
BACHELORARBEIT

Herr
Patrick Merker

Arbuskuläre Mykorrhizapilze

Aufbau einer Zucht in Topfkultur

2024

Fakultät **Angewandte Computer- und
Biowissenschaften**

BACHELORARBEIT

Arbuskuläre Mykorrhizapilze

Aufbau einer Zucht in Topfkultur

Autor:

Patrick Merker

Studiengang:

Bachelor Biotechnologie

Seminargruppe:

BT19wM-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Iris Herrmann-Geppert

Zweitprüfer:

Dipl. Ing. FH Lennart Schulz

Weiterer Betreuer:

Dipl. Ing. FH Lennart Schulz

Mittweida, August 2024

Bibliografische Angaben

Merker, Patrick: Arbuskuläre Mykorrhizapilze, Aufbau einer Zucht in Topfkultur, 34 Seiten, 21 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Englischer Titel: *Arbuscular Mycorrhizal Fungi - Establishment of a cultivation in pot culture*

Bachelorarbeit, 2024

Satz: L^AT_EX

Kurzbeschreibung

Diese Bachelorarbeit widmet sich dem Aufbau einer Zucht von arbuskulären Mykorrhizapilzen. Diese Zucht soll eine beständige Quelle von Sporen für ökotoxikologischen Untersuchungen bieten.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Reich der Pilze.....	1
1.1.1 Unterschätzte Organismen.....	1
1.1.2 Aufbau der Symbiose.....	2
1.1.3 Die erfolgreichste Beziehung der Welt.....	4
1.1.4 Der Einfluss des Menschen.....	5
1.2 Grundlagen des Versuchs.....	9
1.2.1 <i>Funneliformis mosseae</i>	9
1.2.2 Die verwendeten Pflanzen.....	10
2 Zielstellung.....	11
3 Materialien und Geräte.....	12
4 Methoden.....	13
5 Ergebnisse.....	16
6 Diskussion.....	23
7 Ausblick.....	26
8 Zusammenfassung.....	27
Originalarbeiten.....	30
Webseiten.....	32
Glossary.....	33

II. Abbildungsverzeichnis

1	Vergleich von Ektomykorrhiza (links) und Endomykorrhiza (rechts). Quelle: Brechner, Dinkelaker und Dreesmann (2024)	3
2	Schematische Darstellung eines Arbuskels in der Wirtszelle. Aus Parniske (2008)	4
3	Der Stoffaustausch zwischen Pflanzen- und Pilzzelle. Aus Parniske (2008)	5
4	Eine <i>F. mosseae</i> -Spore unter 40x (1) und 100x (2) Vergrößerung	9
5	Färbung einer mit <i>F. mosseae</i> durchsetzten Wurzel. Aus: Rasouli et al. (2023).....	10
6	Gefäße mit Abdeckungen; linke Seite Referenz, rechte Seite die Zucht	13
7	Wurzeln nach dem Bleichen; Das linke Bild zeigt die Wurzeln der Petersilie, das rechte Bild die des Klees	14
8	Wurzeln nach der Färbung; Das linke Bild zeigt die Wurzeln der Petersilie, das rechte Bild die des Klees	15
9	Pflanzgefäße nach 56 Tagen. Auf der linken Seite die Gefäße ohne Inokulum, auf der rechten Seite mit Inokulum. Obere Reihe Klee, mittlere Reihe Zwiebel, untere Reihe Petersilie.	16
10	Gegenüberstellung der Zwiebelgefäße. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum.....	16
11	Vergleich zweier Petersilienpflanzen. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum	17
12	Vergleich zweier Kleepflanzen. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum	17
13	Wurzelausschnitt von Petersilie mit Inokulum, 100x Vergrößerung	18
14	Wurzelausschnitt von Petersilie mit Inokulum, 400x Vergrößerung	18
15	Wurzelausschnitt von Petersilie ohne Inokulum, 40x Vergrößerung	19
16	Gegenüberstellung der Kleewurzeln. Linke Seite ohne Inokulum, rechte Seite mit Inokulum	19
17	Vergleich der Petersilienpflanzen aus dem 2. Durchgang. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum	20
18	Nahaufnahme des Zwiebelgefäß ohne Inokulum.	20
19	Wurzeln der Petersilie mit Inokulum, 2. Durchgang, 100x Vergrößerung	21
20	Wurzelspitze des Klee mit Inokulum, 2. Durchgang, 100x Vergrößerung	22
21	Wurzelspitze des Klee mit Inokulum, 2. Durchgang, 400x Vergrößerung	22

III. Tabellenverzeichnis

1 Gegenüberstellung verschiedener Pestizide und deren Wirkung auf AM-Pilze; Aus: Hage- Ahmed, Rosner und Steinkellner (2019)	7
2 Gegenüberstellung der kombinierten Biomassen aus Gefäßen mit und ohne Inokulum des 1. Durchgang	18
3 Gegenüberstellung der kombinierten Biomassen aus Gefäßen mit und ohne Inokulum des 2. Durchgang	20

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
ERH	extraradikale Hyphen
KOH	Kaliumhydroxid
Lsg.	Lösung
o.A.	oder Anderes
PAM	periarbuskuläre Membran
PAR	periarbuskulärer Raum
TAG	Triacylglycerol
VA-M.	vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
vgl.	vergleiche

1 Einleitung

1.1 Das Reich der Pilze

1.1.1 Unterschätzte Organismen

Das Reich der Pilze bildet einen großen Teil der belebten Natur, dennoch wird dieser Teil häufig übersehen. Jedoch sind Pilze und insbesondere ihre wechselseitigen Beziehungen zu Pflanzen essentiell für funktionierende Ökosysteme und auch unsere Landwirtschaft.

So ermöglichten Pilze erst die Ausbreitung des Lebens an Land. Als vor ca. 600 Millionen Jahren die ersten Algen begannen das Wasser der Urmeere zu verlassen, folgten ihnen rasch erste Pilze, zu beiderseitigem Nutzen, wie sich zeigen sollte (Sheldrake und Vogel, 2020). Es ist zwar noch immer ungeklärt, wie genau die ersten Pilze und Algen an Land zueinander fanden, jedoch war diese Konstellation schnell unzertrennlich. Es entwickelte sich die Symbiose, die wir heute als *Mykorrhiza* bezeichnen. Dieser Begriff leitet sich vom Altgriechischen *Mýkes*, Pilz, und *rhiza*, Wurzel, ab. Hierbei verwachsen die Feinwurzeln der Pflanze mit dem *Mycel* der Pilze. Die Pflanze versorgt den Pilz mit Energieträgern wie z.B. Zuckern, im Gegenzug ermöglichen die Pilze der Pflanze Zugang zu Salzen und Wasser, welche die Pflanzenwurzel sonst nicht erreichen würde (Sheldrake und Vogel, 2020).

Weiterhin spielen Pilze eine wichtige Rolle im Stoffkreislauf der Biosphäre. Da sie nahezu jedes organische Material zersetzen können wirken Pilze als Destruenten, z.B. beim Abbau abgestorbener Bäume (Rohrmann und Jäkel, 2020). Da Holz ein widerstandsfähiges Material ist, bestehend aus Cellulose und Lignin, sind zersetzende Pilze ungemein wichtig um die enthaltenen Nährstoffe und Mineralien dem Boden und damit auch dem ganzen Ökosystem wieder zugänglich zu machen.

Nicht zu unterschätzen ist auch die Gefahr von krankheitserregenden Pilzen, welche auf vielfältige Weise auftreten können. So bereiten Pilze der Landwirtschaft große Probleme durch den Befall der Ernten. Bekannte Beispiele für Pilze als Schädlinge sind das Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) im Getreide oder der Echte Mehltau (*Erysiphaceae*) der viele Nutz- und Zierpflanzen befällt. Laut einer Studie der Universität Toulouse, schätzt Savary et al. (2019), dass allein in Nordwesteuropa Schadpilze Ernteverluste bei Weizen von bis zu 14 Millionen Tonnen pro Jahr verursachen. Nach Savary et al. (2019) sollen diese Verluste in weniger entwickelten Regionen, in welchen ohnehin bereits ein Nahrungsdefizit herrscht, noch höher ausfallen. Vor dem Hintergrund des Klimawandels stellen Schadpilze ein großes, zusätzliches Problem für die Ernährungssicherheit dieser Regionen dar.

Jedoch sind pathogene Pilze keinesfalls nur eine Gefahr für Nutzpflanzen, sie können auch ernstzunehmende Krankheiten bei Mensch und Tier hervorrufen. Bekannteste My-

kose ist wohl der Fußpilz, doch Pilze verursachen nicht nur oberflächliche Hautkrankheiten. Hefen aus der Gattung *Candida* kommen natürlich auf den Schleimhäuten des Verdauungstrakts und der Zunge vor, können diese jedoch bei geschwächtem Immunsystem infizieren, was zu einer Kandidose führt (Meena und Kumar, 2022). Weiterhin können Mykosen die inneren Organe befallen, was dann als Systemmykose bezeichnet wird; dies geschieht allerdings in der Regel nur bei geschwächtem Immunsystem. Beispielsweise können *Aspergillus*-Arten die Lunge schädigen. Ein sehr aktuelles Beispiel ist auch, dass in Indien im Zuge der COVID-19-Pandemie die Fälle von Mukormykose, ausgelöst von Pilzen der Gattung *Mucor*, drastisch anstiegen (Schwarz, 2023). Die größte Herausforderung bei Systemmykosen ist ihre schwere Behandelbarkeit, da z.B. die eben erwähnten *Mucor*-Arten eine Resistenz gegen geläufige Antimykotika besitzen (Vogt et al., 2013).

Zuletzt haben einige Pilze auch eine wichtige Stellung in biotechnologischen Verfahren inne (Wainwright, 2013). Mit *Aspergillus*-Arten, allen voran *Aspergillus niger*, wird im großen Maßstab Citronen- und Gluconsäure hergestellt, welche in Lebensmitteln und der chemischen Industrie Anwendung finden. Arten der Familie *Penicillium* genießen große Bedeutung in der Medizin als Produzenten vom Antibiotikum Penicillin und Antimykotikum Griseofluvin. Das breiteste Anwendungsspektrum haben aber die Hefen. Neben der bekannten Back-/Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die zum Backen und zur Alkoholherstellung genutzt wird, liefern Hefen noch diverse andere Produkte. Unter anderem produzieren Hefen auch Citronen- und Gluconsäure, **Riboflavin** und Enzyme wie beispielsweise Invertase.

Trotz dessen, dass Pilze bisher eher übersehen wurden, rücken sie in letzter Zeit doch zunehmend auch ins Blickfeld von Branchen, welche bisher wenig mit diesen zu tun hatten (Sheldrake und Vogel, 2020). Pilze bieten das Potential in Zukunft innovative Lösungen bei der Entwicklung neuer Medikamente, der Abfallentsorgung und sogar in der Bautechnik zu finden.

1.1.2 Aufbau der Symbiose

Allgemein wird die Art, wie Wurzel und **Mycel** verbunden sind, unterschieden in Endo- und Ektomykorrhiza.

Das *Ektomykorrhiza* kommt vornehmlich bei Bäumen und Sträuchern in gemäßigten Breiten vor, teilweise auch bei tropischen Arten. Wie der Name schon sagt bleibt diese Form des Mykorrhiza nur oberflächlich, heißt das Mycel bildet eine dicke Schicht aus **Hyphen** um die Wurzel herum, dringt aber nur selten in diese ein.

