

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock

**Molekularbiologische Untersuchungen  
zum Nachweis arbuskulärer Mykorrhizapilze  
bei Wildpflanzenpopulationen landwirtschaftlicher Nutzflächen**

Holger Geue

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Schnyder

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock  
2. Priv.-Doz. Dr. P. Schröder

Die Dissertation wurde am 2. Juli 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 11. September 2002 angenommen.

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst dann an  
interessant zu werden, wo sie aufhört.“*

Justus von Liebig (1803-1873), deutscher Chemiker,  
Begründer der Mineraldüngung in der Landwirtschaft

Meinem Lehrer



Karl Aldinger, \*15. Juni 1952, †8. Mai 1996

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Arbuskuläre Mykorrhiza.....	1
1.2	Identifizierung der arbuskulären Mykorrhizapilze.....	5
1.3	Molekularbiologische Untersuchungen bei arbuskulären Mykorrhizapilzen.....	5
1.4	Zielsetzung.....	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>7</b>
2.1	Material.....	7
2.1.1	Versuchsflächen.....	7
2.1.2	Probennahme im Freiland.....	9
2.1.3	Pflanzen.....	10
2.1.4	Arbuskuläre Mykorrhizapilze und sonstige Pilze.....	11
2.1.5	Oligonukleotidprimer.....	12
2.1.6	Enzyme.....	12
2.1.7	Reagenzien.....	13
2.1.8	Kits.....	14
2.1.9	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.10	Geräte.....	16
2.1.11	Puffer und Färbelösungen.....	17
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Aufarbeitung der Proben.....	21
2.2.2	Produktion von Referenzkulturen.....	22
2.2.3	Optimierung der DNA-Extraktion.....	23
2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	27
2.2.5	Oligonukleotidprimer.....	28
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	30
2.2.6.1	Qualitative PCR-Analyse mit universellen Primern.....	31
2.2.6.2	PCR-Analyse mit spezifischen Primern.....	33
2.2.7	Gelelektrophorese.....	34
2.2.8	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-)Analyse.....	35
2.2.9	Sequenzierung und Alignment.....	36
2.2.10	Quantitativer Nachweis.....	36
2.2.11	Bestimmung der AMF anhand der Sporenmorphologie.....	39
2.2.12	Färbung der intraradikalen Pilzstrukturen.....	40

---

2.2.13	Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades.....	41
2.2.14	Phosphatbestimmung .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Optimierung der DNA-Extraktion aus Wurzelmaterial.....	44
3.2	Untersuchung der Oligonukleotidprimer .....	45
3.2.1	Kontrolle der Amplifizierbarkeit.....	49
3.2.2	Qualitativer Nachweis von <i>A. longula</i> mit spezifischen Primern .....	50
3.2.3	Qualitativer Nachweis von <i>G. mosseae</i> in Pflanzenwurzeln.....	51
3.2.4	RFLP-Analyse der <i>G. mosseae</i> -Gruppe .....	52
3.2.5	Sequenzanalysen .....	54
3.3	Quantitativer Nachweis der AMF.....	59
3.3.1	Quantifizierung von <i>A. longula</i> mit der TaqMan <sup>®</sup> PCR .....	59
3.3.2	Quantifizierung von <i>G. mosseae</i> mit der TaqMan <sup>®</sup> PCR.....	62
3.4	Zusammenfassung der molekularbiologischen und morphologischen Ergebnisse.....	65
3.5	Bestimmung der Mykorrhizapilze anhand der Sporenmorphologie.....	68
3.6	Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades in Freilandproben.....	68
3.7	Phosphatgehalte .....	74
3.8	Zusammenhang zwischen Mykorrhizierungsgrad und Phosphatgehalt.....	79
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	DNA-Extraktion aus Wurzelmaterial.....	82
4.2	Amplifizierbarkeit.....	83
4.3	Spezifische Primer .....	84
4.4	Sequenzanalysen und RFLP.....	86
4.5	Quantifizierung mit der TaqMan <sup>®</sup> <i>real-time</i> PCR .....	86
4.6	Identifikation der Mykorrhizapilze anhand der Sporenmorphologie.....	88
4.7	Mykorrhizierung und Phosphatgehalte .....	89
4.8	Biodiversität: Arten und Individuen .....	91
4.9	Fortpflanzung und Variabilität der AMF .....	93
4.10	Phylogenetische und Systematische Neuordnung der Morphospezies.....	95
4.11	Evolution und Artenzahl der AMF .....	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>115</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stammbaum der Glomales nach morphologischen Kriterien.....	2
Abb. 2: Typische morphologische Merkmale einer <i>Glomus</i> -Art in Pflanzenwurzeln.....	2
Abb. 3: Wiese W02 mit Transsekt und den Positionen I, II und III.....	7
Abb. 4: Weide W21 mit Transsekt und den Positionen 1 bis 5. ....	8
Abb. 5: Übersicht der F.A.M.-Versuchsstation Klostergut Scheyern.....	8
Abb. 6: <i>Plantago lanceolata</i> . ....	11
Abb. 7: <i>Trifolium repens</i> .....	11
Abb. 8: <i>Holcus lanatus</i> .....	11
Abb. 9: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.....	21
Abb. 10: Anordnung der rDNA-Einheiten.....	29
Abb. 11: Hybridisierungspositionen der Oligonukleotidprimer.....	30
Abb. 12: DNA-Längenmarker <i>GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus</i> .....	35
Abb. 13: Schematische Darstellung des Prinzip der TaqMan <sup>®</sup> <i>real time</i> PCR.....	37
Abb. 14: DNA-Extrakte mit verschiedenen Zellyse-Techniken.....	45
Abb. 15: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L (1).....	50
Abb. 16: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L (2).....	50
Abb. 17: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Aclong87For-Aclong400Rev.....	51
Abb. 18: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Glmoss85For-Glmoss387Rev (1).....	52
Abb. 19: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Glmoss85For-Glmoss387Rev (2).....	52
Abb. 20: RFLP-Analyse von zehn PCR-Fragmenten der <i>G. mosseae</i> -Gruppe.....	54
Abb. 21: Ergebnis der Sequenzanalyse im Bereich der Domäne D2.....	56
Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum der <i>G. mosseae</i> -Gruppe.....	58
Abb. 23: Amplification-Plot von <i>A. longula</i> .....	60
Abb. 24: Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Ct-Wert der Kalibriergerade bei <i>A.</i> <i>longula</i> . ....	60
Abb. 25: Kontrolle der Bindung des Primers P1 an die ermittelten Sequenzabschnitte.....	62
Abb. 26: Kontrolle der Bindung der Sonde F1 an die ermittelten Sequenzabschnitte.....	63
Abb. 27: Amplification-Plot von <i>G. mosseae</i> -Standards.....	63
Abb. 28: Zusammenhang zwischen den ermittelten Ct-Werten und der eingesetzten Kopienzahl bei <i>G. mosseae</i> .....	64
Abb. 29: Sporenquetschpräparat von <i>G. mosseae</i> .....	69
Abb. 30: <i>P. lanceolata</i> -Wurzel nach Trypanblaufärbung.....	69
Abb. 31: Mykorrhizierungsraten nach Position (W02).....	72

---

Abb. 32: Mykorrhizierungsraten nach Pflanzen (W02).....	72
Abb. 33: Mykorrhizierungsraten nach Probennahmeterminen (W02).....	72
Abb. 34: Mykorrhizierungsraten nach Position (W21).....	73
Abb. 35: Mykorrhizierungsraten nach Pflanzen (W21).....	73
Abb. 36: Mykorrhizierungsraten nach Probenahmeterminen (W21).....	73
Abb. 37: Kalibriergerade der Phosphatmessung. ....	74
Abb. 38: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Position (W02).....	76
Abb. 39: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Pflanze (W02).....	76
Abb. 40: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Probennahmeterminen (W02).....	76
Abb. 41: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Position (W21).....	78
Abb. 42: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Pflanze (W21).....	78
Abb. 43: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Probenahmeterminen (W21).....	78
Abb. 44: Hyphenkolonisierung in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Bodens (W02).....	80
Abb. 45: Vesikelkolonisierung in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Bodens (W02).....	80
Abb. 46: Hyphenkolonisierung in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Bodens (W21).....	81
Abb. 47: Vesikelkolonisierung in Abhängigkeit vom Phosphatgehalt des Bodens (W21).....	81
Abb. 48: Stammbaum der Glomales nach MORTON & REDECKER (2001).....	96
Abb. 49: Stammbaum der Glomeromycota nach SCHWARZOTT <i>et al.</i> (2001). ....	98
Abb. 50: Zahl der neu beschriebenen AMF-Arten seit 1974. ....	120

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Höhenlage der Beprobungspunkte.....	9
Tab. 2: Übersicht der Beprobungstermine auf der Wiese W02 und Weide W21.....	9
Tab. 3: Schlag, Position und Pflanze der Ackerproben.....	10
Tab. 4: Stämme und Herkunft der als Referenz verwendeten AMF.....	11
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer.....	12
Tab. 6: DNA-Verdünnungsreihe für den PicoGreen <sup>®</sup> -Assay.....	27
Tab. 7: Theoretische Bindungsspezifität von Oligonukleotiden.....	28
Tab. 8: Standard PCR-Reaktionsgemisch.....	31
Tab. 9: Zusammensetzung des Master Mix A.....	32
Tab. 10: Temperaturprogramm 1 für die PCR mit den Primern A2R-B2L.....	32
Tab. 11: Größe der unterschiedlichen PCR-Produkte.....	33
Tab. 12: Zusammensetzung des Master Mix B.....	33
Tab. 13: Temperaturprogramm 2 für die PCR mit spezifischen Primern.....	34
Tab. 14: Zusammensetzung eines 1%-igen Agarose-Geles.....	34
Tab. 15: Endonukleasen und ihre Erkennungssequenz. Pfeile geben die Schnittstelle an.....	36
Tab. 16: Master Mix C für die TaqMan <sup>®</sup> PCR-Analyse.....	37
Tab. 17: Plasmid-Anzahl in der verwendeten Standardreihe.....	38
Tab. 18: Temperaturprogramm 3 für die TaqMan <sup>®</sup> PCR.....	39
Tab. 19: Pipettierschema der Kalibrierreihe zur Phosphatbestimmung.....	43
Tab. 20: Vergleich der Sequenzen spezifischer Primer mit Datenbanksequenzen.....	46
Tab. 21: Ergebnisse der „virtuellen“ PCR.....	49
Tab. 22: Abkürzungen der untersuchten Sequenzen.....	53
Tab. 23: Übersicht über die Schnittstellen des Enzyms <i>AluI</i> .....	54
Tab. 24: Sequenzhomologie mit nächstverwandten Arten.....	55
Tab. 25: Zusammenstellung der Ct-Werte der eingesetzten Standard-Verdünnungsreihe bei <i>A. longula</i> .....	61
Tab. 26: Anzahl der ermittelten Kopienzahlen bei <i>A. longula</i> .....	61
Tab. 27: Zusammenstellung der Ct-Werte der eingesetzten Standard-Verdünnungsreihe bei <i>G. mosseae</i> .....	63
Tab. 28: Anzahl der ermittelten Kopienzahlen bei <i>G. mosseae</i> .....	64
Tab. 29: Ergebnisübersicht der molekularbiologischen Untersuchungen.....	66
Tab. 30: Ergebnis der morphologischen Sporenuntersuchung.....	68
Tab. 31: Mykorrhizierung der Pflanzen auf der Wiese (W02).....	70

Tab. 32: Mykorrhizierung der Pflanzen auf der Weide (W21) ..... 71

Tab. 33: Phosphatgehalte der Wiese W02..... 75

Tab. 34: Phosphatgehalte der Weide W21 ..... 77

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Arbuskel-Kolonisierungsrate nach MCGONIGLE <i>et al.</i> (1990)
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
<i>A. longula</i>	<i>A. longula</i> BEG 8
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AMF	arbuskuläre Mykorrhizapilze ( <i>arbuscular mycorrhizal fungi</i> )
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BEG	<i>La Banque Européene des Glomales (European Bank of Glomales)</i>
bp	Basenpaar(e) ( <i>base pairs</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C	Cytosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAA	Formaldehyd-Aceto-Alkohol
F.A.M.	Forschungsverbund Agrarökosysteme München
FAM	6-Carboxyfluorescein
FeEDTA	Eisenethylendiamintetraacetat
FG	Frischgewicht
G	Guanin
h	Stunde(n)
HC	Hyphen-Kolonisierungsrate nach MCGONIGLE <i>et al.</i> (1990)
INVAM	<i>International Culture Collection of Arbuscular &amp; Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi</i>
LSU	große Untereinheit ( <i>large subunit</i> )
M	molar, Molarität (mol/L)
mg	Milligramm

---

mL	Milliliter
mM	millimolar
min	Minute(n)
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
N (bei Lösungen)	normal, Normalität
N (in Sequenzen)	Nukleosid (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin)
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PVLG	Polyvinyl-Lacto-Glycerin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	ribosomale DNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sp.	Spezies
SSU	kleine Untereinheit ( <i>small subunit</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxyltetramethylrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit(s)
v/v	Volumen pro Volumen
VAM	vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza

VC Vesikel-Kolonisierungsrate nach MCGONIGLE *et al.* (1990)  
w/v Masse pro Volumen (*weight per volume*)

# 1 Einleitung

## 1.1 Arbuskuläre Mykorrhiza

### Geschichtliches

Im Jahr 1845 entdeckten TULASNE & TULASNE Sporen der arbuskulären Mykorrhizapilze (AMF) und beschrieben die ersten beiden Arten der neu eingeführten Gattung *Glomus*: *G. microcarpum* und *G. macrocarpum*. 1885 definierte FRANK eine „auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze“ als „Mykorrhiza“. Der Name setzt sich aus den beiden altgriechischen Worten *ἵμας* (Pilz) und *ῥίζα* (Wurzel) zusammen, also „Pilzwurzel“. Es handelte sich bei dieser Form um die sogenannte Ektomykorrhiza, die bei Bäumen vorkommt. Daneben kennt man heute noch sechs weitere Formen solcher symbiotischer Zusammenschlüsse zwischen Pilzen und Pflanzenwurzeln (PETERSON & FARQUHAR, 1994). Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) ist der häufigste Typ, der auch als vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza (VAM) bezeichnet wird. Erst seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wird die AM intensiv erforscht. Seitdem erkannte man die Bedeutung der AMF für viele Pflanzen und damit den potentiellen Nutzen, vor allem für die Landwirtschaft.

### Vorkommen

Sowohl Sporen dieser Pilze als auch mykorrhizierte Pflanzen wurden in allen Klimazonen und Kontinenten unseres Planeten vorgefunden. *Glomus antarcticum* kommt sogar in der Antarktis vor (CABELLO *et al.*, 1994). Etwa 80% aller Landpflanzen sind zu dieser Symbiose befähigt (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988; BONFANTE & PEROTTO, 1995; SMITH & READ, 1997). Neben Kräutern und Gräsern können auch Bäume (z.B. *Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus*, *Betula* und *Salix*; FIEDLER, 2001), Farne (PETERSON *et al.*, 1981), Bärlappgewächse (SCHMID & OBERWINKLER, 1993) und alle Klassen der Moose (STAHL, 1949; PARKE & LINDERMAN, 1980) mit den AMF vergesellschaftet sein. Dieser enormen Zahl an Phytobionten steht eine nur geringe Zahl an Mykobionten gegenüber: bisher wurden etwa 160 verschiedene AMF-Arten anhand ihrer Sporenmorphologie beschrieben. Die zunächst der Ordnung Endogonales zugerechneten AMF wurden 1990 von MORTON & BENNY in der neuen Ordnung Glomales zusammengefasst (Abb. 1). Die modernen Methoden der Molekularbiologie, die in den letzten Jahren bahnbrechende Erkenntnisse in vielen naturwissenschaftlichen Disziplinen bescherten, wurden ebenso erfolgreich auf die AMF angewandt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind in Kapitel 4.9 zusammengefasst.



## Physiologie

Die Chlamydosporen dieser Pilze werden fast immer im Boden, selten auch in der Wurzel, asexuell gebildet. Sie beinhalten meist sichtbare Lipidtröpfchen und andere Speicherstoffe. Aus den Sporen keimen Hyphen, die, wenn sie nicht innerhalb weniger Tage auf die Wurzel eines potentiellen Pflanzenpartners stoßen, wieder absterben. Ist Kontakt mit einem Phyto-bionten hergestellt, so verdickt sich die Spitze der sogenannten *runner hyphae* und bildet an der Wurzeloberfläche ein Appressorium aus (BONFANTE-FASOLO, 1984). Wie beim Eindringen eines pathogenen Pilzes reagiert die Pflanze zunächst mit Abwehrmaßnahmen (DUMAS-GAUDOT *et al.*, 1992; FRANKEN & GNADINGER, 1994; HARRISON & DIXON, 1994). Die genauen Abläufe der komplizierten Partnerfindung sind noch nicht bekannt (GIOVANETTI *et al.*, 1996). Offenbar erkennt die Pflanze jedoch sehr bald „ihren“ Pilz, so dass dieser ungehindert eindringen kann. Die AMF bilden außerhalb der Wurzel ein feines weit verzweigtes extraradikales Myzel aus, das zur Aufnahme von Wasser und mineralischen Nährstoffen dient. Daneben bilden sie ein intraradikales Myzel im Bereich von Wurzelkortex und Epidermis aus (BONFANTE-FASOLO, 1984; Abb. 2). Der Zentralzylinder sowie das Meristem werden jedoch nie kolonisiert (GIANINAZZI, 1991).

Neben diesem interzellulären Wachstum penetrieren die Hyphen die Zellwand der Pflanzenzellen und bilden intrazellulär bäumchenförmig verzweigte Strukturen, die sogenannten Arbuskel. Diese allen Glomales-Arten gemeinsame Struktur war auch für den Mykorrhiza-Typ namensgebend. Die Plasmamembran der Pflanzenzelle bleibt bei der Ausbildung des Arbuskels unbeschädigt und legt sich über die fein verzweigten Hyphen, wobei ein neues apoplasmatisches Kompartiment entsteht, das von BONFANTE & PEROTTO (1995) als *Interface*-Kompartiment beschrieben wurde. Dies ist der Ort des Stoffaustausches: der Pilz stellt der Pflanze Phosphat und andere Mineralstoffe zur Verfügung, während die Pflanze ihn mit Kohlenhydraten versorgt. Die genauen Transportmechanismen sind noch nicht aufgeklärt (SMITH & READ, 1997). Der Pilz baut die erhaltenen Assimilate in Form der Glucose zunächst in das Disaccharid Trehalose (O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -D-Glucopyranosid) oder Glycogen um, so dass die intrazelluläre Glucose-Konzentration abgepuffert wird (SHACHAR-HILL *et al.*, 1995). Aus den Kohlenhydraten werden anschließend Lipide synthetisiert und diese zum extraradikalen Myzel transportiert (PFEFFER *et al.*, 1999). In den Wurzeln von den Vertretern der Unterordnung Glomineae können neben den Arbuskeln auch Vesikel gebildet werden, bläschenförmige Speicherorgane, in denen Lipide gespeichert werden (AMIJEE, 1989). Die Gigasporineae-Arten bilden im Unterschied zu den Glomineae extraradikale Hilfszellen aus (MORTON & BENNY, 1990). Die extraradikalen

Hyphen bilden ein verzweigtes dreidimensionales Netzwerk, mit dem die AMF ein weit größeres Volumen schneller und dichter durchdringen können, als dies der Pflanzenwurzel möglich ist. Zusätzlich verfügt der Pilz über ein abweichendes Enzymsystem, so dass er Mineralstoffe, insbesondere Phosphat mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (ALLEN *et al.*, 1981), sehr viel besser aufschließen, und diese der Pflanze zuführen kann (JAKOBSEN *et al.*, 1994).

### **Nutzen für die Landwirtschaft**

Aufgrund der verbesserten Nährstoffversorgung der Pflanze wurde den AMF in den letzten Jahren immer größere Bedeutung für eine nachhaltige Landwirtschaft beigemessen (BAREA & JEFFRIES, 1995). Neben den in zahlreichen Gewächshausversuchen demonstrierten positiven Effekten auf Wachstum, Qualität und Gesundheit der mykorrhizierten Pflanzen durch die effizientere Nährstoffausnutzung (POWELL & DANIEL, 1978) konnten auch eine erhöhte Schwermetalltoleranz (BERRECK & HASELWANDTER, 2001), Trockenresistenz (DAVIES *et al.*, 1993), eine erhöhte Resistenz gegen Phytopathogene (HOOKER *et al.*, 1994) sowie ein Einfluss auf die Zusammensetzung von Pflanzengesellschaften (VAN DER HEIJDEN, 1998a, 1998b) beobachtet werden. BETHLENFALVAY & SCHÜEPP (1994) zeigten positive Auswirkungen auf die Stabilität von landwirtschaftlich genutzten Flächen. Der gezielte Einsatz dieser Pilze in Landwirtschaft und Gartenbau liegt daher nahe, sei es zur Verringerung der Dünggaben oder zur Erhöhung der Gesundheit der Pflanzen. Weitere Einsatzgebiete sind die Begrünung von ariden Gebieten, schwermetallbelasteten Flächen oder Abraumhalden, um nur einige Beispiele zu nennen (DODD, International Institute of Biotechnology, University of Kent, mündliche Mitteilung). Mittlerweile wurden einige Firmen gegründet, die Pilzinokulum kommerziell vermarkten.

### **Diversität und Funktionalität**

Sowohl das Ausmaß als auch die Effektivität der Symbiose sind vom Genotyp der beteiligten Symbionten abhängig (JAKOBSEN 1995). Während man den AMF häufig ein unspezifisches Kolonisierungspotential nachgesagt hat (BONFANTE-FASOLO, 1984), konnten signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Arten hinsichtlich ihrer Funktionalität aufgezeigt werden (STREITWOLF-ENGEL *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite scheinen die Pflanzen eine gewisse Auswahl treffen zu können. Während die überwiegende Mehrzahl der Gräser und Kräuter und auch einige Bäume eine AM ausbilden, wurde bei den Vertretern der Brassicaceae, Chenopodiaceae und Cyperaceae bisher keine AM nachgewiesen (WEISSENHORN & FELDMANN, 1999).

## Untersuchung der AMF im Feld

Gewächshausversuche liefern einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der unterschiedlichen AMF-Arten oder -Stämme. Häufig ist jedoch ihre Anwendbarkeit auf Freilandssysteme fraglich, da sie niemals die natürlichen Umstände einer komplexen Pflanzen- (und Pilz-) gemeinschaft erklären können. Auf der anderen Seite ist es natürlich schwierig, aus dem Zusammenspiel vieler verschiedener Arten und Individuen eine Funktionalität zu erkennen, die noch dazu von vielen weiteren Faktoren, wie Bodenbeschaffenheit, Klima oder Pathogenvorkommen beeinflusst wird. Dennoch ist es wichtig, das Zusammenspiel dieser Ökosysteme zu erfassen, um daraus entscheidende Rückschlüsse ziehen zu können. Für eine Bestandsaufnahme der AMF sind eindeutige Unterscheidungs- und Identifizierungsmerkmale grundlegend.

### 1.2 Identifizierung der arbuskulären Mykorrhizapilze

Die Bestimmung der Pilzarten anhand ihrer Sporenmorphologie ist bei Freilandproben überaus schwierig und meist nur auf Gattungsebene festzustellen. Grundsätzlich muss jede Einzelspore individuell betrachtet werden, besondere Entwicklungsstadien und weitere wichtige Merkmale der Sporen können fehlen. Zudem sollte zur zweifelsfreien Bestimmung Vergleichsmaterial zur Verfügung stehen. Eine Identifizierung der AMF *in planta* ist ebenso wenig möglich (SCHÜBLER *et al.*, 2001a).

### 1.3 Molekularbiologische Untersuchungen bei arbuskulären Mykorrhizapilzen

Um das Problem der AMF-Identifizierung zu lösen, wurden molekularbiologische Methoden entwickelt. So beschrieben ROSENDAHL & SEN (1992) eine Isozym-Analyse. HAHN *et al.* (1993) entwickelten spezifische Antikörper gegen Oberflächenproteine der Sporen. Die von MULLIS *et al.* (1986) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR), eine *in vitro*-Methode, die die enzymatische Amplifikation von DNA-Sequenzabschnitten ermöglicht, wurde bald auch von zahlreichen Wissenschaftlern für die Erforschung der AMF genutzt. Ein aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammendes, thermostabiles Enzym, die *Taq* DNA Polymerase, bindet dabei monomere Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) komplementär zu einer einzelsträngigen DNA-Matrix. Als Startpunkt fungieren an den aufgetrennten Einzelsträngen Oligonukleotidprimer, die in 5' 3'-Richtung verlängert werden. Die Reaktionen werden in einem Thermo-Cycler durchgeführt, wobei die Proben während 30-40

Zyklen bei jeweils drei verschiedenen Temperaturen inkubiert werden (Saiki, 1990). Die PCR-Technik schaffte die Grundlage für zahlreiche Analysemethoden, die auch auf die AMF übertragen wurden. LANFRANCO *et al.* (1995) publizierten eine RAPD-PCR und LONGATO & BONFANTE (1997) untersuchten die Mikrosatellitenregionen mithilfe der PCR. Die überwiegende Mehrheit konzentrierte sich jedoch auf die Entwicklung von Isolat- oder Gruppen-spezifischen Primern für die PCR, und kombinierten diese Methode zum Teil mit anderen Techniken wie der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-)Analyse.

#### 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die neu gewonnenen molekularbiologischen Erkenntnisse „im Feld“ anzuwenden. Mithilfe von PCR-Techniken sollten die ansonsten nicht unterscheidbaren AMF direkt in der Wurzel nachgewiesen und zugeordnet werden. Trotz der Schwierigkeiten bei der Probenaufarbeitung und bei der Wahl geeigneter DNA-Sequenzen sollte es möglich sein, aufbauend auf der Arbeit von BÖHM (2000), mit spezifischen Oligonukleotiden einzelne Arten und Gruppen dieser Symbionten zu identifizieren. Im Mittelpunkt dieser Studie steht die Pilzart *Acaulospora longula* sowie eine Gruppe nahe verwandter Arten um *Glomus mosseae*. Neben dem Nachweis dieser Arten wurden auch molekularbiologische und histologische Quantifizierungsmethoden angewandt. Daneben wurde die Phosphatversorgung der Pflanzen berücksichtigt.

Die Untersuchungen fanden im Rahmen des Teilprojekts DI 4 (Mykorrhiza) des Forschungsverbundes Agrarökosysteme München (F.A.M.) statt. Der F.A.M. verfügt mit dem ehemaligen Kloostergut in Scheyern über eine einzigartige Versuchsfläche. Der Betrieb wurde 1990 übernommen und auf zwei unterschiedliche Bewirtschaftungsformen umgestellt: Integrierter Pflanzenbau und ökologischer Landbau. In Abstimmung mit anderen Teilprojekten wurden eine Wiese und eine Weidefläche für eine intensive Beprobung ausgewählt. Daneben fanden auch Beprobungen im Ackerland statt. Da es sich bei den arbuskulären Mykorrhizapilzen um obligate Symbionten handelt (AZCON-AGUILAR & BAREA, 1995; DELP *et al.*, 1998), konnte eine Vermehrung der Referenzstämme nur mithilfe geeigneter Wirtspflanzen stattfinden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchsflächen

Beim Schlag W02 handelt es sich um eine Wiese mit südöstlicher Hanglage (Abb. 3). Der Schlag W21 dient als Weide für Rinder und weist eine westliche Hanglage auf (Abb. 4). Aufgrund der Hanglagen war eine möglichst hohe Phosphatvarianz zu erwarten. Die Pflanzengesellschaften wurden nach SCHUBERT *et al.* (2001) bestimmt. Es handelt sich bei W02 um eine Glatthafer-Wiese (*Arrhenatherion elatioris* BRAUN), bei W21 um eine Weidelgras-Weide (*Cynosurion cristati-Lolietum perennis* BRAUN-BLANQUET & DE LEEUW) mit hohem Anteil an *Alopecurus pratensis* und *Poa trivialis*. In Abb. 5 sind die untersuchten Flächen und Beprobungspunkte in einer Übersichtskarte des Versuchsguts in Scheyern dargestellt.

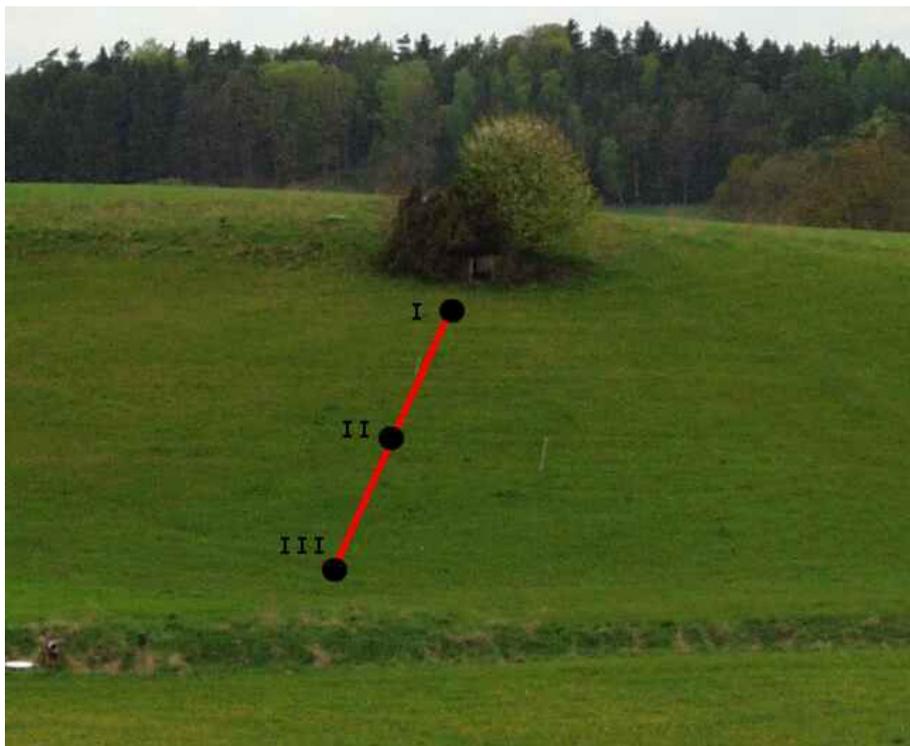


Abb. 3: Wiese W02 mit Transsekt und den Positionen I, II und III.

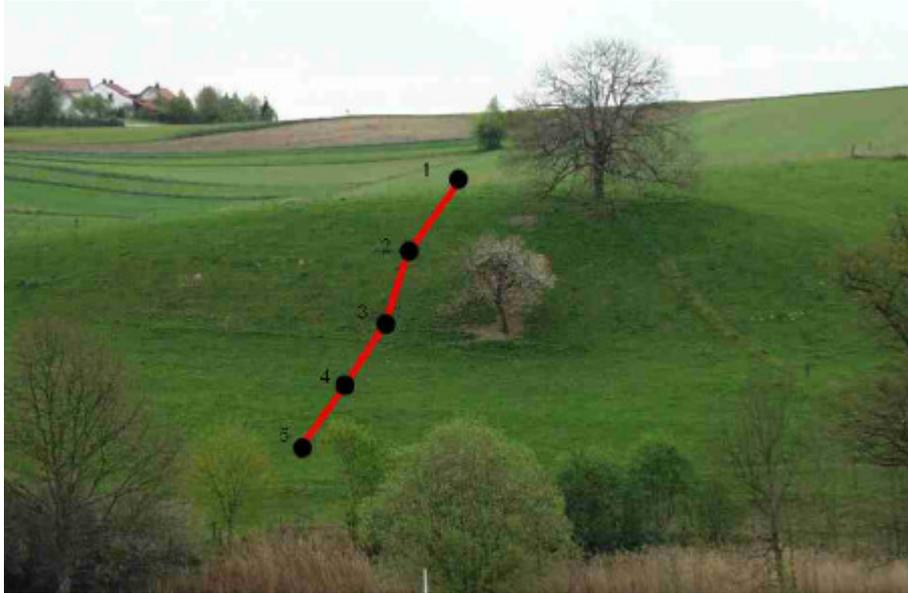


Abb. 4: Weide W21 mit Transsekt und den Positionen 1 bis 5.

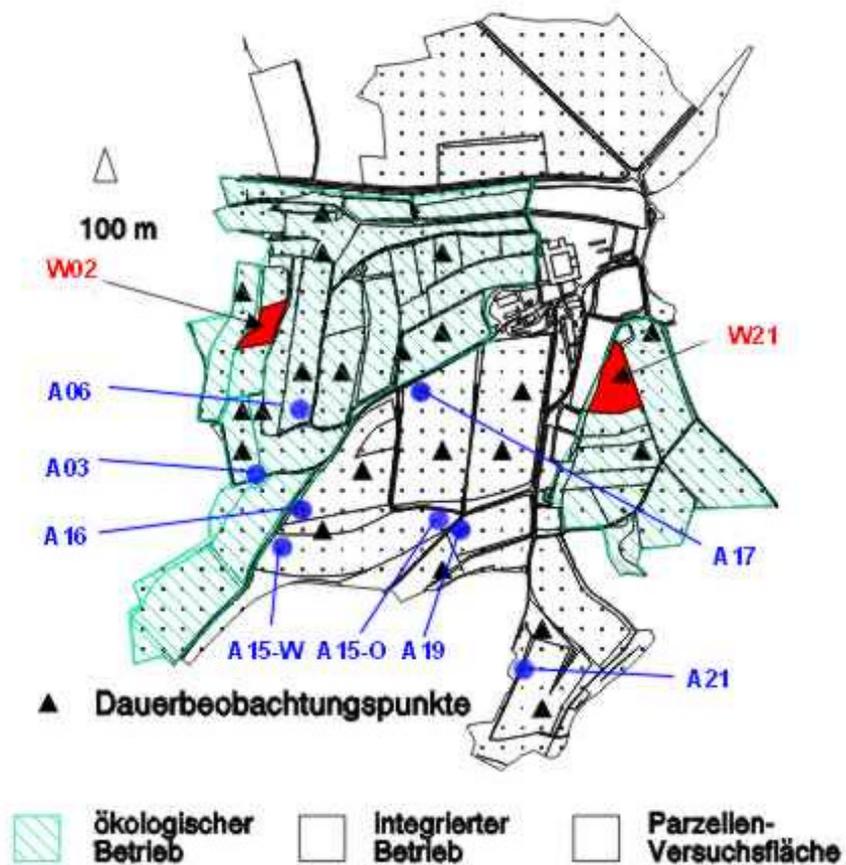


Abb. 5: Übersicht der F.A.M.-Versuchsstation Klostergut Scheyern. Markiert sind die beiden untersuchten Grünlandflächen W02 und W21. Punkte stellen die Probenahmestellen auf den Ackerflächen dar.

### 2.1.2 Probennahme im Freiland

Entlang der Hänge von W02 und W21 wurden Transsekte gelegt und auf diesen 3 bzw. 5 Beprobungspunkte mit gleichmäßigem Abstand definiert (Tab. 1).

Tab. 1: Höhenlage der Beprobungspunkte.

Position	Wiese W02	Weide W21
oben	480 m	468 m
Mitte oben		464 m
Mitte	475 m	459 m
Mitte unten		456 m
unten	470 m	453 m

An den Beprobungspunkten wurden potenzielle Wirtspflanzen mit einem Spaten ausgestochen. Dabei wurde die Pflanze samt einem würfelförmigen Wurzelballen von etwa 15 cm Kantenlänge entnommen. Die Beprobungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Jede Fläche wurde an fünf Terminen beprobt (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht der Beprobungstermine auf der Wiese W02 und Weide W21.

Termin	Beprobung W02	Beprobung W21
05.05.1999		X
10.04.2000	X	X
26.06.2000		X
01.08.2000	X	
02.10.2000	X	X
11.06.2001	X	
22.08.2001	X	X

Neben diesen beiden Grünlandflächen wurden am 27.08.2001 verschiedene Ackerflächen stichprobenhaft beprobt um einen Vergleich zwischen Grünland und Ackerland treffen zu können (Tab. 3). Die Lage der einzelnen Beprobungspunkte sind in Abb. 4 dargestellt.

Tab. 3: Schlag, Position und Pflanze der Ackerproben.

Schlag – Position	Pflanze
A06 Südost	<i>Helianthus annuus</i>
A15 West	<i>Zea mays</i>
A15 Ost	<i>Zea mays</i>
A16 West	<i>Triticum aestivum</i>
A17 Nordwest	<i>Solanum tuberosum</i>
A19 Nordwest	<i>Solanum tuberosum</i>
A21 West	<i>Triticum aestivum</i>

### 2.1.3 Pflanzen

Die AMF-Referenzkulturen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*, Blauetikett-Bornträger, Offstein) kultiviert. Dieser diente auch als Referenz bei molekularbiologischen Untersuchungen: *P. lanceolata* lässt sich leicht mit einem Großteil der Mykorrhizapilze kolonisieren und zeichnet sich durch seinen geringen Lichtbedarf und seinen niederen Wuchs aus (WALKER und VESTBERG 1994). Außerdem ist er wenig anfällig gegenüber pathogenen Pilzen. Um Inokulum lagerfähig zu machen, ist es sinnvoll, die AMF durch „Trockenfallenlassen“ zur Sporulation anzuregen und dann die Mischung aus Substrat, Sporen, Wurzel und Hyphen trocken und kühl aufzubewahren. Dazu wurde die Wasserzufuhr eingestellt, das trockene oberirdische Pflanzenmaterial abgeschnitten und das Substrat für 6 bis 8 Wochen luftgetrocknet.

Bei den Probennahmen im Freiland wurde neben Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L., Abb. 6) auch Weißklee (*Trifolium repens* L., Abb. 7) und Wolliges Honiggras (*Holcus lanatus* L., Abb. 8) untersucht. Ein wichtiges Kriterium hierbei war das Vorkommen der Wirtspflanze an allen Beprobungspunkten. Das Wollige Honiggras war auf W02 recht weit verbreitet und aufgrund seiner Behaarung in jedem Wachstumsstadium leicht zu identifizieren. Auf der Weide war die Verteilung der Grasarten sehr heterogen, so dass hier keine Monokotyle beprobt wurde. Als stickstofffixierende Pflanze wurde Weißklee ausgewählt, der ebenfalls weit verbreitet war. Allerdings musste bei der Entnahme darauf geachtet werden, die Wurzeln zu treffen, da aufgrund von Stolonenbildung weiträumig Ausläufer entwickelt wurden.

Abb. 6: *Plantago lanceolata*.Abb. 7: *Trifolium repens*.Abb. 8: *Holcus lanatus*.

#### 2.1.4 Arbuskuläre Mykorrhizapilze und sonstige Pilze

Als Referenzmaterial wurden im Gewächshaus Kulturen verschiedener AMF herangezogen. Für die Inokulation der Pflanzen wurden von Herrn Dr. Böhm in Tab. 4 aufgeführten AMF-Stämme übernommen. Pilzkulturen mit **BEG**-Nummern sind in der **Banque Européenne des Glomales** (Dijon, Frankreich) registriert.

Tab. 4: Stämme und Herkunft der als Referenz verwendeten AMF.

Mykorrhizapilz	Herkunft
<i>Acaulospora longula</i> SPAIN & SCHENCK (BEG 8)	Walker, England
<i>Entrophospora colombiana</i> SPAIN & SCHENCK (BEG 39)	Walker, England
<i>Gigaspora margarita</i> BECKER & HALL (BEG 34)	Gianinazzi-Pearson, Frankreich
<i>Gigaspora rosea</i> NICOLSON & SCHENCK (BEG 9)	Gianinazzi-Pearson, Frankreich
<i>Glomus intraradices</i> SCHENCK & SMITH (H3)	von Alten, Deutschland
<i>Glomus microaggregatum</i> KOSKE, GEMMA & OLEXIA (BEG 56)	Dodd, England
<i>Glomus mosseae</i> (NICOL. & GERD.) GERD. & TRAPPE (BEG 68)	von Alten, Deutschland

Zur Untersuchung der Spezifität von Primern für die PCR fanden der Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus* (LANGE) IMBACH) und die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae* MEYEN EX E.C. HANSEN) aus dem Lebensmittelhandel Verwendung.

### 2.1.5 Oligonukleotidprimer

Zur Bestimmung der intraradikalen AM standen die unter Tab. 5 angegebenen Primer zur Verfügung. Sämtliche Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die Sonden wurden jeweils am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) kovalent gebunden. Das 3'-Ende wurde mit dem Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxyl-Tetramethyl-Rhodamin) verknüpft und zusätzlich phosphoryliert um eine Elongation durch die Polymerase zu verhindern.

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer.

