

Einfluss verschiedener Bewirtschaftungssysteme auf die Diversität von Bodenpilzen

Alexandra Elisabeth Hagn

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

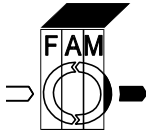
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. I. Kögel-Knabner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. C. Munch
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Die Dissertation wurde am 21.05.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.10.2003 angenommen.



FORSCHUNGSVERBUND AGRARÖKOSysteme MÜNCHEN

Erfassung, Prognose und Bewertung nutzungsbedingter
Veränderungen in Agrarökosystemen und deren Umwelt

Alexandra Hagn

Einfluss verschiedener Bewirtschaftungssysteme auf die Diversität von Bodenpilzen

FAM - Bericht 63



GSF - Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit



Technische Universität
München / Weihenstephan

Shaker Verlag
Aachen 2004

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 2003

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-2473-4

ISSN 0941-892X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Meinen Eltern

PUBLIKATIONSLISTE

- 1) Hagn, A., Geue, H., Pritsch, K., Schloter, M. (2003): Assessment of fungal diversity and community structure in agricultural used soils. In Recent Research Developments in Microbiology 6 (2002), Part II. Research Signpost, Kerala, Indien.
- 2) Hagn, A., Pritsch, K., Ludwig, W., Schloter, M. (2003): Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for soil fungal community analysis. Acta Biotechnologica 23 (4) Accepted und In Press.
- 3) Hagn, A., Pritsch, K., Schloter, M., Munch, J.C. (2003): Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. Biology and Fertility of Soils, 38, 236-244.

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Bodeneigenschaften des Schlages A17

Tab. 2: Bewirtschaftungsmaßnahmen des Schlages A17 im Jahr 2000

Tab. 3: Pilzspezifische Primersets getestet in virtuellen und realen PCR-Ansätzen

Tab. 4: Isolatezahlen und Anzahl der morphologischen Gruppen für alle Medien

Tab. 5: Isolierte Hauptgattungen der einzelnen Medien

Tab. 6: Zunahmen und Abnahmen der Shannon-Weaver Indices für alle Medien, Standorte und Probennahmen

Tab. 7: Zunahmen und Abnahmen der Abundanzwerte für alle Medien, Standorte und Probenahmen

Tab. 8: Einteilung der Isolate (Malzextrakmedium) aller Probennahmen und Standorte in morphologische Gruppen

Tab. 9: Einteilung der Isolate (Bodenextrakmedium) aller Probennahmen und Standorte in morphologische Gruppen

Tab. 10: Einteilung der Isolate (Moser-b Medium) aller Probennahmen und Standorte in morphologische Gruppen

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: Gelcompar Vergleich der DGGE-Fingerprints amplifizierter 18S rDNA aus Boden-DNA-Extrakten der Aprilprobennahme

Abb. 2: Gelcompar Vergleich der DGGE-Fingerprints amplifizierter 18S rDNA aus Boden-DNA-Extrakten der Juniprobennahme

Abb. 3: Gelcompar Vergleich der DGGE-Fingerprints amplifizierter 18S rDNA aus Boden-DNA-Extrakten der Septemberprobennahme

Abb.4: Gelcompar Vergleich der DGGE-Fingerprints amplifizierter 18S rDNA aus vereinigten Boden-DNA-Extrakten für alle Probennahmen

Abb. 5: Vergleich der DGGE-Bandenmuster verschiedener Isolate

Abb. 6: Vergleich der DGGE-Bandenmuster zweier Isolate der *Trichoderma*-Gruppe mit den Bandenmustern amplifizierter 18S rDNA aus vereinigten Boden-DNA-Extrakten

Abb. 7: Definition morphologischer Gruppen

Abb. 8: Shannon-Weaver Indices im Vergleich aller Medien, Standorte und Probennahmen

Abb. 9: Abundanzwerte im Vergleich aller Medien, Standorte und Probennahmen

Abb. 10: Hauptkomponentendiagramme der transformierten Daten der morphologischen Gruppen für alle Medien, Standorte und Probennahmen

Abb. 11: Ergebnisse der Konfrontationstests von Isolaten der *Trichoderma*-Gruppe mit *Fusarium graminearum*