Sollte das Mycel in die Wurzel hinein wachsen, dann nur in die Interzellularräume, wo es ein extrazelluläres Geflecht bildet, das sogenannte Hartig'sche Netz. Vertreter die Ektomykorrhiza bilden, sind Ständerpilze wie z.B. der Steinpilz oder Fliegenpilz, selten auch Schlauchpilze, wie z.B. Echte Trüffel (Brechner, Dinkelaker und Dreesmann, 2024).

In Abb. 1 ist auf der linken Seite eine Darstellung eines Ektomykorrhizas zu sehen. Hier zeigt sich, wie dieses eigentlich oberflächlich wachsende Mycel teilweise bis ins inners-

te der Wurzel, zum **Xylem**, vordringt. Weiterhin ist gut zu erkennen, wie mächtig die Hülle aus Hyphen um die Wurzel herum werden kann.

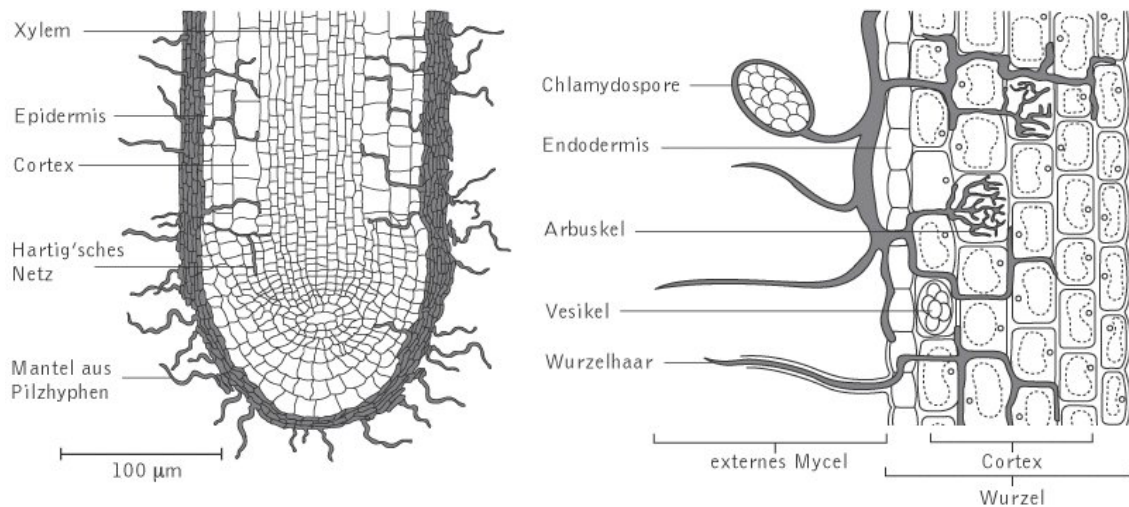


Abbildung 1: Vergleich von Ektomykorrhiza (links) und Endomykorrhiza (rechts). Quelle: Brechner, Dinkelaker und Dreesmann (2024)

Dem gegenüber steht auf der rechten Seite von Abb. 1 eine Darstellung eines *Endomykorrhizas*.

Hier ist die wichtigste Form der Endomykorrhiza abgebildet, die *vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza* (VA-M) oder kurz einfach arbuskuläre Mykorrhiza (Brechner, Dinkelaker und Dreesmann, 2024). Der Name leitet sich vom Lateinischen *arbus* für Baum ab und rührt daher, dass die Pilzhypen in die Wurzelzellen eindringen und dort Verzweigungen ausbilden, welche optisch an Bäume erinnern. Diese werden Arbuskel genannt und sind in der Mitte des rechten Bildes von Abb. 1 allgemein und in Abb. 2 im Detail dargestellt. Weiterhin wird in Abb. 1 anhand des Maßstabs der Wurzelzellen verdeutlicht, dass die AM wesentlich kleiner und filigraner als die Ektomykorrhiza ist. Das externe Mycel kann sich mehrere Meter um die Wurzel herum ausbreiten und ob seiner sehr geringen Hyphengröße auch in feinste Bodenpartikel eindringen, was die Nährstoffaufnahme wesentlich effizienter gestaltet als es die Wurzel allein könnte. Das externe Mycel trägt außerdem Chlamydosporen, Organellen, die zur Fortpflanzung und zum Erhalt des Pilzes dienen.

In Abb. 2 wird gezeigt, wie die Verbindung von Arbuskel und Pflanzenzelle im Detail aussieht. Der Pilz durchstößt die Zellwand der Pflanze, jedoch nicht deren Zellmembran. Diese stülpt sich um die Hyphe und separiert die Pilzzelle vom Cytoplasma der Pflanze. Sie wird in dieser Funktion als periarbuskuläre Membran, kurz PAM, bezeichnet. Zwischen der Zellwand des Pilzes und der PAM befindet sich ein interzellulärer Bereich, genannt periarbuskulärer Raum (PAR). Aufgrund der Synthesefunktion der Zellmembranen beider Seiten besteht dieser Raum sowohl aus Pilz- als auch aus Pflanzenmaterial.

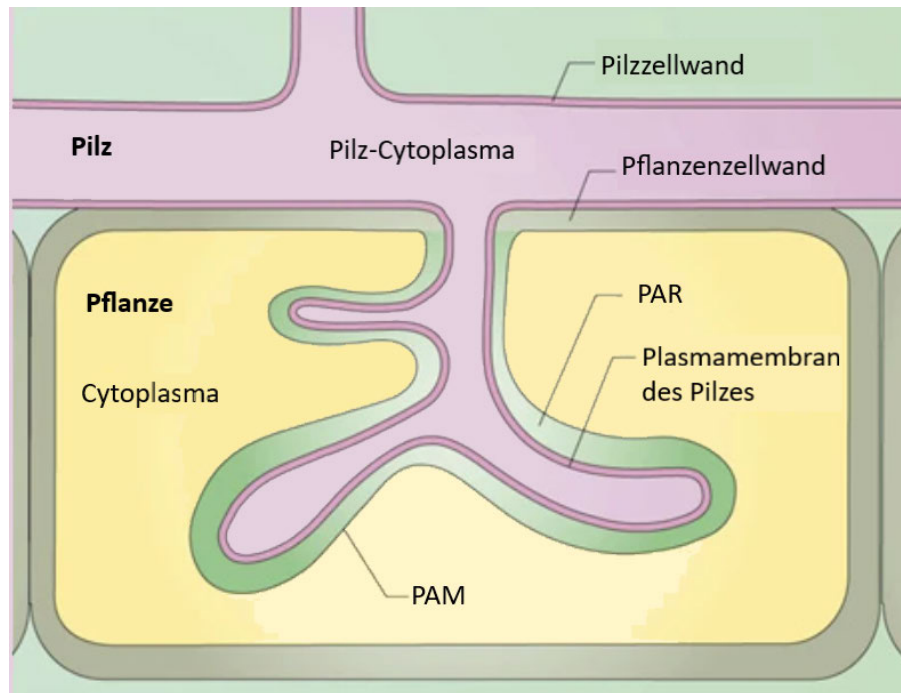


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Arbuskels in der Wirtszelle. Aus Parniske (2008)

1.1.3 Die erfolgreichste Beziehung der Welt

Arbuskuläre Mykorrhizapilze, kurz AM-Pilze, sind in vielerlei Hinsicht ungewöhnliche Erdenbewohner, sei es das unglaubliche Alter der Klasse oder ihre Lebensweise. Alle AM-Pilze bilden zusammen die Klasse der *Glomeromycetes* im Stammbaum der Pilze. Die frühesten fossilen Vertreter sind über 400 Millionen Jahre alt, doch ihre Nachfahren haben sich bis heute nahezu nicht verändert. Doch ihr System hat sich bewährt, da heute 70-90% aller Landpflanzen in Symbiosen mit AM-Pilzen leben (Parniske, 2008). Diese Beziehung ist allerdings nicht zwingend wechselseitig. Die meisten Pflanzen können ohne die Symbiose mit AM-Pilzen wachsen, die Pilze hingegen sind, in den meisten Fällen, obligat biotroph, können also ohne die Interaktion mit einer Pflanze nicht leben. Unter diesen Umständen bilden sie sogenannte Chlamydosporen, wie in Abb. 1 auf der rechten Seite zu sehen ist, um den Organismus zu konservieren.

Durch ihre geringe Größe können die Hyphen von AM-Pilzen, wie schon gesagt, selbst in kleinste Bodenpartikel vordringen und beliefern ihre Partnerpflanze auf diese Weise hauptsächlich mit Phosphat und Wasser. Die Pflanze wiederum versorgt den Pilz mit Nahrung in Form von Kohlenhydraten. Dieser Kreislauf ist in Abb. 3 vereinfacht dargestellt.

Die Pflanzenzelle stellt Kohlenhydrate in Form von Sucrose bereit. Diese wird im PAS in zwei Hexosen aufgespalten, da der Pilz nur Monosaccharid-Carrier besitzt. Im Arbuskel werden diese Hexosen nun entweder zu Triacylglycerol (TAG) oder Glycogen umgewandelt. Das Triacylglycerol dient als Transporteinheit für lange Strecken innerhalb des

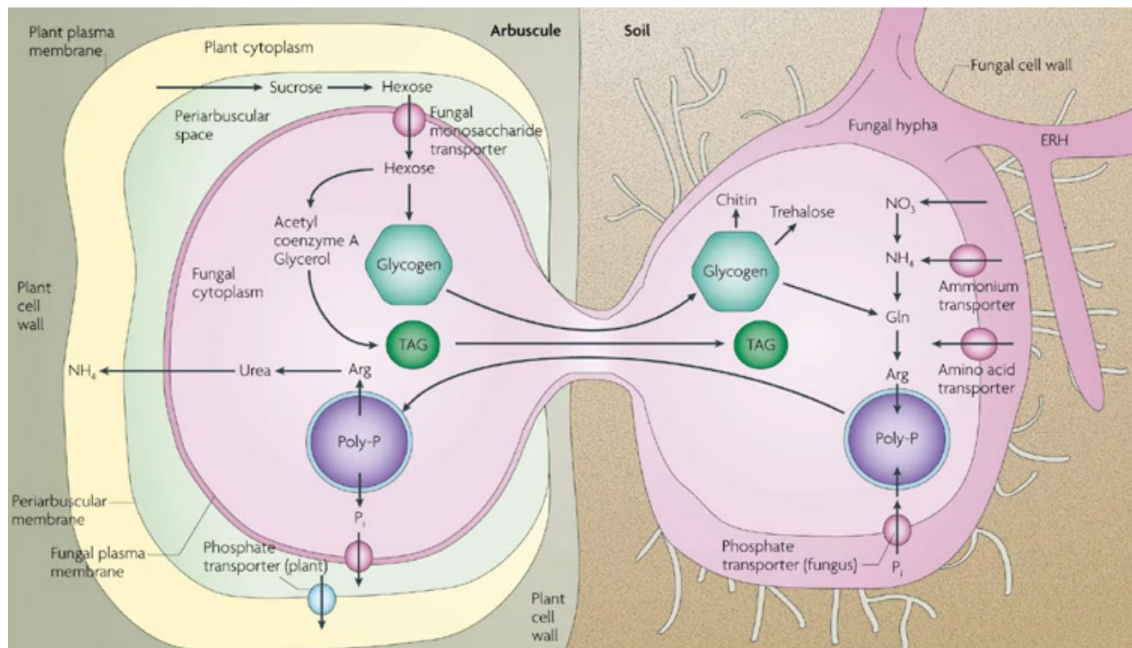


Abbildung 3: Der Stoffaustausch zwischen Pflanzen- und Pilzzelle. Aus Parniske (2008)

Pilzes. Das Glycogen wiederum wird aus dem Arbuskel heraus in die Hyphen außerhalb der Pflanzenwurzel, genannt extraradikale Hyphen, transportiert. Dort wird es in diverse zelluläre Baustoffe umgewandelt oder es wird in die Kette zur Stickstofffixierung eingespeist.