Primer	Sequenz	Referenz
VANS1	5' -GTCTAGTATAATCGTTATACAGG-3'	SIMON <i>et al.</i> , 1992
VAACAU	5' -TGATTCACCAATGGGAAACCCC-3'	SIMON <i>et al.</i> , 1993a
VAGIGA	5' -TCACCAAGGGAAACCCGAAGG-3'	SIMON <i>et al.</i> , 1993a
VAGLO	5' -CAAGGGAATCGGTTGCCCGAT-3'	SIMON <i>et al.</i> , 1993a
VALETC	5' -ATCACCAAGGTTTAGTTGGTTGC-3'	SIMON <i>et al.</i> , 1993a
A2R	5' -AGCGAACAAGTACCGTGAGGG-3'	BÖHM, 2000
B2L	5' -TAGACTCCTTGGTCCGTGTTTC-3'	BÖHM, 2000
Aclong87For	5' -AATCAACTTGATAGTATGCGGG-3'	BÖHM, 2000
Aclong400Rev	5' -TATGATCACTCCAACATCTAGATA-3'	BÖHM, 2000
Glmoss85For	5' -TTGAAGTCAGTCATACCAACGG-3'	BÖHM, 2000
Glmoss387Rev	5' -ACCGTAATACCCTAACATCATAAGC-3'	BÖHM, 2000
Aclong251For	5' -ACCATCAGAAGCCAGGTGACTAG-3'	BÖHM, 2000
Aclong338Rev	5' -TGGCTTTTCTTCGGAAAAGTGT-3'	BÖHM, 2000
AclongSonde	FAM-5' -CAATCCTCAATCCCGGTCACCACATTT-3' -TAMRA	BÖHM, 2000
P1	5' -TGCAACGGATACCCTTCAGG-3'	BÖHM <i>et al.</i> , 1999
P2	5' -AATTCGTTCTAACCTTTTGACCGTAAT-3'	BÖHM <i>et al.</i> , 1999
F1	FAM-5' -AGCAAGCTTTCAACATCAAGGCAACGTATCA-3' -TAMRA	BÖHM <i>et al.</i> , 1999

### 2.1.6 Enzyme

<i>AluI</i> Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas, ER0011
Chitinase, von <i>Streptomyces griseus</i> , 717 U/g	Sigma, C-1525
<i>HinfI</i> Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas, ER0801
<i>HpaII</i> Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas, ER0511
Protease (Proteinase K), 18,5 U/mg	Sigma, P-0390
RNase A	QIAGEN, 19101
<i>RsaI</i> Restriktionsendonuklease	MBI Fermentas, ER1121
<i>Taq</i> DNA Polymerase, nativ	MBI Fermentas, EP0071

### 2.1.7 Reagenzien

Agarose NEE0	Roth, 2267.2
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Sigma, A-7302
L-Ascorbinsäure, Natriumsalz	Sigma, A-7631
Benzylchlorid	Fluka, 13270
Borsäure	Sigma, B-6768
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, B-5525
Calciumacetat-Hydrat	Merck, 1.09325
Calciumchlorid	Fluka, 21101
Calciumlactat	Fluka, 21175
Calciumnitrat	Merck, 1.02121
Desoxynukleotide (dNTP Mix), je 10 mM	MBI Fermentas, R0192
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 1.02952
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, 1.59323
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, D0632
DNA-Erase	ICN, 821805
DNA-Längenmarker <i>20 bp DNA Ladder</i>	Biozym, 850320
DNA-Längenmarker <i>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus</i>	MBI Fermentas, SM0321
Eisenethyldiamintetraacetat (FeEDTA)	Riedel-de Haën, 03650
Essigsäure, 99-100%, reinst	Sigma-Aldrich, 27221
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, 32205
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, E-5134
Ethidiumbromid	Roth, 2218
Formaldehyd, 37%, ACS, säurefrei	Merck, 1.04003
Glycerin, 100%	Merck, 1.04092
Glyceringelatine	Merck, 1.09242
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB)	Sigma-Aldrich, H6269
Iod	Merck, 1.59192
Kaliumchlorid	Merck, 4936
Kaliumdihydrogencitrat	Fluka, 60215
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, 1.04873
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich, 60370
Kaliumiodid	Merck, 1.05051

Kaliumnitrat	Merck, 1.05063
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck, 1.59153
Ladungspuffer <i>Loading Dye Solution</i>	MBI Fermentas, R0611
Magnesiumsulfat	Merck, 1.05886
Mangan(II)chlorid	Merck, 1.05927
Methanol, ACS, absolut, acetonfrei	Sigma-Aldrich, 65543
Milchsäure	Amresco, 0349
Molybdän(VI)oxid	Merck, 1.00403
Natriumchlorid	Merck, 1.06404
Natriummethylenediamintetraacetat (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich, 27285
Nucleon PhytoPure-Harz (in Kit enthalten)	Amersham, RPN 8510
Nukleosidtriphosphate (dNTP)	MBI Fermentas, R0191
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, 81384
2-Propanol	Sigma-Aldrich, 59304
Reagent DX	Qiagen, 1011008
Rinderserumalbumin (BSA)	MBI Fermentas, B14
Salzsäure, 32%	Merck, 1.00319
Sorbinsäure	Fluka, 85510
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	J. T. Baker, 1414
Trypanblau	Sigma, T-6146
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, 1.08597
Zinksulfat	Merck, 1.08883

### 2.1.8 Kits

DNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN, 69104
PicoGreen <sup>®</sup> dsDNA Quantitation Kit	Molecular Probes, P11496
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, 28704
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Kit	ABI, 4304447

**2.1.9 Verbrauchsmaterial**

Deckgläser 22x22 mm	Roth, H874
Deckgläser 24x60 mm	Roth, H878
Duran-Flaschen, 100 mL, autoklavierbar	Fisher, 60762001
Faltenfilter 150 mm	Roth, 4799.1
Filterpipettenspitzen Safeseal-Tips, 10µL, steril	Biozym, 692150
Filterpipettenspitzen Safeseal-Tips, 10µL, steril	Biozym, 693010
Filterpipettenspitzen Safeseal-Tips, 100µL, steril	Biozym, 692066
Filterpipettenspitzen Safeseal-Tips, 1000µL, steril	Biozym, 692079
Floranid NK	BASF
Gartenvlies	Dehner, 241257
Hyperphos	LS Pflanzenernährung
Kunststofftöpfe (9 cm)	Firma Meyer 750908
Lichtdurchlässige Plastikkulturbeutel <i>Sun Bag</i> , transparent, 44x20 cm, 24 mm, 0,02 µm Filter	Sigma, B-7026
Kunstlichtfilme KODAK EPY 64T	Dinkel, 3 7260
Küvetten ½Mikro	Heiland, 370 490
Mikropistillen	Merck, 2112100
Mikrotiterplatten (F-Form)	Greiner, 655201
Objekträger, 76x26 mm	Peske, 611-710
PCR-Reaktionsgefäße Micro PCR-Tubes, flat cap, 0,2 mL	Hybaid, HB-TC-6202N
PCR-Reaktionsplatte OmniPlate 96	Hybaid, HB-TR3-MT
PCR-Reaktionsplattenabdeckung OmniPlate Lid PCR	Hybaid, HB-TR3-MTL
Probenbeutel <i>Rotilabo</i> , 20x30 cm	Roth, P283.1
Quarzsand <i>Dorsilit</i> , 0,6-1,2 mm, Nr. 7	BayWa, 430882000/1
Radigen	Terraflor
Reaktionsgefäße 1,5 mL, PP, Safe-Lock	Peske, 120-086
Seramis <sup>®</sup>	Masterfoods
Stericlin-Papierautoklavierbeutel	Medipha, 42651210
Sterilisationsklebeband	Heiland, 326 202
<i>TaqMan<sup>®</sup> 96 well reaction plate</i>	ABI, N801-0560
<i>TaqMan<sup>®</sup> optical caps</i>	ABI, N801-0935
Wolframcarbid-Kugeln, 3 mm	QIAGEN, 69997

**2.1.10 Geräte**

Analysesiebe 38, 160, 300, 500 µm	Haan
Autoklav, S-ECZ	Keller Apparatebau
Autoklav, 3870ELV	Tuttenauer
Electrophoresis Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia
Elektrophoresekammern GNA 100 und GNA 200	Pharmacia
Fluoreszenzphotometer Reader SPECTRAFluor Plus	Tecan
Gefriertrocknungsanlage Hetosicc	Pfeiffer
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific
Kamera Camag Reprostar	Polaroid
Kamera Nikon F-801s	Nikon
Mikroskop Zeiss Axioplan	Zeiss
Mikroprozessor pH-Meter pH 535, MultiCal	WTW
PCR-Cycler Primer Express	Hybaid
PCR-Cycler PCR Sprint	Hybaid
Photometer Ultrospec 4000	Pharmacia
Pipette Eppendorf Reference, 0,5-10 µL	Eppendorf
Pipette Eppendorf Reference, 10-100 µL	Eppendorf
Pipette Eppendorf Reference, 100-1000 µL	Eppendorf
Quarzglas-Präzisionsküvette SUPRASIL <sup>®</sup> , 5 mm Schichtdicke	Hellma
Schüttler, Vortex VF 2	Janke und Kunkel
Schwingmühle MM 2	Retsch
Schwingmühlen-Adapter für 5 Reaktionsgefäße	Retsch
Stereomikroskop	Zeiss
Sterilbank Clean Air CA/RE 4	Haan
Vakuumsikator	Fisher, 60462038
Wasserbad Thermostat 2761	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge	Heraeus
Zentrifuge 5403	Eppendorf

### 2.1.11 Puffer und Färbelösungen

- **Ammoniummolybdatlösung**

Ammoniumheptamolybdat  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  2,50 g

Aqua dest. 40 mL

Bei ca. 50 °C lösen; nach dem Erkalten:

Aqua dest. ad 50 mL

Die Lösung ist mehrere Wochen haltbar.

- **CAL-Vorratslösung (5x)**

Calciumlactat 77 g

Calciumacetat 39,5 g

in 600 mL heißem Wasser gelöst; nach Abkühlen:

Essigsäure ( $\tilde{n}=1,06 \text{ g/mL}$ ) 89,5 mL

Aqua dest. ad 1000 mL

- **Chitinase-Lösung (10 U/mL)**

Kaliumdihydrogenphosphat 272 mg

Calciumchlorid 2,2 mg

Chitinase (717 U/g) 14 mg

Aqua dest. ad 1000  $\mu\text{L}$

mit KOH auf pH 6,0 einstellen.

- **CTAB-Puffer (2x)**

Tris-HCl 1,2 g

Natriumchlorid 8,2 g

EDTA 744 mg

Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 2 g

DTT 200 mg

Aqua dest. ad 100 mL

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

EDTA 186,1 g

Aqua dest. ad 1000 mL

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen.

- **Extraktionspuffer (nach BAHNWEG *et al.*, 1998)**

CTAB-Puffer (2x)	100 mL
PVP	2 g

- **FAA (Formaldehyd-Aceto-Alkohol) (KORMANIK & MCGRAW, 1984)**

Formaldehyd (37%)	900 mL
Eisessig	50 mL
Ethanol (50%)	50 mL

- **Hoagland-Nährlösung für die Pflanzenanzucht**

(modifiziert nach SYLVIA & HUBELL, 1986)

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	246 mg
KNO <sub>3</sub>	152 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	147 mg
FeEDTA	11 mg
NaCl	3 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,86 mg
MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,54 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,07 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,02 mg
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,006 mg
Aqua dest.	ad 1000 mL

mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 6,5 einstellen.

- **Melzer's Reagenz für die Sporendiagnostik (KREISEL & SCHAUER, 1987)**

Iod	1,5 g
Kaliumiodid	5 g
Aqua dest.	ad 100 mL

- **PCR Puffer (10x) von MBI Fermentas**

100 mM Tris-HCl (pH 8,8)
500 mM KCl
0,8% Nonidet P40

- **Phosphat-Standardlösung**

Kaliumdihydrogenphosphat	383 mg
Aqua dest.	ad 1000 mL

Ein Milliliter entspricht 0,2 mg P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

- **Proteinase K-Stammlösung (10 U/mL)**

Proteinase K (18,5 U/mg)	0,54 mg
Aqua dest.	1000 µL

- **PVLG-Einbettungsmedium für Sporen (MORTON *et al.*, 1993)**

Milchsäure (90%)	10 mL
Glycerin	1 mL
Polyvinylalkohol	1,66 g
Aqua dest.	10 mL
KOH	pH 7,5

Aqua dest., Milchsäure und Glycerin in einer dunklen Flasche mischen, Polyvinylalkohol zugeben und im Wasserbad bei 70 - 80 °C lösen.

- **Reduktionslösung für die Phosphatbestimmung**

Ascorbinsäure	125 mg
Salzsäure (c = 10 mol/L)	5 mL
Aqua dest.	ad 10 mL

Die Lösung ist täglich frisch herzustellen.

- **Resuspensionspuffer für die CTAB-Chloroform-Extraktion**

Ammoniumacetat	77 mg
EDTA	9,3 mg
Aqua dest.	ad 100 mL

- **TBE-Puffer (5x) für die Gelelektrophorese (SAMBROOK *et al.*, 1989)**

Tris	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 mL
Aqua dest.	ad 1000 mL

- **TE-Puffer (20x)**

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7,5

- **TE-Elutionspuffer (1x)**

Tris

10,8 g

0,5 M EDTA (pH 8,0)

2 mL

Aqua dest.

ad 1000 mL

- **Trypanblau-Färbelösung (0,05 %, w/v)**

(modifiziert nach KORMANIK & MCGRAW, 1984)

Trypanblau

0,5 g

Milchsäure

875 mL

Glycerin

63 mL

Aqua dest.

ad 1000 mL

- **Waschpuffer für die CTAB-Chloroform-Extraktion**

Ammoniumacetat

77 mg

EtOH

76 mL

Aqua dest.

ad 100 mL

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufarbeitung der Proben

Die Aufarbeitung der Proben ist in Abb. 99 dargestellt. Von den Proben wurde zunächst im Labor mit einem Löffel oder Spatel anhaftender Boden entnommen, in Glaspetrischalen gegeben und im Trockenschrank bei 40 °C etwa eine Woche getrocknet. Diese Bodenproben dienen später der Phosphatmessung. Von einigen Pflanzen wurden Blattstückchen entnommen, um pilzfreies Referenzmaterial für die DNA-Extraktion zu erhalten. Bei Bedarf konnte ein weiterer Teil des anhaftenden Bodens für eine Sporenbestimmung abgetrennt werden.

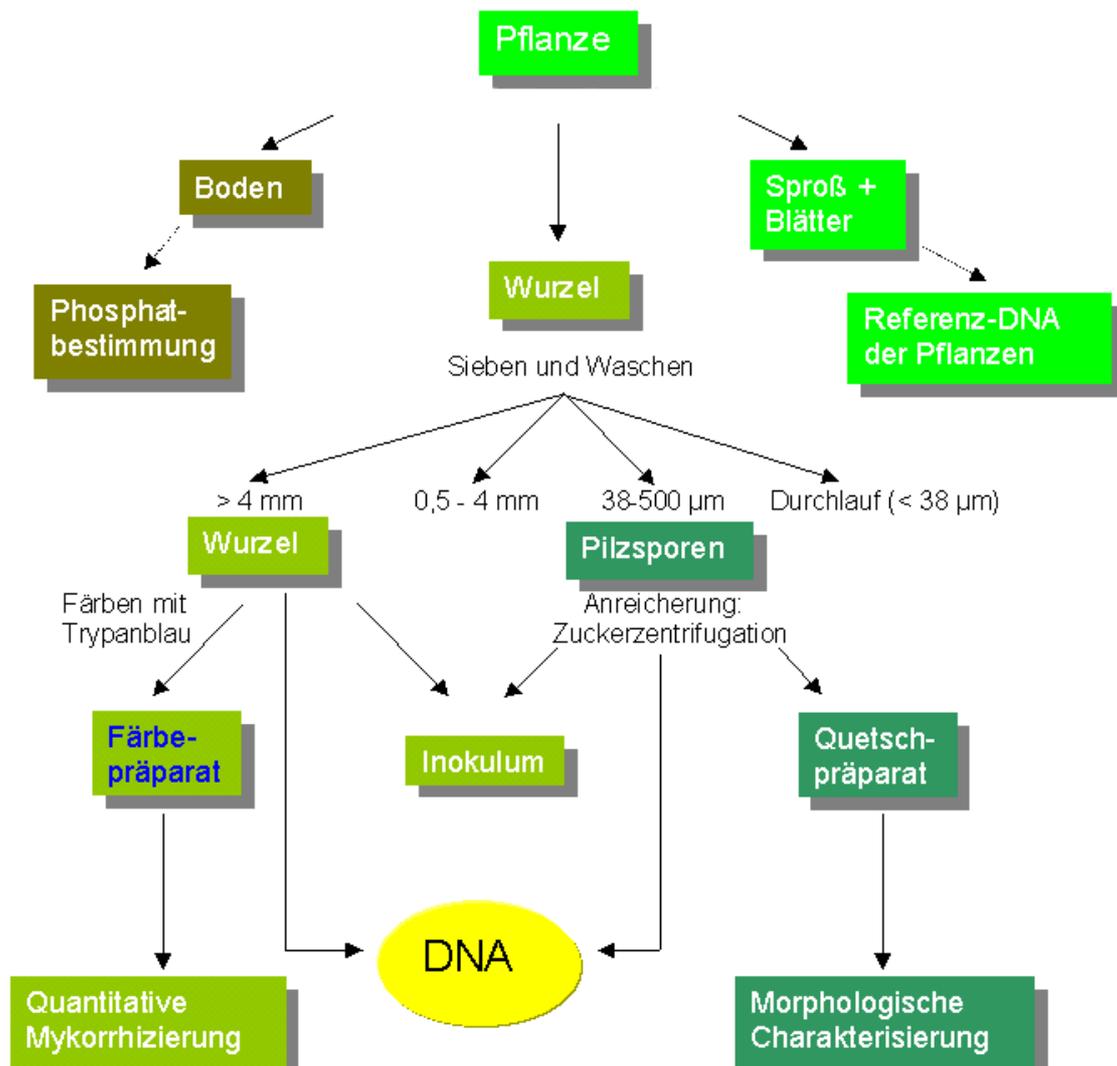


Abb. 9: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.

Der Wurzelballen wurde in Bechergläsern mit Leitungswasser versetzt und die ineinander verwachsenen Wurzeln der Versuchspflanze vorsichtig von anderen Wurzeln und anhaftender Erde getrennt. Anschließend wurde mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, bis keine Trübung des Wassers mehr eintrat. Zuletzt wurden die Wurzeln in einem Becherglas mit Aqua dest. im Ultraschallbad zweimal gereinigt, um eventuell noch anhaftende Huminstoffe zu entfernen, die bei der PCR stören würden. Die Wurzeln wurden anschließend mit einem Zellstofftuch trockengetupft. Von den gewaschenen Wurzeln wurden mehrere kleine, zufällig ausgewählte, ca. 1 cm lange Stücke abgeschnitten, mit flüssigem Stickstoff übergossen und anschließend gefriergetrocknet. Aus ihnen wurde später DNA isoliert. Wie sich im Lauf dieser Arbeit zeigte, musste die Aufarbeitung rasch erfolgen, da die DNA bereits nach 30 min durch Oxidationsprozesse degradiert sein konnte. Die restlichen Wurzeln wurden mit Trypanblau gefärbt, um die Pilzstrukturen unter dem Mikroskop quantitativ zu bestimmen.

### 2.2.2 Produktion von Referenzkulturen

Zur methodischen Entwicklung und als Referenzen wurden verschiedene Stämme von AMF kultiviert. Die Inokula wurden von Herrn Dr. Böhm zur Verfügung gestellt. Als Substrat diente ein Gemisch aus Quarzsand (Körnung 0,6-1,2 mm, Dorsilit Nr. 7) und Seramis<sup>®</sup> (1:1, v/v). Durch die Verwendung von Quarzsand lassen sich bei der Probenentnahme Wurzeln und Pilzsporen leicht vom Substrat trennen; Seramis<sup>®</sup> erhöht als Tongranulat mit hohem Feinporenanteil die Feuchtigkeit im Substrat und erleichtert dadurch die Kultur. 6,4 kg Sand und 2 kg Seramis<sup>®</sup> wurden mit etwas Aqua dest. versetzt und gemeinsam bei 121 °C und 1,3 bar für 20 min autoklaviert, um Kontaminationen zu vermeiden. Je Liter Substrat wurden 760 mg Floranid NK, 110 mg Radigen und 1,5 g Gesteinsphosphat (Hyperphos) als Grunddüngung zugefügt und gut durchmischt. Kunststofftöpfe (MR9) wurden mit Gartenvlies ausgelegt und zu etwa  $\frac{3}{4}$  mit sterilem Substrat gefüllt. Darauf wurde 30 mL Inokulum (Substrat mit AMF-Sporen und mykorrhizierten Wurzeln) gegeben und abschließend mit ca. 1 cm Quarzsand überschichtet. Samen von *P. lanceolata* wurden zur Oberflächensterilisation 20 min in 5%-ige Wasserstoffperoxidlösung gelegt und anschließend mehrmals mit Aqua dest. gewaschen. Zur Keimung wurden die Samen auf feuchte Filterpapierstücke in Petrischalen gelegt. Nach etwa einer Woche wurden jeweils drei Keimlinge in die einzelnen Töpfe pikiert. Die Töpfe wurden in Untersetzer gestellt und anschließend in Sunbags überführt und im Gewächshaus bei ca. 22 °C kultiviert (WALKER & VESTBERG, 1994). Bei den Sunbags handelt es sich um Kunststoffbeutel, die Kreuzkontaminationen verhindern, mittels eines integrierten

Mikrofilters Gasaustausch ermöglichen und die Luftfeuchtigkeit erhöhen. Die Pflanzen wurden zwei bis drei mal wöchentlich mit Aqua dest. gegossen. Zusätzlich wurde alle vier Wochen mit einer modifizierten Hoagland-Nährlösung gedüngt, die bis auf Phosphat alle Makro- und Mikronährstoffe enthält (SYLVIA & HUBBELL, 1986). Nach drei bis sechs Monaten konnten die mykorrhizierten Wurzeln geerntet werden.

Zur Kontrolle der Spezifität von Primern wurden zur Gewinnung von DNA aus Blättern und nicht-mykorrhiziertem Wurzelmaterial von Pflanzen deren oberflächen-sterilisierte Samen in Petrischalen ausgesät, mit Aqua dest. feucht gehalten und nach etwa 5 Tagen aus den entsprechenden Organen DNA extrahiert.

### 2.2.3 Optimierung der DNA-Extraktion

Um die DNA-Extraktion zu optimieren, wurden verschiedene Methoden und Protokolle getestet. Mit den folgenden Schritten sollte die genomische DNA in möglichst reiner Form und in hohen Ausbeuten aus der Zelle isoliert werden. Entscheidend war dabei die Abtrennung von Polysacchariden, Polyphenolen und (bei Wurzeln und Bodenproben) Huminsäuren, die allesamt die folgende PCR stören konnten, ohne dabei die DNA-Ausbeute zu beeinträchtigen (DEMEKE *et al.*, 1992). Neben den gängigen Methoden zur DNA-Aufreinigung bei Tieren und Mikroorganismen standen einige Modifikationen für Pflanzenmaterial sowie ein Kit der Firma QIAGEN zur Isolierung von Pflanzen-DNA (aus Blättern, jedoch nicht aus Wurzeln) zur Verfügung. BAHNWEG *et al.* (1998) und DOYLE & DOYLE (1987) beschäftigten sich speziell mit der Problematik der DNA-Extraktion aus Pflanzen.

Die vorgereinigten Wurzelstücke wurden in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, 1 mL Aqua dest. hinzugefügt und etwa 1 min in ein Ultraschallbad gestellt, um möglicherweise noch an der Oberfläche anhaftende Huminsäuren oder andere Stoffe zu entfernen. Anschließend wurden die Wurzeln in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang so lange wiederholt, bis keine Trübung mehr auftrat. Daraufhin wurden die Wurzeln auf Zellstoff getrocknet und abgewogen. Es wurden jeweils zwischen 10 und 100 mg Frischgewicht bzw. 1 bis 20 mg Trockengewicht verwendet. Als Referenzen wurden auch Blattstücke von Pflanzen oder Myzel von Pilzkulturen verwendet.

Der erste variable Schritt war der Aufschluss der Zellen, hierfür wurden verschiedene Methoden angewandt:

- sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließende Gefriertrocknung – Zellaufschluss als Lyophilisat
- sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff – Zellaufschluss in gefrorenem Zustand
- sofortiger Zellaufschluss in möglichst frischem Zustand

Das eigentliche Zerkleinern zu einem feinen Pulver erfolgte in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen:

- Zermörsern der auf wenige Millimeter vorgeschnittenen Wurzelstückchen mittels eines Mikropistills
- Zermahlen unter Zugabe von 2-4 Wolframcarbid-Kügelchen und Verwendung von zwei Adaptoren für jeweils 5 Gefäße in einer Kugelschwingmühle MM2 für ca. 5 min
- Zellyse mit einem Ultraschallstab
- Zellaufschluß mittels Ultra-Turrax

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsflächen und Geräte mit 70% Ethanol desinfiziert und autoklavierte Gefäße verwendet. Die Mikropistille wurden zunächst 2-3 h in 1 N Salzsäure auf 90 °C erhitzt und mit Aqua dest. gewaschen. Schließlich wurden sie wie Scheren und Pinzetten mit DNA-Erase behandelt, welches sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle hydrolysiert. Anschließend wurde gründlich mit Aqua dest. gewaschen und autoklaviert. Die Wolframcarbid-Kugeln besitzen aufgrund ihrer extremen Härte eine hohe Durchschlagskraft. Außerdem konnten sie aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften leicht aus den Ansätzen entfernt werden. Ihre Reinigung erfolgte durch fünfminütige Inkubation in 1 N HCl auf einem Magnetrührer und anschließendem Waschen in einem Sieb mit Aqua dest. Zur Vermeidung von Aerosolen wurden ausschließlich Filterpipettenspitzen verwendet.

### **Extraktion mit dem DNeasy Plant Mini Kit von QIAGEN**

Dieses kommerzielle System wurde entwickelt, um DNA aus oberirdischen Pflanzenteilen oder Gewebekulturen zu isolieren. Garantiert wird dabei die sichere Abtrennung der meisten PCR-Inhibitoren und die Gewinnung von qualitativ hochwertiger DNA. Das vom Hersteller QIAGEN beigefügte Protokoll wurde mit geringen Modifikationen übernommen:

Zunächst wurden dem zerkleinerten Probenmaterial 400 µL Puffer AP1 und 4 µL RNase beigefügt, mit einem Vortexer gemischt und 10 min im Wasserbad bei 65 °C inkubiert. Bei der Verwendung von frischem Probenmaterial konnten alternativ Puffer AP1 und RNase

zusammen mit 1  $\mu\text{L}$  *Reagent DX* (verhindert starkes Schäumen) bereits vor dem Mahlen mit der Kugelschwingmühle zugefügt werden (Frau Dr. Boronowsky, Fa. QIAGEN, mündliche Mitteilung). Der Puffer AP1 enthält EDTA, SDS, NaCl und Polyvinylpyrrolidon (PVP) in wässriger Lösung. EDTA bindet Magnesiumionen und andere zweiwertige Kationen, die für einige DNasen als Co-Faktoren fungieren (KOKILERA, 1995), und verhindert dadurch einen enzymatischen DNA-Abbau. SDS denaturiert Proteine und trennt somit DNA-Protein-Komplexe. NaCl hält SDS in Lösung. PVP begünstigt die Adsorption von Polyphenolen, die sonst von Phenoloxidasen zu komplexbildenden Verbindungen oxidiert würden (SAUNDERS & PARKES, 1999). Durch die RNase wird RNA verdaut, die in der PCR stören könnte. Um den Zellaufschluss und damit die gewonnene DNA-Menge noch weiter zu steigern, wurden alternativ zusätzlich jeweils 10  $\mu\text{L}$  Chitinase- und Proteinase K-Lösung zugesetzt und vor der Inkubation bei 65 °C zusätzlich 5 min bei RT bzw. 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 130  $\mu\text{L}$  Puffer AP2 hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Der Puffer AP2 enthält Kaliumacetat und Essigsäure in wässriger Lösung. Durch die Erhöhung der Ionenkonzentration präzipitieren die Proteine.

Anschließend wurde die extrahierte DNA auf eine *QIAshredder spin column* aufgetragen und durch Zentrifugieren (2 min bei 15.000 rpm) filtriert. Größere Zellbestandteile blieben dabei in dem Filter zurück, Präzipitate sammelten sich als Rückstand am Grund des Reaktionsgefäßes. Der Überstand (ca. 450  $\mu\text{L}$ ) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Dem Überstand wurden 225  $\mu\text{L}$  Puffer AP3 (enthält Guanidinium-Hydrochlorid) und 450  $\mu\text{L}$  reiner Ethanol zugesetzt. Durch Zugabe eines monovalenten Salzes und Alkohol fällt DNA spontan bei Raumtemperatur aus. Bei sehr kleinen DNA-Mengen unter 250 ng/ $\mu\text{L}$  (z.B. Extraktion aus Sporen) wurde der Ansatz 30 min bis 24 h auf -20 °C in den Gefrierschrank gestellt und zu Beginn der Extraktion 100 ng/ $\mu\text{L}$  tRNA (Poly-A) als Carrier hinzugegeben (MÜLHARDT, 2000). Die Suspension wurde auf eine *DNeasy mini spin column* aufgetragen, wobei die DNA an die Membran binden konnte und die restliche Flüssigkeit durch Zentrifugieren (1 min bei 8.000 rpm) entfernt wurden.

Durch zweimaliges Waschen mit dem Puffer AW konnten störende Stoffe wie Polyphenole oder noch vorhandene Salze des Puffer AP3 abgetrennt werden. Hierfür wurden 500  $\mu\text{L}$  Puffer AW auf die Säule aufgetragen und zunächst 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Beim zweiten Waschschrift wurde die Membran durch 2 min Zentrifugieren bei 15.000 rpm getrocknet. Der Puffer AW enthält NaCl, Tris-HCl und Ethanol.

Abschließend wurde die gereinigte DNA mit 100 µL eines auf 65 °C vorgewärmten Elutionspuffer AE (enthält Tris und EDTA) eluiert. Zur Kontrolle der verwendeten Lösungen auf DNA-Verunreinigungen wurde bei jeder Extraktion eine Extraktionskontrolle mit Aqua dest. verwendet und später in einer PCR mit Universalprimern überprüft. Der DNA-Extrakt wurde bei -20 °C gelagert.

### **CTAB-Chloroform-Extraktion (modifiziert nach DOYLE & DOYLE 1987)**

100 mg pulverisiertes Material wurde 30 min bei 60 °C mit 800 µL 2x CTAB Puffer inkubiert und anschließend mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) extrahiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 500 µL eisgekühlter 2-Propanol zugesetzt und vorsichtig gemischt. Die präzipitierte DNA wurde abzentrifugiert und zweimal 10 min mit 1 mL Waschpuffer gereinigt. Anschließend wurde die DNA abzentrifugiert, der Rückstand luftgetrocknet und danach in 100 µL Resuspensionspuffer gelöst. Der gelösten DNA wurde 1 µL RNase A zugesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit 100 µL Aqua dest. verdünnt, 100 µL 7,5 M-Ammoniumacetat zugegeben und mit 750 µL kaltem Ethanol gefällt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde bei 13.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Präzipitat luftgetrocknet und schließlich mit 100 µL TE-Puffer resuspendiert.

### **Protokoll der DNA-Extraktion (modifiziert nach BAHNWEG 1998)**

100 mg frisches Material wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gemahlen. Hierzu wurden 500 µL Methanol (50% v/v), 25 µL Calciumchlorid (20%, w/v) und 1 % (w/v) DTT auf Eis pipettiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Methanol-Calciumchlorid-Extraktion wiederholt. Danach wurde ein drittes Mal extrahiert, diesmal mit 50% (v/v) Methanol und 1% DTT (ohne CaCl<sub>2</sub>). Zum Rückstand wurden auf Eis (unter dem Abzug) 200 µL Benzylchlorid und 250 µL Extraktionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurden 150 µL gekühltes Chloroform und 50 µL *Nucleon PhytoPure*-Harz hinzugefügt, weitere 5 min bei 4 °C geschüttelt und schließlich 10 min bei 4 °C und 2.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und hierzu 150 µL Chloroform und 50 µL *Nucleon PhytoPure*-Harz pipettiert. Nach weiteren 5 min Inkubation bei 4 °C wurde abermals wie zuvor zentrifugiert. Von dem Überstand wurden vorsichtig 200 µL in ein neues Gefäß auf Eis überführt und 100 µL 2-Propanol addiert, durch vorsichtiges Drehen gemischt und weitere

10 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgten verschiedene Waschschrte bei RT mit 1) 500 µL 70%-igem Ethanol/0,1 M Natriumacetat, 2) 500 µL 80%-igem Ethanol, 3) 500 µL 100%-igem Ethanol und 4) 500 µL Chloroform. Abschließend wurde die DNA 30 min bei RT getrocknet und in 100 µL TE-Puffer gelöst.

#### 2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um das Ergebnis der Extraktionen quantitativ zu überprüfen, wurde ein Kit der Firma Molecular Probes verwendet, mit dem es möglich war, doppelsträngige DNA sehr exakt zu quantifizieren. PicoGreen<sup>®</sup> ist ein Reagenz, das hochselektiv an doppelsträngige DNA bindet. Wird es in dieser Bindung mit Licht der Wellenlänge 502 nm angeregt, so fluoresziert es mit einer Emissionswellenlänge von 523 nm. Da Fluoreszenz im Gegensatz zur Absorption sehr viel genauer gemessen werden kann, entfallen bei dieser Methode störende Faktoren wie Kontaminationen mit RNA oder Proteinen (MÜLHARDT, 2000).

Zunächst wurde die PicoGreen<sup>®</sup>-Stammlösung 1:200 mit 1x TE-Puffer verdünnt. Für die Erstellung einer Kalibrationskurve wurde von der mitgelieferten dsDNA mit TE-Puffer eine Stammlösung hergestellt (2 µg/mL). Mit dieser Stammlösung wurde eine DNA-Verdünnungsreihe hergestellt (Tab. 6). Die Lösungen wurden in Kavitäten einer 96er-Platte pipetiert, 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mit einem Fluoreszenzphotometer gemessen. Die DNA-Standards wurden jeweils dreifach gemessen, die DNA-Proben doppelt bestimmt.

Die zu messenden DNA-Proben wurden mit 1x TE-Puffer auf 100 µL verdünnt. Hierzu wurde jeweils 100 µL PicoGreen<sup>®</sup>-Lösung gegeben und weiter wie bei den Standards verfahren.

Tab. 6: DNA-Verdünnungsreihe für den PicoGreen<sup>®</sup>-Assay.

Stammlösung	1x TE-Puffer	PicoGreen <sup>®</sup> -Lösung	DNA-Konzentration
100 µL	0 µL	100 µL	1000 ng/mL
10 µL	90 µL	100 µL	100 ng/mL
1 µL	99 µL	100 µL	10 ng/mL
0,1 µL	99,9 µL	100 µL	1 ng/mL
0 µL	100 µL	100 µL	0 ng/mL

### 2.2.5 Oligonukleotidprimer

Für eine PCR werden Oligonukleotide benötigt, die den „Rahmen“ des zu amplifizierenden Genabschnitts bilden. Jedes dieser Oligonukleotide oder „Primer“ besteht aus etwa 20 Nucleotiden und bildet den Startpunkt für das Enzym DNA Polymerase. Da die DNA doppelsträngig ist, verwendet man einen Forward-Primer, dessen Basensequenz der des codogenen Stranges entspricht, und einen Reverse-Primer, dessen Basensequenz komplementär zum codogenen Strang ist. Je nach Sequenz kann man zwischen universellen Primern unterscheiden, die für ein bestimmtes Zielgen bei möglichst vielen Organismen passen, und spezifischen Primern, die diese Zielregionen nur bei einer bestimmten Gruppe von Organismen erkennt. Da in jedem Genom konservierte und variable Bereiche vorkommen, kann man die unterschiedlichen Primer entsprechend modellieren. Grundsätzlich gilt: je länger der Primer, desto spezifischer kann er sein (Tab. 7). Eine besondere Art von Primern sind die DNA-Sonden, die bis zu 30 Basen lang sein können und nicht als Startpunkt in einer PCR zum Einsatz kommen, sondern hochspezifisch eine ganz bestimmte Zielregion erkennen sollen. Diese Sonden sind meist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und können in einer quantitativen PCR eingesetzt werden.

Tab. 7: Theoretische Bindungsspezifität von Oligonukleotiden.

Oligonukleotid	Typische Basenzahl	Theoretische Spezifität
Primer	20	$1 : 4^{20} = 1 : 1,1 \cdot 10^{12}$
Sonde	25	$1 : 4^{25} = 1 : 1,1 \cdot 10^{15}$

Universelle Primer dienen in dieser Arbeit zum einen zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA (Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen) und zum anderen in sogenannten *nested* PCRs (s. Kap. 2.2.6.2). Optimal für diese Arbeit wäre ein spezifisches Primerpaar gewesen, das alle Arten der Ordnung Glomales und ausschließlich diese amplifiziert. Ein solches Primerpaar war allerdings nicht gegeben. Des Weiteren wurden Primerkombinationen verwendet, die nur bestimmte Arten oder Gruppen der Glomales erkennen konnten. Weiterhin fanden spezifische DNA-Sonden Verwendung, die hochspezifisch eingesetzt werden konnten, um die Verteilung einzelner Arten zu untersuchen.

Da von einigen Autoren bei der Entwicklung ihrer Primer nur sehr wenig Sequenzdaten zur Verfügung standen, wurde die Qualität einzelner oder kombinierter Primer hinsichtlich ihrer Spezifität mit den seither neu ermittelten Sequenzen untersucht:

- Mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden einzelne Primersequenzen eingegeben und von dem Programm mit sämtlichen verfügbaren Sequenzdaten der Datenbank verglichen.
- Mit den Sequenzen eines Primerpaares sowie der zu erwartenden Fragmentlänge (bis 1000 bp) konnte mit dem Programm FastM der Fa. Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) eine „virtuelle PCR“ durchgeführt werden. Auch hier verglich der Computer die vorhandenen Sequenzen der Datenbank mit den eingegebenen Daten und führte eine PCR *in silico* durch. Die Ergebnisse konnten später auch dazu genutzt werden, um anhand der Fragmentlänge die PCR-Produkte zu überprüfen.

Zielregion der verwendeten Primer war die ribosomale DNA (rDNA). Diese kodiert für die RNA der Ribosomen (rRNA): die große Unterinheit (large subunit, LSU, bei Pilzen meist als 25S rRNA angegeben), die kleine Untereinheit (small subunit, SSU oder 18S rRNA) sowie die 5.8S rRNA. Diese drei kodierenden Genabschnitte sind durch hochvariable Introns, die *internal transcribed spacer* (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt. In Abb. 10 sind die konservierten Bereiche der ribosomalen DNA mit den variablen Spacer-Regionen (ITS1 und ITS2) dargestellt. Eine Übersicht der Bindungsorte einzelner Primer findet sich in Abb. 11. Die rDNA wird sehr häufig für phylogenetische Studien verwendet (WHITE *et al.*, 1990), da sie einige Vorteile besitzt. An den Ribosomen findet die Proteinbiosynthese statt, deshalb muss die rDNA in allen Lebewesen vorhanden sein. Außerdem handelt es sich bei der rDNA um ein *high copy gene*; die einzelnen identischen rDNA-Einheiten sind zu Hunderten tandemförmig aneinandergereiht (ARNHEIM, 1983). Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn nur sehr wenig DNA des Zielorganismus für die Analyse vorhanden ist.

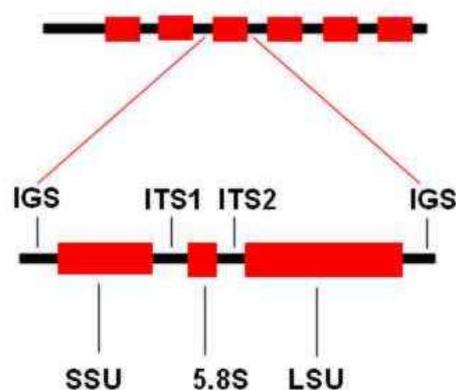


Abb. 10: Anordnung der rDNA-Einheiten. IGS: Intergenic spacer, ITS1: Internal transcribed spacer 1; ITS2: Internal transcribed spacer 2; SSU: small subunit; LSU: large subunit; 5.8S: 5.8S-Untereinheit.

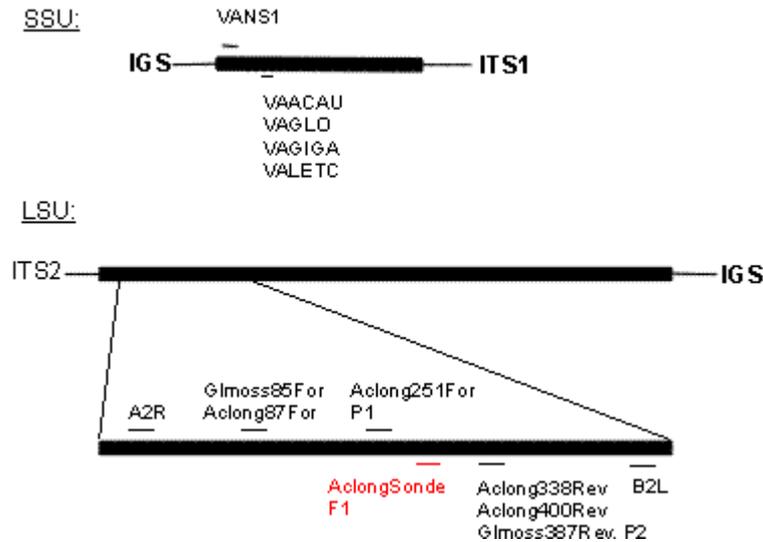


Abb. 11: Hybridisierungspositionen der Oligonukleotidprimer. IGS: Intergenic spacer; ITS1: Internal transcribed spacer 1; ITS2: Internal transcribed Spacer 2; LSU: large subunit; SSU: small subunit.

## 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Untersuchung der AMF wurden in einer PCR DNA-Fragmente der rDNA amplifiziert. Eine PCR besteht aus folgenden Einzelschritten:

### Denaturierung (95 °C)

Die doppelsträngige DNA wird dabei zunächst durch eine Erwärmung auf 95 °C aufgetrennt.

### Annealing (ca. 50 bis 60 °C)

Nach einer Temperaturabsenkung hybridisieren die Primer mit den komplementären Matrixsträngen. Die Annealing-Temperatur hängt dabei von der Länge und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide ab (je kürzer die Primer und je niedriger ihr GC-Gehalt, desto niedriger ist die optimale Hybridisierungstemperatur). Eine Absenkung der Temperatur kann zu einer erhöhten Produktausbeute führen, da die Primer leichter binden, allerdings können dabei durch unspezifische Bindungen unerwünschte Nebenprodukte entstehen.

### Elongation (72 °C)

Bei 72 °C synthetisiert die DNA Polymerase den DNA-Doppelstrang. Danach beginnt der Zyklus von neuem.

Die entstehenden Fragmente werden exponentiell vermehrt: aus einer einzigen Startkopie könnten nach 30 Zyklen rein rechnerisch  $2^{30}$ , also über eine Milliarde identische Kopien entstehen. In der Regel ebbt die Reaktion jedoch z.B. wegen Substratmangels ab (MÜLHARDT, 2000).