Abb. 12: Neighbor-Joining Baum berechnet aus ITS-Sequenzen von Isolaten der *Trichoderma*-Gruppe und Referenzsequenzen der NCBI Datenbank incl. Markierung der Laccase bildenden Isolate der Tests mit *Fusarium graminearum*

Abb. 13: Ergebnisse der Konfrontationstests von Isolaten der *Trichoderma*-Gruppe mit *Fusarium oxysporum*

Abb. 14: Neighbor-Joining Baum berechnet aus ITS-Sequenzen von Isolaten der *Trichoderma*-Gruppe und Referenzsequenzen der NCBI Datenbank incl. Markierung der Laccase bildenden Isolate der Tests mit *Fusarium oxysporum*

Abb. 15: Verteilung der bei Konfrontation mit *Fusarium oxysporum* Laccase bildenden Isolaten der *Trichoderma*-Gruppe für alle Standorte und Probenahmen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A17	Acker/Schlag 17
ABTS	2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6 sulfonsäure
bea	Bodenextraktmedium
bp	basepairs (Nukleotidpaare)
BSA	Bovine Serum Albumin
dest.	destilliert
C _{org}	organischer Kohlenstoff
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxynuklease
dNTPs	Desoxynukleotide
FAM	Forschungsverbund Agrarökosysteme München
HC	high yield, conventional farming (Hohertrag, flächeneinheitliche Düngung)
HP	high yield, precision farming (Hohertrag, teilschlagspezifische Düngung)
ITS	internal transcribed spacers
LC	low yield, conventional farming (Niederertrag, flächeneinheitliche Düngung)
LP	low yield, precision farming (Niederertragsbereich, teilschlagspezifische Düngung)
Mea	Malzextraktmedium
Mb	Moser-b Medium
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
RAPD	random amplification of polymorphic DNA
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphism
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung	1
A.1 Pilze in landwirtschaftlich genutzten Böden	1
A.2. Methoden zur Erfassung struktureller Diversität von Bodenpilzpopulationen	3
A.3. Ziel der Arbeit	7
B. Material und Methoden	9
B.1 Standort und Probennahme	9
B.2 Untersuchungen an Pilzpopulationen in Ackerböden	11
B.2.1 Selektion pilzspezifischer 18S rDNA Primersets	11
<i>B.2.1.1 Software gestützte PCR</i>	11
<i>B.2.1.2 Reale PCR</i>	11
B.2.2 DNA-Isolierung aus Bodenmaterial	12
B.2.3 Spezifische Amplifizierung pilzlicher 18S rDNA aus Boden-DNA-Extrakten	12
B.2.4 Analyse von Pilzgemeinschaften mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	13
B.2.5 Nährmedien zur Kultivierung von filamentösen Bodenpilzen	13
B.2.6 Isolierung aktiver Hyphen aus Bodenproben	15
B.2.7 Charakterisierung morphologischer Gruppen	16
B.2.8 DNA-Isolierung aus Pilzkulturen	16
B.2.9 Amplifizierung der 18S rDNA	17
B.2.10 Amplifizierung der ITS Region	17
B.2.11 Sequenzanalyse und molekulare Identifizierung von Pilzisolaten	18
B.2.12 RAPD-Analyse zur intraspezifischen Differenzierung von Isolaten der Gattung <i>Trichoderma</i>	18
B.3 Populationsanalysen anhand der Berechnung ökologischer Indices	19
B.3.1 Shannon-Weaver Index	19
B.3.2 Abundanz und Gleichverteilung	19
B.3.3 Hauptkomponentenanalyse	20
B.4 Isolate der „ <i>Trichoderma</i> -Gruppe“ mit potentieller Eignung zur Biokontrolle	20
B.4.1 Screening von <i>Trichoderma</i> -Stämmen und Pathogene auf Laccase-Bildung in Reinkultur	20

B.4.2 Konfrontationsversuche von <i>Trichoderma</i> -Isolaten mit <i>Fusarium graminearum</i> und <i>Fusarium oxysporum</i>	21
---	----

