

Einfluss von Gluconasturtiin und
2-Phenylethylisothiocyanat auf die
Rhizosphärenmikroflora beim Raps
(*Brassica napus* L.)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Angelika Susanne Rumberger
aus Hamburg

2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. Lieberei

Weitere Gutachter der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. P. Marschner

Tag der Disputation: 17. Mai 2002

Hamburg, den 04. Juni 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methode	5
2.1 Verwendete Sorten	5
2.1.1 Winterraps	5
2.1.2 Sommerraps	5
2.2 Anzucht und Kultur	5
2.2.1 Feldversuche	5
2.2.2 Gewächshausversuche	5
2.3 Probennahme	6
2.3.1 Probennahme in Feld- und Topfversuchen	6
2.3.2 Probennahme bei Rhizotronversuchen	6
2.4 Trockenmassebestimmung	6
2.5 Bodenfeuchtebestimmung	6
2.6 PEITC-Konzentrationsbestimmung	6
2.7 Analyse der funktionellen Diversität	7
2.7.1 BIOLOG [®] -ecoplates	7
2.7.2 Mikrotiterplatten zur Untersuchung der PEITC-, PPN-, SCN-Empfindlichkeit	7
2.8 Diversitätsanalysen auf DNA-Basis	8
2.8.1 DNA-Isolierung	8
2.8.2 Polymerasekettenreaktion	8
2.8.3 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	10
2.8.4 Färben und Detektieren der Banden	11
2.9 Darstellung der aktiven Mikroflora	11
2.10 Statistische Auswertung	12
3. Experimente	15
3.1 PEITC im Boden: Abbau und Wirkung auf Mikroorganismen	15
3.1.1 Abbau von PEITC im Boden	15
3.1.2 Veränderung der Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegenüber PEITC, PPN und SCN ⁻ in Abhängigkeit von der Vorbehandlung	15
3.1.3 Wirkung von PEITC auf Bodenmikroorganismen	15
3.2 Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit	16
3.2.1 Feldversuche mit Winterraps	16
3.2.1.1 Winterrapsfeldversuch 1999/2000	16
3.2.1.2 Winterrapsfeldversuch 2000/2001	16
3.2.2 Feld- und Gewächshausversuche mit Sommerraps	17

3.2.2.1 Sommerrapsfeldversuch 2000	17
3.2.2.2 Sommerrapsfeldversuch 2001	17
3.2.2.3 Gewächshausversuch	17
3.3 Räumliche Unterschiede der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Mikroflora in der Rhizosphäre	18
3.3.1 Rhizotronversuch mit Winterraps	18
3.3.2 Rhizotronversuch mit Sommerraps	18
3.4. Langfristige Auswirkung des durch PEITC vermittelten Einflusses der Rapswurzel auf die Bodenmikroflora	19
3.4.1 Folgeversuch A	19
3.4.1.1 Vorkultur A	19
3.4.1.2 Folgekultur A	19
3.4.2 Folgeversuch B	20
3.4.2.1 Vorkultur B	20
3.4.2.2 Folgekultur B	20
4. Ergebnisse	22
4.1 PEITC im Boden: Abbau und Wirkung auf Mikroorganismen	22
4.1.1 Abbau von PEITC im Boden	22
4.1.2 Veränderung der Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegenüber PEITC, PPN und SCN in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.	23
4.1.3 Wirkung von PEITC auf Bodenmikroorganismen	26
4.1.4 Zusammenfassung	27
4.2. Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit	29
4.2.1 Winterraps	29
4.2.1.1 Feldversuch 99/00	29
4.2.1.2 Feldversuch 2000/2001	32
4.2.1.3 Zusammenfassung	35
4.2.2 Feldversuche mit Sommerraps	36
4.2.2.1 Feldversuch 2000	36
4.2.2.2 Feldversuch 2001	39
4.2.2.3 Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Keimung bis zur Blüte	41
4.2.3 Zusammenfassung	43
4.3 Räumliche Unterschiede der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Mikroflora in der Rhizosphäre	45
4.3.1 Rhizotronversuch mit Winterraps	45
4.3.2 Rhizotronversuch mit Sommerraps	47
4.3.3 Zusammenfassung	49

4.4. Langfristige Auswirkung des durch PEITC vermittelten Einflusses der Rapswurzel	
auf die Bodenmikroflora	51
4.4.1 Folgeversuch A	51
4.4.1.1. Vorkultur A	51
4.4.1.2 Folgekultur A	53
4.4.1.3 Zusammenfassung	55
4.4.2 Folgeversuch B	55
4.4.2.1 Vorkultur B	55
4.4.2.2 Folgekultur B	56
4.4.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der Versuche 4.4.2.1 und 4.4.2.2	58
4.4.3 Zusammenfassung der Versuche 4.4.1 und 4.4.2	59
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5. Diskussion	63
5.1 Einfluss von endogenen und exogenen Faktoren auf die PEITC-Abgabe bei Raps	63
5.1.1 Größenordnung der PEITC Abgabe	63
5.1.2 Wirkung endogener Faktoren auf die PEITC-Abgabe	64
5.1.3 Bedeutung exogener Faktoren für die PEITC-Abgabe	66
5.2 Einfluss von PEITC und anderen Umweltfaktoren auf die Artenzusammensetzung	
der Rhizosphärenmikroflora	69
5.2.1 Abbau von PEITC im Boden	70
5.2.2 Empfindlichkeit von Bodenmikroorganismen gegenüber PEITC	70
5.2.3 Grenzen der zur Beschreibung der Bodenmikroflora eingesetzten	
Methoden	71
5.2.4 Umwelt- und entwicklungsbedingte Veränderungen der Artenzusammensetzung	
der Rhizosphärenmikroflora	73
5.3 PEITC in der Pflanzen-Mikroben-Wechselbeziehung	78
5.3.1 PEITC in der Wechselwirkung wurzelferner Boden – Rhizosphäre	79
5.3.2 PEITC in den Wechselwirkungen der Rhizosphärenmikroorganismen	
untereinander	81
5.3.3 Wirkung von Rhizosphärenmikroorganismen auf die Pflanze unter	
PEITC-Einfluss	82
5.3.4 Schlussfolgerungen für den Einsatz von glucosinolatreichem Raps für den	
Pflanzenschutz	84
5.5 Zusammenfassung der Diskussion	86
6. Zusammenfassung	87
7. Literatur	89
Lebenslauf	96
Danksagung	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PEITC-, PPN- und SCN Endkonzentrationen [$\mu\text{mol l}^{-1}$] bei 200 μl Kavernenfüllung auf Mikrotiterplatten zur Untersuchung der PEITC-, PPN-, SCN-Empfindlichkeit.	8
Tabelle 2: Sequenz, Zielorganismen und Literaturquelle der zur Darstellung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora verwendeten Primer.	9
Tabelle 3: Zur Darstellung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora verwendete PCR-Zyklen mit Literaturquelle.	10
Tabelle 4: Anzahl der Parallelen pro Behandlungsvariante im Versuch 3.4.1.2.	20
Tabelle 5: Anzahl der Parallelen pro Behandlungsvariante im Versuch 3.4.2.2.	21
Tabelle 6: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Feldversuch 1999/2000.	30
Tabelle 7: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Versuchsjahr 1999/2000.	31
Tabelle 8: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Feldversuch 2000/2001.	33
Tabelle 9: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Versuchsjahr 2000/2001.	35
Tabelle 10: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in Feldkultur im Versuchsjahr 2000 an vier Probennahmeterminen.	37
Tabelle 11 Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Versuchsjahr 2000.	38

Tabelle 12: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in Feldkultur im Versuchsjahr 2000 an vier Probennahmeterminen.	39
Tabelle 13: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Versuchsjahr 2001.	41
Tabelle 14: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der aktiven und der gesamten Rhizosphärenmikroflora bei einem Rhizotronversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Gewächshaus.	46
Tabelle 15: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der aktiven und der gesamten Rhizosphärenmikroflora bei einem Rhizotronversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Gewächshaus.	49
Tabelle 16: Bodenfeuchte [% (g/g)], Sprosstrockenmasse [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 32 Tagen Gewächshauskultur auf Versuchsfeldboden.	51
Tabelle 17: Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 35 Tagen Gewächshauskultur auf Substrat, auf dem zuvor ‚Monty‘ oder ‚Rainbow‘ kultiviert wurde.	54
Tabelle 18: Bodenfeuchte [% (g/g)], PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}], Spross- und Wurzeltrockenmasse [mg] pro Topf nach Kultur der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ über 41 Tage im Kulturschrank.	56
Tabelle 19: Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 21 Tagen Kultur auf unterschiedlich vorbehandelten Substrat.	57
Tabelle 20: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora nach 21 Tagen Kultur von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Klimaschrank auf unterschiedlich vorbehandeltem Substrat.	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung von 2-Phenylethylisothiocyanat (PEITC) durch spontane intramolekulare Umlagerung nach hydrolytischer Spaltung des Gluconasturtiin durch die Myrosinase.	2
Abbildung 2: Abnahme der PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}] gegen die Zeit [h] in sterilem und unsterilem Boden.	22
Abbildung 3: Wachstum fluoreszierender Mikroorganismen in einer Mikrotiterplatte 10 Tage nach Beimpfung mit Bodenlösung aus mit PEITC, PPN, NaSCN (SCN) bzw. H_2O vorbehandelten Boden.	24
Abbildung 4: Vergleich der DGGE-Bandenmuster bakterieller direkt aus dem Boden oder nach zehntägiger Kultur in Mikrotiterplatten isolierten DNA.	25
Abbildung 5: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Bodenbakterien nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen.	27
Abbildung 6: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der eukaryotischen Bodenmikroflora nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen.	28
Abbildung 7: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Bodenaktinomyceten nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen.	28
Abbildung 8: Entwicklung der PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}] gegen die Zeit in der Rhizosphäre von ‚Mohikan‘ bei Feldkultur.	32
Abbildung 9: Zeit- und sortenabhängige Unterschiede der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien an Wurzeln von ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ bei Feldkultur zum Fruchtansatz (15.6.2001) und zur Reife (20.7.2001).	33
Abbildung 10: Veränderung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora an den Wurzeln von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ mit der Entwicklung der Pflanzen im Versuchsjahr 2001.	40
Abbildung 11: Zunahme der Sprosstrockenmasse [g] mit der Zeit von ‚Rainbow‘ bei Gewächshauskultur.	42
Abbildung 12: Zunahme der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre [pmol g^{-1}] mit der Zeit von ‚Rainbow‘ bei Gewächshauskultur.	43

- Abbildung 13: Unterschiede der PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}] in der Rhizosphäre von Nebenwurzeln 1. Ordnung und Nebenwurzeln 2. Ordnung und dem wurzelfernen Boden bei den Winterrapssorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ und den Sommerrapssorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 21 Tagen Gewächshauskultur in Rhizotronen. 48
- Abbildung 14: Unterschiede in der Zusammensetzung der gesamten bakteriellen Mikroflora und der in den letzten 48 h aktiven bakteriellen Mikroflora in Rhizosphäre von Nebenwurzeln 1. Ordnung und 2. Ordnung bei ‚Emerald‘ in Gewächshauskultur. 47
- Abbildung 15: Zu- und Abnahme der Rhizosphärenbakterien in Abhängigkeit von der PEITC-Konzentration bei ‚Monty‘ nach 32 Tagen Gewächshauskultur. 52
- Abbildung 16: Zu- und Abnahme der Rhizosphärenbakterien in Abhängigkeit von der PEITC-Konzentration bei ‚Rainbow‘ nach 32 Tagen Gewächshauskultur. 53

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g/g	Gewicht auf Gewicht
g/vol	Gewicht auf Volumen
G	Guanidin
ns	nicht signifikant
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEITC	2-Phenylethylisothiocyanat
PPN	3-Phenylpropionitril
PBS	Phosphatpuffer mit Salzzusatz, pH 7,3, mit 137 mmol l ⁻¹ NaCl, 2,7mmol l ⁻¹ KCl, 4,3 mmol l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O und 1,4 mmol l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ .
RDA	Redundanzanalyse
rDNA	für ribosomale Ribonukleinsäure kodierende DNA
16 S DNA	für die kleine ribosomale Untereinheit kodierende DNA bei Prokaryota
18 S DNA	für die kleine ribosomale Untereinheit kodierende DNA bei Eukaryota
SCN	Thiocyanid
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Elektrophoresepuffer aus 33,88 g Tris base, 7,99 ml Eisessig, 14 ml 0,5 mol l ⁻¹ EDTA (pH 8,0) auf 7 l deionisiertem Wasser.
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
vol/vol	Volumen auf Volumen

1. Einleitung

Die Bedingungen in der Rhizosphäre, also in dem Bodenbereich, den Pflanzen durch ihre Wurzeln erschließen und beeinflussen, werden von der Pflanze, Bodenmikroorganismen und den abiotischen Eigenschaften des Bodens bestimmt. Pflanzen, Bodenmikroorganismen und Boden beeinflussen einander durch eine Vielzahl von Vorgängen (LYNCH, 1990). Pflanzen geben während des Wachstums organische Substanzen in den Boden ab. Die Gesamtheit dieser organischen Substanzen wird als Rhizodeposition bezeichnet. Diese setzt sich aus passiv ausgeschiedenen, niedermolekularen Exsudaten, aktiv ausgeschiedenen Sekreten, Zellbruchstücken und Gasen zusammen (WHIPPS, 1990). Die Rhizodeposition dient vielen Mikroorganismen als Substrat, was zu einer Erhöhung der Mikroorganismendichte in der Rhizosphäre im Vergleich zum umgebenden Boden führt (BAZIN et al., 1990). Neben Zuckern, Polysacchariden, Aminosäuren und organischen Säuren werden über die Pflanzenwurzeln auch Produkte des sekundären Stoffwechsels in den Boden abgegeben. Diese Stoffe könnten einen Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora haben, der über den einer Nahrungsquelle hinausgeht. Zu den Sekundärstoffen, von denen sich ein solcher Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora erwarten lässt, gehören auch die schwefelhaltigen Glucosinolate, aus denen die teilweise biologisch sehr aktiven Senföle freigesetzt werden können.

Die Senföle sind Produkte des Glucosinolat-Myrosinasesystems, das vor allem in der Ordnung der Capparales weit verbreitet ist (BROWN und MORRA, 1997). Glucosinolate sind β -Thioglucoside, an die ein Sulfonatoximrest (-N-OSO₃) und eine Restgruppe gebunden sind (CHEW, 1988; BROWN und MORRA, 1997). Allerdings sind Glucosinolate selbst biologisch weitgehend inaktiv, erst durch die Spaltung durch die β -Thioglucosidase Myrosinase werden die biologisch aktiven Spaltprodukte, die Senföle, frei (BROWN und MORRA, 1997). In Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Restgruppe, des pH und der Gegenwart weiterer Enzyme und Fe²⁺ entstehen nach der Spaltung der Glucosinolate Substanzen, die zu unterschiedlichen chemischen Stoffklassen gehören (CHEW, 1988). Unter dem Begriff Senföle werden verschiedene Nitrile, SCN⁻ und organische Thiocyanate, Isothiocyanate, Oxalidinthione, Epithionitrile und andere Verbindungen zusammengefasst, die nach der Spaltung von Glucosinolaten entstehen (CHEW, 1988).

Innerhalb der Capparales sind beinahe 100 verschiedene aromatische und aliphatische Restgruppen von Glucosinolaten bekannt (CHEW, 1988). Die einzelnen Familien unterscheiden sich hinsichtlich ihres Spektrums an Glucosinolaten. Bei dem zu den Brassicaceae gehörendem Raps, *Brassica napus* L., dominiert in der Wurzel das Glucosinolat Gluconasturtiin, das einen 2-Phenylethyl-Rest trägt (KIRKEGAARD und SAWAR, 1998). Die Myrosinase spaltet das Gluconasturtiin hydrolytisch zu Glucose und einem instabilen Zwischenprodukt, das durch Umlagerung spontan zu 2-Phenylethylisothiocyanat (PEITC)

und HSO_4^- zerfällt (Abb. 1). Bei niedrigem pH ($< \text{pH } 4$) und in der Gegenwart von Fe^{2+} zerfällt das instabile Zwischenprodukt in 3-Phenylpropannitril (PPN), S^0 und HSO_4^- (BROWN und MORRA, 1997). Im Spross und den Samen von Rapspflanzen werden vor allem Glucosinolate mit aliphatischen Restgruppen gespeichert (KIRKEGAARD und SAWAR, 1998). Werden ganze Rapspflanzen durch Unterpflügen in den Boden eingearbeitet, so sind anschließend im Boden hauptsächlich die Spaltprodukte des Gluconasturtiin, PEITC und PPN, nachzuweisen (GARDINER et al., 1999).

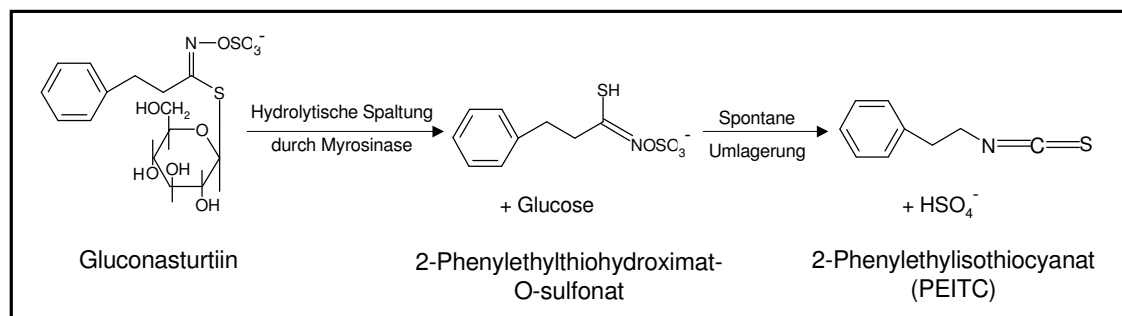


Abbildung 1: Entstehung von 2-Phenylethylisothiocyanat (PEITC) durch spontane intramolekulare Umlagerung nach hydrolytischer Spaltung des Gluconasturtiin durch die Myrosinase.

Im intakten pflanzlichen Gewebe sind die Glucosinolate in der Vakuole gespeichert. Die Myrosinase ist membranassoziiert im Cytoplasma lokalisiert (BONES und ROSSITER, 1996). Erst wenn die Zellintegrität zerstört wird, können Glucosinolate und Myrosinase in Kontakt kommen und Senföle frei werden. Bei natürlichem Wurzelwachstum werden beständig Zellen zerstört, so dass von einer gewissen kontinuierlichen Freisetzung von PEITC in die Rhizosphäre durch die Rapswurzel auszugehen ist. Tatsächlich sind sowohl Isothiocyanate als auch ungespaltene Glucosinolate in der Rhizosphäre von Brassicaceae nachgewiesen worden (ELLIOT und STOWE, 1971; CHOESIN und BOERNER, 1991; SCHREINER und KOIDE, 1993). Über zeitliche und räumliche Veränderungen der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre einer Pflanze ist wenig bekannt. KIRKEGAARD et al. (2001) zeigten, dass die Isothiocyanatkonzentration in der Rhizosphäre bei Sommerraps nach der Blüte parallel zum Glucosinolatgehalt der Wurzeln absinkt. Vermutlich besteht also eine Beziehung zwischen dem Glucosinolatgehalt der Wurzeln und der Isothiocyanatkonzentration der Rhizosphäre. Da der Glucosinolatgehalt von Rapspflanzen mit der Sorte, dem Entwicklungsstadium und der untersuchten Gewebezone schwankt (BUCHNER, 1988; KIRKEGAARD und SAWAR 1998, 1999), sind auch entsprechende Unterschiede in der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zu erwarten.

PEITC ist eine wenig flüchtige Verbindung, die *in vitro* auf zahlreiche Bodenpilze und Bakterien toxisch wirkt (BROWN und MORRA, 1997; Sawar et al., 1998). Die toxische Wirkung ist mit der irreversiblen Bindung der sehr reaktiven Isothiocyanatgruppe ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$) an freie Amino- ($-\text{NH}_2$) und Schwefelwasserstoffgruppen ($-\text{SH}$) sowie an Schwefelschwefelbindungen ($-\text{S}-\text{S}-$) zu erklären. Isothiocyanate gelten als die biologisch

wirksamsten Senföle. PPN und das Thiocyanatanion (SCN^-), das nach Spaltung der ebenfalls in den Rapswurzeln gespeicherten Indolylglucosinolate frei wird (KIRKEGAARD und SAWAR, 1998), greifen dagegen die Atemkette an und gelten als etwas weniger toxisch (BROWN und MORRA, 1997).

Durch die Einarbeitung von Ernterückständen und entfettetem Rapsmehl in den Boden, was auch als Biofumigation bezeichnet wird, oder durch die Zwischenkultur mit Brassicaceae können bodenbürtige Pflanzenpathogene, z.B. *Fusarium spec.* oder *Gaeumannomyces graminis*, gehemmt werden (RAMIREZ-VILLAPUDUA und MUNNIKE, 1987; KIRKEGAARD et al., 1998). Diese Hemmung wird auf die Freisetzung von Senfölen, beim Raps vor allem auf PEITC, zurückgeführt. Über die Wirkung der Senföle auf die Rhizosphärenmikroflora des Rapses selbst ist wenig bekannt. Die natürlichen Isothiocyanatkonzentrationen in der Rhizosphäre sind erheblich geringer als die für Bodenfumigationsmaßnahmen eingesetzten Konzentrationen (KIRKEGAARD et al., 2001). Zudem können sich die Isothiocyanate wegen ihrer geringen Halbwertszeit im Boden von nur etwa 24 h (NICHOLLS et al. 1999) in der Rhizosphäre vermutlich nicht anreichern. Vermutlich wird aber von der Rapswurzel ständig PEITC in die Rhizosphäre abgegeben, so dass trotz der geringen Halbwertszeit von einer im Vergleich zu Bodenfumigationsmaßnahmen zwar erheblich niedrigeren aber über einen längeren Zeitraum konstanten PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ausgegangen werden kann. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob die PEITC-Konzentrationen, die natürlicherweise in der Rhizosphäre vorliegen, ausreichen, um die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora zu beeinflussen.

Zur Analyse der Bodenmikroflora wird ein kulturunabhängiges Verfahren, die denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) (MUYZER und SMALLA, 1998), genutzt, da weniger als 10% der Bodenbakterien kultivierbar sind (BAKKEN, 1985). Für die DGGE wird aus dem Boden isolierte ribosomale DNA mit universellen Primerpaaren für Bakterien, Aktinomyceten (HEUER et al., 1997) und Eukaryota (WHITE et al., 1990) amplifiziert. Auf dem DGGE-Gel kann dann die Artenzusammensetzung der untersuchten Mikroorganismengruppen in einem für den jeweiligen Standort typischen Bandenmuster dargestellt werden. Die so mit der DGGE beobachteten Unterschiede in der Artenzusammensetzung können mit Hilfe von linearen Ordinationsmethoden auf die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und andere Umweltfaktoren bezogen werden. Über Substratnutzungsanalysen (GARLAND, 1997) sollen zusätzlich Hinweise auf den physiologischen Zustand der Bodenmikroflora gewonnen werden.

Der Vergleich von glucosinolatarmen und -reichen Rapsorten soll es in dieser Arbeit ermöglichen, einen Einfluss von PEITC auf die Rhizosphärenmikroflora nachzuweisen. Um den Einfluss des PEITCs von dem Einfluss der übrigen Rhizodeposition trennen zu können, wird zunächst die Reaktion der Mikroflora im wurzelfernen Boden auf PEITC-

Konzentrationen, wie sie in der Rhizosphäre gemessen werden, geprüft (Kapitel 3.1 und 4.1). In Gewächshaus- und Felduntersuchungen an vier Rapssorten wird der Frage nachgegangen, ob die PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre zeitlichen (Kapitel 3.2 und 4.2) und räumlichen Veränderungen (Kapitel 3.3 und 4.3) unterworfen sind und ob dieses zu Veränderungen der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora führt. Außerdem soll untersucht werden, ob die Veränderung der Bodenmikroflora, die durch Rapswurzeln während des Wachstums im Boden verursacht werden, nachhaltig ist (Kapitel 3.4 und 4.4). ist (Kapitel 3.4 und 4.4).

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die angewandten allgemein Methoden beschrieben. Spezielle Versuchsansätze werden in einem eigenen Kapitel (3) gesondert dargestellt.

2.1 Verwendete Sorten:

2.1.1 Winterraps

Das Saatgut der auf den Glucosinolatgehalt der Samen bezogen glucosinolatarmen Sorte ‚Emerald‘ und der glucosinolatreichen ‚Mohikan‘, beide Erntejahr 1999, ist eine Spende der Firma RAPS GbR, Saatzucht Lundsgaard, Lundsgaarder Weg 1, 24977 Grundhof.

2.1.2 Sommerraps

Das Saatgut der glucosinolatarmen Sorte ‚Monty‘ ($5 \mu\text{mol g}^{-1}$ Gluconasturtiin pro Wurzeltrockenmasse zur Blüte, KIRKEGAARD, 1999, persönliche Mitteilung) und der glucosinolatreichen ‚Rainbow‘ ($23 \mu\text{mol g}^{-1}$ Gluconasturtiin pro Wurzeltrockenmasse zur Blüte, KIRKEGAARD, 1999, persönliche Mitteilung) wird von Herrn Kirkegaard, Canberra, zur Verfügung gestellt.

2.2 Anzucht und Kultur

2.2.1 Feldversuche

Alle Feldversuche finden auf den Flächen des Versuchfeldes des Institutes für Angewandte Botanik in Ahrensburg (Hamburger Straße 236-240, 22926 Ahrensburg) statt. Der Boden der Versuchsflächen ist eine Parabraunerde, mit 60% Sand, 20% Lehm und 20% Tonanteil. Die Bodenwertzahl ist 35. Die mittlere Jahrestemperatur beträgt $8,2^{\circ}\text{C}$ und die durchschnittliche Jahresniederschlagsmenge $760 \text{ mm a}^{-1} \text{ m}^{-2}$.

Die Vorkultur auf dem im Versuchsjahr 1999/2000 genutzten Feld war Mais. Das im Versuchsjahr 2000/2001 genutzte Feld war im Vorjahr mit Erdbeeren bepflanzt gewesen.

Der Reihenabstand beträgt in allen Versuchen 33 cm. Auf die Parzellen der Größe 2,5 m x 7 m wurden umgerechnet 4 kg ha^{-1} (das entspricht: $0,4 \text{ g m}^{-2}$) Saatgut ausgebracht. Die Unkrautbekämpfung erfolgt mechanisch. Winter- und Sommerraps erhielten am 4.4.2000, bzw. am 5.4.2001 in $[\text{g m}^{-2}]$ 879 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140 CaCO_3 , 8,75 Mg CO_3 , 6 P_2O_5 , 11,25 K_2O , 4,5 MgO und 6 K_2SO_4 . Im Juni 2000 erhielt der Sommerraps eine zweite Düngergabe von in $[\text{g m}^{-2}]$ 27 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,4 P_2O_5 , 2,89 K_2O , 0,4 MgO und 3 K_2SO_4 .

2.2.2 Gewächshausversuche

Auch im Gewächshaus wird Boden von dem an die Parzellen für die Feldversuche angrenzenden Feld als Substrat verwandt. Die Samen keimen im Substrat und werden nach

dem Auflaufen vereinzelt. Nur in einem Versuch (Versuch 3.4.2.2) keimen die Samen vor dem Überführen in den Boden auf feuchten Filterpapier in Petrischalen aus.

Die in den Rhizotronversuchen verwendeten Pflanzen werden in Töpfen vorgekeimt und im Dreiblattstadium mit dem an den Wurzeln anhaftenden Boden in die Rhizotrone umgesetzt. Die Rhizotrone sind 2 cm tief, 15 cm breit und 30 cm hoch. Sie werden mit der zu öffnenden Breitseite nach unten in einem Winkel zur Horizontalen von etwa 60° aufgestellt

Die Pflanzen erhalten 14 h täglich Zusatzbeleuchtung von $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Temperatur schwankt zwischen 22°C tags und 16°C nachts.

2.3 Probennahme

2.3.1 Probennahme in Feld- und Topfversuchen

Bei der Probennahme wird der gesamte Wurzelballen aus dem Boden bzw. dem Topf entnommen. Dann wird der lose an den Wurzeln haftende Boden vorsichtig abgeschüttelt. Als Rhizosphärenboden wird der Boden angesprochen, der sich nicht auf diese Weise von der Wurzel entfernen lässt., sondern weiter an der Wurzeloberfläche haften bleibt. Vom Rhizosphärenboden wird zunächst die Probe abgenommen, die zur Bestimmung des PEITC-Gehaltes dienen soll, um einen verletzungsbedingten PEITC-Konzentrationsanstieg so gering wie möglich zu halten. Diese Probe wird sofort auf Eis gestellt. Erst anschließend werden die Proben für DNA-Isolierung und funktionelle Untersuchungen gesammelt. Proben für die PEITC-Bestimmung und die DNA-Isolierung werden bis zur Verwendung bei -74°C gelagert.

2.3.2 Probennahme bei Rhizotronversuchen

Bei Rhizotronversuchen werden die Wurzeln zur Probennahme vorsichtig von dem Boden abgehoben. Mit einem kleinen Spatel wird dann der Boden gesammelt, auf dem die Wurzeln gelegen haben.

2.4 Trockenmassenbestimmung

Das Pflanzenmaterial wird bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.5 Bodenfeuchtebestimmung

Die prozentuale Bodenfeuchte wird durch Wägung und Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C bestimmt. Im Folgenden wird die Bodenfeuchte in Gewichtsprozent angegeben.

2.6 PEITC-Konzentrationsbestimmung

Die PEITC-Konzentrationsbestimmung erfolgt gaschromatographisch. Zur PEITC-Isolierung aus dem Boden kommt die Methode von BROWN et al. (1991) in abgewandelter Form zum

Einsatz: 2 g Rhizosphärenboden werden in Glasszintillationsgefäße eingewogen, mit 1 ml 5 mmol l^{-1} CaCl_2 Lösung und 3 ml Chloroform versetzt und 2 h geschüttelt. Hierbei verbleiben die Proben bis zur Zugabe des Chloroforms auf Eis. Das Chloroform wird mit einer Glaspasteurpipette abgenommen, mit 2 ml $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ NaOH gewaschen und durch eine mit Baumwollwatte gefüllte Pasteurpipette in das GC-Probengefäß filtriert.

Die Analyse wird an einem Hewlett Packard 5890 mit einer DB-225 Säule und folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 100°C für 10 min, Heizrate $5^\circ\text{C}/\text{min}$ bis 200°C , 200°C für 5 min. Die Durchflussgeschwindigkeit des Trägergases Helium beträgt 8 ml min^{-1} . Die PEITC-Konzentration wird in pmol g^{-1} bezogen auf das Bodenfrischgewicht angegeben.

2.7 Analyse der funktionellen Diversität

2.7.1 BIOLOG[®]-ecoplates

Die funktionellen Diversität wird mit Hilfe von BIOLOG[®]-ecoplates untersucht. Dazu werden ca. 1 g Rhizosphärenboden in 10 ml NaCl-Puffer (0,85%, NaCl g/vol) gegeben, 1 min auf höchster Geschwindigkeit auf dem Vortex gemischt und auf 10^{-2} in NaCl-Puffer verdünnt. Davon wird $150 \mu\text{l}$ in jede Kaverne pipettiert. Die Platten werden 48 h bei 28°C kultiviert. Danach wird die Extinktion bei 595 nm in den einzelnen Kavernen der BIOLOG[®]-ecoplates mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Dynatech MR 5000) gemessen.

2.7.2 Mikrotiterplatten zur Untersuchung der PEITC-, PPN-, SCN-Empfindlichkeit

Unter sterilen Bedingungen wird in sterile Mikrotiterplatten in jede Kaverne $200 \mu\text{l}$ sterilfiltrierte Nährlösung pipettiert ($0,5\%$ (g/vol) Glucose, $10,9 \text{ mmol l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $3,4 \text{ mmol l}^{-1}$ KCl, $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ Triphenyltetrazoliumchlorid, pH 7 (KENNEDY, 1994)). Für den Blindwert wird eine Kaverne mit Nährlösung ohne Glucose verwendet. Die Nährlösung wird über Nacht in der reinen Werkbank eingetrocknet. Am Tag des Beimpfens werden die Kavernen mit wässriger PEITC, PPN bzw. SCN-Lösung beschickt. PEITC und PPN werden als reine Substanzen in Lösung gebracht, SCN als Natriumsalz. Bezogen auf $200 \mu\text{l}$ werden die Endkonzentrationen 10, 20, 40, 80, 160, 320 und $640 \mu\text{mol l}^{-1}$ eingestellt (Tab. 1).

Die Mikrotiterplatten werden wie unter 2.7.1 beschrieben beimpft. Die Platten werden 10 Tage bei 26°C im Kulturschrank kultiviert. Danach wird die Extinktion bei 595 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

Tabelle 1: PEITC-, PPN- und SCN Endkonzentrationen [$\mu\text{mol l}^{-1}$] bei 200 μl Kavernenfüllung auf Mikrotiterplatten zur Untersuchung der PEITC-, PPN-, SCN-Empfindlichkeit. Der Blindwert enthält nur die Minerallösung, aber keine Glucose, PEITC, PPN oder SCN.

Konzentration in [$\mu\text{mol l}^{-1}$]											
PEITC	PPN	SCN	PEITC	PPN	SCN	PEITC	PPN	SCN	PEITC	PPN	SCN
Blind	0	0	Blind	0	0	Blind	0	0	Blind	0	0
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320	320
640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640	640

2.8 Diversitätsanalysen auf DNA-Basis

2.8.1 DNA-Isolierung

Alle Arbeitsmaterialien werden vor der Verwendung autoklaviert. Die DNA wird nach BORNEMAN (1999, persönliche Mitteilung) isoliert: In ein 2 ml Probenröhrchen (BIOZYM) mit ca. 50 μl Glasperlen des Durchmessers 0,1-0,11 mm, drei bis fünf Glasperlen des Durchmessers 1,7-2,0 mm und einer Glasperle mit 3 mm Durchmesser werden ca. 500 mg Boden eingefüllt. Der Boden wird mit 845 μl 200 mmol l^{-1} Phosphatpuffer (pH 8) und 105 μl 10% (g/vol) Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Der Ansatz wird durch 45 s bei Geschwindigkeit 5,5 m s^{-1} im FastPrepTM Instrument (FP 120 BIO 101 SAVANT) homogenisiert. Anschließend werden die Proben 10 min bei 12000 Umdrehungen pro Minute (upm) zentrifugiert. Der Überstand wird mit 250 μl PPS-Puffer (BIO 101 Carlsbad, USA) versetzt, zehn mal umgeschüttelt und 5 min bei 12000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird mit 800 μl Glasmilch (BIO 101 Carlsbad, USA) gemischt und 5 min umgeschüttelt. Nach 45 s Zentrifugation bei 6000 upm wird der Überstand abgegossen und das Pellet zweimal mit 500 μl SEW-S (BIO 101 Carlsbad, USA) gewaschen. Das Pellet wird 10 min an der Luft getrocknet und mit 100 μl autoklaviertem Reinstwasser gründlich durchmischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 12000 upm werden 80 μl des Überstandes in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

2.8.2 Polymerasekettenreaktion

Um das mikrobielle Artenspektrum darzustellen, wird eine hochvariable, ca. 400 bp lange Region der ribosomalen 16 S, bzw. 18 S-DNA, die von zwei konservierten, für die jeweilig untersuchte Organismengruppe typischen Abschnitten flankiert ist, mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Primer (Tab. 2) setzen an den konservierten Abschnitten an (HEUER et al., 1997). Bei der Amplifikation von Proben, die auf einem DGGE-Gel aufgetragen werden sollen, wird an einen der Primer am 5'-Ende eine GC-

Klammer (Tab. 2) angehängt (MUYZER et al., 1993), um das vollständige Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen während der DGGE zu verhindern. Das Mischungsverhältnis des PCR-Mix ist bei allen untersuchten Organismengruppen gleich: 0,2 µl Taq Polymerase (Appligene Oncor), 2 µl dNTPs (2mmol l⁻¹ je Base), 2,5 µl 10x PCR-Puffer (Appligene Oncor), je 0,4 µl 0,5 mmol l⁻¹ des jeweiligen Primers, 2 µl DNA-Extrakt (1:10 verdünnt), 17,5 µl Reinstwasser. Der Erfolg der PCR wird durch Elektrophorese (20 min, 80 V) eines Aliquots von 5 µl auf einem 1,8 % Agarosegel mit SYBR[®]-green Färbung nachgewiesen. Zur Färbung werden die 5 µl Proben noch vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 3 µl SYBR[®]-greenhaltigen Ladepuffer (2,5 mg Xylencyanol und 1 µl SYBR[®]-green in 1 ml H₂O und 3 ml 99% Glycerol) versetzt.

Zur Amplifikation des 16S rDNA- Abschnittes von Bodenbakterien wird das Primerpaar F984GC, R1378 (HEUER et al., 1997) benutzt. Mit dem Primerpaar NS1-GC und NS2 (Tab. 1) wird ein 555 bp langer DNA-Abschnitt der 18 S rDNA von einer breiten Varietät Eukaryota, (Pilze, Protozoa, Algen) (WHITE et al., 1990) amplifiziert (Tab. 3).