### 2.2.6.1 Qualitative PCR-Analyse mit universellen Primern

#### Optimierung der Reaktionsbedingungen

Für die Optimierung der PCR wurde meist ein Standard PCR-Protokoll (INNIS & GELFAND 1990) als Ausgangspunkt gewählt (Tab. 8). Variiert wurden die Konzentrationen, Polymerasen, Reaktionstemperaturen und -zeiten sowie Additiva (BSA, DMSO, Gelatine; POWELL, 1995). Hierfür wurde hauptsächlich mit *Agaricus bisporus* gearbeitet, da diese Pilz-DNA relativ leicht zu gewinnen war und in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand.

Tab. 8: Standard PCR-Reaktionsgemisch (INNIS & GELFAND, 1990).

	Stammlösung	Endkonzentration
Aqua dest.	-	-
Puffer	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 – 4 mM
dNTPs	je 1 mM	je 20 – 200 µM
Forward Primer	1 µM	0,1 – 0,5 µM
Reverse Primer	1 µM	0,1 – 0,5 µM
BSA	20 mg/mL	0,1 mg/mL
<i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/µL	1 – 2,5 U/100 µL
Template-DNA	variabel	0,1 – 1 µg/100 µL genomische DNA

#### Kontrolle der Amplifizierbarkeit

Neben der PCR-Optimierung konnte auch die Qualität der extrahierten DNA untersucht werden. Die extrahierten DNA-Proben wurden zur Kontrolle ihrer Amplifizierbarkeit in einer PCR mit unspezifischen Primern eingesetzt. Diese konnte gleichzeitig als erste PCR für eine *nested* PCR dienen. Bei der Kontrolle mit den universellen Primern A2R und B2L wurde ein Bereich der eukaryotischen 25S rDNA amplifiziert (BÖHM 2000). Zwar war die Präsenz von

Pilz-DNA in diesem Stadium noch ungewiss, doch musste die sicher vorhandene Pflanzen-DNA ein positives Ergebnis liefern. War kein Produkt erkennbar, so wurde die extrahierte DNA als nicht amplifizierbar gewertet. Umgekehrt wurde die Probe bei Erscheinen einer Pflanzen-Bande in weiteren PCRs eingesetzt.

Die Reaktionen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{L}$  Matrizen-DNA (ca. 10 ng) in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Um identische Konzentrationen für alle Proben zu gewährleisten, wurde optimierter Standard Master Mix A (Tab. 9) pipettiert und danach zu den einzelnen Proben gegeben. Das Temperaturprogramm 1 ist in Tab. 10 wiedergegeben.

Tab. 9: Zusammensetzung des Master Mix A.

	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen je 25 <math>\mu\text{L}</math>-Ansatz</b>
Wasser			17,63 $\mu\text{L}$
Puffer	10x	1x	2,5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2,5 $\mu\text{L}$
dNTPs	10 mM	0,25 mM	0,65 $\mu\text{L}$
Forward Primer A2R	100 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{L}$
Reverse Primer B2L	100 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,25 $\mu\text{L}$
Taq Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	2 U/100 $\mu\text{L}$	0,1 $\mu\text{L}$
BSA	20 mg/mL	0,1 mg/mL	0,125 $\mu\text{L}$
Master Mix A			24 $\mu\text{L}$
Template DNA	variabel	variabel	1 $\mu\text{L}$

Tab. 10: Temperaturprogramm 1 für die PCR mit den Primern A2R-B2L.

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
Initialdenaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	60 s	35 x
Annealing	55 °C	50 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

### 2.2.6.2 PCR-Analyse mit spezifischen Primern

Die mit den universellen Primern positiv getesteten DNA-Extrakte (genomische DNA) wurden anschließend mit den spezifischen Primerpaaren Glmoss85For-Glmoss387Rev und Aclong87For-Aclong400Rev analysiert. Zusätzlich wurden dabei die Produkte der ersten PCR (A2R-B2L-Fragmente) 1:100 verdünnt in einer *nested* PCR verwendet. Der Vorteil einer solchen *nested* PCR liegt darin, dass in der zweiten PCR die Matrix-DNA bereits in größeren Mengen vorliegt, und mögliche inhibierende Stoffe stark verdünnt werden. Die Längen der Amplikons sind in Tab. 11 dargestellt. Für die spezifische PCR-Analyse wurde der Master Mix B (Tab. 12) verwendet. Er enthält im Gegensatz zum Mastermix A geringere MgCl<sub>2</sub>- und Primerkonzentrationen, wodurch die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht wurde. Das verwendete Temperaturprogramm 2 ist in Tab. 13 wiedergegeben.

Tab. 11: Größe der unterschiedlichen PCR-Produkte (BÖHM, 2000).

	<i>A. longula</i>	<i>G. mosseae</i>	Pflanzen
A2R-B2L	448 bp	485 bp	ca. 320 bp
Glmoss85For-Glmoss387Rev	-	317 bp	-
Aclong87For-Aclong400Rev	273 bp	-	-

Tab. 12: Zusammensetzung des Master Mix B.

	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen je 25 µL-Ansatz
Wasser			17,98 µL
Puffer	10x	1x	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,3 mM	2,3 µL
dNTPs	10 mM	0,25 mM	0,65 µL
Forward Primer	100 µM	0,7 µM	0,175 µL
Reverse Primer	100 µM	0,7 µM	0,175 µL
Taq Polymerase	5 U/µL	2 U/100 µL	0,1 µL
BSA	20 mg/mL	0,1 mg/mL	0,125 µL
Master Mix B			24 µL
Template DNA	variabel	variabel	1 µL

Tab. 13: Temperaturprogramm 2 für die PCR mit spezifischen Primern.

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zykluszahl</b>
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	55 s	35 x
Annealing	56 °C	60 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

### 2.2.7 Gelelektrophorese

#### Elektrophoretische Auftrennung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte und die Analyse der Fragmente erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese (AGE). Zu diesem Zweck wurden 1%-ige Agarose-Gele hergestellt (Tab. 14). Die Agarose wurde dabei im Puffer aufgeschwemmt und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen auf ca. 40 bis 50 °C wurde Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung in die Gelschritten gegossen. Jeder wurde mit einem Kamm für die späteren Probenaschen versehen. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5:1 mit Probenpuffer (0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol, 60% Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt, und jeweils 10 µL in die Probenaschen pipettiert.

Tab. 14: Zusammensetzung eines 1%-igen Agarose-Geles.

<b>Reagenz</b>	<b>Kleines Gel</b>	<b>Großes Gel (20 cm x 20 cm)</b>
Agarose	0,5 g	2,5 g
5x TBE-Puffer	10 mL	50 mL
Aqua dest.	40 mL	200 mL
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	4 µL	20 µL

Die Elektrophorese erfolgte 45 min bei 120 V und maximaler Stromstärke in 1x TBE-Puffer. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wanderten dabei zur Anode. Die Auftrennung erfolgte nach ihrer Masse. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein kommerzieller DNA-Längenmarker zugegeben (Abb. 12). Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente mithilfe

des Ethidiumkations detektiert, welches zwischen zwei benachbarte Basenpaare interkaliert (KNIPPERS, 2001) und in diesem Zustand unter Anregung mit UV-Licht (366 nm) fluoresziert. Die sichtbaren Banden wurden mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

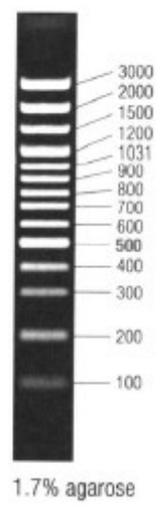


Abb. 12: DNA-Längenmarker *GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* (MBI Fermentas).

### Isolierung aufgereinigter DNA-Fragmente

Die aufgereinigten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert. Hierzu wurden die abgewogenen Gelstückchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG versetzt und die Gelstruktur durch 10 minütige Inkubation bei 50 °C aufgelöst. Anschließend wurden die herausgelösten DNA-Fragmente durch Zugabe von 2-Propanol gefällt, in eine *QIAquick spin column* überführt und bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert. Die DNA band dabei an die Säule und wurde mit 750 µL Puffer PE gewaschen, der ebenfalls abzentrifugiert wurde. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit 50 µL Puffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) eluiert.

### 2.2.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-(RFLP-)Analyse

Da das Primerpaar Glmoss85For-Glomoss387Rev nicht *G. mosseae*-spezifisch ist, sondern theoretisch auch nahe verwandte Arten amplifizieren könnte, wurden die mit diesem Primerpaar erhaltenen PCR-Produkte mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Endonukleasen) untersucht (Tab. 15). Dazu wurden zu jeweils 10 µL PCR-Produkt 2 µL Puffer Y<sup>+</sup>/Tango (wurde mit dem Enzym geliefert), 1µL Enzym (1:10 verdünnt) und 7 µL Aqua dest. gegeben,

1 h inkubiert und anschließend über eine AGE analysiert (s. Kap. 2.2.7). Je nach Vorhandensein einer bestimmten Schnittstelle ergeben sich daraus spezifische Bandenmuster.

Tab. 15: Endonukleasen und ihre Erkennungssequenz.  
Pfeile geben die Schnittstelle an.

Restriktionsenzym	Erkennungsstelle
<i>AluI</i>	AG CT
<i>Hin6I</i>	G CGC
<i>HpaII</i>	C CGG
<i>RsaI</i>	GT AC

### 2.2.9 Sequenzierung und Alignment

Die Sequenzanalysen der DNA-Fragmente wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit verschiedenen bekannten Sequenzen einer Datenbank (NCBI) mithilfe des Programms BioEdit verglichen und ihre phylogenetische Verwandtschaft analysiert.

### 2.2.10 Quantitativer Nachweis

Die *real-time* PCR (HEID *et al.*, 1996) dient der quantitativen Analyse bestimmter Genabschnitte, die auf dem Prinzip der 5'-Nuklease-Aktivität (HOLLAND *et al.*, 1991) einiger DNA Polymerasen beruht. Bei der TaqMan<sup>®</sup> PCR wird neben den beiden Primern eine spezifische Sonde eingesetzt, bestehend aus einem Oligonukleotid (gewöhnlich aus 15 bis 30 Basen), einem fluorogenen Reporter-Farbstoff (Fluorescein-Derivat) am 5'-Ende und einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende, das zusätzlich durch einen Phosphatrest blockiert ist (LEE *et al.*, 1993). Während der Reaktion wird bei jedem Zyklus die Fluoreszenz durch Anregungen mit Licht der Wellenlänge von 488 nm gemessen. Bei der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes durch einen Energie-Transfer zum räumlich nahegelegenen Quencher-Farbstoff verhindert (Abb. 13). Ist ein amplifizierbares Target vorhanden, so hybridisiert die Sonde mit dem komplementären Matrizenstrang und wird während der Extensionsphase durch die 5' 3'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase abgebaut. Da durch diese Hydrolyse Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt werden, steigt die Fluoreszenz entsprechend an und wird von einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgesetzt.

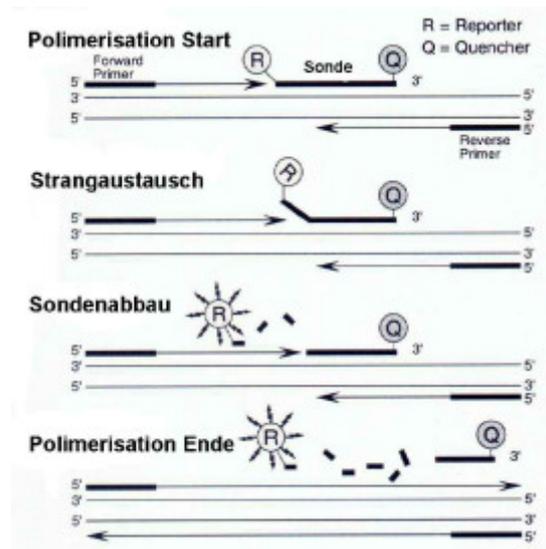


Abb. 13: Schematische Darstellung des Prinzips der TaqMan<sup>®</sup> *real time* PCR. Die Sonde wird durch die 5' 3'-Exonukleaseaktivität der DNA Polymerase abgebaut. Der dabei freiwerdende Reporterfarbstoff (R) emittiert ein Fluoreszenzsignal. Quelle: HEID *et al.* 1996

Für *G. mosseae* und *Acaulspora longula* wurden die Primer P1 und P2 (BÖHM *et al.*, 1999) bzw. Aclong251For und Aclong338Rev (BÖHM, 2000) eingesetzt, die eine möglichst geringe Amplikonlänge gewährleisten (SNIDER, 1999). Als Sonden wurden die Oligonukleotide AclongSonde und F1 eingesetzt (BÖHM, 2000; BÖHM *et al.*, 1999).

Tab. 16: Master Mix C für die TaqMan<sup>®</sup> PCR-Analyse.

	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen je 50 µL-Ansatz
TaqMan <sup>®</sup> Universal Master Mix	2x	1x	25 µL
Sonde	2 µM	200 nM	5 µL
Forward Primer	3 µM	300 nM	5 µL
Reverse Primer	3 µM	300 nM	5 µL
<b>Master Mix C</b>	3 µM	300 nM	40 µL
Template-DNA / Standards / <i>No Template Control</i> (NTC)	variabel	variabel	10 µL

Die TaqMan<sup>®</sup> PCR wurde in einem *ABI Prism 7700 Sequence Detector* durchgeführt. In einer 96er-Reaktionsplatte wurden jeweils 10 µL Probe, Standard oder *no template control* (NTC) pipettiert und 40 µL Master Mix C (Tab. 16) zugesetzt. Die Proben (genomische DNA) wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Als NTC wurde Aqua dest. verwendet. Der Standard wurde von Frau Dr. Lux-Endrich zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um mit dem Primerpaar A2R-B2L amplifizierte PCR-Produkte von *G. mosseae* und *A. longula*, die in den Vektor pT7Blue kloniert und mit dem QIAGEN Plasmid Extraction Kit extrahiert wurden. Die Stammlösungen enthielten  $1,7 \cdot 10^9$  (*G. mosseae*) und  $2 \cdot 10^8$  (*A. longula*) Plasmide je µL. Für eine Kalibrationsgerade wurde von der Stammlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tab. 17), um daraus die unbekannte DNA-Menge der Proben bestimmen zu können. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei Wiederholungen pipettiert. Die Kavitäten wurden mit optischen Deckeln verschlossen.

Tab. 17: Plasmid-Anzahl in der verwendeten Standardreihe.

Verdünnung	Kopien-Anzahl ( <i>G. mosseae</i> )	Kopien-Anzahl ( <i>A. longula</i> )
1:10 <sup>2</sup>	$1,7 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$
1:10 <sup>3</sup>	$1,7 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$
1:10 <sup>4</sup>	$1,7 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$
1:10 <sup>5</sup>	$1,7 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$
1:10 <sup>6</sup>	$1,7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$
1:10 <sup>7</sup>	$1,7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$

Der TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems enthält die AmpliTaq Gold Polymerase, Uracil DNA-Glycosylase (AmpErase UNG), Nukleotide (wobei dTTP durch dUTP ersetzt ist) und ROX als passiven Referenzfarbstoff, mit dem die Variabilität in der Fluoreszenz zwischen den einzelnen Reaktionen ausgeglichen werden (SCHILD, 1996). Zunächst wurde bei 50 °C inkubiert, wobei mögliche *carry-over*-Kontaminationen durch die Uracil DNA-Glycosylase abgebaut werden (weshalb dUTP statt dTTP verwendet wird). AmpliTaq Gold Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv und wird erst durch 10-minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert. Sie besitzt dann dieselben Eigenschaften wie die *Taq* DNA Polymerase. Da die AmpliTaq Gold-Polymerase schon bei 60 °C aktiv ist, können der Annealing- und Syntheseschritt zusammengefasst werden und die quantitative Bestimmung in einer Zwei-Schritt-PCR durchgeführt werden (Tab. 18). Einerseits bewirkt die erhöhte Annealing-

temperatur eine höhere Spezifität, zum anderen erfolgt die Hydrolyse der Sonde bei 60 °C effektiver als bei 72 °C (SCHILD, 1996).

Tab. 18: Temperaturprogramm 3 für die TaqMan® PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Carry-over-Verdau	50 °C	2 min	1 x
Denaturierung und Polymerase-Aktivierung	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 s	40 x
Annealing und Elongation	60 °C	60 s	

Entscheidend für die Quantifizierung ist der jeweilige Ct-Wert einer Probe. Dieser Wert gibt die Zykluszahl an, bei der das Fluoreszenz-Signal erstmals einen bestimmten Schwellenwert signifikant überschreitet. Je höher die Startkopienzahl, desto geringer der Ct-Wert. Aus den Ct-Werten der Standardreihe wurde eine Quantifizierungskurve erstellt und daraus durch Interpolation die jeweilige Startkopienzahl der Proben ermittelt.

Die Effizienz der PCR läßt sich ebenfalls über die Ct-Werte der Standardreihe ermitteln. Hierzu werden die Kopienzahlen halblogarithmisch gegen ihre Ct-Werte aufgetragen und die Steigung  $m$  ermittelt. Die Effizienz kann mit folgender Gleichung errechnet werden (HIGUCHI & WATSON, 1999):

$$\text{Effizienz} = 10^{-1/m} - 1; \quad m: \text{Steigung der Geraden}$$

Da sich die Kopienzahl je Zyklus theoretisch verdoppelt müsste bei zehnfacher Kopienzahl und 100%-iger Effizienz der Ct-Wert um 3,322 niedriger sein.

### 2.2.11 Bestimmung der arbuskulären Mykorrhizapilze anhand der Sporenmorphologie

Mithilfe der Sporenmorphologie kann eine Charakterisierung der AMF vorgenommen werden. Dieses Kriterium wurde ursprünglich zur Arteneinteilung benutzt. In der Regel werden dabei mehrere Dutzend Sporen einer Pilzkultur untersucht, da wichtige Merkmale wie Größe oder Farbe variieren können. Diese Methode wurde angewandt, um die Referenzkulturen zu

kontrollieren. Außerdem wurden in einem Vorversuch Bodenproben auf Sporen untersucht, wobei jede Spore individuell bewertet wurde.

Für die Isolierung der Sporen wurden 2-3 Teelöffel Substrat bzw. Bodenprobe entnommen und in einem Becherglas mit Aqua dest. aufgeschwemmt. Nach der Nass-Siebmethode (GERDEMANN & NICOLSON, 1963) wurden die Proben dann unter einem Wasserstrahl über Siebe mit unterschiedlichen Porengrößen (5 mm, 500  $\mu\text{m}$  und 38  $\mu\text{m}$ ) in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Die Sporen befanden sich zusammen mit Wurzelbruchstücken, Steinchen und anderem Material im Sieb mit der geringsten Maschenweite. Um die stark mit Fremdmaterial durchmischten Sporen der Bodenproben weiter aufzureinigen wurden diese mit Aqua dest. zentrifugiert (10 min, 2.000 rpm), der Überstand verworfen, der Rückstand mit 45% (w/v) Saccharoselösung aufgeschlemmt und nochmals 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert (DANIELS & SKIPPER, 1984). Die Sporen blieben dabei aufgrund ihrer Dichte in der Saccharoselösung. Diese wurde in das 38  $\mu\text{m}$ -Sieb geschüttet und mit Aqua dest. nachgespült. Anschließend wurden die Sporen mit einem kleinen Volumen Aqua dest. in eine Glas-Petrischale gespült und unter einem Stereomikroskop aussortiert. Mit einer Pipette wurden die Sporen auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas fixiert. Zur Identifizierung wurden sie in Polyvinylalkohol-Lacto-Glycerin (PVLG) und PVLG/Melzer's Reagenz (1:1, v/v) eingebettet (KREISEL & SCHAUER, 1987; MORTON, 1995). Durch leichten Druck auf das Deckglas wurden die Sporen aufgebrochen, um die Sporenwanddicke und den Sporenwandaufbau im Mikroskop untersuchen zu können. Weiterhin wurde ihre Form, Größe, Farbe und Färbung durch Melzer's Reagenz bonitiert und mit Bestimmungshilfen (SCHENCK & PÉREZ, 1990; INVAM) eine Kontrolle bzw. Artbestimmung durchgeführt.

### 2.2.12 Färbung der intraradikalen Pilzstrukturen

Um den Umfang der Kolonisierung der Pflanzenwurzeln durch AMF festzustellen, wurden die intraradikalen Pilzstrukturen in den gereinigten Wurzeln mit Trypanblau angefärbt (modifiziert nach KORMANIK & MCGRAW, 1984). Da die Wurzeln der drei untersuchten Pflanzen unterschiedlich empfindlich gegenüber Kochen und Bleichen reagierten, musste das Protokoll je nach Pflanze geändert werden.

Die Wurzeln wurden zunächst zur leichteren Handhabung in ein Vlies eingewickelt und an den beiden Enden mit Büroklammern zugeheftet. Die Proben wurden einzeln in Flaschen mit 10%iger Kaliumhydroxid-Lösung überführt und in einem Tischautoklaven auf 121 °C erhitzt (*H. lanatus* nur auf 80 °C, da sich sonst die Cortezellen ablösen). Durch das Kochen

in KOH wurde das Cytoplasma entfärbt. Nach Erreichen der Temperatur wurde langsam abgekühlt und anschließend die gelblich gefärbte Lauge zweimal durch jeweils einminütiges Waschen mit Aqua dest. entfernt.

Um eine bessere Färbung zu erzielen, wurde 3 min in einer 1%igen HCl-Lösung angesäuert. Anschließend wurden die Probenpäckchen in Trypanblau-Färbelösung überführt und erneut für 5 min auf 121 °C erhitzt (*H. lanatus* 5 min auf 80 °C). Nach dem Abkühlen wurden die Probenpäckchen mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, bis keine Blaufärbung mehr auftrat. Danach wurden die Klammern an den Seiten abgeschnitten und die Wurzeln aus dem Vlies befreit. Die Wurzeln wurden dann auf Objektträger aufgezogen, in Kaisers Glyceringelatine eingebettet und mit einem Deckglas unter leichtem Druck fixiert.

### 2.2.13 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Die Auswertung wurde mit einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioplan) bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte über einen Fotoaufsatz mit einer Spiegelreflexkamera (Nikon F-801s). Für die Analyse der Mykorrhizierung wurden verschiedenste Protokolle entwickelt. In dieser Arbeit wurde die *Magnified Intersection*-Methode angewandt (MCGONIGLE *et al.*, 1990).

Hierbei wurden die einzelnen Objektträger bei 200-facher Vergrößerung schlangelinienförmig bewegt: zunächst an einem Ende beginnend vertikal; war das Ende erreicht, so konnten die Objektträger anhand der Skala auf dem Objektträgertisch um 0,5 cm horizontal verschoben werden und vertikal in entgegengesetzter Richtung abgesucht werden. War das Ende abermals erreicht, so wurde wieder um 0,5 cm horizontal verschoben und vertikal abgesucht, so lange bis das horizontale Ende erreicht war. Wurde dabei mit dem Fadenkreuz des Okulars ein Wurzelabschnitt getroffen, so wurde notiert, ob dieser Hyphen, Vesikel oder Arbuskel enthielt. Pro Stichprobe wurden durchschnittlich etwa fünfzig solcher Schnittpunkte bewertet. Wurzeln ohne Cortex wurden nicht bonitiert. Durch Bildung der Summe von Schnittpunkten mit Arbuskeln, Vesikeln, Hyphen und nicht-mykorrhizierten Wurzelabschnitten konnte die Hyphen-Kolonisierungsrate HC, Kolonisierungsrate mit Arbuskeln (AC) und Kolonisationsrate mit Vesikeln (VC) berechnet werden:

$$AC = \frac{\sum \text{Arbuskel}}{\sum \text{Wurzelabschnitte}}$$

$$VC = \frac{\sum \text{Vesikel}}{\sum \text{Wurzelabschnitte}}$$

$$HC = \frac{\sum \text{Hyphen}}{\sum \text{Wurzelabschnitte}}$$

Allerdings wiesen bereits MCGONIGLE *et al.* (1990) darauf hin, dass durch Trypanblau auch Hyphen phytopathogener Pilze gefärbt sein können. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal sind hierbei die unseptierten Hyphen der arbuskulären Mykorrhizapilze.

#### 2.2.14 Phosphatbestimmung

Für die Bestimmung des Phosphatgehalts in Bodenproben existieren zahlreiche Protokolle. Hier wurde die CAL-Methode verwendet, bei der ein saurer, auf pH 4,1 gepufferter Calcium-Acetat-Lactat (CAL)-Auszug hergestellt und anschließend photometrisch bestimmt wird. Die CAL-Methode wird als Maß für die „pflanzenverfügbare Phosphatmenge“ definiert. Von den im Boden zahlreichen Phosphatverbindungen werden hierbei diejenigen berücksichtigt, die entweder leicht wasserlöslich sind, oder durch die Enzyme der Pflanzen zusätzlich aufgeschlossen werden können. Im Unterschied zum Gesamtphosphatgehalt werden die – auch für Pflanzen - schwerlöslichen Phosphate nicht berücksichtigt (Hoffmann, 1991). Das Protokoll wurde auf Mikromaßstab reduziert, sowie die gemessene Wellenlänge auf das Absorptionsmaximum festgelegt.

Die getrockneten Bodenproben wurden mit einem Löffel durch ein feines Metallsieb (Maschenweite 2 mm) gedrückt und eventuell beigemischtes Pflanzenmaterial entfernt. Von dem homogenen Pulver wurde ca. 1000 mg genau eingewogen, in einem 100 mL Erlenmeyer-Kolben mit 20 mL CAL-Gebrauchslösung versetzt, und 90 min auf einem Horizontalschüttler mit 140 rpm geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und dabei die ersten 1-2 mL des Filtrats verworfen.

Für die Messung wurden ein UV/VIS-Photometer sowie 10 mm-Kunststoffküvetten verwendet. Als Reagenzienblindwert wurden 500 µL CAL-Gebrauchslösung, 750 µL Wasser, 50 µL Molybdatreagenz und 50 µL Reduktionslösung in eine Küvette pipettiert und der

Blindwert am Photometer eingestellt. Mithilfe eines Phosphatstandards wurde eine Kalibrierreihe aufgestellt (Tab. 19).

Phosphationen bilden im Sauren mit Ammoniumheptamolybdat gelbe Phosphormolybdänsäure  $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$ , die anschließend durch Ascorbinsäure zu Molybdänblau reduziert wird. Unter Molybdänblau versteht man Molybdän-Mischoxide der Wertigkeit Mo(IV) und Mo(VI) (HOLLEMANN & WIBERG, 1985). Zunächst wurde eine Absorptionskurve aufgenommen. Die Messung erfolgte dann bei 850 nm, dem Absorptionsmaximum von Molybdänblau, mit Dreifach- oder später Doppelbestimmungen.

Von den Filtraten der einzelnen Bodenproben wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  mit 750  $\mu\text{L}$  Aqua dest., 50  $\mu\text{L}$  Molybdatlösung und 50  $\mu\text{L}$  Reduktionslösung in eine 10 mm-Küvette pipettiert, gemischt und nach ca. 10 min bei 850 nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Alle Proben wurden mindestens doppelt bestimmt. Lag der Absorptionswert über 1, wurde entsprechend verdünnt. Die Gehalte werden gewöhnlich in Phosphor (mg P/kg Boden), Phosphat (mg  $\text{PO}_4^{3-}/100$  g Boden) oder wie in dieser Arbeit als Phosphor(V)-Oxid<sup>1</sup> angegeben (mg  $\text{P}_4\text{O}_{10}/100$  g Boden).

Tab. 19: Pipettierschema der Kalibrierreihe zur Phosphatbestimmung.

<b>Standard (mg <math>\text{P}_4\text{O}_{10}/100</math> g Boden)</b>	<b>0</b>	<b>0,8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>28</b>
Phosphatstandardlösung ( $\mu\text{L}$ )	0	1	2,5	5	10	15	20	25	30	35
CAL-Gebrauchslösung ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Molybdatreagenz ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Reduktionslösung ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Aqua dest. ( $\mu\text{L}$ )	750	749	748	745	740	735	730	725	720	715

<sup>1</sup> Phosphor(V)-Oxid wird häufig als  $\text{P}_2\text{O}_5$  angegeben (FINCK, 1991). Hier wird die korrekte Form  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  benutzt.

### 3 Ergebnisse

Die Bonitierung der AMF *in radix* mit molekularbiologischen und „klassischen“ Experimenten hatte zum Ziel, die Verteilung und Häufigkeit einzelner AMF-Arten bei bestimmten Pflanzen im Freiland zu bestimmen. Neben dem qualitativen Nachweis einzelner Arten wurden zusätzliche quantifizierende Analysen durchgeführt, die Aufschluss über die Rolle der AMF bei der Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen geben sollten.

#### 3.1 Optimierung der DNA-Extraktion aus Wurzelmaterial

Zunächst war es nicht möglich gewesen, trotz scheinbar ausreichender Mengen an DNA und diverser Optimierungsversuche, reproduzierbare PCR-Ergebnisse zu erhalten. Die Vermutung lag nahe, dass das Problem an der DNA-Extraktion liegen könnte. Verdünnungsreihen, die zum Ziel hatten, inhibierende Substanzen wie Polysaccharide soweit zu verdünnen, dass sie keine negativen Effekte mehr auf das Ergebnis gehabt hätten, scheiterten ebenfalls. Polyphenole können bei einer Zerstörung der Zelle, zum Beispiel durch Austrocknung, in kürzester Zeit durch Phenoloxidasen und Peroxidasen oxidiert werden, dabei Radikale bilden und im schlimmsten Fall an die DNA binden (ABU AL-SOUD & RADSTRÖM, 1988). Diese wäre dann in der PCR von der Polymerase nicht mehr „lesbar“. Das Ziel der Extraktionsoptimierung war daher, die DNA so schnell wie möglich zu isolieren, bevor sie durch Radikale angegriffen wurde. Hierzu wurden drei verschiedene Methoden getestet. Die Extraktion nach DOYLE & DOYLE (1987) war für DNA aus Pflanzenmaterial entwickelt worden. BAHNWEIG (1998) hatte eine Methode für schwieriges Material, wie Wurzeln entwickelt. Daneben stand der DNeasy Plant Mini Kit zur Verfügung, der ebenfalls für Pflanzenmaterial entwickelt worden war.

Darüber hinaus wurden verschiedene Möglichkeiten der Zellyse variiert (Abb. 14). Die Extrakte wurden mithilfe eines Agarose-Gels analysiert und ihr DNA-Gehalt mit dem PicoGreen<sup>®</sup> Assay bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei der Methode mit dem Ultraschallstab zwar relativ viel DNA gewonnen werden konnte (über 60 µg/mL, Abb. 14, Spuren 1 und 2), die DNA jedoch durch die starken Scherkräfte fragmentiert wurde. Das Zermösern mit einem Micropistill brachte sehr geringe Ausbeuten (8 µg/mL, Spur 6), ebenso der Aufschluss mit einem Ultra-Turrax (6 µg/mL, Spur 7). Die Extraktion mit dem QIAGEN-Kit in Kombination mit der Schwingmühle brachte die besten Ergebnisse: relativ hohe Ausbeuten (40 µg/mL, Spur 3) bei geringer Degradation. Noch höhere Ausbeuten ließen sich durch Inkubation mit Protease und Chitinase bei 25 °C bzw. 37 °C erzielen (62 und 71 µg/mL, Spuren 4 und 5). Allerdings wurde die DNA durch die erhöhte Temperatur etwas stärker degradiert.

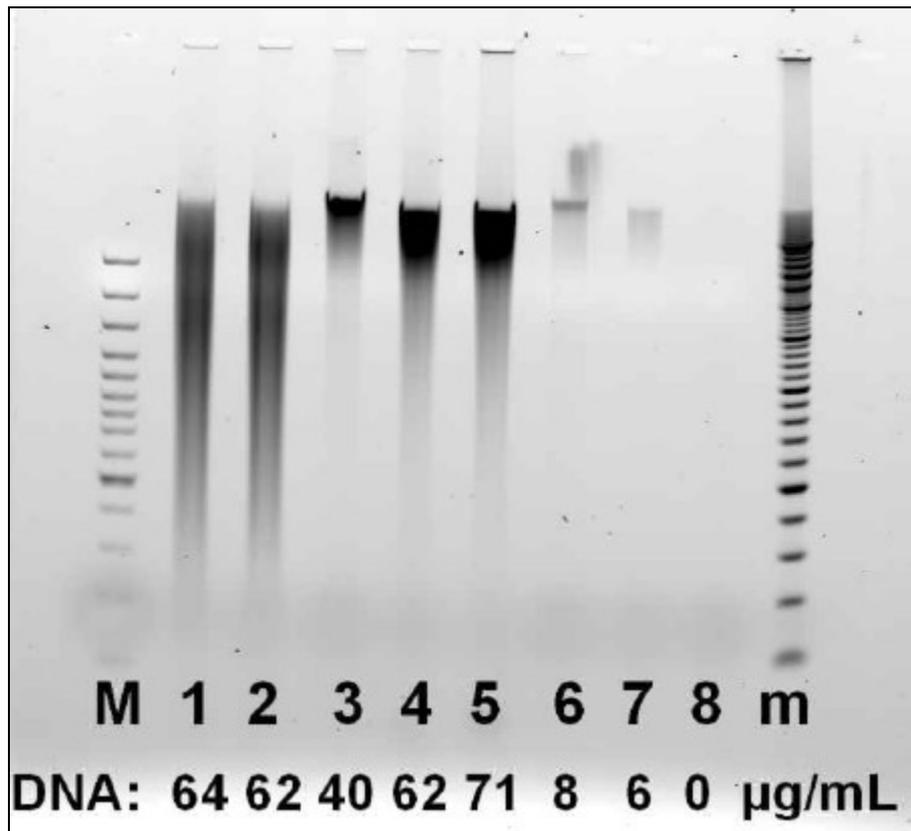


Abb. 14: DNA-Extrakte mit verschiedenen Zellyse-Techniken in 1%-Agarose-Gel. Zellyse mit: 1 - Ultraschallstab, 2 - Ultraschallstab und Poly-A (als Träger-DNA), 3 - Schwingmühle, 4 - Schwingmühle und Inkubation mit Protease und Chitinase bei 25 °C, 5 - Schwingmühle und Inkubation mit Protease und Chitinase bei 37 °C, 6 - Micropistill, 7 - Ultra-Turrax, 8 - Negativkontrolle (Aqua dest.) mit Schwingmühle; M: 100bp DNA Ladder Plus, m: 20 bp DNA Ladder. Darunter zum Vergleich die mit PicoGreen<sup>®</sup> ermittelten DNA-Konzentrationen der Extrakte.

### 3.2 Untersuchung der Oligonukleotidprimer

Um die Spezifität verschiedener Primer zu testen, wurden ihre Sequenzen mithilfe der BLAST-Software analysiert (ALTSCHUL *et al.* 1997). Die eingesandten Sequenzen wurden mit der Datenbank auf Übereinstimmungen überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in zwei Richtungen untersucht: 1) passte die spezifische Primersequenz zu allen Stämmen einer Art/Gruppe und 2) schloss sie alle anderen Arten aus? Die Ergebnisse dieser Spezifitäts-Untersuchung sind in (Tab. 20) dargestellt. Die Zahlen drücken die Basenhomologie aus.

Der von SIMON *et al.* (1992) beschriebene „Glomales-spezifische“ Primer VANS1 passt nur bei einigen AM-Pilzarten 100%-ig. Zahlreiche Sequenzen hingegen, z.B. von *Glomus etunicatum*, *Acaulospora*- und *Scutellospora*-Arten stimmten zum Teil nur mit 16 von 23 Basen mit der Primersequenz überein und wiesen mehrere Abweichungen auf.

Tab. 20: Vergleich der Sequenzen spezifischer Primer mit Datenbanksequenzen. Die Zahlen in der Spalte Basenhomologie geben die übereinstimmenden Basen an. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Sequenzen einer Art an. Die Autoren sind in Tab. 1 aufgeführt. A.: *Acaulospora*, Ar.: *Archaeospora*, E.: *Entrophospora*, G.: *Glomus*, Gi.: *Gigaspora*, P.: *Paraglomus*, S.: *Scutellospora*.

Primer	Länge (Basen)	Spezifität laut Autor(en)	Basenhomologie
VANS1	23	Glomales	23: <i>G. intraradices</i> , <i>Gi. rosea</i> , <i>Gi. margarita</i> , "Endophyte"  22: <i>G. etunicatum</i>  21: <i>S. dipapillosa</i> , <i>S. pellucida</i> , <i>Gi. albida</i> , <i>G. vesiculiferum</i>  19: <i>G. etunicatum</i>  17: <i>A. rugosa</i>  16: <i>A. spinosa</i>
ITS1F	22	Pilze	22: zahlreiche Glomales-Arten und andere Pilze, <i>Chaetosphaeridium globosum</i> (Grünalge)
ACAU1660	17	Acaulosporaceae	17: <i>A. scrobiculata</i> , <i>A. longula</i> , <i>A. laevis</i> , <i>A. rugosa</i> , <i>A. morrowiae</i> , <i>E. colombiana</i>  14: <i>A. spinosa</i> , <i>Ar. leptoticha</i>
ARCH1311	19	Paraglomaceae	19: <i>P. occultum</i> , <i>P. brasilianum</i> ; 8 Pilzsequenzen ( <i>Rhynchostoma minutum</i> , <i>Acrospermum spp.</i> ,...)
GLOM1310	20	Glomaceae	20: <i>G. caledonium</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. manihotis</i> , <i>G. sinuosum</i> , <i>G. vesiculiferum</i>  19: <i>G. caledonium</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. coremioides</i> , <i>G. coronatum</i> , <i>G. fragilistratum</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>G. proliferum</i> , <i>G. verruculosum</i>
LETC1670	18	<i>G. etunicatum</i> - Gruppe	18: <i>G. claroideum</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>G. lamellosum</i> , <i>G. luteum</i> , <i>G. sp. S329</i> , <i>G. sp. W3234</i>  17: <i>Bensingtonia musae &amp; ingoldii</i>
GIGA5.8R	19	Gigasporaceae	19: <i>Gigaspora</i> (5 Arten), <i>Scutellospora</i> (4 Arten)
GLOM5.8R	19	Glomaceae	19: <i>G. caledonium</i> , <i>G. clarum</i> , <i>G. dimorphicum</i> , <i>G. geosporum</i> , <i>G. intraradices</i> , <i>G. monosporum</i> , <i>G. mosseae</i>
Aclong87For	22	<i>A. longula</i>	22: <i>A. longula</i>
Aclong251For	23	<i>A. longula</i>	23: <i>A. longula</i>
AclongSonde	27	<i>A. longula</i>	27: <i>A. longula</i>

Tab. 20 (Fortsetzung)

Primer	Länge (Basen)	Spezifität laut Autor(en)	Annealing
Aclong338Rev	22	<i>A. longula</i>	22: <i>A. longula</i> 21: <i>Blastobotrys capitolata</i>
Aclong400Rev	24	<i>A. longula</i>	24: <i>A. longula</i> 19: <i>A. tuberculata</i> , <i>A. spinosa</i>
Glmoss85For	22	<i>G. mosseae</i>	22: <i>G. mosseae</i> , <i>G. constrictum</i> , <i>G. coronatum</i> , <i>G. geosporum</i> , <i>E. infrequens</i>
Glmoss387Rev	25	<i>G. mosseae</i>	25: <i>G. mosseae</i> , <i>G. caledonium</i> , <i>G. constrictum</i> , <i>G. coronatum</i> , <i>G. geosporum</i> , <i>E. infrequens</i>
P1	20	<i>G. mosseae</i>	20: <i>G. mosseae</i> 18: <i>G. coronatum</i> , <i>E. infrequens</i>
F1	31	<i>G. mosseae</i>	31: <i>G. mosseae</i> (18) 30: <i>G. mosseae</i> (6), <i>G. constrictum</i> , <i>G. coronatum</i> , <i>E. infrequens</i>
P2	27	<i>G. mosseae</i>	27: <i>G. mosseae</i> (19) 25: <i>G. mosseae</i> (1) 23: <i>G. mosseae</i> (5), <i>G. geosporum</i> , <i>G. constrictum</i> , <i>G. coronatum</i>

Der Primer ITS1F wurde als pilzspezifisch beschrieben (GARDES & BRUNS, 1993). Tatsächlich wurden zahlreiche Glomales-Arten mit übereinstimmender Sequenz gefunden. Allerdings „erkennt“ der Primer auch *Chaetosphaeridium globosum*, eine Grünalge.

Der von REDECKER (2000) publizierte Primer ACAU1660 ist für einige Arten der Acaulosporaceae spezifisch. Allerdings diskriminiert er *Acaulospora spinosa*. ARCH1311 passt zu den beiden *Paraglomus*-Arten. Es wurden jedoch noch mindestens 8 weitere Pilzarten gefunden, die 100%-ige Homologie besitzen. Bei dem Glomaceae-spezifischen Primer GLOM1310 besaßen 7 *Glomus*-Arten eine Übereinstimmung in allen 20 Basen, 8 weitere *Glomus*-Arten eine Übereinstimmung in 19 der 20 Basen. LETC1670 wurde als spezifisch für die „*Glomus etunicatum*-Gruppe“ beschrieben. Es konnte völlige Übereinstimmung mit *Glomus etunicatum* und fünf weiteren *Glomus*-Arten gefunden werden. Allerdings traf die Sequenz auch mit 17 der 18 Basen auf zwei *Bensingtonia*-Arten zu. Bei den Primern

GIGA5.8R und GLOM5.8R wurden zahlreiche Arten der Gigasporaceae bzw. Glomaceae mit völliger Übereinstimmung gefunden.