Das Phosphat, welches der Pilz, wie in Abb. 3 zu erkennen ist, direkt über spezielle Carrier-Proteine aufnimmt, wird in großen Polyphosphat-Vesikeln zwischengelagert und von den ERH in die Arbuskel transportiert (Parniske, 2008). Von dort aus wird es in den PAS abgegeben und somit der Pflanze zur Verfügung gestellt.

In Abb. 3 ist weiterhin dargestellt, dass der Pflanze über das Mykorrhiza des Pilzes auch der Zugang zu Stickstoffquellen erleichtert wird. Diese werden, wie das Phosphat, direkt aus dem Boden aufgenommen. An dieser Stelle werden die Kohlenhydrate, welche der Pilz von der Pflanze bezieht genutzt, um die verschiedenen Stickstoffverbindungen in Arginin zu synthetisieren (Bücking und Kafle, 2015). Dessen Transport von den ERH zum Arbuskel erfolgt über die selben Vesikel, welche das Phosphat transportieren, da das Phosphat und Arginin sich aufgrund ihrer gegensätzlichen Ladung anziehen. Im Arbuskel wird das Arginin abgebaut um den Stickstoff in eine kohlenstofffreie Verbindung zu überführen und so der Pflanze zugänglich zu machen (Bücking und Kafle, 2015).

1.1.4 Der Einfluss des Menschen

Mykorrhizapilze im Allgemeinen und AM-Pilze im Speziellen sind wichtige Bausteine eines gesunden Ökosystems, aber auch der Landwirtschaft, da die Mehrheit unserer Kulturpflanzen solche Symbiosen eingehen. Daher ist es wichtig diese nützlichen Pilze zu schützen um gleichbleibende Erträge zu erhalten. Allerdings werden AM-Pilze,

wie viele andere im Boden lebende Mikroorganismen, von den Praktiken der intensiven Landwirtschaft beeinflusst.

Gerade der präventive Einsatz von Fungiziden beeinflusst AM-Pilze sehr. Zwar sind Fungizide primär gegen Schadpilze, wie z.B. Mutterkorn, gerichtet, jedoch sind Effekte auf Non-Target-Organismen nicht immer vermeidbar. In einem Versuch von 2019 zeigten Novais et al. (2019), dass mit steigender Konzentration von gängigen Agrarchemikalien die Länge des Mycels abnimmt. Weiterhin wurde in diesem Versuch gezeigt, dass parallel dazu auch die Fusion der Hyphen verringert wird. Da AM-Pilze generell **anastomotisch** wachsen verlangsamt dies den Stofftransport von den ERH zu den Arbuskeln. In Kombination mit dem kürzeren Mycel, durch das weniger Phosphat und Stickstoff aufgenommen wird, führt das zu einer insgesamt verringerten Symbioseaktivität, was in weiterer Folge ein verringertes Pflanzenwachstum verursacht.

Auch besteht die Möglichkeit, dass Fungizide nicht nur das Wachstum eines entwickelten Pilzes hemmen, sondern schon das Anwachsen und damit die Symbiose generell verhindern. Wenn Felder neu bestellt wurden und die Pflanzen beginnen anzuwachsen wird Fungizid versprüht und gelangt so direkt in den Boden und somit in direkten Kontakt mit den Sporen der AM-Pilze. Sollten die Sporen von der Wirkung des Fungizides beeinträchtigt werden, so verbleiben sie im Sporenstadium, bis sich die Konzentration des Mittels in ihrer Umgebung verringert hat, bevor sie beginnen zu wachsen und die Mykorrhiza auszubilden (Hage-Ahmed, Rosner und Steinkellner, 2019). Diese Beeinträchtigung des Pilz-, und in Folge dessen auch Pflanzenwachstums, ist zwar nur spärlich in Fachliteratur beschrieben, bleibt aber eine Auswirkung die nicht außer Acht gelassen werden kann.

Der Einsatz von Herbiziden beeinflusst AM-Pilze in einer völlig anderen Weise: bestimmte Mittel können das Wachstum fördern. Wie Hage-Ahmed, Rosner und Steinkellner (2019) in einer Studie von 2019 zeigten, können Herbizide, die auf künstlichem Auxin basieren, in geringem Maße das Wachstum des Mycels stimulieren. Indirekt vermögen auch Mittel, welche den Metabolismus der Wirtspflanze verändern, durch einen geänderten Hormonhaushalt das Wachstum der Pilze zu fördern, da diese durch die Verschmelzung mit den Pflanzenzellen auch mit dem Mittel in Berührung kommen. Jedoch sind derartige indirekte Beeinflussungen noch unzureichend dokumentiert um darüber abschließende Aussagen zu treffen. Andere Mittel, welche zum Beispiel die Photosynthese inhibieren, haben keinen Einfluss auf die Mykorrhiza.

Die nachfolgende Tabelle 1 stellt einige ausgewählte Pestizide, die in der Europäischen Union verwendet werden, und ihre Wirkung dar.

Tabelle 1: Gegenüberstellung verschiedener Pestizide und deren Wirkung auf AM-Pilze; Aus: Hage-Ahmed, Rosner und Steinkellner (2019)

Pestizid-Name	Art des Pestizid	Effekt (- = negativ, 0 = neutral, + = positiv)	Auswirkungen
Fenhexamid	Fungizid	- / 0	hemmt in hohen Dosen die Sporenentwicklung und die Verzweigung der Arbuskel
Kupfersulfat	Fungizid/Biozid	-	hemmt Mycelwachstum und Wurzelbesiedlung
Pencycuron	Fungizid	- / 0	hemmt die Sporenentwicklung und die Wurzelbesiedlung
Bifenox	Herbizid	0 / +	kann bei hoher Dosierung die Sporenentwicklung fördern, erhöht den Ertrag bei Getreide
Glyphosat	Herbizid	0	keine Effekte unter Feldbedingungen; Hemmung der Wurzelbesiedlung nur in Vitro und bei Überschreitung der üblichen Austragsmenge
Mecoprop	Herbizid	0 / +	kann bei hoher Dosierung die Sporenentwicklung fördern, erhöht den Ertrag bei Getreide
Azadirachtin	Insektizid	- / 0	hemmt in hohen Dosen die Wurzelbesiedlung

Der Vergleich der in Tabelle 1 aufgelisteten Pestizide zeigt, dass die Fungizide ihre Wirkung nicht nur gegen schädliche Pilze entfalten, sondern auch AM-Pilze beeinträchtigt werden. Gleiches gilt auch für das Insektizid Azadirachtin. Im Gegensatz dazu zeigen Herbizide eine meist positive Auswirkung auf AM-Pilze, wenn auch erst unter hohen Dosen, welche in normaler Kultur selten aufgebracht werden. Interessant ist hierbei, dass gerade Glyphosat, bei welchem nach wie vor heftig debattiert wird, ob es für den Menschen krebserregend ist, unter Feldbedingungen keinerlei Effekte auf die Pilze hat, was sowohl Malty, Siqueira und Moreira (2006) als auch Pasaribu et al. (2011) belegen können.

Endgültige Aussagen über die Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf AM-Pilze sollten allerdings mit Vorsicht getätigt werden. Die Ergebnisse verschiedener Versuche variieren sehr stark, von positiv über neutral bis negativ. Zum einen ergaben sich Unterschiede zwischen Feld- und in Vitro-Versuchen, zum anderen führte auch der Vergleich von in Vitro-Versuchen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Zwar zeichnet sich der Trend ab, dass die Vitalität des Mycels von der eingesetzten Dosis der Pflanzenschutzmittel abhängt, jedoch kommt es bei den zu beobachtenden Effekten meist auf die Art des be-

troffenen Pilzes an. Hinzu kommen, gerade bei Feldversuchen Umweltfaktoren, welche die Wirkung der Mittel auf die Pilze beeinflussen (Hage-Ahmed, Rosner und Steinkellner, 2019). So stellen die Beschaffenheit des Bodens, dessen pH-Wert, die Feuchtigkeit und auch die umgebende Mikroflora erhebliche Einflussfaktoren für die Wirkung eines Pestizids dar.

Durch die mitunter sehr hohe Belastung durch Pestizide jeglicher Art unterliegen AM-Pilze einem hohen Anpassungsdruck. Über die Zeit haben sie verschiedene Wege entwickelt mit den Wirkstoffen der Mittel zurecht zu kommen. Allerdings ist das Wissen um die genauen Mechanismen der Abwehrmaßnahmen noch gering, da Untersuchungen bisher meist die Wirkung des Mittels auf Pilz und Pflanze beschrieben haben und weniger Augenmerk auf den biochemischen Vorgängen innerhalb der Zelle lag. Dennoch konnten schon einige Mechanismen der Pilze im Umgang mit Schadstoffbelastungen aufgedeckt werden. Diese umfassen zum Einen die Synthese von Schutzmolekülen, wie Antioxidantien und **Chaperone** und Veränderungen in der Morphologie des Pilzes. Zum Anderen entwickelten einige Arten eine Kompartimentierung, wie Cornejo et al. (2013) erstmals nachweisen konnten. Hierbei werden Schwermetalle, vornehmlich Kupfer, in eigens dafür gebildeten Sporen akkumuliert und somit aus dem Stoffkreislauf des Organismus ausgeschlossen. Auf diese Weise tragen AM-Pilze auch zum Schutz ihrer Wirtspflanze bei, indem sie auch andere Schwermetalle von ihr fernhalten. Verschiedene Studien kamen zu dem Schluss, dass Pflanzen in metallbelasteten Böden mit Mykorrhiza gesünder sind als solche ohne Symbiose, da die Pilze zum Einen die Schwermetalle akkumulieren und zum Anderen selbige bereits im umgebenden Boden durch spezielle Enzyme immobilisieren (Bano und Ashfaq, 2013). Diese Eigenschaft von AM-Pilzen ermöglicht es auch in ehemaligen Bergbauregionen mit stark kontaminierten Böden Landwirtschaft zu betreiben. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass sich die Pilze ihrem jeweiligen Standort und damit auch den örtlichen Kontaminationen anpassen, weswegen es bei Standortwechsel der Wirtspflanze zunächst einige Zeit benötigt, bis sich die gleichen Effekte wieder einstellen.

Die Erforschung der Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf Mykorrhizapilze wird auch in Zukunft ein wichtiges Tätigkeitsfeld bleiben und in ihrer Bedeutung vermutlich noch zunehmen, da das Verständnis um Strategien der Pilze im Umgang mit Pestiziden und die genauen Prozesse innerhalb der Pilze noch gering ist. Gerade in Zeiten des Klimawandels ist es wichtig die Wirkweise der eingesetzten Stoffe genau zu verstehen, um unerwünschte Auswirkungen auf nützliche Organismen zu vermeiden. Diese hätten schlussendlich nur den gegensätzlichen Effekt zum eigentlichen Zweck der Pflanzenschutzmittel, den größtmöglichen Ertrag zu fördern und die Nahrungsversorgung sicher zu stellen. Da arbuskuläre Mykorrhizapilze nicht nur auf den Feldern, sondern in sehr vielen Ökosystemen unentbehrliche Bausteine des Lebens sind, gilt es umso mehr sie zu schützen. Damit sind in erster Linie zwar Kosten für die Forschung und Produkti-

on verbunden, doch langfristig würde sich diese Investition auch für die Hersteller solcher Schutzmittel lohnen. Durch eine höhere Selektivität des entsprechenden Pflanzenschutzmittels ließe sich mit besonderer Umweltverträglichkeit werben, was sich auch im Preis niederschlagen könnte. Zuletzt würde eine Feinabstimmung der Wirkung des Pestizids auch den Grad der Umweltverschmutzung minimieren, für welchen der Hersteller unter Umständen zur Rechenschaft gezogen würde und für deren Beseitigung er aufkommen müsste.