Zur Amplifizierung der DNA von Aktinomyceten wird das Prinzip der nested-PCR genutzt. Im ersten Schritt wird spezifisch die DNA der gewünschten Gruppe angereichert. Im zweiten Schritt wird ein kürzerer Abschnitt aus der 1:500 Verdünnung der Produkte der ersten PCR noch einmal amplifiziert und mit einer GC-Klammer versehen. Hierbei kommen die Primerpaare F243, R1378 und F984GC, R1378 (HEUER et al., 1997) zum Einsatz. Für die erste PCR ist ein für Aktinomyceten spezifisches Programm genutzt (Tab. 3). Der zweite Schritt ist identisch mit dem zur Vermehrung bakterieller DNA benutzten (Tab. 3).

Tabelle 2: Sequenz, Zielorganismen und Literaturquelle der zur Darstellung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora verwendeten Primer.

Primer	Zielorganismus	Sequenz	Literatur
F984	Bakterien	AACGCGAAGAACCTTAC	HEUER et al. 1997
R1378	Bakterien Aktinomyceten	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	HEUER et al. 1997
F243	Aktinomyceten	GGATGAGCCCGCGGCCTA	HEUER et al. 1997
NS1	Eukaryota	GTAGTCATATGCTTGTC	WHITE et al. 1990
NS2	Eukaryota	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	WHITE et al. 1990
GC-Klammer	Bakterien Aktinomyceten Ascomyceten	CGCCCGGGCGCGCGCCCGGGCGG GGCGGG GGCACGGGGGC	MUYZER et al. 1993
GC-Klammer	Eukaryota	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCG GGGGCACCGGCC	SCHLOTTER 2000 (Persönliche Mitteilung)

Tabelle 3: Zur Darstellung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora verwendete PCR-Zyklen mit Literaturquelle.

Zielorganismus	Primer	Zyklus	Literatur
Bakterien, Aktinomyceten II	F984GC und R1378	94°C 5 min 35 x (94°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min) 72°C 10 min 10°C ∞	HEUER et al. 1997
Aktinomyceten I	F243 und R1378	94°C 5 min 34 x (94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 2 min) 72°C 10 min 10°C ∞	HEUER et al. 1997
Eukaryota	NS1GC und NS2	94°C 5 min 80°C 10 min 35 x(94°C 30 s, 45°C 45 s, 72°C 90 s)) 72°C 10 min 10°C ∞	MARSCHNER 2000 (persönliche Mitteilung)

2.8.3 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese

Dreiundzwanzig µl eines PCR-Produktes werden mit 8 µl Ladebuffer (7 ml 99% Glycerin, 2,5 ml H₂O und je 250 µl 2% (g/vol) Bromphenolblau und Xylencyanol) auf einem 8% Acryl-Bisacrylamidgel mit einem denaturierenden Harnstoff-Formamidgradienten aufgetragen und bei 60°C und 150 V über 5 h elektrophoretisch aufgetrennt (BIO-RAD Dcode™ systems) (HEUER et al., 1997).

Der denaturierende Gradient wird mit Hilfe eines Gelgießstandes (BIO RAD®) erzeugt. Mit diesem wird ein Gradient aus zweimal 17 ml flüssiges 8% Acrylbisacrylamid (37,5:1) unterschiedlichen Harnstoff-Formamid Anteils mit je 150 µl 10% (g/vol) Ammoniumpersulfat und je 15 µl Tetramethylethylendiamin aufgebaut. Dabei erwies sich ein Gradient von 35-55% denaturierender Substanz als geeignet, um die bakterielle und eukaryotischen Gemeinschaften im Boden darzustellen. Als 100% denaturierende Substanz gilt hierbei 40% (vol/vol) Formamid und 42% Harnstoff (g/vol). Für die Darstellung der Aktinomyceten wird ein Gradient von 40-55% genutzt. Der Elektrophoresebuffer (TAE) besteht aus 33,88 g Tris base, 7,99 ml Eisessig, 14 ml 0,5 mol l⁻¹ EDTA (pH 8,0) auf 7 l deionisiertem Wasser.

Auf jedes DGGE-Gel können 20 Proben aufgetragen werden. Um die Proben verschiedener Gele miteinander vergleichen zu können, wird auf jedes Gel die DNA eines Standard-

Bakteriengemisches aufgetragen. Die Positionen der einzelnen Banden der Proben werden dann relativ zu zwei Banden des Standardgemisches ausgedrückt.

2.8.4 Färben und Detektieren der Banden

Das Gel wird nach der Elektrophorese mit SYBR[®]-Green (FMC Bio Products, 100000x konzentriert in Dimethylsulfoxid) (2 µl auf 10 ml TAE) angefärbt. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wird das Gel auf dem UV-Transilluminator (VILBER LOURMAT, Marne-La-Valle, Frankreich) bei 265 nm digital fotografiert (BIOPRINT Fotodokumentation, Version 96.07). Das Bandenmuster wird mit Imagemaster 1D Prime v 300 (PharmaciaBiotech, New Jersey, USA) digitalisiert.

2.9 Darstellung der aktiven Mikroflora

Um den im Zeitraum der letzten zwei Tage vor der Probennahme aktiven Anteil der Rhizosphärenmikroflora zu erfassen, wird mit einem Pinsel auf die bewurzelte Oberfläche eines Rhizotrons 48 h vor der Probennahme 10 ml 5 mmol l⁻¹ Bromdeoxyuridin (BrdU) gleichmäßig aufgetragen; das entspricht 111 ng cm⁻² BrdU auf der Rhizotronoberfläche. BrdU wird als Thymidinanalogon von aktiven Mikroorganismen in die DNA eingebaut.

Nach Probennahme und DNA-Isolierung wie unter 2.3.2 und 2.8.1 beschrieben, wird die DNA, die BrdU enthält, also in den letzten 48 h vor der Probennahme synthetisiert worden ist, mit Hilfe spezifischer Antikörper isoliert. Dazu werden pro Probe 12,5 µl an magnetische Kugeln gebundene Schaf-Antimausantikörper (4*10⁸ Magnetkugeln pro ml, Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Norwegen) dreimal mit je 100 µl mit PBS/BSA-Puffer (0,1% (g/vol) Rinderserumalbumin in Phosphatsalinpuffer, pH 7,3, mit 137 mmol l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol l⁻¹ KCl, 4,3 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄ x 7 H₂O und 1,4 mmol l⁻¹ KH₂PO₄) gewaschen. Die gewaschenen Antikörper werden mit 44 µl Heringssperma DNA (5 mg ml⁻¹ in PBS/BSA gelöst) und 6 µl monoklonaler Maus-Antibromdeoxyuridin (Klon BMC 9318, Böhringer Mannheim) 1 h bei Raumtemperatur rotiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/BSA-Puffer werden die Antikörper mit 100 µl der Heringssperma DNA-Lösung und 25 µl denaturiertem DNA-Extrakt aus der Bodenprobe kurz zentrifugiert und dann bei Raumtemperatur 2 h rotiert. Hierzu wird die DNA durch 5 min Aufschmelzen bei 95°C und 5 min auf Eis denaturiert. Nach viermaligem Waschen mit je 100 µl PBS/BSA Puffer wird die Probe mit 20 µl autoklaviertem Reinstwassers versetzt. Die Proben werden 5 min bei 95°C denaturiert und nach 5 min Abkühlen auf Eis zentrifugiert. Die mit BrdU markierte DNA befindet sich jetzt im Überstand und kann, nachdem sie in ein frisches Eppendorfgefäß überführt worden ist, unverdünnt zur PCR verwendet werden.

2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Bestimmung von Pflanzenmasse, Bodenfeuchte und PEITC-Gehalt werden mit einer einfachen Varianzanalyse oder dem U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY untersucht (SACHS, 1997). Diese Größen sind im Text immer als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Um Zusammenhänge zwischen den bestimmten Größen festzustellen, wird die lineare Korrelation bestimmt (SACHS, 1997). Als Signifikanzschranke werden 95% Wahrscheinlichkeit angenommen.

Die Bandenmuster der DGGE-Gele und die Substratnutzungsmuster aus den BIOLOG[®]-ecoplates werden entweder mit der Hauptkomponentenanalyse (PCA) für sich genommen analysiert oder mit Hilfe der Redundanzanalyse (RDA) auf die untersuchten bzw. vorgegebenen Umweltparameter bezogen. Zu diesen Analysen diente das Programm Canoco for Windows 4 (Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA). Zur besseren Vergleichbarkeit der DGGE-Gele untereinander wird die Peak-Intensität der Einzelbanden in % des Mittelwertes der Intensität aller Banden dieses Gels ausgedrückt. Hierdurch sollen Unterschiede in der Färbung ausgeglichen werden. Die Daten aus den BIOLOG[®]-ecoplates werden als Extinktion pro g Einwaage behandelt. Gelegentlich, dies wird stets ausdrücklich erwähnt, werden die prozentualen Peak-Intensitäten, bzw. Extinktionen logarithmisch transformiert, d.h. statt einer Peakintensität geht ihr Logarithmus zur Basis 10 in die Rechnung ein. (Da ein Logarithmus von 0 nicht existiert, wird zu allen prozentualen Peak-Intensitäten, bzw. Extinktionen vor der Transformation 1 addiert (TER BRAAK und ŠMILAUER, 1998).) Eine logarithmische Transformation hebt die Bedeutung von Banden mit geringeren Peak-Intensitäten bzw. Substraten mit geringen Extinktionen gegenüber denen mit stärkeren Peak-Intensitäten bzw. höheren Extinktionen an (TER BRAAK und ŠMILAUER, 1998). So können Effekte sichtbar werden, die sonst von der Anwesenheit einiger starker Banden bzw. von einigen besonders stark genutzten Substraten überdeckt werden. Ansonsten werden die Daten keiner weiteren Transformation unterzogen. Da die Analyse der Daten mit Hilfe der RDA zu wichtigen Aussagen dieser Arbeit führt, sollen in den folgenden beiden Absätzen einige Hilfestellungen zum Verständnis der Darstellung der Ergebnisse in Text, Tabellen und Abbildungen gegeben werden.

Bei der RDA werden die Muster der Peak-Intensitäten bzw. der Extinktionen mit Umweltparametern wie z.B. Bodenfeuchte oder Wochen nach der Aussaat verrechnet (TER BRAAK und ŠMILAUER, 1998). Hierbei wird bestimmt, welcher Prozentsatz der Varianz der Bandenmuster zwischen den einzelnen Proben mit der Kombination der Umweltparametern korrelieren, die zu den jeweiligen Proben gehören. Wenn die Unterschiede der Bandenmuster mit denen der Umweltparameter korrelieren, weist dieses auf einen Zusammenhang zwischen der Artenzusammensetzung an einem Standort und den dort herrschenden Umweltbedingungen hin. Daher wird von einer ‚Erklärung‘ der Unterschiede gesprochen. Der

Anteil an Unterschieden der durch DGGE oder Substratnutzung dargestellten Artenzusammensetzung, der sich mit der Gesamtheit der beobachteten Umweltfaktoren in Verbindung bringen lässt, wird in Prozent angegeben und in den Tabellen mit ‚alle geprüften Umweltfaktoren‘ überschrieben. Nicht nur die Kombination der Umweltfaktoren, sondern auch die einzelnen Umweltfaktoren lassen sich mit den DGGE-Bandenmustern oder dem Substratnutzungsmuster verrechnen. Bestimmt wird dann der Anteil der Unterschiede der Artenzusammensetzung, der mit den Unterschieden dieses einen Umweltparameters korreliert, also von diesem Umweltfaktor ‚erklärt‘ wird. Die Summe der Anteile der Unterschiede, die von den einzelnen Umweltparametern erklärt werden, kann den Anteil der Erklärung der Kombination aller Umweltparametern übersteigen, wenn einige der Umweltfaktoren miteinander korrelieren.

In den Plots beider Ordinationsmethoden sind Proben als Punkte, Banden und Umweltparameter als Vektoren ausgedrückt. Die zweidimensionale Abbildung eines komplexen Systems erfordert notwendigerweise Vereinfachungen. Daher können in den Ordinationsplots immer nur ein Teil der beobachteten Unterschiede berücksichtigt werden. Auf der x-Achse werden die Unterschiede dargestellt, die die weiteste Trennung der verglichenen Proben voneinander ermöglicht. Der Prozentsatz der beobachteten Unterschiede, der in die auf der x-Achse dargestellte Trennung eingeht, wird mit ‚% Unterschiedserklärung‘ angegeben (bzw. als prozentualer Varianzerklärung bezeichnet). In die Auftrennung der Proben entlang der y-Achse gehen Unterschiede ein, die mit den auf der x-Achse dargestellten Unterschieden nicht korreliert sind und die nächst weiteste Trennung der Proben voneinander ermöglichen. Proben, die sich in den für die beiden Achsen entscheidenden Merkmalen ähneln, werden als nahe beieinander liegende Punkte im Ordinationsplot dargestellt. Anhand der ‚% Unterschiedserklärung‘ lässt sich die Bedeutung des Abstandes zwischen den Punkten ansehen. Bei einer geringen ‚% Unterschiedserklärung‘ der Achse ist dem Abstand zwischen einzelnen Punkten eine geringere Bedeutung zuzumessen, als demselben Abstand bei einer höheren. Die Abstände entlang der x-Achse sind daher immer bezeichnender als die entlang der y-Achse. Die Beziehung zweier Vektoren lässt sich anhand des Kosinus ihres gemeinsamen Winkels erkennen, der dem Regressionskoeffizienten entspricht. Die Länge der Vektoren zeigt die Bedeutung der Bande oder des Umweltparameters für die Unterscheidung der Standorte. Das Lot, das von einem Punkt auf einen Vektor gefällt wird, zeigt die Intensität der Bande bzw. die Größe des Umweltfaktors für die entsprechende Probe. Dabei ist die Intensität der Bande bzw. die Größe des Umweltfaktors um so höher, je näher das Lot an der Spitze des Vektoren gefällt wird (TER BRAAK und ŠMILAUER, 1998).

Canoco for Windows 4 verwendet den Monte Carlo Permutationstest um bei der Redundanzanalyse die Bedeutung der einzelnen Umweltfaktoren für die Erklärung der Bandenmuster, sowie deren Signifikanz anzugeben (TER BRAAK und ŠMILAUER, 1998). Die

Varianzerklärung durch die Umweltparameter ist oft gering, jedoch auch Ordinationen mit relativ geringer prozentualer Varianzerklärung bleiben informativ (GAUCH,1992, zitiert nach TER BRAAK, 1996). Vor allem ist bei großen Probenaufkommen zu bedenken, dass das System mit jeder Probe, die zusätzlich in die Analyse einbezogen wird, komplexer wird. Dadurch kann eine Vereinfachung des Systems auf eine zweidimensionale Abbildung nur noch einen geringen Anteil der Gesamtvarianz erfassen. Bei Versuchen, bei denen die Proben auf verschiedenen DGGE-Gelen verteilt werden müssen, kommt ein Artefakt hinzu, das die prozentuale Varianzerklärung erheblich senkt. Die Gele mit dem Harnstoff-Formamidgradienten werden von Hand gegossen und variieren leicht. Auch die Färbung der Gele mit Sybr[®]-green ist von Gel zu Gel etwas unterschiedlich. Zwischen den Bandenmustern der verschiedenen Gele treten daher immer Unterschiede auf. Durch diese methodisch bedingten Unterschiede wird die prozentuale Varianzerklärung durch die Umweltdaten zusätzlich gesenkt. Daraus ergibt sich, dass eine schon Varianzerklärung durch einen Umweltfaktor von 10% beim Vergleich zweier oder mehr Gele als sehr hoch anzusehen ist.

3. Experimente

3.1 PEITC im Boden: Abbau und Wirkung auf Mikroorganismen

Die folgenden drei Versuche dienen dazu, unter kontrollierten Bedingungen die Wechselwirkung von PEITC und Bodenmikroflora zu studieren.

3.1.1 Abbau von PEITC im Boden

Um den Abbau von PEITC im Boden und die Rolle der Mikroorganismen bei diesem Abbau zu untersuchen, wird die Abnahme von PEITC in sterilisiertem und unsterilem Boden verglichen. Hierzu wird trockener Versuchsfeldboden mit sterilfiltrierter wässriger PEITC-Lösung auf 20% Bodenfeuchte und eine PEITC-Ausgangskonzentration von 3382 pmol g^{-1} gebracht. Verglichen wird hierbei luftgetrockneter Boden mit durch zweimaliges Autoklavieren (25 min, 120°C) sterilisiertem, bei 50°C im Trockenschrank getrocknetem Boden. Die Befeuchtung aller Proben erfolgt in der reinen Werkbank. Die mit der PEITC-Lösung befeuchteten Proben werden bis zur Bestimmung der PEITC-Konzentration auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gemischt. Nach 1, 3, 5, 20, 27, 44, 51, 69, 76 und 91 h wird für je drei Parallelen pro Ansatz die PEITC-Konzentration bestimmt.

3.1.2 Veränderung der Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegenüber PEITC, PPN und SCN^- in Abhängigkeit von der Vorbehandlung

Mit Hilfe von Mikrotiterplatten, in denen in steigenden Konzentrationen PEITC, PPN und SCN^- der Nährlösung zugesetzt werden, soll die Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegenüber diesen Substanzen untersucht werden. Parallel soll getestet werden, ob die Behandlung des Bodens mit PEITC, PPN bzw. SCN^- die Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegen diese Stoffe verändert. Daher wird der Boden mit vergleichsweise hohen Konzentrationen vorbehandelt.

Luftgetrockneter Versuchsfeldboden (10 g) wird mit 1 ml wässriger $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ PEITC-, PPN- oder SCN^- -Lösung wiederbefeuchtet, das entspricht einer Konzentration im Boden von $20000 \text{ pmol g}^{-1}$. Als Kontrolle werden 10 g Boden mit 1 ml deionisiertem Wasser behandelt. Nach drei Tagen werden die Bodenproben noch einmal mit 1 ml der entsprechenden Lösung versetzt. Nach fünf Tagen werden Proben zur Darstellung der bakteriellen und eukaryotischen Diversität mit der DGGE und zur Untersuchung der Empfindlichkeit gegen PEITC, PPN und SCN^- auf Mikrotiterplatten genommen. Pro Ansatz werden je drei Parallelen untersucht.

3.1.3 Wirkung von PEITC auf Bodenmikroorganismen

Diesem Versuch liegt die Fragestellung zu Grunde, ob eine konstant gehaltene PEITC-Konzentrationen im Boden im pmol g^{-1} bis nmol g^{-1} Bereich zu einer mit der DGGE darstellbaren Veränderung der Bodenmikroflora führen kann. PEITC wird in reinem Ethanol

gelöst (6616 nmol l^{-1}). Feuchter Versuchsfeldboden (Bodenfeuchte 10,6 %) in Kunststoffszintillationsgefäßen wird täglich mit der alkoholischen PEITC-Lösung beträufelt und durch kräftiges Schütteln des Gefäßes durchmischt. In je drei Parallelen werden täglich 10 g Boden mit 6, 2 oder 0,5 µl PEITC-Lösung versetzt. Das entspricht, eine vollständige Durchmischung vorausgesetzt, einer PEITC-Konzentration von 3970, 1323 oder 331 pmol g⁻¹. Als Kontrollen werden zwei Parallelen täglich mit 10 µl Ethanol versetzt und zwei weitere mit täglich 10 µl deionisiertem, autoklaviertem Wasser. Nach fünf Tagen werden Proben genommen, die DNA isoliert und die Artenzusammensetzung von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota mit DGGE untersucht.

3.2 Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit

In den unter 3.2 zusammengefassten Versuchen sollen mit Feldversuchen die zeitlichen Veränderungen in der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und in der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora von der Keimung bis zur Reife untersucht werden. Diese Untersuchungen werden sowohl an Winter- als auch an Sommerraps durchgeführt, da der Unterschied zwischen Zwei- und Einjährigkeit auch Unterschiede in der PEITC-Abgabe der Pflanzen und der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora erwarten lassen. Die Anbaubedingungen für alle Feldversuche sind unter 2.2.1 zusammengefasst.

3.2.1 Feldversuche mit Winterraps

3.2.1.1 Winterrapsfeldversuch 1999/2000

Die Winterrapsorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ wurden am 1.9.2000 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. Am 14.9.1999, 14.10.1999, 14.3.2000, 5.4.2000, 26.4.2000, 3.5.2000, 23.5.2000 und am 8.6.2000 wurden von jeder Sorte je 4 Pflanzen zufällig ausgewählt und beprobt. Bei jeder Probennahme wurde eine Blindprobe aus dem unbewachsenen Feldstreifen zwischen den mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ besäten Parzellen genommen. Bestimmt wurden die Bodenfeuchte, die Trockenmasse der Pflanzen, die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre. Das Artenspektrum von Bakterien und Eukaryota wurde mit der DGGE dargestellt. Zusätzlich wurde ab dem 14.3.2000 die physiologische Diversität mit Hilfe der BIOLOG[®]-Ecoplates untersucht.

3.2.1.2 Winterrapsfeldversuch 2000/2001

Die Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ wurden am 28.8.2000 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. Am 2.10.2000, 20.10.2000, 15.11.2000 und 11.12.2000 wurden von ‚Mohikan‘ je 4 Pflanzen zufällig ausgewählt und beprobt. Da ‚Emerald‘ im Herbst 2000 sehr langsam und unregelmäßig aufblühte, wurden erst ab dem Winterende 2001 auch von ‚Emerald‘ Proben genommen. Am 13.3.2001, 4.4.2001, 24.4.2001, 15.5.2001, 15.6.2001 und am 20.7.2001 wurden von beiden Sorten je vier Proben genommen. Bei jeder Probennahme

wurde eine Blindprobe aus dem unbewachsenen Feldstreifen zwischen den mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ besäten Parzellen genommen. Bestimmt wurden die Bodenfeuchte, die Trockenmasse der Pflanzen, die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre. Das Artenspektrum von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota wurde mit der DGGE dargestellt.

3.2.2 Feld- und Gewächshausversuche mit Sommerraps

3.2.2.1 Sommerrapsfeldversuch 2000

Die Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ wurden am 3.4.2000 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. Der Sommerraps erhielt Ende Mai eine zusätzliche Düngergabe von in $[g\ m^{-2}]$ 27 $(NH_4)_2SO_4$, 2,4 P_2O_5 , 2,89 K_2O , 0,4 MgO und 1,2 SO_4^{2-} , da die Pflanzen wegen starken Schädlingsbefalls sehr schlecht wuchsen. Am 23.5.2000, 8.6.2000, 4.7.2000 und 1.8.2000 wurden von beiden Sorten je vier zufällig ausgewählte Proben genommen. Bei jeder Probennahme wurde eine Blindprobe aus dem unbewachsenen Feldstreifen zwischen den mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ besäten Parzellen genommen. Bestimmt wurden die Bodenfeuchte, die Trockenmasse der Pflanzen, die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre. Das Artenspektrum von Bakterien und Eukaryota wurde mit der DGGE und die physiologische Diversität mit Hilfe der BIOLOG[®]-Ecoplates dargestellt

3.2.2.2 Sommerrapsfeldversuch 2001

Aussaattermin für die Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg war der 4.4.2001. Am 15.5.2001, 15.6.2001, 20.7.2001 und 7.8.2001 wurden von jeder Sorte vier zufällig ausgewählte Parallelen beprobt. Bei jeder Probennahme wurde eine Blindprobe aus dem unbewachsenen Feldstreifen zwischen den mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ besäten Parzellen genommen. Untersucht wurden die Bodenfeuchte, die Trockenmasse der Pflanzen, die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre. Das Artenspektrum von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota wurde mit Hilfe der DGGE dargestellt.

3.2.2.3 Gewächshausversuch

Da bei den Sommerrapsfeldversuchen nur eine Probennahme vor der Blüte stattfand, sollte in einem zusätzlichen Versuch im Gewächshaus die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von der Keimung bis zur Blüte bei Sommerraps am Beispiel der Sorte ‚Rainbow‘ dargestellt werden.

Am 5.3.2001 wurden je 5 Samen der Sorte ‚Rainbow‘ pro Topf auf Versuchsfeldboden ausgesät. Die Töpfe wurden vor dem Keimen einmal mit Düngerlösung ($4\ g\ l^{-1}$ Hakaphos) gegossen. Nach dem Keimen wurde auf 1 Pflanze pro Topf vereinzelt. Am 14.3.2001, 20.3.2001, 23.3.2001, 26.3.2001, 29.3.2001, 3.4.2001, 5.4.2001, 9.4.2001, 17.4.2001, 20.4.2001, 23.4.2001, 2.5.2001 und 11.5.2001 wurden je vier Parallelproben eines einheitlichen Entwicklungsstadiums genommen. Die Proben wurden auf Sprosstrockenmasse und PEITC-Konzentration der Rhizosphäre hin untersucht.

3.3 Räumliche Unterschiede der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Mikroflora in der Rhizosphäre

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchsansätzen soll Variabilität in der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora innerhalb des Wurzelsystems einer Pflanze zu einem Zeitpunkt untersucht werden. Hierzu werden zwei praktisch leicht zu unterscheidende Wurzeltypen definiert. Außerdem soll die aktiv wachsende Rhizosphärenmikroflora untersucht und von der Gesamtmikroflora abgesetzt werden. Die Untersuchungen werden an den bereits in den Versuchen 3.2 auf die zeitliche Entwicklung von PEITC-Konzentration und Rhizosphärenmikroflora-Zusammensetzung hin betrachteten Winter- und Sommerrapsorten durchgeführt.

Die PEITC-Konzentration wird in der Rhizosphäre zweier unterschiedlicher Wurzeltypen in Rhizotronen (siehe 2.2.2) untersucht. Als Seitenwurzeln 1.Ordnung werden Wurzeln mit überwiegend vertikaler Wachstumsrichtung und einem Durchmesser > 1 mm definiert. Als Seitenwurzeln 2.Ordnung werden die von den Seitenwurzeln 1.Ordnung abzweigenden Wurzeln angesprochen, die durch überwiegend horizontale Wachstumsrichtung und einen Durchmesser $\bullet 1$ mm ausgezeichnet sind. Es wird die Diversität der gesamten und der aktiven bakteriellen und eukaryotischen Mikroflora mit der DGGE sowie physiologische Diversität mit BIOLOG[®]-Ecoplates (siehe 2.9) untersucht. Außerdem wird die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Seitenwurzeln 1.Ordnung und 2. Ordnung und dem wurzelfernen Boden bestimmt. Bodenfeuchte und Spross- und Wurzeltrockenmasse wird jeweils einmal pro Rhizotron bestimmt.

3.3.1 Rhizotronversuch mit Winterraps

Je zwei Pflanzen der Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ werden im Dreiblattstadium in die Rhizotrone überführt. Die Pflanzen werden 21 Tage im Gewächshaus kultiviert. Pro Sorte und Wurzelzone (Seitenwurzeln 1.Ordnung, Seitenwurzeln 2.Ordnung und wurzelferner Boden) werden drei Parallelen mit BIOLOG[®]-Ecoplates und auf die PEITC-Konzentration hin untersucht und sechs Parallelen mit der DGGE. Die Bodenfeuchte wird nur einmal für jedes Rhizotron bestimmt.

3.3.2 Rhizotronversuch mit Sommerraps

Je zwei Jungpflanzen im Dreiblattstadium der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden in die Rhizotrone überführt. Die Pflanzen werden für 21 Tage im Gewächshaus kultiviert. Pro Sorte und Wurzelzone (Seitenwurzeln 1.Ordnung, Seitenwurzeln 2.Ordnung und wurzelferner Boden) werden drei Parallelen mit BIOLOG[®]-Ecoplates und auf die PEITC-Konzentration hin untersucht und sechs Parallelen mit der DGGE. Die Bodenfeuchte wird nur einmal für jedes Rhizotron bestimmt.

3.4. Langfristige Auswirkung des durch PEITC vermittelten Einflusses der Rapswurzel auf die Bodenmikroflora

In den als ‚Folgeversuche‘ bezeichneten Versuchen soll untersucht werden, in wie weit der Einfluss, den Rapswurzeln einer Vorkultur während des Wachstums und während der anschließenden Zersetzung im Boden auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroorganismen genommen haben, auch noch in der Rhizosphäre einer Folgekultur zu erkennen ist.

3.4.1 Folgeversuch A

3.4.1.1 Vorkultur A

Die australischen Sommerrapssorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden in je sechs Parallelen in 1 l Töpfe Versuchsfeldboden ausgesät und 32 Tage im Gewächshaus kultiviert. Acht Tage nach der Aussaat werden die Sämlinge auf vier Individuen pro Topf vereinzelt. Nach der Probennahme verbleiben die Wurzeln der Pflanzen für einen weiteren, unter 3.4.1.2 beschriebenen Versuch, im Substrat. Untersucht werden Sprosstrockenmasse, Bodenfeuchte, PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, Diversität der pro- und eukaryotischer Mikroflora mit Hilfe der DGGE und die funktionelle Diversität mit BIOLOG[®]-Ecoplates. Als Kontrolle dient ein unbepflanzter Topf.

3.4.1.2 Folgekultur A

Im Anschluss an den unter 3.4.1.1 beschriebenen Versuch werden Rapssamen der Sommerrapssorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in die selben Töpfe, die noch die Wurzeln aus dem vorherigen Versuch enthalten, ausgesät. Dabei werden drei Töpfe, in denen zuvor ‚Monty‘ gewachsen ist, mit ‚Monty‘ und drei mit ‚Rainbow‘ besät (Versuchsplan siehe Tab. 4). Für das ehemals mit ‚Rainbow‘ bewachsene Substrat gilt dasselbe. Die Sorte, die im vorhergehenden Versuch im betreffenden Substrat gewachsen ist, wird im Folgenden als Vorkultur bezeichnet. Die Kontrolle aus vorherigen Versuch 3.4.1.1 wird als Kontrolle beibehalten. Die Keimlinge werden eine Woche nach der Aussaat auf vier Keimlinge pro Topf vereinzelt. 35 Tage nach der Aussaat werden die Ansätze beprobt, dabei wird die Sprosstrockenmasse der Pflanzen, die Bodenfeuchte und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bestimmt. Die Diversität der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora wird mit Hilfe der DGGE und die funktionelle Diversität mit BIOLOG[®]-Ecoplates untersucht.

Tabelle 4: Anzahl der Parallelen pro Behandlungsvariante im Versuch 3.4.1.2. Erklärung siehe Text.

Vorkultur	Folgekultur	
	‚Monty‘	‚Rainbow‘
‚Monty‘	3	3
‚Rainbow‘	3	3

3.4.2 Folgeversuch B

In dem zweiten Folgeversuch soll der Einfluss, den die Wurzeln der Vorkultur während des Wachstums auf die Rhizosphärenmikroorganismen ausgeübt haben, von dem der sich langsam im Boden zersetzenden Wurzeln abgesetzt werden. Außerdem soll überprüft werden, ob der Effekt einer Vorkultur sich durch eine einmalige PEITC-Gabe simulieren lässt.

3.4.2.1 Vorkultur B

Vierundfünfzig Kunststofftöpfe (1 l) werden mit Versuchsfeldboden gefüllt und im Kulturschrank aufgestellt. Von diesen Töpfen werden je 18 mit Saatgut der Sommerrapsorten ‚Monty‘ oder ‚Rainbow‘ besät. Die übrigen 18 Töpfen bleiben unbesät. Nach der Keimung wird auf 4 Pflanzen pro Topf vereinzelt. Sämtliche Töpfe werden gleichmäßig feucht gehalten. Das Klimaprogramm ist auf 8 h Dunkelheit bei 16°C und 16 h Licht ($450 \mu\text{E m}^{-1}\text{s}^{-1}$) bei 22°C eingestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit schwankt zwischen 90 und 100%.

Einundvierzig Tage nach der Aussaat wird geerntet. Dabei werden aus jeweils neun Parallelen jeder Sorte die Wurzeln aus dem Substrat entfernt. Bei den anderen neun Parallelen verbleiben die Wurzeln nach der Probennahme im Substrat. Eine der unbepflanzten Parallelen dient als Blindprobe. Bei sämtlichen beprobten Ansätzen werden Bodenfeuchte, Sprosstrockenmasse und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bestimmt. Zudem wird die mit der DGGE detektierbaren Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora untersucht. Zusätzlich wird für neun Parallelen jeder Sorte die Wurzeltrockenmasse bestimmt.

3.4.2.2 Folgekultur B

Direkt nach der Probennahme werden die Kulturgefäße aus der Vorkultur 3.4.2.1 je vier vorgekeimten Keimlingen der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ eingesetzt. Die nicht beprobten, vorher unbepflanzten Töpfe werden vor dem Bepflanzen einmal ausgeschüttet und wieder gefüllt, um eine Bodendurchmischung wie in den vorher bepflanzten und beprobten Töpfen zu gewährleisten (Tab. 3.3.2.1.). Um Nährstoffverbrauch der Vorkultur auszugleichen, erhält jeder Topf eine einmalige Düngergabe von 100 ml 0,3 % (g/vol) Hakaphos. Neun der bisher unbepflanzten Töpfe erhalten außerdem einmalig 10 ml $4,83 \text{ mmol l}^{-1}$ wässrige PEITC-Lösung. Die PEITC-Lösung ist mit dem Dünger gemischt und wird nur von oben appliziert. Von jeder der Substratbehandlungsvarianten (Vorkultur ‚Monty‘ oder ‚Rainbow‘ mit oder ohne im Boden verbliebenen Wurzeln, unbepflanztes Substrat mit einmaliger PEITC-Zugabe und unbepflanztes, lediglich mit Dünger bereichertes Substrat) werden je vier Parallelen mit ‚Monty‘ Keimlingen und vier mit ‚Rainbow‘ Keimlingen bepflanzt. Zusätzlich verbleiben von jeder Behandlungsvariante ein Topf als unbehandelte Kontrolle (Tab. 5). Die Pflanzen werden 21 Tage unter den in Versuch 3.4.2.1. beschriebenen Bedingungen im Klimaschrank kultiviert.

Von allen Varianten werden die Bodenfeuchte, das Trockengewicht des Sprosses und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und die mit DGGE detektierbare Artenzusammensetzung der Eukaryota, Bakterien und Aktinomyceten bestimmt.

Tabelle 5: Anzahl der Parallelen pro Behandlungsvariante im Versuch 3.4.2.2. Erklärung siehe Text.

Eingesetzte Keimlinge	Vorbehandlung des Bodens					
	Vorkultur ‚Monty‘		Vorkultur ‚Rainbow‘		unbepflanzt	
	Wurzeln im Boden belassen	Wurzeln entfernt	Wurzeln im Boden belassen	Wurzeln entfernt	+ 10 ml 4,83 mmol l ⁻¹ PEITC	unbehandelt
‚Monty‘	4	4	4	4	4	4
‚Rainbow‘	4	4	4	4	4	4
Kontrolle	1	1	1	1	1	1

4. Ergebnisse

4.1 PEITC im Boden: Abbau und Wirkung auf Mikroorganismen

In den folgenden Versuchen soll der Abbau von PEITC im Boden durch Mikroorganismen und die Wirkung von PEITC auf die Bodenmikroflora unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden.

4.1.1 Abbau von PEITC im Boden

In diesem Versuch sollte untersucht werden, wie gut sich PEITC mit der verwendeten Methode aus dem Boden extrahieren lässt und welche Bedeutung Mikroorganismen für den Abbau von PEITC im Boden haben.

Sterilisierter und unsteriler trockener Versuchsfeldboden werden mit sterilfiltrierter, wässriger PEITC-Lösung auf 3382 pmol g^{-1} PEITC-Konzentration gebracht. Über vier Tage wird die Veränderung der PEITC-Konzentration im Boden beobachtet. Der Versuchsansatz ist unter 3.1.1 beschrieben.

Aus sterilisierten, wie aus unsterilen Ansätzen lassen sich nach 1 h nur 51% des zugegebenen PEITCs isolieren. Unklar ist hierbei, ob das nicht extrahierte PEITC fest an die Bodenmatrix gebunden wurde oder die Extraktionsmethode keine höheren Ausbeuten ermöglichte.

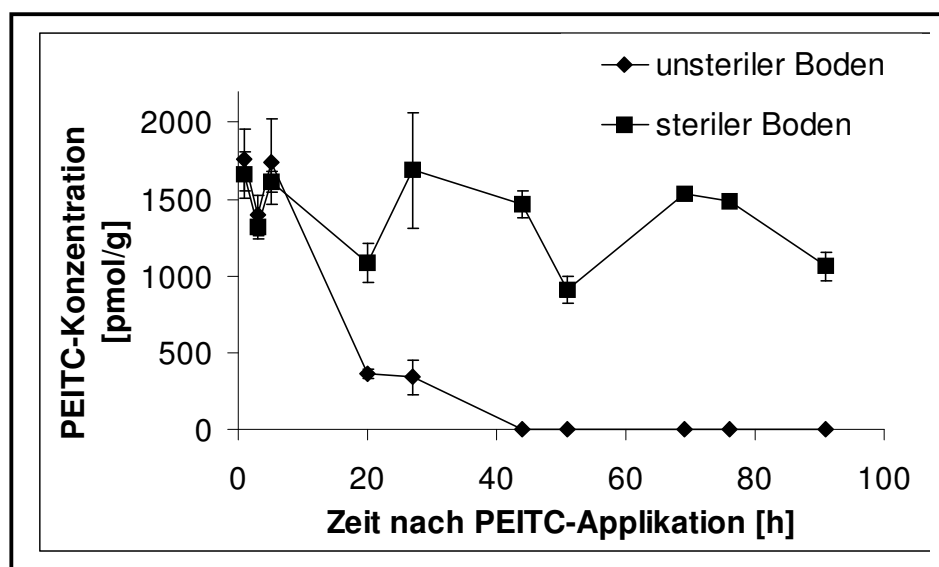


Abbildung 2: Abnahme der PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}] gegen die Zeit [h] in sterilem und unsterilem Boden. Mittelwerte aus drei Parallelen mit Standardabweichungen.

