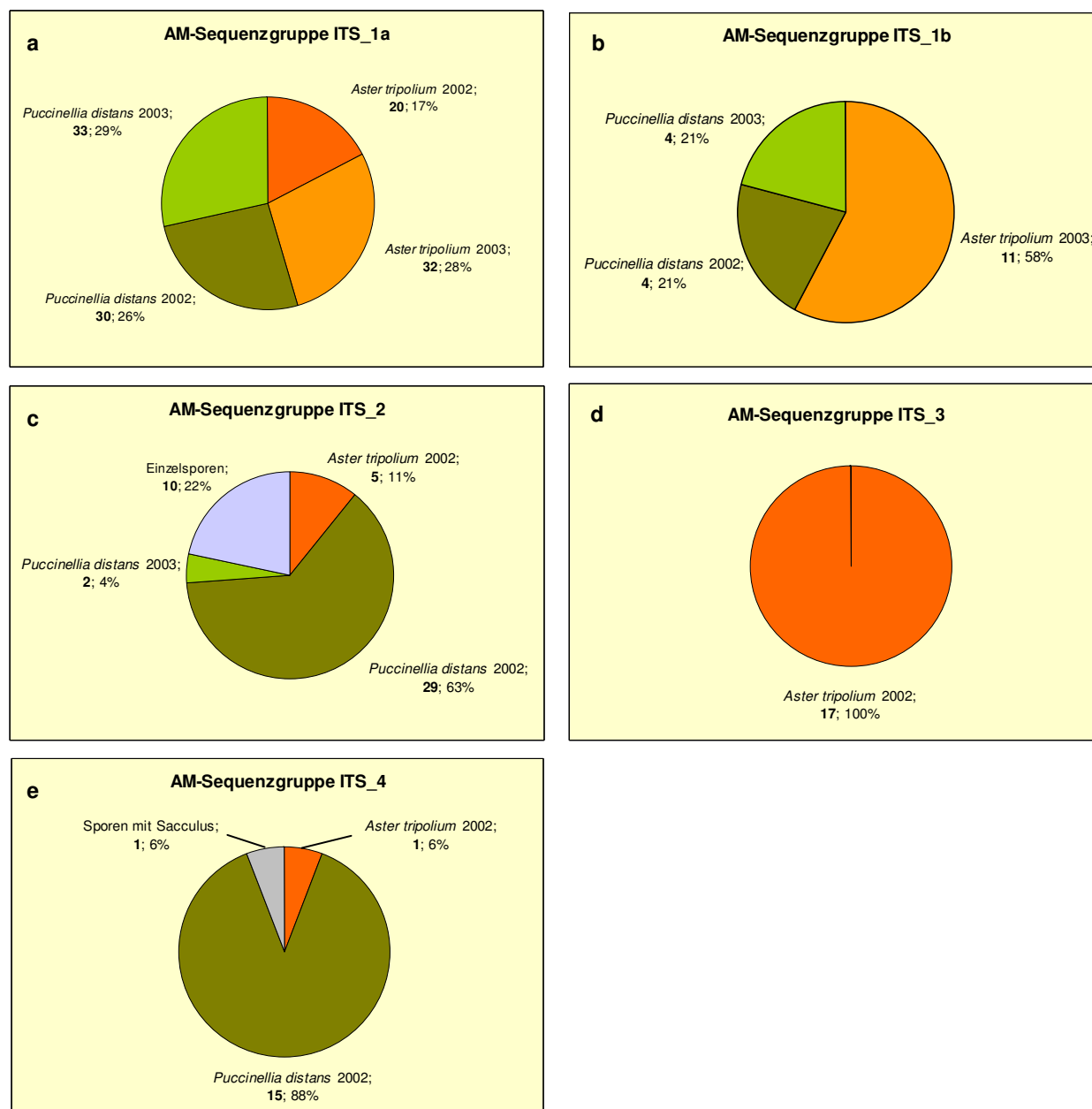


Abb. 3.20 zeigt die Einordnung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis 4 aus Schreyahn (grau unterlegt, GenBank-Zugriffsnummern: EU359061, 121, 179, 219, 227) in ein NJ-Phylogramm der Glomeromycota (5,8S rDNA-ITS2). In Klammern ist jeweils die Anzahl der Sequenzen pro AM-Sequenzgruppe aus Schreyahn aufgeführt. Zum Vergleich sind in fetter Schrift AM-Sequenzgruppen, die aus einer holländischen Salzmarsch (Küste von Terschelling; GenBank-Zugriffsnummern: EU350743, 759, 768, 786, 803, 805, 810, 818, 824, 838) erhalten wurden, angegeben (Stodden 2004; Manal 2006). Die anderen Sequenzen stammen aus GenBank. Nur Bootstrap-Werte über 60 % (1000 Wiederholungen) wurden an den Knoten angegeben. Der Balken zeigt einen Unterschied von 10 auf 100 bp an. Zur Wurzelung wurde eine Sequenz (AB015700) von *Amanita muscaria* (Basidiomycetes) gewählt.

Abb. 3.21 Grafik der Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4



Die Abb. 3.21 a - e zeigen jeweils die Zusammensetzung der AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4.

Bei den Wurzelsequenzen sind die Pflanzenart und das Untersuchungsjahr angegeben. Die Sporendaten stammen alle aus dem Jahr 2003. Des Weiteren sind die Anzahl und der prozentuale Anteil der Sequenzen in der jeweiligen AM-Sequenzgruppe aufgeführt.

In Abb. 3.22 a und b wird ausschließlich die prozentuale Verteilung der erhaltenen Wurzelsequenzen aus dem 5,8S rDNA-ITS2-Bereich zu den beiden Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Die 100 % werden im Jahr 2002 aus 121 Wurzelsequenzen gebildet, im Jahr 2003 aus 81 Wurzelsequenzen. Im Jahr 2002 fallen 44 % der Sequenzen in die AM-Sequenzgruppen ITS_1a und ITS_1b. In der Gruppe ITS_1a sind davon 16 % *Aster tripolium*-Wurzelsequenzen und 25 % stammen aus Wurzeln von *Puccinellia distans*. Die Gruppe ITS_1b wird nur von 3% der Wurzelsequenzen gebildet und diese stammen ausschließlich aus *P. distans*. Die AM-Sequenzgruppe ITS_2 besteht 2002 aus 28 % der

Wurzelsequenzen, davon stammen 24 % aus *P. distans* und 4 % aus *A. tripolium*. Die AM-Sequenzgruppen ITS_3 und ITS_4 sind mit jeweils 14 % gleich groß. Allerdings stammen in Gruppe ITS_3 die Sequenzen alle aus *A. tripolium*, während in Gruppe ITS_4 13 % aus *P. distans* stammen und nur 1 % aus *A. tripolium*. Auch im Jahr 2003 bildet die Gruppe ITS_1a mit 79 % der Wurzelsequenzen die größte AM-Sequenzgruppe. Die Verteilung der Sequenzen auf die beiden Pflanzenarten ist mit 39 bzw. 40 % in etwa gleich. Weitere 19 % fallen in Gruppe ITS_1b, wobei 14 % aus *A. tripolium* stammen und 5 % aus *P. distans*. Die Sequenzgruppe ITS_2 besitzt im Jahr 2003 lediglich 2 % der Wurzelsequenzen aus *P. distans*. Sequenzen aus den Gruppen ITS_3 und ITS_4 konnten im Jahr 2003 nicht gefunden werden.

Abb. 3.22 Prozentuale Verteilung der Wurzelsequenzen auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4

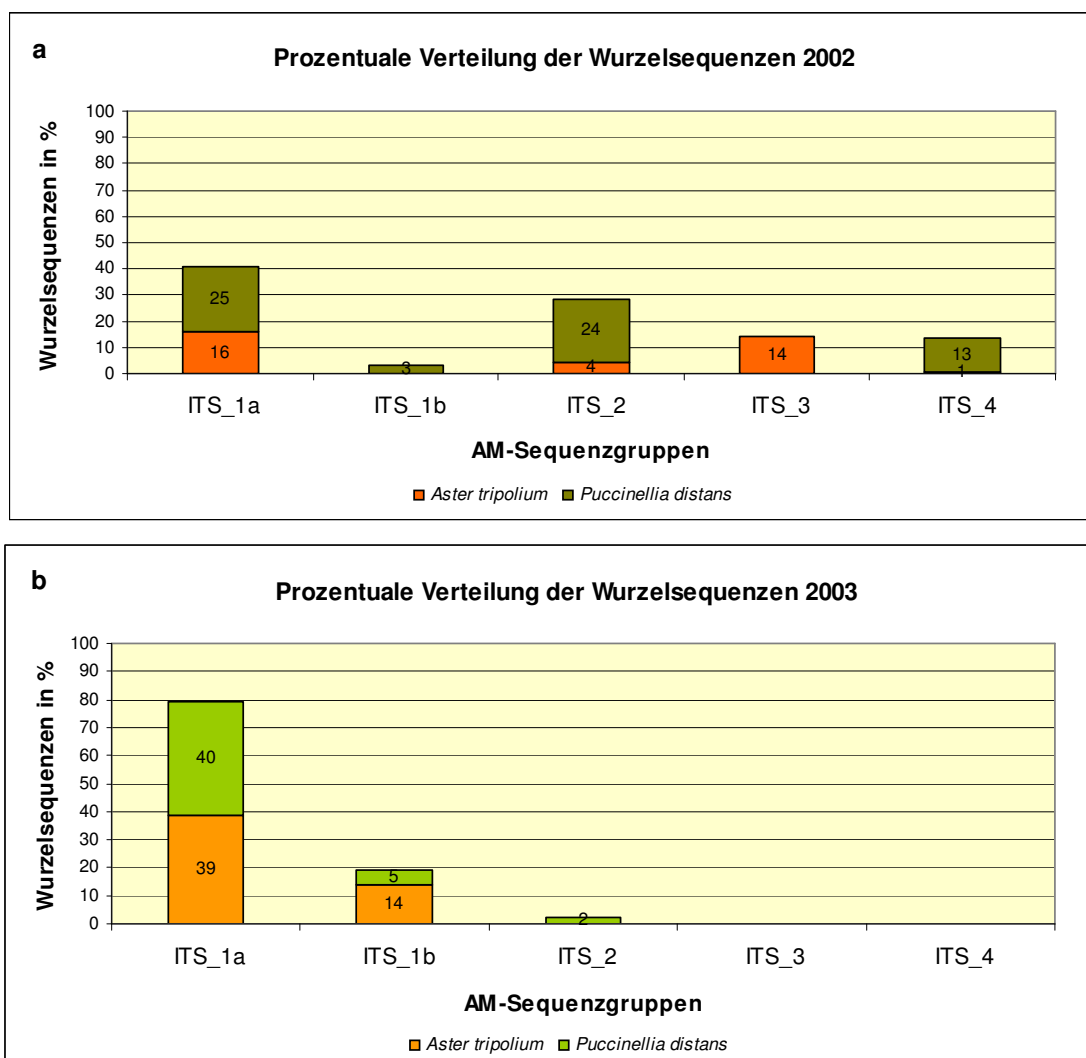


Abb. 3.22 zeigt die prozentuale Aufteilung der Wurzelsequenzen (in a für das Jahr 2002 und in b für das Jahr 2003) aus *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* auf die AM-Sequenzgruppen ITS_1 bis ITS_4. Im Jahr 2002 werden die 100 % aus 121 Wurzelsequenzen gebildet, im Jahr 2003 aus 81 Wurzelsequenzen.

Aus den Daten der kombinierten Klonbibliotheken für die Wurzelsequenzen wurden Rarefactionkurven erstellt (Abb. 3.23), die die Anzahl der erwarteten AM-Sequenzgruppen in Abhängigkeit von der Größe der Klonbibliotheken zeigen (Holland 2003). Grundlage waren die 331 Wurzelsequenzen aus der 18S rDNA-Region, bzw. die 202 Wurzelsequenzen des 5,8S rDNA-ITS2-Bereichs. Während die Rarefactionkurve für den 18S rDNA-Bereich flach ansteigt um in den Sättigungsbereich überzugehen, ist der Anstieg im Anfangsbereich der Rarefactionkurve für die 5,8S rDNA-ITS2-Region wesentlich steiler. Die Anzahlen der erwarteten Sequenzgruppen entsprechen mit drei und fünf der Gesamtdiversität der realen Klonbibliotheken.

Abb. 3.23 Rarefaction-Analyse der 18S rDNA- und 5,8S rDNA-ITS2-Klonbibliotheken aus Schreyahn

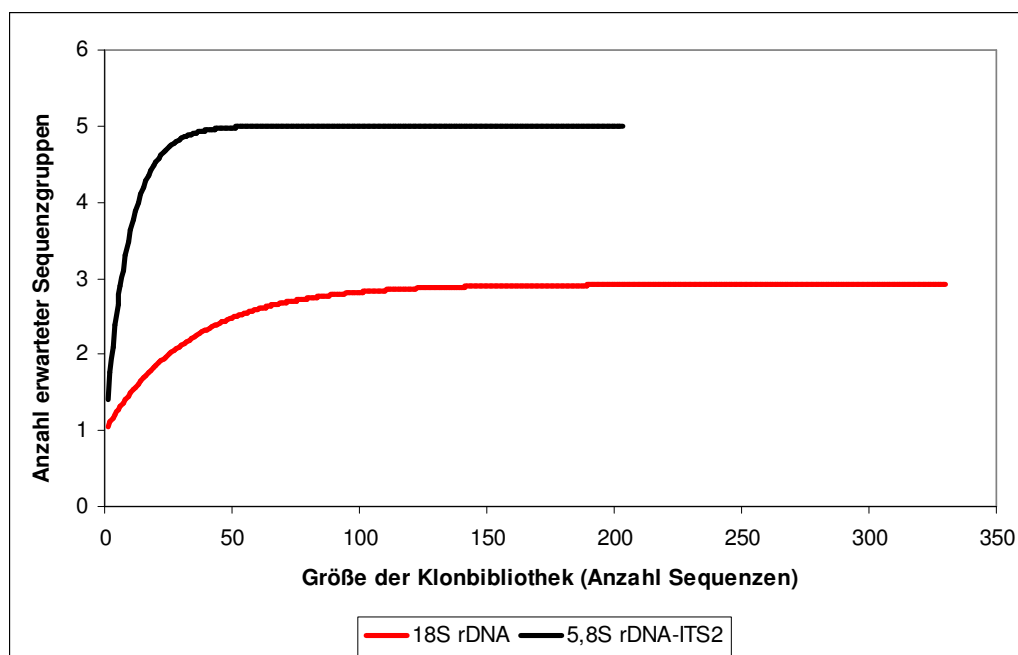


Abb. 3.23 zeigt in rot die Rarefactionkurve der 18S rDNA- und in schwarz die der 5,8S rDNA-ITS2-Klonbibliotheken aus Wurzel

4. Diskussion

4.1. Untersuchte Bodenparameter des Standortes Schreyahn

Zunächst wurden die im Zusammenhang dieser Arbeit wesentlichen Standortparameter der Binnenland-Salzstelle Schreyahn - die elektrische Leitfähigkeit (EC) und der pH-Wert des Bodens - bestimmt.