1.2 Grundlagen des Versuchs

1.2.1 *Funneliformis mosseae*

Die Gattung *Funneliformis* ist weltweit verbreitet und insbesondere die Art *F. mosseae* wird oft für Forschung an AM-Pilzen verwendet. Abbildung 4 zeigt eine typische Spore. Sie sind strohgelb bis dunkelorange gefärbt, zwischen 100 und 260 μm groß und in der Regel rund (The International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi, 2024). An den Sporen verbleibt ein winziger Teil der Hyphe, an der sie gewachsen sind. Die Keimung erfolgt aus eben jener Hyphe heraus, wobei sich der austretende Keimungsschlauch schnell in neue Hyphen verzweigt.

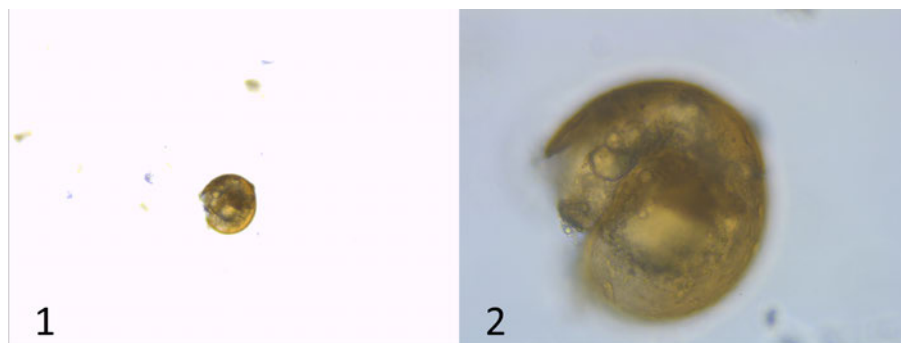


Abbildung 4: Eine *F. mosseae*-Spore unter 40x (1) und 100x (2) Vergrößerung

Durch verschiedene Verfahren lassen sich die Pilzstrukturen innerhalb der Wurzeln sichtbar machen. Wie in Abb. 5 dargestellt ist, lassen sich die einzelnen Bestandteile unter dem Mikroskop gut erkennen. Hyphen sind als feines Geflecht in der Wurzel sichtbar, wohingegen sich das Mycel hier im Speziellen die Arbuskel durch eine noch filigranere Verzweigung unterscheiden. Sporen und Vesikel lassen sich aufgrund ihrer Größe und Anzahl unterscheiden.

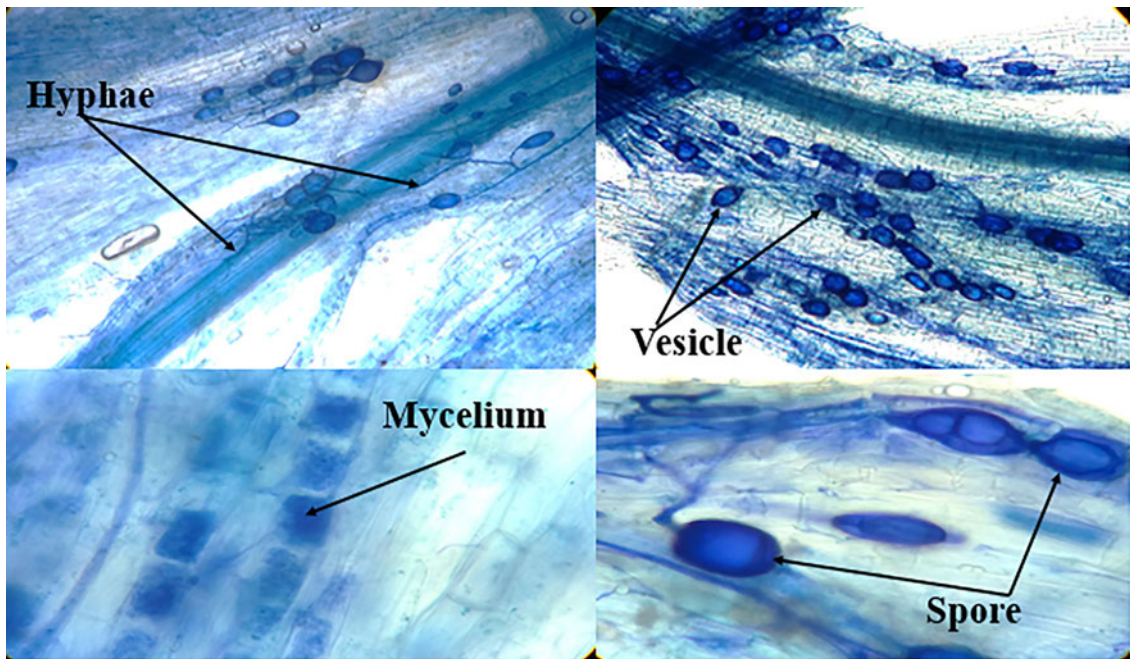


Abbildung 5: Färbung einer mit *F. mosseae* durchsetzten Wurzel. Aus: Rasouli et al. (2023)

1.2.2 Die verwendeten Pflanzen

Der Perserklee *Trifolium resupinatum* stammt ursprünglich aus dem mittleren Osten, wird heute aber weltweit angebaut. Die einjährige Pflanze kann sich gut an verschiedene Böden anpassen und verträgt Boden-pH-Werte von 5 bis 9, gedeiht aber auf feuchten Lehmböden besonders gut (Feedipedia Animal feed resources information system, 2024). Perserklee wird hauptsächlich als proteinreiches Futtermittel angebaut. Desweiteren wird Perserklee auch als Grünlanddünger verwendet, da er als **Leguminose** den Stickstoffgehalt des Bodens steigert. Zuletzt kann Perserklee auch in gewissem Maß zur Schädlingsbekämpfung angewandt werden, da die Pflanze blattlausfressende Schwebfliegen anlockt (Feedipedia Animal feed resources information system, 2024).

Die hier verwendeten Zwiebelsamen stammen von der Sorte „Stuttgarter Riesen“. Diese bildet große flachrunde Zwiebeln, welche sich durch ihre lange Lagerfähigkeit auszeichnen. Die Pflanzen wachsen nach 20-30 Tagen Keimzeit bevorzugt auf mäßig feuchten, durchlässigen Böden, die gut abtrocknen (Quedlinburger Saatgut mbH, 2024).

Bei der hier verwendeten Petersilie der Sorte „Orfeo“ handelt es sich um eine Blattpetersilie, das heißt, sie bilden keine große Wurzelknolle sondern nur lange dünne Wurzeln (Wilstermann-Hildebrand, 2024). Die Keimzeit der Samen ist stark Temperaturabhängig und beträgt je nach Temperatur 12-45 Tage. Blattpetersilien bevorzugen feuchte und lockere Böden, wobei die Nässe einen limitierenden Faktor ausmacht, da zu viel Feuchtigkeit die Keimung hemmt (Wilstermann-Hildebrand, 2024).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es eine Zucht von arbuskulären Mykorrhizapilzen aufzubauen, um deren Sporen für zukünftige ökotoxikologische Versuche zu nutzen.

3 Materialien und Geräte

Organische Materialien

- *Funneliformis mosseae* BEG 12 (Universität de Bourgogne Dijon, Frankreich)
- Perserklee-Samen *Trifolium resupinatum* (Carl Pabst Samen & Saaten GmbH, Großbeeren,)
- Petersilien-Samen „Orfeo“, *Petroselinum crispum* (Quedlinburger Saatgut mbH, Aschersleben)
- Zwiebel-Samen „Stuttgarter Riesen“, *Allium cepa* (Quedlinburger Saatgut mbH, Aschersleben)

Chemische Materialien

- Künstlicher Boden
 - Sand 77,38%
 - Kaolin 20%
 - Torf 2,5%
 - CaCO₃ 0,12%
- Natriumhypochlorid (Lot: 24C214022, VWR International bvba Leuven, Belgien)
- Kaliumhydroxid
- Essigsäure
- Tinte (Sheaffer Ink, Item 94321)

Geräte

- Mikroskop ICC50E (Leica Microsystems GmbH Wetzlar) mit Vergrößerung von 40x-630x

4 Methoden

Als Grundlage des Versuchs wurde ein künstlich zusammengesetzter Boden aus 77,38% Sand, 20% Kaolin, 2,5% Torf und 0,12% Calciumcarbonat verwendet. In Vorbereitung wurden 4kg dieses Bodens 2 mal autoklaviert und anschließend für 6 Tage ruhen gelassen. Währenddessen wurden auch die verwendeten Samen sterilisiert, um eine Besiedelung mit fremden Mykorrhizapilzen auszuschließen. Dazu wurden je 30 Samen der Petersilie, der Zwiebel und des Klees für 5 min in 1%ige Natrium-Hypochlorid-Lösung gelegt. Danach wurden sie mit sterilem, destilliertem Wasser gründlich gewaschen und auf sterile Filterpapiere gelegt. Diese wurden in Petrischalen platziert, mit sterilem, destilliertem Wasser befeuchtet und für 3 Tage in einer Klimakammer bei 22 °C und 60% Luftfeuchtigkeit ruhen gelassen.

Für den eigentlichen Ansatz wurden zunächst die Gefäße, zur Sterilisation, mit 1%iger Natrium-Hypochlorid-Lösung ausgespült. Mit diesen wurden zwei Chargen erstellt, eine mit Inokulum für die Zucht und eine ohne Inokulum als Referenz. Es wurden in beiden Chargen je zwei Gefäße für jede Pflanzenart hergestellt. Für die Referenz wurden die Gefäße mit je 200g des autoklavierten Bodens befüllt. Die Zuchtgefäße wurden zuerst mit 100g reinem Boden befüllt und danach mit 100g Boden-Inokulum-Gemisch aufgefüllt. Für diese Mischung wurden 700g Boden mit 50g des *F. mosseae*-Inokulum vermischt.

In jedes Gefäß wurden je drei der sterilisierten Samen von Petersilie, Zwiebel oder Klee gelegt, ca. 1cm tief eingedrückt und mit sterilem, destilliertem Wasser befeuchtet. Zuletzt wurde über jedes Gefäß eine Plastiktüte gestülpt um einen Verlust der Feuchtigkeit vorzubeugen. Alle Gefäße zusammen wurden auf einem Tablett, wie in Abb. 6 zu sehen, in eine Klimakammer bei 22 °C und 60% Luftfeuchtigkeit gestellt.



Abbildung 6: Gefäße mit Abdeckungen; linke Seite Referenz, rechte Seite die Zucht

Aufgrund, dass reiner Boden und Boden-Inokulum-Gemisch übrig blieben, wurde je noch ein Gefäß für Referenz und Zucht mit Zwiebelsamen hergestellt und zu den anderen gestellt. Die Pflanzen wurden regelmäßig mit Leitungswasser gegossen.

Nach 56 Tagen wurden die Pflanzen aus den Gefäßen entfernt und vorsichtig gewaschen um zu untersuchen, ob eine Besiedlung stattgefunden hat. Dafür wurden zunächst die kombinierte Masse der Referenz bzw. der Zucht von jeder Pflanzenart erhoben. Aufgrund des Zustands der Gefäße mit Zwiebeln konnten diese nicht ausgewertet werden. Anschließend wurde eine Wurzelfärbung durchgeführt um die Mykorrhiza an den Wurzeln sichtbar zu machen.