In den unsterilen Parallelen wird innerhalb der ersten 20 h die PEITC-Konzentration bereits auf ein Zehntel der Ausgangskonzentration reduziert (Abb. 2). Nach 44 h sind nur noch Spuren von PEITC im unsterilen Boden nachzuweisen. Nach 91 h ist kein PEITC im unsterilen Boden mehr nachweisbar. Bei den sterilisierten Proben sinkt die PEITC-

Konzentration sehr langsam ab und beträgt nach 91 h noch 64% der nach 1 h gemessenen Konzentration. Da die Menge extrahierbaren PEITCs im unsterilen Boden wesentlich schneller abnimmt als in den sterilen ParallelenBoden, ist anzunehmen, dass mikrobieller Abbau für das rasche Verschwinden des PEITCs aus dem Boden verantwortlich ist.

Aus dem vorgestellten Experiment lässt sich schließen, dass mikrobieller Abbau innerhalb von 2 Tagen zum nahezu vollständigen Verschwinden von PEITC aus dem Boden führt. Außerdem zeigt sich, dass bei Zugabe von PEITC in den trockenen Boden die Wiederfindung auf etwa 50% begrenzt ist.

4.1.2 Veränderung der Empfindlichkeit der Bodenmikroflora gegenüber PEITC, PPN und SCN in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.

Dem folgenden Versuch liegt die Fragestellung zu Grunde, in wie weit sich die Bodenmikroflora an eine hohe PEITC-Konzentration, bzw. an eine hohe Konzentration der verwandten Substanzen PPN und NaSCN, im Boden anpassen kann und ob sich eine solche Anpassung mit Hilfe eines physiologischen Testes nachweisen lässt.

Die 10^{-2} Verdünnungen von zweimalig mit wässriger PEITC-, PPN- und NaSCN-Lösung behandelten Bodenproben werden auf Mikrotiterplatten mit steigenden PEITC-, PPN- und NaSCN-Konzentrationen in der Nährlösung mit Glucose als Kohlenstoffquelle aufgetragen. Parallel zu der Inokulation der Mikrotiterplatten wird DNA aus den behandelten Bodenproben zur Darstellung der bakteriellen und eukaryotischen Bodenmikroflora isoliert. Der Versuchsansatz ist unter 3.1.2 beschrieben.

Weder die PEITC-, PPN- oder NaSCN-Konzentration in den Kavernen noch die Vorbehandlung der Bodenproben hat einen Einfluss auf die bei 595 nm gemessene Extinktion der Kulturen in der Kavernen nach zehn Tagen Kultur. Die Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid durch atmende Bakterien ist also in allen Kavernen ähnlich. Bei der Betrachtung mit bloßem Auge fällt allerdings farblicher Unterschied zwischen den in den Kavernen wachsenden Kulturen auf: Nach einer Vorbehandlung des Bodens mit PEITC oder PPN sind die Kulturen in 22 ± 1 von 23 Kavernen zitronengelb, bei einer Vorbehandlung mit NaSCN oder Wasser dagegen nur die Kulturen in 5 ± 3 Kavernen. Die zitronengelben Kulturen fluoreszieren unter UV-Licht von 365 nm (Abb. 3). Vermutlich handelt es sich hierbei um fluoreszierende Pseudomonaden.

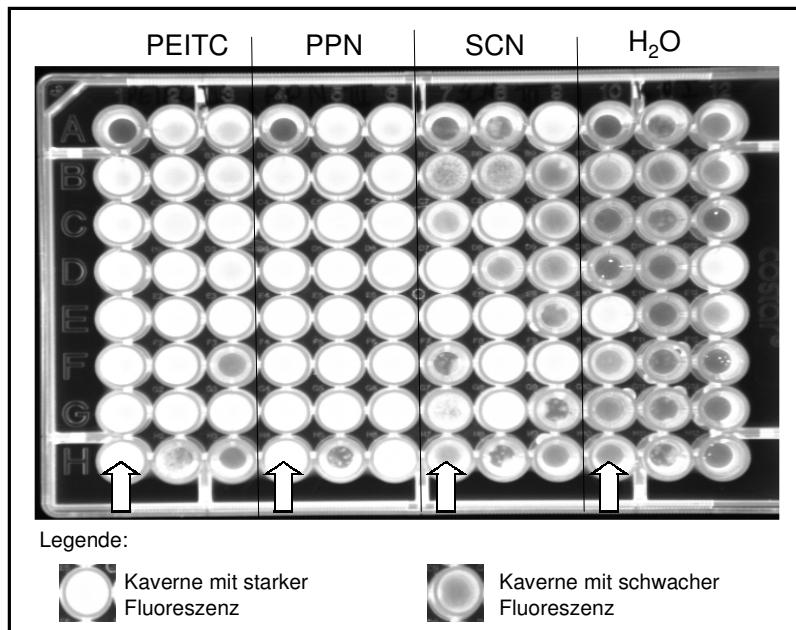


Abbildung 3: Wachstum fluoreszierender Mikroorganismen in einer Mikrotiterplatte 10 Tage nach Beimpfung mit Bodenlösung aus mit PEITC, PPN, NaSCN (SCN) bzw. H₂O vorbehandelten Boden. Aufnahme bei 365 nm UV-Licht. Für die DGGE wird DNA aus den mit einem Pfeil markierten Kavernen isoliert.

Die Vorbehandlung des Bodens mit PEITC, PPN, NaSCN oder Wasser hat nicht zu einer mit der DGGE detektierbaren Veränderung der Artenzusammensetzung der Bakterien im Boden geführt (Abb. 4). Die Bakterienpopulationen in der Kaverne mit der höchsten PEITC-Konzentration wird in der DGGE bei allen Bodenbehandlungsvarianten von einer starken Bande dominiert. Diese dominante Bande ist bei der Vorbehandlung mit PEITC und PPN stärker ausgeprägt als bei der Behandlung mit NaSCN. Dabei ist die dominante Bande bei den mit PEITC, PPN oder NaSCN vorbehandelten Proben im Boden selbst nicht nachzuweisen. Nach Inokulation der Kaverne mit der höchsten PEITC-Konzentration mit Bodensuspension des mit Wasser behandelten Kontrollbodens ist dagegen eine andere Bande dominant. Diese Bande ist auch in den Kavernen mit PEITC, PPN oder NaSCN vorbehandelten Proben und im Boden nachzuweisen.

Auch im DGGE-Bandenmuster der eukaryotischen Bodenmikroflora wird kein Effekt der Wiederbefeuchtung des Bodens mit PEITC-, PPN- oder NaSCN-Lösung bzw. Wasser erkennbar. Die Artenzusammensetzung an eukaryotischen Mikroorganismen in den Kavernen mit der jeweils höchsten PEITC-Konzentration unterscheidet sich deutlich von dem im Boden gefundenen Artenspektrum. Die Bodenbehandlung mit PEITC und PPN führt zu einem weitgehend identischen Bandenmuster der aus den in den Kavernen gewachsenen Mikroorganismen isolierten DNA, das sich von dem mit NaSCN oder Wasser vorbehandelten Proben deutlich unterscheidet.

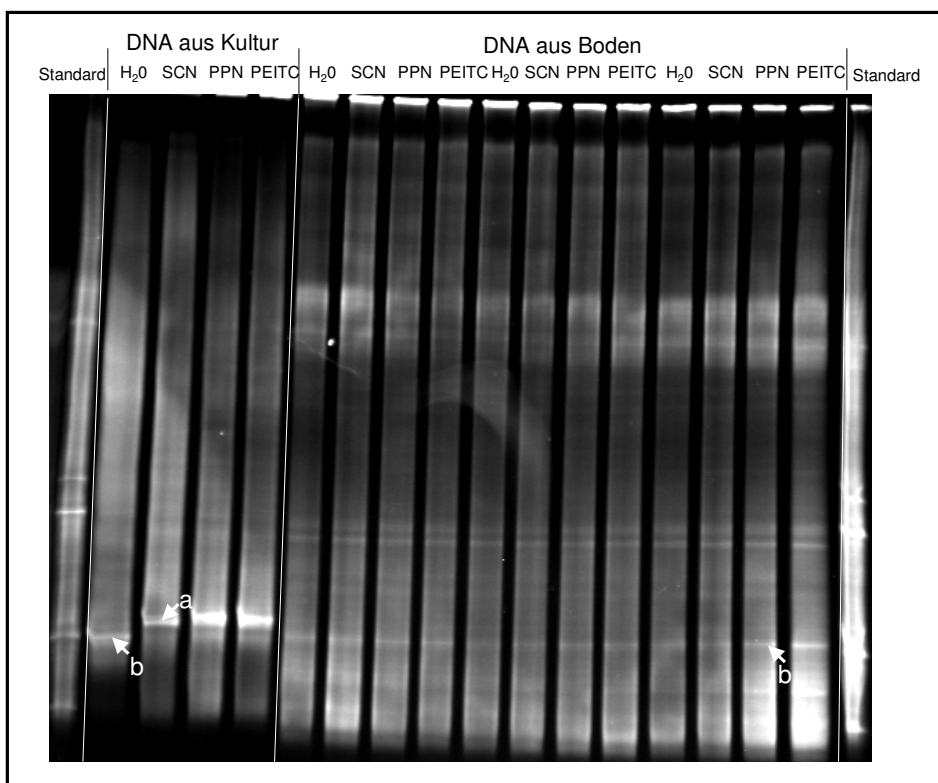


Abbildung 4: Vergleich der DGGE-Bandenmuster bakterieller direkt aus dem Boden oder nach zehntägiger Kultur in Mikrotiterplatten isolierten DNA. Der Boden wurde fünf Tage vor DNA-Isolierung mit wässriger PEITC-, PPN-, NaSCN- (SCN) -Lösung bzw. mit Wasser wiederbefeuchtet. Die 10^{-2} Verdünnung der Bodenlösung derselben Bodenproben wurde zur Beimpfung der Mikrotiterplatten genutzt. Die mit ‚a‘ gekennzeichnete Bande stammt von Bakterien, die dominant in den mit PEITC-, PPN-, NaSCN - (SCN) -Lösung behandelten Proben beimpften Kavernen sind, und die im Boden zu selten sind, um als Bande dargestellt zu werden. Die mit ‚b‘ gekennzeichnete Bande ist die dominante Bande in der nur mit Wasser wiederbefeuchteten Probe beimpften Kaverne und stammt von Bakterien, die auch im Boden häufig waren.

Der Einfluss von PEITC und PPN auf die Bodenmikroflora, der sich mit den Mikrotiterplatten nachweisen lässt, wird bei der DGGE der direkt aus dem Boden isolierten DNA nicht erkennbar. Hierbei entspricht die Artenzusammensetzung der in den Kavernen kultivierten Organismen nicht der, die sich in der Ausgangsbodenproben nachweisen lässt. Die Art, die von PEITC und PPN profitiert hat und in den Kavernen die dominante Bande gebildet hat, ist im Boden zu selten gewesen, um im Bandenmuster der Bodenproben zu erscheinen. Da der trockene Boden erst mit den PEITC-, PPN- und NaSCN-Lösungen wiederbefeuchtet worden ist, ist es möglich, dass ein Großteil der mit der DGGE dargestellten Banden von Dauerstadien stammt. Das könnte erklären, weshalb die unterschiedlichen Behandlungen keine Unterschiede im Bandenmuster der direkt aus dem Boden isolierten DNA zeigten.

Das Wachstum der Bodenmikroorganismen in den Mikrotiterplatten ist unabhängig von der angebotenen PEITC-, PPN- oder NaSCN-Konzentration in allen Kavernen ähnlich. Versuch 4.1.1. zeigt, dass Bodenmikroorganismen PEITC schnell abbauen können. Möglicherweise wird das PEITC, PPN und SCN^- in den Kavernen so schnell abgebaut, dass anschließend die

Bodenmikroorganismen in allen Kavernen unter gleichen Bedingungen wachsen können. Der Ansatz die PEITC-, PPN- oder SCN⁻-Toleranz einer Mikroorganismengesellschaft mit einem einfachen Test nachzuweisen, ist daher gescheitert. Allerdings zeigt ein Nebeneffekt, nämlich die verstärkte Entwicklung von –vermutlich- fluoreszierenden Pseudomonaden in den Mikrotiterplatten, dass PEITC und PPN die Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora beeinflussen können.

In diesem Versuch hat PPN eine vergleichbare Wirkung auf die Bodenmikroflora, wie PEITC. Allerdings kann PPN in den unter 4.2 - 4.4 beschriebenen Versuchen in der Rhizosphäre der untersuchten Rapssorten nicht nachgewiesen werden. Daher wird im folgenden auf PPN nicht weiter eingegangen.

4.1.3 Wirkung von PEITC auf Bodenmikroorganismen

In Versuch 4.1.1 wird deutlich, dass PEITC im Boden schnell durch Mikroorganismen abgebaut wird. Die Ergebnisse von Versuch 4.1.2 zeigen, dass bei einer Wiederbefeuchtung trockenen Bodens eine durch PEITC verursachte Veränderung in der Artenzusammensetzung mit der DGGE nicht nachzuweisen ist, obwohl sie bei Kultur in Mikrotiterplatten erkennbar wird. Die Ursache dafür ist möglicherweise die DNA inaktiver Dauerstadien, die im vormals trockenen Boden so dominiert, dass quantitative Veränderungen in der aktiven Mikroflora bei der DGGE überdeckt werden. Daher werden, um einen Einfluss von PEITC auf die Bodenmikroflora nachweisen zu können, in dem folgenden Versuch über fünf Tage täglich in Ethanol gelöstes PEITC in den feuchten Boden eingearbeitet und anschließend das Artenspektrum von Bakterien, eukaryotischer Mikroorganismen und Aktinomyceten mit der DGGE dargestellt. Der Versuchsansatz ist unter 3.1.3 beschrieben.

Die mit DGGE erfassten Artenspektren aller drei untersuchten Organismengruppen werden durch die mehrfache Zugabe von PEITC in den Boden verändert. Dabei ruft erst eine PEITC-Konzentration größer als 1323 pmol g⁻¹ bei pro- und eukaryotischer Bodenmikroflora eine eindeutige Veränderung hervor (Abb. 5; Abb. 6). Bei beiden Organismengruppen führt die Zugabe von Ethanol nicht zu einer Veränderung des Artenspektrums im Vergleich zu den unbehandelten Bodenproben. Bei den Aktinomyceten liegt diese Empfindlichkeitsgrenze niedriger und zwar im Bereich von 331 pmol g⁻¹ (Abb 7). Bei allen Organismengruppen nimmt die Intensität einiger Banden mit wachsender PEITC-Konzentration zu, während die Intensität anderer Banden abnimmt.

PEITC bewirkt bei regelmäßiger Zugabe in den Boden eine starke Verschiebung der Häufigkeitsverhältnisse der Bodenmikroflora. Diese qualitative Veränderung der Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora ist mit der DGGE nachweisbar.

4.1.4 Zusammenfassung

PEITC wird im Boden durch Mikroorganismen sehr schnell abgebaut. Schon eine PEITC-Konzentration von 3970 pmol g^{-1} Bodenfrischgewicht über 5 Tage führt zu deutlichen, mit DGGE-darstellbaren Veränderungen der Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora. Dabei ist die Empfindlichkeit der Aktinomyceten gegenüber PEITC größer als die bei der Gesamtheit der Bakterien und die bei den eukaryotischen Mikroorganismen beobachtete Empfindlichkeit. Bei Wiederbefeuchtung von trockenem Boden mit PEITC-haltiger Lösung scheint die Vermehrung von fluoreszierenden Pseudomonaden gegenüber anderen Bakterien gefördert zu haben.

Nachdem die drei unter 4.1 vorgestellten Versuche belegt haben, dass PEITC deutliche mit DGGE-darstellbare Veränderungen der Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora verursachen kann, soll in den folgenden Versuchen 4.2 - 4.4 die Funktion des PEITC in der Rhizosphäre von Rapspflanzen untersucht werden.

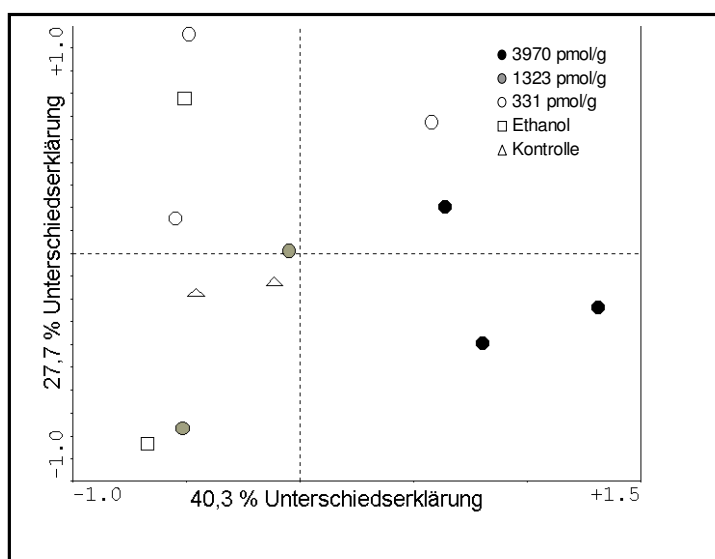


Abbildung 5: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Bodenbakterien nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen. PCA-Plot der DGGE Bandenintensitäten. Je näher zwei Punkte beieinander liegen, um so ähnlicher ist die Artenzusammensetzung der bakteriellen Mikroflora der entsprechenden Bodenproben. Abstände entlang der x-Achse weisen auf größere Unterschiede hin, als Abstände entlang der y-Achse. Die Abstände entlang der x-Achse beruhen auf 40,3% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster. Diese 40,3% der insgesamt beobachteten Unterschiede stammen von Banden, deren Intensität mit wachsender PEITC-Konzentration zu- oder abnimmt. Entlang der y-Achse sind weitere 27,7% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster dargestellt, die nicht mit den auf der x-Achse dargestellten Unterschieden korreliert sind.

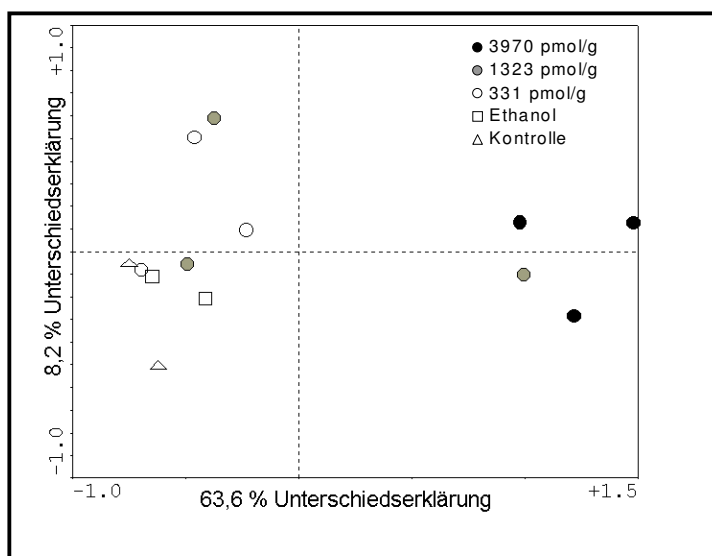


Abbildung 6: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der eukaryotischen Bodenmikroflora nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen. PCA-Plot der DGGE Bandenintensitäten. Je näher zwei Punkte beieinander liegen, um so ähnlicher ist die Artenzusammensetzung der eukaryotischen Mikroflora der entsprechenden Bodenproben. Abstände entlang der x-Achse weisen auf größere Unterschiede hin, als Abstände entlang der y-Achse. Die Abstände entlang der x-Achse beruhen auf 63,6% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster. Diese 63,3% der insgesamt beobachteten Unterschiede stammen von Banden, deren Intensität mit wachsender PEITC-Konzentration zu- oder abnimmt. Entlang der y-Achse sind weitere 8,2% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster dargestellt, die nicht mit den auf der x-Achse dargestellten Unterschieden korreliert sind.

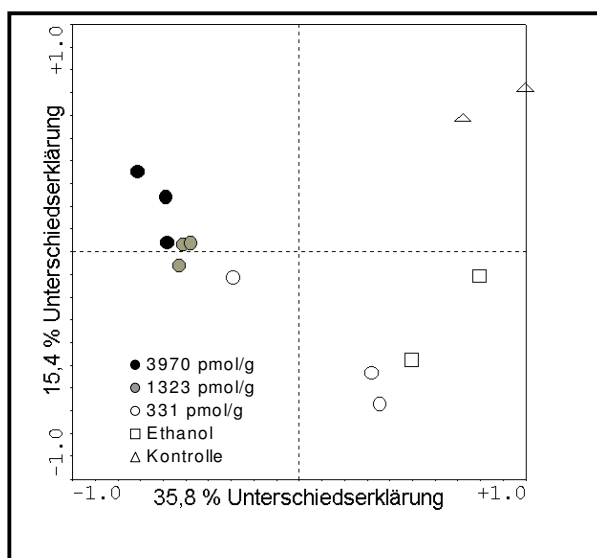


Abbildung 7: Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Bodenaktinomyceten nach fünf Tagen Inkubation mit den PEITC-Konzentrationen 331, 1323 und 3970 pmol g^{-1} oder mit Ethanol, bzw. von unbehandelten Bodenkontrollen. PCA-Plot der logarithmisch transformierten DGGE Bandenintensitäten. Je näher zwei Punkte beieinander liegen, um so ähnlicher ist die Artenzusammensetzung der Aktinomyceten der entsprechenden Bodenproben. Abstände entlang der x-Achse weisen auf größere Unterschiede hin, als Abstände entlang der y-Achse. Die Abstände entlang der x-Achse beruhen auf 35,8% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster. Diese 15,4% der insgesamt beobachteten Unterschiede stammen von Banden, deren Intensität mit wachsender PEITC-Konzentration zu- oder abnimmt. Entlang der y-Achse sind weitere 8,2% der insgesamt beobachteten Unterschiede der Bandenmuster dargestellt, die nicht mit den auf der x-Achse dargestellten Unterschieden korreliert sind.

4.2. Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit

In den folgenden Versuchen soll untersucht werden, ob sich die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit und der Entwicklung der Pflanzen von der Keimung bis zur Reife ändern. Außerdem soll untersucht werden, ob der *in vitro* nachzuweisende Einfluss von PEITC auf die Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora auch auf dem Feld in der Rhizosphäre von Raps nachgewiesen werden kann.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Werte zur Pflanzentrockenmasse verstehen sich immer als Angaben zur Summe aus Spross- und Wurzeltrockenmasse.

4.2.1 Winterraps

Die beiden Winterrapsorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ wurden in den Jahren 99/00 und 00/01 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg kultiviert. In je vier Parallelen wurden Proben nach dem Auflaufen bis zum ersten stärkeren Frost und im Folgejahr vom März bis zur Reife genommen. Der Versuchsansatz ist unter 3.3.1 beschrieben.

4.2.1.1 Feldversuch 99/00

Die Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ wurden am 1.9.1999 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. Die ersten beiden Probennahmen fanden noch im Jahr 1999 statt, die anderen sechs nach dem Winter im Frühjahr 2000. Der Versuchsansatz ist unter 3.2.1.1 beschrieben.

An der Bodenfeuchte lässt sich grob die klimatische Entwicklung des Kulturzeitraumes 1999/2000 ablesen (Tab. 6). Dem ungewöhnlich warmen Herbst folgte ein sehr feuchter, milder Winter, der im Frühjahr hohe Bodenfeuchten verursachte. In einigen Bereichen des Feldes war der Boden im Frühjahr fast schlammig. Nach dem recht warmen Mai wurde es zum Juni hin wieder feuchter.

Bis zum 14.9.1999, zwei Wochen nach der Aussaat, war ‚Mohikan‘ gleichmäßig aufgelaufen, ‚Emerald‘ war etwas später und unregelmäßiger gekeimt und am ersten Probennahmetermin kleiner (Tab. 6). Bis zum 14.10.1999 hat ‚Emerald‘ den Wachstumsvorsprung von ‚Mohikan‘ eingeholt und bildete ebenfalls einen regelmäßigen Bestand. Beide Sorten unterschieden sich anschließend nicht mehr in ihrer Gesamtmasse. Über den milden Winter verdreifachten die Pflanzen ihre Masse. Den Winter über fraßen Tauben an den Blättern beider Sorten, was auch durch das Aufstellen von Vogelscheuchen nicht ganz zu unterbinden war. Außerdem wurden im Frühjahr fast alle Wurzeln von Larven des Kohlerdflohs (*Phyllotreta spec.*) befallen. Bereits Anfang April begannen beide Sorten das Schossen, ‚Emerald‘ etwas früher als

‚Mohikan‘. Vom Winterende bis zur Blüte verdreifachten die Pflanze ihre Masse. Zum letzten Probennahmetermin am 8.6.2000 waren die Blätter und die ersten Schoten trocken.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre war bei beiden Sorten im Herbst 1999 noch gering (Tab. 6). Oft war kein PEITC nachzuweisen. Nach dem Winter ist die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre stark angestiegen. Zu Beginn des Schossens, Probennahmetermin 5.4.2000, erreichte die PEITC-Konzentration bei ‚Emerald‘ ein Maximum. Die höchste in der Rhizosphäre von ‚Emerald‘ gemessene Konzentration betrug 12119 pmol g⁻¹. Bei ‚Mohikan‘ war kein solches Maximum zu erkennen. Maximal wurden bei ‚Mohikan‘ 5489 pmol g⁻¹ gemessen. Nach der Blüte sank die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre leicht.

Tabelle 6: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g⁻¹] der Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Feldversuch 1999/2000. Probennahme an acht Terminen. Aussaat am 1.9.1999. Mittelwerte aus neun (Bodenfeuchte) bzw. vier Parallelen ± Standardabweichungen.

Termin	Stadium	Bodenfeuchte [%]	Sorte	Trockenmasse [g]	PEITC-Konzentration [pmol g ⁻¹]
14.9.99	Keimling	9,9 ± 1,9	‚Emerald‘	0,009 ± 0,003	123 ± 125
			‚Mohikan‘	0,021 ± 0,004	0 ± 0
14.10.99	Juvenil	12,2 ± 1,5	‚Emerald‘	2,3 ± 0,4	0 ± 0
			‚Mohikan‘	3,3 ± 1,1	11 ± 18
14.3.00	Juvenil	15,5	‚Emerald‘	7,9 ± 3,8	2401 ± 563
			‚Mohikan‘	12,3 ± 4,7	3170 ± 1194
5.4.00	Schossen	16,0 ± 1,4	‚Emerald‘	25,7 ± 11,8	9011 ± 2949
			‚Mohikan‘	21,1 ± 6,7	712 ± 767
26.4.00	Knospen	14,1 ± 1,2	‚Emerald‘	38,1 ± 17,6	2829 ± 1399
			‚Mohikan‘	28,9 ± 7,1	1628 ± 2235
3.5.00	Blüte	9,7 ± 3,0	‚Emerald‘	29,5 ± 7,8	1607 ± 941
			‚Mohikan‘	25,6 ± 18,1	1616 ± 1517
23.5.00	Fruchtansatz	7,6 ± 1,0	‚Emerald‘	40,7 ± 18,8	1578 ± 161
			‚Mohikan‘	24,7 ± 7,1	1255 ± 119
8.6.00	Reife	12,1 ± 1,0	‚Emerald‘	39,8 ± 20,8	1400 ± 761
			‚Mohikan‘	31,5 ± 11,5	470 ± 328

Die mit DGGE dargestellten Unterschiede in der Artenzusammensetzung werden durch das Zusammenspiel aller getesteten Umweltfaktoren zu 19,7% erklärt (Tab. 7). Bei der Betrachtung der Zusammenhänge der Artenzusammensetzung der Bakterien mit einzelnen untersuchten Umweltfaktoren wird deutlich, dass sich die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien mit der Zeit und der Bodenfeuchte änderte. Auch die Masse der Pflanze ist mit der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien korreliert. Wird nur die Artenzusammensetzung der Bakterien in der Rhizosphäre von ‚Mohikan‘ betrachtet, so ist

auch ein Zusammenhang zwischen der PEITC-Konzentration und der Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora erkennbar.

Die Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Rhizosphäreneukaryota sind mit der Pflanzenmasse korreliert (Tab. 7). Außerdem änderte sich die Zusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit. Wenn Arten, die im DGGE-Gel durch schwache Banden repräsentiert sind, durch eine logarithmische Transformation der Peak-Intensitäten gegenüber von stärkeren Banden repräsentierten Arten aufgewertet werden, so lässt sich ein Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Rhizosphäreneukaryota erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass einige der weniger häufigen Arten empfindlich auf das PEITC in der Rhizosphäre reagiert haben. Bodenfeuchte und Sorte übten keinen Einfluss auf die Artenzusammensetzung aus, der aus dem Zusammenspiel aller Umweltfaktoren herausgelöst erkennbar wäre.

Die Substratnutzungsmuster unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Probennahmetermin, der Bodenfeuchte und der PEITC-Konzentration der Rhizosphäre voneinander (Tab. 7). Nach der Blüte, an den Probennahmeterminen 23.5.2000 und 8.6.2000, hatten sortenspezifische Unterschiede starken Einfluss auf das Substratnutzungsmuster, so dass 36 bzw. 23% der beobachteten Unterschiede durch den Faktor Sorte erklärt werden.

Tabelle 7: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Versuchsjahr 1999/2000. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE von pro- und eukaryotischer DNA und Substratnutzungsmuster. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster bzw. der Substratnutzungsmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster (100%). In Klammern stehen Erklärungen, die nur bei stärkerer Berücksichtigung der schwächeren Banden, bzw. schwächer genutzten Substrate durch logarithmische Transformation der Daten signifikant werden. ns = nicht signifikant ($\alpha \bullet 0,1$)

Analyse	Erklärter Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede [%]				
	Zeit	Bodenfeuchte	Trockenmasse	PEITC-Konzentration	alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	7	6	5	ns	19,7
Eukaryota	2	ns	4	(2)	10,3
Substratnutzung	13	9	ns	6	20,8

Dieser Versuch zeigt, dass sich die Rhizosphärenmikroflora und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre mit der Zeit und der Entwicklung der Pflanzen ändert. Hierbei ist ein

Einfluss der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre auf die pro- und eukaryotische Rhizosphärenmikroflora zu erkennen.

Da die Wurzeln der Rapspflanzen beider Sorten im Frühjahr durch den Kohlerdfloh befallen wurden, was zu einer Zunahme der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre geführt haben könnte, wurde der Versuch im Anbauzeitraum 2000/2001 wiederholt.

4.2.1.2 Feldversuch 2000/2001

Die Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ wurden am 26.8.2000 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. Die ersten vier Probenahmen fanden noch im Jahr 2000 statt, die anderen sechs im Jahr 2001. Der Versuchansatz ist unter 3.2.1.2 beschrieben.

Die Entwicklung der Bodenfeuchte spiegelte den klimatischen Verlauf der Kulturperiode 2000/2001 wider (Tab. 8). Auf einen feuchten und kühlen Herbst mit sehr spätem Frosteinbruch folgte ein langer, kalter Winter. Das Frühjahr war zunächst feucht, wurde aber Anfang Mai sehr trocken. Im Sommer wurde das Wetter wieder feuchter.

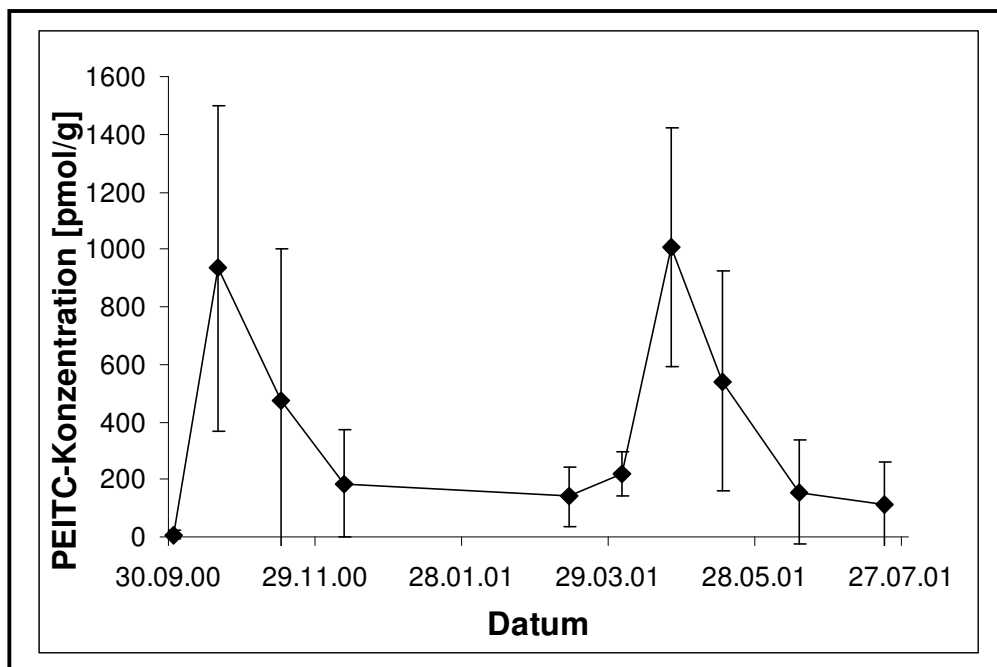


Abbildung 8: Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] gegen die Zeit bei ‚Mohikan‘ bei Feldkultur. Aussaat am 1.9.00. Mittelwerte aus vier Parallelen mit Standardabweichungen.

Wegen der kühlen und feuchten Witterung im Herbst lief die Sorte ‚Emerald‘ nur sehr spärlich und unregelmäßig auf. Daher wurden im Herbst 2000 keine Proben dieser Sorte genommen. Die hohen Standardabweichungen der Pflanzentrockenmasse von ‚Emerald‘ sind die Folge der Unregelmäßigkeit des Bestandes (Tab. 8). ‚Mohikan‘ keimte gleichmäßig aus. Während des Winters litten die Pflanzen unter Taubenfraß. Nach Winterende bis zum

Schossen verdoppelte sich die Masse, die bis zum Wintereinbruch erreicht worden ist. Vom Schossen bis zur Blüte verdreifachte sich die Pflanzenmasse beider Sorten. Am letzten Probennahmetermin, am 20.7.2001, waren die Pflanzen vollkommen trocken und die Samen reif. Bis dahin, zwischen Blüte und Reife, hatte noch einmal eine Verdopplung der Pflanzenmasse stattgefunden.

In der Rhizosphäre der ‚Mohikan‘ Keimlinge war kaum PEITC nachzuweisen (Tab. 8, Abb. 8). Achtzehn Tage später hatte die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre der Jungpflanzen ein erstes Maximum erreicht. Zum Winter sank die PEITC-Konzentration wieder, um während des Schossens ein zweites, etwas höheres Maximum zu erreichen. Dieses Maximum war bei beiden Sorten zu beobachten, wobei in der Rhizosphäre von ‚Emerald‘ als höchste PEITC-Konzentration 2017 pmol g^{-1} und bei ‚Mohikan‘ 1455 pmol g^{-1} gemessen wurden. Bei der Reife sank die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bei beiden Sorten deutlich ab, so dass teilweise kein PEITC mehr nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 8: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Feldversuch 2000/2001. Probennahme bei ‚Mohikan‘ in Feldkultur an zehn Termine vom 2.10.2000 bis zum 20.7.2001 und bei ‚Emerald‘ an sechs Terminen vom 13.3.2001 bis zum 20.7.2001 nach Aussaat am 1.9.2000. Mittelwerte aus neun (Bodenfeuchte) bzw. vier Parallelen \pm Standardabweichungen.