Die Untersuchung des pH-Wertes der Bodenproben vom Standort Schreyahn zeigte Werte im Bereich von 7,4 bis 8,0 (Tab. 4.1). An einer vegetationsfreien Zone des Standortes konnten pH-Werte bis zu 8,4 gemessen werden (Eilmus 2005). Im Vergleich zu den pH-Werten aus Schreyahn waren die gemittelten pH-Werte (zwischen $6,6 \pm 0,4$ und $7,1 \pm 0,1$) einer untersuchten NaCl-Salzmarsch an der Küste der Nordseeinsel Terschelling (Stodden 2004) in den chemisch neutralen bis sauren Bereich verschoben (siehe Tab. 4.1). Eine ungarische NaCl-Binnenland-Salzstelle wies gemittelte pH-Werte zwischen 5,1 und 5,8 (Landwehr *et al.* 2002) auf. In Schreyahn ist der alkalische pH-Wert auf das im Boden dominierende Salz K_2CO_3 zurückzuführen. Ungarische Na_2CO_3 - und Na_2SO_4 -Böden (Landwehr *et al.* 2002) wiesen mit Werten von 6,8 bis 11,1 eine noch deutlichere Ausdehnung in den alkalischen Bereich auf als der Schreyahnboden. Die wurzelnahen Bodenproben von *Puccinellia distans* zeigten sowohl im September 2002 als auch im Juni 2003 von den drei untersuchten Pflanzenarten den jeweils alkalischsten pH-Wert, während die pH-Werte von den *Salicornia europaea*-Bodenproben zu beiden Entnahmezeitpunkten am niedrigsten lagen. Dieses Ergebnis war unerwartet, denn die *S. europaea*-Zone folgt direkt auf das vegetationsfreie Zentrum der Salzstelle und weist somit die höchste Bodensalzkonzentration von den besiedelten Zonen auf. Eine mögliche Erklärung könnten artspezifische, pflanzliche Wurzelausscheidungen sein, die den pH-Wert des Bodens zusätzlich zu den vorliegenden Salzen beeinflussen.

In der Literatur liegen kontroverse Meinungen über den Einfluss des Boden-pH-Wertes auf die Mykorrhizierung von Pflanzen vor. Al-Agely *et al.* (1995) stellten mit zunehmender Alkalität einen negativen Einfluss auf die Mykorrhizierung in Binnen-Sanddünen fest. Peat *et al.* (1993) hingegen beobachteten bei ihrer Untersuchung der britischen Flora, dass Pflanzenspezies, die in der Natur mykorrhiziert vorliegen, eher in Böden mit alkalischeren pH-Werten vorkommen (bis 7,8). In Bezug auf die Sporenkeimung wurde bereits von Green *et al.* (1976) beschrieben, dass *Glomus mosseae*-Sporen am häufigsten bei einem pH-Wert des Mediums zwischen 6,0 und 8,0 auskeimten, wobei diese Sporen aus einem Boden mit einem neutral bis leicht basischen pH-Wert stammten. In einer Veröffentlichung von Douds (1997) wurde ebenfalls von einer erhöhten Sporenkeimungsrate von *G. mosseae* bei einem neutral bis leicht basischen pH Wert des Mediums berichtet. Bei einem sauren pH-Wert von 5,0 wurde von Green *et al.* (1976) nur eine sehr geringe Keimungsrate der Sporen beobachtet, während Douds (1997) keine Keimung bei einem pH-Wert des Mediums von 5,5 feststellte. Daniels *et al.* (1980) konnten eine Keimung von *Glomus epigaeus*-Sporen (= *Glomus versiforme*, (Schenck *et al.* 1990)) entlang eines relativ breiten pH-Bereichs des Mediums zwischen 4,8 und 8,0 beobachten. Die maximale Keimungsrate der Sporen lag bei dieser Untersuchung

zwischen pH 7,0 und 7,4. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde erwartet, dass AM-Pilze am Standort Schreyahn vorgefunden werden konnten.

Die am Standort Schreyahn gemessenen EC-Werte fielen, von der *Salicornia europaea*-Zone ausgehend bis zur *Puccinellia distans*-Zone, von 19,0 auf 5,5 mS/cm (Probenentnahme September 2002), bzw. von 17,2 auf 6,2 mS/cm (Probenentnahme Juni 2003) ab (Tab. 4.1). Im Juni 2003 konnten Werte bis zu 37,9 mS/cm im vegetationsfreien Zentrum der Salzstelle gemessen werden (Eilmus 2005). Im Vergleich dazu besitzt z. B. das Meerwasser der Nordsee (3,5 % NaCl) eine elektrische Leitfähigkeit von 40 mS/cm (Weissenhorn 2000). Die ermittelten EC-Werte der *Aster tripolium*-Zone lagen zu beiden Probeentnahmezeitpunkten mit 14,7 (2002) bzw. 11,5 (2003) mS/cm über den Werten der *P. distans*-Zone. Am Standort Schreyahn und an einer Salzmarsch der Küste von Terschelling (Stodden 2004) lag die Zonierung der Pflanzen in direkter Abhängigkeit von der Bodensalinität wie bei Ellenberg (1963) beschrieben vor. Bei den in der Vergangenheit untersuchten NaCl-Binnenland-Salzstellen in Barnstorf und Jerxheim (Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002) folgte die *P. distans*- auf die *S. europaea*-Zone und *A. tripolium* besiedelte die Zone mit dem niedrigsten Salzgehalt des Bodens (Bothe 1976). Die Salzaster besitzt offensichtlich einen relativ breiten Toleranzbereich bezüglich der Bodensalzkonzentration (Ellenberg 1963). Bestätigt wird dieses durch die Untersuchungen an einer Salzmarsch von Terschelling (Stodden 2004). Hier wurden EC-Werte im wurzelnahen Boden von *A. tripolium* im Bereich von 7,8 bis 23,8 mS/cm gemessen (Tab. 4.1). Ebenso konnte von Carvalho *et al.* (2001) ein Vorkommen von *A. tripolium* in einer portugiesischen Salzmarsch festgestellt werden, wobei eine der Probenentnahmestellen eine Leitfähigkeit von ca. 18 mS/cm aufwies und eine andere etwa 27 mS/cm.

4.2. Auftreten von AM-Pilzen in Schreyahn

Die Beeinflussung der Mykorrhizierung von Pflanzen durch den Bodensalzgehalt im Freiland bzw. im Gewächshausversuch wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Einerseits wird von einer Behinderung bzw. Hemmung des AM-Pilzwachstums und somit der Mykorrhizierung von Pflanzen durch hohe Salzkonzentrationen in Gewächshausversuchen berichtet (Kim *et al.* 1985; Juniper *et al.* 1993; McMillen *et al.* 1998; Knolle 2004). Andererseits konnten wiederholt mykorrhizierte Pflanzenwurzeln und AM-Sporen im Boden saliner Habitats nachgewiesen werden. Das zeigten die Untersuchungen an europäischen Salzstandorten der Küste und des Binnenlandes (Rozema *et al.* 1986; Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Stodden 2004; Manal 2006) sowie an der indischen Küste (Sengupta *et al.* 1990) und der Alvord-Wüste in Oregon (Ho 1987). Das Auftreten von AM-Pilz-Sporen in Salzböden bzw. die Mykorrhizierung von Halophyten wirft die Frage auf, ob die AM-Pilze den Pflanzen dieser Extremstandorte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress bzw. dem daraus resultierenden physiologischen Trockenstress verhelfen können. In der Literatur wurden die Ökologischen Wachstumsvorteile von mykorrhizierten gegenüber nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter salinen Bedingungen beschrieben (Rozema *et al.* 1986; Ruiz-Lozano *et al.* 1996; Al-Karaki 2000; Ruiz-Lozano *et al.* 2000; Carvalho *et al.* 2004). Ein Einfluss von Salz auf Genexpressionen lässt sich im Bereich des Wasserhaushaltes feststellen. Bei Salzbehandlung (Ouziad *et al.* 2006) bzw. unter Trockenstress

(Porcel *et al.* 2006) fiel die Herunterregulierung der PIP-Aquaporin-Genexpression bei mykorrhizierten Pflanzenwurzeln deutlich stärker aus als bei nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen.

An der Binnenland-Salzstelle Schreyahn konnte eine Mykorrhizierung innerhalb der Wurzeln von *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* für beide Probenentnahmen (im September 2002 und im Juni 2003) festgestellt werden. Die intraradikalen Vesikel und Arbuskel sahen nach Anfärbung mit Trypanblau zu beiden Untersuchungszeitpunkten, sowohl bei *A. tripolium* als auch bei *P. distans*, morphologisch intakt aus. Durch ein Anfärben der mykorrhizierten Wurzeln mit Trypanblau lässt sich jedoch nicht feststellen, ob die Pilzstrukturen vital oder bereits abgestorben sind. Der mittlere Mykorrhizierungsgrad von *A. tripolium* lag im September 2002 bei 88 % und im Juni 2003 bei 74 % (Tab. 4.1). Alle untersuchten Exemplare von *A. tripolium* wiesen eine Mykorrhizierung (zwischen 48 und 97 %) auf. Hohe Mykorrhizierungsgrade bis zu 90 % für *A. tripolium* konnten bereits in der Vergangenheit an salinen Standorten gezeigt werden (Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Landwehr *et al.* 2002; Stodden 2004). Die untersuchten Exemplare von *P. distans* zeigten im September 2002 einen mittleren Mykorrhizierungsgrad von 24 %, im Juni 2003 von 11 % (Tab. 4.1). Die im Vergleich zu *A. tripolium* insgesamt niedrigeren gemittelten Mykorrhizierungsdaten von *P. distans* und die relativ hohen Standardabweichungen sind darauf zurückzuführen, dass die Mykorrhizierungswerte von *P. distans* sehr variabel waren. So besaßen im September 2002 vier von sieben, und im Juni 2003 fünf von achtzehn untersuchten *P. distans*-Pflanzen eine Mykorrhizierung ≤ 3 %. Mykorrhizierungsdaten, die ≤ 3 % sind, werden als nicht signifikant angesehen (Hildebrandt *et al.* 2001). Andere Exemplare wiesen hingegen Werte bis zu 70 % für die Gesamtmykorrhizierung auf. Eine Varianz der Mykorrhizierungswerte innerhalb einer Pflanzenart ist nicht überraschend, da der Grad der Besiedlung von Pflanze zu Pflanze Schwankungen aufweisen kann (Smith *et al.* 1997) und scheint für die Gattung *Puccinellia* nicht ungewöhnlich zu sein. So konnte eine hohe Variabilität (zwischen 0 und 49 % Gesamtmykorrhizierung) bei den Mykorrhizierungswerten von *P. distans* bzw. *Puccinellia maritima* bereits von (Hildebrandt *et al.* 2001) festgestellt werden. Grzybowska (2004) stellte keine Mykorrhizierung von *P. distans* an einer Salzstelle in der Nähe von Krakau (Polen) fest. Von Stodden (2004) wurden Werte zwischen 1 und 38 % bei *P. maritima* an einer holländischen Küstensalzmarisch beobachtet (Tab. 4.1). Die Werte für *P. maritima* einer portugiesischen Salzmarisch (Carvalho *et al.* 2001) lagen zwischen 0-6 %. Dort konnten keine Arbuskel, sondern nur Vesikel festgestellt werden. Bei Untersuchungen von *P. distans* der Binnenland-Salzstellen in Barnstorf und in Jerxheim (Landkreis Wolfenbüttel) wurde keine Mykorrhizierung festgestellt (K. Turnau, Krakau, persönliche Mitteilung, 2007). Es ist unklar, welche Umstände zu diesen hochvariablen Mykorrhizierungswerten bei der Gattung *Puccinellia* führen könnten.

Die Tab. 4.1 (folgende Seite) zeigt die Bodenparameter und Mykorrhizierungswerte der beiden Salzstellen Schreyahn und Terschelling im Vergleich. Die Anzahl der Einzelmessungen (n) für die Boden pH-Werte und die elektrische Leitfähigkeit (EC) betrug n = 5 für Schreyahn und n = 3 für Terschelling.