Die von BÖHM (2000) entwickelten Primer für *A. longula* (Aclong87For, Aclong251For, AclongSonde, Aclong338Rev und Aclong400Rev) stimmten alle mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzdaten von *A. longula* überein. Bei Aclong338Rev ergab sich eine hohe Übereinstimmung von 21 der 22 Basen mit *Blastobotrys capitolata*. Die *G. mosseae*-spezifischen Primer (Glmoss85For und Glmoss387Rev) stimmten zu 100% mit Sequenzen von *G. mosseae*, *G. caledonium*, *G. constrictum*, *G. coronatum*, *G. geosporum* und *Entrophospora infrequens* überein. P1 war identisch mit der *G. mosseae*-Sequenz. Allerdings passten 18 von 20 Basen bei *G. coronatum* und *E. infrequens*. Bei P2 waren 19 von insgesamt 25 Datenbanksequenzen von *G. mosseae* mit dem Primer identisch. Die restlichen sechs Sequenzen differierten um bis zu vier Basen.

Im zweiten Schritt wurden die Primern in einer „virtuellen PCR“ getestet. Hierbei wurden die Primerpaare via Internet mithilfe der Software der Fa. Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) mit Datenbanksequenzen verglichen. Zusätzlich zur Primersequenz konnte die erwartete Produktlänge in Basenpaaren angegeben werden. Die Software ermittelte solche Sequenzen, bei denen sowohl Fragmentlänge als auch die Bindungsstellen der beiden Primer übereintrafen (Tab. 21).

Das Primerpaar VANS1-NS21 (SIMON *et al.* 1992) erbrachte ganze drei Sequenzen. Dieses Ergebnis bestätigte die Tatsache, dass viele Glomales-Arten von VANS1 nicht erfasst werden. Mit dem Primerpaar A2R-B2L wurden zahlreiche Sequenzen von Pilzen, Pflanzen und Invertebraten gefunden. Damit war die universelle Bindungseigenschaft der beiden Oligonukleotide bestätigt. Aclong87For und Aclong400Rev passten nur auf drei Sequenzen von *A. longula*. Das Primerpaar ist also – bezogen auf bisher bekannte Sequenzen – spezifisch für diese Art. Dem Ergebnis der *in silico* PCR mit den Primern Glmoss85For und Glmoss387Rev zufolge, wurden neben *G. mosseae* mehrere, offenbar nah verwandte Arten, darunter *G. coronatum*, *G. constrictum*, *G. geosporum*, *G. caledonium*, *G. fragilistratum* amplifiziert. Die Spezifität dieses Primerpaares muß also auf eine *G. mosseae*-Gruppe ausgeweitet werden.

Tab. 21: Ergebnisse der „virtuellen“ PCR. Angaben in Klammern zeigen die Anzahl der gefundenen Sequenzen. A.: *Acaulospora*, G.: *Glomus*, Gi.: *Gigaspora*.

Forward Primer	Reverse Primer	Gesuchte Amplifikat-Länge	Ergebnisse (100% Übereinstimmung)	Mittlere Amplifikat-Länge der virtuellen PCR
VANS1	NS21	300-800 bp	<i>G. intraradices</i> , <i>Gi. margarita</i> , <i>G. sp.</i>	548 bp
A2R	B2L	250-750 bp	Pilze (>100), Pflanzen (>100), Invertebraten (>100)	338 bp
Aclong 87For	Aclong 400Rev	100-600 bp	<i>A. longula</i> (3)	273 bp
Glmoos 85For	Glmoos 387Rev	100-600 bp	<i>G. mosseae</i> (4), <i>G. coronatum</i> (8), <i>G. constrictum</i> (1), <i>G. geosporum</i> (3), <i>G. caledonium</i> (2), <i>G. fragilistratum</i> (1), <i>G. sp.</i> (7)	317 bp

### 3.2.1 Kontrolle der Amplifizierbarkeit

Alle eingesetzten Proben wurden zunächst mit dem allgemeinen Primerpaar A2R-B2L auf Amplifizierbarkeit der genomischen DNA untersucht. Das Primerpaar A2R-B2L amplifiziert einen Teilabschnitt der LSU rDNA, die Domäne D2. Die Größen der Amplikons von Pflanzen und AMF sind unterschiedlich. Das Vorhandensein zumindest einer Pflanzenbande (ca. 320 bp) bei dem universellen Primerpaar beweist die Amplifizierbarkeit des DNA-Extrakts. Abb. 15 zeigt das Ergebnis einer PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L. In der Probe 1 wurde DNA aus *G. mosseae*-Sporen eingesetzt. Das Ergebnis ist eine diskrete Bande bei ca. 500 bp. In den Proben 2 und 4 war Pflanzen-DNA, die ein Produkt bei ca. 330 bp lieferte. Probe 3 war eine Mischprobe (*P. lanceolata*-Wurzel mit *G. mosseae* mykorrhiziert). Neben der pflanzenspezifischen Bande bei ca. 330 bp ist noch eine weitere schwache Bande bei ca. 500 bp zu erkennen. In Probe 5 wurde zur Kontrolle Wasser eingesetzt.

Auf diese Weise wurden alle DNA-Extrakte auf ihre Amplifizierbarkeit untersucht. Dies war notwendig, um falsch-negative Ergebnisse in den folgenden Experimenten mit spezifischen Primerpaaren auszuschließen. Abb. 16 zeigt ein typisches Gel mit PCR-Produkten der universellen Primer. 87% der Extrakte konnten dabei amplifiziert werden. Die Ergebnisse sind in einer Übersicht in Kapitel 3.4 zusammengefasst.

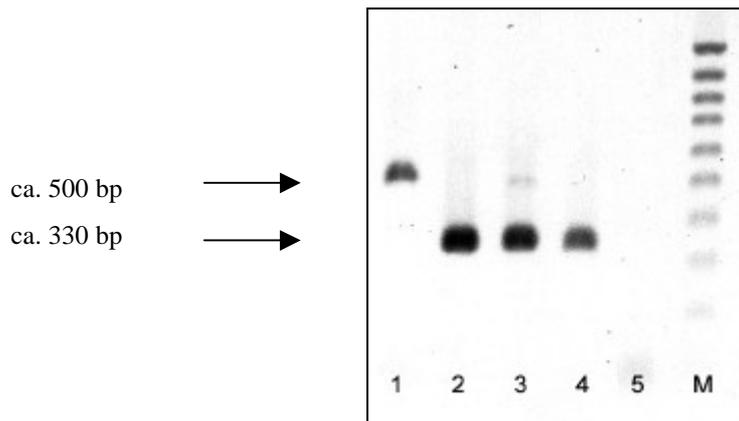


Abb. 15: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L in 1% Agarose-Gel. 1: *G. mosseae* (Sporen), 2: *P. lanceolata* (Blatt), 3: *P. lanceolata* (Wurzel) mit *G. mosseae* mykorrhiziert, 4: *P. lanceolata* (Wurzel), nicht mykorrhiziert, 5: Kontrolle (Aqua dest.), M: *100bp DNA Ladder Plus*.

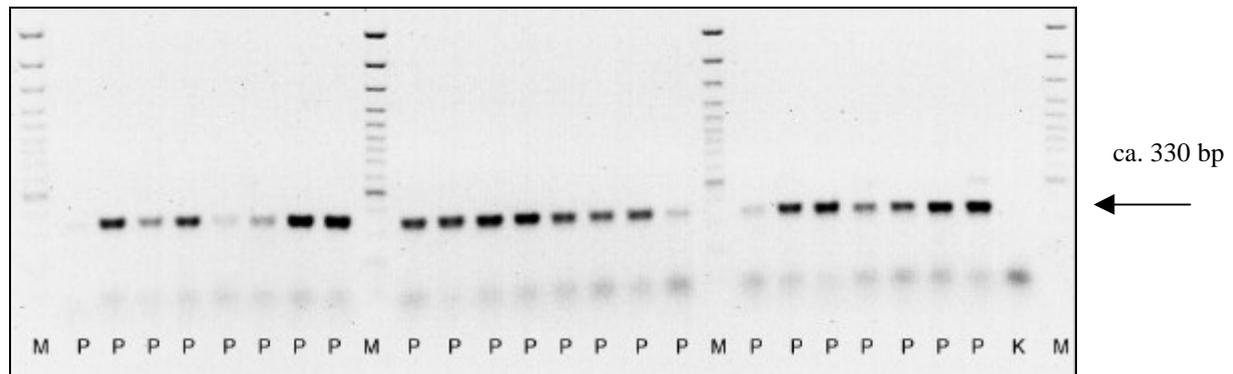


Abb. 16: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L in 1% Agarose-Gel. M: *100bp DNA Ladder Plus*, P: Freilandproben, K: Kontrolle (Aqua dest.).

### 3.2.2 Qualitativer Nachweis von *A. longula* mit spezifischen Primern

Zum Nachweis des AMF *A. longula* wurden in PCR-Analysen genomische DNA aus Wurzelmaterial und 1:100-verdünnte PCR-Produkte der Amplifikation mit dem Primerpaar A2R-B2L eingesetzt und mit dem Primerpaar Aalong87For-Aalong400Rev amplifiziert. Dabei lieferte die PCR mit genomischer DNA in den meisten Fällen keine positiven Ergebnisse. Mithilfe einer *nested* PCR konnten jedoch gute Ergebnisse erzielt werden (Abb. 17). Die PCR-Ansätze, die zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit durchgeführt worden waren, wurden dabei mit Aqua dest 1:100 verdünnt und als *Template* DNA eingesetzt. Dies war möglich, da sich die Primerbindungsstellen innerhalb des Fragments der PCR mit A2R und B2L befanden (Abb. 11). Als Positivkontrollen wurde DNA-Extrakt einer Gewächshauskultur von *A. longula* BEG8 verwendet. Als Negativkontrollen diente DNA von *P. lanceolata*,

*A. bisporus*, verschiedene AM-Pilzarten, Aqua dest. und Proben, die in der PCR mit unspezifischen Primern keine positiven Ergebnisse geliefert hatten.

Von den Kontrollen lieferte nur die Positivkontrolle mit *A. longula* BEG8 ein PCR-Produkt. Die Länge des Amplikons entsprach der zu erwartenden Länge von 273 bp. Bei allen anderen Kontrollen zeigte sich kein Signal. Bei den eingesetzten DNA-Proben waren fünf Banden mit einer Amplifikatlänge von 273 bp zu erkennen. Bei weiteren acht Proben waren sehr schwache Banden derselben Größe zu erkennen.

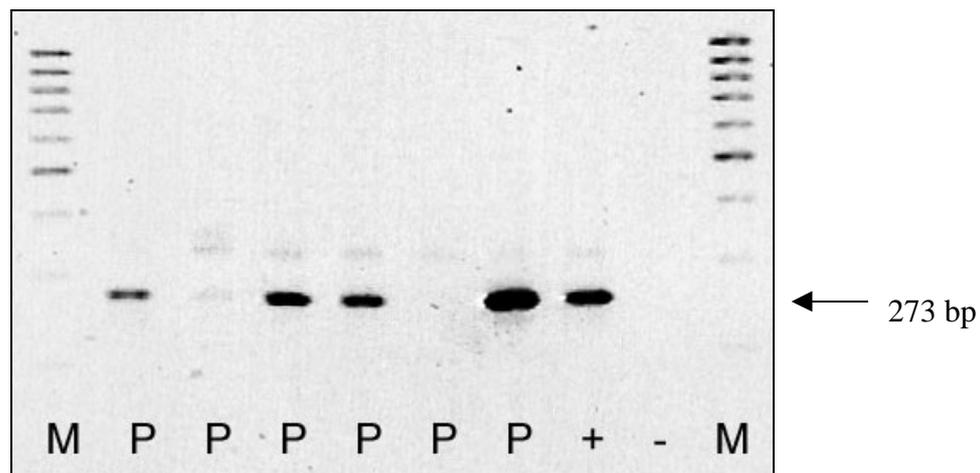


Abb. 17: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Aclong87For-Aclong400Rev in 1% Agarose-Gel. M: 100bp DNA Ladder Plus, P: Freilandproben, +: Positivkontrolle (*P. lanceolata*-Wurzel mit *A. longula* mykorrhiziert), -: Negativkontrolle (*P. lanceolata*-Blatt).

### 3.2.3 Qualitativer Nachweis von *G. mosseae* in Pflanzenwurzeln

Zum Nachweis einer Gruppe nah verwandter AM-Arten um *G. mosseae* wurden in PCR-Analysen genomische DNA aus Wurzelmaterial und 1:100-verdünnte PCR-Produkte der Amplifikation mit dem Primerpaar A2R-B2L eingesetzt und mit dem Primerpaar Glmoss85For-Glmoss387Rev amplifiziert. Wie schon beim Nachweis von *A. longula* lieferte auch hier die PCR mit genomischer DNA kaum positiven Ergebnisse. Mit der *nested* PCR wurden jedoch Produkte detektiert. Die Produkte der ersten PCR mit dem Primerpaar A2R-B2L wurden 1:100 verdünnt und als Template DNA eingesetzt. Als Positivkontrollen wurde DNA-Extrakt einer Topfkultur von *G. mosseae* BEG68 verwendet. Als Negativkontrollen diente DNA von *P. lanceolata*, *A. bisporus*, verschiedene AM-Pilzarten, Aqua dest. und Proben, die in der PCR mit unspezifischen Primern keine positiven Ergebnisse geliefert hatten.

Von den Kontrollen lieferte nur die Positivkontrolle mit *G. mosseae* BEG68 ein PCR-Produkt. Die Länge des Amplikons entsprach der zu erwartenden Länge von 317 bp. Bei allen anderen Kontrollen zeigte sich kein Signal. Bei den eingesetzten DNA-Proben lieferten 9 positive Ergebnisse (Abb. 18). Da bereits BÖHM (2000) die Artspezifität des Primerpaares in Frage stellte und die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität mit *G. caledonium*, *G. coronatum*, *G. constrictum*, *G. fragilistratum* und *G. geosporum* vermutete, wurden die positiven Proben nochmals unmittelbar nebeneinander nach ihrer Größe untersucht (Abb. 19). In dem Agarosegel konnten keine Größenunterschiede bei den positiven Proben festgestellt werden. Alle Banden besaßen eine Fragmentgröße von ca. 317 bp. Die Banden wurden ausgeschnitten, um später sequenziert zu werden.

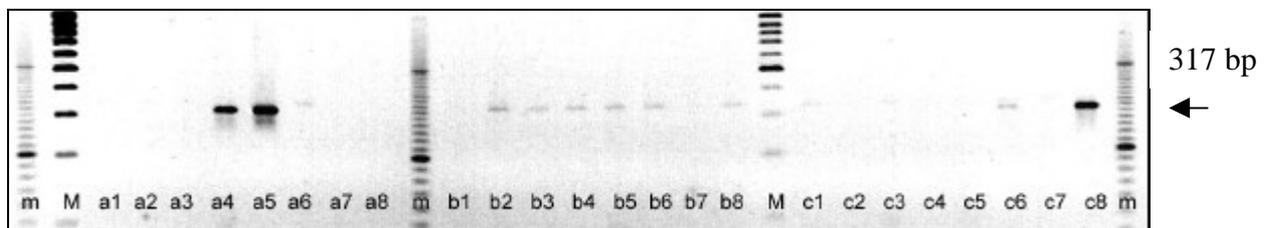


Abb. 18: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Glmoss85For-Glmoss387Rev in 1% Agarosegel. M: 100bp DNA Ladder Plus, m: 20 bp DNA Ladder, a1-c6: Proben, a7: Negativkontrolle (*P. lanceolata*-Blatt), c8: Positivkontrolle (*P. lanceolata*-Wurzel mit *G. mosseae* mykorrhiziert).

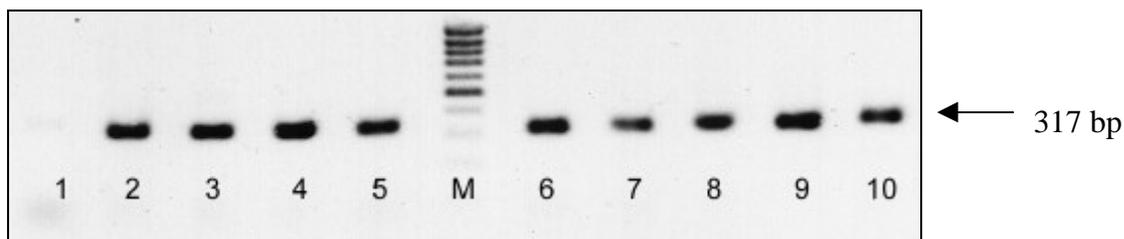


Abb. 19: Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar Glmoss85For-Glmoss387Rev in 1% Agarose-Gel. Vergleich der PCR-Produkte. M: 100bp DNA Ladder Plus, 1: Negativkontrolle (*P. lanceolata*-Blatt), 2-10: Proben.

### 3.2.4 RFLP-Analyse der *G. mosseae*-Gruppe

Die Produkte der PCR mit den Primern Glmoss85For und Glmoss387Rev wurden mit vier verschiedenen Restriktionsendonukleasen inkubiert und anschließend mithilfe der AGE analysiert. Bei dem Verdau der DNA-Fragmente mit *HinfI*, *HpaII* und *RsaI* traten keine Unterschiede auf. Bei *AluI* zeigten sich jedoch zwei unterschiedliche *fingerprints* (Abb. 20): Bei drei Proben war eine Bande von ca. 270 bp Länge zu erkennen, bei den übrigen eine Bande

von ca. 130 bp. Anhand der Sequenzinformation (Kapitel 3.2.5) konnten mögliche Schnittstellen des Enzyms *AluI* lokalisiert werden (Tab. 23). Bei den drei ungeschnittenen Fragmenten (Pla5-004, HoIII-008 und ZeaA15) konnten auch in den Sequenzdaten keine Schnittstellen gefunden werden. Bei den restlichen Proben waren zwei Schnittstellen vorhanden, woraus sich drei Fragmente mit 17, 121 und 128 bp ergaben. Diese Fragmentlängen stimmen mit denen des Gels überein, unter der Voraussetzung, dass ein 17 bp-Fragment unter den gegebenen Bedingungen im Gel nicht nachweisbar war und die beiden größeren Fragmente sich nicht voneinander trennen ließen, also als eine Bande erschienen. Bei TraA21 fehlte die erste Schnittstelle, so dass das zweite, größere Fragment eine Länge von 149 bp statt 121 bp besaß. Bei HeLa06 konnte über die erste Schnittstelle keine Aussage getroffen werden, da entsprechende Sequenzdaten fehlten. Hier waren auch im Gel keine eindeutigen Banden zu erkennen.

Tab. 22: Abkürzungen der untersuchten Sequenzen. Auf der linken Seite sind die Abkürzungen für die Sequenzen der Freiland-Isolate zusammengefaßt; auf der rechten Seite die verwendeten Datenbanksequenzen.

Ermittelte Sequenzen		Datenbanksequenzen	
Abkürzung	Sequenz	Abkürzung	Sequenz
Glmooss68W	<i>G. mosseae</i> BEG68 (Kontrolle)	EninfrMS05	<i>Entrophospora infrequens</i> MS05
Hel-A06	<i>G. mosseae</i> von <i>H. annuus</i> , A06, Juni 2000	GlcaleRMC	<i>Glomus caledonium</i> RMC658
		GlcaleRWZ	<i>Glomus caledonium</i> RWZ658
HoI-108	<i>G. mosseae</i> von <i>H. lanatus</i> , W02-oben, August 2001	Glcoro28	<i>Glomus coronatum</i> BEG28
HoIII-008	<i>G. caledonium</i> von <i>H. lanatus</i> , W02-unten, August 2000	Glcoro28K	<i>Glomus coronatum</i> BEG28K
		Glfrag05	<i>Glomus fragilistratum</i> BEG05
PlaIII-004	<i>G. mosseae</i> von <i>P. lanceolata</i> , W02-unten, April 2000	Glgeos11	<i>Glomus geosporum</i> BEG11
PlaIII-108	<i>G. mosseae</i> von <i>P. lanceolata</i> , W02-unten, August 2001	Glgeos90	<i>Glomus geosporum</i> BEG90
		Glgeos106	<i>Glomus geosporum</i> BEG106
Pla4-004	<i>G. mosseae</i> von <i>P. lanceolata</i> , W21-unten Mitte, April 2000	Glmooss25	<i>G. mosseae</i> BEG25
Pla5-004	<i>G. geosporum</i> von <i>P. lanceolata</i> , W21-unten, April 2000	Glmooss68/2	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 2
		Glmooss68/4	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 4
TraA21	<i>G. mosseae</i> von <i>T. aestivum</i> , A21, August 2001	Glmooss68/6	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 6
ZeaA15	<i>G. caledonium</i> von <i>Z. mays</i> , A15, August 2001	Glmooss68/7	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon7

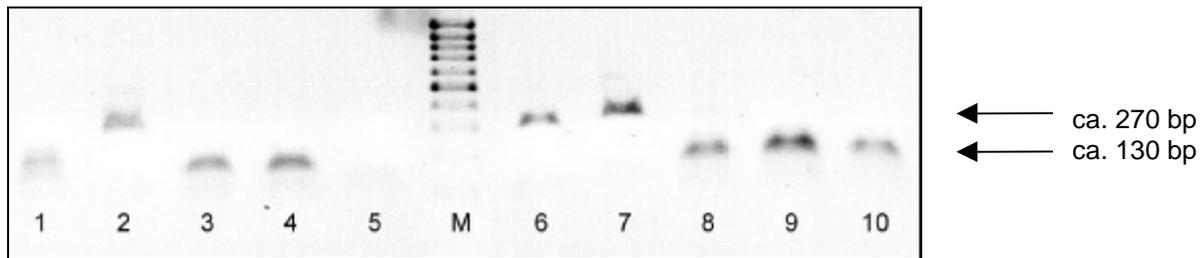


Abb. 20: RFLP-Analyse von zehn PCR-Fragmenten der *G. mosseae*-Gruppe mit dem Enzym *AluI* in 1% Agarose-Gel. M: 100bp DNA Ladder Plus, 1: Gmoss68W, 2: Pla5-004, 3: Pla4-004, 4: PlaIII-004, 5: HeIA06, 6: HoIIII-008, 7: ZeaA15, 8: HoII-108, 9: TraA21, 10: PlaIII-108. Abkürzungen siehe Tab. 22.

Tab. 23: Übersicht über die Schnittstellen des Enzyms *AluI*. Abweichende Basen sind unterlegt. Schnittstellen sind mit Pfeilen ( ) markiert, nicht geschnittene Positionen durch Striche (-), ungewisse Positionen durch ein Fragezeichen (?). Den Basen sind die Größen der Fragmente angegeben. Abkürzungen siehe Tab. 22.

Position:	16-19	150-153	Fragmentlängen
<i>AluI</i>	AG CT	AG CT	
Gmoss68W	TAG CTC	GAG CTT	17 - 128 - 121
PlaIII-004	TAG CTC	GAG CTT	17 - 128 - 121
Pla4-004	TAG CTC	GAG CTT	17 - 128 - 121
HeIA06	NNN?NNN	GAG CTT	17?- 128?- 121
HoII-108	TAG CTC	GAG CTT	17 - 128 - 121
PlaIII-108	TAG CTC	GAG CTT	17 - 129 - 121
TraA21	TAG- <b>T</b> TC	GAG CTT	146 - 121
HoIIII-008	TAG- <b>TTT</b>	<b>GG</b> -CTT	267
ZeaA15	TAG- <b>TTT</b>	<b>GG</b> -CTT	267
Pla5-004	TAG- <b>TTT</b>	<b>GG</b> -CTT	267

### 3.2.5 Sequenzanalysen

Von der PCR mit den Primern Gmoss85For und Gmoss387Rev wurden zehn Amplikons aufgereinigt und sequenziert, darunter neun Freilandproben und ein mit *P. lanceolata* kultivierter Stamm von *G. mosseae* BEG68 (Gmoss68W) als Kontrolle. Von den erhaltenen Sequenzdaten wurden zunächst in der NCBI-Datenbank mithilfe des Programmes BLAST die Sequenzen mit der größten Homologie ermittelt (Tab. 24). Mit diesen Datenbanksequenzen und den sequenzierten Fragmenten von Gmoss85For und Gmoss387Rev wurde ein Annealing durchgeführt. Zur Untersuchung der Sequenzhomologie wurde das Programm BioEdit verwendet (HALL, 1999). Die Länge der sequenzierten Fragmente lag zwischen 265 und 270 Basenpaaren (Abb. 21). Die ersten 44 Nukleotide des Isolats HeIA06 konnten bei der Sequenzierung nicht bestimmt werden. Sechs der neun sequenzierten Freiland-Stämme sowie die Kontrolle *G. mosseae* BEG68 waren identisch oder unterschieden sich in nur einer Base (0,4%) von *G. mosseae*-Stämmen aus der Datenbank. Diese sechs Isolate konnten folglich als

*G. mosseae* identifiziert werden. Eine weitere Untergruppe konnte aus Sequenzen von *Glomus fragilistratum* und *Glomus caledonium* gebildet werden. Dieser Untergruppe konnten zwei weitere Freiland-Isolate zugeordnet werden. Eines davon (HolIII-008) war identisch mit *G. caledonium* RWZ658, das zweite (ZeaA15) wies eine hohe Homologie mit ihr auf (99,3%). Die neunte Sequenz (Pla5-004) konnte als *Glomus geosporum* identifiziert werden. Abb. 22 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der sequenzierten Freilandstämme sowie ihrer ermittelten nächsten Verwandten aus der NCBI-Datenbank. Die Abkürzungen sind in Tab. 22 angegeben.

Tab. 24: Sequenzhomologie mit nächstverwandten Arten. Abkürzungen siehe Tab. 22.

Sequenz(en)	Homologie	Nächstverwandte Spezies/Stamm	Accession-Nr.
<i>G. mosseae</i> BEG68W TraA21	99,6%	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 6	AF389013
PlaIII-004 Pla4-004	100%	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 4 <i>G. mosseae</i> BEG25	AF389011 AF304985
PlaIII-108 Holl-108	100%	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 7	AF389014
ZeaA15	99,2%	<i>Glomus caledonium</i> RWZ658	AF396789
Pla5-004	99,6%	<i>Glomus geosporum</i> BEG90 <i>Glomus geosporum</i> BEG106	AF145742 AF145743
HolIII-008	100%	<i>Glomus caledonium</i> RWZ658	AF396789
HelA06	99,6%	<i>G. mosseae</i> BEG68 Klon 4 <i>G. mosseae</i> BEG25	AF389011 AF304985

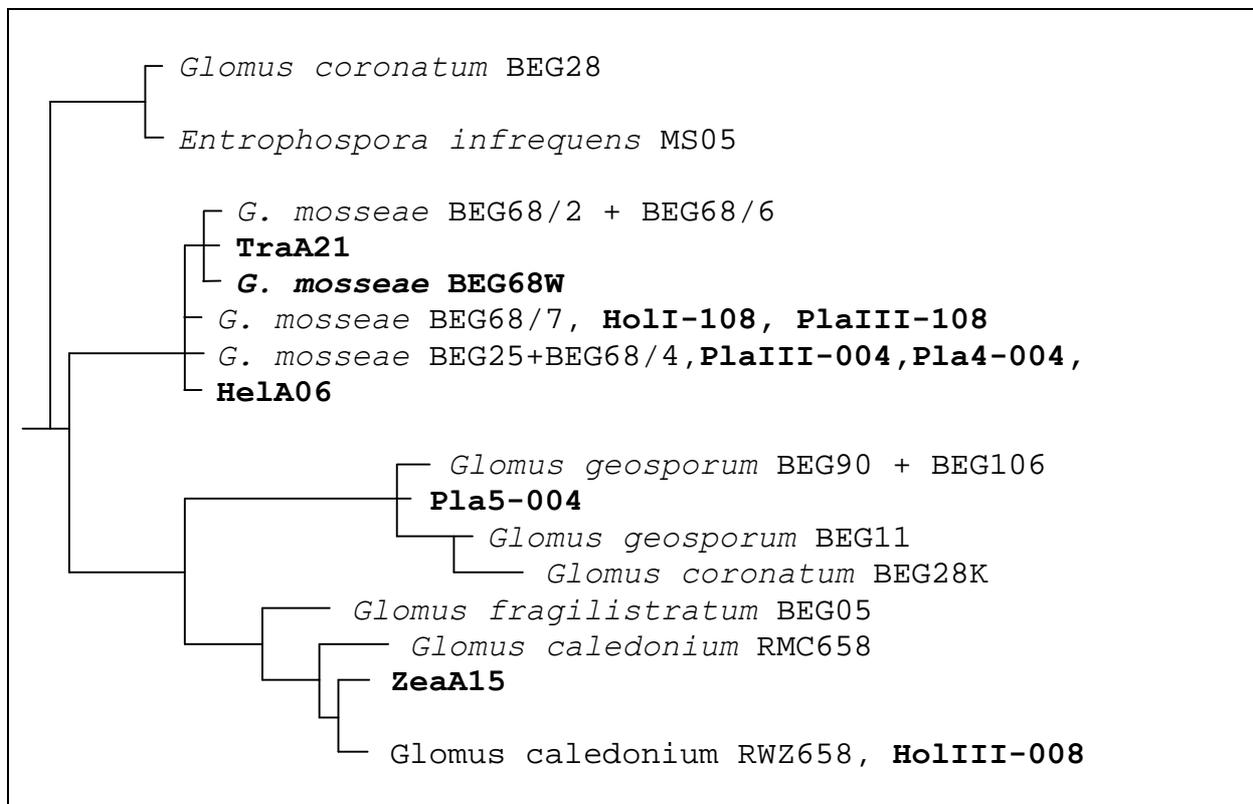


	130	140	150	160	170	180	
CONSENSUS	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glmoss68/4	TGAATGTCATAAAATGACTGGAGGAATGTAGCTTCGATCTCGTATTGAAGTGTTATAGCC						
Glmoss25	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>PlaIII-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>Pla4-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>HeLa06</b>	.....N..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glmoss68/7	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>HolI-108</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>PlaIII-108</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>Glmoss68W</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
<b>TraA21</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glmoss68/2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glmoss68/6	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glfrag05	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.				
GlcalerMC	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.				
GlcalerWZ	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.				
<b>HolIII-008</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.				
<b>ZeaA15</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.				
Glgeos106	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.		C..C.	A..	
Glgeos90	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.		C..C.	A..	
<b>Pla5-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		G.		C.	A..	
Glgeos11	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		T.	G.	C.	A..	
Glcoro28K	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		T.	G.	C.	A..	
Glcoro28	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				C.		
EninfrMS05	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				C.		
		190	200	210	220	230	240
CONSENSUS	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....						
Glmoss68/4	TTTGGTAGATGTGATGTTTGAGACCGAGGATTGCAACGGATACCCCTTCA-GGGCTATTCG						
Glmoss25	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>PlaIII-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>Pla4-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>HeLa06</b>	.....N..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
Glmoss68/7	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>HolI-108</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>PlaIII-108</b>	.....N..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	N.
<b>Glmoss68W</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
<b>TraA21</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
Glmoss68/2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
Glmoss68/6	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					-	
Glfrag05	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			T-	
GlcalerMC	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					T-	
GlcalerWZ	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			T.		T-	
<b>HolIII-008</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....			T.		T-	
<b>ZeaA15</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					T-	
Glgeos106	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			T.	T-
Glgeos90	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			T.	T-
<b>Pla5-004</b>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			T.	T-
Glgeos11	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			T.	T-
Glcoro28K	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....		C.			-	CA.
Glcoro28	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					T.	-
EninfrMS05	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					T.	

Abb. 21 (Fortsetzung)

	250	260	270	
	.... .... .... .... .... .... ...			
CONSENSUS	TCTGATCTCTGATACGTTGCCTTGATGTTGAAA			3' (266 bp)
Glmoss68/4	.....			3' (266 bp)
Glmoss25	.....			3' (266 bp)
<b>PlaIII-004</b>	.....			3' (266 bp)
<b>Pla4-004</b>	.....			3' (266 bp)
<b>HeIA06</b>	.....			3' (266 bp)
Glmoss68/7	.....			3' (266 bp)
<b>HolI-108</b>	.....			3' (266 bp)
<b>PlaIII-108</b>	.....N...			3' (266 bp)
<b>Glmoss68W</b>	.....			3' (267 bp)
<b>TraA21</b>	.....			3' (267 bp)
Glmoss68/2	.....			3' (266 bp)
Glmoss68/6	.....			3' (266 bp)
Glfrag05	.....A.....C....			3' (266 bp)
GlcaleRMC	.....A.....C....			3' (270 bp)
GlcaleRWZ	.....A.....C....			3' (267 bp)
<b>HolIII-008</b>	.....A.....C....			3' (267 bp)
<b>ZeaA15</b>	.....A.....C....			3' (267 bp)
Glgeos106	.....C....			3' (267 bp)
Glgeos90	.....C....			3' (267 bp)
<b>Pla5-004</b>	.....C....			3' (267 bp)
Glgeos11	.....C....			3' (267 bp)
Glcoro28K	.....C....			3' (266 bp)
Glcoro28	.....			3' (265 bp)
EninfrMS05	.....			3' (266 bp)

Abb. 21: (Fortsetzung)

Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum der *G. mosseae*-Gruppe. Grundlage bildete der Vergleich der sequenzierten Amplikons (fett abgebildet) mit Datenbanksequenzen. ( ) entspricht einer Substitution bei einer Gesamtlänge der Fragments von ca. 266 Nukleotiden. Abkürzungen siehe Tab. 22.

### 3.3 Quantitativer Nachweis der AMF

Für die Bestimmung der Kopienzahl wurde bei jedem Experiment eine Kalibrierkurve angelegt. Hierfür wurden Plasmide verwendet, die das mit dem Primerpaar A2R-B2L amplifizierte Fragment der LSU rDNA von *A. longula* bzw. *G. mosseae* enthielten. Von den Plasmiden wurden Verdünnungsreihen mit Aqua dest. hergestellt, die zur Berechnung einer Kalibriergeraden dienten. Die Plasmidverdünnungen, Proben und Kontrollen wurden in einer *TaqMan*<sup>®</sup> 96 well reaction plate vorgelegt. Hierzu wurde der Mastermix C pipettiert und die Kavitäten mit *TaqMan*<sup>®</sup> optical caps verschlossen. Anschließend wurden in einem *Abi Prism 7700 sequence detector* 40 PCR-Zyklen durchgeführt und die dabei emittierte Fluoreszenz gemessen. Die Software von Applied Biosystems errechnete automatisch für jeden Standard den Ct-Wert, also diejenige Zykluszahl, bei dem das Fluoreszenz-Signal des Reporterfarbstoff erstmalig über ein Hintergrundrauschen hinausragte. Die ermittelten Ct-Werte wurden halblogarithmisch gegen die Kopienzahl der Standards aufgetragen. Die Stärke des Fluoreszenz-Signals und damit der Ct-Wert waren abhängig von der eingesetzten Kopienzahl der Ziel-DNA. Die in den Proben vorhandenen Kopienzahlen wurden durch Interpolation berechnet. Da die Kopienzahl exponentiell zum Ct-Wert abnimmt, wurde das geometrische Mittel der beiden Doppelbestimmungen ermittelt. Hieraus wurde auf die Kopienzahl je mg Pflanzenwurzel zurückgerechnet.

#### 3.3.1 Quantifizierung von *A. longula* mit der *TaqMan*<sup>®</sup> PCR

Für die quantitative spezifische Bestimmung der Kopienzahl von *A. longula*-rDNA wurden die beiden Primer Aclong251For und Aclong338Rev sowie die Sonde AclongSonde eingesetzt. Die Länge des Amplikons betrug 92 bp. Für die Standardreihe wurde eine Verdünnungsreihe von klonierter *A. longula*-DNA hergestellt und mithilfe der ermittelten Ct-Werte eine Standardkurve angefertigt. Abb. 23 zeigt den Verlauf der *TaqMan*<sup>®</sup> PCR mit den eingesetzten *A. longula*-Standards. Der Rn-Wert entspricht dem Quotienten aus Emissionsintensität des Reporterfarbstoffs und Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffs.  $\Delta Rn$  entspricht dem Rn-Wert abzüglich dem Hintergrundsignal der ersten PCR-Zyklen. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 25 zusammengefaßt und in Abb. 24 aufgetragen. Aus der Standardkurve ist der lineare Zusammenhang zwischen eingesetzter Kopienzahl und Signalstärke (Ct-Wert) klar erkennbar. Mit der Steigung  $m$  der Korrelationsgeraden von -3,710 ergab sich eine Effizienz der *TaqMan*<sup>®</sup> PCR von 86%. Der Korrelationskoeffizient der Standardkurve betrug 0,973.

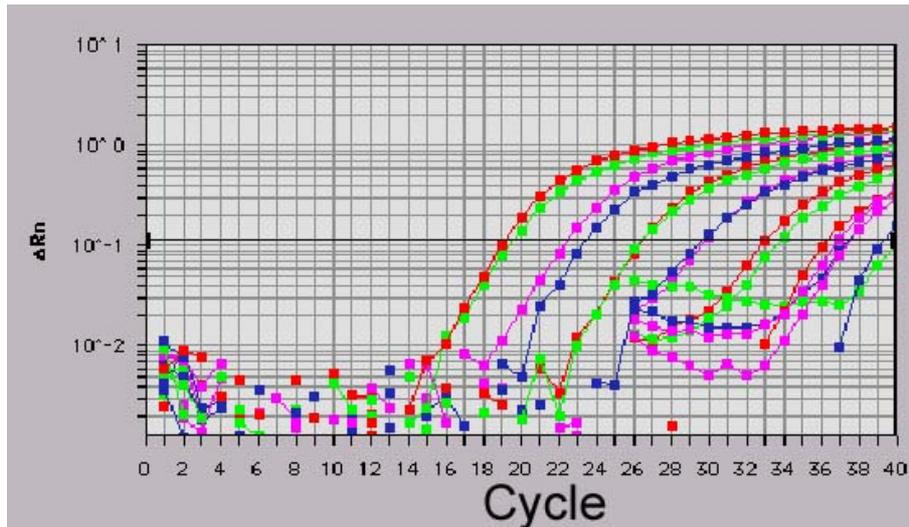


Abb. 23: Amplification-Plot mit sechs DNA-Standards und Aqua dest. (jeweils Doppelbestimmungen). Die  $\Delta R_n$ -Werte der sechs *A. longula*-Standards wurden über der Zyklenzahl aufgetragen. Startkopienzahl: siehe Tab. 25.

Die Proben, die in dem Experiment mit den *A. longula*-spezifischen Primern Aalong87For und Aalong400Rev positive Ergebnisse geliefert hatten, wurden daraufhin in der TaqMan<sup>®</sup> PCR eingesetzt. Proben, bei denen beide Messungen erst nach dem 35. Zyklus ein Signal lieferten wurden dabei aus folgenden Gründen nicht gewertet: 1) Nach dem 35. Zyklus nahm die Linearität der Standardkurve ab und die Standardabweichung stark zu; 2) in diesem Bereich können auch Negativkontrollen Signale liefern und 3) da es sich bei der rRNA um ein *high copy gene* handelt, wobei die Kopien tandemförmig aneinandergereiht sind, erschien eine Kopienzahl von weniger als 100 als unwahrscheinlich. Als Kontrolle wurden *G. mosseae* und Aqua dest. verwendet.

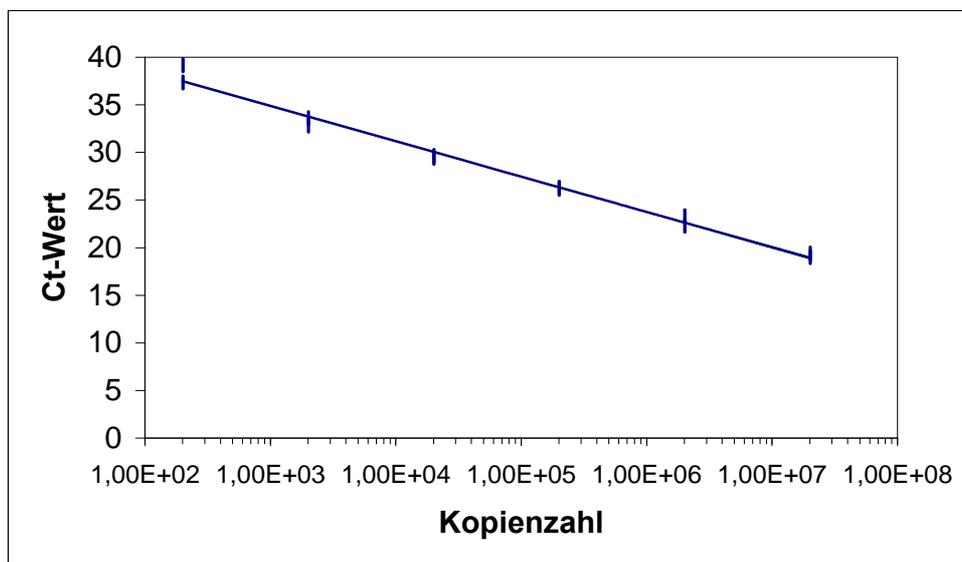


Abb. 24: Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Ct-Wert der Kalibriergerade bei *A. longula*.

Die Ergebnisse sind in Tab. 26 zusammengefaßt. Bei *A. longula* BEG8 und sieben Proben wurden Werte ermittelt, die eine Quantifizierung zuließen. Demnach befanden sich in der Positivkontrolle 1889 Kopien je  $\mu\text{L}$ , die Proben enthielten zwischen 266 und 5926 Kopien/ $\mu\text{L}$ .

Tab. 25: Zusammenstellung der Ct-Werte der eingesetzten Standard-Verdünnungsreihe bei *A. longula*.

Kopienzahl	Ct-Wert 1	Ct-Wert 2	Mittelwert (n=2)
$2 \cdot 10^7$	19,01	19,37	19,19
$2 \cdot 10^6$	22,30	23,29	22,80
$2 \cdot 10^5$	26,29	26,17	26,23
$2 \cdot 10^4$	29,64	29,43	29,54
$2 \cdot 10^3$	32,82	33,59	33,20
$2 \cdot 10^2$	37,35	39,15	38,25

Tab. 26: Anzahl der ermittelten Kopienzahlen bei *A. longula*, geometrische Mittelwerte (n = 2) je  $\mu\text{L}$  DNA-Extrakt und Kopienzahl je mg Wurzel (FG).