Termin	Stadium	Bodenfeuchte [%]	Sorte	Trockenmasse [g]	PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}]
2.10.00	Keimling	16,2 \pm 0,9	‚Mohikan‘	0,19 \pm 0,06	9 \pm 15
20.10.00	Juvenil	15,2 \pm 1,3	‚Mohikan‘	0,6 \pm 0,3	934 \pm 567
15.11.00	Juvenil	15,4 \pm 1,3	‚Mohikan‘	2,4 \pm 0,6	473 \pm 531
11.12.00	Juvenil	17,3 \pm 1,4	‚Mohikan‘	4,2 \pm 2,8	185 \pm 186
13.3.01	Juvenil	16,2 \pm 0,7	‚Emerald‘	3,5 \pm 2,8	247 \pm 223
			‚Mohikan‘	2,8 \pm 1,1	140 \pm 103
4.4.01	Knospenschieben	13,0 \pm 1,2	‚Emerald‘	3,1 \pm 1,0	205 \pm 93
			‚Mohikan‘	2,6 \pm 5,0	218 \pm 79
24.4.01	Schossen	12,8 \pm 0,8	‚Emerald‘	6,7 \pm 2,3	1003 \pm 716
			‚Mohikan‘	7,8 \pm 3,3	1006 \pm 414
15.5.01	Blüte	4,5 \pm 0,6	‚Emerald‘	28,2 \pm 11,0	306 \pm 222
			‚Mohikan‘	23,6 \pm 14,2	541 \pm 383
15.6.01	Fruchtansatz	6,8 \pm 1,6	‚Emerald‘	27,8 \pm 26,1	381 \pm 449
			‚Mohikan‘	26,9 \pm 12,2	157 \pm 181
20.7.01	Reife	9,0 \pm 1,8	‚Emerald‘	84,1 \pm 51,9	185 \pm 185
			‚Mohikan‘	42,6 \pm 12,2	112 \pm 151

Die mit DGGE dargestellte Artenzusammensetzung der Bakterien änderte sich mit der Zeit und der Bodenfeuchte (Tab. 9). Eine Änderung der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien mit der Zeit war bei den ersten vier Probennahmen im Herbst 2000

allerdings noch nicht erkennbar. Auch die Unterschiede in der PEITC-Konzentration und der Masse der Pflanze sind mit Unterschieden in der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien korreliert. Zum Fruchtansatz ließen sich sortenspezifische Unterschiede in der Rhizosphärenmikroflora erkennen, die zur Reife wieder verschwanden (Abb. 9).

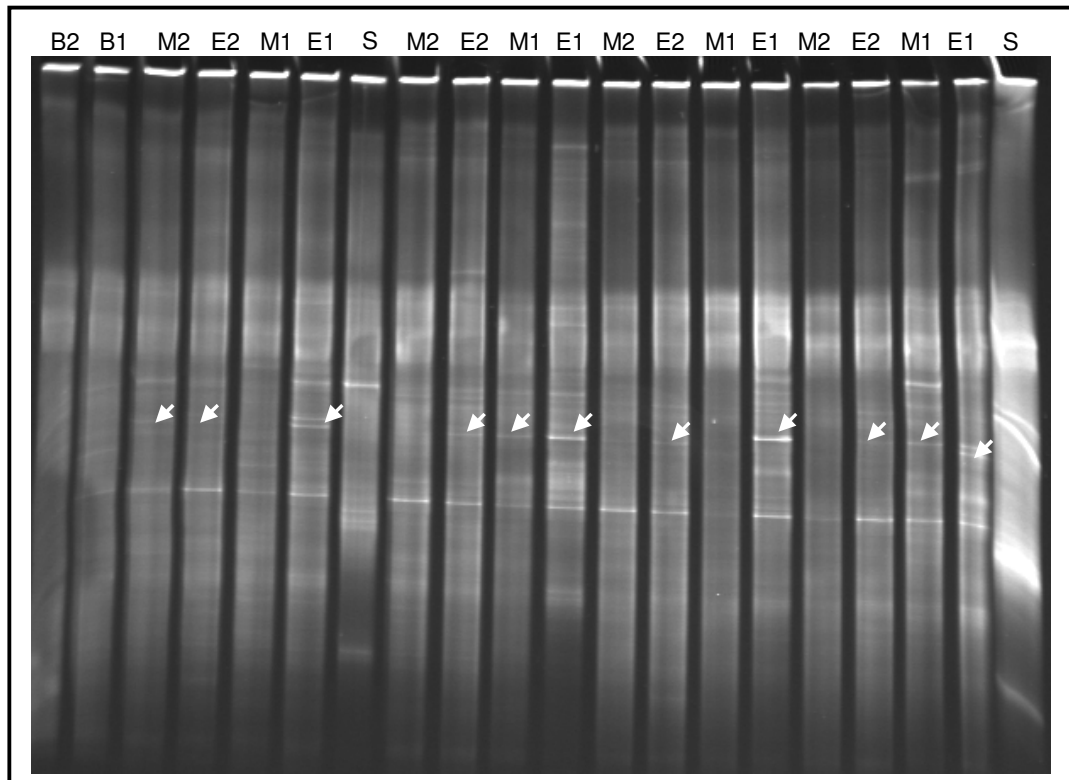


Abbildung 9: Zeit- und sortenabhängige Unterschiede der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien an Wurzeln von ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ bei Feldkultur zum Fruchtansatz (15.6.2001) und zur Reife (20.7.2001). DGGE-Gel
 Legende: S Standard, B1 wurzelferner Boden 15.6.2001, B2 wurzelferner Boden 20.7.2001, E1 ‚Emerald‘ 15.6.2001, E2 ‚Emerald‘ 20.7.2001, M1 ‚Mohikan‘ 15.6.2001, M2 ‚Mohikan‘ 20.7.2001. Die Pfeile weisen auf eine Bande hin, durch die die zeit- und sortenspezifischen Unterschiede besonders deutlich werden.

Die Artenzusammensetzung der Aktinomyceten in der Rhizosphäre unterschied sich deutlich von der im wurzelfernen Boden. Auch die Artenzusammensetzung der Aktinomyceten in der Rhizosphäre änderte sich mit der Zeit (Tab. 9). Im Herbst 2000 kam es allerdings noch zu keinen Veränderungen der Artenzusammensetzung mit der Zeit. Nach logarithmischer Transformation der Peak-Intensitäten wird deutlich, dass die Artenzusammensetzung der weniger häufigen Arten von der Bodenfeuchte beeinflusst wird. Sorte, Trockenmasse und PEITC-Konzentration übten keinen Einfluss auf die Artenzusammensetzung aus, der aus dem Zusammenspiel aller Umweltfaktoren herausgelöst erkennbar wäre.

Die Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen änderte sich ebenfalls mit der Zeit und der Bodenfeuchte (Tab. 9). Bei logarithmischer Transformation

(siehe 2.10) der Peak-Intensitäten vor der RDA zeigt sich, dass Unterschiede in der Artenzusammensetzung, gerade bei den durch schwächere Banden repräsentierten Arten, mit Unterschieden der Pflanzentrockenmasse und der PEITC-Konzentration korreliert sind. Bei den ersten vier Probennahmen im Herbst 2000 war der Zusammenhang zwischen der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen besonders deutlich mit 14% Unterschiedserklärung zu erkennen. Die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora beider Sorten war ähnlich. Besonders im Sommer 2001 war der Unterschied zwischen dem Artenspektrum der Rhizosphäreneukaryota und dem der Eukaryota im wurzelfernen Boden deutlich zu erkennen.

Tabelle 9: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Versuchsjahr 2000/2001. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE der DNA von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster (100%). In Klammern stehen Erklärungen, die nur bei stärkerer Berücksichtigung der schwächeren Banden, bzw. schwächer genutzten Substrate durch logarithmische Transformation der Daten signifikant werden. ns = nicht signifikant ($\alpha \bullet 0,1$)

Organismen- gruppe	<i>Erklärter Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede</i> [%]				
	Zeit	Bodenfeuchte	Trockenmasse	PEITC- Konzentration	alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	13	6	3	4	22,8
Aktino- myceten	4	(3)	ns	ns	12,7
Eukaryota	9	5	(3)	(3)	19,4

4.2.1.3 Zusammenfassung

In den Versuchen 4.2.1.1 und 4.2.1.2 wird deutlich, dass sich die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Winterraps mit der Entwicklung der Pflanzen ändert. In beiden Versuchen fällt ein Maximum der PEITC-Konzentration während des Schossens auf. Im Herbst 2000 (Versuch 4.2.1.2) wurde zusätzlich ein zweites Maximum nach der Keimung erkennbar. Die PEITC-Konzentrationen, die im Versuch im Jahr 2000 (Versuch 4.2.1.1) gemessen wurden, waren teilweise wesentlich höher, als im Jahr 2001 (Versuch 4.2.1.2). Ursache hierfür waren möglicherweise der Schädlingsbefall an den Wurzeln in der Kulturperiode 1999/2000. Auch die ungünstigen klimatischen Verhältnisse während der Kulturperiode 2000/2001 könnten eine Rolle spielen, denn in dieser Kulturperiode erreichten die Pflanzen erst zur Blüte, der Zeit nach der maximalen PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, dieselbe Trockenmasse wie im Vorjahr zum gleichen Stadium.

In beiden Versuchen wird deutlich, dass sich die Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit ändert. Hierbei spielen abiotische, klimatische Veränderung eine Rolle, wie sie exemplarisch in der Bodenfeuchte erfasst sind. Aber auch die untersuchten physiologischen Veränderungen der Pflanzen im Verlauf ihrer Entwicklung, die Pflanzenmasse und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, sind mit den Veränderungen der Artenzusammensetzungen der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen korreliert.

In den beiden Feldversuchen mit Winterraps erstreckt sich der Versuchszeitraum über die winterliche Vegetationsruhe. Die zeitliche Veränderung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, wie sie beim Winterraps beobachtet wurde, könnte sich von der des Sommerrapses unterscheiden, dessen Entwicklung nicht von einer kalten Jahreszeit unterbrochen wird. Außerdem ist anzunehmen, dass die Veränderung der Rhizosphärenmikroflora über die Zeit nicht so stark sein wird, wenn der Versuchszeitraum keinen Winter einschließt. Daher werden auch Feldversuche mit Sommerraps durchgeführt.

4.2.2 Feldversuche mit Sommerraps

Den beiden im Folgenden beschriebenen Versuchen liegt die Fragestellung zu Grunde, ob sich die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora, wie beim Winterraps beobachtet, auch bei Sommerraps mit der Kultivierungszeit und der Entwicklung der Pflanze verändert.

Die beiden Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ wurden in den Jahren 2000 und 2001 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg kultiviert. In je vier Parallelen wurden Proben von Jungpflanzen, bei der Blüte, beim Fruchtansatz und zur Reife genommen. Außerdem wurde in einem Gewächshausversuch die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ von der Keimung bis zur Blüte dargestellt. Die Versuchsansätze sind unter 3.2.2 beschrieben.

4.3.2.1 Feldversuch 2000

Die Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ wurden am 3.4.2000 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. An vier Probennahmeterminen wurden von jeder Sorte je vier Parallelen untersucht. Der Versuchsansatz ist unter 3.2.2.1 beschrieben.

Die Bodenfeuchte veränderte sich über den Versuchszeitraum nur wenig (Tab. 10). Dieses spiegelt einen gleichmäßig feuchten, nur von kurzen, heißen Phasen unterbrochenen Sommer wider.

Zwischen Keimung, Ende April, und erster Probennahme, 23.5.2000, litten die Jungpflanzen beider Sorten unter starkem Fraß an den Blättern durch den Kohlerdfloh (*Phyllotreta spec.*).

Da die Pflanzen stark geschwächt waren, erhielt die Sommerrapskultur eine zusätzliche Düngergabe (siehe Kapitel 3.2.2.1). Bis zur Blüte, Anfang Juni, hatten die Pflanzen dann ihre Masse versechsfacht (Tab. 10). Zu diesem Zeitpunkt waren die Wurzeln von Larven des Kohlerdflohs befallen. Im folgenden Monat, während des Fruchtansatzes, vervierfachte sich die Pflanzenmasse noch einmal. Zum letzten Probenahmetermin, 1.8.2000, waren die Pflanzen trocken und die meisten Blätter abgefallen.

Tabelle 10: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmasse der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g⁻¹] von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in Feldkultur im Versuchsjahr 2000 an vier Probenahmeterminen. Aussaat am 3.4.2000. Mittelwerte aus neun (Bodenfeuchte) bzw. vier Parallelen ± Standardabweichungen.

Termin	Stadium	Bodenfeuchte [%]	Sorte	Trockenmasse [g]	PEITC-Konzentration [pmol g ⁻¹]
23.5.00	Jungpflanzen	9,2 ± 0,4	‚Monty‘	1,3 ± 0,3	223 ± 348
			‚Rainbow‘	1,0 ± 0,4	303 ± 140
8.6.00	Blüte	11,7 ± 0,6	‚Monty‘	7,5 ± 1,3	1513 ± 782
			‚Rainbow‘	6,4 ± 1,5	1400 ± 776
4.7.00	Fruchtansatz	9,1 ± 0,8	‚Monty‘	34,7 ± 12,3	836 ± 707
			‚Rainbow‘	22,6 ± 12,3	609 ± 478
1.8.00	Reife	11,3 ± 0,3	‚Monty‘	29,9 ± 15,3	1033 ± 906
			‚Rainbow‘	19,2 ± 6,0	1153 ± 1178

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre entwickelte sich bei beiden Sorten gleichartig (Tab. 10). In der Rhizosphäre der Jungpflanzen war die PEITC-Konzentration gering. Zur Blüte war die PEITC-Konzentration stark angestiegen und verblieb bis zur Reife auf diesem hohen Niveau. Während aber in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ in einem Bereich von 67 bis 3116 pmol g⁻¹ immer PEITC nachweisbar war, war bei ‚Monty‘ bei einigen Parallelen kein PEITC nachzuweisen. Als höchste PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von ‚Monty‘ wurde 2436 pmol g⁻¹ gemessen.

Die mit der DGGE darstellbare Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien änderte sich mit der Zeit (Tab. 11). Außerdem sind die Unterschiede in der Artenzusammensetzung auch mit denen der Pflanzentrockenmasse, der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Bodenfeuchte korreliert. Der Einfluss der PEITC-Konzentration wird besonders an der Artenzusammensetzung in der Rhizosphäre von ‚Monty‘ deutlich, wo 10% aller Unterschiede durch die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre erklärt werden. Die Rapsorten ähnelten einander in der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien.

Die Unterschiede im DGGE-Bandenmuster der eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora lassen in der RDA einen Einfluss der Sorte auf die Artenzusammensetzung erkennen (Tab. 11). Bei stärkerer Berücksichtigung der schwächeren Banden durch eine logarithmische Transformation (siehe 2.10) der Peak-Intensitäten vor der RDA wird auch eine Korrelation

mit der Pflanzenmasse deutlich. Werden ausschließlich die eukaryotischen Mikroorganismen in der Rhizosphäre von ‚Monty‘ betrachtet, wird bei einer logarithmischen Transformation (siehe 2.10) ein Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Artenzusammensetzung erkennbar (11% Unterschiedserklärung). Veränderungen der eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit oder der Bodenfeuchte waren nicht nachzuweisen.

Tabelle 11: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Versuchsjahr 2000/2001. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE von pro- und eukaryotischer DNA und Substratnutzungsmuster. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster bzw. der Substratnutzungsmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster (100%). In Klammern stehen Erklärungen, die nur bei stärkerer Berücksichtigung der schwächeren Banden, bzw. schwächer genutzten Substrate durch logarithmische Transformation der Daten signifikant werden. ns = nicht signifikant ($\alpha \bullet 0,1$)

Analyse	Erklärter Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede [%]					
	Zeit	Sorte	Bodenfeuchte	Trockenmasse	PEITC-Konzentration	alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	14	ns	3	8	5	31,3
Eukaryota	ns	4	ns	(6)	ns	29,4
Substratnutzung	ns	ns	5	10	(7)	27,5

Die Unterschiede in der Substratnutzung erscheinen in der RDA von der Pflanzenmasse und der Bodenfeuchte abhängig (Tab. 11). Durch eine logarithmische Transformation der Werte wird auch noch ein Zusammenhang mit der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre erkennbar. Die Faktoren ‚Zeit‘ und ‚Sorte‘ hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Substratnutzung.

In diesem Versuch stiegen die Trockenmasse und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zur Blüte stark an, nachdem die Jungpflanzen wegen des starken Insektenbefalls eine zusätzliche Düngergabe erhalten hatten. Während die Trockenmasse nach der Blüte noch weiter stieg, blieb die PEITC-Konzentration konstant. Damit unterscheidet sich die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre vom Sommerraps deutlich von der beim Winterraps beobachteten. Die bakterielle Mikroflora änderte sich auch in der Rhizosphäre vom Sommerraps im Laufe der Zeit. Hierbei stand sowohl die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Mikroorganismen, als auch das Substratnutzungsmuster im Zusammenhang mit der Trockenmasse der Pflanzen. Für Artenzusammensetzung der Bakterien und Substratnutzungsmuster spielten außerdem die

PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und die Bodenfeuchte eine Rolle. Die beiden Sorten unterschieden sich hinsichtlich der Artenzusammensetzung der Eukaryota in der Rhizosphäre.

Wegen des Insektenbefalls im Frühjahr und Sommer 2000 und der damit verbundenen zusätzlichen Düngung, die die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beeinflusst haben könnten, wurde der Feldversuch mit Sommerraps im Jahre 2001 wiederholt.

4.2.2.2 Feldversuch 2001

Die Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ wurden am 4.4.2001 auf dem Versuchsfeld in Ahrensburg ausgesät. An vier Probennahmeterminen wurden von jeder Sorte je vier Parallelen untersucht. Der Versuchsansatz ist unter 3.2.2.2 beschrieben.

An den Bodenfeuchten lässt sich grob die Wetterentwicklung im Frühling und Sommer 2001 ablesen (Tab. 12). Auf einen trockenen und warmen Mai folgte ein etwas feuchterer Sommer, der Ende Juli, Anfang August nass und kühl wurde.

Neununddreißig Tage nach der Aussaat hatten beide Sorten das 3-4 Blattstadium erreicht (Tab. 12). Bis zur Blüte wuchsen die Pflanzen kräftig. Sie hatten kaum unter Insektenbefall zu leiden. Nach der Blüte nahm nur noch bei ‚Rainbow‘ die Masse zu. ‚Monty‘ hatte an den letzten beiden Probennahmeterminen eine geringere Trockenmasse als ‚Rainbow‘.

Tabelle 12: Entwicklungsstadium, Bodenfeuchte in [% (g/g)], Trockenmassen der Pflanzen [g] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g⁻¹] von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in Feldkultur im Versuchsjahr 2000 an vier Probennahmeterminen. Aussaat am 4.4.2000. Mittelwerte aus neun (Bodenfeuchte) bzw. vier Parallelen ± Standardabweichungen.

Termin	Stadium	Bodenfeuchte [%]	Sorte	Trockenmasse [g]	PEITC-Konzentration [pmol g ⁻¹]
15.5.01	3-4 Blätter	6,8 ± 1,8	‚Monty‘	0,08 ± 0,01	231 ± 241
			‚Rainbow‘	0,09 ± 0,03	208 ± 91
15.6.01	Blüte	8,0 ± 2,2	‚Monty‘	9,9 ± 3,8	617 ± 318
			‚Rainbow‘	5,0 ± 2,0	424 ± 448
20.7.01	Fruchtansatz	8,5 ± 1,3	‚Monty‘	7,3 ± 1,6	883 ± 1196
			‚Rainbow‘	13,3 ± 1,8	442 ± 316
7.8.01	Reife	15,2 ± 1,2	‚Monty‘	9,9 ± 4,2	365 ± 446
			‚Rainbow‘	14,5 ± 6,9	55 ± 76

Der Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre war bei beiden Sorten ähnlich (Tab. 12). Vom Dreiblattstadium bis zum Fruchtansatz blieb die mittlere PEITC-Konzentration auf einem einheitlichen Niveau. Dabei schwankten die Extremwerte der PEITC-Konzentration bei ‚Monty‘ von 0 bis 2944 pmol g⁻¹. Bei ‚Rainbow‘ war die Varianz

geringer ($37\text{-}1143\text{ pmol g}^{-1}$). Zur Reife sank die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre deutlich ab.

Die mit der DGGE detektierte Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien änderte sich mit der Zeit und der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre (Tab. 13). Hierbei wird der Einfluss des PEITC auf die Bakterienflora mit 12% Unterschiedserklärung am deutlichsten, wenn nur die Rhizosphärenbakterien bei ‚Monty‘ betrachtet werden. Die Faktoren Sorte, Bodenfeuchte und Trockenmasse der Pflanzen hatten jeder für sich betrachtet keinen signifikanten Einfluss auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien.

Die Artenzusammensetzung der Eukaryota in der Rhizosphäre änderte sich deutlich mit der Zeit (Tab. 13, Abb. 10). Durch eine logarithmische Transformation der Bandenintensitäten wird auch ein Zusammenhang mit der Bodenfeuchte und der Trockenmasse der Pflanzen erkennbar.

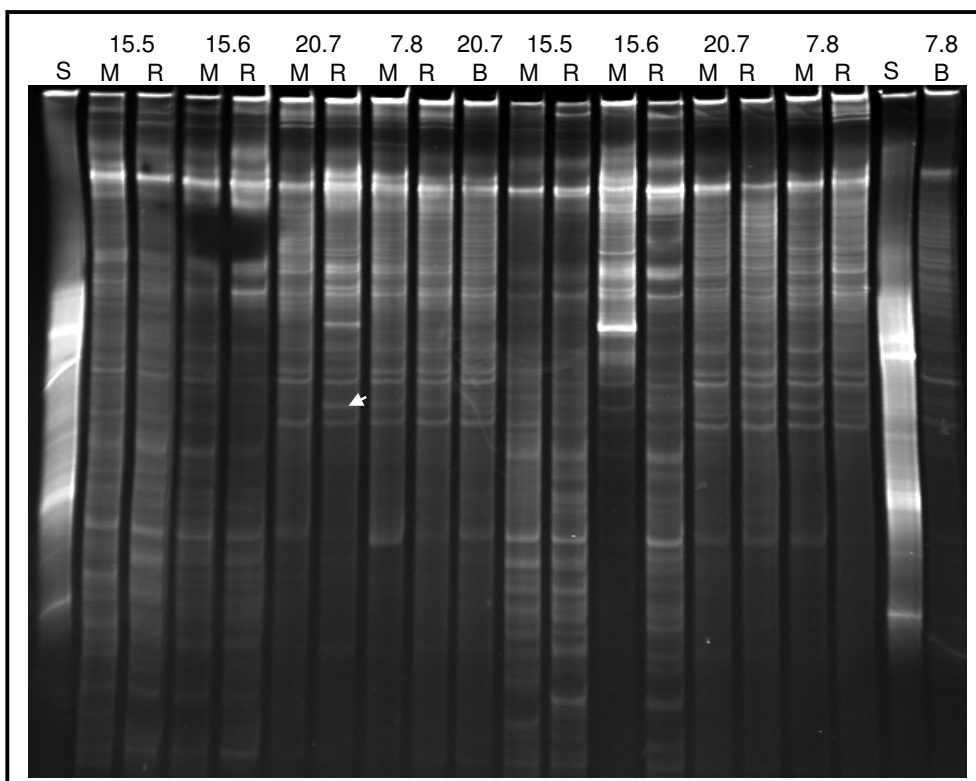


Abbildung 10: Veränderung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora an den Wurzeln von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ mit der Entwicklung der Pflanzen im Versuchsjahr 2001. DGGE-Gel. Entwicklungsstadium zu den Probenahmenterminen: Jungpflanzen (15.5.2001), Blüte (15.6.2001), Fruchtansatz (20.7.2001) und Reife (7.8.2001).

Legende: S Standard, B wurzelferner Boden, M ‚Monty‘, R ‚Rainbow‘. Der Pfeil markiert eine Bande, die Mikroorganismen repräsentiert, die nur im Juli und August häufig genug sind, um als erkennbare Bande abgebildet zu werden.

Alle untersuchten Umweltfaktoren gemeinsam können 18,7% der Unterschiede im DGGE-Bandenmuster der Aktinomyceten erklären (Tab. 13). Allerdings kann keiner der untersuchten Umweltfaktoren allein mit einem Teil der Unterschiede signifikant korreliert werden.

In diesem Feldversuch wuchsen beide Sorten zunächst einheitlich, nach der Blüte war aber nur noch bei ‚Rainbow‘ eine Massenzunahme zu verzeichnen. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre war zu den ersten drei Probennahmeterminen hoch, allerdings niedriger als im Vorjahr, und nahm zur Reife hin stark ab. Die Artenzusammensetzung von pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen veränderte sich mit der Zeit. Dabei sind bei den Eukaryota die Veränderung in der Artenzusammensetzung mit Veränderungen der Bodenfeuchte und der Trockenmasse der Pflanze korreliert. Bei den Bakterien war ein deutlicher Einfluss der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zu beobachten.

Tabelle 9: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei einem Feldversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Versuchsjahr 2000. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE der DNA von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster (100%). In Klammern stehen Erklärungen, die nur bei stärkerer Berücksichtigung der schwächeren Banden, bzw. schwächer genutzten Substrate durch logarithmische Transformation der Daten signifikant werden. ns = nicht signifikant ($\alpha = 0,1$)

Organismen- gruppe	<i>Erklärter</i> Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede [%]				
	Zeit	Bodenfeuchte	Trockenmasse	PEITC- Konzentration	alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	5	ns	ns	4	19,5
Aktinomyceten	ns	ns	ns	ns	18,7
Eukaryota	6	(5)	(5)	ns	18,9

Im Vergleich der beiden Feldversuche mit Sommerraps in den Jahren 2000 (4.2.2.1) und 2001 (4.2.2.2) fällt auf, dass die Rapspflanzen im Jahr 2000 eine höhere Trockenmasse und eine höhere PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre erreichten als im Folgejahr. Ursache hierfür war vermutlich die zusätzliche Düngung im Jahr 2000. Zusätzlich könnte die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre durch den Insektenbefall erhöht worden sein. Im Gegensatz zum Winterraps fiel die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bei beiden Sommerrapsorten erst zur Reife. In beiden Versuchen hatte die PEITC-Konzentration einen Einfluss auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien. Auch in der Rhizosphäre des Sommerrapses änderte sich trotz des Fehlens einer winterlichen Ruhephase die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit. Im klimatisch etwas abwechslungsreicheren Sommer 2001 war diese Veränderung der Rhizosphärenmikroflora

mit der Zeit bei Bakterien und Eukaryota zu erkennen, im Sommer 2000 war dieses nur für die prokaryotische Mikroflora nachzuweisen. Die Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen ist in beiden Versuchen mit der Sprosstrockenmasse korreliert.

Da bei den Feldversuchen mit Sommerraps nur eine Probennahme vor der Blüte erfolgt ist und daher die Veränderung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre mit der Entwicklung der Pflanze nur bruchstückhaft dokumentiert ist, sollte die Veränderung der PEITC-Konzentration von der Keimung bis zur Blüte in einem Gewächshausversuch dargestellt werden.

4.2.2.3 Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von der Keimung bis zur Blüte

In einem Gewächshausversuch soll die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre einer Sommerrapsorte, ‚Rainbow‘ verfolgt werden. Dadurch soll die Frage geklärt werden, ob beim Sommerraps wie beim Winterraps ein Maximum der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre vor der Blüte existiert. Der Versuchansatz ist unter 3.2.2.3 beschrieben.

Neun Tage nach der Aussaat werden an den ersten Keimlingen Proben genommen. Die Pflanzen entwickeln sich zügig innerhalb der folgenden 58 Tage zur Blüte (Abb. 11).

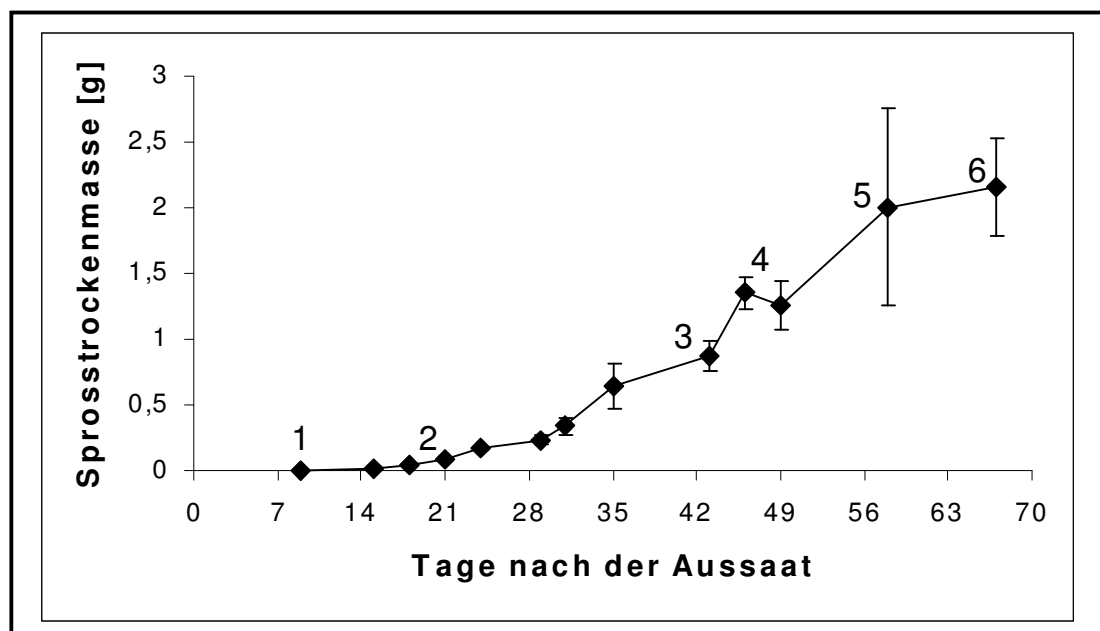


Abbildung 11: Zunahme der Sprosstrockenmasse [g] mit der Zeit von ‚Rainbow‘ bei Gewächshauskultur. Aussaat am 5.3.2001. Die Entwicklungsstadien sind mit Zahlen markiert: 1 Keimling, 2 Dreiblattstadium, 3 erster Knospenansatz, 4 Schossen, 5 Knospen und 6 Blüte. Mittelwerte aus vier Parallelen \pm Standardabweichung.

Bei Keimlingen ist noch kein PEITC in der Rhizosphäre nachzuweisen (Abb. 12). Im Dreiblattstadium beginnt die PEITC-Konzentration anzusteigen. Die PEITC-Konzentration steigt bis zur Blüte. Kurz nach dem Dreiblattstadium scheint die PEITC-Konzentration wieder zu sinken. Allerdings ist die niedrigste PEITC-Konzentration nach dem Dreiblattstadium nicht signifikant kleiner als die höchste Konzentration während des Dreiblattstadiums, so dass hier nicht von einem ersten Maximum gesprochen werden kann. Zum Knospenansatz wird eine höhere PEITC-Konzentration gemessen, als während des Schossens. Allerdings wird auch dieser Unterschied nicht signifikant. Daher kann angenommen werden, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beim Sommerraps vom Dreiblattstadium bis zur Blüte kontinuierlich ansteigt. Die höchste PEITC-Konzentration (1989 pmol g^{-1}) wird zur Blüte gemessen.

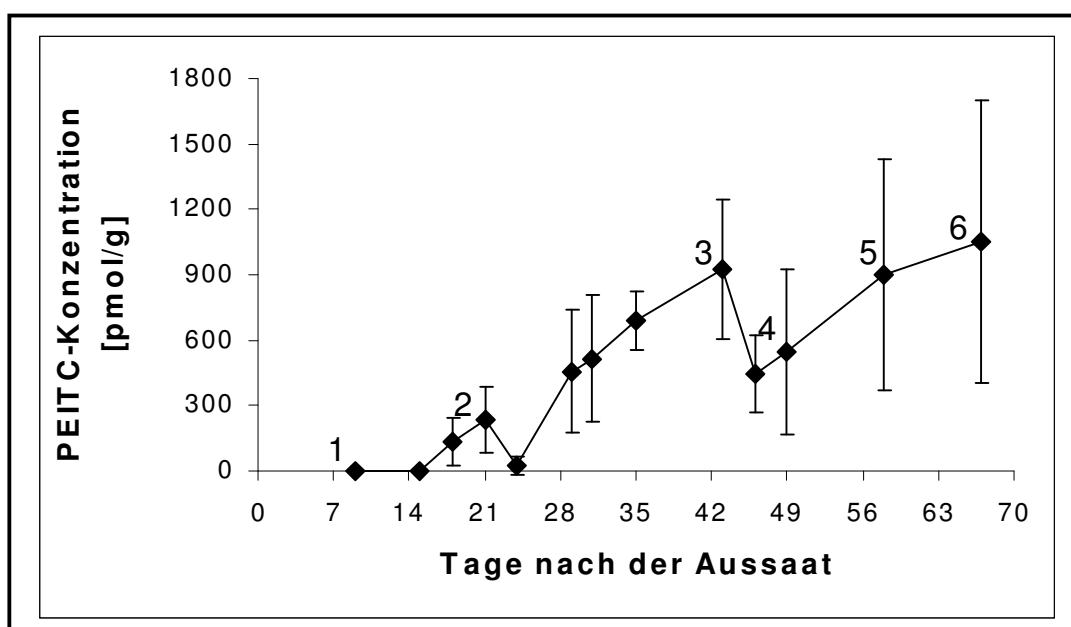


Abbildung 12: Zunahme der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] mit der Zeit von ‚Rainbow‘ bei Gewächshauskultur. Aussaat am 5.3.2001. Die Entwicklungsstadien sind mit Zahlen markiert: 1 Keimling, 2 Dreiblattstadium, 3 erster Knospenansatz, 4 Schossen, 5 Knospen und 6 Blüte. Mittelwerte aus vier Parallelen \pm Standardabweichung.

4.2.3 Zusammenfassung

Die unter 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Feld und Gewächshausversuche zeigen, dass sich die PEITC-Abgabe in den Wurzelraum während der Entwicklung der Pflanze ändert. Keimlinge von Sommer- und Winterraps geben noch keine messbaren Mengen PEITC in die Rhizosphäre ab. Schon im Dreiblattstadium steigt die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre deutlich an. Bei Winterraps gibt es in diesem frühen Stadium ein erstes Maximum der PEITC-Konzentration, die dann über den Winter wieder sinkt. Beim Schossen ist beim Winterraps ein zweites Maximum zu beobachten, anschließend sinkt die PEITC-Konzentration bis zur Reife kontinuierlich ab. Bei Sommerraps dagegen steigt die PEITC-

Konzentration vom Dreiblattstadium bis zur Blüte ohne Zwischenmaxima an. Die PEITC-Konzentration bleibt dann während des Fruchtansatzes auf dem hohen Niveau bestehen und sinkt erst zur Reife wieder deutlich ab.

Die Versuche ergeben Hinweise, dass auch Düngung, Witterung und Schädlingsbefall die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beeinflussen. Denn im Versuchszeitraum 1999/2000, der sich durch einen wärmeren Winter, Insektenbefall im Frühjahr und eine zusätzlichen Düngung vom Versuchszeitraum 2000/2001 unterschied, wurden erheblich höhere PEITC-Konzentrationen in den Rhizosphären von Sommer- und Winterraps erreicht. Unter Feldbedingungen unterscheiden sich die mittleren PEITC-Konzentrationen, die in der Rhizosphäre von glucosinolatarmen und -reichen Sorten gemessen werden, nicht.

In den Feldversuchen mit Sommer- und Winterraps zeigt sich deutlich, dass sich die Rhizosphärenmikroflora mit der Zeit ändert. Dieser Einfluss wird vor allem bei den Winterrapsversuchen deutlich, wo der Versuchszeitraum die jahreszeitlichen Veränderungen von Herbst bis Sommer einschließt. Dabei wird an pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen deutlich, dass abiotische Veränderungen wie die Bodenfeuchte die Artenzusammensetzung beeinflussen. Aber auch die physiologischen Veränderungen der Pflanze im Laufe der Zeit wie die Pflanzenmasse und der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre verändern die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora. Der Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Rhizosphärenmikroflora ist dabei etwa gleichwertig mit dem von Pflanzenmasse oder Bodenfeuchte anzusehen.

Die im Kapitel 4.2 beschriebenen Versuche zeigen, dass sich in der Rhizosphäre vom Raps im Laufe der Zeit von der Keimung bis zur Reife die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora ändert. Diese Veränderung wird von der Veränderung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre mit der Entwicklung der Pflanzen mitverursacht. Mit den im Folgenden beschriebenen Versuchen soll untersucht werden, ob innerhalb eines einheitlichen Zeitfensters durch räumliche Unterschiede in der PEITC-Konzentration innerhalb der Rhizosphäre einer Pflanze unterschiedliche Selektionsbedingungen für Mikroorganismen nebeneinander bestehen.

4.3 Räumliche Unterschiede der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Mikroflora in der Rhizosphäre

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen wird untersucht, ob in der PEITC-Konzentration und der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora innerhalb des Wurzelsystems einer einzelnen Pflanze Unterschiede auftreten. Dafür werden die PEITC-Konzentration und die Diversität der pro- und eukaryotischen Bodenmikroflora in der Rhizosphäre von Seitenwurzeln erster und zweiter Ordnung und im wurzelfernen Boden untersucht. Außerdem soll die Wirkung der PEITC-Konzentration auf die aktiv wachsende Rhizosphärenmikroflora untersucht und von der auf die Gesamtmikroflora abgesetzt werden. Die Untersuchungen werden an den bereits in den Versuchen 3.2 auf die zeitliche Entwicklung von PEITC-Konzentration und Rhizosphärenmikroflora-Zusammensetzung hin betrachteten Winter- und Sommerrapsorten durchgeführt.