Die Anzahl (n) der untersuchten Pflanzenexemplare (Pfln.exmp.) für die Bestimmung der prozentualen Gesamtmykorrhizierung, bzw. der Anteile an Vesikeln, Arbuskeln und Innenmycel ist in der untersten Zeile angegeben

Tab. 4.1 Bodenparameter und Mykorrhizierungswerte der Salzstellen Schreyahn und Terschelling im Vergleich

Parameter	Binnenland-Salzstelle Schreyahn (K ₂ CO ₃)						Küste von Terschelling (NaCl)					
	09/2002			06/2003			07/2003			10/2004		
Probenentnahme-Zeitpunkt												
Pflanzenart	<i>Aster tripolium</i>	<i>Puccinellia distans</i>	<i>Salicornia europaea</i>	<i>Aster tripolium</i>	<i>Puccinellia distans</i>	<i>Salicornia europaea</i>	<i>Aster tripolium</i>	<i>Puccinellia maritima</i>	<i>Salicornia europaea</i>	<i>Aster tripolium</i>	<i>Puccinellia maritima</i>	<i>Salicornia europaea</i>
Boden-pH in Wurzelnähe	7,61 ± 0,06	7,83 ± 0,07	7,42 ± 0,04	7,82 ± 0,08	7,93 ± 0,07	7,67 ± 0,09	6,69 ± 0,15	7,14 ± 0,07	6,96 ± 0,13	6,90 ± 0,12	6,84 ± 0,10	6,63 ± 0,38
EC [mS/cm]	14,7 ± 0,5	5,5 ± 0,2	19,0 ± 0,4	11,5 ± 0,9	6,2 ± 0,2	17,2 ± 1,3	15,9 ± 8,9	6,9 ± 3,0	20,1 ± 3,9	7,7 ± 3,4	7,1 ± 2,0	11,2 ± 3,3
Myk.grad [%]	88 ± 9	24 ± 31	0	74 ± 12	11 ± 9	0	85; 42	20; 38	0; 0	54; 48	1; 11	0; 0
Arbuskel [%]	83 ± 11	17 ± 23	0	47 ± 12	5 ± 4	0	37;14	<1;<1	0;0	11;9	<1;<1	0;0
Vesikel [%]	83 ± 8	10 ± 18	0	66 ± 12	6 ± 8	0	52;18	6;33	0;0	26;39	1;10	0;0
Innenmycel [%]	88 ± 9	24 ± 31	0	74 ± 12	11 ± 9	0	84;41	13;38	0;0	52;46	1;11	0;0
Pflnz.exmp. [n]	7	7	7	22	18	12	2	2	2	2	2	2

Die insgesamt höheren Mykorrhizierungswerte im September 2002, sowohl für *Aster tripolium* als auch für *Puccinellia distans*, könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Entwicklung der Vegetation zur Probenentnahme im September 2002 schon wesentlich weiter fortgeschritten war als im Juni 2003. So stand im September 2002 die Aster in voller Blüte und der Queller zeigte bereits eine Rotfärbung. Im Juni 2003 hingegen war noch keine Knospenbildung bei der Aster zu erkennen und die *Salicornia europaea*-Zone erschien grün. Jahreszeitliche Schwankungen im Mykorrhizierungsgrad wurden schon von Puppi *et al.* (1987) beschrieben. Bei *A. tripolium* lagen Vesikel und Arbuskel im September 2002 zu gleichen Anteilen vor (jeweils 83 %), im Juni 2003 lag der prozentuale Anteil der Arbuskel mit 47 % niedriger als der der Vesikel mit 66 %. Bei *P. distans* hingegen zeigten sich umgekehrte Verhältnisse, denn im September 2002 konnten mit 10 % weniger Vesikel als Arbuskel (17 %) beobachtet werden. Im Juni 2003 wiesen Vesikel und Arbuskel mit 6 bzw. 5 % etwa die gleichen Anteile auf. Unterschiede im pilzlichen Kolonisierungsverhalten könnten mit der spezifischen jahreszeitlichen Entwicklung der Pflanzenarten zusammenhängen (Ruotsalainen *et al.* 2002). Allerdings sind die Werte bei *P. distans* durch die hohen Standardabweichungen nur bedingt aussagefähig. Es wäre denkbar, dass die den Probenentnahmen vorhergegangenen Niederschlagsmengen einen Einfluss auf die Anteile der pilzlichen Strukturen in den Wurzeln haben. So zeigten mykorrhizierte Halophyten einer ungarischen Salzstelle eine negative Korrelation zwischen der Niederschlagsmenge und dem Auftreten von Arbuskeln (Füzy *et al.* 2007).

Eine Mykorrhizierung von *Salicornia europaea* (Chenopodiaceae) konnte in Schreyahn nicht festgestellt werden. Die Chenopodiaceae galten in der Vergangenheit zwar als „nicht-mykorrhizierbare“ Pflanzenfamilie (Werner 1987), allerdings liefert die Literatur dazu gegensätzliche Aussagen. So konnten Carvalho *et al.* (2001) keine Mykorrhizierung für *Arthrocnemum fruticosum* und *Arthrocnemum perenne* aus der Familie der Chenopodiaceae feststellen. Sengupta *et al.* (1990) beschrieben hingegen eine Mykorrhizierung bis zu 72 % von *Arthrocnemum indicum* und *Suaeda maritima* (Chenopodiaceae) durch AM-Pilze an einer indischen Salzmarsch. Auch von Hildebrandt *et al.* (2001) konnte eine Mykorrhizierung bis zu 45 % bei einzelnen Exemplaren von *S. europaea* (Chenopodiaceae) an den deutschen Binnenland-Salzstellen Barnstorf und Jerxheim festgestellt werden. Der Anteil an Arbuskeln lag jedoch ≤ 3 %. Renker *et al.* (2005) beschrieben eine Mykorrhizierung bis zu 24 % von *Atriplex sagittata* (Chenopodiaceae) an einem phosphatbelasteten deutschen Standort. Im Gewächshaus konnten Planchette *et al.* (2005) eine Mykorrhizierung von *Atriplex nummularia* durch *Glomus intraradices* herbeiführen, allerdings ohne dass eine Ausbildung von Arbuskeln beobachtet werden konnte. Aliasgharzadeh *et al.* (2001) konnten keine Mykorrhizierung der untersuchten Chenopodiaceae (*Salicornia* sp., *Salsola* sp.) eines iranischen Salzhabitats beobachten. Ebenso konnte Landwehr *et al.* (2002) keinerlei AM-Strukturen bei ungarischen Chenopodiaceen (*Camphorosma annua*, *Suaeda maritima*, *Salicornia europaea*) feststellen. Auch von Stodden (2004) konnten keine mykorrhizierten Exemplare von *S. europaea* an einer holländischen Salzmarsch (Küste von Terschelling) beobachtet werden. Welche Voraussetzungen erfüllt sein müssen, dass vielfach nicht-mykorrhizierte Pflanzen an manchen Standorten doch besiedelt werden, muss in Zukunft noch geklärt werden. Eine Untersuchung von (Püschel *et al.* 2007) zeigte, dass zumindest in Gewächshausexperimenten mit *Glomus mosseae* BEG95 die Art des Inokulums, also der infizierenden Pilzstrukturen, eine Rolle spielt. Es stellte sich

heraus, dass Pflanzenspezies besiedelt wurden, die gewöhnlich keine Mykorrhiza ausbilden. So konnte z. B. *Atriplex sagittata* (Chenopodiaceae) mit dem extraradikalen Mycel des Isolates *G. mosseae* BEG95 mykorrhiziert werden, eine Inokulierung mit Sporen desselben Isolates führte jedoch keine Besiedlung herbei.

Tab. 4.2 Sporenanzahlen verschiedener Salzstellen im Vergleich

AM-Sporen, isoliert aus Wurzelnähe von	Probenentnahmestelle	Schreyahn		Terschelling			Barnstorf
		09/2002	06/2003	09/2003	06/2004	10/2004	10/2004
<i>Aster tripolium</i>	Gesamtanzahl	242 ±	121 ±	264 ±	951 ±	783 ±	126
	AM-Sporen	20	12	56	350	442	± 22
	davon <i>Archaeospora</i> sp.	n.d	0	72 ±	525 ±	609 ±	0
	Anzahl <i>Vaucheria</i> -Zygoten	350 ±	303 ±	0	0	0	13 ± 7
		30	307				
<i>Puccinellia distans</i> bzw. <i>P. maritima</i>	Gesamtanzahl	101 ±	95 ±	251 ±	291 ±	883 ±	53 ±
	AM-Sporen	18	47	150	41	200	5
	davon <i>Archaeospora</i> sp.	n.d	0	126 ±	79 ±	761 ±	n.d
	Anzahl <i>Vaucheria</i> -Zygoten	112 ±	937 ±	0	0	0	36 ±
		13	959				18
<i>Salicornia europaea</i>	Gesamtanzahl	77 ±	6 ±	84 ±	77 ±	36 ±	36
	AM-Sporen	31	3	23	19	13	± 11
	davon <i>Archaeospora</i> sp.	n.d	0	5 ±	9 ±	14 ± 7	n.d
	Anzahl <i>Vaucheria</i> -Zygoten	328 ±	343 ±	0	0	0	51 ±
		36	119				12

Die Tab. 4.2 vergleicht die Gesamtsporenanzahlen pro 10 g Trockengewicht Boden der Salzstellen Schreyahn, Terschelling und Barnstorf. Des Weiteren wurden die Anzahlen der Sporen von *Archaeospora* sp. und der Zygoten von *Vaucheria erythrospora* bestimmt. n = 5

Häufig wird zusätzlich zum Mykorrhizierungsgrad der Pflanzenwurzeln die Sporendichte der AM-Sporen im wurzelnahen Bodenbereich bestimmt. Die Sporendichte soll weiteren Aufschluss über den möglichen Einfluss einer Mykorrhizierung auf die Pflanzen am untersuchten Standort geben.

In der Literatur wurden von Puppi *et al.* (1987) durchschnittlich nur 2,5 Sporen/g Boden in einem italienischen Sanddünengebiet bestimmt, wobei in einer Sanddüne der Salzgehalt in der Regel gering ist. Eine Untersuchung der Mykorrhizierung halophiler Gräser eines Alkalibodens in der Alvord Wüste in Oregon von Ho (1987) zeigte hingegen eine Anzahl von 24-96 AM-Sporen pro g Boden. Ein ungarischer Na₂CO₃-Boden wies sogar bis zu 200 Sporen pro g Boden auf (Landwehr *et al.* 2002). Die großen Unterschiede in der Sporenhäufigkeit der genannten Salzstandorte sind nicht überraschend, denn die Sporen liegen innerhalb eines Bodens nicht gleichmäßig verteilt vor und in manchen Fällen werden Sporokarpe gebildet. Auch kann die Häufigkeit der Sporen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Die Sporulationsrate bzw. der Zeitpunkt der Sporulation ist von der AM-

Spezies sowie der Wirtspflanze abhängig, und die unterschiedlichen Bodenfaktoren können einen zusätzlichen Einfluss auf die Sporendichte ausüben (Bever *et al.* 2001; Schüßler *et al.* 2001b).

Die erhaltenen Daten zur Sporendichte für den Standort Schreyahn (im Jahr 2002 und 2003) wurden, zur besseren Übersicht und zum Vergleich, mit den Daten der NaCl-Binnenland-Salzstelle Barnstorf und der holländischen Insel Terschelling in Tab. 4.2 zusammengefasst. Die Daten für Terschelling wurden in einer Diplom- (Manal 2006), bzw. Staatsexamensarbeit (Stodden 2004) ermittelt. Während für die Binnenland-Salzstelle Barnstorf ein Anstieg der AM-Sporenanzahl mit abnehmender Bodensalzkonzentration zu verzeichnen war, schien für Schreyahn und Terschelling keine Zonierung bezüglich der Sporendichte in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Bodens vorzuliegen (Tab. 4.2).

4.3. Diversität der AM-Pilze am Standort Schreyahn

4.3.1. Einblick in die AM-Diversität anhand der Sporen

Die Identifizierung der etwa 160 beschriebenen AM-Pilz-Spezies erfolgte bislang hauptsächlich anhand von morphologischen Kriterien der Sporen (Walker *et al.* 1993). Allerdings ist die Charakterisierung der AM-Sporen einzig aufgrund morphologischer Kriterien sehr schwierig, da sich die Sporen oftmals äußerlich sehr ähneln und sich die morphologischen Merkmale im Laufe der Sporen-Ontogenese oder aufgrund von Standortbedingungen ändern (Redecker *et al.* 2003; Wubet *et al.* 2003a). Eine molekularbiologische Charakterisierung ist für viele AM-Pilz-Spezies insofern noch schwierig, da häufig keine vergleichbaren Sequenzen einer bekannten AM-Spezies aus der ITS-Region oder der 18S rDNA in den Sequenz-Datenbanken zur Verfügung stehen. In solchen Fällen kann eine - von einem Experten durchgeführte - morphologische Charakterisierung des Sporentyps, aus dem die Sequenz erhalten wurde, eine Identifizierung der AM-Spezies ermöglichen. Zudem ist eine morphologische Charakterisierung der AM-Sporen durchaus sinnvoll, um einen ersten Einblick in die AM-Diversität am Standort zu erhalten. Das Sporenvorkommen im Boden muss allerdings nicht unbedingt die Mykorrhizierungsverhältnisse innerhalb der Pflanzenwurzeln widerspiegeln (Smith *et al.* 1997). Neben den Sporen, die von den zum Untersuchungszeitpunkt Wurzel-besiedelnden AM-Pilzen stammen, können sich auch die AM-Sporen früherer Kolonisierer im Boden befinden, ohne dass diese zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Mykorrhiza ausbilden. Zudem gibt es auch nicht oder nicht so häufig sporulierende AM-Pilze, von denen keine oder kaum Sporen gefunden werden können (Schüßler *et al.* 2001b).

Insgesamt konnten im September 2002 in Schreyahn von Dr. E. Sieverding 13 AM-Spezies anhand ihrer Sporenmorphologie charakterisiert werden, während es im Juni 2003 zwischen 8 oder 9 Spezies waren (Tab. 3.1). Dabei muss beachtet werden, dass die zeitaufwändige, morphologische Charakterisierung der isolierten Sporen durch Dr. E. Sieverding nur einmal für jeden Probeentnahmezeitpunkt durchgeführt werden konnte. Deshalb sind die Ergebnisse als nicht repräsentativ anzusehen. Die Küsten-Salzmarsch Terschelling liegt mit einer Anzahl von acht morphologisch charakterisierten AM-Sporenspezies in einer vergleichbaren Größenordnung (Manal 2006).