Probe	Kopienzahl A	Kopienzahl B	Mittelwert je $\mu\text{L}$ DNA-Ext.	Kopienzahl je mg Wurzel
<i>A. longula</i> BEG8	1569	2274	1889	94450
PlaI-008	0	0	0	0
Pla3-004	2899	1283	1929	3445
Pla4-004	0	0	0	0
Pla5-004	775	790	782	3910
TriII-004	583	339	445	2967
TriII-008	0	0	0	0
Tri3-004	309	229	266	13300
Tri4-004	771	676	721	5150
Tri5-004	676	1074	852	5680
Tri5-106	0	0	0	0
HolIII-106	9221	3808	5926	4489
HelA06	0	0	0	0
SolA17	0	0	0	0
Aqua dest.	0	0	0	0





die mittlere Kopienzahl je  $\mu\text{L}$  336 bzw. 592. In der Probe mit *G. geosporum* (Pla5-004) konnten keine Kopien ermittelt werden. Daraus ergaben sich bis zu 64750 Kopien je mg Wurzel (Frischgewicht).

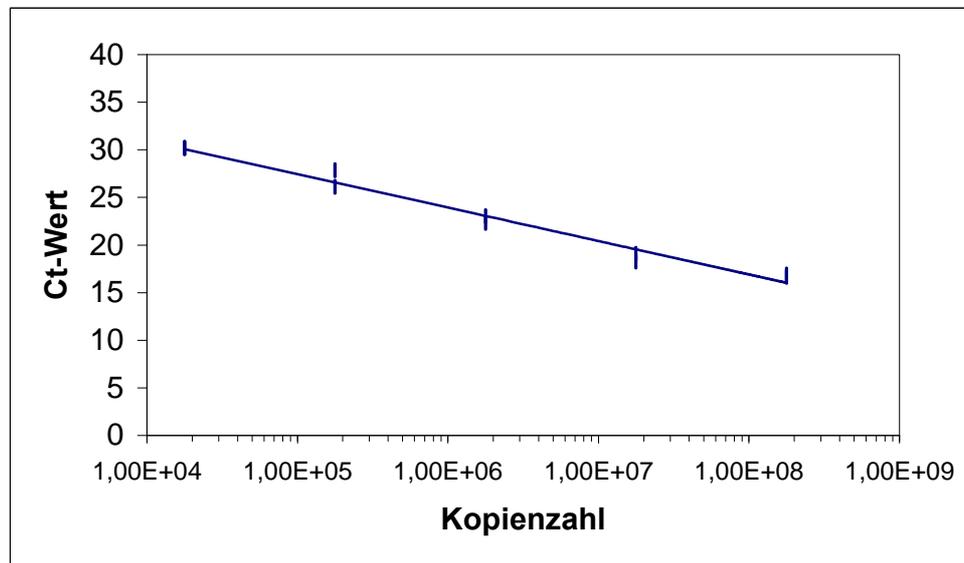


Abb. 28: Zusammenhang zwischen den ermittelten Ct-Werten und der eingesetzten Kopienzahl bei *G. mosseae*.  $r = 0,979$ .

Tab. 28: Anzahl der ermittelten Kopienzahlen bei *G. mosseae*, geometrische Mittelwerte ( $n = 2$ ) je  $\mu\text{L}$  DNA-Extrakt und Kopienzahl je mg Wurzel (FG).

Probe	Kopienzahl A	Kopienzahl B	Mittelwert je $\mu\text{L}$ DNA-Ext.	Kopienzahl je mg Wurzel (FG)
Gmoss68W	159	259	203	1450
PlaIII-004	2739	715	1399	9327
PlaIII-108	2821	2378	2590	64750
Pla4-004	5499	4915	5199	37136
Pla5-004	0	0	0	0
HoIIII-008	314	1117	592	2960
HoII-108	4045	4787	4400	4783
HelA06	14378	4434	7984	1094
TraA21	912	460	648	661
ZeaA15	248	454	336	381
Aqua dest.	0	0	0	-

### 3.4 Zusammenfassung der molekularbiologischen und morphologischen Ergebnisse

Aus 65 Proben von Pflanzenwurzeln wurde DNA extrahiert (Tab. 29). Von diesen DNA-Extrakten konnten 56 in einer PCR mit unspezifischen Primern amplifiziert werden. In einer PCR mit *A. longula*-spezifischen Primern ergaben fünf dieser positiv getesteten Proben (9%) eine starke Bande, bei weiteren acht Proben (14%) waren schwache Banden erkennbar. Eine quantitative PCR ergab zwischen 3910 und 13300 Kopien je mg Wurzelmasse bei den starken Signalen und bis zu 5680 Kopien je mg bei den schwächeren Signalen. Allerdings konnten bei sechs der acht Proben mit schwachen Signalen keine Kopien nachgewiesen werden.

In neun (16%) der Proben konnte mit den spezifischen Primern Glmoss85For und Glmoss387Rev ein Produkt erhalten werden. Diese Produkte wurden sequenziert und durch den Vergleich mit der Datenbank konnten sechs als *G. mosseae*, zwei als *G. caledonium* und eines als *G. geosporum* identifiziert werden. Mit einer quantitativen PCR wurde die Kopienzahl je mg Wurzelmasse bestimmt. Bei den *G. mosseae*-Proben wurden zwischen 661 und 64750 Kopien/mg nachgewiesen, bei den beiden *G. caledonium*-Proben zwischen 381 und 2960 (*G. mosseae*-Äquivalente). Bei der *G. caledonium*-Probe konnten keine Kopien gemessen werden.

Tab. 29: Ergebnisübersicht der molekularbiologischen Untersuchungen. Zum Vergleich ist die Hyphen-Kolonisierungsrate angegeben (siehe Kapitel 3.6). Aclong: *A. longula*, Ampli: Amplifikationsfähigkeit, Gca: *G. caledonium*, Gge: *G. geosporum*, Glmoss: *G. mosseae*-Gruppe, Gmo: *G. mosseae*, HC: Hyphen-Kolonisierungsrate, Hol: *H. lanatus*, KopAI: Kopien *A. longula*/mg Wurzel, KopGm: Kopien *G. mosseae*(-Gruppe)/mg Wurzel, n.d.: nicht untersucht, Pla: *P. lanceolata*, SeqTyp: Sequenztyp, Tri: *T. repens*.

Pflanze	Punkt	Ampli	Glmoss	SeqTyp	KopGm	Aclong	KopAI	HC
<b>10.04.2000</b>								
Pla	I	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	64%
Pla	II	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	70%
Pla	III	+	++	Gmo	9327	-	n.d.	66%
Pla	1	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47%
Pla	2	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	50%
Pla	3	++	-	n.d.	n.d.	++	4489	67%
Pla	4	++	+	Gmo	37136	(+)	0	66%
Pla	5	++	+	Gge	0	+	3910	67%
Tri	I	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	19%
Tri	II	+	-	n.d.	n.d.	(+)	2967	56%
Tri	III	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	39%
Tri	1	++	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20%
Tri	2	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	40%
Tri	3	++	-	n.d.	n.d.	++	13300	21%
Tri	4	++	-	n.d.	n.d.	+	5150	17%
Tri	5	++	-	n.d.	n.d.	(+)	5680	40%
Hol	I	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14%
Hol	II	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	41%
Hol	III	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	6%
<b>01.08.2000</b>								
Pla	I	++	-	n.d.	n.d.	(+)	0	36%
Pla	II	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	53%
Pla	III	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	68%
Tri	I	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	60%
Tri	II	+	-	n.d.	n.d.	(+)	0	31%
Tri	III	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	82%
Hol	I	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4%
Hol	II	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	17%
Hol	III	+	+	Gca	2960	-	n.d.	3%

Tab. 29: (Fortsetzung)

11.06.2001								
Pla	I	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	33%
Pla	II	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	11%
Pla	III	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6%
Tri	I	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	29%
Tri	II	-	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	10%
Tri	III	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	36%
Hol	I	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	18%
Hol	II	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	11%
Hol	III	+	-	n.d.	n.d.	++	4489	20%
22.08.2001								
Pla	I	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	32%
Pla	II	+	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	37%
Pla	III	+	++	Gmo	64750	-	n.d.	56%
Pla	1	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	5%
Pla	2	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	17%
Pla	3	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	24%
Pla	4	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	38%
Pla	5	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	26%
Tri	I	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	27%
Tri	II	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	19%
Tri	III	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	17%
Tri	1	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	23%
Tri	2	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	26%
Tri	3	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	13%
Tri	4	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	27%
Tri	5	++	-	n.d.	n.d.	(+)	0	23%
Hol	I	+	+	Gmo	4783	-	n.d.	0%
Hol	II	+	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	7%
Hol	III	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	16%
27.08.2001								
Zea	A15	+	++	Gca	381	-	n.d.	4%
Sol	A19	++	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	9%
Sol	A17	++	-	n.d.	n.d.	(+)	0	13%
Hel	A06	++	++	Gmo	1094	-	n.d.	31%
Hel	A06	++	-	n.d.	n.d.	(+)	0	12%
Tra	A21	-	+	Gmo	661	n.d.	n.d.	50%
Tra	A16	(+)	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17%
Zea	A15	(+)	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6%

### 3.5 Bestimmung der Mykorrhizapilze anhand der Sporenmorphologie

Neben der Überprüfung der Referenzkulturen aufgrund der Sporenbildung wurden auch Freilandproben von W02 und W21 stichprobenhaft auf vorhandene Sporen untersucht. Die isolierten Sporen wurden zunächst nach ihrer Färbung in helle, bräunliche und dunkle Sporen getrennt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Sporenwände. Die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung sind in Tab. 30 wiedergegeben. Demnach konnten 6 verschiedene Sporentypen nachgewiesen werden. Eine exakte Artbestimmung war jedoch nicht möglich (s. Kapitel 2.2.11). Die überwiegende Mehrzahl der gefundenen Sporen (ca. 70 %) gehörten zu *G. mosseae* (Abb. 29) oder waren dieser Art sehr ähnlich. *Gigaspora*-Sporen konnten nicht direkt nachgewiesen werden, jedoch fanden sich mehrere Hilfszellen.

Tab. 30: Ergebnis der morphologischen Sporenuntersuchung.

Häufigkeit	Sporentyp
ca. 70 %	<i>Glomus mosseae</i> -ähnlich
ca. 10 %	<i>Glomus geosporum</i> -ähnlich
ca. 5 %	<i>Glomus pubescens</i> - bzw. <i>G. arboreense</i> -ähnlich
ca. 5 %	<i>Archaeospora leptoticha</i> ( <i>Glomus leptotichum</i> )-ähnlich
ca. 5 %	<i>Acaulospora delicata</i> -ähnlich
ca. 5 %	<i>Gigaspora</i> sp. (kein Sporennachweis aber Vorkommen von Hilfszellen)

### 3.6 Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades in Freilandproben

Abb. 30 zeigt mit Trypanblau gefärbte Pilzhyphen, mehrere Arbuskel sowie ein Vesikel. Im Hintergrund sind ungefärbte Pflanzenzellen zu erkennen. Die Bonitierung erfolgte je Probe an ca. 30 bis 100 Stellen (n) für die Flächen W02 (Tab. 31) und W21 (Tab. 32). Während Pilzhyphen und Vesikel leicht zu erkennen waren, kann die Erfassung der Arbuskel unter Umständen unvollständig gewesen sein, da ihre Identifizierung vor allem in dickeren Wurzelbereichen, wo sie häufig nur als diffuse „Wolke“ zu erkennen waren, Probleme bereitete. Insgesamt ist die mikroskopische Bonitierung der Mykorrhizierung gefärbter Präparate subjektiv und nur bedingt aussagekräftig, was sich auch in den hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Aus diesem Grund wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

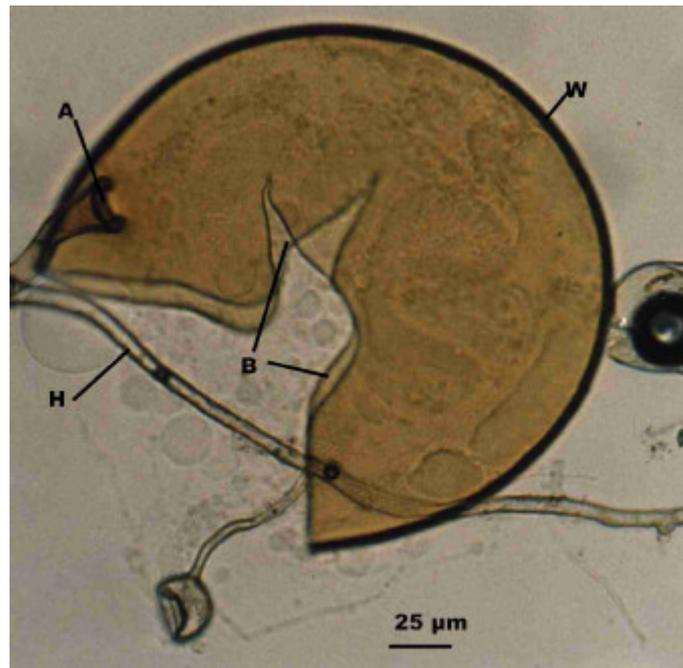


Abb. 29: Sporenquetschpräparat von *G. mosseae*. A: Hyphenansatzstelle, B: Bruchstelle der Sporenwand, H: Hyphe, W: Sporenwand.

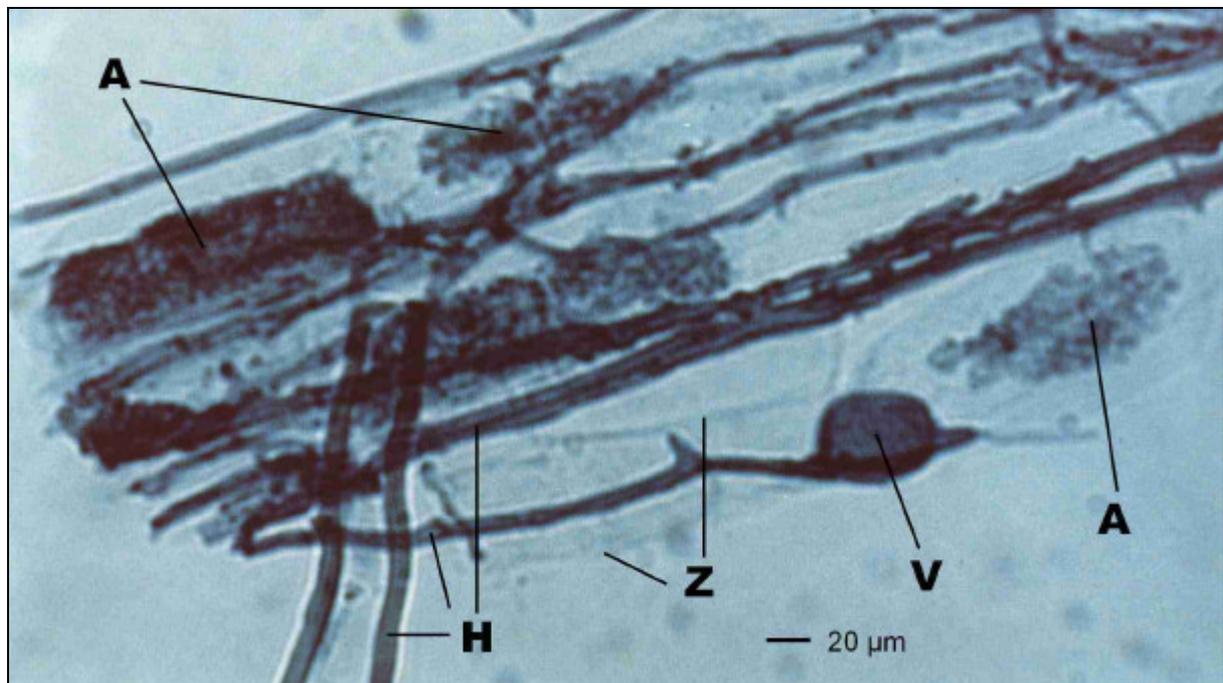


Abb. 30: *P. lanceolata*-Wurzel nach Trypanblaufärbung. A: Arbuskel, H: Pilzhypen, V: Vesikel, Z: Pflanzenzellwände.

Auf der Wiese (W02) steigt demnach die Kolonisierung mit Hyphen von oben (HC = 42%) nach unten (HC = 47%) durchschnittlich leicht an (Abb. 31). Bei den untersuchten Pflanzen zeigt sich ein deutlicheres Bild: *P. lanceolata* besitzt die höchsten Kolonisierungsraten (HC = 48%, VC = 16%, AC = 5%), gefolgt von *T. repens* (HC = 44%, VC = 6%, AC = 1%) und zuletzt *H. lanatus* (HC = 40%, VC = 4%, AC = 1%). Vor allem die relativ zahlreichen Vesikel und Arbuskel fallen bei *P. lanceolata* auf. *H. lanatus* besitzt eine sehr variable Hyphen-Kolonisierungsrate, was sich in der hohen Standardabweichung niederschlägt (Abb. 32). Im Laufe eines Jahres zeigt sich eine deutliche Zunahme der Hyphenkolonisierung (Abb. 33). So stieg sie im Jahr 2000 von durchschnittlich 36% (April) über 59% (Anfang August) auf bis zu 77% (Oktober). Im folgenden Jahr wiederholt sich diese Entwicklung, wenn auch abgeschwächt, von 16% (Juni) auf 23% (August). Eine gegensätzliche Entwicklung zeigt sich jedoch bei der Vesikelkolonisierung. Diese nimmt im Jahr 2000 kontinuierlich von durchschnittlich 15% (April) über 11% (Anfang August) auf nur noch 5% ab (Anfang Oktober). Im Jahr 2001 sinkt VC ebenfalls von 11% (Juni) auf 2% im August.

Tab. 31: Mykorrhizierung der Pflanzen auf der Wiese (W02). Kolonisierungsrate mit Hyphen (HC), Vesikeln (VC) und Arbuskeln (AC), n: untersuchte Stellen.

Position	<i>P. lanceolata</i>				<i>T. repens</i>				<i>H. lanatus</i>			
	HC	VC	AC	n	HC	VC	AC	n	HC	VC	AC	n
<b>10. April 2000</b>												
oben	64%	25%	5%	81	19%	10%	0%	62	14%	3%	0%	107
Mitte	70%	33%	23%	40	56%	13%	5%	223	41%	12%	0%	34
unten	66%	31%	16%	102	39%	3%	2%	94	6%	1%	0%	77
<b>1. August 2000</b>												
oben	36%	18%	0%	11	60%	0%	0%	25	58%	4%	0%	24
Mitte	53%	7%	0%	30	31%	0%	0%	13	67%	17%	0%	18
unten	68%	26%	3%	31	82%	23%	0%	22	75%	3%	0%	33
<b>2. Oktober 2000</b>												
oben	63%	29%	17%	24	92%	4%	0%	26	90%	0%	0%	20
Mitte	88%	8%	0%	26	72%	0%	0%	18	96%	0%	0%	24
unten	37%	3%	0%	30	85%	0%	0%	20	84%	0%	0%	32
<b>11. Juni 2001</b>												
oben	33%	20%	0%	40	29%	15%	3%	34	18%	4%	0%	67
Mitte	11%	19%	9%	54	10%	7%	7%	30	11%	7%	5%	57
unten	6%	7%	0%	54	36%	15%	0%	47	20%	5%	5%	61
<b>22. August 2001</b>												
oben	32%	4%	0%	68	27%	0%	1%	180	0%	0%	0%	98
Mitte	37%	0%	0%	73	19%	2%	0%	223	7%	0%	0%	91
unten	56%	6%	0%	131	17%	5%	1%	132	16%	1%	0%	82

Tab. 32: Mykorrhizierung der Pflanzen auf der Weide (W21). Kolonisierungsrate mit Hyphen (HC), Vesikeln (VC) und Arbuskeln (AC), n: untersuchte Stellen.

Position	<i>P. lanceolata</i>				<i>T. repens</i>			
	HC	VC	AC	n	HC	VC	AC	n
<b>5. Mai 1999</b>								
oben	90%	33%	0%	21	43%	5%	0%	60
Mitte	95%	11%	5%	19	97%	0%	0%	32
unten	94%	6%	0%	66	58%	3%	0%	40
<b>10. April 2000</b>								
oben	47%	11%	4%	73	20%	2%	4%	49
Mitte oben	50%	0%	0%	4	40%	12%	0%	99
Mitte	67%	36%	0%	42	21%	4%	0%	57
Mitte unten	66%	19%	4%	116	17%	0%	0%	36
unten	67%	7%	5%	61	40%	4%	12%	137
<b>29. Juni 2000</b>								
oben	73%	15%	0%	33	63%	13%	0%	8
Mitte oben	70%	26%	17%	23	61%	6%	11%	18
Mitte	39%	24%	3%	38	80%	20%	0%	20
Mitte unten	70%	13%	3%	32	88%	12%	6%	17
unten	30%	4%	0%	27	69%	0%	0%	14
<b>2. Oktober 2000</b>								
oben	69%	0%	3%	36	64%	0%	0%	25
Mitte oben	50%	0%	7%	28	55%	5%	0%	22
Mitte	79%	24%	10%	29	13%	0%	6%	16
Mitte unten	97%	43%	8%	36	65%	0%	0%	20
unten	95%	14%	0%	22	55%	5%	0%	20
<b>22. August 2001</b>								
oben	5%	0%	0%	37	23%	1%	1%	75
Mitte oben	17%	8%	1%	75	26%	7%	0%	76
Mitte	24%	1%	0%	135	13%	1%	1%	84
Mitte unten	38%	5%	3%	76	27%	6%	1%	101
unten	26%	6%	0%	80	23%	8%	1%	88

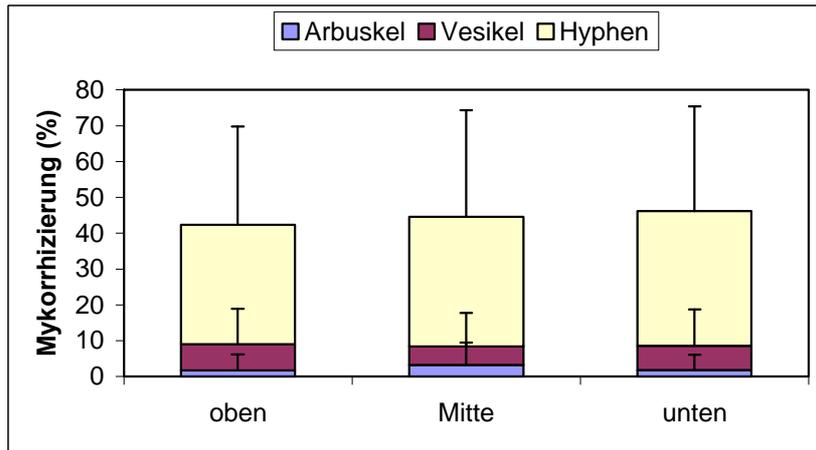


Abb. 31: Mykorrhizierungsraten nach Position (W02). Standardabweichung: Balken = 1s.

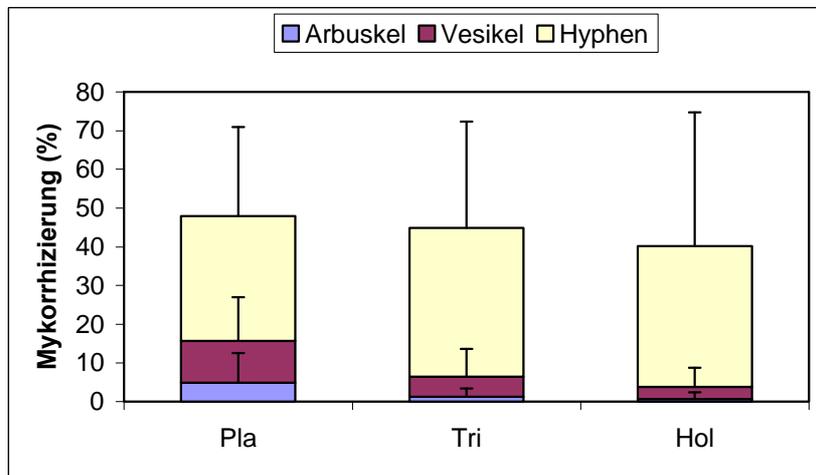


Abb. 32: Mykorrhizierungsraten nach Pflanzen (W02). Standardabweichung: Balken = 1s.  
Hol: *H. lanatus*, Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*.

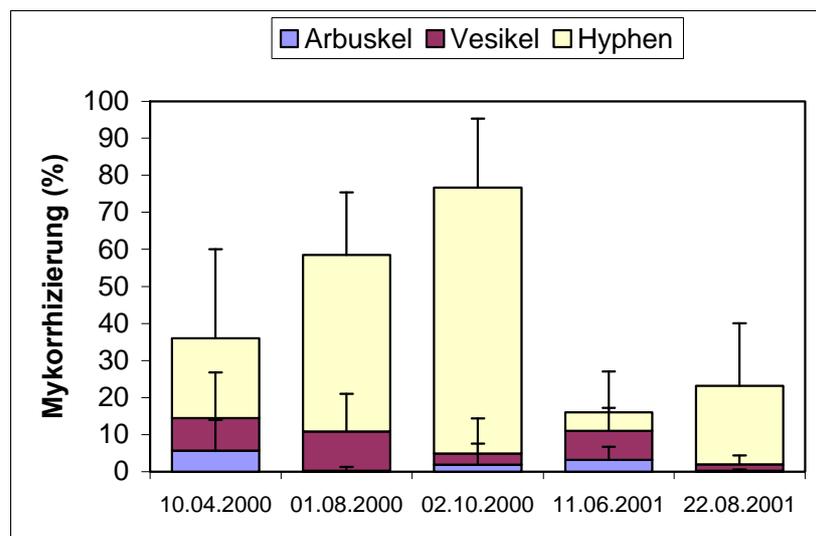


Abb. 33: Mykorrhizierungsraten nach Probennahmeterminen (W02). Standardabweichung: Balken = 1s.

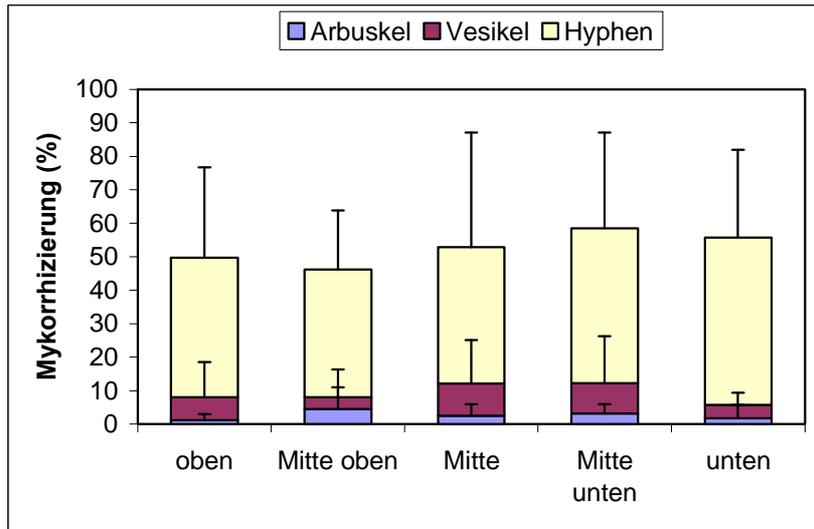


Abb. 34: Mykorrhizierungsraten nach Position (W21). Standardabweichung: Balken = 1s.

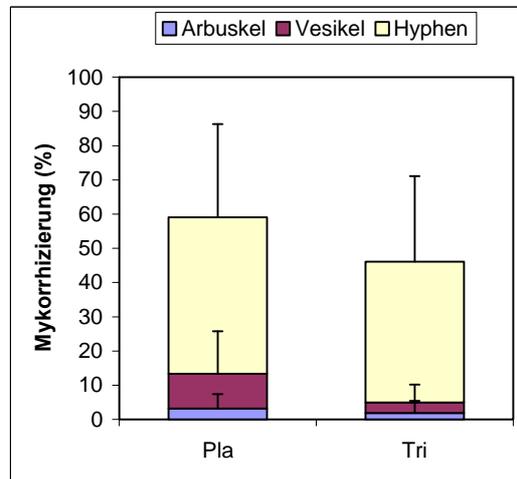


Abb. 35: Mykorrhizierungsraten nach Pflanzen (W21). Standardabweichung: Balken = 1s. Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*.

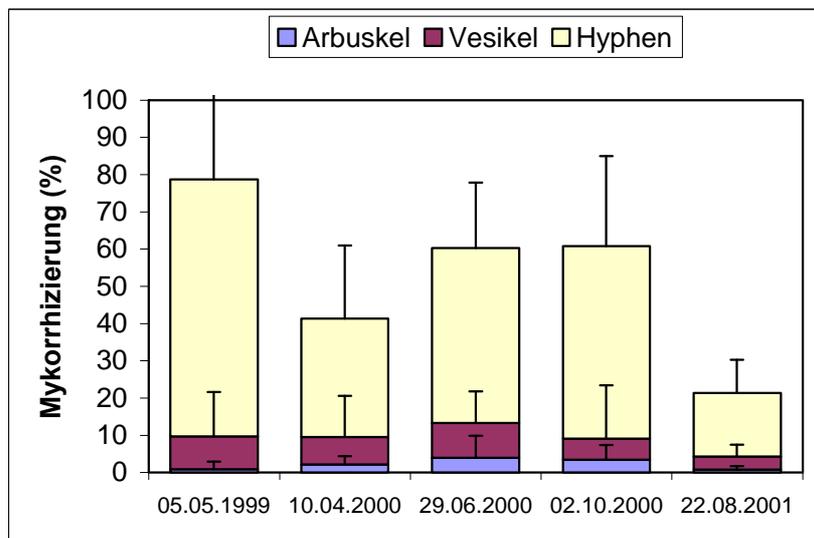


Abb. 36: Mykorrhizierungsraten nach Probenahmeterminen (W21). Standardabweichung: Balken = 1s.

Auf der Weide (W21) betrug die Hyphenkolonisierung an allen Probenahmepunkten etwa 50% (von oben nach unten sinkt sie zunächst etwas auf 47%, steigt wieder auf 58% an und beträgt schließlich unten 56%. Bei den Vesikeln zeigt sich ein ähnliches Bild, nur die Arbuskelkolonisierung ist mit 5% Mitte oben (Position 2) am höchsten (Abb. 34). Bei den untersuchten Pflanzen wiederholt sich ein ähnliches Bild wie schon auf der Wiese: *P. lanceolata* besitzt mit Kolonisierungsraten von HC = 59%, VC = 13% und AC = 3% höhere Werte als *T. repens* mit 56%, 5% und 2%. (Abb. 35). Der Einfluss der Jahreszeiten ist schwierig zu interpretieren. Die drei Beprobungsterminen des Jahres 2000 für sich genommen zeigen auf der Wiese eine durchschnittliche Zunahme der Hyphenkolonisierung von 41% (April) auf 60% (Juni) bzw. 61% im Oktober. Jahresspezifische Einflüsse könnten hierbei ebenfalls eine Rolle spielen (Abb. 36).

### 3.7 Phosphatgehalte

Um die Sensitivität und Nachweisgrenze der gewählten Messmethode zu bestimmen, wurde zunächst eine Kalibrierung mithilfe eines Phosphatstandards vorgenommen, wobei jeder Wert fünffach bestimmt wurde (Abb. 37). Der gemessene Farbstoff Molybdänblau wies einen linearen Messbereich bis etwa 1,4 Absorptionseinheiten auf, was einer Phosphatkonzentration von ca. 10 mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  entspricht. Bei höheren Konzentrationen flacht die Extinktionskurve allmählich ab. Als Nachweisgrenze wurde der Wert bei 0,1 Absorptionseinheiten herangezogen und auf 0,6 mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  festgelegt. Bodenproben mit mehr als 40 mg  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  je 100 g Boden mussten verdünnt gemessen werden.

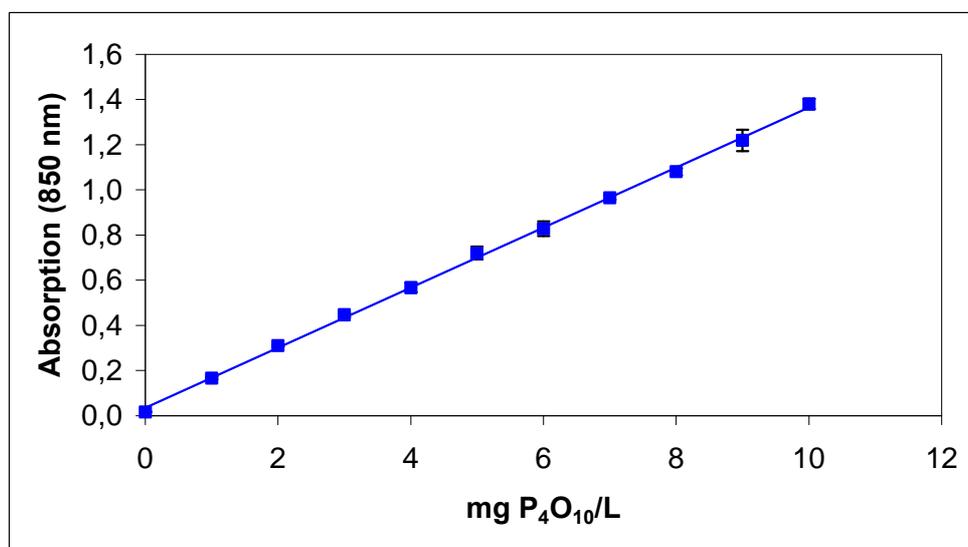


Abb. 37: Kalibriergerade der Phosphatmessung. Standardabweichung: Balken =  $\pm 1s$ .

Die  $P_4O_{10}$ -Werte der Bodenproben von W02 (Wiese) lagen im Bereich zwischen 0,97 bis 4,24 mit einem Mittelwert bei 2,14 mg/100 g Boden (Tab. 33). Zwischen den unterschiedlichen Positionen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 38). Die durchschnittlichen Phosphatgehalte bei *P. lanceolata* und *H. lanatus* waren mit 2,35 bzw. 2,23 mg/100 g Boden fast identisch (Abb. 39). Nur bei *T. repens* lagen diese mit 1,84 mg/100 g Boden etwas niedriger. Dagegen nahmen die Gehalte von April 1999 (2,64 mg/100 g Boden) bis Oktober 2000 (1,53 mg/100 g Boden) etwas ab, während sie bis August 2001 (2,50 mg/100 g Boden) wieder anstiegen (Abb. 40).

Tab. 33: Phosphatgehalte der Wiese W02. Mittelwerte mit Standardabweichung in mg  $P_4O_{10}$ /100 mg Boden.

Position	<i>P. lanceolata</i>	<i>T. repens</i>	<i>H. lanatus</i>
<b>10. April 2000</b>			
oben	3,30 ± 0,07	3,33 ± 0,04	2,96 ± 0,07
Mitte	3,58 ± 0,07	2,73 ± 0,86	2,37 ± 0,04
unten	2,08 ± 0,03	1,35 ± 0,03	2,08 ± 0,03
<b>1. August 2000</b>			
oben	1,79 ± 0,06	2,42 ± 0,19	2,06 ± 0,19
Mitte	2,06 ± 0,06	1,92 ± 0,00	4,05 ± 0,06
unten	1,56 ± 0,00	1,74 ± 0,00	1,38 ± 0,00
<b>2. Oktober 2000</b>			
oben	1,78 ± 0,00	1,28 ± 0,00	1,87 ± 0,00
Mitte	1,63 ± 0,08	1,28 ± 0,00	1,18 ± 0,00
unten	1,58 ± 0,00	1,92 ± 0,38	1,28 ± 0,00
<b>11. Juni 2001</b>			
oben	2,11 ± 0,07	1,91 ± 0,00	1,50 ± 0,00
Mitte	1,24 ± 0,00	0,97 ± 0,17	1,61 ± 0,03
unten	4,24 ± 0,99	1,47 ± 0,10	2,15 ± 0,04
<b>22. August 2001</b>			
oben	2,46 ± 0,04	1,99 ± 0,01	3,07 ± 0,01
Mitte	2,82 ± 0,15	1,82 ± 0,03	3,44 ± 0,04
unten	2,98 ± 0,08	1,54 ± 0,17	2,41 ± 0,13

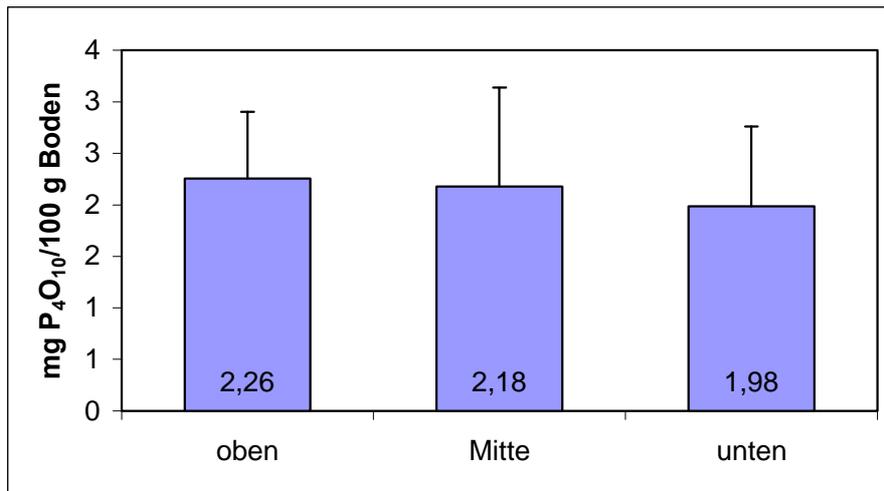


Abb. 38: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Position (W02). Standardabweichung: Balken = 1s.

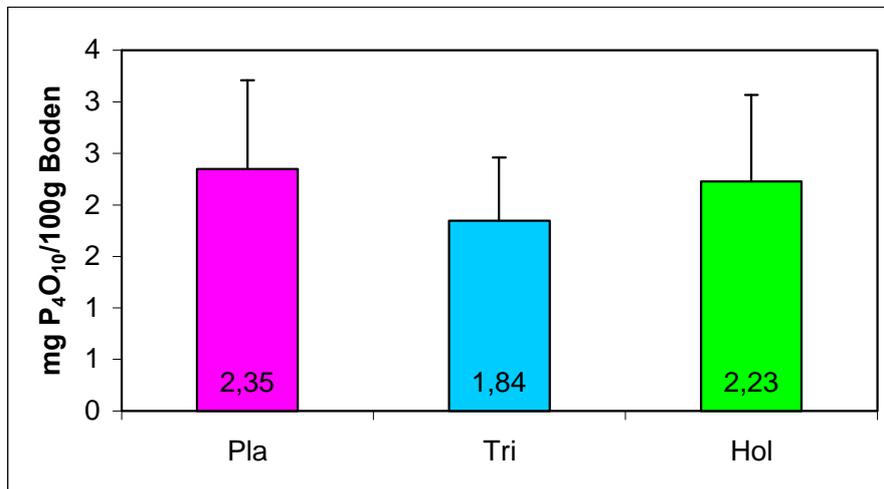


Abb. 39: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Pflanze (W02). Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*, Hol: *H. lanatus*. Standardabweichung: Balken = 1s.

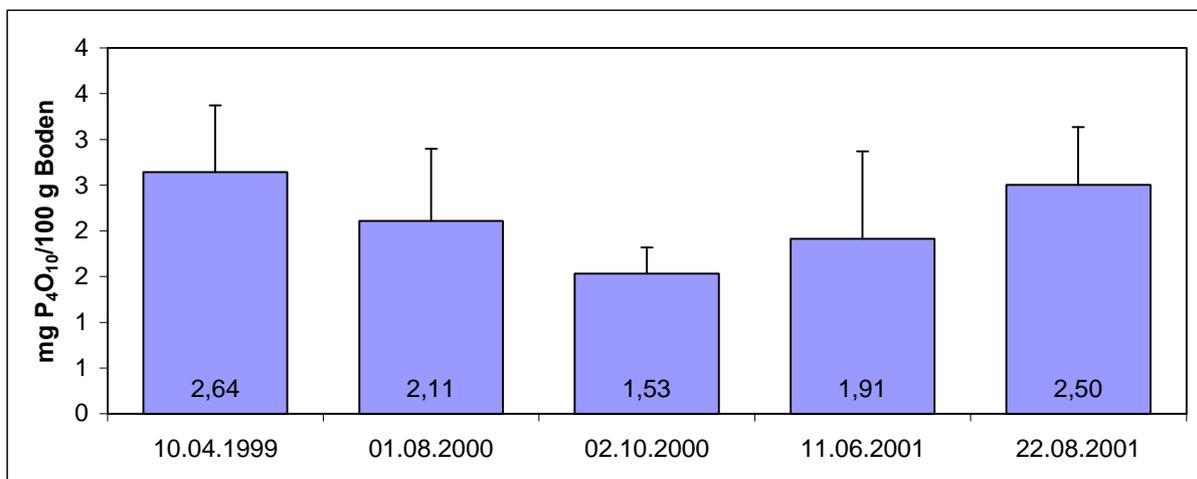


Abb. 40: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Probennahmeterrinen (W02). Standardabweichung: Balken = 1s.

Tab. 34: Phosphatgehalte der Weide W21. Mittelwerte mit Standardabweichung in mg P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>/100 mg Boden.