4.3.1 Rhizotronversuch mit Winterraps

Die beiden Winterrapsorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ werden vom Dreiblattstadium an 21 Tage lang in Rhizotronen mit Versuchsfeldboden im Gewächshaus kultiviert. Zur Markierung der aktiven prokaryotischen und eukaryotischen Arten wird die zugängliche, nach unten weisende Bodenoberfläche 48 h vor der Probennahme mit BrdU-Lösung bestrichen. Je drei Parallelen pro Sorten werden untersucht. Das Vorgehen ist unter 3.3.1 genauer beschrieben.

Beide Sorten erreichen eine Sprosstrockenmasse von $1,22 \pm 0,23$ g. Die Bodenfeuchte in den Rhizotronen beträgt zur Probennahme $15,4 \pm 2,3\%$. Während in der Rhizosphäre von ‚Emerald‘ kein PEITC nachzuweisen ist, wird bei ‚Mohikan‘ die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre der Seitenwurzeln 1. Ordnung etwas höher als bei Seitenwurzeln 2. Ordnung (Abb. 14). Die höchste PEITC-Konzentration um Seitenwurzeln 1. Ordnung beträgt 1079 pmol g^{-1} . In dem von den Wurzeln entfernten Boden sind Spuren von PEITC nachzuweisen.

Die mit der DGGE dargestellte Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien ändert sich mit der Sprosstrockenmasse und der Bodenfeuchte (Tab. 14). Werden nur die Proben aus den mit ‚Mohikan‘ bepflanzten Rhizotronen betrachtet, so ist ein deutlicher Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Artenzusammensetzung der Bakterien in der Rhizosphäre zu erkennen (12% Unterschiedserklärung).

Die Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Bakterien, die in den letzten 48 h vor der Probennahme DNA synthetisiert haben, sind mit der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Bodenfeuchte korreliert (Tab. 14). Hierbei ist die PEITC-Konzentration der Faktor, der den größten Anteil an Unterschieden allein erklärt. Im Bandenmuster der mit BrdU markierten DNA aktiver Rhizosphärenbakterien treten Banden auf, die in der

Darstellung der Gesamtbakteriengesellschaft nicht zu erkennen sind (Abb. 13). Umgekehrt erscheinen im Bandenmuster der Gesamtbakteriengesellschaft einige Banden, die in der Darstellung der aktiven Rhizosphärenbakterien nicht oder nur schwach sichtbar sind. Dieses ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass einige der im DGGE-Bandenmuster der Gesamtbakteriengesellschaft erkennbare Daten von inaktiven Dauerstadien stammen.

Beide Rapssorten unterscheiden sich in der mit DGGE dargestellten Artenzusammensetzung der gesamten Rhizosphäreneukaryota (Tab. 14). Außerdem sind die Unterschiede der Artenzusammensetzung mit der Sprosstrockenmasse korreliert.

Die eukaryotischen Mikroorganismen, die in den letzten 48 h vor der Probennahme DNA synthetisiert haben, sind in ihrer Artenzusammensetzung von der PEITC-Konzentration im Boden, der Sprosstrockenmasse der Pflanzen und der Bodenfeuchte abhängig (Tab. 14). Allerdings sind keine sortenspezifischen Unterschiede in der Artenzusammensetzung der aktiven eukaryotischen Mikroorganismen zu beobachten.

Das Substratnutzungsmuster variiert mit der Sorte und Veränderungen in der Sprosstrockenmasse und der Bodenfeuchte (Tab. 14). Die PEITC-Konzentration hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Substratnutzung.

Tabelle 14: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der aktiven und der gesamten Rhizosphärenmikroflora bei einem Rhizotronversuch mit ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ im Gewächshaus. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE von pro- und eukaryotischer DNA und Substratnutzungsmuster auf BIOLOG® ecoplates. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster bzw. der Substratnutzungsmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster (100%). Die DNA der in den letzten 48 h aktive Mikroflora wurde mit BrdU markiert. ns = nicht signifikant ($\alpha = 0,1$)

Analyse	<i>Erklärter Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede</i> [%]				
	Sorte	Bodenfeuchte	Sprosstrockenmasse	PEITC-Konzentration	Alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	ns	5	10	ns	39,8
aktive Bakterien	6	9	ns	10	38,0
Eukaryota	10	ns	6	ns	39,7
aktive Eukaryota	ns	6	8	8	34,0
Substratnutzung	18	25	25	ns	67,4

Dieser Versuch zeigt, die PEITC-Konzentration um die Seitenwurzeln 1. Ordnung etwas höher als um Seitenwurzeln 2. Ordnung. Innerhalb des Wurzelsystems einer Pflanze sind daher je nach Wurzelzone unterschiedliche Selektionsbedingungen in der Rhizosphäre anzunehmen. Allerdings ist nur in der Rhizosphäre von 'Mohikan' PEITC nachweisbar. Die PEITC-Konzentration hat einen starken Einfluss auf die aktive Rhizosphärenmikroflora, der sich bei einer Betrachtung der Gesamtrhizosphärenmikroflora nicht erkennen lässt. Die Artenzusammensetzung der aktiven Rhizosphärenmikroflora unterscheidet sich deutlich von der Gesamtrhizosphärenmikroflora. Außerdem beeinflussen Sorte, Bodenfeuchte und Pflanzenmasse die Zusammensetzung und die Substratnutzung der Rhizosphärenmikroflora stark.

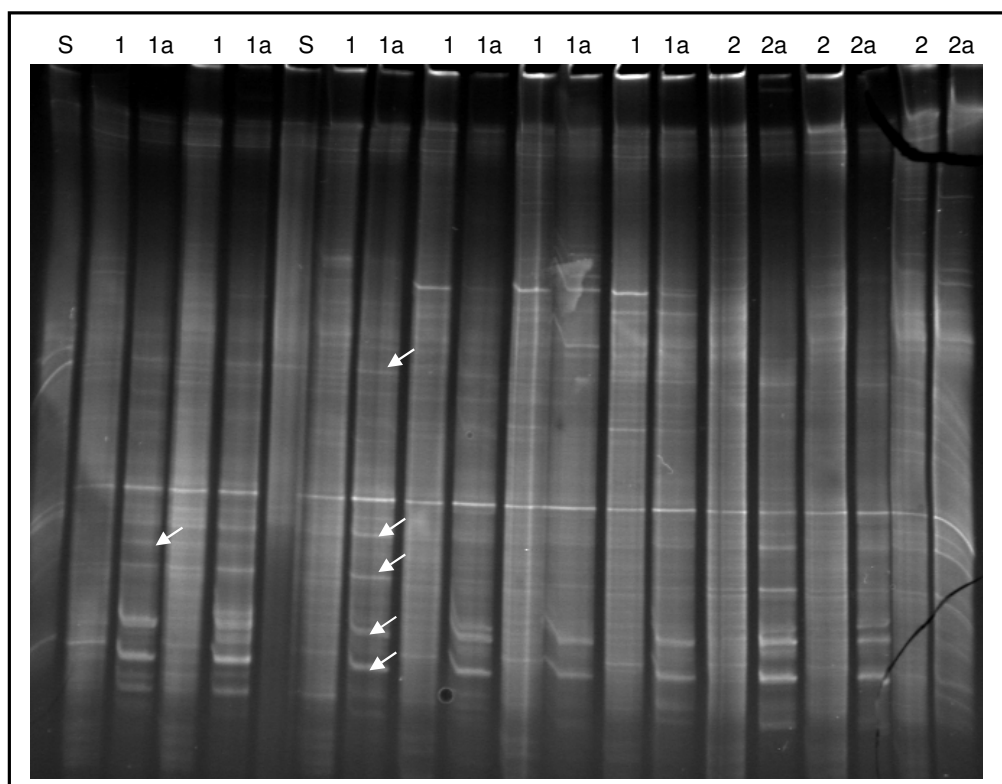


Abbildung 13: Unterschiede in der Zusammensetzung der gesamten bakteriellen Mikroflora und der in den letzten 48 h aktiven bakteriellen Mikroflora in Rhizosphäre von Seitenwurzeln 1. Ordnung und 2. Ordnung bei ‚Emerald‘ in Gewächshauskultur. Darstellung der bakteriellen Mikroflora mit der DGGE. Die DNA aktiver Bakterien wurde mit BrdU markiert.

Legende: S Standard, 1 Bandenmuster aller Bakterien an Seitenwurzeln 1. Ordnung, 1a Bandenmuster aktiver Bakterien an Seitenwurzeln 1. Ordnung, 2 Bandenmuster aller Bakterien an Seitenwurzeln 2. Ordnung, 2a Bandenmuster aktiver Bakterien an Seitenwurzeln 2. Ordnung. Die Pfeile weisen auf Banden hin, die nur bei der aktiven Rhizosphärenmikroflora erkennbar sind.

4.3.2 Rhizotronversuch mit Sommerraps

Die beiden Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden 21 Tage lang vom Dreiblattstadium an in Rhizotronen mit Versuchsfeldboden im Gewächshaus kultiviert. Zur

Markierung der aktiven pro- und eukaryotischen Mikroflora wird die Substratunterseite 48 h vor der Probennahme mit BrdU-Lösung bestrichen. Je drei Parallelen pro Sorten werden untersucht. Das Vorgehen ist unter 3.2.2 genauer beschrieben.

Die Bodenfeuchte zur Probennahme beträgt $12,9 \pm 3,3\%$. Beide Sorten erreichen eine Sprosstrockenmasse von $0,72 \pm 0,08$ g. Dabei ist das Wurzel/Sprossverhältnis von ‚Monty‘ mit $0,22 \pm 0,07$ signifikant niedriger als das von ‚Rainbow‘ mit $0,55 \pm 0,15$.

Die Konzentration und die Verteilung von PEITC in den Rhizosphären von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ sind ähnlich (Abb. 14). Hierbei ist die PEITC-Konzentration um Seitenwurzeln 1. Ordnung signifikant höher als in der Rhizosphäre von Seitenwurzeln 2. Ordnung. Im wurzelfernen Boden kann kein PEITC nachgewiesen werden.

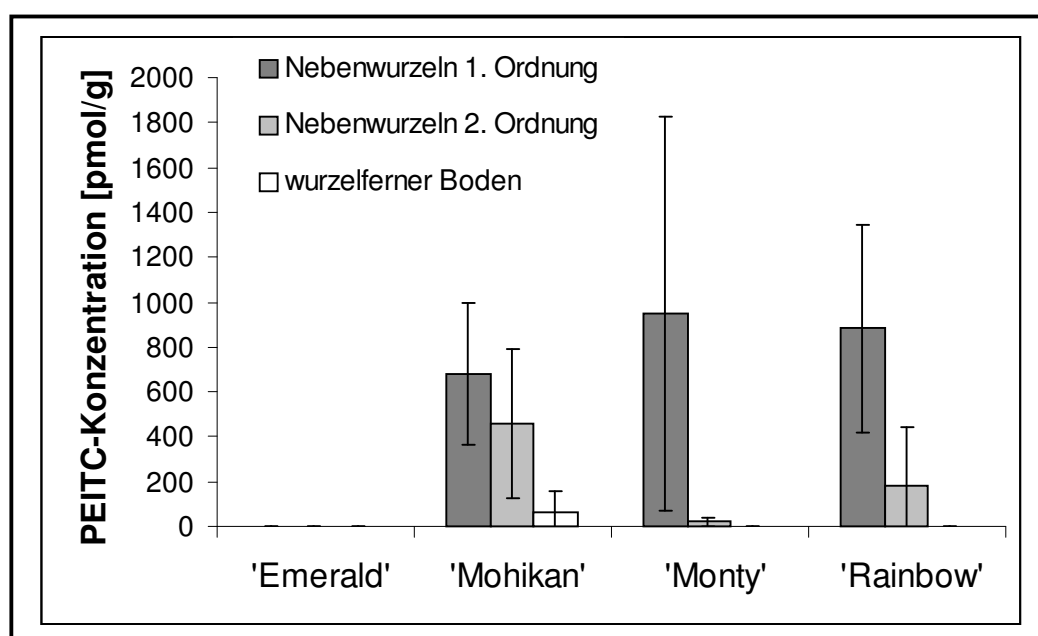


Abbildung 14: Unterschiede der PEITC-Konzentration bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] in der Rhizosphäre von Seitenwurzeln 1. Ordnung und Seitenwurzeln 2. Ordnung und dem wurzelfernen Boden bei den Winterrapssorten ‚Emerald‘ und ‚Mohikan‘ und den Sommerrapssorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 21 Tagen Gewächshauskultur in Rhizotronen. Mittelwerte aus drei Parallelen mit Standardabweichung

Die mit der DGGE detektierten Unterschiede der gesamten bakteriellen Rhizosphärenmikroflora werden von der Kombination der untersuchten Umweltparameter nur zu 16,9% erklärt (Tab. 15). Von den Unterschieden in den Bandenmustern der in den letzten 48 h aktiven Bakterien werden 34,3% von der Kombination der untersuchten Umweltparameter erklärt. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ist der einzige Faktor, der, allein betrachtet, signifikant mit einem Teil der beobachteten Unterschiede in der Artenzusammensetzung der aktiven Bakterien korreliert ist. Demnach hat PEITC im

Vergleich zu den anderen untersuchten Faktoren einen sehr starken Einfluss auf die bakterielle Rhizosphärenmikroflora.

Die mit der DGGE darstellbare Artenzusammensetzung der gesamten eukaryotischen Mikroflora erscheint als deutlich von der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beeinflusst (Tab. 15). Hierbei stellt die PEITC-Konzentration den einzigen der untersuchten Umweltparameter dar, der für sich betrachtet einen Teil der beobachteten Unterschiede in der Artenzusammensetzung erklärt. Bei den Eukaryota, die in den letzten 48 h vor der Probennahme DNA synthetisiert haben, sind die Unterschiede in der Artenzusammensetzung stark mit der Bodenfeuchte korreliert, nicht aber mit der PEITC-Konzentration.

Tabelle 15: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der aktiven und der gesamten Rhizosphärenmikroflora bei einem Rhizotronversuch mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Gewächshaus. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE von pro- und eukaryotischer DNA und Substratnutzungsmuster auf BIOLOG® ecoplates. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster bzw. der Substratnutzungsmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster bzw. Substratnutzungsmuster (100%). Die DNA der in den letzten 48 h aktive Mikroflora wurde mit BrdU markiert. ns = nicht signifikant ($\alpha \bullet 0,1$)

Analyse	<i>Erklärter</i> Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede [%]					
	Sorte	Wurzelzone	Bodenfeuchte	Sprosstrockenmasse	PEITC-Konzentration	alle geprüften Umweltfaktoren
Bakterien	ns	ns	ns	ns	ns	16,8
aktive Bakterien	ns	ns	ns	ns	5	34,3
Eukaryota	ns	ns	ns	ns	9	29,6
aktive Eukaryota	ns	ns	11	ns	ns	43,0
Substratnutzung	7	15	ns	11	ns	63,1

Die Unterschiede im Substratnutzungsmuster sind mit Faktoren korreliert, die keinem erkennbaren Zusammenhang mit den mit der DGGE dargestellten Unterschieden im Artenspektrum stehen. Die Substratnutzungsmuster werden von der Wurzelzone, der Sorte sowie der Sprosstrockenmasse beeinflusst. Die Substratnutzungsmuster unterscheiden sich von Rhizotron zu Rhizotron einer Sorte, was auf einen Einfluss individueller Unterschiede der Pflanzen auf ihre Rhizosphärenmikroflora schließen lässt.

Dieser Versuch mit den beiden Sommerrapssorten zeigte, dass sich in der Rhizosphäre beider Sorten vergleichbare Konzentrationen an PEITC nachweisen lassen. Die PEITC-

Konzentration um die Seitenwurzeln 1. Ordnung ist deutlich höher als um Seitenwurzeln zweiter Ordnung. Die PEITC-Konzentration hat einen starken Einfluss auf die aktive pro- und eukaryotische Rhizosphärenmikroflora. Die Betrachtung aller Rhizosphärenbakterien lässt keinen Einfluss des PEITC erkennen. An den Unterschieden des Substratnutzungsmusters wird der Einfluss von Sorte und Wurzelzone auf die Rhizosphärenmikroflora deutlich. Außerdem zeigt sich im Substratnutzungsmuster, dass auch individuelle Unterschiede von Pflanze zu Pflanze die Rhizosphärenmikroflora stark beeinflussen.

4.3.3 Zusammenfassung

An der Winterrapsorte ‚Mohikan‘ und der Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ wird dieselbe räumliche Verteilung von PEITC in der Rhizosphäre beobachtet. Dabei ist die PEITC-Konzentration in der direkten Umgebung von Seitenwurzeln 1. Ordnung höher als um Seitenwurzeln 2. Ordnung. Im wurzelfernen Boden sind höchstens Spuren von PEITC nachzuweisen.

In der Rhizosphäre einer Rapspflanze bestehen zur selben Zeit durch die Unterschiede in der PEITC-Konzentration unterschiedliche ökologische Nischen nebeneinander. Dabei wird die Wirkung von PEITC auf die Rhizosphärenmikroflora vor allem an den Mikroorganismen sichtbar, die in den letzten 48 h vor der Probenahme noch DNA synthetisiert haben. Bei einer Betrachtung der Gesamtmikroflora, zu der auch inaktive Dauerstadien gehören und sich in der Artenzusammensetzung von der aktiven Rhizosphärenflora stark unterscheiden, ist ein Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Artenzusammensetzung oft nicht zu erkennen.

Neben der PEITC-Konzentration im Boden haben auch die Bodenfeuchte, die Sorte, die Wurzelzone und Sprosstrockenmasse Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora, was vor allem an Unterschieden im Substratnutzungsmuster erkennbar wird.

Die unter 4.2 und 4.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Raps die Artenzusammensetzung der aktiven pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen stark beeinflusst. Langfristig kann dieses zu einer Veränderung der Artenzusammensetzung der gesamten Rhizosphärenmikroflora führen. Mit den beiden unter 4.4 vorgestellten Versuchen soll die Frage geklärt werden, ob der Einfluss, den die Rapswurzel auf die Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora nimmt, auch nach dem Wachstum der Wurzeln im Boden bestehen bleibt.

4.4. Langfristige Auswirkung des durch PEITC vermittelten Einflusses der Rapswurzel auf die Bodenmikroflora

Die beiden im folgenden beschriebenen Versuchen sollen die Fragestellung klären, in wie weit der Einfluss, den die Rapswurzeln während des Wachstums auf die Bodenmikroflora genommen haben, auch nach Wachstum einer Folgekultur auf demselben Substrat noch erkennbar ist. Hierfür werden eine glucosinolatarme und eine glucosinolatreiche Rapsorte auf Versuchsfeldboden angezogen (Vorkultur) und nach der ersten Probennahme die selben Rapsorten noch einmal auf dem Substrat der selben und der jeweils anderen Sorte kultiviert (Folgekultur). Dieses Vorgehen soll ermöglichen, den Einfluss des PEITCs auf die Bodenmikroflora während des Wurzelwachstums mit dem PEITC vermittelten Einfluss einer Vorkultur zu vergleichen.

4.4.1 Folgeversuch A

4.4.1.1. Vorkultur A

Die Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden über 32 Tage in sechs Parallelen auf Versuchsfeldboden im Gewächshaus kultiviert. Der Versuchsansatz ist unter 3.4.1.1 beschrieben.

Beide Sorten erreichen ähnliche Sprosstrockenmassen (Tab. 16). Die Bodenfeuchte ist bei ‚Monty‘ geringer als bei ‚Rainbow‘. Die Bodenfeuchte der unbepflanzten Kontrolle ist wesentlich höher. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von ‚Monty‘ ist etwas (nicht signifikant) niedriger als bei ‚Rainbow‘. Dabei schwankt die PEITC-Konzentration bei ‚Monty‘ zwischen Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze und 2694 pmol g^{-1} . Bei ‚Rainbow‘ werden maximal 4732 pmol g^{-1} und minimal 790 pmol g^{-1} PEITC in der Rhizosphäre gemessen. Bei beiden Sorten ist die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre weder mit der Bodenfeuchte noch mit der Sprosstrockenmasse der Pflanzen korreliert.

Tabelle 16: Bodenfeuchte [% (g/g)], Sprosstrockenmasse [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 32 Tagen Gewächshauskultur auf Versuchsfeldboden. Mittelwerte von sechs Parallelen mit Standardabweichung.

Sorte	Bodenfeuchte [%]	Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg]	PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}]
‚Monty‘	$7,8 \pm 1,5$	776 ± 87	1665 ± 1127
‚Rainbow‘	$12,3 \pm 3,7$	764 ± 200	2891 ± 1282
Kontrolle	20,5	-	0

Die mit DGGE detektierten Unterschiede der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora aller Proben zusammen sind mit keinem der untersuchten Umweltparameter allein signifikant korreliert. Werden die Rhizosphärenmikroflora beider Sorten einzeln betrachtet, so lassen

Die Unterschiede in der mit BIOLOG[®]-Ecoplates dargestellten funktionellen Diversität lassen sich zu 24% durch die Bodenfeuchte erklären. Werden die Sorten einzeln betrachtet, so lassen sich bei ‚Monty‘ 38% aller Unterschiede durch die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre erklären. Hierbei bestehen nur negative Korrelationen zwischen Substratnutzung und PEITC-Konzentration. Bei ‚Rainbow‘ hat die PEITC-Konzentration keinen Einfluss auf die funktionelle Diversität.

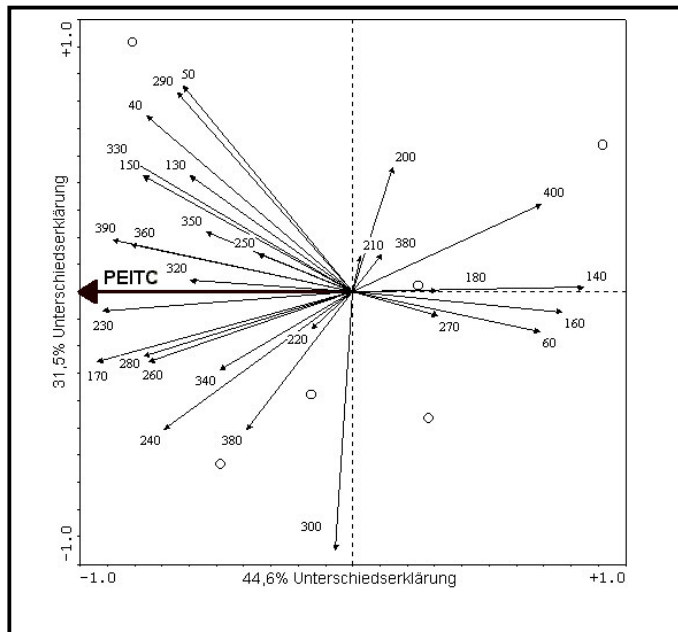


Abbildung 16: Zu- und Abnahme der von Rhizosphärenbakterien in Abhängigkeit von der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bei ‚Rainbow‘ nach 32 Tagen Gewächshauskultur. RDA-Plot der DGGE Peak-Intensitäten. Die mit Zahlen bezeichneten Vektoren stehen für die einzelnen Banden. Je länger ein Vektor ist, desto größer sind die Unterschiede in der Intensität der entsprechenden Bande in den einzelnen Bandenmustern. Der Cosinus des Winkels zwischen zwei Vektoren entspricht dem Korrelationskoeffizienten. Entlang der x-Achse sind 44,6% der insgesamt beobachteten Unterschiede aufgetragen. Diese 44,6% werden von Banden verursacht, deren Intensität mit der PEITC-Konzentration zu- oder abnimmt. Entlang der y-Achse sind weitere 31,5% der insgesamt beobachteten Unterschiede aufgetragen. Diese 31,5% der Unterschiede sind nicht mit der PEITC-Konzentration korreliert.

PEITC hat einen sehr starken Einfluss auf die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora. Dabei scheint die Bedeutung des PEITCs für die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora bei der Sorte ‚Rainbow‘ größer zu sein als bei ‚Monty‘. Denn bei ‚Rainbow‘ werden höhere PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre gemessen und der Einfluss des PEITCs auf die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora ist nur bei ‚Rainbow‘ zu erkennen.

4.4.1.2 Folgekultur A

Im Anschluss an den unter 4.4.1.1. beschriebenen Versuch werden die Sommerrapssorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ in den selben Kulturgefäßen, die noch die Wurzeln aus dem vorherigen Versuch enthalten, 35 Tage im Gewächshaus kultiviert. Dabei wachsen je drei Parallelen einer Sorte auf Substrat, auf dem vorher die selbe Sorte kultiviert wurde, und drei Parallelen auf Substrat mit Vorkultur der jeweils anderen Sorte. Der Versuch ist unter 3.4.1.2 beschrieben.

Beide Sorten erreichen eine ähnliche Sprosstrockenmasse (Tab. 17). Dabei sind jedoch Sprosstrockenmassen bei den Pflanzen mit ‚Rainbow‘ als Vorkultur größer als solche mit Vorkultur ‚Monty‘.

Die Bodenfeuchte liegt bei beiden Sorten und der Kontrolle bei $15 \pm 5\%$. Die Vorkultur hatte keinen Einfluss auf die Bodenfeuchte.

Bei beiden Sorten werden bei hoher Variabilität vergleichbare mittlere PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre gemessen (Tab. 17). Hierbei ist die Varianz der Werte bei ‚Monty‘ größer, denn die niedrigste PEITC-Konzentration liegt unterhalb der Nachweisgrenze, die höchste bei 3159 pmol g^{-1} . Bei ‚Rainbow‘ schwanken die Konzentrationen zwischen 370 pmol g^{-1} und 2504 pmol g^{-1} .

Tabelle 17: Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g^{-1}] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 35 Tagen Gewächshauskultur auf Substrat, auf dem zuvor ‚Monty‘ oder ‚Rainbow‘ kultiviert wurde. Mittelwerte aus drei Parallelen \pm Standardabweichungen.

Vorkultur	Sorte	Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg]	PEITC-Konzentration [pmol g^{-1}]
‚Monty‘	‚Monty‘	654 ± 12	1814 ± 1234
	‚Rainbow‘	742 ± 60	994 ± 948
‚Rainbow‘	‚Monty‘	694 ± 76	701 ± 287
	‚Rainbow‘	785 ± 104	1751 ± 908

Von den mit der DGGE dargestellten Unterschieden der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien können mit der RDA insgesamt 43% anhand der untersuchten und vorgegebenen Umweltparameter erklärt werden. Dabei ist die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre mit 13% Unterschiedserklärung der wichtigste Faktor. Dagegen wird kein Einfluss von Sorte, Vorkultur, Bodenfeuchte und Sprosstrockenmasse auf die Rhizosphärenbakterien festgestellt, der sich unabhängig von den Einflüssen der jeweils anderen Parametern erkennen ließe.

Bei den eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen können 49% der mit der DGGE dargestellten Unterschiede im Artenmuster auf die untersuchten Umweltparameter bezogen werden. Dabei stehen die Trockenmasse der Sprosse und die Vorkultur mit 21% bzw. 10% Unterschiedserklärung am engsten mit dem detektierten Artenmuster in Beziehung. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre für sich genommen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen.

Die Unterschiede im Substratnutzungsmuster der Rhizosphärenproben lassen sich zu 41% durch die Kombination der untersuchten Umweltparameter erklären. Allerdings kann mit keinem der untersuchten Faktoren allein ein Teil der Unterschiede erklärt werden.

4.4.1.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend für die beiden unter 4.4.1.1 und 4.4.1.2. beschriebenen Versuche lässt sich sagen, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre die Artenzusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora bei den Rapsorten ‚Rainbow‘ und ‚Monty‘ sehr stark beeinflusst. Auch auf die eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen wird in Versuch 4.4.1.1 ein Einfluss der PEITC-Konzentration erkennbar. In Versuch 4.4.1.2 zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen Vorkultur, Sprosstrockenmasse und Artenzusammensetzung der Eukaryota ab. Hierbei sind die Rapspflanzen, in deren Substrat sich die Wurzeln der Sorte ‚Monty‘ befanden, kleiner als die mit den Wurzeln der Sorte ‚Rainbow‘ im Substrat.

4.4.2 Folgeversuch B

In dem folgenden Versuch, soll untersucht werden, ob der in Versuch 4.4.1 beobachtete Einfluss der Vorkultur auf die Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen durch den Abbau der im Boden belassenen Wurzeln verursacht wurde oder hauptsächlich auf den Einfluss der lebenden Rapswurzel der Vorkultur zurückzuführen sind. Ferner soll überprüft werden, ob das verringerte Sprosswachstum nach Vorkultur mit der Sorte ‚Monty‘ auf unterschiedliche Nährstoffextraktion der Vorkultur oder auf einen durch die Bodenmikroflora vermittelten Effekt zurückzuführen ist. Schließlich soll die Frage geklärt werden, ob sich der Einfluss auf die Bodenmikroflora, den die Rapswurzel unter anderem durch die Abgabe von PEITC in die Rhizosphäre nimmt, durch die einmalige Zugabe von PEITC simulieren lässt.

4.4.2.1 Vorkultur B

Die Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden 41 Tage in 18 Parallelen auf Versuchsfeldboden im Kulturschrank kultiviert. Die Versuchsbedingungen sind unter 3.4.2.1 beschrieben.

Beide Sorten haben dieselbe Sprosstrockenmasse pro Topf erreicht (Tab. 18). Gleichzeitig hat ‚Rainbow‘ eine deutlich größere Wurzelmasse gebildet. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ist bei ‚Rainbow‘ etwas (nicht signifikant) höher als bei ‚Monty‘. Hierbei wird in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ stets PEITC nachgewiesen, während in der Rhizosphäre von ‚Monty‘ bei 28% der Proben kein PEITC nachweisbar ist. Zwischen den bepflanzten Parallelen und der unbepflanzten Kontrolle gibt es keinen Unterschied der Bodenfeuchte.

Die detektierten Unterschiede in der Artenzusammensetzung der bakteriellen Mikroflora sind mit der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre korreliert (6% Unterschiedserklärung). Das entspricht 35% der insgesamt von allen Umweltparametern erklärten Unterschiede. Daraus lässt sich folgern, dass PEITC im Vergleich zu den anderen untersuchten Umweltparametern einen besonders starken Einfluss auf die bakterielle Mikroflora hat. Dagegen besteht kein erkennbarer Zusammenhang mit der Sprosstrockenmasse, der Bodenfeuchte oder der Rapsorte.

Tabelle 18: Bodenfeuchte [% (g/g)], PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [pmol g⁻¹], Spross- und Wurzelrockenmasse [mg] pro Topf nach Kultur der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ über 41 Tage im Kulturschrank. Mittelwerte von 18 Parallelen ± Standardabweichung.

Sorte	Bodenfeuchte [%]	Sprosstrockenmasse pro Topf [mg]	Wurzelrockenmasse pro Topf [mg]	PEITC-Konzentration [pmol g ⁻¹]
‚Monty‘	9,3 ± 1,3	248 ± 61	109 ± 14	397 ± 415
‚Rainbow‘	9,1 ± 1,8	265 ± 51	265 ± 51	533 ± 351

Die detektierten Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Eukaryota werden nur zu 15% von den untersuchten Umweltparametern erklärt. Hierbei besteht bei der Sorte ‚Rainbow‘ ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Sprosstrockenmasse und der Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen (18% Unterschiedserklärung), der bei ‚Monty‘ nicht zu erkennen ist.

4.4.2.2 Folgekultur B

Die Sommerrapsorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ werden als Keimlinge in das abgeerntete Substrat der Vorkultur 4.4.2.1 eingesetzt und für 21 Tage im Klimaschrank kultiviert. Hierfür sind bei der Hälfte der Töpfe die Wurzeln der Vorkultur aus dem Boden entfernt worden. Der Hälfte der Töpfe mit vorher unbepflanztem Substrat wurde zu Versuchsbeginn einmalig 10 ml 14,83 mol l⁻¹ PEITC-Lösung zugefügt. Je vier Parallelen pro Variante werden untersucht. Die genaue Beschreibung der Versuchsbedingungen findet sich unter 3.4.2.2.

Beide Sorten erreichen eine ähnliche Sprosstrockenmasse (Tab. 19). Allerdings haben die Pflanzen beider Sorten, die auf Substrat mit Vorkultur ‚Monty‘ gewachsen sind, geringere

Sprosstrockenmasse gebildet als die Pflanzen, die auf vorher unbewachsenen Substrat oder nach Vorkultur ‚Rainbow‘ gewachsen sind. Hierbei ist es unerheblich, ob die Wurzeln der Vorkultur aus dem Substrat entfernt worden sind oder nicht. Die Vorkultur mit ‚Rainbow‘ hat keinen negativen Einfluss auf die Bildung von Sprosstrockenmasse. Da der Boden noch Wurzeln von der Vorkultur enthält, die nicht immer klar von denen der Folgekultur zu unterschieden sind, werden die Trockenmassen der Wurzeln nicht näher betrachtet.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ ist höher als bei ‚Monty‘ (Tab. 19). Die Vorkultur mit ‚Rainbow‘ führt, unabhängig davon, ob die Wurzeln im Boden belassen wurden oder nicht, zu einer geringeren PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre als bei allen anderen Bodenvorbehandlungen. Möglicherweise wird in dem Substrat nach Vorkultur mit ‚Rainbow‘ PEITC schneller abgebaut als in den anderen Substraten. Die PEITC-Konzentrationen in den Rhizosphären nach Vorkultur ‚Monty‘, im unbehandelten oder einmalig mit PEITC behandelten Substrat sind ähnlich. In den unbepflanzten Kontrollen ist kein PEITC mehr nachweisbar. Die Bodenfeuchte liegt bei allen Varianten bei $11,9 \pm 2,4$ %.

Tabelle 19: Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg] und PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre bezogen auf das Bodenfrischgewicht [$\mu\text{mol g}^{-1}$] der Sorten ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ nach 21 Tagen Kultur auf unterschiedlich vorbehandelten Substrat. Mittelwerte aus vier Parallelen mit Standardabweichung.

Vorkultur	Vorbehandlung	Sorte	Sprosstrockenmasse pro Pflanze [mg]	PEITC-Konzentration [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
‚Monty‘	Wurzeln im Boden belassen	‚Monty‘	183 \pm 31	727 \pm 492
		‚Rainbow‘	190 \pm 18	837 \pm 532
	Wurzeln entfernt	‚Monty‘	159 \pm 37	687 \pm 370
		‚Rainbow‘	208 \pm 47	825 \pm 429
‚Rainbow‘	Wurzeln im Boden belassen	‚Monty‘	226 \pm 49	109 \pm 119
		‚Rainbow‘	222 \pm 48	508 \pm 442
	Wurzeln entfernt	‚Monty‘	253 \pm 66	505 \pm 237
		‚Rainbow‘	233 \pm 47	469 \pm 202
unbepflanzt	+10 ml $14,83 \text{ mol l}^{-1}$ PEITC	‚Monty‘	220 \pm 49	615 \pm 372
		‚Rainbow‘	190 \pm 49	1117 \pm 357
	unbehandelt	‚Monty‘	265 \pm 35	433 \pm 336
		‚Rainbow‘	199 \pm 33	1241 \pm 415

Die mit DGGE detektierten Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien sind mit der Sprosstrockenmasse der Pflanzen korreliert (Tab. 20). Auch die Sorte als dominanter Faktor und die Vorkultur beeinflussen die Artenzusammensetzung. Die bakteriellen Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur mit ‚Monty‘ oder ‚Rainbow‘ unterscheiden sich voneinander und von denen im vorher

unbewachsenen Substrat. Hierbei ist es auch von Bedeutung, ob die Wurzeln der Vorkultur im Substrat belassen wurden oder entfernt wurden. So unterscheidet sich die bakterielle Rhizosphärenmikroflora bei Vorkultur ‚Monty‘ nur dann von denen in vorher unbewachsenen Substrat, wenn die Wurzeln im Substrat belassen wurden. Bei Vorkultur ‚Rainbow‘ ist unabhängig vom Verbleib der Wurzeln ein Unterschied zu den anderen Behandlungen erkennbar. Kein signifikanter Zusammenhang ist zwischen der aktuellen PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre und der Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora zu erkennen. Nach 21 Kulturtagen ist kein Einfluss einer einmaligen Behandlung mit PEITC-Lösung auf die bakterielle Rhizosphärenmikroflora zu erkennen.

Wie bei den Bakterien beeinflusst die Vorkultur auch die Artenzusammensetzung der Aktinomyceten (Tab. 20). Dabei unterscheidet sich die Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur mit ‚Rainbow‘ immer von allen anderen Varianten. Der Einfluss der Vorkultur ‚Monty‘ ist dagegen nur erkennbar, wenn die Wurzeln im Boden verblieben sind. Die einmalige Behandlung mit PEITC-Lösung hat keine erkennbare Veränderung in der Artenzusammensetzung der Aktinomyceten verursacht. PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, Bodenfeuchte und Sorte haben für sich betrachtet keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Aktinomyceten in der Rhizosphäre.

