

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

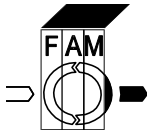
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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.



FORSCHUNGSVERBUND AGRARÖKOSYSTEME MÜNCHEN

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

Holger Geue

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

FAM - Bericht 54



GSF - Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit



Technische Universität
München / Weihenstephan

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Geue, Holger:

Molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis arbuskulärer
Mykorrhizapilze bei Wildpflanzenpopulationen landwirtschaftlicher
Nutzflächen/Holger Geue.

Aachen: Shaker, 2002

(FAM-Bericht; Bd. 54)

Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-0940-9

Copyright Shaker Verlag 2002

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

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0940-9

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

*„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

1	Einleitung.....	1
1.1	Arbuskuläre Mykorrhiza	1
1.2	Identifizierung der arbuskulären Mykorrhizapilze	5
1.3	Molekularbiologische Untersuchungen bei arbuskulären Mykorrhizapilzen	5
1.4	Zielsetzung.....	6
2	Material und Methoden.....	7
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
3	Ergebnisse.....	44
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® PCR	59
3.3.2	Quantifizierung von <i>G. mosseae</i> mit der TaqMan® 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
4	Diskussion	82
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® <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
5	Zusammenfassung	101
6	Literatur.....	102
7	Anhang.....	115

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® <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. 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®-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® PCR-Analyse.	37
Tab. 17: Plasmid-Anzahl in der verwendeten Standardreihe.	38
Tab. 18: Temperaturprogramm 3 für die TaqMan® 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 & 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 <i>et al.</i> (1990)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)