Position	<i>P. lanceolata</i>	<i>T. repens</i>
<b>5. Mai 1999</b>		
oben	8,60 ± 0,26	9,69 ± 0,26
Mitte	19,10 ± 0,26	20,92 ± 0,26
unten	19,28 ± 0,00	45,45 ± 0,51
<b>10. April 2000</b>		
oben	11,34 ± 0,70	7,09 ± 0,15
Mitte oben	4,15 ± 0,00	3,67 ± 0,11
Mitte	2,37 ± 0,04	2,93 ± 0,04
Mitte unten	3,47 ± 0,07	4,43 ± 0,07
unten	> 16	9,18 ± 0,23
<b>29. Juni 2000</b>		
oben	32,77 ± 0,34	15,49 ± 0,63
Mitte oben	5,94 ± 0,23	5,98 ± 0,28
Mitte	6,51 ± 2,16	3,13 ± 0,50
Mitte unten	3,95 ± 0,39	4,80 ± 0,23
unten	31,02 ± 2,24	25,45 ± 0,23
<b>2. Oktober 2000</b>		
oben	28,94 ± 0,59	34,91 1,18
Mitte oben	14,87 ± 0,89	10,88 0,30
Mitte	10,08 ± 0,30	11,68 0,30
Mitte unten	11,28 ± 0,30	16,86 0,29
unten	52,84 ± 0,58	38,90 0,00
<b>22. August 2001</b>		
oben	10,02 ± 0,15	13,75 ± 0,02
Mitte oben	3,07 ± 0,03	5,28 ± 0,05
Mitte	2,26 ± 0,04	4,48 ± 0,11
Mitte unten	14,07 ± 0,16	13,60 ± 0,14
unten	12,39 ± 0,02	8,51 ± 0,04

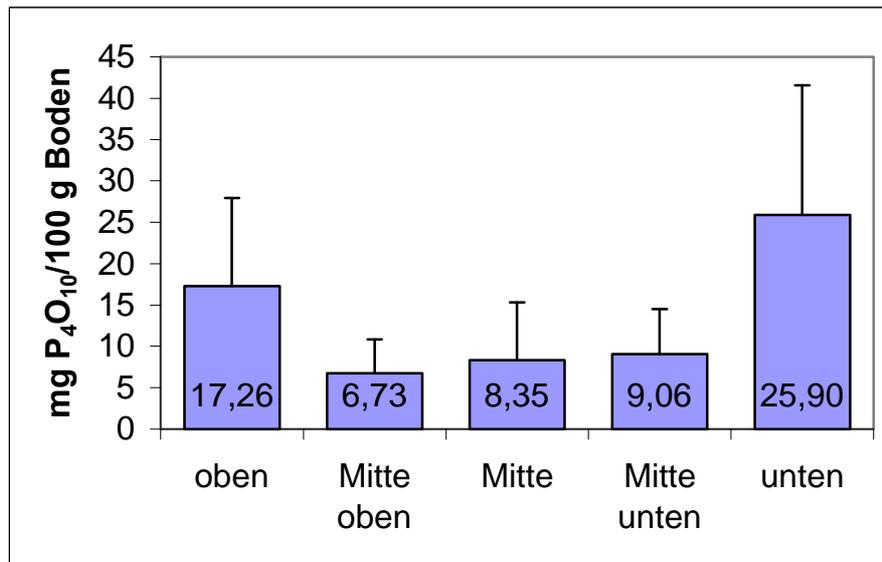


Abb. 41: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Position (W21). Standardabweichung: Balken = 1s.

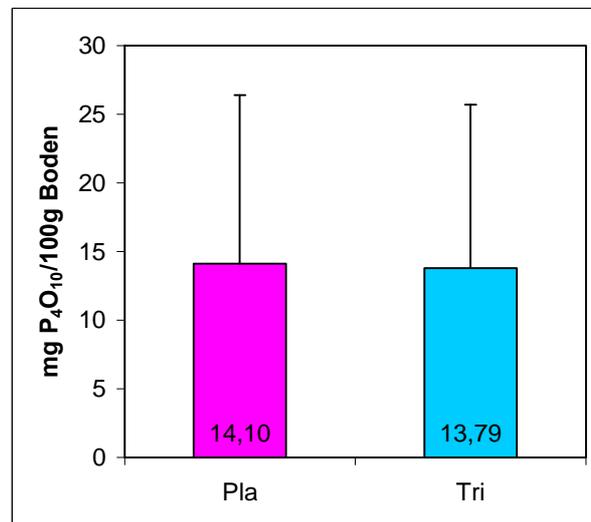


Abb. 42: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Pflanze (W21). Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*. Standardabweichung: Balken = 1s.

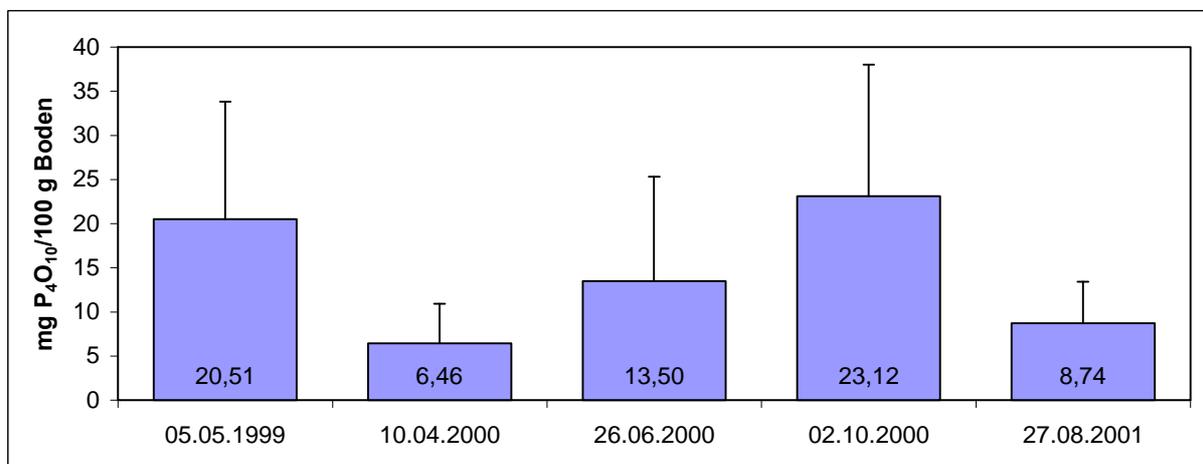


Abb. 43: Durchschnittlicher Phosphatgehalt nach Probenahmeterminen (W21). Standardabweichung: Balken = 1s.

Die  $P_4O_{10}$ -Werte der Bodenproben von W21 (Weide) lagen breit gestreut im Bereich zwischen 2,26 und 52,84 mg/100 g Boden mit einem Mittelwert von 13,94 mg/100 g Boden (Tab. 34). Bei den unterschiedlichen Positionen zeigte sich, dass die flacheren Standorte („oben“ mit durchschnittlich 17,26 und „unten“ mit 25,90 mg/100 g Boden deutlich höhere Werte besaßen, als die steileren „mittleren“ Standorte mit Werten zwischen 6,73 und 9,06 mg/100 g Boden (Abb. 41). Die durchschnittlichen Phosphatgehalte bei *P. lanceolata* und *T. repens* waren mit 14,10 bzw. 13,79 mg/100 g Boden nahezu identisch (Abb. 42). Im jahreszeitlichen Ablauf zeigte sich jeweils eine Abnahme über den Winter, sowie eine deutliche Zunahme von April (6,46 mg/100 g Boden) über August (13,50 mg/100 g Boden) bis Oktober (23,12 mg/100 g Boden; Abb. 43).

### 3.8 Zusammenhang zwischen Mykorrhizierungsgrad und Phosphatgehalt

Die einzelnen Mykorrhizierungswerte wurden für jede Pflanze mit den entsprechenden Phosphatwerten korreliert. Die Hyphen- (HC) und Vesikel-Kolonisierungsraten (VC) wurden getrennt dargestellt. Die Arbuskel-Kolonisierung (AC) wurde nicht berücksichtigt, da der Nachweis von Arbuskeln relativ schwierig ist und nur geringe Kolonisierungsraten gefunden wurden.

Auf der Wiese W02 zeigt sich bei *P. lanceolata* und *T. repens* praktisch kein direkter Zusammenhang zwischen Hyphenkolonisierung HC und dem verfügbaren Phosphatgehalt des anhaftenden Bodens ( $r = -0,139$  bzw.  $-0,091$ ; Abb. 44). Bei *H. lanatus* hingegen läßt sich bei steigendem Phosphatgehalt eine Abnahme der Hyphenkolonisierung erkennen ( $r = -0,389$ ). Auch bei der Vesikelkolonisierungsrate läßt sich bei *P. lanceolata* und *T. repens* kein direkter Zusammenhang mit dem Phosphatgehalt feststellen ( $r = -0,066$  bzw.  $0,128$ ). Bei *H. lanatus* wiederum deutet sich ein Vesikel-Zunahme bei steigendem Phosphatgehalt an ( $r = 0,414$ ; Abb. 45).

Auch auf der Weide W21 ist keine direkte Korrelation zwischen Mykorrhizierung und Phosphatgehalt bei *P. lanceolata* und *T. repens* erkennbar (Abb. 46 und Abb. 47). Selbst vergleichsweise sehr hohe Phosphatwerte konnten mit starker Hyphenkolonisierung einhergehen.

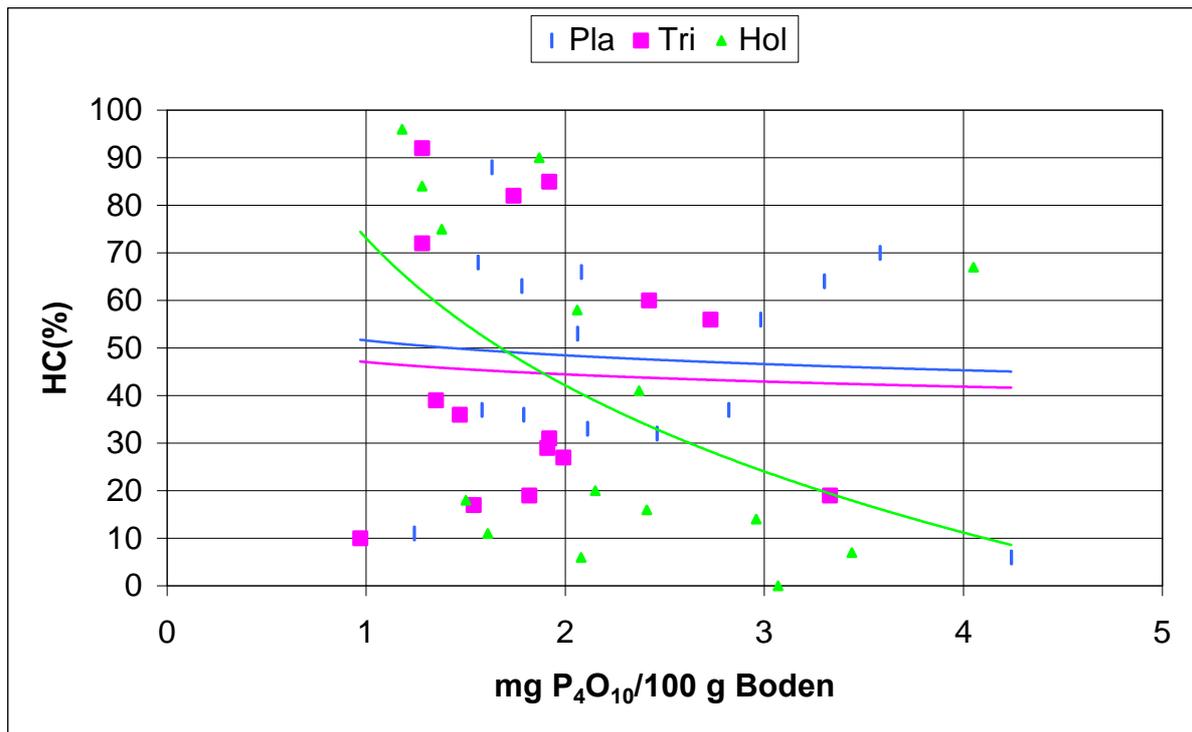


Abb. 44: Hyphenkolonisierung in Abhängigkeit vom CAL-Phosphatgehalt des Bodens (W02).  
Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*, Hol: *H. lanatus*.

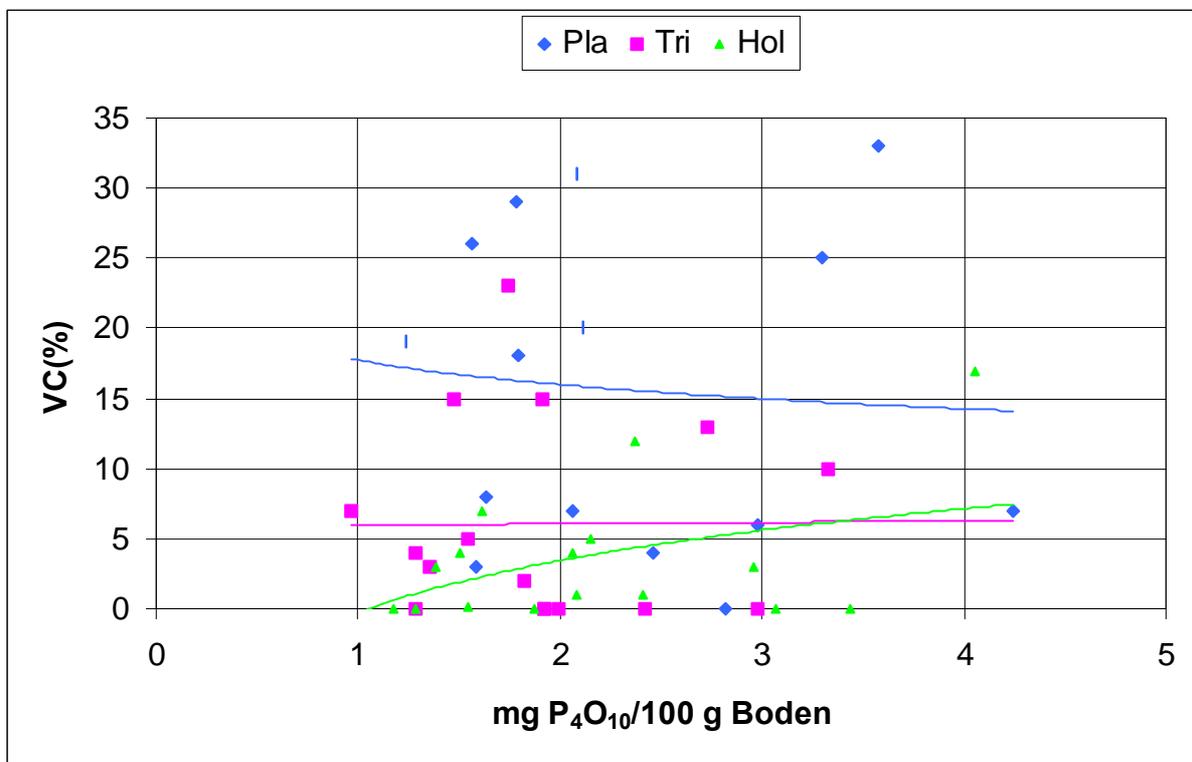


Abb. 45: Vesikelkolonisierung in Abhängigkeit vom CAL-Phosphatgehalt des Bodens (W02).  
Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*, Hol: *H. lanatus*.

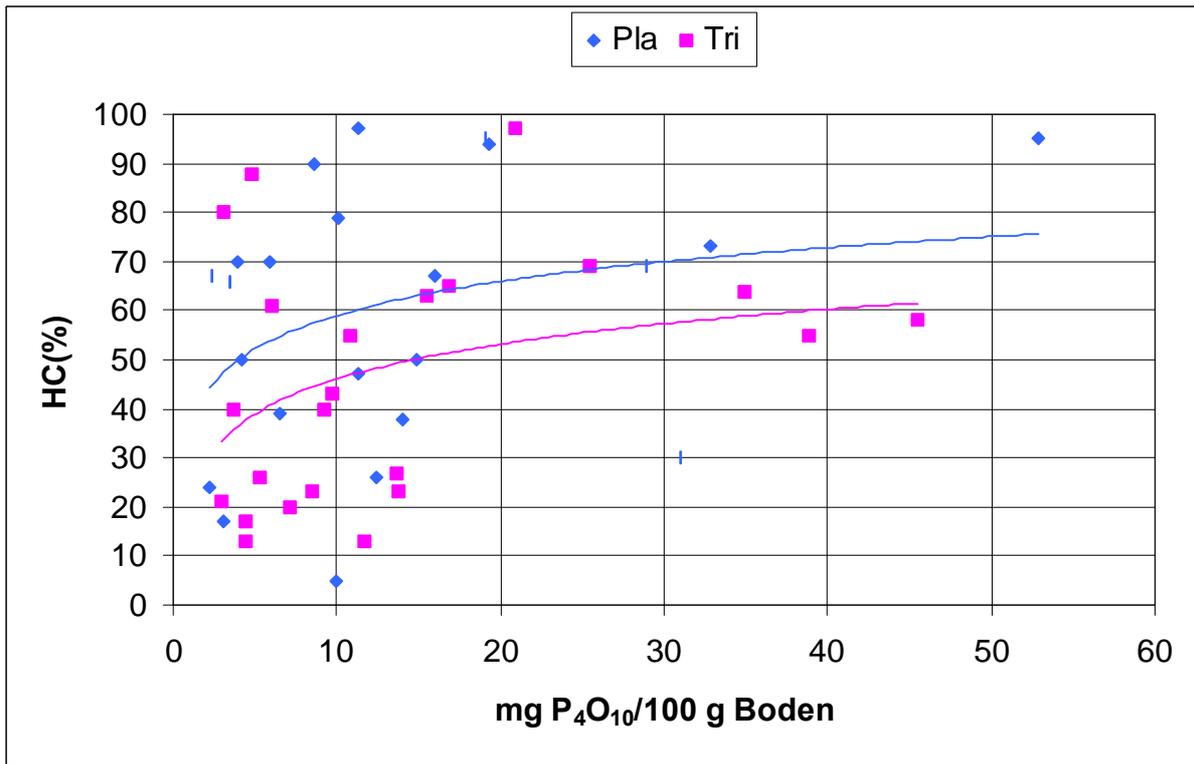


Abb. 46: Hyphenkolonisierung in Abhängigkeit vom CAL-Phosphatgehalt des Bodens (W21).  
Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*.

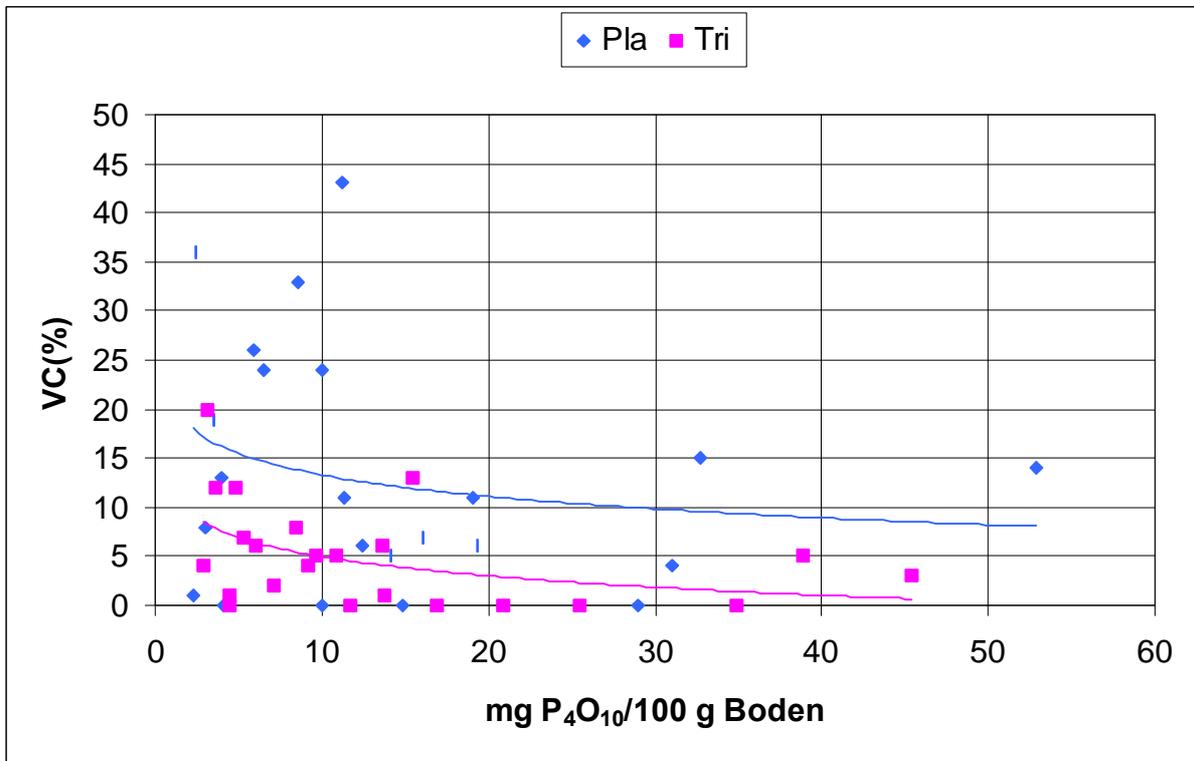


Abb. 47: Vesikelkolonisierung in Abhängigkeit vom CAL-Phosphatgehalt des Bodens (W21).  
Pla: *P. lanceolata*, Tri: *T. repens*.

## 4 Diskussion

Parallel zum wachsenden Interesse an der arbuskulären Mykorrhiza fand in den letzten Jahren ein Umdenken in der Landwirtschaft hin zu einer nachhaltigen Landnutzung statt. Die Forschungsergebnisse, die aus Gewächshausversuchen gewonnen werden konnten, versprechen vielfache Anwendungsmöglichkeiten der AMF, so bei der Reduktion von Dünger, dem Schutz vor Pathogenen und der Begrünung erodierter oder desertifizierter Flächen. Dennoch ist bislang relativ wenig über sie bekannt und vor allem ihre biologische Funktion im Freiland bietet noch zahlreiche Forschungsoptionen, z.B. die Einflüsse unterschiedlichen Arten auf die Nährstoffversorgung der Pflanzen. Der artspezifische Nachweis einzelner AMF-Arten in ihrer natürlichen Umgebung ist das zentrale Thema dieser Arbeit. Hierzu mußten die vorhandenen Erkenntnisse der AMF-Forschung für eine Anwendung bei Freilandproben optimiert werden.

### 4.1 DNA-Extraktion aus Wurzelmaterial

Die Methode nach Doyle & Doyle (1987) brachte in der vorliegenden Arbeit nur wenig amplifizierbares Material. Die Methode nach BAHNWEG *et al.* (1998) führte zu guten Ergebnissen. Allerdings nicht mit „frischstem Material“ (BAHNWEG, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF-Forschungszentrum, mündliche Mitteilung), sondern mit gefriergetrockneten Proben. Der Vorteil dieser Extraktion ist, dass die Mengen beliebig variiert werden können. Bei Benzylchlorid handelt es sich jedoch um ein starkes Reizgas, das ebenso wie Chloroform und 2-Mercaptoethanol gesundheitlich bedenklich ist, so dass unter einem Abzug gearbeitet werden muss. Die besten Ergebnisse wurden mit dem modifizierten QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit erzielt, wobei entscheidend war, dass die frischen Wurzeln unverzüglich mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellyse der gefriergetrockneten Proben fand mit einer Kugelmühle in der Kältekammer statt. Die DNA-Extraktion aus Wurzeln mit kochender Natronlauge und anschließender salzsaurer Neutralisation nach REDECKER *et al.* (1997) konnte nicht reproduziert werden.

Auf den ersten Blick erscheint die Analyse von Sporen der beste und einfachste Weg, um die Diversität und Verbreitung von AMF zu untersuchen. So entwickelten z.B. REDECKER *et al.* (1997) eine PCR-RFLP-Methode zur Identifizierung einzelner Glomales-Arten. Die aus Sporen gewonnene DNA ist jedoch keinesfalls frei von Fremd-DNA (s. Kap. 4.6). Auch spiegelt die Verteilung von Sporen nicht die tatsächliche Mykorrhizierung in einer Wurzel wider.

Sporen können ein Reservoir potentieller Mykobionten darstellen. Um die tatsächliche Situation in den kolonisierten Wurzeln zu beschreiben, muß jedoch die Wurzel-DNA unter-

sucht werden. Die extrahierte DNA lieferte zunächst keine positiven Ergebnisse in der PCR, deshalb wurde nach Gründen für die schlechte Amplifizierbarkeit gesucht. Es war bereits bekannt, dass sowohl Pflanzenmaterial, als auch Bodenproben viele Substanzen enthalten, welche die DNA degradieren oder anderweitig die Polymerase-Kettenreaktion inhibieren können (ABU AL-SOUD & RADSTRÖM, 1988). Zu diesen unerwünschten Reagenzien gehören neben Polyphenolen und Polysacchariden in der Pflanze auch Huminstoffe im Boden. Polysaccharide und Tannine stellen ein großes Problem bei der PCR dar. Sie sind bei DNA-Extraktion nur schwer von der DNA abzutrennen und können DNA Polymerasen und Nukleasen inhibieren oder zu unspezifischen Produkten führen. Polyphenolische Substanzen können durch Phenoxidasen und Peroxidasen, die bei Verletzung Wurzel oder deren Austrocknung freigesetzt werden, zu freien Radikalen oxidiert werden. In dieser reaktiven Form können sie irreversibel an die DNA binden (ROWLAND & NGUYEN, 1993), die dadurch für die DNA Polymerase unlesbar wird. Auch Huminsäuren besitzen eine inhibierende Wirkung auf die DNA Polymerasen (TEBBE & VAJHEN, 1993). Allerdings haften diese in der Regel außen an der Wurzel und können durch eine gründliche Reinigung entfernt werden. Zunächst mußte also nach einer geeigneten DNA-Extraktionsmethode gesucht werden.

Mithilfe von CTAB kann jedoch die DNA präzipitiert werden, während die Polysaccharide in Lösung bleiben (MURRAY & THOMPSON, 1980). GEHRIG *et al.* (1998) extrahierten DNA aus Blättern von *Kalanchoe*-Arten mittels der CTAB-Methode (DOYLE & DOYLE, 1987). Bei 40% der Extrakte konnte in einer PCR kein Amplifikat erhalten werden. Die gleiche Extraktion mit sechs verschiedenen kommerziellen Kits führte zu noch geringeren Erfolgsquoten. BOITEUX *et al.* (1999) untersuchten sieben verschiedene Extraktionsmethoden an *Daucus carota*-Wurzeln und erzielten ebenfalls mit der CTAB-Methode die „besten Ergebnisse“. BOBOWSKI *et al.* (1999) verwendeten ebendiese Methode zur Extraktion von DNA aus Pflanzenblättern und -wurzeln. Dabei erhielten sie allerdings in nur 25% (Blätter) bzw. 3% (Wurzeln) der Fälle amplifizierbares Material. LINDER *et al.* (2000) stellen schließlich sehr treffend fest „*that extraction and purification of DNA from roots can be challenging*“.

## 4.2 Amplifizierbarkeit

Nach anfänglichen Schwierigkeiten konnten durch die optimierte DNA-Extraktion mit den universellen Primern A2R und B2L die meisten DNA-Proben (etwa 90%) amplifiziert werden. Das Zielgen der PCR, die rDNA, besitzt den Vorteil, dass es als *high copy gene* mit mehreren tausend Kopien innerhalb eines Genoms vorkommt (BUCHANAN *et al.*, 2000). ROGERS

& BENDICH (1987) geben 200 bis 22.000 rDNA-Kopien je Pflanzengenom an. Da das rRNA-Gen zudem in allen Organismen vorkommt, wird es gerne für phylogenetische Studien herangezogen. Bei den AMF kann die geringe DNA-Menge und der hohe Anteil an Pflanzen-DNA durch die hohe Kopienzahl der rDNA relativiert werden. TOTH *et al.* (1991) schätzten die Pilz-Biomasse bei *Allium cepa*-Wurzeln, die zu 76% kolonisiert waren, auf nur 4,3%. MALDONADO-MENDOZA *et al.* (2002) berechneten den Anteil von AMF-RNA auf 5-12% in den am meisten kolonisierten Wurzeln, so dass wohl optimistisch betrachtet von einem Anteil an Pilz-DNA von maximal 5% ausgegangen werden kann.

### 4.3 Spezifische Primer

Obwohl die SSU intensiver erforscht ist und zahlreiche Sequenzdaten zur Verfügung stehen, birgt die LSU rDNA vielleicht die bessere Information. Die variable Domäne D2 bietet Zielsequenzen für spezifische Primer und Endonukleasen (BÖHM, 2000). Außerdem konnte bisher keine Polymorphie innerhalb einzelner Sporen wie bei der ITS-Region nachgewiesen werden (Kap. 4.9). Mit den Primern Aclong87For und Aclong400Rev wurde bei fünf der amplifizierbaren Proben (9%) ein positives Signal erhalten. Bei weiteren acht Extrakten (15%) waren schwache Banden zu erkennen. Dabei könnte es sich um nahe Verwandte von *A. longula* handeln, bei denen die PCR weniger effizient ablief, oder um Proben mit sehr wenig *A. longula*-DNA. Mit dem Primerpaar Glmoss85For und Glmoss387Rev wurden neun positive Signale erhalten (17%), die entweder *G. mosseae* oder einer nah verwandten Art zuzuordnen sind.

Eine „Pilzspezifität“ der Primer reicht zum Nachweis der AMF in Wurzeln nicht aus, denn neben Pflanzen- und AMF-DNA können die Wurzelproben durch Fremd-DNA kontaminiert sein. So mussten bei fast allen Proben von *H. lanatus* und anderen Gräsern bei mikroskopischen Untersuchungen ein Befall mit *Polymyxa graminis* festgestellt werden. VANDENKOORNHUYSE *et al.* (2002) untersuchten Wurzeln von *Arrhenatherum elatius* und amplifizierten dabei Abschnitte der SSU rDNA mit pilzspezifischen Primern. Von den daraus erhaltenen 49 Sequenztypen ließen sich nur drei den AMF zuordnen. Die restlichen 46 gehörten zu den Basidiomycota, Ascomycota oder Zygomycota. Neben zahlreichen phytopathogenen Pilzen, die in Wurzeln vorkommen, können auch die AMF-Sporen selbst von Parasiten befallen sein. So konnten REDECKER *et al.* (1999) nachweisen, dass einige Sequenzen aus *Scutellospora castanea*-Sporen von Ascomyceten stammten. Daneben belegten WALLEY & GERMIDA (1996) Sporenwand-assoziierte Bakterien.

Da es sich bei den AMF um obligate Symbionten handelt, ist die Kultur nicht kontaminierter Stämme unmöglich (Redecker *et al.*, 1999). Versuche, axenische AMF-Kulturen zu etablieren, sind bislang gescheitert. Zwar ist es möglich, Sporen zum Keimen zu bringen, doch die Hyphen sterben spätestens nach zwei Wochen ab, wenn sie auf keine Wirtswurzel stoßen und alle möglichen untersuchten Kombinationen von Kohlenstoff-Substraten konnten den Pilz bisher nicht zur Vollendung seines Lebenszyklus anregen (Bago, 2000).

SIMON *et al.* (1992) veröffentlichten den ersten „Glomales-spezifischen“ Primer, nachdem sie die SSU rDNA-Sequenzen dreier Glomales-Arten miteinander verglichen hatten, die damals zur Verfügung standen. Zahlreiche Autoren haben darauf hingewiesen, dass VANS1 „Probleme bei der PCR“ verursachte (CLAPP *et al.*, 1995 und 1999; REDECKER, 1999) oder nur „schwache Amplifikationsprodukte“ lieferte (GEHRIG *et al.* 1996). CLAPP *et al.* (1999) zeigten, dass die *Annealing site* von VANS1 innerhalb der Glomales nicht konserviert ist. Einige Arten wurden von diesem Primer überhaupt nicht erkannt (REDECKER, 2000). SCHÜBLER *et al.* (2001a) bestätigten, dass VANS1 weder für die AMF im allgemeinen, noch für eine ihrer taxonomischen oder phylogenetischen Gruppen spezifisch ist. Die Autoren konnten auch belegen, dass die „familienspezifischen“ Primer VAACAU, VAGLO, VALETC und VAGIGA (SIMON, 1993a) keine Spezifität für die Familien der Acaulosporaceae, Glomaceae und Gigasporaceae besitzen.

Ein ähnliches Resultat fand sich bei dem pilzspezifischen Primer AM1 (HELGASON *et al.*, 1998), der zwar erfolgreich Pflanzen diskriminiert (bei *Zea mays* differieren 8 von 20 Basen), jedoch ebenso *Geosiphon pyriforme*, *Archaeospora gerdemannii*, *Archaeospora trappei* (3/20) und *Paraglomus occultum* (4/20). Der Versuch, alle Vertreter der arbuskulären Mykorrhizapilze durch geeignete Primer zu erfassen, muß bis heute als gescheitert betrachtet werden, da nach wie vor im besten Fall Untergruppen amplifiziert werden können (SCHÜBLER *et al.*, 2001a).

REDECKER (2000) veröffentlichte Primer mit spezifischen Bindungseigenschaften für eine *G. mosseae/intraradices*- (GLOM1310, GLOM5.8R), *G. etunicatum/claroideum*- (LETC1670) und *A. gerdemanni/trappei/G. occultum/brasilianum*-Gruppe (ARCH1311) sowie für Acaulosporaceae (ACAU1660) und Gigasporaceae (GIGA5.8R). All diese Primer amplifizieren jedoch die ITS1-Region, die durch ihre Hypervariabilität (s. Kap. 4.9) eine erhöhte Diversität vortäuschen kann und ihre Anwendung bei Freilandproben deshalb in Frage gestellt werden muß. Außerdem können auch mit diesen Primern nicht alle AMF-Arten (wie z.B. *G. versiforme*) erfasst werden. Redeckers Analyse der Amplifikate mittels RFLP brachte zwar „weitgehend übereinstimmende“, aber keine eindeutigen Ergebnisse. So konnten die

*Gigaspora*-Arten überhaupt nicht voneinander unterschieden werden. Eine vorgeschlagene Sequenzierung der DNA-Fragmente ist bei hoher Probenzahl aufwändig und teuer.

#### 4.4 Sequenzanalysen und RFLP

Die Sequenzanalysen im Bereich des mit dem Primerpaar Glmoss85For und Glmoss387Rev amplifizierten Teilstückes zeigte eine Sequenzhomologie von insgesamt 87%. Alle Sequenzen waren bis auf wenige Positionen innerhalb der ersten zehn Basen eindeutig. Nur bei HeIA06 konnten die ersten 44 Nukleotide nicht ermittelt werden. Alle Sequenzen konnten im Vergleich mit Datenbanksequenzen einer Art zugeordnet. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde phylogenetischer Stammbaum erstellt. Es handelte sich dabei um sechs *G. mosseae*-, eine *G. geosporum*- und zwei *G. caledonium*-Sequenzen. Außerdem konnten für die einzelnen Arten charakteristische Substitutionsmuster identifiziert werden: Für *G. mosseae* 20>C, 70>G, 82>C, 87>C, 95>T, *G. caledonium* 12>C, 48>T, *G. fragilistratum* 78>T und *G. geosporum* 225>T.

#### 4.5 Quantifizierung mit der TaqMan<sup>®</sup> *real-time* PCR

BÖHM *et al.* (1999) entwickelten die *real-time* PCR für *G. mosseae*. Dabei wurden die Startkopien des *G. mosseae* templates (Bereich der LSU rDNA) von 11 bzw. 100 Sporen quantifiziert, und zwischen 100.000 bis 350.000 Kopien je Spore gefunden. Das entspricht bei einer angenommenen Kopienzahl von etwa 100 rDNA-Einheiten je Genom ca. 1000 bis 3500 Nuklei je Spore. Die *real-time* PCR hat gegenüber der kompetitiven PCR mit internen Standards den Vorteil, dass über einen großen DNA-Konzentrationsbereich gemessen werden kann. Die Messung fand in 96er-Platten statt, dabei konnten maximal 40 Proben bestimmt werden, da jede Probe mindestens doppelt bestimmt wurde und Standards und Kontrollen mindestens 16 Kavitäten beanspruchten. Der Nachteil dieser Analysemethode sind die relativ hohen Kosten.

Bei der Quantifizierung von *A. longula* betrug die Effizienz der PCR 86%. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,973. Die Standardwerte lagen also bis zu 97,3% auf der Korrelationsgeraden. Durchschnittlich ergeben sich zwischen 4489 und 94450 Kopien je mg Wurzel. Dabei konnten bei sechs der acht schwachen Banden aus der PCR mit den *A. longula*-spezifischen Primern keine Kopien ermittelt werden. Womöglich handelte es sich dabei um *A. longula*-Varianten oder nah verwandte Arten, die an den entsprechenden Positionen der

Primer- und Sondenbindungsstellen Basensubstitutionen aufwiesen. Als Richtwert für eine gewöhnliche PCR geben INNIS & GELFAND (1990)  $3 \cdot 10^5$  Startkopien an.

Bei der Quantifizierung von *G. mosseae* betrug die Effizienz der PCR 93%. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,979. Die Standardwerte lagen also bis zu 97,9% auf der Korrelationsgeraden. Die Mittelwerte der gemessenen Kopienzahlen lagen zwischen 381 und 64750 Kopien je mg Wurzel. Allerdings ist zu beachten, dass es sich hierbei um „*G. mosseae*-Äquivalente“ handelt. Ein Vergleich der Probensequenzen mit denen des Primers P1 und der Sonde F1 hatte gezeigt, dass bei den ermittelten *G. caledonium* und *G. geosporum*-Proben jeweils eine bzw. zwei Basen abwichen. Dies könnte der Grund für eine verringerte PCR-Effizienz gewesen sein und würde erklären, weshalb bei der *G. geosporum*-Probe von *P. lanceolata* Pla5-004 keine Kopien ermittelt wurden. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei der rDNA um ein *high copy gene* handelt, so dass etwa 100 Startkopien je Genom vorliegen. Da diese fest miteinander auf einem Strang verbunden waren, wurden sie nur „paketweise“ pipettiert. Die Konsequenz ist eine umso höhere Standardabweichung bei geringerer Kopienzahl.

Aus dem Ergebnis dieser Analyse lässt sich somit auf die Zahl der Genome oder Kerne je mg Wurzel schließen. Da die Hyphen der AMF nicht septiert sind, ist eine Gleichsetzung der Kernzahl mit der Zellzahl nicht möglich und eine Massenbestimmung schwierig. Über die Zahl der Kerne in Sporen wurden einige Untersuchungen durchgeführt, die jedoch sehr unterschiedlich ausgefallen sind, so untersuchten BIANCIOTTO & BONFANTE (1992) cytofluorometrisch die Genomgröße zweier AMF-Arten. Sie errechneten dabei durchschnittlich 0,26 pg je Nukleus für *G. versiforme* und ca. 0,75 pg je Nukleus bei *G. margarita*. Die Anzahl der Nuklei je Spore geben sie mit 9.000 für *G. caledonium*, 20.000 bei *G. margarita* und 35.000 bei *G. decipiens* an. Allerdings beschreiben HOSNY *et al.* (1998) lediglich 800 Nuklei und 0,88 pg DNA für *S. castanea*-Sporen und 1167 Nuklei bei *G. margarita*. BURGGRAAF & BERINGER (1989) hingegen errechneten 20.000 Kerne pro *G. margarita*-Spore und BÉCARD & PFEFFER (1993) geben 2400 Kerne an. BAHNWEIG *et al.* (1998) gehen bei Pilzen von einer haploiden Genomgröße von  $2 \cdot 10^7$  bp und einer Kopienzahl von 300 rDNA-Einheiten pro Genom und  $9,1 \cdot 10^8$  bp je pg DNA aus. HOSNY *et al.* (1999) untersuchten die rDNA von *S. castanea* und fanden eine Kopienzahl von 75 (40 bis 400) je haploidem Genom. Sie stellten außerdem eine Größe des Genoms von  $10^8$  bis  $10^9$  bp fest, verglichen sie mit anderen Pilzarten ( $1,4$  bis  $5 \cdot 10^7$  bp). Bei angenommenen 100 rDNA-Einheiten je Genom und 0,5 pg je Nukleus ergibt dies ungefähr 45 bis 945 Kerne (22,5 bis 472 pg

AMF-DNA) je mg Wurzel bei *A. longula* und zwischen 4 und 648 Kerne (2 bis 324 pg AMF-DNA) je mg Wurzel bei *G. mosseae*.

#### 4.6 Identifikation der Mykorrhizapilze anhand der Sporenmorphologie

Bei der Identifizierung der AMF mithilfe der Sporenmorphologie konnten sechs verschiedenen Typen unterschieden werden. Sporen vom Typ *G. mosseae* stellten dabei mit einem Anteil von etwa 70% den größten Anteil. Dieses Ergebnis stimmt recht gut mit den Angaben anderer Autoren überein (Kap. 4.8).

Die klassischen Studien zur Identifizierung der AMF-Arten beruhen auf der Untersuchung der Sporenmorphologie. SCHENK & PÉREZ (1990) veröffentlichten hierzu einen Bestimmungsschlüssel. Dieser basiert auf den Veröffentlichungen neu beschriebener Arten und ist daher sehr uneinheitlich, so dass einzelne Beschreibungen nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können. Während die Identifizierung auf Gattungsebene noch relativ einfach ist, können bei der Bestimmung einzelner Arten vielerlei Probleme auftreten. Charakteristika wie Größe oder Färbung sind abhängig vom Alter und Zustand der Sporen sowie ihrer Umgebung (Substrat). Außerdem kann die sichere Identifizierung der Sporen durch Parasitenbefall unmöglich werden. Bei der Bestimmung von Freiland-Sporen müssen die meist einzeln isolierten Sporen individuell analysiert werden. Dadurch können einige wichtige Unterscheidungsmerkmale nur bedingt berücksichtigt werden. Untersucht man die Sporengröße an hunderten Sporen einer Einzelsporkultur, so erkennt man, dass diese einer Gauß'schen Normalverteilungskurve entspricht. Außerdem sind junge Sporen in der Regel kleiner als ältere. Die phänotypische Größe einer isolierten Freilandspore unbekanntes Alters ist daher kein sicheres Merkmal. Auch die Farbe einer Spore ist von ihrem Alter abhängig, so sind jüngere heller. Außerdem können sie je nach Boden unterschiedlich getönt sein, so dass Freilandsporen meist dunkler sind als Sporen aus Topfkulturen (KRAMADIBRATA *et al.* 2000). Desgleichen kann die Sporen-Ontogenese aus entwickelten Sporen nicht mehr als Unterscheidungsmerkmal dienen. Mit der klassischen Methode werden „Morphotypen“ (MORTON & BENNY, 1990; WALKER, 1992) beschrieben, wobei minimale Differenzen im Aufbau der Sporenwand zur Unterscheidung von Arten ausreichen. Dass diese „Morphotypen“ jedoch nicht synonym mit dem Begriff „Arten“ behandelt werden dürfen zeigt folgendes Beispiel: *A. gerdemannii* und *G. leptotichum* wurden aufgrund ihres Sporenphänotyps beschrieben. Nachdem SAWAKI *et al.* (1998) zeigen konnten, dass sie genotypisch identisch sind, wurden beide als *Archaeospora leptoticha* zusammengefasst (s. Kap. 4.11).