Tabelle 20: Einfluss von Pflanze und Umwelt auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora nach 21 Tagen Kultur von ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ im Klimaschrank auf unterschiedlich vorbehandeltem Substrat. Analyse der Rhizosphärenmikroflora durch DGGE der DNA von Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der Bandenmuster wurden mit der Redundanzanalyse für jede Analyse einzeln auf die unterschiedlichen Faktoren und ihre Kombination bezogen. Der Anteil an Unterschieden im Bandenmuster, die signifikant mit einem einzelnen oder der Kombination aller Umweltfaktoren korreliert sind, d.h. *erklärt* werden (siehe 2.10), wird in [%] angegeben, bezogen auf die Gesamtheit aller identifizierten Unterschiede im Bandenmuster (100%). ns = nicht signifikant ($\alpha \bullet 0,1$)

Organismen- gruppe	Erklärter Anteil der insgesamt beobachteten Unterschiede [%]				
	Vorkultur	Wurzeln der Vorkultur	Sorte	Sprosstrocken- masse	alle getesteten Umweltfaktoren
Bakterien	6	4	7	6	23,2
Aktinomyceten	3	4	ns	ns	15,4
Eukaryota	3	ns	4	4	15,5

Die mit DGGE detektierbaren Unterschiede in der Artenzusammensetzung der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen sind mit der Sprosstrockenmasse der Pflanzen als dominantem Faktor korreliert (Tab. 20). Sowohl die Sorte, als auch die Vorkultur beeinflussen die Artenzusammensetzung. Die eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur mit ‚Monty‘ unterscheiden sich von allen anderen Varianten. Die Vorkultur ‚Rainbow‘ oder eine einmalige Behandlung mit PEITC führen im Vergleich zum

unbehandelten Substrat zu keiner Veränderung der Artenzusammensetzung. Der Verbleib der Wurzeln im Boden hat keine erkennbare Auswirkung auf die eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen. Wie bei den prokaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen haben auch bei den Eukaryota die Bodenfeuchte und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die Artenzusammensetzung, der aus dem Zusammenspiel der Umweltfaktoren herausgelöst erkennbar wäre.

4.4.2.3 Zusammenfassende Betrachtung der Versuche 4.4.2.1 und 4.4.2.2

Im Vergleich der Versuche 4.4.2.1 (Vorkultur) und 4.4.2.2 (Folgekultur) fällt auf, dass die Pflanzen der Folgekultur, die gedüngt worden sind, eine größere Sprosstrockenmasse gebildet und höhere PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre erreicht haben. Hierbei wird von der Sorte ‚Rainbow‘ mehr PEITC freigesetzt als von ‚Monty‘. Zudem bildet ‚Rainbow‘ auch eine größere Wurzelmasse. Dadurch kann ‚Rainbow‘ ein größeres Bodenvolumen mit einer höheren PEITC-Konzentration beeinflussen als ‚Monty‘.

Bei der Vorkultur (4.4.2.1) wird erkennbar, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre für die Artenzusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora beim Raps von großer Bedeutung ist. Der sortenspezifische Einfluss der Vorkultur auf die pro- und eukaryotische Rhizosphärenmikroflora der Folgekultur bleibt über mindestens 21 Tage bestehen. Die bakterielle Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur mit ‚Rainbow‘ unterscheidet sich auch dann noch von der Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur ‚Monty‘ oder der Rhizosphärenmikroflora im vorher unbewachsenen Boden, wenn die Wurzeln der Vorkultur weitgehend aus dem Boden entfernt worden sind. Während der Vorkultur mit ‚Rainbow‘, der im Vergleich zu ‚Monty‘ mehr PEITC abgebenden Sorte, sind Mikroorganismen, die PEITC abbauen können, besonders gefördert worden. Der Einfluss einer Vorkultur mit ‚Monty‘ auf die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora bleibt ebenfalls zu erkennen, auch wenn der Großteil der Wurzeln aus dem Boden entfernt worden ist. Dieses lässt vermuten, dass der Einfluss, den die Rapswurzeln während ihres Wachstums auf die Bodenmikroflora genommen haben, den Einfluss der langsam im Boden abgebaut werdenden Wurzeln überwiegt. Eine einmalige Zugabe von PEITC führt dagegen nicht zu einer dauerhaften Veränderung der Bodenmikroflora.

Während eine Vorkultur mit ‚Monty‘ zu einem verringerten Sprosswachstum der Folgekultur führt, tritt bei Vorkultur mit ‚Rainbow‘ keine Wachstumshemmung auf. Hierbei sind Unterschiede der Sprosstrockenmasse mit den Unterschieden der Artenzusammensetzung von pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen korreliert. Die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur ‚Monty‘ unterscheidet sich von der nach Vorkultur ‚Rainbow‘ und der im vorher unbepflanzten Boden, die sich ihrerseits nicht erkennbar von einander unterscheiden. Dieses legt die Vermutung nahe, dass sich in der Rhizosphäre von

„Monty“ eukaryotische Mikroorganismen entwickelt haben, die das Wachstum der Folgekultur beeinträchtigen können.

4.4.3 Zusammenfassung der Versuche 4.4.1 und 4.4.2

Im Vergleich der Versuche im Gewächshaus (4.4.1) und im Klimaschrank (4.4.2) fällt auf, dass im Gewächshaus höhere PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre erreicht werden als bei Kultur im Klimaschrank. Ursache hierfür ist möglicherweise, dass den Pflanzen im Klimaschrank weniger Licht zur Verfügung steht als im Gewächshaus. In Versuch 4.4.2 ist die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre der gedüngten Folgekultur höher als bei der ungedüngten Vorkultur. Dieses lässt einen Einfluss der Pflanzenernährung auf die PEITC-Abgabe vermuten. Die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre ist bei „Rainbow“ höher als bei „Monty“. Zudem bildet „Rainbow“ bei gleicher Sprosstrockenmasse eine größere Wurzeltrockenmasse, so dass „Rainbow“ ein größeres Bodenvolumen mit einer höheren PEITC-Konzentration beeinflussen kann als „Monty“.

In beiden Versuchen ist ein starker Einfluss der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora zu beobachten. Der Einfluss der PEITC-Abgabe der Vorkultur lässt sich noch in der Rhizosphäre der Folgekultur nachweisen. In der Rhizosphäre von Pflanzen der Folgekultur, die nach einer Vorkultur mit „Rainbow“ gewachsen sind, ist die PEITC-Konzentration niedriger als nach allen andern Vorbehandlungen des Bodens. Daher lässt sich vermuten, dass während der Vorkultur in der Rhizosphäre von „Rainbow“ Mikroorganismen angereichert werden, die PEITC abbauen können.

Die Artenzusammensetzung aller untersuchten Organismengruppen, Bakterien, Aktinomyceten und Eukaryota, in den Rhizosphären der Folgekulturen unterscheiden sich in Abhängigkeit von den jeweiligen Vorkulturen. Diese Abhängigkeit ist auch dann noch zu erkennen, wenn die Wurzeln der Vorkultur vor dem Einsetzen der Folgekultur aus dem Boden entfernt worden sind. Daraus lässt sich schließen, dass sich die beobachtete Abhängigkeit vor allem auf den Einfluss zurückführen lässt, den die Pflanze während des Wachstums auf die Bodenmikroflora nimmt. Der Einfluss der sich langsam im Boden zersetzenden Wurzeln der Vorkultur auf die Rhizosphärenmikroflora der Folgekultur scheint dagegen von geringerer Bedeutung zu sein. Eine einmalige Zugabe von PEITC genügt nicht, um den Effekt einer Vorkultur zu simulieren.

In beiden Versuchen führt die Vorkultur mit „Monty“ zu einem verringerten Sprosswachstum der Folgekultur. In beiden Versuchen korreliert die Sprosstrockenmasse mit den Unterschieden im Artenspektrum der eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen. Hierbei unterscheidet sich das Artenspektrum der Eukaryota bei Vorkultur „Monty“ erkennbar von

dem auf vorher unbewachsenen Boden oder Boden nach Vorkultur ‚Rainbow‘, die sich ihrerseits nicht erkennbar von einander unterschieden. Das legt die Vermutung nahe, dass sich während der Vorkultur mit ‚Monty‘ eukaryotische Mikroorganismen vermehrt haben, die in der Lage sind, das Wachstum einer Folgekultur zu beeinträchtigen.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Rhizosphäre von glucosinolatarmem und –reichem Sommer- und Winterraps lässt sich fast immer PEITC nachweisen. Die PEITC-Konzentration ist hierbei um feine Wurzeln (Durchmesser • 1 mm) geringer als in der Rhizosphäre von etwas kräftigeren Seitenwurzeln (Durchmesser > 1mm). Zeitlich ändert sich die PEITC-Konzentration mit der Entwicklung der Pflanzen. Hierin unterschieden sich Sommer und Winterraps. Bei Sommerraps steigt die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre vom Dreiblattstadium bis zur Blüte hin an und sinkt erst beim Vertrocknen der Pflanzen zur Reife wieder. Beim Winterraps steigt die PEITC-Konzentration bei den Jungpflanzen im Herbst zunächst stark an, um im Spätherbst und Winter wieder auf ein niedrigeres Niveau herabzufallen. Zum Schossen erreicht die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Winterraps ein zweites Maximum. Bereits zur Blüte sinkt die PEITC-Konzentration beim Winterraps wieder und fällt weiter bis zur Reife.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ist neben der Wurzelzone und dem Entwicklungsstatus der Pflanze von einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängig. Die durchweg sehr hohen Standardabweichungen bei den Messungen der PEITC-Konzentration in den Rhizosphären weisen auf große individuelle Unterschiede in der PEITC-Abgabe hin. Dieser Effekt wird durch den schnellen Abbau von PEITC im Boden verstärkt. Daneben gibt es sortenspezifische Unterschiede in der PEITC-Abgabe. Auch Düngung, eine günstige, klimatische Situation und Insektenbefall scheinen zu höheren PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre zu führen.

Wenn trockener Boden mit wässriger PEITC-Lösung wiederbefeuchtet wird, fördert dies die Entwicklung von -vermutlich- fluoreszierenden Pseudomonaden. Wird PEITC dem feuchten Boden regelmäßig zugegeben, führt eine Konzentration von $> 1323 \text{ pmol g}^{-1}$ bezogen auf das Bodenfrischgewicht zu einer deutlichen, mit der DGGE darstellbaren Veränderung der Artenzusammensetzung von Bodenpilzen und Bakterien. Aktinomyceten reagieren empfindlicher. Diese PEITC-Konzentrationen werden in der Rhizosphäre auch nachgewiesen. Allerdings scheint die Mikroflora in der Rhizosphäre schon durch niedrigere PEITC-Konzentrationen beeinflusst zu werden. Dieser Einfluss ist besonders deutlich, wenn ausschließlich der aktive Teil der Rhizosphäreneukaryota und –bakterien betrachtet wird. Die Veränderungen, die von lebenden Rapswurzeln in der Zusammensetzung der Bodenmikroflora bewirkt werden, bleiben auch nach Entfernen der Wurzeln bestehen.

Die Artenzusammensetzung und die physiologische Diversität der Rhizosphärenmikroflora ändert sich mit der Zeit. Dabei sind abiotische Faktoren wie die Bodenfeuchte ebenso von Bedeutung, wie die Entwicklung der Pflanzen, die zur Veränderung der Masse und der PEITC-Konzentration im Boden führt. Auch abgesehen von zeitlichen Veränderungen hat die Bodenfeuchte einen starken Einfluss auf Substratnutzung und Artenzusammensetzung.

Auffällig ist die häufige Korrelation der Pflanzenmasse mit der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora, vor allem der eukaryotischen. Neben den beschriebenen allgemeinen Veränderungen treten auch individuelle Unterschiede in der Rhizosphärenmikroflora einzelner Pflanzen auf.

PEITC in der Rhizosphäre lebender Rapswurzeln kann also als ein wichtiger Faktor in der Pflanze-Mikroorganismen-Beziehung angesehen werden.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Eintrag Senföles PEITC des durch Rapswurzeln in die Rhizosphäre zu erfassen und dessen Einfluss auf das komplexe System der Rhizosphäre zu untersuchen. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre unterliegt erheblichen Schwankungen. Diese Schwankungen scheinen nicht allein von dem raschen mikrobiellen Abbau des PEITCs im Boden herzurühren, sondern werden auch stark durch den physiologische Zustand der Pflanze bedingt. Unter 5.1 soll daher die Pflanze, die als eine variable, von der Umwelt beeinflusste Komponente des untersuchten System über die PEITC-Abgabe die Bedingungen in der Rhizosphäre verändert, im Mittelpunkt der Betrachtung stehen. PEITC-Konzentrationen, wie sie in der Rhizosphäre des Rapses gemessen werden, können zu einer veränderten Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora führen. Die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroorganismen und die diese beeinflussenden untersuchten Faktoren, vor allem das PEITC, werden unter 5.2 diskutiert. Pflanze und Rhizosphärenmikroflora beeinflussen sich gegenseitig. Unter 5.3 soll die Rolle des PEITCs in der Wechselbeziehung Pflanze-Rhizosphärenmikroflora im Zentrum der Betrachtung stehen.

5.1 Einfluss von endogenen und exogenen Faktoren auf die PEITC-Abgabe bei Raps

Die in der Rhizosphäre nachgewiesenen PEITC-Konzentrationen liegen im weiten Bereich von 10 – 10000 pmol g⁻¹ bezogen auf das Bodenfrischgewicht. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ändert sich im Laufe der Entwicklung der Pflanze. Neben den Veränderungen der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre über die Zeit bestehen in Abhängigkeit von der Wurzelzone auch Bereiche unterschiedlicher PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre einer Pflanze zeitgleich nebeneinander. Deutliche quantitative Unterschiede in der PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre treten auch in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen (Klima, Düngung, Insektenbefall) auf.

5.1.1 Größenordnung der PEITC Abgabe

Die in der Rhizosphäre nachgewiesenen PEITC-Konzentrationen sind um Größenordnungen kleiner als der Gluconasturtingehalt der Wurzeln. Die höchste PEITC-Konzentration, die in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ gemessen wurde, beträgt 4732 pmol g⁻¹ (siehe 4.4.1.1). , Zur Blüte liegt bei ‚Rainbow‘ der mittlere Gluconasturtingehalt der gesamten Wurzel, ohne Unterteilung in Fein- und Grobwurzeln, bei 25 µmol g⁻¹ (KIRKEGAARD, 1999, persönliche Mitteilung).

CHOESIN und BOERNER (1991) wiesen in der Rhizosphäre von Raps Allylisothiocyanat, das aus Sinigrin freigesetzte Senföl, und das in der Rhizosphäre noch ungespalten vorliegende

Sinigrin in Konzentrationen von insgesamt umgerechnet 20 – 5630 pmol g⁻¹ nach. Die Autoren schätzten anhand von Literaturangaben, dass die Glucosinolatgehalte der Wurzeln zwischen 10,4 µmol g⁻¹ und 524 µmol g⁻¹ lagen. Da CHOESIN und BOERNER (1991) auch das im Boden ungespalten vorliegende Sinigrin in die Konzentrationsangaben einbezogen, ist anzunehmen, dass die Konzentration an freiem Allylisothiocyanat in der Rhizosphäre noch geringer ist. KIRKEGAARD et al. (2001) fanden zum Blühbeginn von Sommerraps eine Isothiocyanatkonzentration von maximal 2000 pmol g⁻¹ in der Rhizosphäre bei einer Glucosinolatkonzentration von über 11 µmol g⁻¹ im Wurzelgewebe. Damit entspricht der Unterschied in den Größenordnungen der Konzentrationen von freiem Senföl in der Rhizosphäre und der des zugehörigen Glucosinolates im pflanzlichen Gewebe, wie er auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, den Ergebnissen anderer Autoren.

Die Werte, die in der Literatur zum Glucosinolatgehalt von Pflanzenwurzeln genannt werden, stammen aus Messungen, bei denen das getrocknete Pflanzenmaterial vollständig zerkleinert und anschließend extrahiert wurde (z.B. KIRKEGAARD und SAWAR, 1998; KIRKEGAARD et al., 2001; NICHOLLS et al., 1999). In diese Messungen des Glucosinolatgehaltes geht das gesamte Wurzelgewebe ein. An der Abgabe von PEITC in die Rhizosphäre sind aber vermutlich nur die äußersten Schichten des Wurzelgewebes beteiligt. Sofern die Glucosinolate gleichmäßig auf alle Wurzelgewebe verteilt wären, stünde damit nur ein Bruchteil des in der Wurzel gespeicherten Glucosinolates für die Abgabe in die Rhizosphäre zur Verfügung. Dazu kommt, dass längst nicht alle in den Boden freigesetzten Glucosinolate auch durch die Myrosinase gespalten werden. So werden, wenn entfettetes Rapsmehl in den Boden eingearbeitet wird, nur 19% der Senföl freisetzenden Glucosinolate tatsächlich gespalten (BROWN et al., 1991). Obwohl in der Wurzel die Myrosinaseaktivität höher ist als im übrigen Pflanzengewebe (BONES und ROSSITER, 1996), werden auch im Bereich lebender Wurzeln ungespaltene Glucosinolate freigestellt (ELLIOT und STOWE, 1971). Dieses könnte erklären, weshalb die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre im p bis nmol g⁻¹ Bereich liegt, der Gluconasturtingehalt der Wurzel dagegen im µmol g⁻¹ Bereich.

5.1.2 Wirkung endogener Faktoren auf die PEITC-Abgabe

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ändert sich mit der Entwicklung der Pflanzen. Sommer- und Winterraps unterscheiden sich in dieser Entwicklung (siehe 4.2). Zu Beginn der Entwicklung im Keimlingsstadium ist bei Sommer- und Winterraps noch kein PEITC in der Rhizosphäre nachzuweisen. Bei Jungpflanzen im Dreiblattstadium beginnt bei Sommer- und Winterraps die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zu steigen. Beim Sommerraps steigt die PEITC-Konzentration vom Dreiblattstadium bis zur Blüte an und sinkt erst zur Reife wieder (Tab.12). Beim Winterraps dagegen gibt es ein Maximum der PEITC-Konzentration vor dem Winter. Während des Winters ist die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von Winterraps gering. Zum Schossen erreicht die PEITC-Konzentration beim Winterraps ein zweites Maximum und fällt anschließend zur Reife kontinuierlich ab.

Obwohl nur ein Bruchteil des Glucosinolatgehaltes der Wurzeln in die PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre eingeht, spiegelt die zeitliche Veränderung der PEITC-Konzentration der Rhizosphäre die Entwicklung des Glucosinolatgehaltes im pflanzlichen Gewebe wider. Der Glucosinolatgehalt in Keimlingen und auch der Keimlingswurzeln korreliert stark mit dem der Samen (O'CALLAGHAN et al., 2000). In Samengewebe ist der Anteil an Glucosinolaten mit aromatischen Restgruppen wie das Gluconasturtiin gering (KIRKEGAARD und SAWAR, 1999). Im Pflanzenmaterial von Keimlingen ist kaum Gluconasturtiin nachzuweisen (BUCHNER, 1988). Dem entspricht, dass in der Rhizosphäre von Keimlingen kein PEITC nachgewiesen werden konnte (Abb. 8 und 12). Nach dem Keimlingsstadium besteht kein Zusammenhang mehr zwischen dem Glucosinolatgehalt der Samen und dem der Wurzeln, denn auch Sorten mit glucosinolatarmen Samen können hohe Glucosinolatgehalte in den Wurzeln erreichen (KIRKEGAARD und SAWAR, 1999). Mit der Bildung des dritten und vierten Laubblattes beginnt der Glucosinolatgehalt in jungen Rapspflanzen stark anzusteigen (BUCHNER, 1988). In diesem Stadium steigt auch die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre deutlich an (Abb. 8 und 12). SAWAR und KIRKEGAARD (1998) konnten für Sommerraps eine Zunahme der Glucosinolatkonzentration im Gewebe vom Knospenschieben bis zur Blüte nachweisen, welches der Zunahme der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beim Sommerraps entspricht (Abb. 12). Zur Reife sind im Pflanzenmaterial von Sommer- und Winterraps kaum Glucosinolate nachzuweisen (SAWAR und KIRKEGAARD, 1998), was wiederum den geringen PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre zu diesem Stadium entspricht (Tab. 6, 8, 10 und 12). Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fanden KIRKEGAARD et al. (2001), dass beim Sommerraps schon zum Ende der Blüte die Isothiocyanatkonzentration in der Rhizosphäre parallel zum Glucosinolatgehalt der Wurzel stark absinkt. Dieses war allerdings vor allem bei einer sehr glucosinolatreichen Sorte zu beobachten. Bei der ebenfalls bearbeiteten, glucosinolatarmen Sorte ‚Monty‘ fiel die Isothiocyanatkonzentration von einem geringeren Höchstwert aus langsamer ab (KIRKEGAARD et al., 2001), was den Ergebnissen dieser Arbeit eher entspricht. Bei Winterraps ist die Glucosinolatkonzentration der Wurzel während des Knospenschiebens höher als zur Blüte (SAWAR und KIRKEGAARD, 1998), was sich in dem zweiten Maximum der PEITC-Konzentrationen während des Schossens beim Winterraps widerspiegelt (Abb. 8; Tab. 6 und 8). Die Veränderungen im Glucosinolatgehalt der Wurzeln während der Entwicklung der Pflanzen von der Keimung bis zur Reife hat zur Folge, dass die Pflanzen je nach Entwicklungsstadium unterschiedliche Mengen PEITC in die Rhizosphäre abgeben.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre unterliegt nicht nur einer zeitlichen, sondern auch einer räumlichen Variabilität (siehe 4.3). Um Seitenwurzeln mit einem Durchmesser > 1 mm ist die PEITC-Konzentration höher, als um Wurzeln mit einem Durchmesser • 1 mm (Abb. 14). KIRKEGAARD und SAWAR (1999) unterschieden Seitenwurzeln (Durchmesser > 2 mm) von Feinwurzeln (Durchmesser • 2 mm). Die Seitenwurzeln zeichneten sich durch

einen hohen Gluconasturtiinanteil der Glucosinolate aus. Die Feinwurzeln dagegen enthalten hauptsächlich Indolylglucosinolate und nur einen geringen Anteil an Gluconasturtiin (KIRKEGAARD und SAWAR, 1999). Auch anhand der räumlichen Unterschiede in der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zu einem Zeitpunkt ist zu erkennen, dass sich der Gluconasturtiin Gehalt der Wurzeln in der PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre deutlich widerspiegelt, obwohl nur ein Bruchteil des Gluconasturtiins in der Wurzel tatsächlich gespalten und in die Rhizosphäre abgegeben wird.

In der Phase, in der das stärkste Absterben von Wurzeln und damit auch die Zerstörung der Zellintegrität zu erwarten ist, nach der Blüte und vor allem zur Reife, sinkt die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre. Dieses wird vor allem bei den Untersuchungen am Winterraps erkennbar (Abb. 8). Darin stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch zu den Vermutungen von KIRKEGAARD und SAWAR (1999), dass gerade zur Reife, wenn größere Wurzeln abgebaut werden, die meisten Isothiocyanate freigesetzt werden sollten. Diese Vermutung basiert auf der Annahme, dass Glucosinolate vor allem während des Abbaus von Wurzeln gespalten werden. CHOESIN und BOERNER (1991) dagegen betonen, die Allylisothiocyanatabgabe aktiv wachsender, lebendiger Wurzeln gemessen zu haben. Auch die Beobachtungen von SCHREINER und KOIDE (1993), nach denen *Glomus*-Sporen in Gegenwart lebender, intakter *Brassica*-Wurzeln am Auskeimen gehindert sind, unterstützen die Annahme, dass lebende Wurzeln einen nicht unerheblichen Anteil an der Senfölabgabe in den Boden haben könnten.

5.1.3 Bedeutung exogener Faktoren für die PEITC-Abgabe

Unter kontrollierten Bedingungen gibt die glucosinolatreiche Sorte ‚Rainbow‘ mehr PEITC in die Rhizosphäre ab als die glucosinolatarme Sorte ‚Monty‘ (Tab. 17). Unter Freilandbedingungen lässt sich dieser Unterschied nicht nachweisen (Tab. 10 und 12). Der Einfluss, den die Pflanze durch die PEITC-Abgabe auf ihre Umwelt nimmt, ist also nicht nur von endogenen Faktoren wie dem Entwicklungsstadium, der Wurzelzone oder der Sorte abhängig, sondern auch von exogenen. Von Versuch zu Versuch unterschieden sich die Wachstumsbedingungen der Pflanzen in Hinblick Klima, Strahlung, Düngung und Insektenbefall. Der Einfluss dieser Faktoren auf die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre soll im Folgenden diskutiert werden.

Im Vergleich der Feldversuche mit Winterraps fällt auf, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre nach dem kälteren und längeren Winter 2000/2001 erheblich geringer war als im Vorjahr (Tab. 7 und 9). Kurze Tageslängen, niedrige Temperaturen und geringere Strahlung sind als Faktoren bekannt, die den Glucosinolatgehalt von Rapspflanzen gering halten (KIRKEGAARD et al., 1998). Beispielsweise weist im australischen Herbst kultivierter Raps niedrigere Glucosinolatgehalte in Spross und Wurzel auf als im australischen Frühling ausgesäte Pflanzen derselben Sorten (SAWAR und KIRKEGAARD, 1998). Dementsprechend

hatten vermutlich die Rapspflanzen in der vorliegenden Arbeit in der klimatisch ungünstigeren Wachstumsperiode 2000/2001 weniger Glucosinolate gebildet als die im Vorjahr und konnten daher nur wenig PEITC in die Rhizosphäre abgeben. Die PEITC-Konzentration von Pflanzen, die im Klimaschrank kultiviert wurden, war geringer als die von im Gewächshaus gezogenen Pflanzen der gleichen Sorte (Tab. 16 und 19). Die Pflanzen im Klimaschrank wuchsen mit täglich 16 h Licht der Strahlungsintensität von $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Pflanzen im Gewächshaus erhielten zusätzlich zu dem durch Glasdach- und -wände einfallenden Licht täglich 12 h $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Zusatzbeleuchtung. Das entspricht den Beobachtungen von SAWAR und KIRKEGAARD (1998), nach denen im australischen Freiland, also bei höherer Strahlung, gewachsener Raps mehr Glucosinolate bildete als die zeitgleich im Gewächshaus ohne Zusatzbeleuchtung oder gar bei niedrigen Lichtintensitäten im Phytotron kultivierten Pflanzen gleicher Sorte. Strahlung und Temperatur haben Einfluss auf die Glucosinolatgehalte der Pflanzenwurzeln (KIRKEGAARD et al., 1998) und damit, wie im Vergleich der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche deutlich wird, auch auf die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre der im Klimaschrank ohne Düngung gewachsenen Rapspflanzen war wesentlich geringer als bei der anschließend kultivierten Folgekultur, die eine Düngergabe erhalten hatte (Tab. 18 und 19). Dieses legt den Schluss nahe, dass auch die Ernährung der Pflanzen die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beeinflusst. Hierfür spricht auch, dass die Pflanzenernährung, insbesondere die Schwefelversorgung, großen Einfluss auf den Glucosinolatgehalt der Pflanzen hat (BOOTH und WALTER, 1992; BLAKE-KALFF et al., 1998; WIELEBSKI et al., 1999). Ein niedriges Schwefelangebot im Boden kann den Glucosinolatgehalt von Rapssaatgut bereits erheblich senken, bevor Schwefelmangelerscheinungen oder Wachstumsdepression bemerkbar werden (BOOTH und WALTER, 1992). Ähnliches gilt vermutlich auch für die vegetativen Organe des Raps. Gute Schwefeldüngung dagegen, vor allem in Kombination mit niedrigem Stickstoffangebot, kann den Glucosinolatgehalt in den vegetativen Organen des Rapses stark erhöhen (BLAKE-KALFF et al., 1998). Allerdings wurden trotz Düngung im Klimaschrank nicht so hohe PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre gemessen wie ohne Düngung im Gewächshaus (Tab. 16 und 19). Daher steht zu vermuten, dass auch gute Mineralernährung den Effekt geringer Lichtintensität nicht ausgleichen kann.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ ist bei Kultur im Klimaschrank unter ausreichender Ernährung höher als bei ‚Monty‘ (Tab. 19). Bei schlechterer Ernährung, die auch zu einem deutlich reduzierten Sprosswachstum führt, ist dieser Unterschied nicht zu erkennen (Tab. 18). Sortenspezifische Unterschiede zeigen sich also darin, in wie weit eine Verbesserung der Umweltbedingungen in eine Erhöhung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre umgesetzt werden kann. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von BOOTH und WALTER (1992) und WIELEBSKI et al. (1999), nach denen sortenspezifisch unterschiedliche

Obergrenzen für Schwefeldüngung bestehen, durch die der Glucosinolatgehalt der Rapssamen noch gesteigert werden kann. Ähnliches könnte auch für die vegetativen Organe der Pflanzen und damit indirekt für die PEITC-Abgabe der Pflanzen gelten. Mit einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen wird der Glucosinolatgehalt der Pflanzen zwar quantitativ erhöht, die art- bzw. sortentypische qualitative Zusammensetzung der Glucosinolate aber bleibt unverändert (KIRKEGAARD und SAWAR, 1998).

Im Versuchsjahr 2000 litten die Rapspflanzen unter Befall durch den Kohlerdfloh. Diese Insekten schädigen die Blätter der Pflanzen durch Lochfraß. Die Larven entwickeln sich an und in den Wurzeln und im unteren Stengelbereich (BÖRNER, 1990). Im Mai und Juni 2000, der Zeit des stärksten Befalls der Wurzeln, wurden in den Rhizosphären von Sommer- und Winterraps erheblich höhere PEITC-Konzentrationen gemessen als zur gleichen Jahreszeit im Folgejahr (Tab. 6, 8, 10 und 12). Damit Glucosinolat von der Myrosinase gespalten werden kann, so dass PEITC frei wird, muss die Zellintegrität zerstört werden, da Glucosinolate in der Vakuole, die Myrosinase membranassoziiert im Cytoplasma gelagert werden (BONES und ROSSITER, 1996). Fressende Insektenlarven dürften wesentlich mehr Zellen zerstören, als bei ungestörtem Wurzelwachstum absterben. Zudem kann auch die Glucosinolatproduktion durch Insektenbefall und mechanische Verletzungen verstärkt werden (BENNETT und WOLLSGROVE, 1994). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Insektenbefall der Wurzeln im Mai und Juni 2000 zu einer Steigerung der PEITC-Konzentrationen in den Rhizosphären geführt hat. Auch Lochfraß in den Blättern kann bei jungen Rapspflanzen zur Erhöhung des Glucosinolatgehaltes der Wurzeln führen (KORITSAS et al., 1990), was eine verstärkte PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre zur Folge haben sollte. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre der im Jahr 2000 ausgesäten Sommerrapsjungpflanzen war allerdings gering (Tab. 10). Möglicherweise waren die Pflanzen durch den massiven Befall zu stark geschwächt, um die Glucosinolatproduktion verstärken zu können. Vermutlich kann Insektenbefall je nachdem, wie weit er die Pflanze schwächt, die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre erhöhen oder senken.

Auch Pflanzen einer Sorte, die unter denselben Anbaubedingungen gewachsen sind und am selben Entwicklungsstadium untersucht werden, unterscheiden sich oft sehr stark in der PEITC-Konzentration ihrer Rhizosphären (z.B. Tab 6). Die Ursachen dieser individuellen Unterschiede sind nicht klar zu erkennen. Hohe Variabilität im Gehalt sekundärer Pflanzenstoffe ist nicht ungewöhnlich und auch für freie Isothiocyanate im pflanzlichen Gewebe bekannt (CHOESIN und BOERNER, 1991). Zwar wurde Raps in Hinblick auf den Glucosinolatgehalt züchterisch stark bearbeitet, doch bezogen sich diese Arbeiten vor allem auf den Glucosinolatgehalt der Samen, der nicht mit dem der Wurzeln korreliert ist (BENNETT und WOLLSGROVE, 1994; KIRKEGAARD und SAWAR, 1998). Für die Abgabe von PEITC in die Rhizosphäre spielt nicht nur der Glucosinolatgehalt der Wurzel eine Rolle, der innerhalb einer Art sehr variabel sein kann (KIRKEGAARD und SAWAR, 1998), sondern auch die Aktivität und

das Vorkommen des spaltenden Enzymes Myrosinase sind von Bedeutung. Die Aktivität der Myrosinase, von der organspezifisch innerhalb der Pflanze verschiedene Isoenzyme ausgebildet werden, wird von Myrosinase-binding-Proteins und Myrosinase-binding-related-Proteins und auch von niedermolekularen Verbindungen wie Ascorbinsäure beeinflusst. Beim Raps sind allein 10 Myrosinase-binding-proteins bekannt (BONES und ROSSITER, 1996). Durch die komplexen Steuerungsmöglichkeiten der Myrosinaseaktivität besteht viel Raum für individuelle Unterschiede. Allerdings ist –gerade bei ungünstigen Wachstumsbedingungen– die Variabilität in der PEITC-Abgabe bei der glucosinolatreichen Sorte ‚Rainbow‘ geringer als bei der glucosinolatarmen Sorte ‚Monty‘ (Tab. 17). Individuelle Unterschiede können also in dem von Sorte, Entwicklungsstadium und Umwelteinflüssen gesteckten Rahmen die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre steuern.

Durch das Zusammenspiel endogener und exogener Faktoren, die die PEITC-Abgabe der lebenden Rapswurzeln in die Rhizosphäre steuern, entstehen in der Rhizosphäre des Rapses verschiedene Bereiche, die sich stark hinsichtlich der Konzentration des antibiotisch wirksamen PEITCs unterscheiden. Mit der ontogenetischen Entwicklung der Pflanze entstehen über die Veränderungen der PEITC-Konzentration zeitlich hintereinander immer neue Lebensräume in der Rhizosphäre. Durch die räumliche Varianz in der PEITC-Konzentration bestehen zeitgleich verschiedene ökologische Nischen. Dieses mag eine Ursache sein, weshalb sich die Rhizosphäre des Rapses im Vergleich zu der anderer Kulturpflanzen durch eine höhere mikrobielle Diversität auszeichnet (SMALLA et al., 2001). Die Wirkung des PEITCs und anderer Umweltfaktoren auf die Rhizosphärenmikroflora soll im folgenden Kapitel (5.2) näher ausgeführt werden. Das Zusammenspiel von Rhizosphärenmikroflora, Pflanze und Boden wird unter 5.3 diskutiert werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Zusammenspiel von endogenen und exogenen Faktoren die PEITC-Abgabe durch die lebende Rapswurzel steuert. Das Ausmaß der PEITC-Abgabe steht mit dem Gluconasturtiin Gehalt der Wurzel im Zusammenhang, wird aber anscheinend auch von anderen Faktoren wie z.B. der Myrosinaseaktivität maßgeblich beeinflusst. Allerdings geht während des Pflanzenwachstums nur ein Bruchteil des in der Wurzel gespeicherten Gluconasturtiins in die PEITC-Abgabe ein. Durch zeitliche und räumliche Unterschiede in der PEITC-Konzentration entstehen in der Rhizosphäre des Rapses neben- und nacheinander verschiedene für Mikroorganismen besiedelbare Lebensräume.

5.2 Einfluss von PEITC und anderen Umweltfaktoren auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora

In der Rhizosphäre des Rapses bestehen verschiedene, durch die PEITC-Konzentration beeinflusste Lebensräume nebeneinander. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Artenzusammensetzung der eukaryotischen und prokaryotischen

Mikroorganismen in Abhängigkeit von der PEITC-Konzentration in Boden und Rhizosphäre ändert. Zudem wurde deutlich, dass PEITC im Boden schnell von Mikroorganismen abgebaut wird. Außer mit der PEITC-Konzentration änderte sich die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora auch in Abhängigkeit von anderen Faktoren wie Bodenfeuchte, Zeit, Sorte und Größe der Pflanzen.

5.2.1 Abbau von PEITC im Boden

Innerhalb von 24 h wird der Großteil des in den Boden gegebenen PEITCs durch Mikroorganismen abgebaut (Abb. 2). Auch wenn sie in erheblich höheren Konzentrationen vorliegen, als in der vorliegenden Arbeit angewendet oder gemessen, verschwinden Isothiocyanate schnell aus dem Boden (BROWN et al., 1991; GARDINER et al., 1999). PEITC könnte den abbauenden Organismen als zusätzliche Stickstoff-, Schwefel- und Energiequelle dienen. Neben dem in dieser Arbeit nachgewiesenen mikrobiellen Abbau von PEITC werden für den schnellen Verlust von freien Isothiocyanaten aus dem Boden auch Verdampfen (CHOESIN und BOERNER, 1991) und Reaktion mit unbelebter, organischer Substanz im Boden verantwortlich gemacht (BROWN und MORRA, 1997). Da PEITC kaum flüchtig ist (SAWAR et al., 1998), sind als Ursache für den Verlust von PEITC in den sterilen Kontrollen vor allem Reaktionen mit der organischen Substanz im Boden zu vermuten. Zudem können Isothiocyanate durch Photodissoziation zerstört werden (BROWN und MORRA, 1997). Da der Versuch zum Abbau von PEITC im Boden in geschlossenen Glasszintillationsgefäßen durchgeführt wurde, könnte der langsame Verlust von PEITC in den sterilen Ansätzen auch durch Lichteinwirkung mitverursacht sein. Die geringe Halbwertszeit des PEITCs im belebten Boden wirft die Frage auf, in wie weit PEITC tatsächlich zu einer Änderung der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora führen kann. Denn mikrobielle Gesellschaften brauchen Zeit, einige Wochen, um sich an die Bedingungen in der Rhizosphäre anzupassen (MARSCHNER et al., 2001b).