C. Ergebnisse **22**

C.1 Kultivierungsunabhängige Analyse pilzlicher Gesamtdiversität basierend auf DNA-Polymorphismen	22
C.1.1 Virtuelle und reale Primertests	22
C.1.2 Spezifische Amplifizierung pilzlicher 18S rDNA Sequenzen aus Boden-DNA-Extrakten	22
C.2 Kultivierungsabhängige polyphasische Charakterisierung aktiver Pilzgemeinschaften in Ackerböden	26
C.2.1 Definition morphologischer Gruppen	26
C.2.2 Genotypische Charakterisierung von Bodenpilzgemeinschaften	28
C.2.3 Kultivierbare Vertreter von Pilzpopulationen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Bewirtschaftungsformen, Standorteigenschaften und Jahreszeit	29
C.2.3.1 Pilzliche Diversität	29
C.2.3.2 Abundanzen morphologischer Gruppen	31
C.2.3.3 Hauptkomponentenanalyse	32
C.3 Populationsstruktur der morphologischen Gruppe „ <i>Trichoderma</i> “	34
C.3.1 Molekularbiologische Untersuchungen der Gattung <i>Trichoderma</i>	34
C.3.2 Jahreszeitliche, standort- und bewirtschaftungsbedingte Verteilung von <i>T. viride</i> , <i>T. atroviride</i> und <i>Trichoderma</i> sp. „neu“	34
C.3.3 Untersuchungen zur intraspezifischen Variabilität von <i>T. viride</i> , <i>T. atroviride</i> und <i>Trichoderma</i> sp. „neu“	35
C.4 Endogene <i>Trichoderma</i> -Stämme als potentielle Antagonisten gegen bodenbürtige (Weizen)Pathogene	36
C.4.1 Konfrontationsversuche von <i>Trichoderma</i> spp. gegen <i>Fusarium graminearum</i>	36
C.4.2 Konfrontationsversuche von <i>Trichoderma</i> spp. gegen <i>Fusarium oxysporum</i>	39

D. Diskussion	43
D.1 Kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Methoden zur Erfassung pilzlicher Diversität im Boden	43
D.1.1 Eignung von 18S rDNA Fingerprinting zur Erfassung pilzlicher Gesamtgemeinschaften	43
D.1.2 Isolierung aktiver Populationen	44
D.1.3 Komplementäre Techniken	46
D.2 Der Einfluss ökologischer Faktoren auf Gesamtpilzgemeinschaften und aktive Populationen	47
D.2.1 Jahreszeitlich und vegetationsbedingte Effekte	47
D.2.2 Standortspezifische Unterschiede	48
D.2.3 Einfluss verschiedener Bewirtschaftungssysteme	49
D.3 Die Gattung <i>Trichoderma</i> als eine Hauptgruppe pilzlicher Gemeinschaften der beprobten Standorte	51
D.3.1 Phylogenetische Einteilung der Gattung <i>Trichoderma</i>	51
D.3.2 Jahreszeitliche, standort- und bewirtschaftungsspezifische Verteilung von <i>T. viride</i> , <i>T. atroviride</i> und <i>Trichoderma</i> sp. „neu“	52
D.3.3 <i>Trichoderma</i> spp. als potentiell biokontrollaktive Organismen gegen Fusariosen	53
D.3.4 Laccasebildung – Detoxifikationsmechanismus und Abwehrstrategie?	53
D.4 Schlussfolgerung	55
E. Zusammenfassung	57
F. Literaturverzeichnis	59
G. Anhang	75
G.1 Tabelle 8: Einteilung der Isolate (Malzextraktmedium) aller Probenahmen und Standorte in morphologische Gruppen Charakterisierung morphologischer Gruppen für die Isolate	75

G.2 Tabelle 9: Einteilung der Isolate (Bodenextraktmedium) aller Probennahmen und Standorte in morphologische Gruppen	79
G.3 Tabelle 10: Einteilung der Isolate (Moser-b Medium) aller Probennahmen und Standorte in morphologische Gruppen Charakterisierung morphologischer Gruppen für die Isolate	85
G.4 Publikation: Assessment of fungal diversity and community structure in agricultural used soils	89
G.5 Publikation: Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for soil fungal community analysis	109
G.6 Publikation: Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems with special reference to biocontrol strains of <i>Trichoderma</i> spp.	119