Oehl *et al.* (2003) konnten eine negative Korrelation zwischen der Intensität der landwirtschaftlichen Nutzung und der Diversität der AM-Pilze feststellen. In Bodenproben eines Graslandes fanden Oehl *et al.* (2003) zwischen 20 und 24 AM-Spezies. Wurde der Boden nach dem Fruchtwechsel-Prinzip bestellt, lagen zwischen 13 und 18 Arten vor. Bei Anbau von Mais als Monokultur konnten nur acht bis zehn Spezies charakterisiert werden.

Bemerkenswert in Terschelling ist das eindeutige Vorkommen von *Archaeospora* sp.-Sporen (Tab. 4.2). Sporen dieser Gattung konnten in Schreyahn nicht sicher identifiziert werden. In Schreyahn konnten Sporen aus wurzelnahem Boden von *P. distans* isoliert werden, die einen säckchenartigen Anhang (Sacculus) aufwiesen (siehe Abb. 3.10). Diese Sporen waren klein (ca. 45 µm) und farblos-hyalin. Sie wurden von Dr. E. Sieverding morphologisch als *Archaeospora trappei* oder *Acaulospora myriocarpa* charakterisiert. Der Sacculus stellt neben Farbe und Sporengröße ein wichtiges morphologisches Merkmal dar. Es ist aber davon auszugehen, dass der Sacculus während des Passierens der Sporen durch die Siebkolonne leicht abgetrennt wird. Somit standen nicht viele eindeutig zu identifizierende Sporen für die Einzelsporen-PCR zur Verfügung und aus diesen wurden lediglich zwei Basidiomyceten-Amplifikate erhalten. Aus einer Sammelsporen-PCR der Sporen mit Sacculus resultierte letztendlich eine einzige AM-Sequenz. Diese wurde mit einer *Archaeospora*-Sequenz aus Terschelling (Manal 2006) in einen Stammbaum eingerechnet (Abb. 3.12). Obwohl die Sequenz aus Schreyahn auch in die Familie der Archaeosporaceae fiel, betrug die Übereinstimmung zu der *Archaeospora* sp.-Sequenz aus Terschelling im 5,8S rDNA-ITS2-Bereich nur 66,2 %.

Die *G. geosporum*-ähnlichen AM-Sporen konnten in fast allen von Dr. E. Sieverding untersuchten Bodenproben aus Schreyahn, d.h. sowohl von 2002 als auch von 2003 und bei allen drei Pflanzenarten identifiziert werden. Die einzige Ausnahme war die Probe, die im Juni 2003 aus Wurzelnahe von *Salicornia europaea* entnommen wurde. In dieser Probe waren keine Sporen von *G. geosporum* enthalten. In der Vergangenheit trat *G. geosporum* als dominierender Sporentyp im Boden der untersuchten europäischen, salinen Habitats auf (Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Janetta 2001; Landwehr *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Manal 2006; Grzybowska, 2004). Die Dominanz der *G. geosporum*-Sporen ließ vermuten, dass dieser AM-Pilz bei der Vermittlung von Salz- bzw. Trockentoleranz an salinen Habitats eine Rolle spielt. Zunächst zeigte sich in einem Gewächshausversuch mit Mais und *G. geosporum* als Inokulum ein leicht verstärktes Pflanzenwachstums unter erhöhten Salzkonzentrationen, gegenüber nicht-okulierten Kontrollpflanzen (Janetta 2001). Die ermittelten Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant und die positiven Resultate konnten in nachfolgenden Wachstumsversuchen nicht bestätigt werden (Wilde 2002; Knolle 2004). Eine Rolle von *G. geosporum* bei der Vermittlung von Salz- bzw. Trockentoleranz erscheint seitdem fraglich.

Am Standort Schreyahn wurden von Dr. E. Sieverding *G. geosporum*-ähnliche Sporen charakterisiert, die in der vorliegenden Arbeit als *G. geosporum* „klein“ bezeichnet werden. Dieser Sporentyp wies zwar morphologische Merkmale von *G. geosporum* auf, war aber im Durchschnitt deutlich kleiner. Während in der Spezies-Beschreibung von Walker aus dem Jahr 1982 (Schenck *et al.* 1990) ein Sporendurchmesser von 110 - 290 µm für *G. geosporum* angegeben wird, wiesen die „kleinen“ *G. geosporum*-ähnlichen Sporen aus Schreyahn nur 80 - 130 µm (Mittelwert: 110 µm ± 11; n = 20) auf. Des Weiteren wurden Sporen dieser „kleinen“ *G. geosporum*-Variante innerhalb der Wurzeln von

Puccinellia distans vorgefunden. In der Art-Beschreibung von Gerdemann und Trappe aus dem Jahr 1974 (Schenck *et al.* 1990) wird neben der namensgebenden Sporenbildung von *G. geosporum* im Boden das Vorkommen von Sporen in absterbenden Wurzeln erwähnt. In den Artbeschreibungen von Nicolson und Gerdemann aus dem Jahr 1968 (Schenck *et al.* 1990) und der Beschreibung von Walker aus dem Jahr 1982 (Schenck *et al.* 1990) wird dagegen ausschließlich über die Bildung von Sporen im Boden berichtet. Auch bei dem *G. geosporum*-Referenzstamm (CA112), der sich in der Kultursammlung der INVAM befindet, wird nur von Einzelsporenbildung im Boden berichtet (INVAM 2007). Ob die „kleinen“ *G. geosporum*-ähnlichen Sporen aus Schreyahn in lebenden oder toten Wurzeln gebildet wurden, müsste in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden. Aufgrund der geringen Größe konnte von Dr. E. Sieverding nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich tatsächlich um eine Variante von *G. geosporum* handelte. Deshalb wurde die morphologische Charakterisierung der *G. geosporum*-ähnlichen Sporen, zumindest stichprobenartig, molekularbiologisch abgesichert. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine PCR-RFLP-Analyse (Lloyd-MacGilp *et al.* 1996) mit einer Einzelspore der *G. geosporum*-Variante „klein“, d. h. $\leq 110 \mu\text{m}$.

Zum Vergleich wurde eine *G. geosporum*-Spore mit einem Durchmesser $\geq 150 \mu\text{m}$ in eine weitere PCR eingesetzt. Eine Größe von $\geq 150 \mu\text{m}$ liegt in dem von Walker im Jahr 1980 beschriebenen Bereich für *G. geosporum* (Schenck *et al.* 1990). Die PCR erfolgte mit dem Primerpaar ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990). Bei etwa 12 % der PCR-Ansätze mit *G. geosporum*-ähnlichen Sporen aus Schreyahn war ein Amplifikat der erwarteten Größe von ca. 620 bp zu erkennen. PCR-inhibierende Substanzen, wie z. B. Salze, Huminsäuren des Bodens (Tebbe *et al.* 1993; Abu Al-Soud *et al.* 1998) oder die unterschiedlich hohen DNA-Mengen und das Alter der Sporen könnten Gründe dafür sein, dass nicht alle PCR-Ansätze ein sichtbares Amplifikat lieferten. Die Erfolgsrate einer PCR aus Einzelsporen wird im Allgemeinen mit 10-72 % (Sanders *et al.* 1995) und für saline Standorte mit 10-30 % (Hildebrandt *et al.* 2001) angegeben. Auch die Lagerungszeit der verwendeten Bodenproben wirkt sich stark auf die Amplifizierbarkeit von Sporen-DNA aus (Ouziad 1999). Die Primer ITS4 und ITS5 sind universelle Primer, d. h. sie binden im Bereich der konservierten rDNA-Gene und liefern somit Amplifikate von verschiedenen, auch miteinander nur entfernt verwandten Organismen, z. B. von Pilzen und Pflanzen. Die ITS-Regionen der rDNA unterliegen einer wesentlich höheren Mutationsgeschwindigkeit als die konservierten rDNA-Gene und eignen sich somit zur Untersuchung genetischer Varianzen mittels RFLP-Analyse und Sequenzierung (Lloyd-MacGilp *et al.* 1996). Das Primerpaar ITS4 und ITS5 ist geeignet für AM-Einzelsporen, die aus dem Boden isoliert wurden, weil diese kein Pflanzenmaterial enthalten, dessen rDNA-ITS-Region ebenfalls amplifiziert werden könnte. Ein Nachteil der AM-Einzelsporen ist aber, dass sie eukaryotische Kontaminanten enthalten können (Sanders *et al.* 1995), deren rDNA-ITS-Regionen ebenfalls amplifiziert werden könnten. Weiteren Aufschluss über den Ursprung der amplifizierten ITS-Region der rDNA gibt das Restriktionsmuster. Die Variabilität der ITS-Regionen ermöglicht eine RFLP-Analyse mit den Amplifikaten aus den AM-Einzelsporen, denn durch die Variabilität liegen unterschiedliche Schnittstellen für die Restriktionsenzyme vor, so dass artspezifische Restriktionsmuster resultieren. Anhand dieser Muster kann die morphologische Sporencharakterisierung überprüft werden, falls Referenzmuster und eine Sequenzabsicherung vorliegen. Die RFLP-Muster (siehe Abb. 3.8), die aus den Amplifikaten der „kleinen“ ($\leq 110 \mu\text{m}$) und der *G. geosporum*-ähnlichen Spore $\geq 150 \mu\text{m}$ erhalten wurden, ergaben

beide ein einheitliches Restriktionsmuster, das mit dem von Hildebrandt *et al.* (2001) ermittelten Muster des Referenzisolates *G. geosporum* BEG 11 identisch war bis auf geringe Unterschiede in den Fragmentlängen. Diese sind durch die Verwendung der Primer ITS1 und ITS4 von Hildebrandt *et al.* (2001) zu erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990) für die PCR verwendet. Bei Einsatz der Primer ITS1 und ITS4 werden ca. 20 bp kürzere Amplifikate erhalten, als mit der Primerkombination ITS4 und ITS5. Charakteristisch für das RFLP-Muster von *G. geosporum* im ITS-Bereich ist entweder das Fehlen einer Schnittstelle für das Enzyms *AluI* oder das Auftreten einer Bande von ca. 580 bp zusätzlich zur ungeschnittenen Bande. Diese *AluI*-Schnittstelle direkt zu Beginn des PCR-Amplifikats wurde in der Vergangenheit wiederholt bei RFLP-Mustern aus *G. geosporum*-ähnlichen Sporen von Salzstellen (Bothe *et al.* 2001) beobachtet. Das könnte durch unterschiedliche ITS-Sequenzen innerhalb einer Spore hervorgerufen werden (Sanders *et al.* 1995). *BsuRI* besitzt typischerweise keine Schnittstelle, *Hinfi* erzeugt Fragmente in der Größe von etwa 380 und 250 bp, bei *HpaII* entstehen Banden von etwa 300 und 350 bp und charakteristisch für *TaqI* ist eine sichtbare Bande von ca. 200 bp. Die Summe der Fragmente pro Enzym sollte erwartungsgemäß der Gesamtlänge des Amplifikats entsprechen. Kleine Fragmente (unter 100 bp) können aber von Primerartefakten überdeckt werden, oder nicht detektierbar sein, weil aufgrund der geringen Größe nicht ausreichend Ethidiumbromid interkalieren kann. Es ist auch möglich, dass es nur Fragmente einer Größe gibt oder fast gleich große Fragmente, die aufgrund einer zu geringen Länge des Gels nicht aufgetrennt wurden, so dass sie als eine Bande erscheinen. Selbst im Fall völlig identischer Muster muss jedoch eine Sequenzierung zur weiteren molekularbiologischen Absicherung der morphologischen Charakterisierung erfolgen. Identische Muster könnten auch durch die zufällige gleiche Lage von Restriktionsschnittstellen innerhalb der variablen ITS-Regionen entstehen, obwohl die Organismen aus verschiedenen taxonomischen Gruppen stammen (Landwehr *et al.* 2002). Einige „kleine“ *G. geosporum*-ähnliche Sporen wurden aus den Wurzeln von *Puccinellia distans* freipräpariert. Die erhaltenen Amplifikate aus diesen Sporen waren nicht intensiv genug für eine RFLP-Analyse, deshalb wurde direkt eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzen der gesamten ITS-Region (ITS1-5,8S rDNA-ITS2) sind für eine sichere Einordnung in einen phylogenetischen Stammbaum zu variabel, d. h. sie sind oftmals unterschiedlich lang und lassen sich daher nur schlecht in ein Alignment stellen. Die zwischen den ITS-Regionen liegende konservierte 5,8S-rDNA weist mit einer Länge von ca. 170 bp genug phylogenetische Merkmale auf, um die Sequenzen mit ausreichenden Bootstrap-Werten in bereits gefasste taxonomische Gruppen einordnen zu können (Cullings *et al.* 1998; Renker *et al.* 2003). Eine höhere Auflösung zwischen nah verwandten Sequenzen kann dadurch erreicht werden, dass ein Teil der ITS2-Region mit in die Analyse einbezogen wird. Alle aus *G. geosporum*-ähnlichen Sporen erhaltenen Sequenzen gruppieren sich im Phylogramm der 5,8S-ITS2-Region (Abb. 3.12) in die Familie der Glomeraceae, *Glomus*-Gruppe Aa (Schwarzott *et al.* 2001). In dieser Gruppe befinden sich auch in direkter Nachbarschaft die Sequenzen aus *G. geosporum*-ähnlichen Sporen der früher untersuchten, salinen Standorte, unabhängig davon, welche Art von Bodensalz dort dominierte. Die im 5,8S rDNA-ITS2 Phylogramm dargestellten Ergebnisse (Abb. 3.12) werden durch zusätzliche Untersuchungen in der 18S rDNA (550 bp-Fragment) bestätigt. Auch hier erfolgt im Phylogramm (Abb. 3.13) eine Eingruppierung der *G. geosporum*-ähnlichen Sporen in die Glomeraceae, *Glomus*-Gruppe Aa (Schwarzott *et al.* 2001).