Für die Färbung wurden die Wurzeln mit und ohne Inokulum des Klees und der Petersilie je in ein Tube überführt, mit Kaliumhydroxid (KOH) bedeckt und über Nacht einwirken gelassen um sie zu bleichen. Danach wurde das KOH erneuert und für 5 min bei 90 °C erhitzt. Nach diesem Schritt sollten die Wurzeln gänzlich farblos sein, wie in Abb. 7 dargestellt.

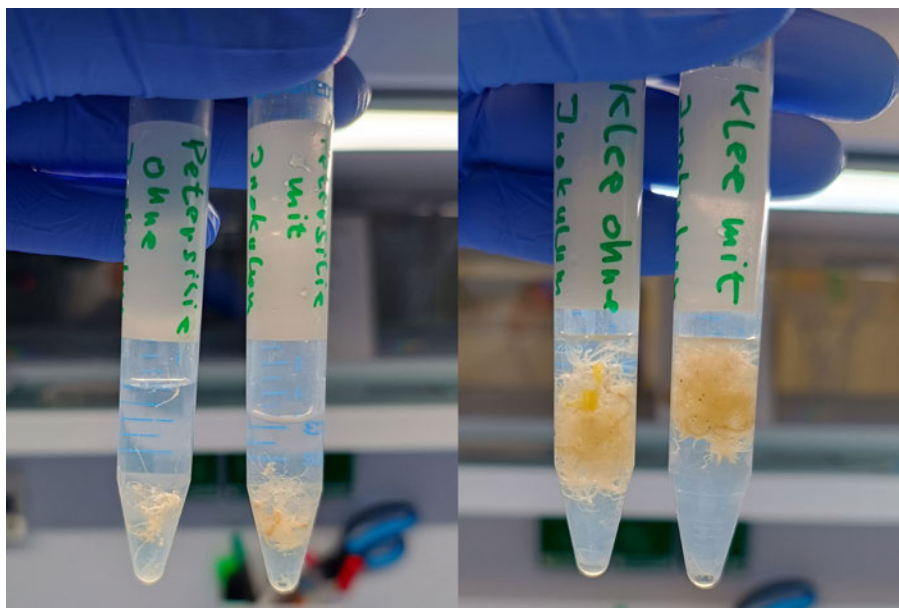


Abbildung 7: Wurzeln nach dem Bleichen; Das linke Bild zeigt die Wurzeln der Petersilie, das rechte Bild die des Klees

Anschließend wurde das KOH entfernt und die Wurzeln gründlich gewaschen. Die Wurzeln wurden in die Tubes zurück gesteckt und mit 5%iger Essigsäure bedeckt um sie zu neutralisieren. Diese wirkete 50 min. bei Raumtemperatur und wurde anschließend verworfen. Danach wurden die Wurzeln mit einer Lösung, bestehend aus 5%iger Essigsäure und 5%iger Tinte (in diesem Fall Sheaffer Ink) in einem 1:1 Verhältnis, versetzt. Mit der Tintenlösung wurden die Wurzeln nochmals für 5 min bei 90 °C erhitzt. Die Tintenlösung wurde danach verworfen und die Wurzeln gründlich gewaschen. Nach erfolgreicher Färbung sollten die Wurzeln eine tief blaue Farbe angenommen haben, wie in Abb. 8 zu sehen ist.

Die gefärbten Wurzeln wurden auf Objektträger verbracht und unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet.

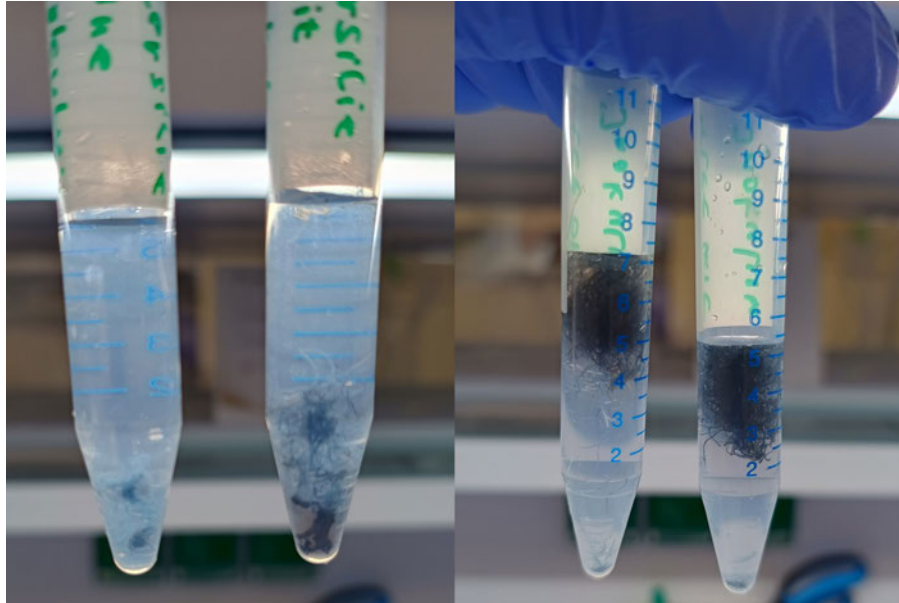


Abbildung 8: Wurzeln nach der Färbung; Das linke Bild zeigt die Wurzeln der Petersilie, das rechte Bild die des Klees

Um zu bestätigen, dass die Zucht erfolgreich war, das heißt, dass die Pilze Sporen gebildet haben, wurden erneut je drei Samen von Klee, Zwiebel und Petersilie mit Natrium-Hypochlorid sterilisiert und nach 3 Tagen Ruhe in die selben Gefäße verpflanzt. Aufgrund extremer Trockenheit musste ein Gefäß für Petersilie aus der Referenz verworfen werden. Es wurde durch das zusätzliche Zwiebel-Gefäß aus der Referenz ausgetauscht.

Nach 30 Tagen wurden die Pflanzen wieder vorsichtig aus den Gefäßen entfernt, gewaschen und das Gewicht aufgenommen. Danach wurden die Wurzeln eingefärbt und unter einem Durchlichtmikroskop auf eine Besiedlung durch Pilze untersucht.

5 Ergebnisse

Nach 56 Tagen waren in den meisten Gefäßen, wie in Abb. 9 zu sehen, Pflanzen ad-äquater Größe gewachsen. Jedoch muss festgehalten werden, dass der Boden in allen Pflanzgefäßen extrem feucht war.



Abbildung 9: Pflanzgefäße nach 56 Tagen. Auf der linken Seite die Gefäße ohne Inokulum, auf der rechten Seite mit Inokulum. Obere Reihe Klee, mittlere Reihe Zwiebel, untere Reihe Petersilie.

Besonders auffällig war diese Staunässe bei den Zwiebelgefäßen, welche teilweise so weit ging, dass das Wasser einige Millimeter über dem Boden stand, wie im linken Gefäß auf dem rechten Bild in Abb. 10 zu erkennen ist.

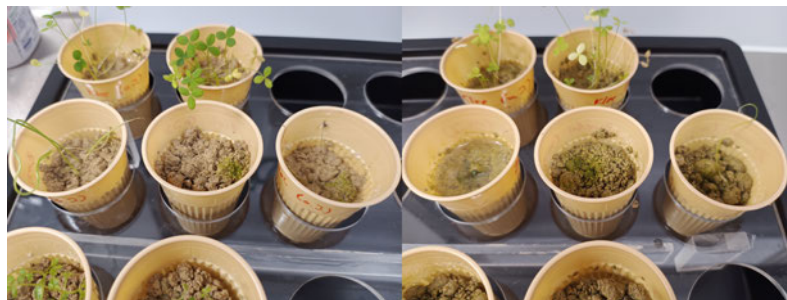


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Zwiebelgefäße. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum

An den Petersilienpflanzen in Abb. 11 ist gut zu sehen, dass die Pflanze auf Boden mit Pilz-Inokulum deutlich größer und voluminöser ist als diese auf reinem Boden.



Abbildung 11: Vergleich zweier Petersilienpflanzen. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum



Abbildung 12: Vergleich zweier Kleepflanzen. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum

Ein gegenteiliges Bild zeigt sich beim Klee. Hier sind die Pflanzen auf beiden Böden annähernd gleich in Größe und Volumen (Abb. 12). Dies spiegelt auch der Vergleich der Biomassen wieder, die in Tabelle 2 dargestellt sind. Die Gewichte der Kleepflanzen unterscheiden sich nur geringfügig von einander, wohingegen die Petersilie, welche auf Boden mit Pilzsporen gewachsen ist, mehr als die doppelte Masse aufweist, als jene Petersilie welche auf reinem Boden wuchs.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der kombinierten Biomassen aus Gefäßen mit und ohne Inokulum des 1. Durchgang

Pflanze	Biomasse auf Boden ohne Inokulum	Biomasse auf Boden mit Inokulum
Klee	2,121g	1,988g
Petersilie	0,344g	0,782g

Nach der Wurzelfärbung zeigt sich, dass die Petersilie, welche auf Boden mit Inokulum gewachsen war, mit dunklen Flecken durchsetzt ist. Im Vergleich mit Abb. 5 sind die Strukturen in Abb. 13 eindeutig als Arbuskel zu identifizieren. Auf diesem und anderen Bildern (siehe Anhang) ist gut zu erkennen, dass der Pilz sich in weiten Teilen der Wurzeln ausgebreitet hat. Weiterhin sind in Abb. 13 und insbesondere Abb. 14 auch das Mycel des Pilzes innerhalb und außerhalb der der Wurzel zu sehen.

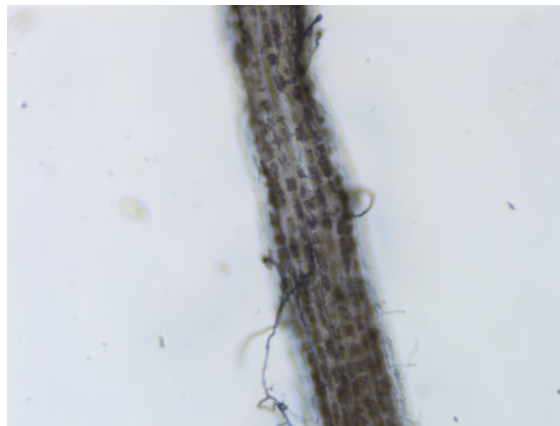


Abbildung 13: Wurzelabschnitt von Petersilie mit Inokulum, 100x Vergrößerung

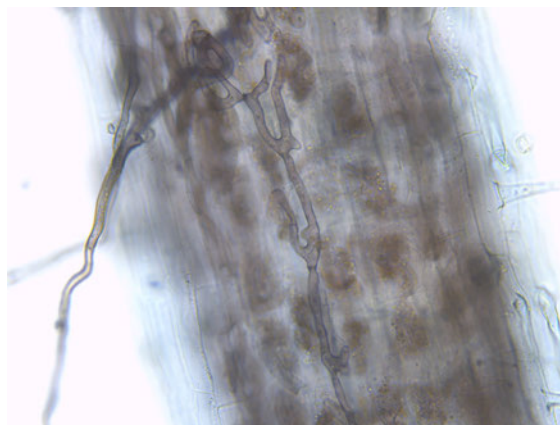


Abbildung 14: Wurzelabschnitt von Petersilie mit Inokulum, 400x Vergrößerung

Bei der Petersilie auf reinem Boden hat sich, wie erwarten, keine Mykorrhiza gebildet, da sich die Wurzeln nach der Färbung durchscheinend zeigten (Abb. 15), lediglich das Leitbündel der Wurzel ist als dunklere Struktur zu sehen.