5.2.2 Empfindlichkeit von Bodenmikroorganismen gegenüber PEITC

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora beeinflusst, steht im Widerspruch zu den Zweifeln von CHOESIN und BOERNER (1991) und KIRKEGAARD et al. (2001), ob aufgrund der geringen Isothiocyanatkonzentrationen in der Rhizosphäre überhaupt eine allelopathische Wirkung zu erwarten sei. Für diese Zweifel spricht, dass durch den schnellen Abbau keine Akkumulation von Isothiocyanaten in der Rhizosphäre möglich ist (KIRKEGAARD et al., 2001). Auch in dieser Arbeit wurde bei einmaliger Zugabe von PEITC in den Boden keine nachhaltige Veränderung der Bodenmikroflora beobachtet (siehe 4.4.2.2). CHOESIN und BOERNER (1991) hatten ebenfalls nach einmaliger Zugabe von Allylisothiocyanat in das Substrat von *Medicago sativa* keine nachhaltige Hemmung des Pflanzenwachstums beobachten können und daraus geschlossen, Allylisothiocyanat könne nicht die Ursache allelopathischer Eigenschaften des Rapses sein. Die Bedingungen in der

Rhizosphäre entsprechen allerdings nicht denen eines Versuchsansatzes, bei dem Isothiocyanate einmalig dem Substrat zugegeben werden. Vielmehr ist an den lebenden Wurzeln immer eine gewisse PEITC-Abgabe zu erwarten, so dass in der Rhizosphäre über einige Zeit hinweg eine hinreichend konstante, dem physiologischen Status der Pflanze, der Wurzelzone und den Bodenbedingungen entsprechende PEITC-Konzentration angenommen werden kann. Tatsächlich werden nach einer Woche regelmäßiger Zugabe von PEITC in den Boden durch die DGGE deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung der pro- und eukaryotischen Bodenmikroflora sichtbar (Abb. 5, 6 und 7). Trotz des schnellen Abbaus von PEITC im Boden hat die PEITC-Abgabe lebender Wurzel aufgrund der kontinuierlichen Abgabe einen Einfluss auf die Bodenmikroflora.

Die kritische PEITC-Konzentration für eine mit der DGGE nachweisbare Veränderung der Bodenmikroflora liegt zwischen 1323 und 3969 pmol g⁻¹ für Bakterien und Eukaryota (Abb. 5 und 6). Bei Aktinomyzeten war schon bei PEITC-Konzentrationen zwischen 331 und 1323 pmol g⁻¹ eine Veränderung der Artenzusammensetzung zu erkennen (Abb. 7). Diese PEITC-Konzentrationen können in der Rhizosphäre von Raps erreicht und überschritten werden. Um einen Vergleich zu *in vitro* gewonnenen Daten zu erhalten, soll im Folgenden angenommen werden, das alles PEITC, das mit Chloroform extrahierbar im Boden vorliegt, in der Bodenlösung gelöst sei. In diesem Fall entspräche eine PEITC-Konzentration im Boden von 3969 pmol g⁻¹ im Chloroformextrakt bei einer Bodenfeuchte von etwa 10% (g/g) einer PEITC-Konzentration in der Bodenlösung von 37 nmol ml⁻¹ bzw. 6 µg ml⁻¹. PEITC-Konzentrationen im Boden von 331 und 1323 pmol g⁻¹ entsprächen 0,5 und 2 µg ml⁻¹. *In vitro* genügt eine PEITC-Konzentration von 4 bzw. 0,2 µg ml⁻¹, um das Wachstum von *Staphylococcus aureus* bzw. *Gaeumannomyces graminis* zu hemmen (BROWN und MORRA, 1997). Die phytopathogenen Pilze *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* und *Rhizoctonia solani* werden von einer PEITC-Konzentration im Agar von 10 nmol ml⁻¹ abgetötet (SAWAR et al., 1998). Die Angaben der PEITC-Konzentration, die das Wachstum von *Aspergillus niger* vollständig unterbindet, schwanken zwischen 3 bis 12 µg ml⁻¹ (BROWN und MORRA, 1997). Demnach lägen die in der Rhizosphäre gemessenen PEITC-Konzentrationen in einem Bereich, in dem *in vitro* das Wachstum von Bodenmikroorganismen gehemmt wird. Die PEITC-Abgabe durch die Pflanze erscheint trotz des raschen Abbaus des PEITCs im Boden nicht zu gering, um die Artenzusammensetzung in der Rhizosphäre stark zu beeinflussen.

5.2.3 Grenzen der zur Beschreibung der Bodenmikroflora eingesetzten Methoden

Der durch die Folge DNA-Isolierung - PCR - DGGE ermöglichte Überblick über die Zusammensetzung der Bodenmikroflora wird durch die Empfindlichkeit und das Auflösungsvermögen der Methode begrenzt. Mit der in dieser Arbeit eingesetzten Methode der DNA-Extraktion aus dem Boden wird die DNA aus Dauerstadien, z.B. Bakteriensporen, ebenso effektiv isoliert wie aus aktiven Zellen (BAUMANN, 2001). Allerdings kann auch mit dieser Methode nicht die DNA sämtlicher im Boden vorkommender Mikroorganismen isoliert

werden, da z.B. Zellen nicht erreicht werden, die in Ritzen von Quarzkörnern oder in nicht aufgebrochenen Bodenaggregaten wachsen (BAUMANN, 2001). Zudem kann auch freie DNA unterschiedlich fest an die Bodenmatrix gebunden werden (BAUMANN, 2001). Eine Bakterienart kann erst dann als Bande auf dem DGGE-Gel dargestellt werden, wenn wenigstens $5 \cdot 10^6 \text{ g}^{-1}$ Genkopien pro Bodentrockenmasse vorliegen. Dieses entspricht einem Anteil der Art von 0,5-1,5% an der Gesamtheit der Bakterien im Boden (GELSOMINO et al., 1999). Weniger häufige Arten werden mit der in dieser Arbeit verwendeten PCR-DGGE Methode gar nicht dargestellt. Zudem werden seltenere DNA-Templates in Gegenwart von häufigeren bei der PCR diskriminiert (HEAD et al., 1998; POLZ und CAVANAUGH, 1998). Außerdem ist zu beachten, dass die Gesamt-DNA sowohl von lebenden als auch von abgestorbenen Zellen stammen kann, da DNA im Boden nicht sofort abgebaut wird (BLUM, 1997). Dadurch können vor allem kurzfristige Veränderungen übersehen werden, insbesondere in einem Boden, der sehr reich an Dauerstadien ist, wie z.B. bei der Wiederbefeuchtung luftgetrockneten Bodens. Die Vorbehandlung des Bodens mit BrdU ermöglicht, nicht aktiv wachsende Spezies und Dauerstadien im Boden aus der Betrachtung auszuschließen. Dadurch können auch Banden von selteneren Arten sichtbar werden, die bei der PCR der Gesamt-DNA nicht amplifiziert werden. Dieses wird deutlich im Vergleich der Bandenmuster der mit BrdU markierten DNA mit der Gesamt-DNA derselben Probe (Abb. 14). Von der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre verursachte Unterschiede in der Artenzusammensetzung werden dabei teilweise nur bei der aktiven Flora sichtbar (Tab. 14 und 15). Allerdings war eine Vorbehandlung des Bodens mit BrdU bei vielen Versuchsansätzen nicht möglich, da die Rhizosphären von auf dem Feld oder in Töpfen kultivierten Pflanzen für eine weitgehend störungsfreie, gleichmäßige Applikation einer BrdU-Lösung nicht zugänglich waren.

In Versuch 4.4.1 (Folgeversuch A im Gewächshaus) nimmt in der DGGE der bakteriellen DNA die Intensität mancher Banden in der Rhizosphäre von ‚Rainbow‘ mit der PEITC-Konzentration zu, bei ‚Monty‘ aber ab (Abb. 15 und 16). YANG und CROWLEY (2000) fanden beim Clonieren einzelner DGGE Banden, dass sich diese aus der DNA verschiedener Arten zusammensetzen können. Das lässt vermuten, dass eine Bande, deren Intensität mit der PEITC-Konzentration bei ‚Rainbow‘ steigt und bei ‚Monty‘ sinkt, sich bei ‚Rainbow‘ aus der DNA anderer unterschiedlich auf PEITC reagierenden Bakterienstämme/-arten zusammensetzt als bei ‚Monty‘. Der Einfluss eines Umweltfaktors auf die Artenzusammensetzung der Mikroflora kann mit Hilfe der DGGE nur dann nachgewiesen, wenn die Arten, die in einer Bande dargestellt werden, auf diesen Umweltfaktor in gleicher Weise reagieren, bzw. wenn unterschiedlich reagierende Arten auch in voneinander unterscheidbaren Banden abgebildet werden. Die Möglichkeit, Veränderungen des mikrobiellen Artenspektrums mit der DGGE darzustellen, wird damit auch durch die Auflösung der DGGE-Gele eingeschränkt.

Die DGGE-Bandenmuster zeichnen sich durch hohe Reproduzierbarkeit aus (GELSOMINO et al., 1999; BAUMANN, 2001). Durch die aufgezeigten Grenzen der Empfindlichkeit und der Auflösung können jedoch Unterschiede zwischen der Artenzusammensetzung von Mikrofloren an verschiedenen Standorten übersehen werden. Sind aber Unterschiede zwischen den Bandenmustern zweier Proben zu erkennen, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mikroflora der entsprechenden Standorte von einander deutlich unterscheidet.

Am Beispiel der Wiederbefeuchtung luftgetrockneten Bodens mit PEITC-Lösung (siehe 4.1.2) wird deutlich, dass strukturelle Veränderungen der Bodenmikroflora in kulturabhängigen Methoden (Abb. 3) schneller sichtbar werden können als bei der DGGE (Abb. 4). Substratnutzungsmuster einer mikrobiellen Gemeinschaft können sehr deutlich Reaktionen auf veränderte Umweltbedingungen, vor allem Stress, zeigen (GARLAND, 1997). Eine abrupte Zunahme der PEITC-Konzentration im Boden führte demnach zu Veränderungen im Substratnutzungsmuster, die möglicherweise vor Veränderungen des DGGE Bandenmusters erkennbar werden. Das Substratnutzungsmuster lässt keine Rückschlüsse darauf zu, welche Substrate von einer Mikroflora an ihrem natürlichen Standort genutzt werden, da die Artenzusammensetzungen in den Kavernen denen am natürlichen Standort nicht entsprechen (SMALLA et al., 1998). Die Unterschiede in den Substratnutzungsmustern geben eher einen Hinweis auf strukturelle, denn auf funktionelle Unterschiede der betrachteten Mikrofloren (GARLAND, 1997). Dennoch werden Unterschiede im Substratnutzungsmuster auch als Hinweis auf unterschiedliche Ernährungsbedingungen am Standort gewertet werden (GARLAND et al., 1997; GRAYSTON et al., 1998; RUPPEL et al., 2000). Daher können aus der Substratnutzungsanalyse mit BIOLOG[®]-ecoplates zusätzliche Informationen über die Verhältnisse in der Rhizosphäre gewonnen werden, die aus der Darstellung der Artenzusammensetzung mit der DGGE allein nicht zu erhalten wären. Wie bei der DGGE gilt, dass auch bei der Substratnutzungsanalyse Unterschiede übersehen werden können. Werden jedoch Unterschiede im Substratnutzungsmuster zweier Proben gefunden, kann dies als Hinweis auf Unterschiede in Struktur und/oder physiologischem Zustand zwischen den Bakterienpopulationen gewertet werden (GARLAND, 1997).

5.2.4 Umwelt- und entwicklungsbedingte Veränderungen der Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora

Die mit der DGGE oder der Substratnutzungsanalyse detektierten Unterschiede in der Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora konnte mit Hilfe der RDA teilweise mit der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre, der Masse der Pflanzen, der Rapssorte, der Wurzelzone, der Vorbehandlung des Bodens, der Bodenfeuchte und der Zeit korreliert werden. Diese Faktoren scheinen die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora unterschiedlich stark zu beeinflussen. Im Folgenden soll der Einfluss der genannten Faktoren diskutiert und der Einfluss der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre von dem der anderen abgegrenzt werden.

In den Feldversuchen mit Winter- und Sommerraps ändert sich die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora stark mit der Zeit (Tab. 7, 9, 11 und 13). Dieses entspricht den Beobachtungen von LOTTMANN et al. (2000) und SMALLA et al. (2001), dass sich bei Feldversuchen an Kartoffel bzw. zusätzlich Erdbeere und Raps die Artenzusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora deutlich mit der Zeit ändert. Hierbei ist zu bedenken, dass in dieser Arbeit unter dem Begriff ‚Zeit‘ mehrere, teilweise zusätzlich auch einzeln untersuchte Faktoren zusammengefasst sind. Der Faktor Zeit wurde als Zahl der Wochen nach der Aussaat ausgedrückt. Er beinhaltet daher sowohl Umweltveränderungen (Jahreszeit) als auch Veränderungen in der Physiologie der Pflanzen (Entwicklungsstadium). Diese Veränderungen wurden jedoch nicht direkt quantifiziert und konnten daher nicht von dem Faktor Zeit getrennt werden. Im Gegensatz dazu konnten die Bodenfeuchte, die Trockenmasse der Pflanzen, als Maß für die Entwicklung und für das Wachstum der Pflanzen, und die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre gesondert in die Untersuchung einbezogen werden.

In den Faktor ‚Zeit‘ gehen die ansonsten nicht näher untersuchten Änderungen der Temperatur während der Feldkultur ein. Bei den Feldversuchen mit Winterraps, bei denen die Spanne der jahreszeitlichen Veränderungen vom Frost im Winter bis zu sommerlich warmen Temperaturen bei Ernte und Reife reicht, erscheint der Einfluss der Zeit daher stärker als beim Sommerraps (Tab. 7, 9, 11 und 13). Für das Wachstum und die erfolgreiche Etablierung von Bodenmikroorganismen in der Rhizosphäre spielt die Bodentemperatur eine wichtige Rolle (HORNBY, 1990). So kann sich z.B. *Gaeumanomyces graminis* bei höheren Bodentemperaturen schlechter gegen andere die Wurzeln besiedelnde Mikroorganismen durchsetzen als bei niedrigeren (COOK und PAPENDICK, 1972; HORNBY, 1990). Der Einfluss der Temperatur ist unter Feldbedingungen nicht immer klar von dem der Bodenfeuchte zu trennen, da eine höhere Bodentemperatur einen stärkeren Wasserverlust aus dem Boden verursacht (BAMFORTH, 1997).

Sowohl bei den Feldversuchen, als auch bei den Versuchen im Gewächshaus war ein Einfluss der Bodenfeuchte auf die Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora deutlich zu erkennen (Tab. 7, 9, 11, 13 und 14). Das Leben im Boden spielt sich in dem Wasserfilm, der Bodenpartikel bedeckt, und in wassergefüllten Bodenporen ab. Bakterien und Protozoen können sich nur entlang dieser Wasserfilme bewegen (BAMFORTH, 1997). Veränderungen in der relativen Bodenfeuchte verschieben den Konkurrenzvorteil der einzelnen Arten gegeneinander (COOK und PAPENDICK, 1972). Für die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Wasserverlust im Boden ist ihre Größe und damit die der Bodenporen, die sie besiedeln können, von Bedeutung (BAMFORTH, 1997). Denn je größer die Bodenporen sind, desto eher verlieren sie beim Austrocknen des Bodens Wasser (WILD, 1995). Die Etablierung von phytopathogenen Pilzen in der Rhizosphäre und von saprophytischen Pilzen im Boden ist

stark von der Bodenfeuchte abhängig (COOK und PAPENDICK, 1972). Die Gruppe der Aktinomyzeten gilt als besonders unempfindlich gegenüber geringer Bodenfeuchte (COOK und PAPENDICK, 1972), allerdings gilt dieses nicht für alle Arten (ZUBERER, 1990). Der Einfluss der Bodenfeuchte auf die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen wird deutlicher, wenn nur der aktive Anteil der Mikroflora betrachtet wird (Tab. 14 und 15). Bodenlebende Protozoen begegnen den schwankenden Wassergehalten in ihrem Lebensraum mit ihrer Fähigkeit, Dauerstadien zu bilden (BAMFORTH, 1997). Ähnliches dürfte auch für viele Bakterien und Pilze gelten. Entsprechend der Wasserverfügbarkeit im Boden ist jeweils nur ein Teil der Bodenmikroflora aktiv, für den die jeweilige Feuchte günstig ist. Das Substratnutzungsmuster wird von den Unterschieden der Bodenfeuchte stärker beeinflusst, als die mit der DGGE darstellbare Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora (Tab. 6, 11 und 14). Ein ähnlich starker Einfluss der Bodenfeuchte auf das Substratnutzungsmuster wurde auch von BOSSIO und SCOW (1995) beobachtet.

Die Bodentemperatur und die Bodenfeuchte beeinflussen das Wachstum, den Glucosinolatgehalt und die Rhizodeposition der Pflanzenwurzeln im Boden (ROVIRA, 1959; DREW, 1990; KIRKEGAARD et al., 1998). Dadurch haben beide Faktoren neben dem direkten auch einen indirekten, durch die Pflanze vermittelten, Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora.

Die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora verändert sich mit zunehmender Pflanzenmasse (Tab. 7, 9 11 und 13). So ändert sich bei der Anzucht von Chrysanthemen in der Klimakammer die Artenzusammensetzung und das Substratnutzungsmusters der Rhizosphärenbakterien mit der Zeit, also mit Wachstum und Entwicklung der Pflanzen (DUINEVELD et al., 1998). Auch SMALLA et al. (2001) beobachteten während eines Feldversuches unterschiedliche Zusammensetzungen der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora an den Wurzeln von Rapskeimlingen, blühendem Raps und abreifendem Raps. Die Rhizodeposition der Pflanzen stellt die wichtigste Nährstoffquelle für die Mikroorganismen in der Rhizosphäre dar (WHIPPS, 1990; BAMFORTH, 1997). Die Qualität und Quantität der Rhizodeposition ändert sich mit dem Alter und der Größe der Pflanze (WHIPPS, 1990). Unterschiede in der Rhizodeposition können zu strukturellen Veränderungen der Mikroflora, die diese Nahrungsquelle nutzt, führen. So unterscheidet sich die bakterielle Mikroflora im Bereich der Wurzelspitzen, dem Ort der quantitativ höchsten Exsudation niedermolekularer, wasserlöslicher Stoffe wie Zucker und Aminosäuren (WHIPPS, 1990; JONES und DARRAH, 1994) von der an älteren Wurzelabschnitten mit geringerer Exsudation (DUINEVELD et al. 1998; YANG und CROWLEY, 2000; MARSCHNER et al., 2001a). Daher kann als eine Ursache der Veränderung der Rhizosphärenmikroflora mit dem Wachstum der Pflanzen die Veränderung der Rhizodeposition angenommen werden.

In dieser Arbeit wurde die Rhizosphärenmikroflora um Seitenwurzeln mit einem Durchmesser > 1 mm mit der um Wurzeln mit einem Durchmesser $\bullet 1$ mm verglichen, wobei sich die Substratnutzung in Abhängigkeit von der Wurzelzone unterschied (Tab. 15). Die meisten Untersuchungen zu Unterschieden in der Rhizodeposition oder der mikrobiellen Besiedelung und Substratnutzung an verschiedenen Wurzelzonen beziehen sich auf den Unterschied zwischen Wurzelspitze und älteren Wurzelabschnitten (z.B. JONES und DARRAH, 1994; RUPPEL et al., 2000 YANG und CROWLEY, 2000, MARSCHNER et al. 2001a). Ein unterschiedliches Nahrungsangebot in der Rhizosphäre kann zu unterschiedlichen Substratnutzungsmustern der Rhizosphärenmikroorganismen führen (GRAYSTON et al., 1998; RUPPEL et al., 2000). Daher ist zu vermuten, dass sich auch die beiden hier untersuchten Wurzeltypen in ihrer Rhizodeposition voneinander unterscheiden.

Die Rhizosphärenmikroflora unterscheidet sich auch in der Abhängigkeit von der Rapsorte (Tab. 11, 14, 15 und 20; Abb. 15 und 16). Auch hier könnten sortenspezifische qualitative und quantitative Unterschiede im Nahrungsangebot in der Rhizosphäre eine wesentliche Ursachen sein. Zudem gehen in den Faktor ‚Sorte‘ auch sortenspezifische Unterschiede in der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ein, deren Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora im Folgenden betrachtet werden soll.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre beeinflusst die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen (Tab. 7, 9, 11, 13, 14 und 15; Abb. 15 und 16). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von O'CALLAGHAN et al. (2000) überein, die beobachteten, dass *Azorhizobium caulinodans* ORS571 sich nur auf den Wurzeln glucosinolatärmer Rapskeimlinge etablieren konnte. Der Einfluss des PEITCs auf die pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora könnte eine Ursache für den von SMALLA et al. (2001) beobachteten, besonders starken artspezifischen Einfluss von Sommerraps auf die Rhizosphärenmikroflora zur Blüte, also der Zeit der höchsten PEITC-Konzentration, sein. Auch die starke Veränderung der Bakterien und Protozoenpopulationen in der Rhizosphäre von Senf zum Blütenbeginn (DARBYSHIRE und GREAVES, 1967) könnte durch eine erhöhte PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre verursacht worden sein. Der Einfluss des PEITC auf Bakterien und Eukaryota ist in der Rhizosphäre noch bei Konzentrationen nachzuweisen, die bei 5 Tagen regelmäßiger Zugabe in den wurzelfernen Boden noch keine Veränderung der Artenzusammensetzung bewirkt hatten (Abb. 5 und 6). Möglicherweise sind in der Rhizosphäre durch das reichhaltigere Nahrungsangebot mehr Mikroorganismen aktiv als im wurzelfernen Boden, so dass der interspezifische Konkurrenzdruck höher ist. In diesem Fall könnten selbst die kleinen Vor- und Nachteile, die den Arten aus einer niedrigen, im wurzelfernen Boden unbedeutenden PEITC-Konzentration entstehen, für die Etablierung in der Rhizosphäre relevant sein. Erstaunlicherweise ist weder bei den Feldversuchen, noch bei den Untersuchungen im Klimaschrank in der Rhizosphäre ein Einfluss der PEITC-Konzentration auf die Gruppe der Aktinomyceten zu beobachten gewesen (Tab. 9, 13 und

20), obwohl sich gerade diese Gruppe im wurzelfernen Boden als besonders empfindlich gegenüber PEITC erwiesen hat (Abb.7). Aktinomyceten sind in der Rhizosphäre nicht selten (SMALLA et al., 2001). Da aber Unterschiede zwischen der Artenzusammensetzung der Aktinomyceten der Rhizosphäre und der im wurzelfernen Boden bestehen (SMALLA et al., 2001), lässt sich vermuten, dass möglicherweise nur weitgehend PEITC unempfindliche Arten die Rhizosphäre besiedeln. So wie sich die Lebensbedingungen und die Mikroflora von wurzelfernem Boden und Rhizosphäre voneinander unterscheiden, unterscheidet sich anscheinend auch die Empfindlichkeit der jeweiligen Mikroflora gegenüber der PEITC-Konzentration.

Eine einmalige Zugabe von PEITC in den Boden hat keinen nachhaltigen Effekt auf die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora (Tab. 20). Ursache hierfür ist wahrscheinlich der schnelle Abbau von PEITC im Boden (Abb. 2). Wenn *Brassica*-Material in den Boden eingearbeitet wird, verschwinden die kurz nach der Einarbeitung frei werdenden Isothiocyanate schnell aus dem Boden (BROWN et al., 1991; GARDINER et al., 1999; NICHOLLS et al., 1999), so dass kein nachhaltiger Effekt der aus dem abgestorbenen Material freigewordenen Isothiocyanate auf die Bodenmikroflora zu erwarten ist. Der schnelle Abbau von PEITC im Boden ist vermutlich der Grund dafür, dass die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora an der Rapswurzel nach Vorkultur mit Raps nicht davon beeinflusst wurde, ob die Wurzeln der Vorkultur aus dem Boden entfernt wurden oder nicht (Tab. 20). Im Gegensatz zu der eukaryotischen Mikroflora war eine Abhängigkeit der Artenzusammensetzung von Bakterien und Aktinomyceten vom Verbleib der Wurzel im Boden erkennbar. Eine solche Abhängigkeit lässt sich dadurch erklären, dass das tote organische Material als zusätzliche Nahrungsquelle diente (ROVIRA et al., 1990), wobei unklar ist, warum dies nicht auch einen Einfluss auf die Eukaryota hatte.

Wird nur der aktive Teil der Rhizosphärenmikroflora betrachtet, erweist sich die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre als der von allen untersuchten Faktoren mit dem stärksten Einfluss auf Zusammensetzung der aktiven Arten (Tab. 14 und 15). Bei der statistischen Auswertung der Folgeversuche im Gewächshaus fällt der PEITC-Konzentration mit 33,4% und 44,6% ein sehr hoher Anteil an Unterschiedserklärung zu (Abb. 15 und 16). Diese Ergebnisse weisen auf eine große Bedeutung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre für die Etablierung von Rhizosphärenbakterien beim Raps hin. Bei den Feldversuchen beeinflusste die PEITC-Konzentration die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen im gleichen Maße wie die Faktoren Bodenfeuchte und Größe der Pflanzen (Tab. 7, 9, 11 und 13). Die letztgenannten Faktoren unterlagen während der Feldversuche erheblich größeren Schwankungen als in den Gewächshausversuchen, daher konnte ihr Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora in den Feldversuchen besser sichtbar werden. Vermutlich wird von der Bodenfeuchte und dem –mit der Größe und dem Entwicklungsstadium der Pflanze zusammenhängenden–

Nahrungsangebot in der Rhizosphäre bestimmt, welche der im Boden vorkommenden Mikroorganismen sich überhaupt in einer Rhizosphäre etablieren, vermehren und über längere Zeiträume durchsetzen. Von der PEITC-Konzentration als einem weiteren Faktoren hängt ab, welche dieser Mikroorganismen sich in der Rhizosphäre des Rapses etablieren können.

Viele Bakterien aus der Rhizosphäre des Rapses sind durch Sequenzierung der aus der Rhizosphäre isolierten DNA bestimmt oder in Kultur genommen worden (BERG, 1996; GERMIDA et al., 1998; MACRAE et al., 2000; SMALLA et al., 2001). In diesen Arbeiten wurde die mögliche Wirkung von Isothiocyanaten auf die Rhizosphärenmikroflora nicht berücksichtigt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob PEITC einen Einfluss auf die Rhizosphärenmikroflora lebender Rapswurzeln hat. Daher wurde auf die Identifizierung der Rhizosphärenmikroorganismen verzichtet. Vermutlich ist der für *Brassica*-Arten spezifische Selektionsfaktor PEITC, der in zeitlich und räumlich veränderlichen Konzentrationen vorliegt, eine Ursache für die von GERMIDA et al. (1998) und SMALLA et al. (2001) beobachtete hohe Diversität der bakteriellen Rhizosphärenmikroflora beim Raps. Weiterführend wäre es jetzt von Interesse zu bestimmen, welche Bakterien, Pilze und Protozoen besonders von dem PEITC in der Rhizosphäre profitieren, bzw. gehemmt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass PEITC in der Rhizosphäre von Raps als ein entscheidender selektiver Faktor für die Etablierung von Mikroorganismen wirkt. Hierbei ist entscheidend, dass durch die ständige Abgabe von PEITC durch die Wurzel trotz des raschen mikrobiellen Abbaus die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre hinreichend konstant bleibt. Eine einmalige Zugabe von PEITC in den Boden führt dagegen nicht zu einer Veränderung der Mikroflora. Da sich die Artenzusammensetzung von pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen mit der PEITC-Konzentration ändert, besteht das Potential für eine große räumliche und zeitliche Variabilität von Mikroflora in der Rhizosphäre von Raps.

Nachdem in diesem und dem vorhergehenden Kapitel (5.1) die PEITC-Abgabe durch die Pflanze und die Wirkung des PEITCs auf die Mikroorganismen in Boden und Rhizosphäre betrachtet wurde, soll im folgenden Kapitel die Rolle des PEITCs in den Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Rhizosphärenmikroorganismen und den Mikroorganismen untereinander diskutiert werden.

5.3 PEITC in der Pflanzen-Mikroben-Wechselbeziehung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Raps durch die PEITC-Abgabe der Wurzeln die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora stark beeinflusst. Der Einfluss, den verschiedene Rapsorten auf ihre Rhizosphärenmikroflora nehmen, bleibt auch noch in der Rhizosphäre von anschließend auf dem selben Substrat kultivierten Raps erkennbar. Hierbei

ergaben sich Hinweise, dass die von der Vorkultur geprägte Rhizosphärenmikroflora das Wachstum der Folgekultur beeinflusst. Von dieser Basis aus soll im Folgenden die Funktion des PEITC in dem komplexen System der Rhizosphäre des Rapses diskutiert werden.

5.3.1 PEITC in der Wechselwirkung wurzelferner Boden - Rhizosphäre

Für alle in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurde derselbe Boden aus dem Versuchsfeld in Ahrensburg als Substrat verwendet. Trotz gewisser Unterschiede in Bezug auf das Nährstoffangebot, sofern gedüngt wurde, und auf die Bodenfeuchte konnten sich alle untersuchten Rhizosphären in einem sehr ähnlichen Umfeld entwickeln. Der Boden nimmt durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften und die in ihm lebenden Organismen Einfluss auf die Entwicklung der Rhizosphäre (LYNCH, 1990).

Bei der Zugabe von PEITC zu trockenem Versuchsfeldboden und der anschließenden Extraktion zeigte sich, dass ein Teil des PEITCs offensichtlich im Boden sorbiert wird (siehe 4.1.1). Vor allem das organische Material ist für die Sorption von Isothiocyanaten im Boden von Bedeutung (BROWN und MORRA, 1997). Daher ist anzunehmen, dass der Einfluss, den die Pflanze durch PEITC-Abgabe auf ihre Rhizosphärenmikroflora nehmen kann, mit steigendem Humusanteil im Boden sinkt. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass sich wilde *Brassica*-Arten vor allem auf humusarmen Standorten wie Bahndämmen, Schutt oder Äckern ansiedeln (FITTER et al., 1986). Neben dem direkten Einfluss durch die Sorption könnte sich der Humusgehalt auch indirekt über den Einfluss auf Wachstum und Nährstoffaufnahme der Pflanzen auf die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre auswirken.

Viele Mikroorganismen, die mit der DGGE in der Rhizosphäre nachzuweisen sind, treten auch im wurzelfernen Boden auf (Abb. 9 und 10). Solche ubiquitären Arten wurden auch von DUINEVELD et al. (1998) und YANG und CROWLEY (2000) beschrieben. Die Art der Probenahme in dieser und den zitierten Arbeiten führt dazu, dass auch wurzelferner Boden mit in die Rhizosphärenprobe eingeht (MACRAE et al., 2001). Da allerdings die DNA-Konzentration in der Rhizosphäre die des umgebenden Bodens weit übersteigt (MACRAE et al., 2001), kann davon ausgegangen werden, dass bei der DGGE von Rhizosphärenproben vor allem die in der Rhizosphäre und Rhizoplane dominanten Arten abgebildet werden. Für die erfolgreiche Besiedlung der Rhizosphäre durch Bodenmikroorganismen ist eine hohe Inokulumsdichte im Boden von Vorteil (JEMBA und ALEXANDER, 1999). Die ubiquitären Arten haben auf Grund ihrer hohen Dichte im Boden besonders gute Chancen, sich in der Rhizosphäre durchzusetzen. Allerdings scheint es auch Arten zu geben, die trotz geringer Ausgangsdichte im Boden sehr erfolgreich die Rhizosphäre besiedeln können (LAMBERT et al., 1987). Die abiotischen Eigenschaften und die Geschichte eines Bodens führen zu einer bodentypischen Mikroflora. Aus dieser kann sich entsprechend der spezifischen Selektionsbedingungen in der Rhizosphäre unterschiedlicher Pflanzenarten eine pflanzenart- und bodentypische Rhizosphärenmikroflora entwickeln (MARSCHNER et al., 2001a). Der

Artenreichtum der Mikroflora nimmt dabei vom wurzelfernen Boden zur Rhizosphäre und von der Rhizosphäre zur Rhizoplane ab (BAZIN et al., 1990; MACRAE et al. 2001). Neben der Bodenmikroflora schlägt LYNCH (1990) die Spermosphäre als zusätzliche Quelle für Rhizosphärenmikroorganismen vor. Neben Arten, die mit der DGGE in vielen Parallelen von Boden- und Rhizosphärenproben nachgewiesen werden, treten immer wieder Arten auf, die nur in einer einzigen Rhizosphäre nachgewiesen werden können (Abb. 10; YANG und CROWLEY, 2000). Die Rhizosphärenmikroflora von Pflanzen einer Art am gleichen Standort können starke individuelle Unterschiede aufweisen (LAMBERT et al., 1987). Ursache hierfür könnte sein, dass natürlicher Boden ein sehr inhomogener Lebensraum ist. Hier spielt auch der Zufall eine Rolle, ob eine Pflanzenwurzel in Reichweite einer selteneren Art wächst, die sich in der Rhizosphäre etablieren kann. Auch Tiere, die größere Strecken im Boden durchqueren, können an ihrer Oberfläche Mikroorganismen einschleppen, die im umgebenden Boden sonst nicht vorkommen. Festzuhalten bleibt, dass die Bodenmikroflora das Artenspektrum stellt, aus dem sich Rhizosphärenmikroflora entwickeln kann.

Der sortenspezifische Einfluss der Rapspflanzen auf die Rhizosphärenmikroflora bleibt auch in der Rhizosphäre einer Folgekultur noch zu erkennen (Tab. 20). Da die Mikroorganismen sich in der Rhizosphäre durch die bessere Ernährung wesentlich stärker vermehren können als im wurzelfernen Boden, wird bei hinreichend starker Durchwurzelung des Bodens das quantitative Verhältnis der bodenlebenden Mikroorganismen insgesamt zugunsten der in der Rhizosphäre lebenden verschoben. Sofern die Rhizosphärenmikroorganismen nach dem Absterben der Wurzel solange im Boden überdauern können, bis eine neue Wurzel in ihren Lebensraum einwächst, haben sie durch ihre große Anzahl eine erhöhte Chance, sich in der neuen Rhizosphäre durchzusetzen (JEMBA und ALEXANDER, 1999). Entsprechend zeigen sich pflanzenartsspezifische Artzusammensetzungen der Rhizosphärenmikroflora besonders deutlich, wenn Pflanzen einer Art zwei Jahre hintereinander auf dem selben Boden kultiviert werden (SMALLA et al., 2001). In der Rhizosphäre von Raps ist die PEITC-Konzentration ein wichtiger Selektionsfaktor für die Besiedelung der Rhizosphäre. Über die Anreicherung von PEITC-verträglichen und die Abnahme von empfindlichen Mikroorganismen in der Rhizosphäre kann eine Rapskultur die quantitativen Artenverhältnisse im gesamten Boden verschieben. Je höher die PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre werden, bzw. je stärker der Boden von PEITC abgebenden Wurzeln durchwurzelt wird, um so stärker können diese Verschiebungen ausfallen. So wird die Infektionsrate des sehr PEITC empfindlichen Weizenpathogens *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (SAWAR et al.; 1998) durch Vorkultur mit Raps stark verringert. Glucosinolatreicher Raps kann hierbei das Pathogen stärker unterdrücken als glucosinolatarme (KIRKEGAARD et al., 1998). Dieses wird von den Autoren auf die für das Pathogen giftige Wirkung der Isothiocyanate zurückgeführt. Der Effekt dürfte auch durch die Förderung anderer Mikroorganismen verstärkt werden, die *Gaeumannomyces graminis* in der Weizenrhizosphäre verdrängen können.

Die Wechselwirkungen zwischen Boden und Rhizosphäre lassen sich in Hinblick auf PEITC in drei Aspekte zusammenfassen: Erstens geben die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens Grenzen vor, in wie weit eine Rapspflanze durch PEITC-Abgabe ihre Rhizosphäre beeinflussen kann. Zweitens stellt die Bodenmikroflora das Artenspektrum, aus dem sich die an PEITC angepasste Rhizosphärenmikroflora entwickeln kann. Drittens wird durch die Vermehrung PEITC-verträglicher und die Abnahme PEITC-empfindlicher Mikroorganismen in der Rhizosphäre die Artenverhältnisse der Bodenmikroflora quantitativ verschoben.