Die Identifikation von Sporen wurde in dieser Arbeit bewusst nur dazu angewandt, um einen ersten Überblick über das Vorhandensein bestimmter Typen zu erhalten. Sie sagt weder etwas über die tatsächlichen Mykorrhizierungsverhältnisse in den Pflanzen aus, noch über das Mykorrhizierungspotential, da viele AMF nur wenige, unregelmäßige oder gar keine Sporen produzieren, oder diese sich in den Pflanzenwurzeln (z.B. *G. intraradices*) statt im Boden befinden (SCHÜBLER *et al.* 2001a). Letztlich stellt die Sporenanalyse ein „Sporenbildungspotential“ fest (FITTER, Department of Biology, University of York, persönliche Mitteilung). Auf eine intensivere Untersuchung der Sporen wurde deshalb zugunsten der molekularbiologischen Methoden verzichtet.

#### 4.7 Mykorrhizierung und Phosphatgehalte

Die angewandte *Magnified Intersections*-Methode nach MCGONIGLE *et al.* (1990) besitzt gegenüber der häufig verwendeten *Grid-line Intersect*-Methode (GIOVANETTI & MOSSE, 1980, TROUVELOT *et al.*, 1986) den Vorteil, dass einzelne kleine Bereiche keine höhere Kolonisierungsrate vortäuschen wie kompakte, dichte Bereiche. GANGE *et al.* (1999) fanden heraus, dass verschiedene Färbemethoden die Pilzhyphen unterschiedliche stark färben konnten. Die Mykorrhizierung der einzelnen Pflanzen wies insgesamt starke Schwankungen auf, so dass eine eindeutige Interpretation schwierig war. Bei der Hyphen-Kolonisierungsrate konnte keine Abhängigkeit vom Standort oder der Pflanze festgestellt werden. Es sind lediglich Indizien für eine jahreszeitliche Zunahme vorhanden. SANDERS & FITTER (1992) untersuchten die Mykorrhizierung bei sechs verschiedenen Grasland-Pflanzenarten. Sie stellten bei *P. lanceolata* und *Rumex acetosa* eine starke jahreszeitliche Schwankung fest. Bei *Festuca rubra*, *H. lanatus*, *Lathyrus pratensis* und *Trifolium pratense* verlief die Kolonisierung gleichmäßiger. Bei der Vesikel-Kolonisierungsrate zeigt sich ein differenzierteres Bild. So deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Vesikeldichte zum Herbst hin abnimmt. Dies könnte dergestalt interpretiert werden, dass die Assimilate zunächst in der Pflanzenwurzel, also den Vesikeln gespeichert und im späteren Verlauf des Jahres während der Bildung von Sporen in diese verlagert werden. FITTER *et al.* (1998) stellten eine Korrelation fest zwischen dem C-Transfer und der Vesikelzahl in der korrespondierenden Pflanzenwurzel fest. Es ist daher anzunehmen, dass der Anstieg der Vesikel-Kolonisierungsrate mit der hohen Assimilatproduktion der Pflanzen im Sommer zusammenfällt. Im Herbst dagegen nimmt die Assimilatproduktion wieder ab. Aus diesem Grund und in Kombination mit dem Temperaturabfall und/oder zunehmender Trockenheit (bei Gewächshauskulturen wird der Pilz durch Einstellen

des Gießens zur Sporulation angeregt) könnten die AMF ihre Reservestoffe von den intraradikalischen Vesikeln in die neu gebildeten Sporen verlagern.

Die Phosphatgehalte fielen auf der Wiese W02 mit durchschnittlich 2 mg  $P_4O_{10}$  je 100 g Boden sehr gering aus. Auf der Weide lagen die Werte generell höher und erreichten in den flacheren oberen und unteren Lagen Spitzenwerte im Gegensatz zu den steileren Mittellagen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Rinder die flachen Stellen bevorzugt zum Wiederkäuen aussuchten, was im Phosphateintrag durch Kot deutlich wird. Die jahreszeitliche Zunahme auf der Weide könnte ebenfalls auf die Beweidung durch die Rinder und den damit verbundenen P-Eintrag zurückzuführen sein. Den Winter über wurden sie im Stall gehalten, so dass der P-Gehalt wieder abgenommen hat. Von dem geringen natürlichen, aus der Verwitterung von Mineralien entstandenen, Phosphatgehalt von 0,01-0,1% (davon ca. 60% in anorganischer, ca. 40% in organischer Form) stehen den Pflanzen nur etwa 0,02-0,1 mg P/kg zur Verfügung (BLUME, 1992). Düngerphosphate werden durch Umsetzungsprozesse langsam an Eisenoxide absorbiert oder zu schwer löslichen Calciumphosphaten umgesetzt. Dadurch steht es den Pflanzen nicht mehr zur Verfügung, so dass von einem Ausnutzungsgrad von 10 bis 25% im ersten Jahr ausgegangen wird, allerdings tritt ein Depoteffekt ein. Bei Flüssigdünger (Gülle) wird ein Großteil des Phosphats in tiefere Schichten gespült und kann unter Umständen, wenn es in Gewässer gelangt zu deren Eutrophierung beitragen. Wenn hohe Phosphatdüngemengen zu einer Hemmung der Mykorrhiza führen (BLUME, 1992), so kann eine verringerte Düngung die Mykorrhiza fördern und womöglich die Phosphatausbeute (mit gezielter Beimpfung durch geeignete Stämme) erhöhen.

Ein Zusammenhang zwischen Phosphatverfügbarkeit und Mykorrhizierung lässt sich nur bei der Hyphenkonzentration von *H. lanatus* auf der Wiese feststellen. In Gewächshausversuchen wurde bei Erhöhung des Nährstoffangebots für die Pflanze durch Düngung ein Rückgang der Mykorrhiza beobachtet (FIEDLER, 2001). Diese Erkenntnis impliziert, dass im umgekehrten Fall bei einer Verringerung der Düngemenge die Mykorrhizierung ansteigen würde und dadurch ein Nährstoffmangel ausgeglichen werden könnte. Durch gezielte Inokulierung (bei genauer Kenntnis der Funktionalität der AMF) landwirtschaftlicher Nutzflächen könnte ein Wandel von einer *high-input*- in eine *low-input*-Landwirtschaft durchaus denkbar sein (GALVEZ *et al.* 1995). Im Gegensatz zu den Gewächshausversuchen mit kontrollierbaren Parametern können im Freiland sehr viele Faktoren eine Rolle spielen. Da Grünflächen keine Monokulturen darstellen, stehen die einzelnen Pflanzen in Konkurrenz und Phytopathogene können zusätzlich eine Mykorrhizierung begünstigen. Es mag widersprüchlich erscheinen, dass eine Pflanze in einer mineralien- und wasserreichen

Umgebung auf die AMF angewiesen ist. Doch ein hohes Ressourcenangebot führt zu starkem Pflanzenwachstum und –produktivität und damit zu einem Verdrängungswettbewerb zwischen den Pflanzen (ALLEN & ALLEN, 1990). EOM *et al.* (2001) untersuchten den Einfluß von Huftieren auf die Zusammensetzung von AMF-Arten (in diesem Fall Sporen-Morphotypen) im Weideland. Sie fanden heraus, dass durch die Beweidung sowohl die Wurzelkolonisierung mit AMF-Hyphen als auch die Diversität der AMF-Arten zunahm. Uneinigkeit besteht über Möglichkeit des Assimilattransports zwischen verschiedenen Pflanzen über ein AMF-Netz. WATKINS *et al.* (1996) berichteten vom Transport von bis zu 10% <sup>13</sup>C-markierter Verbindungen von einer anderen Pflanzen in eine AM-Wurzel. FITTER *et al.* (1998) konnten jedoch belegen, dass die Assimilate ausschließlich in der Wurzel, nicht aber in der übrigen „Empfänger-Pflanze“ zu finden waren. Die Autoren vermuten, dass die Kohlenstoff-Verbindungen zwar über das Myzel verteilt werden und womöglich in Vesikeln einer benachbarten Pflanzenwurzel deponiert werden, schließen aber einen Rücktransfer Pilz-Pflanze aus.

#### **4.8 Biodiversität: Arten und Individuen**

Die Biodiversität setzt sich aus der Artenzahl und Artenverteilung zusammen. Bei den AMF kann weder der Begriff Art genau definiert, noch eine Individuenzahl angegeben werden. Eine klassische Definition des Artbegriffes setzt die fruchtbare Nachkommenschaft voraus (ROSENDAHL, 1996). Bei den AMF handelt es sich jedoch um Lebewesen, die sich vegetativ fortpflanzen. Eine Einteilung nach Sporenmerkmalen liefert bestenfalls „Morphotypen“. Genetische Einteilungen liefern keine schlüssigeren Kriterien, da immer wieder von Polymorphismen berichtet wurde (s. Kap. 4.9). Selbst wenn man sich auf „Karyotypen“ beschränkt, ist eine Artabgrenzung problematisch. Auch die Suche nach einem „AMF-Individuum“ ist schwierig, da nicht einmal einzelne Zellen innerhalb der unseptierten Hyphen zu definieren sind. Die Sporen sind heteropolykaryotisch, so dass auch in diesem Fall die einzelnen Kerne als kleinste (individuelle) Einheit anzusehen sind. Im Rahmen dieser Arbeit können deshalb nur bedingt Aussagen über die Biodiversität der AMF getroffen werden. Einerseits konnten mit den verfügbaren Mitteln nur einzelne Gruppen der AMF nachgewiesen, andererseits ist eine Arteinteilung bei Haplonten naturgemäß problematisch. Eine Häufigkeit in Form von Individuenzahlen kann ebensowenig angegeben werden. Die ermittelten Kopienzahlen stellen in dieser Hinsicht einen Näherungswert dar, wobei jedoch bisher die Zusammenhänge zwischen Kopien-, Kern- und Individuenzahl nur unzureichend erforscht sind.

MERRYWEATHER & FITTER (1998) untersuchten die Morphologie von AMF in Wurzeln von *Hyacinthoides non-scripta* und ihre Sporen in der Wurzelzone. Sie fanden dabei in den Wurzeln sechs Morphotypen (1 *Scutellospora*, 1 *Acaulospora*, 3 *Glomus*, 1 „Endophyt“) und acht Sporentypen: hauptsächlich *S. dipurpurascens* und *Acaulospora koskei* neben *Glomus rubiforme* und fünf *Acaulospora*-Arten. HELGASON *et al.* (1998) verglichen die AMF-Verteilung in Wald und Ackerland. Sie sequenzierten einen Bereich der SSU rDNA von mykorrhizierten Wurzeln, die mit den Primern AM1 und NS31 amplifiziert worden waren und stellten signifikante Unterschiede zwischen Wald und Ackerland fest. Von 100 Acker-Sequenzen ließen sich 92 *G. mosseae* zuordnen. Daneben fanden sie sechs weitere *Glomus*-, eine *Acaulospora*- und eine *Scutellospora*-Sequenz. Diese Dominanz von *G. mosseae* und nah verwandten Arten wurde in der Folgezeit durch verschiedene Autoren bestätigt. KJØLLER & ROSENDAHL (2001) untersuchten dänische Ackerflächen, auf denen Erbsen angebaut waren. Anhand der Sporenmorphologie konnten sie neben *G. mosseae*, *G. geosporum*, *G. caledonium* und *G. claroideum* eine *Scutellospora*-Art feststellen. Die Sequenzierung von 39 Amplifikaten einer *nested* PCR erbrachte zwölf *G. intraradices*, sieben *G. geosporum*, achtzehn *G. caledonium* und zwei *G. fragilistratum*-ähnliche Isolate. In drei Fällen konnte jeweils *G. intraradices* und *G. caledonium* gemeinsam in einer Wurzelprobe festgestellt werden. Die Abwesenheit von *G. mosseae*-Sequenzen erklären die Autoren mit einer Kolonisierung durch diesen Pilz zu einem früheren Zeitpunkt. VANDENKOORNHUYSE *et al.* (2002) fanden bei der Untersuchung von *Arrhenatherum elatius*-Wurzeln mit pilzspezifischen Primern (SSU rDNA) drei AMF-Sequenztypen. Einer davon ließ sich der Gattung *Glomus* zuordnen, die beiden anderen wiesen keine nähere Verwandtschaft mit irgendeiner bekannten AMF-Art auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich eine Artenzahl von bis zu 10 AMF in einem Ökosystem vorhersagen, wobei auf landwirtschaftlichen Nutzflächen *G. mosseae*-verwandte Arten dominant auftreten können. Die vorliegende Arbeit bestätigt diesen Befund: die Anzahl von sechs verschiedenen Morphotypen stimmt sehr gut mit den Angaben der anderen Autoren überein. Die Dominanz von *G. mosseae* im Grünland findet sich ebenfalls bestätigt: etwa 70% der Sporen konnten als *G. mosseae* identifiziert werden, weitere 10% wurden der nah verwandten Art *G. geosporum* zugeordnet. Auch die molekulargenetischen Untersuchungen ergaben ein verbreitetes Vorkommen von *G. mosseae* und verwandten Arten bei 17% der untersuchten Pflanzen.

## 4.9 Fortpflanzung und Variabilität der AMF

Bei der langen Entwicklungszeit von über 400 Millionen Jahren und ihrer weltweiten Verbreitung hätten sich bei einer rein vegetativen Fortpflanzung weit mehr als die bekannten 166 AMF-Arten entwickeln können, da die divergierenden Genotypen keine Möglichkeit der Rekombination besitzen. Die hohe genetische Diversität innerhalb einzelner AMF-Sporen ist seit längerer Zeit bekannt und durch zahlreiche Publikationen belegt. Die spannende Frage, ob sich die variablen rDNA Sequenzen innerhalb eines Kerns oder unter verschiedenen Nuklei einer Spore befinden, bleibt ein offenes Rätsel (Redecker *et al.*, 1999).

LLOYD-MACGILP *et al.* (1996) analysierten verschiedene Klone der ITS-Region aus Sporen von *G. mosseae*, *G. coronatum*, *G. fasciculatum* und *G. dimorphicum*. Dabei konnten sie Unterschiede von bis zu 6% innerhalb eines Isolats oder gar einer Spore feststellen. Interessanterweise war die Variabilität zwischen Isolaten einer geographischen Region nicht kleiner als zwischen Isolaten, die von verschiedenen Kontinenten stammten. HIJRI *et al.* (1999) sequenzierten Klone von PCR-Produkten der ITS-Region einzelner Sporen. Sie konstruierten einen Stammbaum und konnten eine hohe Divergenz dieser Sequenzen feststellen. REDECKER *et al.* (1999) konnten zwar anhand von Untersuchungen der 5.8S rDNA nachweisen, dass einige Sequenzen von *S. castanea*, die sich nicht innerhalb der Glomales einordnen ließen, zu den Ascomyceten gerechnet werden müssen (*Phoma* und *Leptosphaeria*). Sie schlossen daraus, dass Ascomyceten entweder an der Sporenoberfläche leben, innerhalb der Sporen als Parasiten vorkommen oder diese Sequenzen tatsächlich Teil des Genoms der AMF sind. Allerdings wurde die Polymorphie unter den AMF nicht in Frage gestellt. ANTONIOLLI *et al.* (2000) analysierten die Variabilität der ITS-Region bei *Glomus mosseae* und *Gigaspora margarita* von einer Weidefläche in Australien. Dabei zeigte sich, dass aus einer einzelnen Spore bis zu zwölf verschiedene Sequenzen mit einer mittleren Abweichung von 5,6 Substitutionen je 100 Nukleotide (*G. mosseae*) bzw. neun verschiedenen Sequenzen mit 3,6 Substitutionen (*G. margarita*) erhalten werden konnten. Datenbankvergleiche der einzelnen Sequenzen erbrachten hohe Identitätsraten mit Isolaten rund um den Globus (u.a. Finnland, Indonesien, Venezuela).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen konnte keine nennenswerte Variabilität innerhalb einzelner Isolate festgestellt werden. Obwohl die PCR-Produkte nicht kloniert worden waren, verliefen die Sequenzierungen ohne Probleme. Nur einzelne Basen konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Diese unbestimmten Basen lagen jedoch nicht in Bereichen, in denen sich einzelne Stämme voneinander unterschieden, so dass eine mögliche Heterokaryose für diesen analysierten Bereich der LSU rDNA ausgeschlossen werden kann.

Die verwendeten spezifischen Primer sind aufgrund des hohen Konservierungsgrades der LSU rDNA gegenüber der hochvariablen ITS-Region für diese Art der Untersuchung von Vorteil. Einzelne Isolate von *G. mosseae* unterschieden sich in einigen wenigen Basen, so dass unterschiedliche Stämme in allen untersuchten Flächen vorgefunden werden konnten.

VANDENKOORNHUYSE *et al.* (2001) untersuchten die genetische Diversität zweier *Glomus*-Arten mit Hilfe von *Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) fingerprint*. Dabei wurden Elektrophoresetypen von einzelnen Sporen erstellt und diese miteinander verglichen. Die hohe Zahl unterschiedlicher Elektrophorese-Profile und polymorpher Loci innerhalb der beiden Arten ließ sie schlussfolgern, dass Mutationen alleine durch homologe Rekombinationen oder ein Kernaustausch durch Anastomose stattgefunden haben muß. Bereits SANDERS *et al.* (1996) vermuteten als Grund für die heterokaryotische Natur der AMF den Austausch von Nuklei durch die Fusion von Hyphen. Giovannetti *et al.* (1999) konnten tatsächlich eine Anastomose bei *G. mosseae*, *G. caledonium* und *G. intraradices* nachweisen. Dabei fanden Fusionen von Hyphenwänden sowie ein Cytoplasma-Austausch zwischen Hyphen statt, die aus einer einzigen Spore und mehreren Sporen eines Isolats gewachsen waren. Es konnten jedoch keine intergenerischen oder interspezifischen Fusionen beobachtet werden. Bei den ebenfalls untersuchten Arten *G. rosea* und *S. castanea* konnte keine Anastomose dokumentiert werden.

Anastomose ermöglicht den Austausch von genetischem Material. Diese als Parasexualität bezeichnete Form der Rekombination ohne Meiose und Gameten (PONTECORVO *et al.*, 1953) würde einerseits die hohe Diversität innerhalb einzelner Sporen und das Vorhandensein identischer Genotypen in verschiedenen Stämmen erklären, es könnte aber auch der Grund für die geringe Artenzahl sein. Die sexuelle Fortpflanzung diploider Organismen kann als „Motor der Evolution“ bezeichnet werden kann, da durch Meiose, *Crossing over* und Rekombination immer neue Formen entstehen. Hingegen könnte die Parasexualität als „Bremse der Evolution“, im Sinne einer geringen Artenzahl, fungiert haben. Durch die Rekombination einzelner Kerne kann zwar eine hohe Anpassungsfähigkeit erzielt werden, es entstehen jedoch dadurch keine neuen „Arten“, sondern der mögliche Formenreichtum wird immer wieder durch eine Durchmischung von Kernen relativiert. Die phänotypischen Eigenschaften der heteropolykaryotischen haploiden AMF würden demnach durch Anzahl und Verhältnis der einzelnen Kerntypen beeinflusst. Bei der „normalen“ Sexualität diploider Organismen kann es dagegen vermutlich leichter und schneller zu Fortpflanzungsbarrieren und damit zur Bildung neuer Arten kommen. Dies könnte auch die geringe Wirtsspezifität der AMF erklären. Wenn ein Myzel mit einem heterogenen

Kernrepertoire neue Sporen ausgebildet, werden diese zufällig mit Kernen unterschiedlichen Genotyps ausgestattet. Da die Sporen tausende von Kernen enthalten können, besitzen wahrscheinlich keine zwei Sporen eine exakt identische Kernzusammensetzung. Entsprechend ihrer Umweltbedingungen würden einzelne Sporen einen Vorteil erhalten und bestimmte Kerntypen begünstigt werden. Ändern sich die Umweltbedingungen, so könnte durch Anastomose ein Genfluß stattfinden und die Karyotypen-Population mit „frischem Blut“ (= Kerne) aufgestockt werden.

Eine interessante These stellen RODRIGUEZ *et al.* (2001) auf. Auch sie hatten unterschiedliche Sequenzen bei Einzelsporen von *Entrophospora infrequens* gefunden, welche sich zum Teil verschiedenen *Glomus*-Arten zuordnen ließen. *E. infrequens* gilt neben *G. globiferum*, *E. baltica*, *S. spinosissima* und *S. projecturata* als nicht kultivierbar, d.h. Einzelsporkulturen schlugen bisher stets fehl. Die Autoren vermuten deshalb, es könnte sich hierbei um eine Hybrid-Form handeln, bei der genetisches Material (Nuklei) verschiedener Arten durch Anastomose vermischt wurde. Bisher konnten jedoch nur Anastomosen zwischen Isolaten einzelner *Glomus*-Arten dokumentiert werden.

#### 4.10 Phylogenetische und Systematische Neuordnung der Morphospezies

Die ursprüngliche Zuordnung der AMF zur Ordnung Endogonales innerhalb der Zygomyceten, war aufgrund der Sporokarpnienbildung bei *Endogone* (sexuell) und *Glomus* (asexuell) erfolgt. MORTON & BENNY (1990) fassten alle AMF in einer neuen Ordnung Glomales zusammen, der sechs Gattungen angehörten. ALMEIDA & SCHENCK (1990) nahmen aufgrund der Sporenposition in den Sporokarpnien eine Neuordnung der 13 *Sclerocystis*-Arten vor. Sie überführten fünf Arten in die Gattung *Glomus* und fassten die restlichen zur Art *S. coremioides* zusammen. SIMON (1996) fand bei der Untersuchung der SSU rDNA eine starke Abweichung zwischen Sequenzen von *G. etunicatum* einerseits, sowie *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. vesiculiferum* und *G. manihotis* andererseits. REDECKER *et al.* (2000a) kamen zu dem Schluß, dass die letzte verbliebene *Sclerocystis*-Art, *S. coremioides*, der Gattung *Glomus* zuzuordnen sei. MORTON & REDECKER (2001) gliederten einige Arten der Acaulosporaceae und Glomaceae aufgrund ihrer genetischen Abweichungen aus und gruppierten sie in zwei neu beschriebenen Familien (Archaeosporaceae und Paraglomaceae) mit jeweils einer neuen Gattung (*Archaeospora* und *Paraglomus*; Abb. 48).

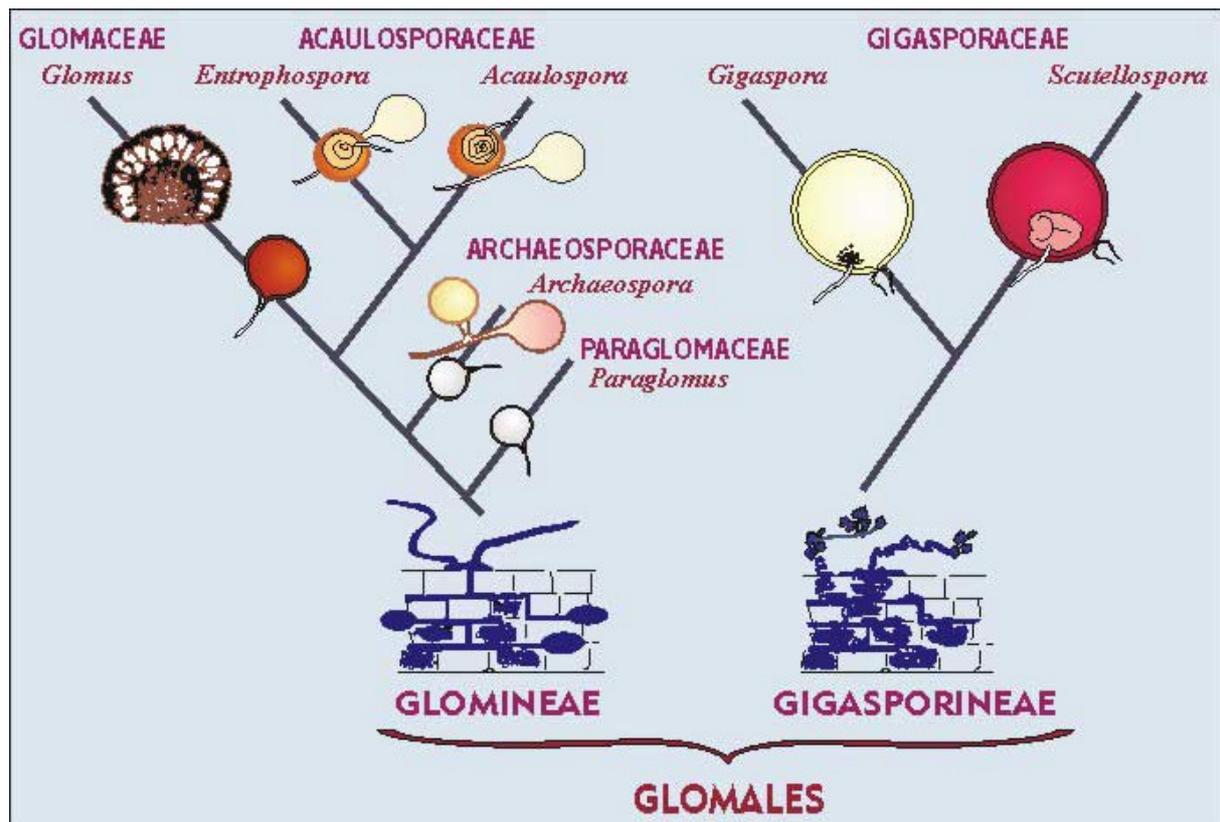


Abb. 48: Stammbaum der Glomales nach MORTON & REDECKER (2001).

SCHWARZOTT *et al.* (2001) stellten anhand von Untersuchungen der SSU rDNA von 30 Isolaten fest, dass die Gattung *Glomus* nicht monophyletisch ist. Neben den Familien Archaesporaceae und Paraglomaceae konnten sie die restlichen *Glomus*-Vertreter in drei Gruppen einteilen. Ihre *Glomus mosseae*-Gruppe (GIGrA) umfaßt in einer Untergruppe (GIGrAa) u.a. die Arten *G. caledonium*, *G. coronatum*, *G. fragilistratum*, *G. geosporum*, *G. mosseae* und *G. verruculosum*. Dies entspricht denjenigen Arten, die mit den Primern Glom85For und Glom387Rev amplifiziert werden konnten. Eine weitere Untergruppe (GIGrAb) besteht aus den Arten *G. clarum*, *G. coremioides*, *G. fasciculatum*, *G. intraradices*, *G. manihotis*, *G. proliferum*, *G. sinuosum* und *G. vesiculiferum* und die Untergruppe GIGrAc enthält das Isolat *G. sp.* W3347. Ihrer *Glomus etunicatum*-Gruppe (GIGrB) ordnen die Autoren die Arten *G. claroideum*, *G. etunicatum*, *G. lamellosum*, *G. luteum*, *G. manihotis* (*clarum*), *G. microaggregatum* und *G. viscosum* zu. Eine weitere Gruppe (GIGrC), bestehend aus *G. versiforme*, *G. spurcum* und *G. etunicatum*, steht interessanterweise den Acaulosporaceae näher als den beiden anderen *Glomus*-Gruppen. Ungeklärt bleibt dabei die Stellung von *G. manihotis* und *G. clarum*, die sich sehr ähneln und sowohl in GIGrAa als auch in GIGrB auftauchen. Ebenso finden sich Stämme von *G. etunicatum* in den Gruppen GIGrC und GIGrB. Die Autoren schlagen für ihre *Glomus*-Gruppe C einen neuen Familien-

namen Diversisporaceae vor. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass *Geosiphon pyriforme* (Kap. 4.11) innerhalb der Archaeosporaceae näher mit *A. leptotichum* verwandt ist als mit *A. trappei*. Die Paraglomaceae weisen die größten genetischen Abweichungen im Vergleich zu allen anderen Familien auf und repräsentieren vermutlich die ursprünglichsten Vertreter der AMF.

Aus den phylogenetischen Befunden lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ziehen: Jedes Isolat, weist es auch eine noch so große morphologische Ähnlichkeit zu anderen Arten auf, ist primär unbedingt als eigener Stamm bzw. Isolat zu behandeln. Die beiden Unterordnungen Glominaeae und Gigasporineae sind in dieser Form nicht mehr haltbar. Die erwogene Paraphylie der Glomales ist durch die neuesten phylogenetischen Erkenntnisse widerlegt (SCHWARZOTT *et al.* 2001), so dass nunmehr alle AMF-Arten (inklusive *G. pyriforme*) sicher einem gemeinsamen Vorfahren entstammen. Durch die Gruppierung von *G. pyriforme* innerhalb der (dadurch paraphyletischen) Archaeosporaceae ergeben sich drei Möglichkeiten: die Umbenennung *G. pyriforme* zu *Archaeospora pyriforme*, eine Zwei-Familien-Lösung mit einer gemeinsamen Familie (oder Gattung) aus *G. pyriforme* und *A. leptotichum* oder eine Drei-Familien-Lösung mit *G. pyriforme*, *A. leptotichum* und *A. trappei* in drei Familien (oder Gattungen). Insgesamt sind die molekularbiologischen Analysemethoden noch nicht erschöpft, so dass umfassende systematische und taxonomische Änderungen zu erwarten sind. SCHÜBLER *et al.* (2001b) korrigierten den Ordnungsnamen Glomales nach den Regeln des *International Code of Botanical Nomenclature* (GREUTER *et al.*, 2000) in Glomerales (Glomaceae in Glomeraceae, Paraglomaceae in Paraglomeraceae). Außerdem erhoben sie die AMF zum neuen Phylum Glomeramycota (mit drei neuen Ordnungen), das näher mit den Ascomycota und Basidiomycota verwandt ist als mit den verbleibenden Gruppen der Zygomycota (Abb. 49). Die Diversisporales umfassen die Gigasporaceae, Acaulosporaceae sowie die vorgeschlagene Familie Diversisporaceae (*Glomus*-Gruppe C). Die Archaeosporaceae und Geosiphonaceae bilden die Archaeosporales und die verbleibenden Paraglomaceae die Paraglomerales. Demnach enthält die Ordnung Glomerales nur noch die beiden *Glomus*-Gruppen A und B, die in noch zu benennende Familien einzuteilen sind. Die Neuordnung der verbliebenen *Glomus*-Arten in möglicherweise zwei Familien (GrGIA und GrGIB) mit drei neuen Gattungen (GrGIA-Untergruppen a bis c) scheitert bisher noch an der Tatsache, dass Untersuchungen der Typusart *G. microcarpum* fehlen.

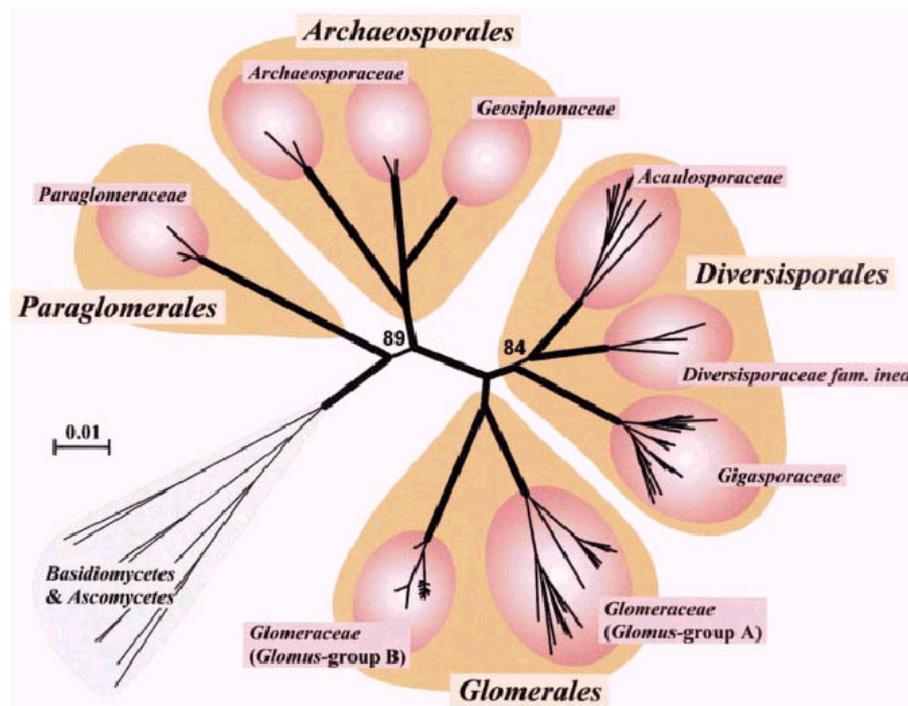


Abb. 49: Stammbaum der Glomeromycota nach SCHWARZOTT *et al.* (2001).

#### 4.11 Evolution und Artenzahl der AMF

Die frühesten Fossilfunde der AMF werden auf 400 Millionen Jahre datiert. In fossilen *Aglaothyton major*-Wurzeln hatten TAYLOR *et al.* (1995) Pilzstrukturen gefunden, die identisch mit heutigen Arbuskeln und Hyphen waren. Die Pilzart wurde als *Glomites rhyhiensis* beschrieben. REDECKER *et al.* (2000b) fanden Fossilien von unseptierten Hyphen und Sporen, die denen der AMF sehr ähnlich waren, mit einem Alter von etwa 460 Millionen Jahren. Simon *et al.* (1993b) bezifferten das Alter der Glomaceae, Gigasporaceae und Acaulosporaceae mit ca. 355 Mio. Jahren. Die Autoren führten jedoch ein sehr viel früheres Alter für die AMF an, gestützt auf phylogenetische Untersuchungen, das mit dem Erscheinen der ersten Landpflanzen vor 475 Millionen Jahren zusammenfällt. Während dieser langen Entwicklungszeit scheinen es manche Pflanzengruppen „vorgezogen“ zu haben, ihren Symbiose-Partner „aufzukündigen“ und eine Nährstoffversorgung ohne Mykobionten zu gewährleisten (Trappe, 1987). Nachdem MORTON & BENNY (1990) die AMF in der Ordnung Glomales zusammenfaßten bürgerte sich allmählich ein, die beiden Begriffe synonym zu verwenden. GEHRIG *et al.* (1996) konnten jedoch zeigen, dass *Geosiphon pyriforme* zu dieser Ordnung zählt. Dies ist die einzige bekannte Art, die Cyanobakterien (der Gattung *Nostoc*) als Endosymbionten besitzt. Sie erinnert damit eher an Pflanzen, deren Chloroplasten ja ursprünglich auch Cyanobakterien waren, oder Flechten als welche sie ursprünglich beschrieben

wurde. Ob es sich bei *G. pyriforme* um die ursprüngliche Symbioseform handelt, woraus sich dann durch Koevolution arbuskuläre Mykorrhizen zwischen AMF und höheren Pflanzen mit den typischen Arbuskeln entwickeln konnten, oder ob die Symbiose mit Cyanobakterien sich erst später entwickelte, ist noch nicht geklärt. Da es sich bei AMF um obligate Symbionten handelt, wäre eine Entwicklung von saprophytischen oder parasitischen Vorläufern über die Zwischenform der Symbiose mit Cyanobakterien durchaus plausibel. Damit wäre *G. pyriforme* der einzige noch existierende Vertreter dieser speziellen Form der Symbiose. PIROZYNSKI & MALLOCH (1975) sehen das Zusammenspiel einer Alge und eines Oomyzeten als Vorläufer der AM. Sporen vom Typ *Glomus* scheinen die ursprüngliche Form darzustellen, von der sich im Lauf der Evolution mehrere Seitenzweige mit modifizierter Morphologie abgezweigt haben. Allerdings müsste dann der *Acaulospora*-Sporentyp mindestens zweimal durch Konvergenz entstanden sein, da er sich bei *Acaulospora* und *Archaeospora* findet. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ursprünglich acauloide und glomoide Sporen gebildet wurden – wie heute noch bei *Archaeospora leptoticha* als „lebendem Fossil“ - und der eine oder andere Sporentyp bei den anderen Arten später verloren ging (Redecker *et al.* 2000c).

Wie viele AMF-Arten konnten sich im Lauf dieser mehr als 400 Millionen Jahren entwickeln? HAWKSWORTH (2001) schätzt die Zahl der Endogonales- und Glomales-Arten weltweit auf 1000. Wenn man diese Zahl entsprechend der derzeit beschriebenen Arten auf die beiden Gruppen aufteilt, so kann man mit 800 bis 1000 AMF-Arten rechnen. Vor 1974 waren acht Arten von arbuskuläre Mykorrhizapilzen beschrieben worden. Seitdem kamen ca. 158 hinzu (Anhang B), so dass heute etwa 167 Arten zu den Glomeromycota gezählt werden können (inklusive *Geosiphon pyriforme*). Eine Übersicht der derzeit allgemein anerkannten Arten findet sich in Anhang A. Während zwischen 1974 und 1989 die Zahl der Arten noch stark zunahm, sind die Neubeschreibungen in den letzten zehn Jahren auf durchschnittlich drei pro Jahr gesunken. Neben der Beschreibung neuer Spezies aus dem Freiland, führt auch die Überprüfung kultivierter Arten zu Neufunden. So wurden z. B. die Arten *G. eburneum* und *G. luteum* von *G. spurcum* ausgegliedert (KENNEDY *et al.*, 1999). Andererseits wurden einige Arten als Synonyme entlarvt. SCHWARZOTT *et al.* (2001) stellten fest, dass sich *G. manihotis* und *G. clarum* genetisch kaum unterscheiden und wohl als eine Art anzusehen sind. MERRYWEATHER & FITTER (1998) stellten eine hohe genetische Verwandtschaft zwischen *S. dipurpurascens* und *S. calospora* fest. Eine enge Verwandtschaft von *A. rugosa*, *A. longula* und *A. morrowiae* wird ebenfalls diskutiert (INVAM). Die Artenzahlen wurden häufig aufgrund von Pilz/Pflanzen-Raten und der Wirtsspezifität hochgerechnet. Da die AMF-Arten als wirtsunspezifisch gelten (SANDERS, 1993) und viele Arten weltweit verbreitet sind (WALKER,

1992), läßt sich dieses Rechenmodell wohl nicht auf sie übertragen. Ob tatsächlich 1000 Arten existieren oder jemals beschrieben werden können bleibt ungewiß. Vielleicht wird aber auch eines Tages der Artbegriff bei den AMF, Prokaryoten und anderen Haplonten vollständig aufgegeben, zugunsten einer Klassifizierung nach Stämmen. Die hohen Erwartungen jedenfalls, die in die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden zur Definition von Arten gesetzt wurden, konnten bisher ebensowenig erfüllt werden, wie bei der klassischen Einteilung anhand der Sporenmorphologie.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden arbuskuläre Mykorrhizapilze (AMF) in landwirtschaftlichen Nutzflächen bei *Plantago lanceolata*, *Trifolium repens*, *Holcus lanatus* und anderen Pflanzen mit spezifischen Primer in einer *nested* PCR nachgewiesen. Neben *Acaulospora longula* wurde eine Gruppe nah verwandter Arten um *Glomus mosseae* erfasst, die als dominant auf landwirtschaftlichen Flächen betrachtet werden kann. Die Isolate dieser Gruppe konnten *a posteriori* durch Sequenzvergleiche als *G. mosseae*, *G. caledonium* und *G. geosporum* identifiziert werden. Als Zielregion für die PCR diente die große Untereinheit der ribosomalen DNA (LSU rDNA). Um die Pilze *in planta* nachweisen zu können, mussten bestehende DNA-Extraktionsmethoden weiterentwickelt werden. 56 DNA-Extrakte aus Wurzeln wurden mit universellen Primern als amplifizierbar getestet. *A. longula* konnte in mindestens fünf Wurzelproben bei allen drei Grünland-Pflanzen nachgewiesen werden. Außer in diesen Pflanzen wurde *G. mosseae* auch in *Helianthus annuus* und *Triticum aestivum* gefunden. Die *G. caledonium*-Sequenzen stammten aus *H. lanatus* und *Zea mays* sowie *G. geosporum* aus *P. lanceolata*. Aufgrund dieser Verbreitung konnte keine Wirtsspezifität der untersuchten AMF festgestellt werden. Die PCR-Produkte der *G. mosseae*-Gruppe wurden mit Endonukleasen behandelt, um Restriktionsmuster zu erhalten. Mit dem Enzym *AclI* konnte *G. mosseae* von den übrigen Arten unterschieden werden. Von den gewonnenen Sequenzdaten konnte unter Einbeziehung von Datenbank-Sequenzen ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden. Mithilfe der quantitativen Taqman<sup>®</sup> *real-time* PCR wurde die Kopienzahl der Mykorrhizapilze bestimmt. Von *A. longula* konnten bis zu 13.300 Kopien und von *G. mosseae* bis zu 64.750 Kopien je mg Wurzel nachgewiesen werden.

Die Pilze wurden in der Wurzel mit Trypanblau gefärbt, die Kolonisierungsraten mikroskopisch bonitiert und mit den pflanzenverfügbaren Phosphatgehalten der Rhizosphäre korreliert. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Mykorrhizierung und Standort, Jahreszeit, Pflanze oder Phosphatverfügbarkeit festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Kolonisierung mit Hyphen im Jahresverlauf zunimmt, während die Vesikelzahl abzunehmen scheint. Vermutlich werden die Speicherstoffe der Vesikel gegen Ende des Jahres zur Bildung von Sporen extraradikal verlagert. *P. lanceolata* wies generell die höchste Hyphen-Kolonisierungsrate auf und bei *H. lanatus* scheint es einen indirekten Zusammenhang zwischen Hyphendichte und Phosphatkonzentration zu geben. Außerdem wurde eine Sporenbestimmung vorgenommen, bei der sechs verschiedene Sporentypen unterschieden werden konnten. Der häufigste Sporentyp ähnelte dabei *G. mosseae*.