Abbildung 15: Wurzelabschnitt von Petersilie ohne Inokulum, 40x Vergrößerung

Ein völlig gegenteiliges Bild zeigt sich beim Klee. Hier wurde trotz Anwesenheit von Pilzsporen keine Mykorrhiza ausgebildet. Vergleicht man in Abb. 16 das linke Bild von einer Wurzel aus reinem Boden mit dem rechten Bild aus Boden mit Inokulum, zeigen sich keine Unterschiede, beide Wurzeln sind farblos, durchscheinend.

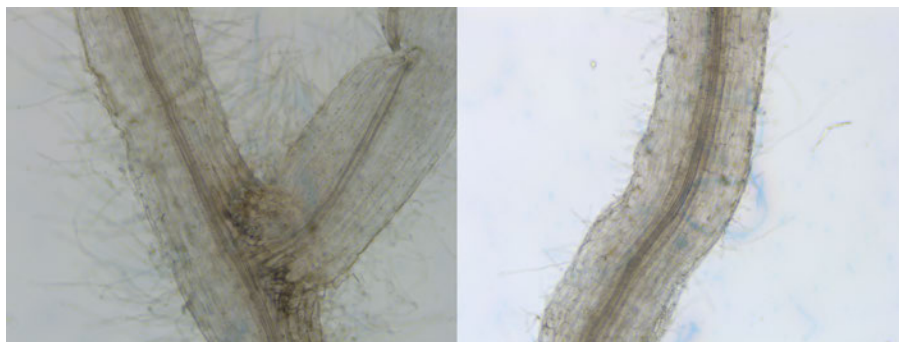


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Kleewurzeln. Linke Seite ohne Inokulum, rechte Seite mit Inokulum

Bei den Pflanzen des 2. Durchgangs zeigt sich ein sehr ähnliches Bild zu denen des 1. Durchgangs. Die Petersilie mit Inokulum ist, wie Abb. 17 zu erkennen, erneut sichtlich größer und voluminöser als jene, die auf Boden ohne Pilzsporen gewachsen sind. Aufgrund des frühen Wachstumsstadium wird der Unterschied hier noch einmal deutlicher sichtbar als bei den älteren Pflanzen in Abb. 11. Der Klee hingegen zeigt, wie bei den ersten Pflanzen, erneut keinen äußerlich sichtbaren Unterschied zwischen Pflanzen mit und ohne Inokulum.

Die Zwiebeln in den Gefäßen mit Inokulum sind nie gekeimt. In den Gefäßen mit reinem Boden waren in jedem Gefäß eine Pflanze gewachsen, allerdings war eine der beiden zum Zeitpunkt der Ernte eingegangen. Zudem wuchs in dem Gefäß mit der intakten Zwiebelpflanze neben dieser auch ein grüner Belag auf dem Boden, welcher in Abb. 18 in Nahaufnahme abgebildet ist.



Abbildung 17: Vergleich der Petersilienpflanzen aus dem 2. Durchgang. Links ohne Inokulum, rechts mit Inokulum



Abbildung 18: Nahaufnahme des Zwiebelgefäß ohne Inokulum.

Der Vergleich der Biomassen in Tabelle 3 fiel im Vergleich zum ersten Durchgang geringer aus. Die Gewichtsunterschiede zwischen den Petersilien waren mit nur 0,06g Differenz geradezu marginal, gleiches gilt auch für den Klee.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der kombinierten Biomassen aus Gefäßen mit und ohne Inokulum des 2. Durchgang

Pflanze	Biomasse auf Boden ohne Inokulum	Biomasse auf Boden mit Inokulum
Klee	0,3991g	0,4354g
Petersilie	0,1065g	0,1669g

Auch die Wurzelfärbung der Pflanzen des 2. Durchgangs zeigten ähnliche Resultate wie beim 1. Durchgang. Die Petersilie ohne Inokulum hatte, wie zu erwarten, keine Mykorrhiza ausgebildet. Jene auf Boden mit Pilzsporen ist eine Verbindung mit den Pilzen eingegangen, allerdings war die Mykorrhiza hier nicht in gleichem Maße ausgeprägt wie bei den Wurzeln der ersten Pflanzen (vgl. Abb. 13 und Abb. 19), in einigen Wurzeln fehlte sie gänzlich.

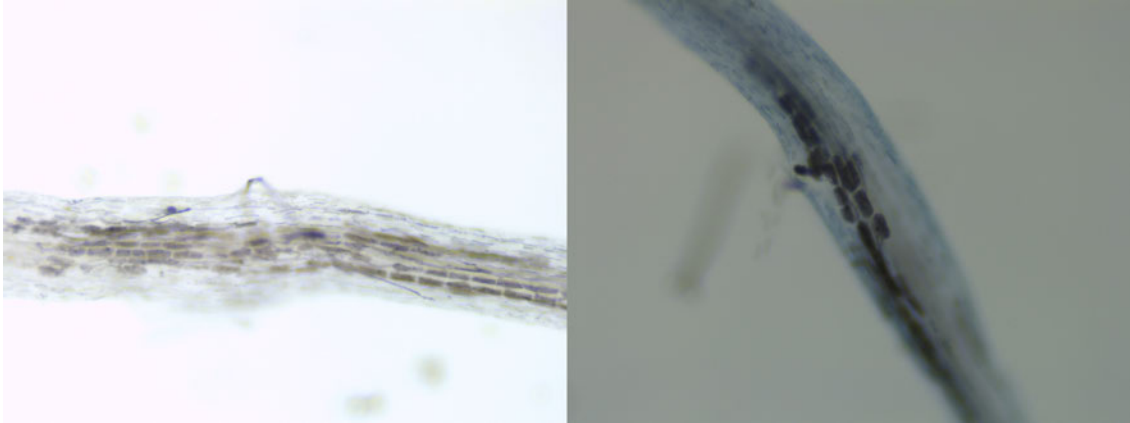


Abbildung 19: Wurzeln der Petersilie mit Inokulum, 2. Durchgang, 100x Vergrößerung

Beim Klee hingegen zeigte sich dieses Mal ein anderes Bild. Auch hier hatte sich in den Gefäßen ohne Inokulum erwartungsgemäß keine Mykorrhiza entwickelt. Doch unter den Wurzeln aus den Gefäßen mit Sporen war eine Wurzel, in deren Spitze sich Arbuskeln gebildet haben, wie in Abb. 20 zu sehen ist. Unter einer größeren Vergrößerung in Abb. 21 sind auch die verbindenden Hyphen zwischen diesen Arbuskeln zu erkennen. Allerdings war dies nur bei einer einzigen Wurzel zu beobachten, in allen anderen hatte sich keine Mykorrhiza eingestellt.



Abbildung 20: Wurzelspitze des Klee mit Inokulum, 2. Durchgang, 100x Vergrößerung

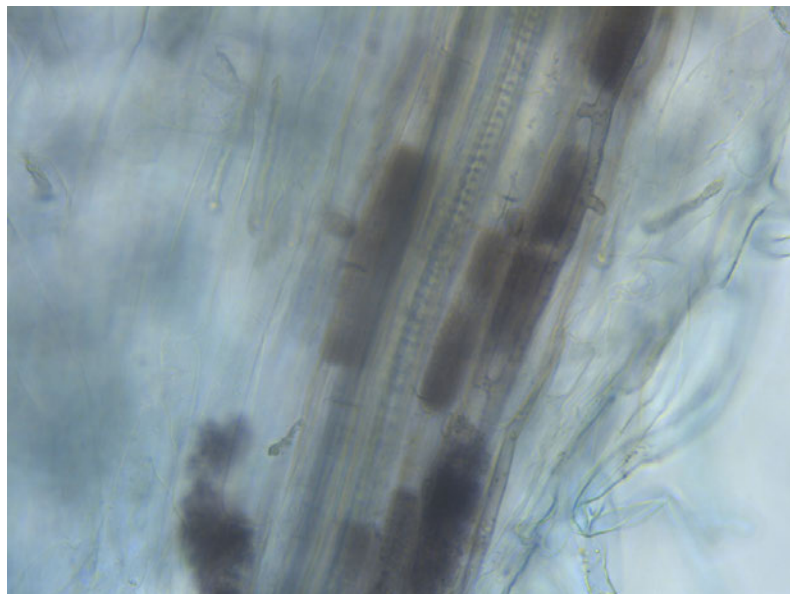


Abbildung 21: Wurzelspitze des Klee mit Inokulum, 2. Durchgang, 400x Vergrößerung

6 Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Versuchs in Gänze kann die Zucht als erfolgreich angesehen werden. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass zumindest die Petersilienpflanzen auf Boden, welcher mit Inokulum, also mit Pilzsporen, versetzt worden ist, besser und größer wuchsen, als jene ohne Pilze. Dies wird auch durch den Vergleich der Biomassen der geernteten Pflanzen gestützt. Da dies zweimal in Folge auf dem selben Boden erfolgte, müssen sich die Pilze durch die Symbiose mit den Pflanzen vermehrt haben, sodass auch beim 2. Durchgang wieder Sporen im Boden waren, um die neuen Pflanzen zu besiedeln. Betrachtet man allerdings hier die Differenz der Biomassen von Pflanzen mit und ohne Inokulum, so fällt diese eher marginal aus. Dieser Umstand lässt sich auf die unterschiedlichen Wachstumszeiten zurückführen, die Pflanzen des 1. Durchgangs wurden nach 56 Tagen geerntet, wohin gegen jene des 2. Durchgangs schon nach 30 Tagen entfernt wurden. Insofern hielt der Effekt der Pilze, das Wachstum durch erhöhten Nährstoffzugang zu steigern, im 1. Durchgang länger an, sich sowohl im Gewicht als auch dem Aussehen der Pflanzen niederschlug. An dieser Stelle sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass natürlich auch die Möglichkeit besteht, dass das beigemischte Inokulum genug Sporen für zwei Aussaaten enthielt, was aber aufgrund der geringen Menge die beigegeben wurde eher zu vernachlässigen ist. Insofern wurde das Ziel dieser Arbeit, eine beständige Quelle an Pilzsporen zu erschaffen vorerst erfüllt.

Selbstredend gibt es noch immer viele Parameter, die angepasst werden sollten oder gar angepasst werden müssen, um eine Fortführung auch in größerem Maßstab zu gewährleisten.