Aus Wurzeln stammende „kleine“ *G. geosporum*-ähnliche Sporen wurden mit den 18S rDNA-Primern nicht untersucht, weil die Anzahl der verfügbaren Sporen aus Wurzeln limitiert war und durch die Präparation zusätzlich verringert wurde. Denn eine Beschädigung der Sporen, die beim Herauslösen aus dem Wurzelgewebe leicht passieren kann, machte die Sporen für eine PCR unbrauchbar.

Bei der Klärung der Zugehörigkeitsfrage der kleinen *G. geosporum*-ähnlichen Sporen half die molekularbiologische Untersuchung der ITS-Region nur bedingt weiter. Bei den AM-Pilzen ist nicht eindeutig, ab welchem Sequenzunterschied von unterschiedlichen Arten gesprochen werden kann. Beobachtete Variationen in den AM-Pilz-Sequenzen könnten ebenso, wie für Einzelsporen gezeigt, durch das Vorhandensein unterschiedlicher Sequenzen in den AM-Pilzen begründet sein. Die ITS-Region zeigt innerhalb von AM-Spezies, sogar innerhalb einzelner Sporen eine hohe Variabilität (Hijri *et al.* 1999; Clapp *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 2004). Das Auftreten solcher multiplen Sequenzen wurde zuerst in den ITS-Regionen von *G. ssp.* (Sanders *et al.* 1995; Lloyd-MacGilp *et al.* 1996; Ouziad 1999) durch PCR-RFLP-Analyse bzw. Sequenzierung nachgewiesen. Dieses gilt ebenso für die ITS-Regionen von *Gigaspora margarita* BEG34 (Lanfranco *et al.* 1999). Die Sequenzen aus der ITS-Region einer Spore können stärker variieren, als die zwischen den Sporen eines Isolats (Pringle *et al.* 2000). Dieses ist auf die hohe Anzahl der vorliegenden Kopien in einer Spore und deren Vielkernigkeit zurückzuführen. Ob AM-Pilze jedoch homo- oder heterokaryotisch sind, wird bislang kontrovers diskutiert (Zézé *et al.* 1997; Hijri *et al.* 1999; Pawlowska *et al.* 2004; Bever *et al.* 2005). Für die 18S-Untereinheit der rDNA von *Scutellospora* sp. konnten aus einer Spore mindestens fünf verschiedene Sequenzen (Clapp *et al.* 1999) nachgewiesen werden. Ebenso ergab die Analyse von drei *Glomus mosseae*-Sporen insgesamt 23 unterschiedliche Sequenzen der ITS-Region mit einer durchschnittlichen Sequenzdivergenz von 14,4 %. Die Divergenzen innerhalb einer Spore lagen dabei zwischen 2,4 und 5,7 % (Antoniolli *et al.* 2000). Von Clapp *et al.* (2001) konnten bei einer Sequenz-Analyse der 28S rDNA verschiedener Isolate von *Glomus coronatum* sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Isolaten erhebliche Sequenzdivergenzen festgestellt werden. Innerhalb einer Spezies ist bisher der Umfang der genetischen Variation unbekannt (Wubet *et al.* 2003a; Koch *et al.* 2004). Anstelle von Spezies werden vielmehr Sequenzgruppen identifiziert (Redecker *et al.* 2003). Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass einzelne Sequenzen nicht als repräsentativ für eine Art oder ein Isolat gelten können.

Durch die morphologische und molekularbiologische Charakterisierung der Sporen konnte ein erster Einblick in die AM-Diversität am Standort Schreyahn erhalten werden. Die morphologischen Untersuchungen zur Sporencharakterisierung konnten von Dr. E. Sieverding aufgrund des hohen Zeitaufwandes nur einmal pro Entnahmezeitpunkt durchgeführt werden, so dass sie keine allgemeingültigen Schlüsse auf die Verbreitung von AM-Sporen an Salzstellen zulassen. Hier wären detaillierte Untersuchungen wünschenswert. Die erforderlichen Kenntnisse für eine morphologische Identifizierung von AM-Sporen besitzen jedoch weltweit nur wenige Spezialisten. Die Identifizierung von AM Pilz-Sporen anhand morphologischer Kriterien gelingt aber selbst den Experten nicht immer eindeutig, wie das später beschriebene Beispiel der *Vaucheria erythrospora*-Zygoten zeigt. Zudem spiegeln die Sporenverhältnisse im Boden nicht die tatsächlichen Mykorrhizierungsverhältnisse innerhalb der Pflanzenwurzeln wider (Smith *et al.* 1997). Aus diesem Grund wurde auf eine

intensivere Untersuchung der AM-Sporen zugunsten der molekularbiologischen Untersuchung der intraradikalen AM-Diversität verzichtet.

4.3.2. Diversität der AM-Pilze innerhalb der mykorrhizierten Pflanzenwurzeln

Zur DNA-Isolierung wurden ungefärbte Wurzelstücke der Pflanzenexemplare eingesetzt, deren gefärbte Wurzelproben AM-Strukturen erkennen ließen. Eine DNA-Amplifizierung aus angefärbten Wurzelproben gelang in der vorliegenden Arbeit trotz wiederholter Versuche nicht. Auch in der Literatur (Redecker 2000c; Turnau *et al.* 2001) wird nur vereinzelt davon berichtet, dass DNA aus angefärbtem Wurzelmaterial amplifiziert wurde. Das anfänglich zur DNA-Isolierung angewandte Verfahren nach Raeder *et al.* (1985) wurde durch die Methode nach Doyle *et al.* (1990) ersetzt, nachdem sich diese in Bezug auf die isolierte DNA-Menge als ergiebiger erwiesen hatte (siehe 2.4). Sowohl in pflanzlichen Gewebeproben als auch im Boden können PCR-inhibierende Stoffe, wie Polyphenole, Polysaccharide und Huminstoffe vorkommen. Während die im Boden vorhandenen Huminstoffe durch gründliche Reinigung der Wurzeln entfernt werden können, wird durch Einsatz von CTAB bei der Methode nach Doyle *et al.* (1990) die DNA präzipitiert, während die Polysaccharide in Lösung bleiben. Eine nach der DNA-Isolierung erfolgte Behandlung der Proben mit Aktivkohle sollte zusätzlich zur Entfernung möglicher PCR-inhibierender Stoffe beitragen (Vroh Bi *et al.* 1996).

Die pilzliche DNA hat einen Mengenanteil von etwa 5 % (Toth *et al.* 1991) an der gesamten isolierten genomischen DNA. Somit ist die pflanzliche DNA der pilzlichen DNA mengenmäßig stark überlegen, ein Umstand, der sich limitierend auf die Erfolgsrate einer einfachen PCR auswirken kann (Clapp *et al.*, 1995). Anhand eines nested PCR-Verfahrens nach Renker *et al.* (2003) wurde versucht, die AM-Pilz-DNA im Bereich der ITS-Region spezifisch zu amplifizieren. Bei dieser nested PCR wurden zwei PCR-Reaktionen hintereinandergeschaltet, um die pilzliche von der pflanzlichen DNA zu diskriminieren. Außerdem kann der zwischen den beiden Reaktionen erfolgte Verdünnungsschritt zur Reduzierung von PCR-hemmenden Stoffen und somit zur besseren Amplifizierbarkeit der DNA beitragen. Zwischen den beiden Reaktionen erfolgte ein *AluI*-Verdau nach Renker *et al.* (2003), denn die meisten Nicht-AM-Pilze besitzen eine Schnittstelle für *AluI*. Es stellte sich jedoch in der vorliegenden Arbeit heraus, dass trotz Anwendung dieser Methode 171 der insgesamt 385 erhaltenen Sequenzen von Basidiomyceten stammten. Von diesen Fremdsequenzen besaßen 122 keine *AluI*-Schnittstelle, bei den anderen 49 Sequenzen hat der *AluI*-Verdau offensichtlich nicht funktioniert.

Eine andere in dieser Arbeit angewandte Methode beruht auf der Amplifizierung eines Fragments der 18S rDNA (Helgason *et al.* 1998). Diese PCR hat den Vorteil, dass nur ein Schritt notwendig ist, um die pflanzliche von der AM-Pilz-DNA zu diskriminieren. Ein Nachteil ist, dass manche Gruppen innerhalb der Glomeromycota, wie die Archaeosporaceae, nicht erfasst werden. Eine Kombination der beiden Primer-Systeme erschien deshalb sinnvoll um die intraradikale AM-Diversität möglichst weitläufig zu erfassen.

Die Analyse des 18S-rDNA-Fragments ergab eine Anzahl von 328 sequenzierten Klonen aus zwölf mykorrhizierten Pflanzenexemplaren, die zur Untersuchung eingesetzt wurden. Die phylogenetische Auswertung zeigte, dass AM-Pilze aus drei Sequenzgruppen die Wurzeln der zwei untersuchten,

mykorrhizierten Pflanzenarten kolonisierten. Diese drei AM-Sequenzgruppen fallen alle in die Familie der Glomeraceae (siehe Abb. 3.15).

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten zeichnete sich eine Präferenz der AM-Gruppe SSU_2 für *P. distans* ab, während sich die Sequenzen aus der AM-Gruppe SSU_1, die zu beiden Entnahmezeitpunkten den Hauptanteil stellen, relativ gleichmäßig auf beide Pflanzenarten verteilen. Die AM-Gruppe SSU_1 steht in enger Verwandtschaft zu Sequenzen von *G. vesiculiferum* und *G. intraradices* und fällt somit in *Glomus*-Gruppe Ab. AM-Gruppe SSU_2 weist eine hohe Sequenzidentität zu *G. geosporum* auf und gehört in die Gruppe *Glomus* Aa. Im Jahr 2002 gehörten 32 % der Wurzelsequenzen zu dieser Gruppe, im Jahr 2003 lediglich 8 %. Die AM-Gruppe SSU_3 ist nur im Jahr 2002 bei *A. tripolium* mit drei Sequenzen vertreten. Die höchste Sequenzidentität besteht zu unkultivierten *Glomus*-Sequenzen. Eine Sequenz von *Glomus hoi* befindet sich am Nachbarzweig. Zwischen dieser Sequenz und AM-Gruppe SSU_3 liegt die Sequenzidentität bei 95 %.

Die Ergebnisse aus dem 18S-rDNA Bereich wurden durch die Analyse der ITS-Region bestätigt. Hier wurden 214 AM-Sequenzen erhalten, die sich auf fünf Sequenzgruppen verteilen. Auch hier liegt eine hohe Verwandtschaft der größten Gruppe ITS_1 a, sowie der Gruppe ITS_1 b zu *G. intraradices* und *G. clarum* vor, also zur Familie der Glomeraceae, *Glomus*-Gruppe Ab. Die AM-Gruppe ITS_3 liegt an einem Nachbarzweig zu Sequenzen unkultivierter AM-Pilze aus der Datenbank (96 % Sequenzidentität), und befindet sich in der Nachbarschaft zu Wurzelsequenzen unkultivierter AM-Pilze aus Terschelling (76 % Sequenzidentität). Die AM-Gruppe ITS_2 weist eine Sequenzidentität von 93 % zu *G. geosporum* BEG11 auf und von 98 % zu Sequenzen aus Terschelling. Im 5,8S rDNA-ITS2-Baum erscheint zusätzlich noch die AM-Sequenzgruppe ITS_4 aus der Familie der Archaeosporaceae, die aber nur durch die Unvollständigkeit des *AluI*-Verdau erhalten wurde. Es ist zwar von Vorteil, dass durch den *AluI*-Verdau viele Nicht-AM-Sequenzen eliminiert werden. Ein Nachteil liegt aber darin, dass dadurch auch einige AM-Sequenzen nicht erfasst werden. Aus diesem Grund wurde in einer neueren Untersuchung von Hempel *et al.* (2007) auf den *AluI*-Verdau verzichtet.

Die eingeschränkte pflanzliche Artenvielfalt der Salzstelle Schreyahn spiegelte sich in einer geringen Anzahl an erhaltenen AM-Sequenzgruppen wider. Das steht im Einklang mit den Erwartungen, die sich aus der Rarefaction-Analyse ergaben, sowohl im ITS- als auch im 18S rDNA-Bereich (Abb. 3.23). Weiterhin spricht der Verlauf der Rarefaction-Kurven dafür, dass die Anzahl der Sequenzen ausreichte um die Gesamtdiversität zu erfassen. Eine Untersuchung der AM-Pilz-Diversität einer Salz-Marsch von Terschelling anhand der ITS-Region (Stodden 2004), erbrachte ebenfalls eine geringe Anzahl von nur drei intraradikalen Sequenzgruppen. Im Gegensatz dazu konnten an einem Feuchtstandort bis zu 21 Sequenzgruppen gefunden werden, obwohl eine „natürliche Monokultur“ von *Phragmites australis* untersucht wurde und somit nur eine Wirtspflanze vorlag (Wirsel 2004).

Das zonierte Wachstum der Pflanzenspezies in Abhängigkeit vom Bodensalzgehalt ist deutlich sichtbar. Ein Einfluss der Bodensalzkonzentration, bzw. der Wirtspflanzenspezies auf das Kolonisierungsverhalten der AM-Pilze zeigt sich dagegen in Schreyahn nur ansatzweise. Denn während der Hauptanteil der erhaltenen Wurzelsequenzen (*Glomus*-Gruppe Ab) in etwa zu gleichen Teilen aus *Aster tripolium* und *Puccinellia distans* stammt, wurden die Sequenzen der zweitgrößten Gruppe (*Glomus* Aa) fast ausschließlich aus *P. distans* erhalten. Die Diversität der Wurzelsequenzen aus Schreyahn erscheint 2002 höher, da dort zwei AM-Sequenzgruppen mehr vertreten waren als im Jahr 2003.