## 6 Literatur

- ABU AL-SOUD W, RADSTRÖM P (1988) Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Appl Environ Microbiol* 64: 3748-3753
- ALLEN MF, SEXTON JC, MOORE TS, CHRISTENSEN M (1981) Influence of phosphate source on vesicular-arbuscular mycorrhizae of *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex Steud. *New Phytol* 88: 683-693
- ALLEN EB, ALLEN MF (1990) The Mediation of Competition by Mycorrhizae in Successional and Patchy Environments. In: GRACE B, TILMAN D (eds.) *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, San Diego, pp. 376-389
- ALMEIDA RT, SCHENCK NC (1990) A Revision of the Genus *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales). *Mycologia* 82: 703-714
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- AMIJEE F (1989) Vesicular-arbuscular mycorrhizas: an ubiquitous symbiosis between fungi and roots of vascular plants. *Mycologist* 3: 176-180
- ANTONIOLLI ZI, SCHACHTMAN DP, OPHEL-KELLER K, SMITH SE (2000) Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. *Mycol Res* 104: 708-715
- ARNHEIM N (1983) Concerted evolution of multigene families. In: NEI M, KOEHN RK (eds.) *Evolution of Genes and Proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass., pp. 38-61
- AZCON-AGUILAR C, BAREA JM (1995) Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: VARMA A, HOCK B (eds.) *Mycorrhiza*. Springer, Berlin, pp. 391-407
- BAGO B (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226: 263-274
- BAHNWEG G, SCHULZE S, MÖLLER EM (1998) DNA isolation from recalcitrant materials such as trees, roots, bark and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 262: 79-82

- BAREA JM, JEFFRIES P (1995) Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. In: VARMA A, HOCK B (eds.) Mycorrhiza. Springer, Berlin, pp. 521-560
- BÉCARD G, PFEFFER PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. Protoplasma 174: 62-68
- BETHLENVALVAY GJ, SCHÜEPP H (1994) Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. In: GIANINAZZI S, SCHÜEPP H (eds.) Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser, Basel, pp. 117-131
- BERRECK M, HASELWANDTER K (2001) Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants. Mycorrhiza 10: 275-280
- BIANCOTTO V, BONFANTE P (1992) Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. Mycol Res 96: 1071-1076
- BLUME HP (1992) Handbuch des Bodenschutzes Bodenökologie und –belastung – Vorbeugende und abwehrende Schutzmaßnahmen. Ecomed, Landsberg
- BOBOWSKI BR, HOLE D, WOLF PG (1999) Identification of roots of woody species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Mol Ecol 8: 485-491
- BÖHM J (2000) Artspezifischer Nachweis arbuskulärer Mykorrhizapilze mit Hilfe von Sequenzanalysen der ribosomalen DNA. Dissertation, Technische Universität München in Weihenstephan, Lehrstuhl für Botanik
- BÖHM J, HAHN A, SCHUBERT R, BAHNWEIG G, ADLER N, NECHWATAL J, OEHLMANN R, OBWALD W (1999) Real-time quantitative PCR: DNA Determination in Isolated Spores of the Mycorrhizal Fungus *G. mosseae* and Monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their Respective Host Plants. J Phytopathology 147: 409-416
- BOITEUX LS, FONSECA MEN, SIMON PW (1999) Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. J Amer Soc Hort Sci 124: 32-38
- BONFANTE P, PEROTTO S (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol 130:3-21
- BONFANTE-FASOLO P (1984) Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL CL, BAGYARAJ DJ (eds.) VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, pp. 5-33

- BRUNDRETT M, BOUGHER N, DELL B, GROVE T, MALAJCZUK N (1996) Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32, Canberra
- BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RC (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Courier Companies, p. 328
- BURGGRAAF AJP, BERINGER JE (1989) Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. Mycol Res 96: 25-33
- CABELLO M, GASPAR L, POLLERO R (1994) *Glomus antarcticum* sp. nov., a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from Antarctica. Mycotaxon 51: 123-128
- CLAPP JP, YOUNG JPW, MERRYWEATHER J W (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. New Phytol 130: 259-265
- CLAPP JP, FITTER H, YOUNG JPW (1999) Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. Mol Ecol 8: 915-921
- DANIELS BA, SKIPPER HD (1984) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: SCHENCK NC (ed.) Methods and Principles of Mycorrhizal Research. St. Paul, Minnesota, pp. 29-35
- DAVIES FT, POTTER JR, LINDERMAN RG (1993) Drought Resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P-concentration – response in gas-exchange and water relations. Physiologia Plantarum 87: 45-53
- DELP G, ROSEWARNE GM, BARKER S (1998) The molecular route to understanding VAM symbiosis. In: VARMA A, HOCK B (eds.) Mycorrhiza. Springer, Berlin, pp. 327-352
- DEMEKE T, ADAMS RP (1992) The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. BioTechniques 12: 332-334
- DOYLE JJ, DOYLE JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15
- DUMAT-GAUDOT E, FURLAN V, GRENIER J, ASSELIN A (1992) New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 1: 133-136
- ENARD W, KHAITOVICH P, KLOSE J, ZÖLLNER S, HEISSIG F, GIAVALISCO P, NIESELT-STRUWE K, MUCHMORE E, VARKI A, RAVID R, DOXIADIS GM, BONTROP RE, PÄÄBO S (2002) Intra- and Interspecific Variation in Primate Gene Expression Patterns. Science 296: 340-342

- EOM A-H, WILSON GWT, HARTNETT DC (2001) Effects of ungulate grazers on arbuscular mycorrhizal symbiosis and fungal community structure in tallgrass prairies. *Mycologia* 93: 233-242
- FIEDLER HJ (2001) Böden und Bodenfunktionen in Ökosystemen, Landschaften und Ballungsgebieten. Expert, Renningen-Malmsheim, Forum EIPOS, Band 7
- FINCK A (1991) Düngung. Ulmer, Stuttgart
- FITTER AH, GRAVES JD, WATKINS NK, ROBINSON D, SCRIMGEOUR C (1998) Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Funct Ecol* 12: 406-412
- FRANK B (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Deutsch Bot Ges* 3: 128-145
- FRANKEN P, GNADINGER F (1994) Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense related genes. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 612-620
- GALVEZ L, DOUDS DD, WAGONER P, LONGNECKER LR, DRINKWATER LE, JANKE RR (1995) An overwintering cover crop increases inoculum of VAM fungi in agricultural soil. *American Journal of Alternative Agriculture* 10: 152-156
- GANGE AC, BOWER E, STAGG PG (1999) A comparison of visualization techniques for recording arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytol* 142: 123-132
- GARDES M, BRUNS TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118
- GEHRIG H, SCHÜBLER A, KLUGE M (1996) *Geosiphon pyriforme*, a Fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis. *J Mol Evol* 43: 71-81
- GEHRIG H, VOLZ F, HEUTE V (1998) DNA from difficult plant and fungal species using DNeasy Plant Kits. *QIAGENNews* 2: 14-17
- GERDEMANN JW, NICOLSON TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Myc Soc* 46: 235-244
- GIANINAZZI S (1991) Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agricult, Ecosys Environm* 35: 105-119

- GIOVANNETTI M, MOSSE B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 8: 489-500
- GIOVANNETTI M, SBRANA C, CIERNESI AS (1996) Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 65-71
- GIOVANNETTI M, AZZOLINI D, CITERNESI AS (1999) Anastomosis Formation and Nuclear and Protoplasmic Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Appl Environ Microbiol* 65: 5571-5575
- GREUTER W, MCNEILL J, BARRIE FR, BURDET H-M, DEMOULIN V, FILGUEIRAS TS, NICOLSON DH, SILVA PC, SKOG JE, TREHANE P, TURLAND NJ, HAWKSWORTH DL (2001) International Code of Botanical Nomenclature. *Regnum Vegetabile* 131. Koeltz Scientific Books, Königstein
- HAHN A, BONFANTE P, HORN K, PAUSCH F, HOCK B (1993) Production of monoclonal antibodies against surface antigens of spores from arbuscular mycorrhizal fungi by an improved immunization and screening procedure. *Mycorrhiza* 4: 69-78
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98
- HARRISON MJ, DIXON RA (1994) Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J* 6: 9-20
- HAWKSWORTH DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422-1432
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- HELGASON T, DANIELL TJ, HUSBAND R (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431
- HIGUCHI R, WATSON R (1999) Kinetic PCR analysis using a CCD camera and without using oligonucleotide probes. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (eds.) *PCR Applications. Protocols for functional Genomics*. Academic Press, San Diego, pp. 263-284

- HIJRI M, HOSNY M, VAN TUINEN D (1999) Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fung Genet Biol* 26: 141-151
- HOFFMANN G (1991) *Methodenbuch I. Die Untersuchung von Böden*. VDLUFA-Verlag Darmstadt
- HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280
- HOLLEMANN AF, WIBERG N (1985) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 33. Edition, de Gruyter, Berlin
- HOOKE JE, JAIZME-VEGA M, ATKINSON D (1994) Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: GIANINAZZI S, SCHÜEPP H (eds.) *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel, pp. 191-200
- HOSNY M, GIANINAZZI-PEARSON V, DULIEU H (1998) Nuclear content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41: 422-428
- HOSNY M, HIJRI M, PASSERIEUX E, DULIEU H (1999) rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* 226: 61-71
- INNIS MA, GELFAND DH (1990) Optimization of PCRs. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (eds.) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego pp. 3-11
- JAKOBSEN I (1995) Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In: VARMA A, HOCK B (eds.) *Mycorrhiza*. Springer, Berlin, pp. 297-324
- JAKOBSEN I, JONER EJ, LARSEN J (1994) Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth. In: GIANINAZZI S, SCHÜEPP H (eds.) *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel, pp. 133-146
- KENNEDY LJ, STUTZ JC, MORTON JB (1999) *Glomus eburneum* and *G. luteum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi, with emendation of *G. spurgum*. *Mycologia* 91: 1083-1093

- KJØLLER R, ROSENDAHL S (2001) Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas. *Mycol Res* 105: 1027-1032
- KNIPPERS R (2001) *Molekulare Genetik*. Thieme, Stuttgart
- KOKILERA L (1995) Comparative study of induction of endogenous DNA degradation in rat liver nuclei and intact thymocytes. *Comp Biochem Physiol* 111 B: 35-43
- KORMANIK PP, MCGRAW AC (1984) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots In: SCHENCK NC (ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 37-45
- KRAMADIBRATA K, WALKER C, SCHWARZOTT D (2000) A New Species of *Scutellospora* with a Coiled Germination Shield. *Annals of Botany* 86: 21-27
- KREISEL H, SCHAUER F (1987) *Methoden des mykologischen Laboratoriums*. Fischer, Stuttgart
- LANFRANCO L, WYSS P, MARZACHI C (1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *G. mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Ecol* 4: 61-65
- LEE LG, CONNELL CR, BLOCH W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21: 3761-3766
- LINDER CR, MOORE LA, JACKSON RB (2000) A Universal Molecular Method for Identifying Underground Plant Parts to Species. *Mol Ecol* 9: 1549-1559
- LLOYD-MACGILP SA, CHAMBERS SM, DODD JC (1996) Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *G. mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 103-111
- LONGATO S, BONFANTE P (1997) Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol Res* 133: 103-112
- MALDONADO-MENDOZA I, DEWBRE GR, VAN BUUREN ML, VERSAW WK, HARRISON MJ (2002) Methods to estimate the proportion of plant and fungal RNA in an arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 12: 67-74
- MCGONIGLE TP, MILLER MH, EVANS DG, FAIRCHILD GL, SWAN JA (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115: 495-501

- MERRYWEATHER J, FITTER A (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta* I. Diversity of fungal taxa. *New Phytol* 138: 117-129
- MORTON JB (1995) Taxonomic and phylogenetic divergence among five *Scutellospora* species based on comparative developmental sequences. *Mycologia* 87: 127-137
- MORTON JB, BENNY GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37: 441-491
- MORTON JB, REDECKER D (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195
- MORTON JB, BENTIVENGA SP, WHEELER WW (1993) Germplasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528
- MÜLHARDT C (2000) *Molekularbiologie*. Spektrum, Heidelberg
- MULLIS KB, FALOONA F, SCHAARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273
- MURRAY MG, THOMPSON WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321-4325
- PARKE JL, LINDERMAN RG (1980) Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*. *Can J Bot* 58: 1898-1904
- PETERSON RL, FARQUHAR ML (1994) Mycorrhizas – integrated development between roots and fungi. *Mycologia* 86: 311-326
- PETERSON RL, HOWARTH ML, WHITTIER DP (1981) Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*. *Canad J Bot* 59: 711-720
- PFEFFER PE, DOUDS JR. DD, BÉCARD G (1999) Carbon Uptake and the Metabolism and Transport of Lipids in an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587-598
- PIROZYNSKI KA, MALLOCH DW (1975) The Origin of Land Plants: A Matter of Mycotrophism. *BioSystems* 6: 153-164

- PONTECORVO G, ROPFER JA, HEMMONS LJ, MACDONALD KD, BUFTON AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141-238
- POWELL SJ (1995) Protocol optimization and reaction specificity. In: NEWTON CR (ed.) *PCR essential data*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 72-86
- POWELL CL, DANIEL J (1978) Mycorrhizal fungi stimulate uptake of soluble and insoluble phosphate fertilizer from phosphate deficient soil. *New Phytol* 80: 351-358
- REDECKER D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80
- REDECKER D, THIERFELDER H, WALKER C (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: 1756-1761
- REDECKER D, HIJRI M, DULIEU H (1999) Phylogenetic Analysis of a Dataset of Fungal 5.8S rDNA Sequences Shows That Highly Divergent Copies of Internal Transcribed Spacers Reported from *Scutellospora castanea* Are of Ascomycete Origin. *Fungal Genetics and Biology* 28: 238-244
- REDECKER D, MORTON JB, BRUNS TD (2000a) Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. *Mycologia* 92: 282-285
- REDECKER D, KODNER R, GRAHAM LE (2000b) Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921
- REDECKER D, MORTON JB, BRUNS TD (2000c) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol* 14: 276-284
- RODRIGUEZ A, DOUGALL T, DODD JC, CLAPP JP (2001) The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytologist* 152: 159-167
- ROGERS S, BENDICH AJ (1987) Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 9: 509-520
- ROSENDAHL S (1996) A practical Approach to the Species Concept in the Glomales. In: *Mycorrhizas in Integrated Systems From Genes to Plant Development – Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Symposium on Mycorrhizas*. Granada, pp. 15-18
- ROSENDAHL S, SEN R (1992) Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. *Meth Microbiol* 24: 169-194

- ROWLAND LJ, NGUYEN B (1993) Use of Polyethylene Glycol for Purification of DNA from Leaf Tissue of Woody Plants. *BioTechniques* 14: 735-736
- SAIKI RK (1990) Amplification of Genomic DNA In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (eds.) *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp. 13-20
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- SANDERS IR, FITTER AH (1992) The ecology and functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. *New Phytol* 120: 517-524
- SANDERS IR, ALT M, GROPE K (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 IR, CLAPP JP, WIEMKEN A (1996) The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 133: 123-134
- SAUNDERS GC, PARKES HC (1999) *Analytical molecular biology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- SAWAKI H, SUGAWARA K, SAITO M (1998) Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph, *Glomus leptochilum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* 39: 477-480
- SCHENCK NC, PÉREZ Y (1990) *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. 3<sup>rd</sup> ed., Synergistic Publications, Gainesville
- SCHILD TA (1996) Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. 7700 SDS Workshop, PE Applied Biosystems, Weiterstadt
- SCHMID E, OBERWINKLER F (1993) Mycorrhiza-like interaction between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy. *New Phytol* 124: 69-81
- SCHUBERT R, HILBIG W, KLOTZ S (2001) *Bestimmungsbuch der Pflanzengesellschaften Deutschlands*. Spektrum, Heidelberg
- SCHÜBLER A, GEHRIG H, SCHWARZOTT D (2001a) Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res* 105: 5-15

- SCHÜBLER A, SCHWARZOTT D, WALKER C (2001b) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421
- SCHWARZOTT D, WALKER C, SCHÜBLER A (2001) *Glomus*, the Largest Genus of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomales), Is Nonmonophyletic. *Mol Phylogenet Evol* 21: 190-197
- SHACHAR-HILL Y, PFEFFER PE, DOUDS D, OSMAN SF, DONER LW, RATCLIFFE RG (1995) Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek. *Plant Physiol* 108: 7-15
- SIMON L (1996) Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytol* 133: 95-101
- SIMON L, LALONDE M, BRUNS TD (1992) Specific Amplification of 18S Fungal Ribosomal Genes from Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Fungi Colonizing Roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291-295
- SIMON L, LÉVESQUE RC, LALONDE M (1993a) Identification of Endomycorrhizal Fungi Colonizing Roots by Fluorescent Single-Strand Conformation Polymorphism-Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* 59: 4211-4215
- SIMON L, BOUSQUET J, LÉVESQUE RC (1993b) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- SMITH SE, GIANINAZZI-PEARSON V (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plan Mol Biol* 39: 221-244
- SMITH SE, READ DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego
- SNIDER J (1999) Whole cell assays. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (eds.) *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, pp. 329-333
- STAHL M (1949) Die Mykorrhiza der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung der thallösen Formen. *Planta* 37: 103-148
- STREITWOLF-ENGEL R, BOLLER T, WIEMKEN A (1997) Clonal traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. *J Ecol* 85: 181-191
- SYLVIA DM, HUBBELL DH (1986) Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259:267

- TAYLOR TN, REMY W, HASS H (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560-573
- TEBBE C, VAHJEN W (1993) Interference of Humic Acids and DNA Extracted Directly from Soil in Detection and Transformation of Recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Appl Environ Microbiol* 59: 2657-2665
- TOTH R, MILLER RM, JARSTFER A, ALEXANDER A, BENNET EL (1991) The calculation of intraradical fungal biomass from percent colonisation in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Mycologia* 83: 553-558
- TRAPPE JM (1987) Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR GR (ed.) *Ecophysiology of VA Mycorrhizal plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 5-25
- TROUVELOT A, KOUGH JL, GIANINAZZI-PEARSON V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: GIANINAZZI-PEARSON V, GIANINAZZI S (eds.): *Physiological and genetic aspects of mycorrhizae*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 217-221
- TULASNE LR, TULASNE C (1845) Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cognito act. *Giorn Bot Ital* 2: 55-63
- VAN DER HEIJDEN MGA, KLIRONOMOS JN, URSIC M (1998a) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72
- VAN DER HEIJDEN MGA, BOLLER T, WIEMKEN A (1998b) Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091
- VAN TUINEN D, JACQUOT E, ZHAO B (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7: 879-887
- VANDENKOORNHUYSE P, LEYVAL C, BONNIN I (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87: 243-253
- VANDENKOORNHUYSE P, BALDAUF SL, LEYVAL C, STRACZEK J, YOUNG JPW (2002) Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. *Science* 295: 2051
- WALKER C (1992) Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897

- WALKER C, TRAPPE JM (1993) Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycol Res* 97: 339-344
- WALKER C, VESTBERG M (1994) A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi *Agric Sci Finland* 3: 233-240
- WALLEY FL, GERMIDA JJ (1996) Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza*: 6: 43-49
- WATKINS NK, FITTER AH, GRAVES JD, ROBINSON D (1996) Carbon transfer between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants linked by a common mycorrhizal network, quantified using stable carbon isotopes. *Soil Biol Biochem* 28: 471-477
- WEISSENHORN I, FELDMANN F (1999) Perspektiven der Nutzung der arbuskulären Mykorrhiza im niederländischen Gartenbau unter Glas. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt*, 363
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ (eds.) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322

## 7 Anhang

### A. Übersicht der AMF-Arten

In der folgenden Übersicht sind sämtliche AMF-Arten (inklusive *Geosiphon pyriforme*) und noch gebräuchliche Synonyme mit Autoren und Jahr der Beschreibung aufgeführt. Die Gliederung entspricht dem neuesten Stand (SCHÜBLER *et al.*, 2001b). Die Unterteilung der *Glomus*-Arten ist bereits – soweit möglich – berücksichtigt. *Glomus*-Arten, die aufgrund mangelnder Sequenzdaten bisher keiner der drei Gruppen zugeteilt werden konnten, werden weiterhin in der Gattung *Glomus* geführt. Die Bezeichnungen entsprechen den Korrekturen von WALKER & TRAPPE (1993) und SCHÜBLER *et al.* (2001b). Arten, von denen genetische Informationen in der NCBI-Datenbank vorliegt, sind mit einem § gekennzeichnet.

### STAMM GLOMEROMYCOTA WALKER & SCHÜBLER 2001

#### KLASSE GLOMEROMYCETES CAVALIER-SMITH 1998

#### ORDNUNG GLOMERALES (MORTON & BENNY 1990) WALKER & SCHÜBLER 2001

Familie Glomeraceae PIROZYNSKI & DALPÉ 1989

Gattung *Glomus* TULASNE & TULASNE 1845

#### *Glomus mosseae*-Gruppe (GIGrA)

##### Untergruppe a (GIGrAa)

- § *G. caledonium* (NICOLSON & GERDEMANN) TRAPPE & GERDEMANN 1974
- § *G. coronatum* GIOVANNETTI, AVIO & SALUTINI 1991
- § *G. fragilistratum* SKOU & JAKOBSEN 1989
- § *G. geosporum* (NICOLSON & GERDEMANN) WALKER 1982
- § *G. mosseae* (NICOLSON & GERDEMANN) GERDEMANN & TRAPPE 1974
- § *G. verruculosum* BLASZKOWSKI 1997

##### Untergruppe b (GIGrAb)

- § *G. clarum* NICOLSON & SCHENCK 1979
- § *G. coremioides* (BERK. & BROOME) REDECKER & MORTON 2000
  - = *Sc. coccogena* (PATOILLARD) VON HÖHNEL 1910
  - = *Sc. coremioides* BERKELEY & BROOME 1873
  - = *Sc. dussii* (PATOILLARD) VON HÖHNEL 1910
- § *G. fasciculatum* (THAXTER) GERDEMANN & TRAPPE emend. WALKER & KOSKE 1987
- § *G. intraradices* SCHENCK & SMITH 1982 (*G. intraradix*)
- § *G. manihotis* HOWELER, SIEVERDING & SCHENCK 1984 (*G. manihot*) = *G. clarum*? (oder GIGrB?)
- § *G. sinuosum* (GERDEMANN & BAKSHI) ALMEIDA & SCHENCK 1990
  - = *Sc. pakistanica* IQBAL & BUSHRA 1980
  - = *Sc. sinuosa* GERDEMANN & BAKSHI 1976
- § *G. vesiculiferum* (THAXTER) GERDEMANN & TRAPPE 1974

Glomus etunicatum-Gruppe (GIGrB)

- § *G. claroideum* (SCHENCK & SMITH 1982) WALKER & VERSTBERG 1998 (*G. claroides*)
- § *G. etunicatum* BECKER & GERDEMANN 1977 (oder Diversisporales?)
- § *G. lamellosum* DALPÉ, KOSKE & TEWS 1992
- § *G. luteum* Kennedy, STUTZ & MORTON 1999
- § *G. manihotis* HOWELER, SIEVERDING & SCHENCK 1984 (*G. manihot*) = *G. clarum*? (oder GIGrAb?)
- § *G. microaggregatum* KOSKE, GEMMA & OLEXIA 1986 (GIGrB)
- § *G. viscosum* WALKER *et al.* 1995

Noch nicht zugeordnete Arten

- G. aggregatum* (SCHENCK & SMITH) KOSKE 1985
- G. albidum* WALKER & RHODES 1981
- G. ambisporum* SMITH & SCHENCK 1985
- G. antarcticum* CABELLO 1994
- G. arborenses* MCGEE 1986
- G. arenarium* BLASZKOWSKI, TADYCH & MADEJ 2001
- G. australe* (BERKELEY) BERCH 1983
- G. boreale* (THAXTER) TRAPPE & GERDEMANN 1922
- G. botryoides* ROTHWELL & VICTOR 1984
- G. callosum* SIEVERDING 1988
- G. canadense* (THAXTER) TRAPPE & GERDEMANN 1922
- G. cerebriforme* MCGEE 1986
- G. chimonobambusae* WU & LIU 1995
- G. citricola* TANG & ZANG 1984
- = *G. fistulosum* SKOU & JAKOBSEN 1989
- = *G. maculosum* MILLER & WALKER 1986
- = *G. multisubstansum* MUKERJI, BHATTACHARJEE & TEWARI 1983
- G. clavisporem* (TRAPPE) ALMEIDA & SCHENCK 1990
- = *Sc. clavisporea* TRAPPE 1977
- = *Sc. microcarpa* IQBAL & BUSHRA 1980
- § *G. constrictum* TRAPPE 1977
- G. convolutum* GERDEMANN & TRAPPE 1974
- G. corymbiforme* BLASZKOWSKI 1995
- G. delhiense* MUKERJI, BHATTACHARJEE & TEWARI 1983
- G. deserticola* TRAPPE, BLOSS & MENGE 1984
- G. diaphanum* MORTON & WALKER 1984
- § *G. dimorphicum* BOYETCHKO & TEWARI 1986
- G. dominikii* BLASZKOWSKI 1988
- G. eburneum* KENNEDY, STUTZ & MORTON 1999
- G. flavisporum* (LANGE & LUND) TRAPPE & GERDEMANN 1964
- G. formosanum* WU & CHEN 1986
- G. fragile* (BERK. & BROOME) TRAPPE & GERDEMANN 1974
- G. fuegianum* (SPEGAZZINI) TRAPPE & GERDEMANN 1922
- G. fulvum* (BERK. & BROOME) TRAPPE & GERDEMANN 1922
- G. gibbosum* BLASZKOWSKI 1997
- G. globiferum* KOSKE & WALKER 1986
- G. glomerulatum* SIEVERDING 1987
- (*G. hadleyi* ined.)
- G. halonatum* ROSE & TRAPPE 1980 (*G. halon*, *G. halonatus*)
- G. heterosporum* SMITH & SCHENCK 1985

- § *G. hoi* BERCH & TRAPPE 1985  
 (G. hyalinum ined.)  
*G. invermaium* HALL 1977 (*G. invermayanum*)  
*G. laccatum* BLASZKOWSKI  
*G. lacteum* ROSE & TRAPPE 1980  
*G. liquidambaris* (WU & CHEN) ALMEIDA & SCHENCK 1990  
 = *Sc. cunninghamia* HU 1988  
 = *Sc. liquidambaris* WU & CHEN 1987  
*G. macrocarpum* TULASNE & TULASNE 1845  
*G. magnicaule* HALL 1977  
*G. melanosporum* GERDEMANN & TRAPPE 1974  
*G. microcarpum* TULASNE & TULASNE 1845 => **Typusart**  
*G. minutum* BLASZKOWSKI, TADYCH & MADAJ 2000  
 (G. mirificum ined.)
- § *G. monosporum* GERDEMANN & TRAPPE 1974  
*G. mortonii* BENTIVENGA & HETRICK 1991  
*G. multicaule* GERDEMANN & BAKSHI 1976  
*G. multiforum* TADYCH & BLASZKOWSKI 1997  
*G. nanolumen* KOSKE & GEMMA 1989  
*G. pallidum* HALL 1977  
*G. pansihalos* BERCH & KOSKE 1986  
*G. przelewicensis* BLASZKOWSKI 1988 = *G. albidum*?  
*G. pubescens* (SACCARDO & ELLIS) TRAPPE & GERDEMANN 1974  
*G. pulvinatum* (HENNINGS) TRAPPE & GERDEMANN 1975  
*G. pustulatum* KOSKE, FRIESE, WALKER & DALPÉ 1986  
*G. radiatum* (THAXTER) TRAPPE & GERDEMANN 1974  
*G. reticulatum* BHATTACHARJEE & MUKERJI 1980  
*G. rubiforme* (GERDEMANN & TRAPPE) ALMEIDA & SCHENCK 1990  
 = *Sc. indica* BHATTACHARJEE & MUKERJI 1980  
 = *Sc. pachycaulis* WU & CHEN 1986  
 = *Sc. rubiformis* GERDEMANN & TRAPPE 1974  
*G. scintillans* ROSE & TRAPPE 1980  
*G. segmentatum* TRAPPE, SPOONER & IVORY 1979  
*G. sterilum* MEHROTRA & BAIJAL  
*G. taiwananse* (WU & CHEN) ALMEIDA & SCHENCK 1990  
 = *Sc. taiwanensis* WU & CHEN 1987  
*G. tenebrosum* (THAXTER) BERCH 1983  
*G. tenerum* TANDY emend. MCGEE 1986  
*G. tenue* (GREENHALL) HALL 1977  
*G. tortuosum* SCHENCK & SMITH 1982  
*G. trimurales* KOSKE & HALVORSON 1989  
*G. tubiforme* TANDY 1975 (*G. tubaeforme*)  
*G. warcupii* MCGEE 1986

(Gattung *Sclerocystis* Berkeley & Broome 1873) s. *Glomus*

## ORDNUNG DIVERSISPORALES WALKER &amp; SCHÜßLER 2001

## Familie Acaulosporaceae MORTON &amp; BENNY 1990

Gattung *Acaulospora* (GERDEMANN & TRAPPE) emend. BERCH 1985

- A. bireticulata* ROTHWELL & TRAPPE 1979
- A. capsicula* BLASZKOWSKI 1991
- A. cavernata* BLASZKOWSKI 1989
- § *A. colossica* SCHULTZ, BEVER & MORTON 1999
- A. delicata* WALKER, PFEIFFER & BLOSS 1986
- § *A. denticulata* SIEVERDING & TORO 1987
- A. dilatata* MORTON 1986
- A. elegans* TRAPPE & GERDEMANN 1974
- A. excavata* INGLEBY & WALKER 1994
- A. foveata* TRAPPE & JANOS 1982
- A. gedanensis* BLASZKOWSKI 1988 (*A. gdanskensis*)
- § *A. koskei* BLASZKOWSKI 1995
- § *A. lacunosa* MORTON 1986
- § *A. laevis* GERDEMANN & TRAPPE 1974
- § *A. longula* SPAIN & SCHENCK 1984 = *A. morrowiae*?
- § *A. mellea* SPAIN & SCHENCK 1984
- § *A. morrowiae* SPAIN & SCHENCK 1984
- A. myriocarpa* SPAIN, SIEVERDING & SCHENCK 1986
- A. nicolsonii* WALKER, REED & SANDERS 1984
- A. paulineae* BLASZKOWSKI Jahr?
- A. polonica* BLASZKOWSKI 1988
- A. rehmi* SIEVERDING & TORO 1987
- § *A. rugosa* MORTON 1986 = *A. morrowiae*?
- § *A. scrobiculata* TRAPPE 1977
- § *A. spinosa* WALKER & TRAPPE 1981
- A. splendida* SIEVERDING, CHAVERRI & ROJAS 1988
- A. sporocarpia* BERCH 1985 (*A. sporocarpa*)
- A. taiwania* HU 1988
- A. thomii* BLASZKOWSKI 1988
- § *A. tuberculata* JANOS & TRAPPE 1982
- A. undulata* SIEVERDING 1988
- A. walkeri* KRAMADIBRATA & HEDGER 1990

Gattung *Entrophospora* AMES & SCHNEIDER 1979

- E. baltica* BLASZKOWSKI & TADYCH 1998
- § *E. colombiana* SPAIN & SCHENCK 1984
- § (*E. contigua* ined.)
- § *E. infrequens* (HALL) AMES & SCHNEIDER 1979
- E. kentinensis* WU & LIU 1995
- E. schenckii* SIEVERDING & TORO 1987

## Familie Gigasporaceae MORTON &amp; BENNY 1990

Gattung *Gigaspora* (GERDEMANN & TRAPPE) WALKER & SANDERS 1986

- § *Gi. albida* SCHENCK & SMITH 1982

- § *Gi. decipiens* HALL & ABBOTT 1984
- § *Gi. gigantea* (NICOLSON & GERDEMANN) GERDEMANN & TRAPPE 1974
- § *Gi. margarita* BECKER & HALL 1976  
= *Gi. ramisporophora* SPAIN, SIEVERDING & SCHENCK 1989
- § *Gi. rosea* NICOLSON & SCHENCK 1979  
= *Gi. candida* BHATTACHARJEE, MUKERJI, TEWARI & SKOROPAD 1982

Gattung *Scutellospora* WALKER & SANDERS 1986

- S. alborosea* (FERRER & HERRERA) WALKER & SANDERS 1980
- S. arenicola* KOSKE & HALVORSON 1989
- S. armeniaca* BLASZKOWSKI 1992
- § *S. aurigloba* (HALL) WALKER & SANDERS 1977 (*S. auriglobosa*)  
*S. biornata* SPAIN, SIEVERDING & TORO 1989
- § *S. calospora* (NICOLSON & GERDEMANN) WALKER & SANDERS 1986
- § *S. castanea* WALKER 1993 = *S. persica*?
- § *S. cerradensis* SPAIN & MIRANDA 1997
- § *S. coralloidea* (TRAPPE, GERDEM. & HO) WALKER & SANDERS 1985 (*S. coralloides*)  
*S. crenulata* HERRERA-PERAZA, CUENCA & WALKER 2001
- § *S. dipapillosa* (WALKER & KOSKE) WALKER & SANDERS 1985
- § *S. dipurpurascens* MORTON & KOSKE 1988
- § *S. erythropha* (KOSKE & WALKER) WALKER & SANDERS 1984
- § *S. fulgida* KOSKE & WALKER 1986
- § *S. gilmorei* (TRAPPE & HERD.) WALKER & SANDERS 1974  
*S. gregaria* (SCHENCK & NICOLSON) WALKER & SANDERS 1985  
*S. hawaiiensis* KOSKE & GEMMA 1995
- § *S. heterogama* (NICOLSON & GERDEMANN) WALKER & SANDERS 1985  
*S. minuta* (FERRER & HERRERA) WALKER & SANDERS 1980  
*S. nigra* (REDHEAD) WALKER & SANDERS 1979
- § *S. nodosa* BLASZKOWSKI 1991
- § *S. pellucida* (NICOLSON & SCHENCK) WALKER & SANDERS 1986
- § *S. persica* (KOSKE & WALKER) WALKER & SANDERS 1985  
= *Gi. tuberculata* NEERAJ, MUKERJI, SHARMA & VARMA 1993
- § *S. projecturata* KRAMADIBRATA & WALKER 2000  
*S. reticulata* (KOSKE, MILLER & WALKER) WALKER & SANDERS 1983  
*S. rubra* STÜRMER & MORTON 1999  
*S. savannicola* (FERRER & HERRERA) WALKER & SANDERS 1980  
*S. scutata* WALKER & DIEDERICHS 1989  
*S. spinosissima* WALKER, CUENCA & SANCHEZ 1998  
*S. tricalypta* (HERRERA & FERRER) WALKER & SANDERS 1980  
*S. verrucosa* (KOSKE & WALKER) WALKER & SANDERS 1985  
*S. weresubiae* KOSKE & WALKER 1986

Familie Diversisporaceae fam. ined.

- § *G. etunicatum* BECKER & GERDEMANN 1977 (oder *Glomus* GlGrB?)
- § *G. spurcum* (PFEIFFER, WALKER & BLOSS 1996) KENNEDY, STUTZ & MORTON 1999
- § *G. versiforme* (KARSTEN) BERCH 1983  
= *G. epigaeum* DANIELS & TRAPPE 1979

**ORDNUNG ARCHAEOSPORALES WALKER & SCHÜBLER 2001**

Familie Archaeosporaceae MORTON &amp; REDECKER 2001

Gattung *Archaeospora* MORTON & REDECKER 2001§ *Ar. gerdemanii* (ROSE, DANIELS & TRAPPE) MORTON & REDECKER 2001= *G. gerdemanii* ROSE, DANIELS & TRAPPE 1979§ *Ar. leptoticha* (SCHENCK & SMITH) MORTON & REDECKER 2001= *A. appendicula* SPAIN, SIEVERDING & SCHENCK 1984= *A. gerdemanii* NICOLSON & SCHENCK 1979= *G. fecundisporum* SCHENCK & SMITH 1982= *G. leptotichum* SCHENCK & SMITH 1982§ *Ar. trappei* (AMES & LINDERMAN) MORTON & REDECKER 2001= *A. trappei* AMES & LINDERMAN 1976

Familie Geosiphonaceae

Gattung *Geosiphon* (KÜTZ.) v. WETTSTEIN 1915§ *Geo. pyriforme* (KÜTZ.) v. WETTSTEIN 1915**ORDNUNG PARAGLOMERALES WALKER & SCHÜBLER 2001**

Familie Paraglomeraceae MORTON &amp; REDECKER 2001

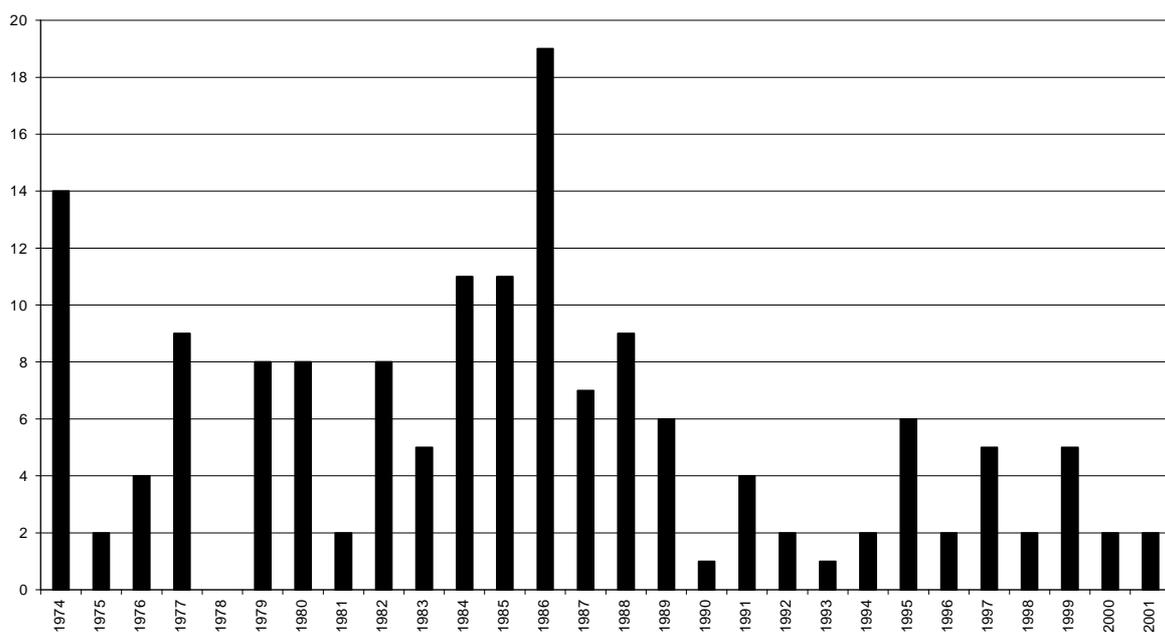
Gattung *Paraglomerus* MORTON & REDECKER 2001§ *P. brasilianum* (SPAIN & MIRANDA) MORTON & REDECKER 2001= *G. brasilianum* SPAIN & MIRANDA 1996§ *P. occultum* (WALKER) MORTON & REDECKER 2001= *G. occultum* WALKER 1982**B. Neubeschreibung von Arten**

Abb. 50: Zahl der neu beschriebenen AMF-Arten seit 1974.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hock für die Überlassung des Themas und die fachliche Unterstützung während meiner Arbeit an seinem Lehrstuhl.

Herrn Dr. Böhm möchte ich besonders für die von ihm geleistete Vorarbeit auf diesem Gebiet, die Überlassung von Pilzmaterial und seine konstruktive Kritik danken.

Für die gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie bedanke ich mich bei allen übrigen Mitarbeitern, insbesondere bei Frau Dr. Lux-Endrich (Mykorrhiza) und Frau Rothe (Computer-Problemchen). Ganz besonderer Dank gilt auch Frau Scholz, die sich überaus kompetent um „den Papierkram“ sorgte.

Im Rahmen des F.A.M. möchte ich mich für die Kooperation bei Herrn Prof. Dr. Munch, Herrn PD Dr. Schröder (F.A.M.-Leitung), Herrn Prof. Schnyder, Frau Dr. Huber-Sannwald (Mykorrhiza), Herrn Dr. Schloter (TGGE) und Herrn Dr. Lebuhn (Gaeumannomyces) bedanken.

Für ihre Ideen und Ratschläge rund um das Problem der DNA-Extraktion danke ich Herrn PD Dr. Weller und Frau Dr. Römmelt, sowie Frau Dr. Boronowski (QIAGEN), die mit mir geduldig zahlreiche Varianten am Telefon besprochen hat.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die jederzeit zu mir gestanden hat und meinen Freunden, die von mir vernachlässigt wurden.

Bei Steffi bedanke ich mich für ihre Unterstützung und ihre Geduld mit mir.

Bei Herrn Aldinger, der leider viel zu früh von uns gegangen ist, möchte mich dafür bedanken, dass es ihm nicht gelungen ist, mir von meinem Studium abzuraten.

Ich danke dem Bundesministerium für Forschung und Bildung für die finanzielle Förderung des Projekts.

---

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Holger Geue  
Geburtsdatum: 24. Juli 1972  
Geburtsort: Augsburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1979 – 1983 Wittelsbacher Grundschule in Augsburg  
1983 – 1992 Holbein-Gymnasium in Augsburg  
(Abschluß: Allgemeine Hochschulreife)  
Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie

### **Hochschulstudium:**

Okt. 1993 – Jun. 1998 Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
(Abschluß: Lebensmittelchemiker, 1. Staatsexamen)

### **Praktische Tätigkeiten:**

Jul. 1992 – Sep. 1993 Wehrdienst als Sanitäts- und Stabsdienstsoldat beim SanLehrBtl. 851 in München  
Nov. 1996 - Dez. 1996 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
Jul. 1998 - Jan. 1999 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
seit Feb. 1999 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Zellbiologie der TU München in Freising-Weihenstephan

Von Februar 1999 bis April 2002 wurde die vorliegende Dissertation angefertigt.