Angefangen bei der Auswahl der Pflanzen für die Zucht, lässt sich hier schon eine Stellenschraube für Erfolg oder Misserfolg der Zucht ausmachen. Wie in diesem Versuch zu sehen, eignet sich Blattpetersilie sehr gut, da die dünnen Wurzeln einen Nachweis der Arbuskel per Färbung erleichtern. Klee wiederum hat sich als ungeeignet erwiesen, wenngleich im 2. Durchgang Ansätze einer Besiedlung zu sehen waren. Diese waren allerdings so gering, dass sie in der Betrachtung der Eignung vernachlässigt werden können. Ein möglicher Erklärungsansatz, warum der Klee nicht vom Pilz besiedelt wurde wäre das extrem schnelle Wachstum des Klees. Da der Klee schon während der 3 Tage Ruhe nach dem Sterilisieren gekeimt war, ist es möglich, dass er für den Pilz zu schnell gewachsen ist, als dass er noch Wurzeln hätte besiedeln können. Sicher ein recht schwacher Erklärungsansatz, doch bedenkt man die, vom Züchter der ursprünglichen Sporen angegebenen, 5-14 Tage Keimzeit der Pilzsporen und dass der Klee binnen dieser Zeitspanne schon weit über den Status eines Keimlings hinaus ist, bleibt es eine Möglichkeit das Ausbleiben einer Besiedlung zu erklären. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Klee die Pilze grundsätzlich nicht akzeptiert, da er als Vertreter der Leguminosen Knöllchenbakterien als Partner bevorzugt. Dahingehend muss man aber argumentieren, dass bis auf äußerst wenige Ausnahmen alle Leguminosenarten grund-

sätzlich befähigt sind Mykorrhizen auszubilden (Sprent und James, 2007). Weiterhin hätte der Klee auch keine Möglichkeit unter den Umständen des Versuches wählerisch im Hinblick auf seine Symbiosepartner zu sein, da der Boden autoklaviert wurde und somit schlicht keine Bakterien vorhanden waren, die sich der Klee hätte aneignen können, was nur noch die Pilze als Partner übrig ließe. Dies würde eventuell erklären, dass an einer Wurzel des 2. Durchgangs doch eine kleine Besiedlung stattgefunden hat, da der Pflanze keine andere Möglichkeit blieb außer den Pilz anzunehmen. Zuletzt kann man auch mutmaßen, dass es unter den AM-Pilzen auch Spezialisierungen auf bestimmte Wirtspflanzen und umgekehrt gibt, sodass der hier verwendete *Funneliformis mosseae* Klee nicht in seinem normalen Spektrum an Wirtspflanzen hat oder der Klee *F. mosseae* nicht in seinem normalen Spektrum an Partnern.

Dass die Zwiebelsamen nur zum Teil bzw. gar nicht gekeimt sind lässt sich auf zwei Punkte zurückführen. Zum einen wäre, insbesondere im 2. Durchgang, die Keimzeit der Samen zu beachten. Da diese 20-30 Tage umfasst ist es naheliegend, dass der Großteil der Samen am Tag, als die Pflanzen geerntet wurden, gerade erst im Begriff waren zu keimen. Für den 1. Durchgang entfällt das Argument der Keimzeit allerdings, da hier erst nach 56 Tagen geerntet wurde. An dieser Stelle kommen eher die Bodeneigenschaften zum Tragen, welche sich negativ auf die Keimung bzw. das Wachstum der Zwiebeln auswirkten. Infolge dessen, dass der Hersteller der Samen angibt, dass diese Sorte Zwiebeln nur mäßig feuchte Böden bevorzugt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Samen wegen der hohen Feuchte des Bodens nicht keimten. Dies hat sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die, trotz für sie widrigen Bedingungen, gewachsenen Zwiebelpflanzen des 2. Durchgangs ausgewirkt und eine davon eingehen lassen.

Diese Staunässe ist vermutlich auch Grundlage des grünen Belages, welcher sich in den inokulierten Zwiebelgefäßen des 2. Durchgangs bildete. Wie in Abb. 18 zu erkennen, zeigt sich dieser recht dick gewachsen und vereinzelt mit verhältnismäßig großen Auswüchsen, welche auf den ersten Blick an Moos erinnern. In Anbetracht des sehr schnellen Wachstums handelt es sich hierbei aber wohl um Landalgen. Diese wachsen bevorzugt auf sehr feuchtem Boden (Metting, 1981) und bilden, wie hier zu beobachten, aufragende Fäden, die an Moos erinnern (Spektrum Akademischer Verlag, 2024). Es steht jedoch die Frage im Vordergrund, wie diese Kontamination in die Gefäße gelangt ist. Das sie vom Boden selbst herrührt ist nahezu ausgeschlossen, da dieser autoklaviert wurde. Eine Möglichkeit wäre das Wasser, mit dem die Pflanzen regelmäßig gegossen wurden. Allerdings hätte sich die Kontamination, sollte sie vom Gießwasser stammen auch in allen anderen Gefäßen ausbreiten müssen. Von daher bleibt noch die Möglichkeit, dass beim Stecken der Samen die Kontamination über schwebende Algen aus der Luft in die Gefäße gelangt sein muss.

Größtes Augenmerk bezüglich des Verbesserungspotentials der Zucht liegt auf dem verwendeten Boden. Sowohl im 1. als auch im 2. Durchgang fiel auf, dass der Boden stets sehr feucht bis extrem nass war. Dies ist in erster Linie der Zusammensetzung des Bodens geschuldet. Da der Hauptbestandteil des Kaolin, das Kaolit, ein Tonmineral ist, besitzt es sehr kleine Partikel, zwischen denen Wasser gut gehalten werden kann (Zerrle, 2024). In Kombination mit dem ebenfalls enthaltenen Torf, welches auch eine hohe Wasserkapazität besitzt, ergibt sich für die gesamte Bodenmischung eine recht hohe maximale Wasserkapazität. Dieser Umstand hat sich als hinderlich für das Pflanzenwachstum herausgestellt. Während der Klee sich an die Nässe anpassen konnte, verhinderte sie bei den Zwiebelsamen teilweise gänzlich eine Keimung. Hinzukommt, dass durch die hohe Feuchtigkeit der Boden zu Klumpen neigt, was dem Wachstum auch abträglich ist. Verstärkt wird das Nässeproblem zusätzlich, dass die Gefäße nach unten hin keinen Ablauf besaßen und nach oben hin die Abdeckungen ein Verdunsten verhinderten, wodurch beim Gießen immer mehr Feuchtigkeit akkumuliert wurde. Die Abdeckungen gegen Verdunstung waren rückblickend vermutlich auch nicht nötig, da in der Klimakammer konstant 60% Luftfeuchtigkeit herrschten und somit eine rasche Verdunstung kein Problem dargestellt hätte. Für zukünftige Durchgänge sollten unbedingt Gefäße mit einer Ablaufmöglichkeit gewählt werden, damit überschüssiges Wasser abgeschieden werden kann und die Pflanzen nicht am Wachstum hindert. Je nach Standort der Gefäße kann auch auf den Verdunstungsschutz verzichtet werden. Eine weitere Möglichkeit den Wasserhaushalt in den Gefäßen zu kontrollieren wäre, die Wasserzugabe an den Gewichtsverlust des Bodens anzupassen. So würden die Gefäße beim Stecken der Samen und in regelmäßigen Kontrollen gewogen. Weisen sie einen vorher festgelegten Prozentsatz an Gewichtsverlust, durch Verdunstung o.A., auf wird diese Menge Wasser wieder zugegeben. Somit würde eine Übersättigung mit Wasser verhindert.

Der letzte Punkt, der einer Betrachtung lohnt ist etwas kritischer zu sehen. Der Züchter der ursprünglichen Sporen sagte, dass ein zu hoher Phosphatgehalt das Wachstum der Pilze hemmen würde. Diese These wird auch häufig in Veröffentlichungen zum Thema genannt, wenn gleich Tawaraya et al. (1996) bereits 1996 zeigten, dass das verfügbare Phosphat im Boden einen zu vernachlässigenden Effekt auf das Pilzwachstum hat. Allerdings ließe sich von dieser Seite her argumentieren, dass bei einem hohen Phosphatgehalt, die Pflanze gar nicht mehr auf den Pilz angewiesen wäre um diesen Nährstoff zugänglich zu machen und somit auch keine Mykorrhiza zustande kommt. Gestützt würde diese These dadurch, dass die Kleewurzel in Abb. 20 sehr viele feine Wurzelhaare besitzt, über welche sie das Phosphat, wenn es in ausreichender Quantität vorläge allein aufnehmen könnte. Da aber für alle Gefäße der selbe Boden verwendet wurde hätte das Gleiche auch bei den Petersilienpflanzen stattfinden müssen. Da die Petersilien jedoch eine Mykorrhiza ausgebildet haben, ist davon auszugehen, dass der Boden nicht mit Phosphat übersättigt ist und dass das Ausbleiben einer Mykorrhiza an den Wurzeln des Klees auf andere Faktoren zurückzuführen ist.

7 Ausblick

Nachdem die Zucht in kleinem Maßstab eingestellt ist, sollte sie vergrößert werden, um für zukünftige Versuche genügend Sporen bereitstellen zu können. Dafür bietet sich an, erneut Samen in den inokulierten Boden zu geben und die daraus gewachsenen Pflanzen in neuen, reinen Boden umzupflanzen, damit die Pilze dort neue Sporen bilden können. Werden die Pflanzen dann erneut umgesetzt, können die Sporen, welche im Boden zurückbleiben anschließend herausgewaschen und gesiebt werden. Wiederholt man diese Schritte mehrfach stellt sich über die Zeit eine beständige Quelle an Sporen ein, der je nach Bedarf Sporen entnommen werden können. Da die Sporen bei niedrigen Temperaturen auch mehrere Monate haltbar sind, stellt auch die Ansammlung einer größeren Menge für großangelegte oder viele parallel laufende Versuche kein Problem dar.

Dies wird insofern noch wichtig, als dass die ökotoxikologische Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Mykorrhizapilze zunehmend ins Blickfeld der Hersteller jener Mittel und der Behörden, die deren Zulassung prüfen, fallen. Zukünftig sollten alle neu entwickelten bzw. bereits in Nutzung befindlichen Pflanzenschutzmittel bezüglich deren Wirkung auf Mykorrhizapilze hin geprüft werden, damit dieser wichtige Baustein der Ökosysteme nicht nachhaltig geschädigt wird. Dahingehend sollten allerdings auch die Testverfahren an sich nochmals auf ihre Tauglichkeit getestet und standardisiert werden, um falsche Schlüsse zu vermeiden.

8 Zusammenfassung

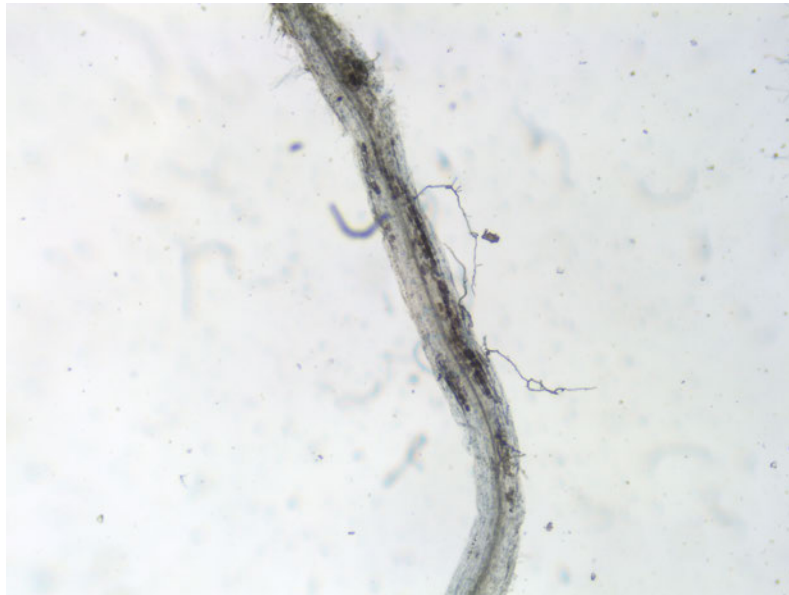
In dieser Arbeit sollte eine Zucht von arbuskulären Mykorrhizapilzen angelegt werden, um langfristig eine Sporenquelle für ökotoxikologische Versuche zu schaffen und nicht auf Drittanbieter angewiesen zu sein.