Für die Bakterienpopulation am Standort Schreyahn ließ sich keine Zonierung, d.h. keine Änderung der Diversität in Abhängigkeit vom Bodensalzgehalt feststellen (Eilmus 2005), dafür ließen sich aber alle wesentlichen Klassen der Prokaryoten mit überraschend hoher Diversität nachweisen.

Etliche morphologische und molekularbiologische Untersuchungen (Carvalho *et al.* 2001; Hildebrandt *et al.* 2001; Janetta 2001; Landwehr *et al.* 2002; Carvalho *et al.* 2004; Manal 2006; Grzybowska 2004) haben in der Vergangenheit gezeigt, dass *G. geosporum*-Sporen in den Böden diverser Salzstellen dominieren. *G. geosporum* kommt zwar auch ausserhalb von Salzstellen vor, neigt aber offensichtlich an salinen Habitaten zu intensiver Sporenbildung. Von Daniell *et al.* (2001) wurden hauptsächlich Sequenzen von *G. geosporum* und *Glomus mosseae* innerhalb der Wurzeln von Ackerpflanzen (Gerste, Mais, Erbse und Weizen) nachgewiesen. In den Schreyahn-Wurzeln hingegen trat *G. geosporum* jedoch nicht als Hauptbesiedler auf. Auch aus den Halophytenwurzeln der Küste von Terschelling wurden nur drei (von 47) *G. geosporum*-Sequenzen erhalten (Stodden 2004). Die Frage, ob und welche Rolle *G. geosporum* an Salzstellen spielt bleibt weiterhin offen.

Die Vermutung, dass *G. geosporum* unter erhöhten Salzkonzentrationen zu einer vermehrten Sporulierung neigt, könnte durch Stressversuche im Gewächshaus näher untersucht werden. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Sporengröße und der Bodensalzkonzentration könnte getestet werden, indem Pflanzen unter Salzstress und im Normalboden gezielt mit „kleinen“ *Glomus geosporum*-ähnlichen Sporen inokuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten solche Versuche aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, morphologische Strukturen (z.B. Sporen) zu finden, die eine Identifizierung der unkultivierten AM-Pilz-Gruppen ermöglichen. Es war erstrebenswert durch die Zusammenarbeit mit einem Morphologen solche Strukturen zu charakterisieren um spezifische Primer zu entwickeln, die die jeweilige Pilzgruppe in der Wurzel nachweisen können. Diese intensiven Bemühungen blieben jedoch erfolglos, wie auch in den Untersuchungen an der Salzmarsch von Terschelling (Manal 2006). Es ist einerseits möglich, dass Sporen bislang unkultivierter AM-Pilze trotz Vorhandensein nicht gefunden wurden. Andererseits ist es auch denkbar, dass diese Pilze zum Untersuchungszeitpunkt nicht sporuliert haben oder generell nicht zur Sporenbildung neigen und durch andere Strukturen die Wurzeln besiedeln. Es wurden zwar von Dr. Sieverding unbekannte sporenlähnliche Strukturen im Boden von Schreyahn entdeckt, diese konnten aber nach langwierigen Untersuchungen letztendlich als Zygoten von *Vaucheria erythrospora* aus der Klasse der Xanthophyceae identifiziert werden (Dr. K.-H. Linne von Berg, Köln, persönliche Mitteilung). Die Zygoten von *V. erythrospora* weisen nicht nur eine morphologische Ähnlichkeit zu den AM-Sporen auf, sondern sie sind ebenso wie AM-Sporen ölreich und besitzen eine mehrschichtige Wand (Strasburger *et al.* 1998). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zwischen AM-Sporen und Zygoten von *V. erythrospora* in Morphologie und Konsistenz konnte bei der Durchführung der „Einzelsporen“-PCR-Experimente kein Unterschied bemerkt werden. Die Zygoten von *V. erythrospora* wurden in der Vergangenheit lediglich an zwei der von der Arbeitsgruppe untersuchten, salinen Habitats beobachtet (aber nicht identifiziert), und zwar an den Binnenland-Salzstellen Schreyahn und Barnstorf (Landkreis Wolfenbüttel). So wurde lange Zeit angenommen, dass es sich um die Sporen eines bislang unkultivierten, speziellen AM-Binnensalztyps handeln könnte, den es zu identifizieren galt.

Die zur Keimung und molekularbiologischen Charakterisierung erfolgten Versuche waren größtenteils spezifisch für AM-Pilze angelegt und konnten deshalb nicht zu einer erfolgreichen Identifizierung führen, wie im Nachhinein klar wurde. Die Primerkombination ITS4 und ITS5 (White *et al.* 1990) ist zwar universell und lässt sich bei höheren Pflanzen zur Amplifizierung des ITS-Bereiches anwenden, aber führte in der vorliegenden Arbeit zu keiner erfolgreichen Amplifizierung der ITS-Region von *V. erythrospora*. Ein Amplifikat hätte möglicherweise zur direkten Identifizierung führen können.

Eine Zunahme der Zygotenanzahl mit ansteigender Bodensalzkonzentration war an der Salzstelle Barnstorf zu erkennen, nicht aber in Schreyahn (Tab. 4.2). In Bezug auf die Salztoleranz sind die meisten *Vaucheria*-Species euryhalin (Schneider 2007), d.h. sie sind in der Lage starke Schwankungen des Salzgehaltes zu tolerieren. Somit überrascht im Nachhinein die Auskeimung der Zygoten dieser halophilen Organismen in Leitungswasser nicht. Das Vorkommen von *Vaucheria erythrospora* an salzhaltigen Habitats der Küsten und des Binnenlandes wurde von Rieth (1980) beschrieben. Die Art ist in Mittel- und Westeuropa, Nordamerika und Asien (Japan, Ostindien) verbreitet. Den siphonalen Fadenthalli von *Vaucheria erythrospora* wird - wie auch dem extraradikalen AM-Pilzmycel im Boden - eine ökologisch wichtige Rolle bei der Substratstabilisierung zugeschrieben (Schneider 2007). Eine stark haftende Eigenschaft der fädigen Thalli konnte bei Transferaktionen mit der Präpariernadel festgestellt werden.

Bereits Horst *et al.* (1976) gingen davon aus, dass das „vielgestaltige, ungewöhnliche Salzgebiet von Schreyahn eine Fülle wissenschaftlicher Frage- und Aufgabenstellungen bietet“. Sie erwarteten, dass „die Salzstelle Schreyahn auch eine spezielle halophile Fauna beherbergt“ und „ähnliches auch für

salzliebende niedere Pflanzen wie Algen und Moose gilt“. Diese Annahme konnte für die Alge *Vaucheria* in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Seit einiger Zeit findet die tRFLP (terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)-Analyse (Liu *et al.* 1997) – als Alternative oder Ergänzung zur anfangs beschriebenen PCR-RFLP/Sequenzierungsmethode – bei der molekularen Charakterisierung von AM-Pilzen Beachtung (Tonin *et al.* 2001; Vandenkoornhuysen *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2003; Vandenkoornhuysen *et al.* 2003; Mummey *et al.* 2005). Der tRFLP-Analyse geht eine PCR voraus, bei der mindestens einer der beiden Primer Fluorochrom-markiert ist. Nach einem Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen können die markierten terminalen Restriktionsfragmente (tRFs) auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert werden. Aufgrund der Anzahl der aus einer Probe erhaltenen tRFs pro Restriktionsenzym sind Aussagen zur Diversität möglich. Steht bei Einsatz dieser Methode ein umfangreicher Referenz-Sequenzdatensatz zur Verfügung, der „virtuell verdaut“ wird, ist es möglich die tatsächlich erhaltenen tRFLP-Profilen mit den theoretisch ermittelten abzugleichen und zuzuordnen. Mit Hilfe des Computerprogramms TReFID (Rösch *et al.* 2005) ist es möglich, die für jeden Ansatz erhaltenen tRFLP-Profilen parallel auszuwerten und durch Vergleich mit den „virtuell verdauten“ Referenzdaten eine „Speziesliste“ aufzustellen. Das Programm TReFID wurde im Labor für die Untersuchung der Gesamtdiversität von Bakterienpopulationen in Umweltproben mittels tRFLP entwickelt und konnte bei einer Untersuchung der Bakteriendiversität in Schreyahn erfolgreich eingesetzt werden (Eilmus *et al.* 2007). Es wäre erstrebenswert in Zukunft weitere Untersuchungen zur AM-Pilzdiversität anhand dieser Methode vorzunehmen. Die bereits im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zeitaufwändigen tRFLP-Versuche lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Weitere Wiederholungen waren aufgrund anhaltender technischer Probleme mit dem Sequenzierer und aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, arbuskuläre Mykorrhizapilze innerhalb der Wurzeln ausgewählter Halophyten molekularbiologisch zu charakterisieren. Die für die Untersuchungen eingesetzten Pflanzen stammten von einer K₂CO₃-Binnenland-Salzstelle in Schreyahn (Niedersachsen). Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die Wurzeln von *Aster tripolium* wiesen durchweg AM-Pilzstrukturen (Arbuskel, Vesikel, Innenmycel) auf. Ihre Mykorrhizierungswerten lagen zwischen 75-97 % (2002) bzw. 48-93 % (2003). Die Wurzeln von *Puccinellia distans* hingegen waren nur gelegentlich besiedelt, d. h. der Mykorrhizierungsgrad lag zwischen 0-70 % (2002) und 0-34 % (2003). Die untersuchten Exemplare von *Salicornia europaea* wiesen keine Mykorrhizierung auf. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, die an anderen Salzstellen durchgeführt wurden.
2. Die DNA der AM-Pilze ließ sich aus den Wurzeln der Halophyten durch PCR amplifizieren, obwohl sie mengenmäßig der pflanzlichen DNA deutlich unterlegen war. Zusätzlich erschwerte der hohe Salzgehalt des Untersuchungsmaterials die erfolgreiche Amplifizierung. Als Zielregionen für die PCR dienten der ITS-Bereich und ein Fragment der 18S rDNA der AM-Pilze. PCR-Amplifikate wurden aus den Wurzeln von *P. distans* und *A. tripolium* erhalten, nicht aber aus *S. europaea*-Wurzeln.
3. Die gewonnenen Sequenzdaten konnten unter der Voraussetzung, dass eine paarweise Homologie von $\geq 90,5$ % im ITS-, bzw. $\geq 98,2$ % im 18S rDNA-Bereich vorlag, in Gruppen gefasst werden. Mit diesen Sequenzgruppen wurden unter Einbeziehung von Datenbank-Sequenzen phylogenetische Stammbäume erstellt, anhand derer sich folgende Ergebnisse ableiten ließen:
 - a. Der Hauptanteil der intraradikalen Sequenzen fiel zu beiden Entnahmezeitpunkten, sowohl im ITS- als auch im 18S rDNA-Bereich in die *Glomus*-Gruppe Ab, in nahe Verwandtschaft zu *Glomus intraradices* bzw. *Glomus fasciculatum*. Die Sequenzen stammen aus Wurzeln von *P. distans* und *A. tripolium* und bilden die AM-Sequenzgruppen SSU_1 bzw. ITS_1.
 - b. Sequenzen, die in naher Verwandtschaft zu *Glomus geosporum* (*Glomus*-Gruppe Aa) stehen, bildeten die zweitgrößten Gruppen (SSU_2 und ITS_2) sowohl unter Anwendung der Primerpaare für den ITS- als auch für den 18S rDNA-Bereich. Die Sequenzen stammten weit überwiegend aus Wurzeln von *P. distans*.

- c. Sequenzgruppen in Verwandtschaft zu bislang nicht kultivierten AM-Pilzen (SSU_3 und ITS_3) wurden mit geringer Sequenzanzahl im Bereich der ITS- als auch der 18S rDNA-Region nur für 2002 erhalten.
 - d. Die AM-Sequenzgruppe ITS_4 fällt in die Familie der Archaeosporaceae, zeigt aber keine hohe Verwandtschaft zu bislang bekannten Sequenzen dieser Familie. Die Gruppe ITS_4 trat nur 2002 auf. Im Bereich der 18S rDNA-Region wurden keine Archaeosporaceae-Sequenzen erhalten.
 - e. Die Anzahl der intraradikalen Sequenzgruppen lag 2002 insgesamt bei drei im SSU- und bei fünf im ITS-Bereich. Im Jahr 2003 traten zwei Sequenzgruppen im SSU-Bereich auf, während die Anzahl der Gruppen für den ITS-Bereich bei drei lag. Somit war die intraradikale Diversität 2002 etwas höher als 2003.
4. Ein zwischen den beiden Schritten der nested PCR erfolgter *AluI*-Verdau sollte nach Renker *et al.* (2003) eine Amplifizierung der DNA von Nicht-AM-Pilzen in der zweiten PCR vermeiden. In der vorliegenden Arbeit wurden trotzdem zu 32 % Basidiomyceten-Sequenzen im ITS-Bereich erhalten, weil diese Sequenzen keine *AluI*-Schnittstelle besitzen. Des Weiteren gehen mit dem *AluI*-Verdau reale AM-Sequenzen verloren, die doch eine Schnittstelle für dieses Enzym haben, z. B. aus der Familie der Archaeosporaceae.
 5. Die aufgrund des hohen Zeitaufwandes von Dr. E. Sieverding nur einmal pro Entnahmezeitpunkt durchgeführte morphologische Charakterisierung der AM-Sporen im Boden von Schreyahn zeigte für 2002 eine Anzahl von 13 und für 2003 eine Anzahl von acht oder neun AM-Pilzspezies. Die molekularbiologische Analyse hingegen zeigte lediglich eine Anzahl von drei bzw. fünf AM-Sequenzgruppen innerhalb der Wurzeln.
 6. Die weitgehenden Übereinstimmungen in den phylogenetischen Untersuchungen und den Rarefaction-Analysen bestätigen eine tatsächlich geringe intraradikale Diversität der AM-Pilze in Schreyahn zu den beiden Untersuchungszeitpunkten.
 7. Frühere Untersuchungen von Böden anderer Salzstellen zeigten eine Dominanz der Sporen des AM-Pilz *Glomus geosporum*. Auch im Boden von Schreyahn wurde eine hohe Anzahl *G. geosporum*-ähnlicher Sporen gefunden. Diese Sporen waren mehrheitlich kleiner, als in der Artbeschreibung von *G. geosporum* angegeben ist. Eine hohe Verwandtschaft dieser „kleinen“ Sporen zu *G. geosporum* konnte jedoch durch Sequenzanalysen im Bereich der 18S rDNA und in der ITS-Region (5.8S rDNA-ITS2) gezeigt werden.
 8. AM-Sporen, die eine nähere Charakterisierung der bislang unkultivierten bzw. der nah zu *G. intraradices* verwandten AM-Pilze innerhalb der Wurzeln ermöglichen könnten, wurden im Boden von Schreyahn nicht gefunden.

9. Ein Zusammenhang zwischen der Gesamtanzahl der AM-Sporen und der Salzkonzentration im Boden von Schreyahn war nicht zu erkennen. An der Binnenland-Salzstelle Barnstorf zeigte sich eine Abnahme der Sporenanzahl mit zunehmendem Salzgehalt im Boden.

10. Im Boden der Salzstelle Schreyahn wurden in hoher Anzahl Strukturen gefunden, die AM-Sporen morphologisch sehr ähnelten. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Sporen eines bislang unkultivierten AM-Pilzes handeln könnte, jedoch blieben Versuche zur Identifizierung lange Zeit erfolglos. Erst die reproduzierbare Ausbildung von plastidenhaltigen Keimschläuchen führte dazu, dass die Strukturen als Zygoten der Alge *Vaucheria erythrospora* aus der Klasse der Xanthophyceae identifiziert werden konnten. *V. erythrospora*-Zygoten wurden auch an der NaCl-Binnenland-Salzstelle Barnstorf gefunden, nicht jedoch an der holländischen Salzmarsch (Küste von Terschelling). Während in Barnstorf die Zygotenzahl mit zunehmendem Bodensalzgehalt anstieg, konnte in Schreyahn keine Zunahme der Zygotenanzahl mit ansteigender Bodensalzkonzentration verzeichnet werden.

6. Literatur

- Abu Al-Soud, W. and P. Rådström (1998). "Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples." *Appl Environ Microbiol.* 64: 3748-3753.
- Akiyama, K., K. Matsuzaki and H. Hayashi (2005). "Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi." *Nature* 435: 824-827.
- Al-Agely, A. K. and F. B. Reeves (1995). "Inland sand dune mycorrhizae: Effects of soil dept, moisture, and pH on colonization of *Oryzopsis hymenoides*." *Mycologia* 87(1): 54-60.
- Al-Karaki, G. N. (2000). "Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress." *Mycorrhiza* 10: 51-54.
- Aliasgharzadeh, N., N. Saleh Rastin, H. Towfighi and A. Alizadeh (2001). "Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil." *Mycorrhiza* 11: 119-122.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
- Ambler, J. R. and J. L. Young (1977). "Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 551-556.
- Antoniolli, Z. I., D. P. Schachtman, K. Ophel-Keller and S. E. Smith (2000). "Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture." *Mycol Research* 104: 708-715.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, A. Goulet and Y. Piché (1998). "Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi." *New. Phytol.* 139: 375-388.
- Bécard, G. and J. A. Fortin (1988). "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA-transformed roots." *New Phytol* 108: 211-218.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp and D. L. Wheeler (2000). "GenBank." *Nucl Acids Res.* 28(1): 15-18.
- Bever, J. D., P. A. Schultz, A. Pringle and J. B. Morton (2001). "Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why." *Bio Science* 51(11): 923-931.
- Bever, J. D. and M. Wang (2005). "Arbuscular mycorrhizal fungi: Hyphal fusion and multigenomic structure." *Nature* 433: E3-E4.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-23.
- Bonfante-Fasolo, P. (1984). *Anatomy and morphology of VA-mycorrhizae*. Boca Raton, FL, USA, CRS Press.
- Bothe, H. (1976). "Salzresistenz bei Pflanzen." *Biologie in unserer Zeit* 1: 2-9.

- Bothe, H., U. Hildebrandt, F. Ouziad, M. Landwehr and K. Nawrath (2001). "The colonization of plants from Central European heavy metal soils and salt marshes by arbuscular mycorrhizal fungi." *Minerva Biotechnologica* 13: 65-67.
- Carvalho, L. M., I. Caçador and M. A. Martins-Loução (2001). "Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal)." *Mycorrhiza* 11: 303-309.
- Carvalho, L. M., P. M. Correia and M. A. Martins-Loução (2004). "Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh." *Mycorrhiza* 14: 165-170.
- Chelius, M. K. and E. W. Triplett (1999). "Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA." *Mycorrhiza* 9: 61-64.
- Chung, C. T. and R. H. Miller (1993). "Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells." *Methods Enzymol* 218: 43.
- Clapp, J. P., A. Rodriguez and J. C. Dodd (2001). "Inter- and intra-isolate rRNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores." *New Phytol* 149: 539-554.
- Clapp, J. P., A. Rodriguez and J. C. Dodd (2002). "Glomales rRNA gene diversity - all that glistens is not necessarily glomalean?" *Mycorrhiza* 12: 269-270.
- Clapp, J. P., J. P. W. Young and A. H. Fitter (1999). "Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp." *Mol Ecol* 8: 915-921.
- Clapp, J. P., J. P. W. Young, J. W. Merryweather and A. H. Fitter (1995). "Diversity of fungal symbiosis on arbuscular mycorrhizas from a natural community." *New Phytol.* 13: 259-265.
- Cullings, K. W. and D. R. Vogler (1998). "A 5,8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: Applications to ecology and evolution." *Mol. Ecol.* 7: 919-923.
- Daniell, T. J., R. Husband, A. H. Fitter and J. P. W. Young (2001). "Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops." *FEMS Microbiol Lett* 36: 203-209.
- Daniels, B. A. and J. M. Trappe (1980). "Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*." *Mycologia* 72: 457-471.
- Dehne, H. W. (1982). "Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens." *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Douds, D. D. (1997). "A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots." *Mycorrhiza* 7: 57-61.
- Douds, D. D., P. E. Pfeffer and Y. Shachar-Hill (2000). "Application of in vitro methods to study carbon uptake and transport by AM fungi." *Plant and Soil* 226: 255-261.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle (1990). "Isolation of plant DNA from fresh tissue." *Focus* 12: 13-15.
- Eilmus, S. (2005). *Diversität von Prokaryoten einer Binnensalzstelle*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Eilmus, S., C. Rösch and H. Bothe (2007). "Prokaryotic life in a potash-polluted marsh with emphasis on N-metabolizing microorganisms." *Environmental Pollution* 146(2): 478-491.
- Ellenberg, H. (1963). *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*. Stuttgart, Eugen Ulmer.

-
- Esch, H., B. Hundeshagen, H. Schneider-Poetsch and B. H. (1994) (1994). "Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*." *Plant Science* 99: 9-16.
- Frank, B. A. (1885). "Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung bestimmter Bäume durch gewisse unterirdische Pilze." *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 3: 128-145.
- Füzy, A., T. Tóth, U. Hildebrandt, B. Biró and H. Bothe (2007). "Drought, but no salt-load determines the apparent effectiveness of halophytes colonized by arbuscular mycorrhizal fungi." Manuskript in Vorbereitung.
- Gardes, M. and T. D. Bruns (1993). "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Mol Ecol* 2: 113-118.
- Gerdemann, J. W. and J. M. Trappe (1974). "The Endogonaceae in the Pacific Northwest." *Mycologia* 8: 123-130.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). "Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis." *The Plant Cell* 8: 1871-1883.
- Giovanetti, M. V. and C. V. Sbrana (1998). "Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi." *Mycorrhiza* 8: 123-130.
- Green, N. E., S. O. Graham and N. C. Schenck (1976). "The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores." *Mycologia* 68: 929-934.
- Gryndler, M., H. Hrselova and I. Chvatalova (1997). "An improved procedure for root surface disinfection suitable for observations of proliferation of intraradical hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fistulosum*." *Folia Microbiologica* 42(5): 489-494.
- Grzybowska, B. (2004). "Arbuscular Mycorrhiza of herbs colonizing a salt affected area near Kraków (Poland)." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 73 (3): 247-253.
- Guder, C., C. Evers and D. Brandes (1998). "Kalihalden als Modellobjekte der kleinräumigen Florendynamik dargestellt an Untersuchungen im nördlichen Harzvorland." *Braunschw. naturkd. Schr.* 5(3): 641-665.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Harley, J. L. and S. E. Smith (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press.
- Hartig (1851). *Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen Deutschlands*. Berlin.
- Hayman (1982). "Influence of soil and fertility and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi." *Phytopath.* 72: 1119-1124.
- Helgason, T., T. J. Daniell, R. Husband, A. Fitter and J. P. W. Young (1998). "Ploughing up the wood-wide web?" *Nature* 394: 431.
- Helgason, T., A. H. Fitter and J. P. W. Young (1999). "Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland." *Molecular Ecology* 8: 658-666.
- Hempel, S., C. Renker and F. Buscot (2007). "Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem." *Environmental Microbiology*: 1-9.
-

- Hijri, M., M. Hosny, D. van Tuinen and H. Dulieu (1999). "Intraspecific ITS Polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) Is Structured within Multinucleate Spores." *Fungal Genetics and Biology* 26: 141-151.
- Hildebrandt, U., K. Janetta, F. Ouziad, B. Renne, K. Nawrath and H. Bothe (2001). "Arbuscular mycorrhizal colonisation of halophytes in Central European salt marshes." *Mycorrhiza* 10: 175-183.
- Hildebrandt, U., M. Kaldorf and H. Bothe (1999). "The zinc violet and its colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi." *J. Plant. Physiol.* 154: 709-717.
- Hildebrandt, U., F. Ouziad, F. J. Marner and H. Bothe (2006). "The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores." *FEMS Microbiol Lett* 254: 258-267.
- Ho, I. (1987). "Vesicular-arbuscular mycorrhizae of halophytic grasses in the Alvard desert of Oregon." *Northwest Sci.* 61: 148-151.
- Holland, S. M. (2003). Analytic Rarefaction (Computerprogramm, Windows PC), <http://www.uga.edu/strata/software>
- Horst, K. and I. Redel (1976). "Salzpflanzen und salzliebende Pflanzengesellschaften bei Schreyahn- ein schutzwürdiges Refugium im Hannoverschen Wendland." 6. Jahresheft des Heimatkundlichen Arbeitskreises Lüchow-Dannenberg.
- Hosny, M., V. Gianinazzi-Pearson and H. Dulieu (1998). "Nuclear content of 11 fungal species in Glomales." *Genome* 41: 422-428.
- Huber, T., G. Faulkner and P. Hugenholtz (2004). "Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments." *Bioinformatics* 20(14): 2317-19.
- INVAM (2007). "International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi." <http://invam.caf.wvu.edu>.
- Jacquot, E., D. Van Tuinen, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi-Pearson (2000). "Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge." *Plant and Soil* 226: 176-188.
- Jain, R. K., K. Paliwal, R. K. Dixon and D. H. Gjerstad (1989). "Improving productivity of multipurpose trees on substandard soils in India." *J. For.* 87: 38-42.
- Jakobsen, L. and L. Rosendahl (1990). "Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants." *New Phytol* 115: 77-84.
- Janetta, K. (2001). Untersuchung zur Mykorrhizierung von Halophyten deutscher Salzmarschen und Binnensalzstellen sowie zum spezifischen Einfluß von *Paenibacillus validus* auf die Hyphenmorphologie von *Glomus intraradices* Sy167 in Co-Kultur ohne Wirtswurzel. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Johnson, D., P. Vandenkoornhuysen, J. R. Leake, L. Gilbert, R. E. Booth, G. J.P., J. P. W. Young and D. J. Read (2003). "Plant community affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms." *New Phytol* 161: 503-515.
- Juniper, S. and L. K. Abbott (1993). "Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity." *Mycorrhiza* 4: 45-57.

- Kaldorf, M. O., A. J. Kuhn, W. H. Schröder, U. Hildebrandt and H. Bothe (1999). "Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus." *J. Plant Physiol.* 154: 718-728.
- Kim, C. K. and D. J. Weber (1985). "Distribution of VA mycorrhiza on halophytes on inland salt playas." *Plant Soil* 83: 207-214.
- Kjølner, R. and S. Rosendahl (2001). "Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas." *Mycol. Res.* 9: 1027-1032.
- Kjølner, R. R. (2000). "Detection of Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism)." *Plant and Soil* 226: 189-196.
- Knolle, S. K. (2004). Untersuchung zur Entwicklung und differentiellen Genexpression von arbuskulären Mykorrhizapilzen in Abhängigkeit von den Stickstoffquellen und dem Salzgehalt in Anzuchtmedien. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Koch, M., G. Kuhn, P. Fontanillas, L. Fumagalli, J. Goudet and I. R. Sanders (2004). "High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi." *PNAS* 101(8): 2369-2374.
- Kothari, S. K., H. Marschner and V. Römhild (1991). "Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil." *Plant and Soil* 131: 177-185.
- Landwehr, M., U. Hildebrandt, P. Wilde, K. Nawrath, T. Tóth, B. Biró and B. H. (2002). "The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils." *Mycorrhiza* 12: 199-211.
- Lanfranco, L., M. Delpero and P. Bonfante (1999). "Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*." *Molecular Ecology* 8: 37-45.
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng and L. Forney (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA." *Appl Environ Microbiol.* 63(11): 4516-22.
- Lloyd-MacGilp, S. A., S. M. Chambers, J. C. Dodd, A. H. Fitter, C. Walker and J. P. W. Young (1996). "Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi." *New Phytol.* 133: 103-111.
- Manal, A. (2006). Diversität der arbuskulären Mykorrhizapilze im Boden der Salzmarsch von Terschelling und Vergleich mit der Diversität in den Wurzeln; Auswertung der Salz-SSH-Bank zur differentiellen Genexpression unter Salzstreß. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- McMillen, B. G., S. Juniper and L. K. Abbott (1998). "Inhibition of hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil containing sodium chloride limits the spread of infection from spores." *Soil Biol. Bioch.* 30: 1639-1646.
- Mummey, D. L., M. C. Rillig and W. E. Holben (2005). "Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis." *Plant and Soil* 271: 83-90.
- NCBI "National Center for Biotechnology Information." <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, P. Mäder, T. Boller and A. Wiemken (2003). "Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe." *Appl Environ Microbiol.* 69(5): 2816-2824.