Um die Zucht zu Initialisieren wurde künstlichem Boden Inokulum mit Pilzsporen untergemischt. Von diesen Boden wurden in je zwei Gefäße sterilisierte Samen von Petersilie, Klee und Zwiebel gepflanzt. Zur Kontrolle wurden je zwei identische Gefäße jeder Samenart ohne das Inokulum angefertigt. Nach 56 Tagen in einer Klimakammer bei 22°C und 60% Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen geerntet um mittels Wurzelfärbung die Anwesenheit einer Mykorrhiza fest zu stellen. Die Pflanzen, welche auf inokuliertem Boden wuchsen waren schon optisch größer und voluminöser als jene auf reinem Boden, was auf die Ausbildung einer Mykorrhiza hindeutet. Nachgewiesen konnte diese, nach dem Einfärben der Wurzeln, jedoch nur an den Petersilienpflanzen, der Klee hatte keine Mykorrhiza etabliert. Die Zwiebelsamen waren aufgrund hoher Feuchtigkeit des Bodens nie gekeimt.

Zur Bestätigung, dass sich die Pilze im Boden vermehrt hatten wurde ein 2. Durchgang an Pflanzen gesteckt und nach 30 Tagen geerntet. Die Ergebnisse des 1. Durchgangs wiederholten sich größtenteils. Die Pflanzen auf Boden mit Inokulum waren größer und voluminöser. Die Wurzelfärbung allerdings zeigte diesmal neben der Mykorrhiza in den Petersilienwurzeln, dass sich auch beim Klee eine minimale Mykorrhiza eingestellt hatte, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie bei der Petersilie. Auch der Umstand, dass die Zwiebeln aufgrund von Staunässe nicht keimten wiederholte sich.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass Petersilie für eine Zucht arbuskulärer Mykorrhizapilze sehr gut geeignet ist, allen voran, da die Wurzeln dünn genug sind, um Pilzstrukturen gut nachzuweisen. Klee hingegen eignet sich weniger, sei es dem Umstand geschuldet, dass es eine Leguminose ist oder, dass es mögliche Spezialisierungen von Pilz auf Pflanze oder umgekehrt gibt. Weiterhin ist es für zukünftige Zuchten wichtig den Wasserhaushalt in den Gefäßen zu kontrollieren, um Staunässe zu verhindern.

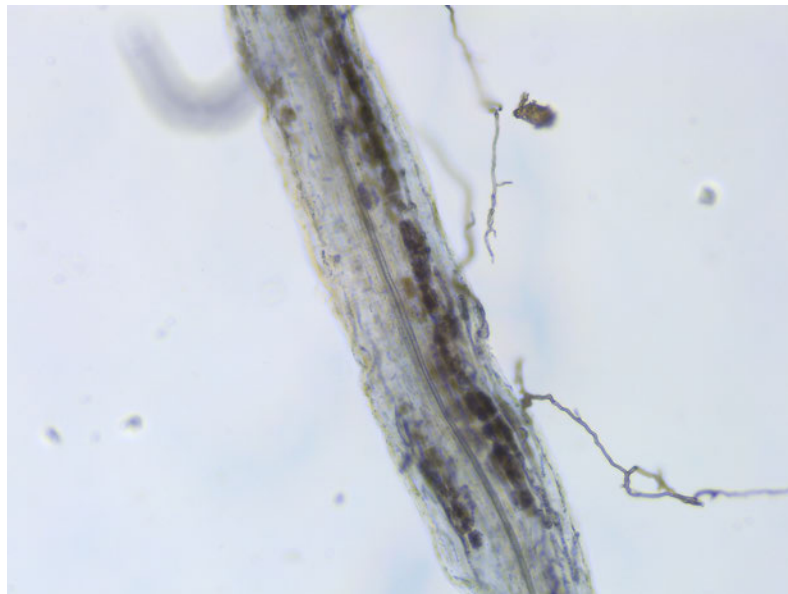
In Gänze betrachtet war dieser Versuch erfolgreich, sodass die eingestellte Zucht nun vergrößert werden kann, damit stets ein ausreichend großer Vorrat an Sporen für Tests an diesen zur Verfügung steht.



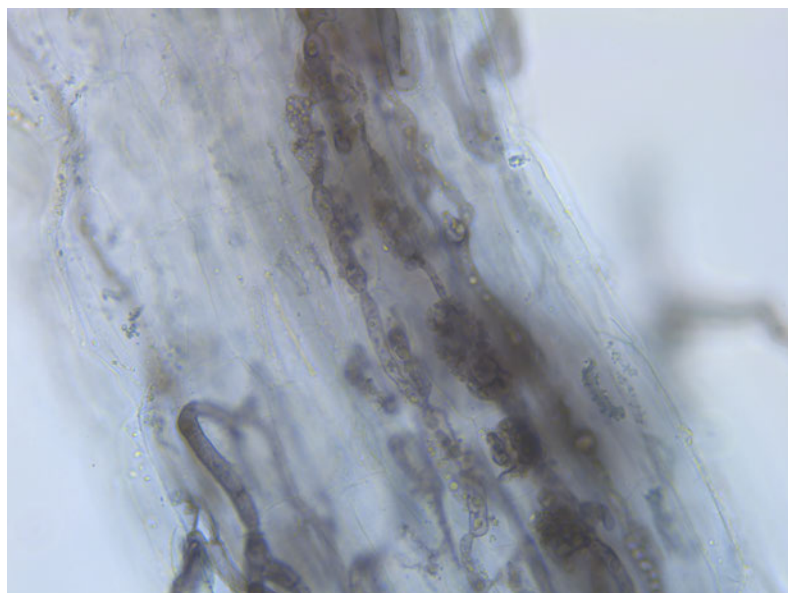
Petersilie mit Inokulum, 1. Durchgang, 40x Vergrößerung



Petersilie mit Inokulum, 1. Durchgang, 40x Vergrößerung



Petersilie mit Inokulum, 1. Durchgang, 100x Vergrößerung



Petersilie mit Inokulum, 1. Durchgang, 400x Vergrößerung. Gut zu erkennen sind die Hyphen innerhalb der Wurzel, die die Arbuskel verbinden.

Originalarbeiten

- Bano, SA und D Ashfaq (2013) Role of mycorrhiza to reduce heavy metal stress. *Natural Science* 2013.
- Bücking, H und A Kafle (2015) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. *Agronomy* 5(4):S. 587–612.
- Cornejo, P, J Pérez-Tienda, S Meier, A Valderas, F Borie, C Azcón-Aguilar und N Ferrol (2013) Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry* 57:S. 925–928.
- Hage-Ahmed, K, K Rosner und S Steinkellner (2019) Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. *Pest management science* 75(3):S. 583–590.
- Malty, JdS, JO Siqueira und FMdS Moreira (2006) Effects of glyphosate on soybean symbiotic microorganisms, in culture media and in greenhouse. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:S. 285–291.
- Meena, DS und D Kumar (2022) Candida-Pneumonie: Ein harmloser Zuschauer oder ein leiser Mörder? *Kompass Pneumologie* 10(2):S. 66–69.
- Metting, B (1981) The systematics and ecology of soil algae. *The botanical review* 47:S. 195–312.
- Novais, CB de, L Avio, M Giovannetti, SM de Faria, JO Siqueira und C Sbrana (2019) Interconnectedness, length and viability of arbuscular mycorrhizal mycelium as affected by selected herbicides and fungicides. *Applied Soil Ecology* 143:S. 144–152.
- Parniske, M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6(10):S. 763–775.
- Pasaribu, A, RB Mohamad, Y Awang, R Othman und A Puteh (2011) Growth and development of symbiotic Arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mossea* (Nicol. and Gerd.), in alachlor and glyphosate treated soils. *African Journal of Biotechnology* 10(55):S. 11520–11526.
- Rasouli, F, T Amini, S Skrovankova, M Asadi, MB Hassanpouraghdam, S Ercisli, M Buckova, M Mrazkova und J Mlcek (2023) Influence of drought stress and mycorrhizal (*Funneliformis mosseae*) symbiosis on growth parameters, chlorophyll fluorescence, antioxidant activity, and essential oil composition of summer savory (*Satureja hortensis* L.) plants. *Frontiers in Plant Science* 14:S.1151467.
- Rohrmann, S und L Jäkel (2020) Versuchs mal mit Pflanzen: Botanik lernen und lehren. wbv Media GmbH & Company KG. ISBN: 9783763965571.
- Savary, S, L Willocquet, SJ Pethybridge, P Esker, N McRoberts und A Nelson (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution* 3(3):S. 430–439.
- Schwarz, P (2023) Mukormykosen-Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. *InFo Hämatologie+ Onkologie* 26(1-2):S. 32–40.

- Sheldrake, M und S Vogel (2020) *Verwobenes Leben: Wie Pilze unsere Welt formen und unsere Zukunft beeinflussen*. Ullstein Ebooks. ISBN: 9783843724265.
- Sprent, JI und EK James (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant physiology* 144(2):S. 575–581.
- Tawaraya, K, c Saito, M Morioka und T Wagatsuma (1996) Effect of concentration of phosphate on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *Soil science and plant nutrition* 42(3):S. 667–671.
- Vogt, K, P Klein, K Miksits, H Zeichhardt, H Hahn, D Falke, S Kaufmann und U Ullmann (2013) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 9783662086278.
- Wainwright, M (2013) *Biotechnologie mit Pilzen: Eine Einführung*. Springer-Verlag.

Webseiten

- Brechner, E, B Dinkelaker und D Dreesmann. (2024) *Kompaktlexikon der Biologie, Mykorrhiza*. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/mykorrhiza/7904> (aufgerufen am 09.01.2024).
- Feedipedia Animal feed resources information system. (2024) *Persian clover (Trifolium resupinatum)*. URL: <https://www.feedipedia.org/node/244> (aufgerufen am 15.08.2024).
- Quedlinburger Saatgut mbH. (2024) *Zwiebeln Stuttgarter Riesen*. URL: <https://www.quedlinburger-saatgut.de/saatgut/artikel/zwiebeln-zwiebeln-stuttgarter-riesen-491232.html> (aufgerufen am 19.08.2024).
- Spektrum Akademischer Verlag. (2024) *Lexikon der Biologie, Landalgen*. URL: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/landalgen/38087> (aufgerufen am 23.08.2024).
- The International Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. (2024) *Funneliformis mosseae*. URL: <https://invam.ku.edu/mosseae> (aufgerufen am 17.05.2024).
- Wilstermann-Hildebrand, M. (2024) *Petersilie*. URL: <https://heimbiotop.de/Petersilie.html> (aufgerufen am 19.08.2024).
- Zerrle, M. (2024) *Bodenwasser – Wasserbindungen, Wasserkapazität*. URL: <https://geohilfe.de/physische-geographie/bodengeographie/bodenbestandteile/bodenwasser-definition/bodenwasser-wasserbindungen-wasserkapazitaet/> (aufgerufen am 23.08.2024).

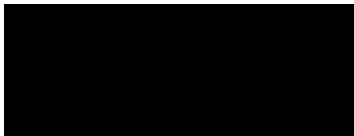
Glossar

anastamotisch	von Anastamose; keine räumliche Trennung zwischen einzelnen Pilzzellen mehr, mehrere Zellen (Zellkerne) teilen sich ein großes Cytoplasma
Chaperone	Proteine, die die korrekte Faltung anderer Proteine überwachen und unterstützen
Hyphen	fadenförmige Vegetationskörper der Pilze
Klasse	Stufe in der Systematik der Biologie
Leguminose	latein für Hülsenfrüchtler, zeichnen sich durch die Symbiose mit stickstofffixierenden Knöllchenbakterien aus
Mycel	Gesamtheit der Hyphen eines Pilzes
Mykorrhiza	Symbiose aus Pilz und Pflanze
Mykose	Fachausdruck Pilzerkrankung
Riboflavin	auch bekannt als Vitamin B ₂
Xylem	Leitbündel, sorgt für den Stofftransport innerhalb der Pflanze

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.



Mittweida, 25.08.2024