- Ouziad, F. (1999). Charakterisierung der arbuskulären Mykorrhiza Pilz-Flora an ausgewählten Standorten mit molekularbiologischen Methoden. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Ouziad, F., P. Wilde, E. Schmelzer, U. Hildebrandt and H. Bothe (2006). "Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress." *Environ. Exp. Bot.* 57(1-2): 177-186.
- Page, R. D. (1996). "TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers." *Comput Appl Biosci.* 12(4): 357-358.
- Pawlowska, T. E. and J. W. Taylor (2004). "Organisation of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi." *Nature* 427: 733-737.
- Peat, H. J. and A. H. Fitter (1993). "The distribution of arbuscular mycorrhizas in the British flora." *New. Phytol.* 125: 845-854.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman (1970). "Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection." *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-168.
- Plenchette, C. and R. Duponnois (2005). "Growth response of the saltbush *Atriplex nummularia* L. to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*." *JOURNAL OF ARID ENVIRONMENTS* 61(4): 535-540.
- Porcel, R., R. Aroca, R. Azcón and Ruiz-Lozano J.M. (2006). "PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance." *Plant Molecular Biology* 60: 389-404.
- Pringle, A., J. M. Moncalvo and R. Vilgalys (2000). "High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora collosica*." *Mycologia* 92(2): 259-268.
- Puppi, G. and S. Riess (1987). "Role and ecology of VA mycorrhizae in sand dunes." *Angew. Botanik* 61: 115-126.
- Püschel, D., J. Rydlová and M. Vosátka (2007). "The development of arbuscular mycorrhiza in two simulated stages of spoil-bank succession." *Applied Soil Ecology* 35(2): 363-369.
- Raeder, U. and P. Broda (1985). "Rapid preparation of DNA from filamentous fungi." *Appl. Microbiol.* 1: 17-20.
- Redecker, D. (2000c). "Specific PCR primer to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots." *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Redecker, D., I. Hijri and A. Wiemken (2003). "Molecular Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Roots: Perspectives and Problems." *Folia Geobotanica* 38: 113-124.
- Redecker, D., R. Kodner and L. E. Graham (2000a). "Glomalean Fungi from the Ordovician." *Science* 289: 1920-1921.
- Redecker, D., H. Thierfelder, C. Walker and D. Werner (1997). "Restriction Analysis of PCR-Amplified Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA as a Tool for Species Identification in Different Genera of the Order Glomales." *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 1756-1761.
- Renker, C., V. Blanke and F. Buscot (2005). "Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant." *Environmental Pollution* 135: 255-266.

- Renker, C., J. Heinrichs, M. Kaldorf and F. Buscot (2003). "Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field." *Mycorrhiza* 13: 191-198.
- Renne, B. (1999). Untersuchung zur Mykorrhizierung von Halophyten der Insel Schiermonnikoog. Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II ggf. mit Zusatzprüfung für die Sekundarstufe I, Universität zu Köln.
- Rieth, A. (1980). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 4, Fischer, Gustav.
- Rodriguez, A., J. P. Clapp and J. C. Dodd (2004). "Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)." *Journal of Ecology* 92: 986-989.
- Rösch, C. and H. Bothe (2005). "Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes." *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 2026-35.
- Rosendahl, S. and E. H. Stukenbrock (2004). "Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences." *Molecular Ecology* 13: 3179-3186.
- Rozema, J., W. Arp, J. Van Diggelen, V. E. M., R. Broekman and H. Punte (1986). "Occurrence and ecological significance of vesicular arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment." *Acta Bot. Neerl* 35(4): 457-467.
- Ruiz-Lozano, J. M. and R. Azcón (2000). "Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity." *Mycorrhiza* 10: 137-143.
- Ruiz-Lozano, J. M., R. Azcón and M. Gómez (1996). "Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants." *Physiologia Plantarum* 98: 767-772.
- Ruotsalainen, A. L., H. Väre and M. Vestberg (2002). "Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs." *Mycorrhiza* 12: 29-36.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230: 1350-1354.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, I. R., M. Alt, K. Groppe, T. Boller and A. Wiemken (1995). "Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities." *New Phytol* 130: 419-427.
- Sanders, I. R., J. P. Clapp, A. Wiemken and (1996). "The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis." *New Phytol.* 133: 123-134.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-67.
- Scheloske, S., M. Maetz, T. Schneider, U. Hildebrandt, H. Bothe and B. Povh (2004). "Element distribution in mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of the halophyte *Aster tripolium* determined by proton induced X-ray emission." *Protoplasma* 223: 183-189.

- Schenck, N. C. and Y. Pérez (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Gainesville, Synergistic Publications.
- Schimper, A. F. W. (1898). Pflanzengeographie auf physiologischer Grundlage. Jena, Fischer Verlag.
- Schmitz, O., G. Danneberg, B. Hundeshagen, A. Klingner and H. Bothe (1991). "Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters." J. Plant Physiol. 139: 106-114.
- Schneider, C. W. (2007). "<http://www2.trincoll.edu/~cschneid/vcult.html>."
- Schüßler, A. (2004). "Das fünfte Pilz-Phylum: die Glomeromycota." Biospektrum 6: 741-742.
- Schüßler, A., H. Gehring, D. Schwarzott and C. Walker (2001b). "Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny." Mycol. Res. 105(1): 5-15.
- Schüßler, A., D. Schwarzott and C. Walker (2001a). "A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution." Mycol. Res. 105(12): 1413-1421.
- Schwarzott, D., C. Walker and A. Schüßler (2001). "*Glomus*, the Largest Genus of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales), Is Nonmonophyletic." Molecular Phylogenetics and Evolution 21(2): 190-197.
- Sengupta, A. and S. Chaudhuri (1990). "Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in pioneer salt marsh plants of the Ganges river delta in West Bengal (India)." Plant and Soil 122: 111-113.
- Shachar-Hill, Y., P. E. Pfeffer, D. Douds, S. F. Osman, L. W. Doner and R. G. Ratcliffe (1995). "Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek." Plant Physiol 108: 7-15.
- Simon, L., M. Lalonde and T. D. Bruns (1992). "Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots." Appl. Environ. Microbiol. 58: 291-295.
- Smith, S. E. and D. J. Read (1997). Mycorrhizal Symbiosis. San Diego, Californien, Academic Press.
- Solaiman, M. D. and M. Saito (1997). "Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry." New Phytol. 136: 533-538.
- Stocker, O. (1928). Das Halophytenproblem. Berlin, Springer.
- Stodden, M. (2004). Diversität arbuskulärer Mykorrhiza-Pilze einer Salzmarsch der Insel Terschelling. Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für die Lehramter für die Sekundarstufe II ggf. mit Zusatzprüfung für die Sekundarstufe I, Universität zu Köln.
- Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck and A. F. W. Schimper (1998). Lehrbuch der Botanik. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Fischer, Gustav.
- Stukenbrock, E. H. and S. Rosendahl (2005b). "Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coastal grassland." Mycorrhiza 15: 497-503.
- Taylor, T. N., W. Remy and H. Hass (1995). "Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian." Mycologia 87: 560-573.
- Tebbe, C. and W. Vahjen (1993). "Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast." Appl Environ Microbiol. 59: 2657-2665.

-
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997). "The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-82.
- Tonin, C., P. Vandenkoornhuyse, E. J. Joner, J. Strczek and C. Leyval (2001). "Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover." *Mycorrhiza* 10: 161-168.
- Toth, R., R. M. Miller, A. Jarstfer, A. Alexander and E. L. Bennet (1991). "The calculation of intraradical fungal biomass from percent colonisation in vesicular-arbuscular mycorrhizae." *Mycologia* 83: 553-558.
- Turnau, K., P. Ryszka, V. Gianinazzi-Pearson and D. Van Tuinen (2001). "Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland." *Mycorrhiza* 10: 169-174.
- Uhlmann, E., C. C. Görke, A. Petersen and F. Oberwinkler (2006). "Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia." *Journal of Arid Environments* 64: 221-237.
- Van der Heijden, M. A. G., T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders (1998b). "Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure." *Ecology* 79(6): 2082-2091.
- Van der Heijden, M. A. G., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders (1998a). "Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity." *Nature* 396: 69-72.
- Van Tuinen, D., E. Jacquot, B. Zhao, A. Gallotte and V. Gianinazzi-Pearson (1998). "Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR." *Molecular Ecology* 7: 879-887.
- Vandenkoornhuyse, P., R. Husband, T. J. Daniell, I. J. Watson, M. Duck, A. H. Fitter and J. P. W. Young (2002). "Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem." *Molecular Ecology* 11: 1555-1564.
- Vandenkoornhuyse, P., K. P. Ridgway, I. J. Watson, A. H. Fitter and J. P. W. Young (2003). "Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities." *Molecular Ecology* 12: 3085-3095.
- Viera, A. and M. G. Glenn (1990). "DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores." *Mycologia* 82: 263-267.
- Vroh Bi, I., L. Harvengt, A. Chandelier, G. Mergeai and P. Du Jardin (1996). "Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction." *Plant Breeding* 115: 205-206.
- Walker, C. and J. M. Trappe (1993). "Names and epithets in the Glomales and Endogonales." *Mycological Research* 97: 339-344.
- Weissenhorn, I. (2000). "Equipment and method for the salinization of growth substrate and in situ measurement of salt (NaCl) concentration in pot cultures." nicht publizierter Entwurf.
- Werner, D. (1987). *Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen*. Stuttgart, New York, Thieme.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. New York, Academic Press.

- Wilde, P.-. (2002). Untersuchungen zur Salztoleranz mykorrhizierter Pflanzen sowie zur Mykorrhizierung von *Thlaspi*-Arten durch arbuskuläre Mykorrhiza-Pilze. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Wirsel, S. G. R. (2004). "Homogenous stands of a wetland grass harbour diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi." *FEMS Microbiology Ecology* 48: 129-138.
- Wubet, T., M. Weiß, I. Kottke and F. Oberwinkler (2003a). "Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*)." *Can.J.Bot.* 81: 255-266.
- Zézé, A., E. Sulistyowati, K. Ophel-Keller, S. Barker and S. Smith (1997). " Intersporal Genetic Variation of *Gigaspora margarita*, a Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus, Revealed by M13 Minisatellite-Primed PCR." *Appl Environ Microbiol.* 63(2): 676-678.

7. Anhang

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bothe erstellt.

Herrn Prof. Dr. H. Bothe danke ich für die Überlassung des Themas, interessante Diskussionen und die Bereitstellung der Standort- und Pflanzenfotos.

Herrn Prof. Dr. M. Bucher möchte ich für die Übernahme des Coreferats danken.

Bei Herrn Dr. E. Sieverding bedanke ich mich für die zeitaufwändige, morphologische Charakterisierung der AM-Pilzsporen.

Für die sehr gute kollegiale Zusammenarbeit danke ich:

Stefanie Junkermann, Dr. Christopher Rösch, Dr. Ulrich Hildebrandt, Astrid Manal, Caroline Steingen, Sascha Eilmus, Dr. Fouad Ouziad, Dr. Alexander Mergel, Dr. Gudrun Boison, Sandra Knolle, Marc Stodden, Jürgen Bruns, Helena Jolkver und Emmanuelle Mounier.

Für die technische Assistenz bedanke ich mich sehr herzlich bei Stefanie Junkermann, sowie bei Karin Otto, Elisabeth Kirst und Mirela Stecki.

Der Alge *Vaucheria erythrospora* danke ich für ihre grüne, aber späte Offenbarung.
Bei Herrn Dr. K. H. Linne von Berg bedanke ich mich für die offizielle Bestätigung der grausamen Wahrheit.

Vielen Dank an alle Korrekturleser und motivierenden Seelsorger!

Des Weiteren danke ich meinen Freunden für Trost und Beistand, der PCR-Elfe, Padre Pio & all the Saints für übernatürliche Hilfe und Terry Pratchett für regelmäßige Urlaubsäquivalente auf der Scheibenwelt.

Meinen Eltern danke ich für alles.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir angefertigte Dissertation ist von Prof. Dr. Hermann Bothe betreut worden.

Köln, 20. September 2007

Petra Wilde

Teilpublikation:

Wilde, P; Manal, A.; Stodden, M.; Sieverding, E.; Hildebrandt, U.; Bothe, H. (2007);

Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in roots and soils of two salt marshes - Manuskript in Vorbereitung

GenBank Zugriffsnummern (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>):

DQ263761-DQ264150

AY955311-AY955372

EU359056-EU359269

Lebenslauf

Name: Petra Wilde
Geburtsdatum: 03. März 1974
Geburtsort: Porz am Rhein (jetzt Köln)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1980 – 1984 Peter-Petersen-Grundschule Porz-Grengel
1984 – 1993 Maximilian-Kolbe-Gymnasium Porz-Wahn
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

10/1993 - 03/2002 Biologiestudium (Diplom), Universität zu Köln
10/2000 - 02/2001 studentische Hilfskraft,
04/2001 - 07/2001 Botanisches Institut der
10/2001 - 03/2002 Universität zu Köln

seit 04/2002 Promotionsstudium Biologie, Universität zu Köln
04/2002 - 03/2006 wissenschaftliche Hilfskraft/
wissenschaftliche Mitarbeiterin,
Botanisches Institut der
Universität zu Köln

Köln, 20. September 2007