5.3.2 PEITC in den Wechselwirkungen der Rhizosphärenmikroorganismen untereinander

Die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora ändert sich in Abhängigkeit von der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre. Daraus lässt sich folgern, dass einige Arten, die sich bei niedrigen PEITC-Konzentrationen oder in Abwesenheit von PEITC nicht in der Rhizosphäre behaupten können, durch höhere PEITC-Konzentrationen einen Konkurrenzvorteil erhalten, während andere durch PEITC im Wachstum reduziert sind. Ein solcher Vorteil könnte sich ergeben, wenn die betreffenden Mikroorganismen das PEITC als zusätzliche Nährstoffquelle nutzen könnten. Der schnelle Abbau von PEITC im Boden gibt einen Hinweis darauf, dass eine solche Nutzung vielleicht tatsächlich stattfindet. Ein anderer Vorteil könnte den PEITC-verträglichen Mikroorganismen aus der Schwächung oder dem Verschwinden ansonsten dominanter, PEITC-empfindlicher Arten entstehen. Versuche zur Besiedlung der Rhizosphäre in monaxenischen und polyxenischen Kultursystemen haben gezeigt, dass einige Bakterien nur dann die Rhizosphäre besiedeln können, sofern sie nicht der Konkurrenz anderer Arten ausgesetzt sind (BAZIN et al., 1990). Als Faktoren, die eine erfolgreiche Etablierung von Bakterien in der Rhizosphäre ermöglichen, werden u.a. eine hohe Inokulumsdichte im Boden, eine potentiell hohe Wachstumsrate, geringe Beweidung durch Bodenprotozoen, die Fähigkeit an der Wurzel anzuhafte und die Bildung bzw. die Verträglichkeit gegenüber Antibiotika diskutiert (BAZIN et al., 1990; JJEMBA und ALEXANDER, 1999). In der Rhizosphäre von Raps kommt die PEITC-Verträglichkeit als zusätzlicher Faktor hinzu, der mit steigender PEITC-Konzentration immer wichtiger wird. So kann z.B. *Azorhizobium caulonidans*, ein Bakterium, das sich als Endophyt bei verschiedenen Pflanzenarten etablieren kann, auch unter monaxenischen Bedingungen nicht an und in glucosinolatreichen Rapswurzeln wachsen (O'CALLAGHAN et al., 2000). Eine solche, durch das Absterben einer empfindlichen Mikroorganismenart frei gewordene Nische kann dann von anderen, toleranten Organismen besetzt werden.

Bei der Wiederbefeuchtung von luftgetrockneten Boden mit wässriger PEITC-Lösung nimmt die Menge an Bakterien, die einen zitronengelben, fluoreszierenden Farbstoff produzieren, vermutlich fluoreszierenden Pseudomonaden, deutlich zu (Abb. 3). Aus der Rhizosphäre des Rapses wurden verschiedentlich fluoreszierende Pseudomonaden isoliert. Ein Teil dieser

Isolate hatte antifungische und/oder antibakterielle Eigenschaften (KREMER et al., 1990; BERG, 1996). Der phytopathogene Pilz *Gaeumannomyces graminis* ist sehr empfindlich gegen von fluoreszierenden Pseudomonaden produzierte Antibiotika (BAZIN et al., 1990). Dieser Pilz wird auch durch eine Zwischenkultur mit glucosinolatreichem Raps unterdrückt (KIRKEGAARD et al., 1998). Die hemmende Wirkung des PEITCs auf *Gaeumannomyces graminis* (SAWAR et al., 1998) könnte also in der Rhizosphäre des Rapses zusätzlich durch die PEITC bedingte Förderung antifungisch aktiver Pseudomonaden verstärkt werden. Zudem könnte eine Förderung Antibiotika produzierender Mikroorganismen der PEITC erklären, weshalb der Einfluss von PEITC auf die Bodenmikroflora auch noch zu beobachten ist, wenn das PEITC selbst bereits aus dem Boden verschwunden ist (BENDING und LINCOLN, 2000). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass fluoreszierende Pseudomonaden einen nur geringen Anteil (2,5%) der kultivierbaren Bakterien aus der Rhizosphäre des Rapses ausmachen (GERMIDA et al., 1998). Mit kulturunabhängigen Methoden (DNA-Isolierung und Sequenzierung) konnten MACRAE et al. (2001) keine Pseudomonaden in der Rhizosphäre des Rapses nachweisen. Neben den fluoreszierenden Pseudomonaden wurden aus der Rhizosphäre des Rapses noch weitere Bakterien mit antifungischen und/oder antibakteriellen Eigenschaften isoliert (BERG, 1996). Diese Arten könnten häufiger sein, allerdings ist bisher nichts über ihre PEITC-Empfindlichkeit bekannt.

In der Rhizosphäre lebende Protozoen ernähren sich von den Rhizosphärenbakterien. Hierbei scheint die Artenzusammensetzung der Beute für Artenzusammensetzung der Protozoen von großer Bedeutung zu sein, da manche Arten spezifisch bestimmte Bakterienarten grasen (CASSIDA, 1989). Der Erfolg der Etablierung der Bakterien scheint allerdings nicht durch das selektive Grasens der Protozoen gehemmt zu werden (JEMBA und ALEXANDER, 1999). PEITC wirkt also zusätzlich zu der eigenen Giftigkeit auch über die veränderte Artenzusammensetzung der Rhizosphärenbakterien auf die der Protozoen.

Zusammenfassend für die Bedeutung des PEITCs in den Wechselwirkungen der Rhizosphärenmikroorganismen untereinander lässt sich sagen, dass PEITC als wichtiger Selektionsfaktor in der Rhizosphäre des Rapses wirkt. Da sich PEITC-empfindliche Organismen nicht in der Rhizosphäre etablieren können, werden ihre Nischen frei für PEITC-verträgliche Arten. Dieser Effekt fällt um so deutlicher aus, je höher die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre ist. Können die von PEITC geförderten Mikroorganismen Antibiotika produzieren, wird der selektive Effekt des PEITCs noch zusätzlich verstärkt.

5.3.3 Wirkung von Rhizosphärenmikroorganismen auf die Pflanze unter PEITC-Einfluss

In vielen der in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen zeigte sich, dass die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroorganismen mit der Masse der Pflanzen korreliert ist (Tab. 7, 9, 11, 13, 14, 15 und 20). Zum Teil lässt sich diese

Korrelation auf Unterschiede in der Rhizodeposition zurückführen. Die Ergebnisse der Folgeversuche (siehe 4.4) lassen zudem vermuten, dass die Mikroorganismen das Wachstum der Pflanzen beeinflussen. Da der Einfluss der Pflanze auf die Rhizosphärenmikroflora bereits in Kapitel 5.2.4 betrachtet wurde, soll sich der folgende Teil der Diskussion vor allem auf Mikroorganismen konzentrieren, die das Pflanzenwachstum beeinflussen.

In der Literatur werden das Pflanzenwachstum fördernde (PGPO = Plant Growth Promoting Organisms, auch als PGPB = Plant Growth Promoting Bacteria bezeichnet) und das Pflanzenwachstum hemmende Mikroorganismen (DRMO = Deleterious Rhizosphere MicroOrganisms) unterschieden. Letztere unterscheiden sich von Pathogenen darin, dass sie keine Läsionen am Pflanzenmaterial verursachen. Die Schadwirkung der DRMO besteht häufig in der Produktion von Stoffwechselgiften wie z.B. HCN (SCHIPPERS et al., 1987; ROVIRA et al., 1990). Die PGPO können das Pflanzenwachstum einerseits direkt durch Phytohormonproduktion oder Verbesserung der Pflanzenernährung fördern, andererseits können sie Pathogene oder DRMO durch Antibiotikaproduktion oder Nahrungskonkurrenz hemmen (GLICK, 1995). Bei den folgenden Ausführungen ist zu beachten, dass die Aussagen über PGPO und DRMO in der Rhizosphäre des Rapses, die aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit gefolgert werden, indirekte Schlussfolgerungen sind, da im Rahmen dieser Arbeit Mikroorganismen weder identifiziert, noch auf ihre antagonistischen Eigenschaften hin untersucht wurden.

Eine Vorkultur mit der glucosinolatarmen Sorte ‚Monty‘ führte zu vermindertem Wachstum der Folgekultur (Tab. 17 und 19). Dieses entspricht der oft beschriebenen Beobachtung, dass wiederholter Anbau einer Art nacheinander auf dem selben Boden die DRMO anreichert und damit den Ertrag der Pflanzen verringert (ROVIRA et al., 1990). Bei der glucosinolatreichen Sorte ‚Rainbow‘ wurde kein vermindertes Wachstum der Folgekultur beobachtet (Tab. 17 und 19). Im Vergleich der Vorkulturen mit ‚Monty‘ und ‚Rainbow‘ fällt auf, dass sich die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur mit ‚Monty‘ deutlich von der aller anderen Varianten unterschied. Die eukaryotische Rhizosphärenmikroflora nach Vorkultur ‚Rainbow‘ entsprach dagegen der des unbehandelten Substrates. Das legt den Verdacht nahe, dass die nach Vorkultur mit ‚Monty‘ aufgetretene Wachstumshemmung durch eukaryotische Mikroorganismen vermittelt worden ist. Eine Anreicherung von wachstumshemmenden Eukaryota, wie sie bei ‚Monty‘ vermutet wird, ist bei ‚Rainbow‘ offenbar ausgeblieben. Ähnliche sortenspezifische Anreicherungen von DRMO sind auch für den Zuckerrohranbau beschrieben (ROVIRA et al., 1990). In der prokaryotischen Rhizosphärenmikroflora unterscheiden sich beide Vorkulturen voneinander und von der unbehandelten Variante. Die Sorte ‚Rainbow‘ kann die Bodenmikroflora durch PEITC-Abgabe stärker beeinflussen als ‚Monty‘, da sie einerseits in der Rhizosphäre höhere PEITC-Konzentrationen erreichen kann, andererseits durch eine bessere Durchwurzelung des Bodens ein größeres Rhizosphärenvolumen beeinflusst. Möglicherweise sind die DRMO in der Rhizosphäre von

„Rainbow“ durch die höhere PEITC-Konzentration direkt oder durch die Förderung antagonistischer Bakterien indirekt unterdrückt worden. Die PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre könnte damit die Gesundheit der Pflanze und der an dem selben Standort nachfolgenden Pflanzen der eigenen oder einer anderen Art fördern.

Die Unterdrückung von DRMO in der Rhizosphäre durch die antibiotische Wirkung des PEITCs oder die Förderung antagonistischer Bakterien wird durch die räumliche und zeitliche Varianz der PEITC-Konzentration beschränkt. Andererseits könnte gerade diese Varianz für glucosinolatreiche Rapsorten einen Vorteil darstellen. Einige Insekten und Rapspathogene werden von Glucosinolaten und ihren Spaltprodukten angezogen und gefördert (CHEW, 1988). Ähnliches könnte auch für DRMO gelten. Durch die unterschiedlich hohen PEITC-Konzentrationen in verschiedenen Bereichen des Wurzelsystems werden verschiedenen Mikroorganismengesellschaften nebeneinander Lebensraum geboten. Dieses verhindert, dass eine einzige, möglicherweise schädliche Art von Mikroorganismen in der gesamten Rhizosphäre dominant werden kann.

Festzuhalten bleibt, dass die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre des Rapses starken Einfluss darauf hat, welche Mikroorganismen sich in der Rhizosphäre durchsetzen können. Dieser Einfluss des PEITCs kann verstärkt werden, wenn die durch PEITC geförderten Mikroorganismen zur Antibiotikaproduktion fähig sind. Durch die PEITC-Abgabe können glucosinolatreiche Rapsorten entweder direkt oder indirekt über die Förderung antagonistischer Arten die Vermehrung schädlicher Mikroorganismen unterdrücken. Die durch die räumliche und zeitliche Varianz der PEITC-Konzentration ermöglichte Diversität der Rhizosphärenmikroflora stellt einen zusätzlichen Schutz vor der Vermehrung einzelner, möglicherweise schädlicher Arten da.

Nachdem in diesem und den vorhergehenden Kapiteln dieser Diskussion die Entwicklung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre des Rapses und ihre Bedeutung in dem Zusammenspiel von Boden, Rhizosphärenmikroflora und Pflanze betrachtet wurden, soll im folgenden ein kurzer Ausblick für die Nutzung der PEITC-Abgabe durch Raps im Pflanzenschutz gegeben werden.

5.3.4 Schlussfolgerungen für den Einsatz von glucosinolatreichem Raps für den Pflanzenschutz

Zahlreiche Arbeiten haben den Einsatz von *Brassica*-Arten als Zwischenfrucht oder das Einarbeiten von Ernterückständen und entfettetem Rapsmehl zur Unterdrückung von bodenbürtigen Phytopathogenen, die sogenannte „Biofumigation“, zum Thema (z.B. RAMIREZ-VILLAPUDUA und MENNICKE, 1987; BROWN et al., 1991; BROWN und MORRA, 1997; KIRKEGAARD et al., 1998; KIRKEGAARD und SAWAR, 1999). Einerseits wurden z.B. Erfolge in der Unterdrückung von *Gaeumannomyces graminis* durch glucosinolatreichen

Raps als Zwischenfrucht beobachtet (KIRKEGAARD et al., 1998). Andererseits wurden Zweifel geäußert, ob aufgrund der geringen Halbwertszeit von Isothiocyanaten im Boden tatsächlich mit einer nachhaltigen Wirkung gerechnet werden kann (GARDINER et al., 1999; NICHOLLS et al., 1999). Auch Untersuchungen des Substratnutzungsmuster von Rhizosphärenmikroorganismen an Erbse konnten keinen nachhaltigen Einfluss einer Gründüngung mit Raps nachweisen (SCOTT und KNUDSEN, 1999). Von dieser Basis aus sollen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit in bezug auf den Pflanzenschutz diskutiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Abgabe von PEITC in den Boden auch eine Eigenschaft lebender Wurzeln ist. Entsprechend kann in der Rhizosphäre ein über einige Zeit hinreichend konstante PEITC-Konzentration angenommen werden. Wird dagegen totes Pflanzenmaterial in den Boden eingearbeitet, steigt die Isothiocyanatkonzentration im Boden zwar schnell an, aber bereits 24 h nach diesem Anstieg sind kaum noch Isothiocyanate im Boden nachzuweisen (BROWN et al., 1991; GARDINER et al., 1999; NICHOLLS et al., 1999). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist jedoch eine Behandlung des Bodens mit PEITC über mehrere Tage notwendig, um eine Veränderung der Artenzusammensetzung der Bodenmikroflora zu verursachen. Somit ist anzunehmen, dass die bloße Einarbeitung von totem Pflanzenmaterial, wie z.B. entfettetem Rapsmehl, in den Boden, im Gegensatz zu der Langzeitwirkung des PEITCs in der Rhizosphäre, nur kurzzeitig wirken kann. Überdies kann das eingearbeitete tote Pflanzenmaterial als zusätzliches Substrat manche bodenbürtige Pathogene fördern (BROWN und MORRA, 1997). Folglich kann sich ein Ansatz für den Pflanzenschutz eher aus dem Einfluss ergeben, den die Pflanze während ihres Wachstums auf die Bodenmikroflora nimmt. Werden nach dem Wachstum allerdings die oberirdischen Organe in den Boden eingearbeitet, könnte dieses den Einfluss der lebenden Wurzeln nachträglich verstärken.

Die PEITC-Abgabe durch die Pflanze beeinflusst die Artenzusammensetzung der Rhizosphäre stark. Dadurch kann es zu einer quantitativen Verschiebung der Zusammensetzung der Bodenmikroflora kommen. Möglicherweise werden auch PGPO angereichert. Manche Phytopathogene und DRMO werden in der Rhizosphäre von Raps durch das PEITC gehemmt. Da die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre länger konstant bleibt als z.B. bei der Einarbeitung von Rapsmehl, ist die Vermehrung dieser Organismen im Boden für entsprechend längere Zeit gestört. Kommt es zudem zu einer Anreicherung von antagonistischen Bakterien in der Rapsrhizosphäre, könnten diese einen zusätzlichen, besonders langfristigen Schutz für die Folgekultur darstellen. Obwohl viele Pflanzen artspezifische Rhizosphärenmikroflora haben (MARSCHNER et al., 2001a; SMALLA et al., 2001) und so eine Veränderung in der Bodenmikroflora verursachen können, ist der Einfluss von glucosinolatreichen *Brassica*-Arten auf einige Phytopathogene im Vergleich zu andern Pflanzen besonders stark (BROWN und MORRA, 1997; KIRKEGAARD et al. 1998). Um die

Wirkung des PEITCs auf die Rhizosphärenmikroflora optimal ausnutzen zu können, sollte eine Zwischenkultur mit Raps, die nicht zur Beerntung vorgesehen ist, mindestens bis zum Erreichen der maximalen PEITC-Konzentrationen stehen gelassen werden. Die höchsten PEITC-Konzentrationen werden in der Rhizosphäre von Sommerraps zum Beginn der Blüte erreicht (Tab. 10 und 12, Abb. 12), beim Winterraps während des Schossens (Tab. 6 und 8). Entsprechend sollte Winterraps als Gründüngung frühestens nach dem Schossen, Sommerraps erst nach Blütenbeginn untergepflügt werden. Überdies empfiehlt sich der Einsatz glucosinolatreicher Sorten, die den Boden stark durchwurzeln.

Aus den Ergebnisse dieser Arbeit und der in der Literatur veröffentlichten Beobachtungen anderer Autoren lässt sich schließen, dass eine Zwischenkultur mit glucosinolatreichem Raps oder anderen glucosinolatreichen *Brassica*-Arten die vermutlich effektivste Art ist, die hemmende Wirkung von PEITC auf bodenbürtige Phytopathogene zu nutzen. Hierbei sollte den Pflanzen erlaubt werden, bis zum Überschreiten der maximalen PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre zu wachsen.

5.5 Zusammenfassung der Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die folgenden Schlüsse über die Bedeutung von PEITC in der Rhizosphäre des Rapses zu: Die PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre ist auch eine Eigenschaft lebender Wurzeln. Ein komplexes Zusammenspiel von endogenen und exogenen Faktoren bestimmen die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre. Als endogene Faktoren beeinflussen das Entwicklungsstadium der Pflanze, die Sortenzugehörigkeit und individuelle Unterschiede der Pflanzen die PEITC-Abgabe. Zudem werden um unterschiedliche Wurzeltypen verschieden hohe PEITC-Konzentrationen erreicht. Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre wird aber auch von den Wachstumsbedingungen der Pflanze, wie Strahlung, Ernährung und Insektenbefall, beeinflusst. Eine Akkumulation von PEITC in der Rhizosphäre wird durch den raschen mikrobiellen Abbau verhindert. So entstehen in der Rhizosphäre verschiedene zeitlich und räumlich voneinander begrenzte, sich in der PEITC-Konzentration unterscheidende Bereiche. Da die PEITC-Konzentration einen sehr großen Einfluss darauf hat, welche Mikroorganismen sich in der Rhizosphäre des Rapses etablieren können, besteht das Potential zu einer hohen zeitlichen und räumlichen Diversität der Rhizosphärenmikroflora. Durch die PEITC-Abgabe in die Rhizosphäre kann die Rapspflanze eine starke Vermehrung von schädlichen Mikroorganismen in der Rhizosphäre verhindern. Möglicherweise geschieht dieses auch durch die Förderung von antagonistisch wirkenden Bakterien. Ein solcher, durch PEITC vermittelter Einfluss der lebenden Wurzel auf die Rhizosphärenmikroflora kann durch quantitative Verschiebungen der Zusammensetzung der gesamten Bodenmikroflora auch noch in der Rhizosphäre einer nachfolgenden Kultur erkennbar bleiben.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Senföles 2-Phenylethylisothiocyanat (PEITC) in dem Zusammenspiel von Boden, Mikroorganismen und Pflanze in der Rhizosphäre des Rapses zu untersuchen. Dazu wurden in Feld- und Gewächshausversuchen mit vier Rapsorten die zeitliche und räumliche Veränderung der PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre untersucht. Parallel wurde die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Rhizosphärenmikroflora mit der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) und Substratnutzungsmustern dargestellt. Die so gewonnenen Banden- und Substratnutzungsmuster wurden mit der Redundanz-Analyse (RDA) auf die PEITC-Konzentration der Rhizosphäre und andere Umweltparameter bezogen.

Die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre ändert sich mit der Entwicklung der Pflanze. Bei Winterraps erreicht die PEITC-Konzentration jeweils vor Einbruch des Winters und zum Schossen ein Maximum. Bei Sommerraps wird die höchste PEITC-Konzentration während der Blüte erreicht. Bei Keimlingen und zur Reife ist die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre niedrig. Um Nebenwurzeln mit einem Durchmesser > 1 mm ist die PEITC-Konzentration höher als um Feinwurzeln (Durchmesser < 1 mm). Die PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre liegen in einem Bereich von $10 - 10000 \text{ pmol g}^{-1}$ bezogen auf das Bodenfrischgewicht. Die Untersuchungen zeigen, dass auch lebende Wurzeln PEITC in die Rhizosphäre abgeben. Hierbei können in der Rhizosphäre glucosinolatreicher Rapsorten höhere PEITC-Konzentrationen erreicht werden als bei glucosinolatarmen Sorten. Zudem bestehen auch zwischen den Pflanzen einer Sorte große individuelle Unterschiede in der PEITC-Abgabe. Schlechte Ernährung der Pflanzen und niedrige Lichtintensität, die auch das Wachstum der Pflanzen einschränken, können die PEITC-Konzentration in der Rhizosphäre senken. Klimatisch günstige Verhältnisse und Insektenbefall können dagegen zu höheren PEITC-Konzentrationen in der Rhizosphäre führen.

PEITC im Boden wird innerhalb von 48 h fast vollständig von Mikroorganismen abgebaut. Dennoch hat die PEITC-Konzentration starken Einfluss auf die Artenzusammensetzung der pro- und eukaryotischen Mikroorganismen, die sich in der Rhizosphäre von Raps etablieren können. Die Artenzusammensetzung der Mikroflora im wurzelfernen Boden ändert sich, wenn sie über mehrere Tage konstant einer PEITC-Konzentration $> 1323 \text{ pmol g}^{-1}$ bezogen auf das Bodenfrischgewicht ausgesetzt ist. Die Rhizosphärenmikroflora reagiert empfindlicher auf PEITC: Auch in Rhizosphären, in denen im Mittel eine PEITC-Konzentration von 533 pmol g^{-1} erreicht wird, ist ein Einfluss des PEITC auf die Rhizosphärenmikroflora zu beobachten. Eine einmalige Behandlung des Bodens mit PEITC dagegen führt auch bei höheren Konzentrationen nicht zu einer nachweisbaren Veränderung der Bodenmikroflora. Die unter dem Einfluss von PEITC in der Rhizosphäre einer

glucosinolatreichen Rapssorte angereicherten Arten können auch die Rhizosphärenmikroflora einer glucosinolatarmen Sorte prägen, die anschließend auf demselben Substrat wächst. Hierbei hat es den Anschein, als ob durch hohe PEITC-Konzentrationen die Vermehrung schädlicher Mikroorganismen in der Rhizosphäre gehemmt werden kann. Neben dem Einfluss der PEITC-Konzentration konnte auch ein Einfluss der Pflanzensorte, der Wurzelzone, der Sprossrockenmasse, der Bodenfeuchte und der Zeit auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora beobachtet werden.

In der Rhizosphäre des Rapses hat PEITC einen entscheidenden Einfluss auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora. Durch zeitliche und räumliche Unterschiede in der PEITC-Konzentration entstehen in der Rhizosphäre des Rapses neben und nacheinander verschiedene für Mikroorganismen besiedelbare Lebensräume. Neben dem PEITC wirken jedoch auch andere Umweltfaktoren wie Bodenfeuchte direkt oder indirekt, über ihren Einfluss auf die Pflanze, auf die Artenzusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora und können so den Einfluss des PEITCs begrenzen. Von PEITC mitverursachte Unterschiede in der Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora können das Wachstum der Pflanzen beeinflussen. Möglicherweise kann durch die Anreicherung von PEITC-toleranten, antibiotisch aktiven Mikroorganismen die hemmende Wirkung von PEITC auf bodenbürtige Pflanzenpathogene verstärkt werden.

7. Literatur

- Bakken, L.R. (1985)** Separation and purification of bacteria from soil.
Applied and Environmental Microbiology 49, 1482-1487
- Bamforth, S.S. (1997)** Protozoa: Recyclers and indicators of agroecosystem quality.
in G. Benckiser (ed.) Fauna in Soil Ecosystems. Marcel Decker, Inc., New York Basel
Hong Kong, 63-84
- Baumann, K (2001)** DGGE zur Erfassung von Bodenmikroorganismen - Modellversuche zur
Wiederfindung eingesetzter Mikroorganismen der pflanzlichen Rhizosphäre.
Diplomarbeit, Universität Hamburg. 83 S.
- Bazin, M.J., P. Markham, E.M. Scott und J.M. Lynch (1990)** Population dynamics and
rhizosphere interactions.
in J.M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester New York
Brisbane Toronto Singapore, 99-128
- Bending, G.D. und S.D. Lincoln (2000)** Inhibition of soil nitrifying bacteria communities
and their activities by glucosinolate hydrolysis products.
Soil Biology and Biochemistry 32, 1261-1269
- Bennett R.N. and R.M. Wollsgrove (1994)** Secondary metabolites in plant defence.
New Phytologist 72, 617-633
- Berg, G. (1996)** Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *verticillium dahliae* var.
longisporum STARK.
Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 103, 20-30
- Blake-Kalff, M.M.A, K.R. Harrison, M.J. Hawkesford, F.J. Zhao und S.P. McGrath
(1998)** Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency
during vegetative growth.
Plant Physiology 118, 1337-1344
- Blum, S.A.E. (1997)** Die Überdauerung extrazellulärer DNA im Boden.
Dissertation, Universität Oldenburg, 87S.
- ter Braak C.J.F (1996)** Unimodal models to relate species to environment.
DLO-Agricultural Mathematics Group, Wageningen, 266 S.
- ter Braak, C.J.F., und P. Šmilauer (1998)** CANOCO reference manual and user's guide to
CANOCO for Windows: software for canonical community ordination (version 4).
Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA, 352 S.
- Brown, P.D., M.J. Morra, J.P. McCafrey, D.L. Auld und L. Williams (1991)**
Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil.
Journal of Chemical Ecology 17, 2021-2034

- Brown, P.D. und M.J. Morra (1997)** Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants.
Advances in Agronomy 61, 167-231
- Börner, H. (1990)** Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.
6. Auflage, UTB Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 464 S., S.367
- Bones, A.M. und J.T. Rossiter (1996)** The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry.
Physiologia plantarum 97, 194-208
- Bossio, D.A. and K.M. Scow (1995)** Impact of Carbon and Flooding on the Metabolic Diversity of Microbial Communities in Soils.
Applied and Environmental Microbiology 61, Nr.11, 4043-4050
- Booth, E.J. und K.C. Walker (1992)** The effect of site and foliar sulfur on oilseed rape: comparison of sulfur responsive and nonresponsive seasons.
Phyton 32 (3), 9-13
- Buchner, R. (1988)** Analyse und Biologie der Glucosinolate in Raps (*Brassica napus* L.).
Dissertation, Universität Göttingen, 111 S.
- Cassida, L.E., Jr. (1989)** Protozoan response to the addition of bacterial predators and other bacterial in soil.
Applied and Environmental Microbiology 55, 1857-1859
- Chew, F. S. (1988)** Biological effects of glucosinolates.
in Biological Active Natural Products, American Chemical Society, 155-181
- Choesin D.N. und R.E.J. Boerner (1991)** Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae).
American Journal of Botany 78, 1083-1090
- Cook, R.J. und R.I. Papendick (1972)** Influence of water potential of soils and plants on root disease.
Annual Review of Phytopathology 10, 349-374
- Darbyshire, J.F. and M.P. Greaves (1967)** Protozoa and bacteria in the rhizosphere of *Sinapis alba* L., *Trifolium repens* L., and *Lolium perenne* L.
Canadian journal of Microbiology 13, 1057-1068
- Drew, M.C. (1990)** Root function, development, growth and mineral nutrition.
in J.M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 35-57
- Duineveld, B.M., A.S. Rosado, J.D. van Elsas und J.A. van Veen (1998)** Analysis of dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the Chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns.
Applied and Environmental Microbiology 64, 4950-4957

- Elliot, M.C. und B.B. Stowe (1971)** Distribution and variation of indole glucosinolates in woad (*Isatis tinctoria* L.).
Plant Physiology 48, 498-503
- Fitter, R., A. Fitter und M. Blamey (1986)** Pareys Blumenbuch.
2. Auflage. Verlag Paul Parey. Hamburg Berlin, 336 S.
- Gardiner, J.B., M.J. Morra, C.V. Eberlein, P.D. Brown und V. Borek (1999)** Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures.
Journal of Agriculture and Food Chemistry 47, 3837-3842
- Garland, J.L. (1997)** Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology.
FEMS Microbiology Ecology 24, 289-300
- Garland, J.L., K.L. Cook, C.A. Loader und B.A. Hungate (1997)** The influence of microbial community structure and function on community-level physiological profiles.
in H. Insam, A. Rangger (eds.) Microbial Communities, 171-183
- Gelsomino, A., A.C. Keijzer-Wolters, G. Cacco und J.D. van Elsas (1999)** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis.
Journal of Microbiological Methods 38, 1-15
- Germida, J.J., S.D. Siliciano, J.R. de Freitas und A.M. Seib (1998)** Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.).
FEMS Microbial Ecology 26, 43-50
- Glick, B.R. (1995)** The enhancement of plant growth by free-living bacteria.
Canadian Journal of Microbiology 41, 109-117
- Grayston S.J., S. Wang, C.D: Campbell and A.C. Edwards (1998)** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere.
Soil Biology and Biochemistry , Nr. 3, 369-378
- Head, I.M., J.R. Saunders und R.W. Pickup (1998)** Microbial evolution, diversity and ecology: A decade of ribosomal RNA-analysis of uncultivated microorganisms.
Microbial Ecology 35, 1-21
- Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla und E.M.H. Wellington (1997)** Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients.
Applied and Environmental Microbiology 63, Nr.8, 3223-3241
- Hornby, D. (1990)** Root diseases.
in J.M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 233-258

- Jjemba, P.K. und M. Alexander (1999)** Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria.
Soil Biology and Biochemistry 31, 623-632
- Jones D.L. und P.R. Darrah (1994)** Amino-acid influx at soil-root interface of *Zea mais* L. and its implications in the rhizosphere.
Plant and Soil 163, 1-12
- Kennedy, A.C. (1994)** Carbon utilization and fatty acid profiles for characterization of bacteria.
In Methods of soil analysis. Part 2 Microbial and biochemical properties. Soil Science Society of America book series No.4 Madison USA, 543-556
- Kirkegaard, J.A. und M. Sarwar (1998)** Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas.
Plant and Soil 201, 71-89
- Kirkegaard, J.A., M. Sarwar, P.T.W. Wong and A. Mead (1998)** Biofumigation by brassicas reduces take-all infection.
Proceedings of the 9th Australian Agronomy Conference, Wagga Wagga, 465-468
- Kirkegaard, J.A. und M. Sarwar (1999)** Glucosinolate profiles of Australian canola (*Brassica napus annua* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: implications for biofumigation.
Australian Journal of Agricultural Research 50, 315-324
- Kirkegaard, J.A., B.J. Smith und M.J. Morra (2001)** Biofumigation: soil-borne pest and disease suppression by *Brassica* roots.
The 6th Symposium of the International Society of Root Research 11-15 November 2001. Nagoya, Japan, 416-417
- Koritsas, V.M., J.A. Lewis und G.R. Fenwick (1991)** Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*).
Annals of Applied Botany 118; 209-221
- Kremer, R.J., M.F.T. Begonia, L. Stanley und E.T. Lanham (1990)** Characterization of Rhizobacteria associated with weed seedlings.
Applied and Environmental Microbiology 56, 1649-1655
- Lambert, B., F. Leyns, L. van Royen, F. Gosselé, Y. Papon und J. Swings (1987)** Rhizobacteria of maize and their antifungal activities.
Applied and Environmental Microbiology 53, 1866-1871
- Lottmann, J., H. Heuer, J. de Vries, A. Mahn, K. Düring, W. Wackernagel, K. Smalla und G. Berg (2000)** Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community.
FEMS Microbiology Ecology 33, 41-49

- Lynch, J.M. (1990)** Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plants and soil.
in J.M. Lynch (ed.) *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 1-10
- Macrae A., D.L. Rimmer und A.G. O'Donnell (2000)** Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA.
Antonie van Leeuwenhoek 78, 13-21
- Macrae, A., C.M.M. Lucon, D.L. Rimmer und A.G. O' Donnell (2001)** Sampling DNA from the rhizosphere of *brassica napus* to investigate rhizobacterial community structure.
Plant and Soil 233, 223-230
- Marschner P., C.H. Yang, R. Lieberei und D.E. Crowley (2001)a** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere.
Soil Biology and Biochemistry 33, 1437-1445
- Marschner P., D.E. Crowley und R. Lieberei (2001)b** Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16 S rDNA communtiy composition in the rhizosphere of maize.
Mycorrhiza 11, 297-302
- Muyzer G., E.D. de Wall und A.G. Uitterlinden (1993)** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.
Applied and Environmental Microbiology 59, 695-700
- Muyzer, G. und K. Smalla (1998)** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.
Antonie van Leeuwenhoek 73, 127-141
- Nicholls, J.W., V. Bianco, D. Allen und I.L. Porter (1999)** Relative concentration of isothiocyanates in water and in soil and the implications for soilborne pathogen control.
"New Horizons for an old crop" Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia
- O'Callaghan, K.J., P.J. Stone, X. Hu, D.W. Griffith, M.R. Davey und E.C. Cocking (2000)** Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571.
Applied and Environmental Microbiology 66, 2185-2191
- Polz, M.F. und C.M. Cavanaugh (1998)** Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR.
Applied and Environmental Microbiology 64, 3724-3730
- Rovira A.D. (1959)** Root excretions in relation to the rhizosphere effect IV Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exsudation.
Plant and Soil 11, 53-64

- Rovira, A.D., L.F. Elliott und R.J. Cook (1990)** The impact of cropping systems on rhizosphere organisms affecting plant health.
in J.M. Lynch (ed.) *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 389-436
- Ruppel S., C. Feller, A. Gransee und W. Merbach (2000)** Bakterielle Besiedlung von Rapswurzeln und deren Aktivität bei unterschiedlicher Substratverfügbarkeit.
In W. Mehrbach, L. Wittenmayer, J. Augustin (ed.) *Rhizodeposition und Stoffverwertung*. 10. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes. Teubner. Stuttgart Leipzig, 133-138
- Sachs, L. (1996)** *Angewandte Statistik*.
8. Auflage Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 884 S.
- Sarwar, M und J.A Kirkegaard. (1998)** Biofumigation potential of brassicas II. Effect of the environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening.
Plant and Soil 201, 91-101
- Sarwar, M, J.A Kirkegaard, P.T.W. Wong und J.M. Desmarchelier (1998)** Biofumigation potential of brassicas III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens.
Plant and Soil 201, 103-112
- Schippers, B., A.W. Bakker und P.A.H.M. Bakker (1987)** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices.
Annual Review of Phytopathology 25, 339-358
- Schreiner, R.P, und R.T. Koide (1993)** Mustards, mustard oils and mycorrhizas.
New Phytologist 123, 107-113
- Scott, J.S. und G.R. Knudsen (1999)** Soil amendment effects of rape (*Brassica napus*) residues on pea rhizosphere bacteria
Soil Biology and Biochemistry 31, 1435-1441
- Smalla, K., U. Wachtendorf, H. Heuer, W. Liu and L. Forney (1998)** Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities.
Applied and Environmental Microbiology 64, Nr.4, 1220-1225
- Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer und G. Berg (2001)** Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed.
Applied and Environmental Microbiology 67, 4742-4751
- Ramirez-Villapudua J., und D.E. Munnecke (1987)** Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxyspermum* f. sp. *conglutinans* and other organisms.
Phytopathology 78, 289-295

- Wielebski F., M. Wójtowicz und J. Krzymowski (1999)** Influence of sulphur fertilization on glucosinolate quality and quantity in seeds of two double low oilseed rape varieties (*Brassica napus* L.).
"New Horizons for an old crop" Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia
- Wild, A. (1995)** Umweltorientierte Bodenkunde.
Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin Oxford. 328 S.
- Whipps, J.M. (1990)** Carbon economy.
in J.M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 59-97
- White T.J., T. Bruns, S. Lee und J. Taylor (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.
In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky und T.J. White (eds.) PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101, 315-322
- Yang, C.H. und D.E. Crowley (2000)** Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status.
Applied and Environmental Microbiology 66, 345-351
- Zuberer, D.A. (1990)** Soil and rhizosphere aspects of N₂-fixing plant-microbe associations.
in J.M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, 317-353

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Angelika Susanne Rumberger
Geburtstag und –Ort: 7.10.1974 in Hamburg
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schule und Studium

1980 – 1984 Grundsule der Heinrich Hertz Gesamtschule, Hamburg
1984 – 1993 Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg, Abschluss: Abitur

1993 - 1999 Studium der Biologie an der Universität Hamburg, Abschluss:
Diplom
Titel der Diplomarbeit: ‚Quantitative und qualitative
Untersuchungen an Wurzelexsudaten bei Raps.‘

1999-2002 Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Universität
Hamburg
Thema der Dissertation: ‚Einfluss von Gluconasturtiin und
2-Phenylethylisothiocyanat auf die Rhizosphärenmikroflora
beim Raps (*Brassica napus* L.).‘

April 2000 – März 2002 angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität
Hamburg, Finanzierung durch das DFG-Projekt MA 1675/4-1

17 Mai 2002 Disputation

Danksagung

Während der Arbeit an dieser Dissertation habe ich in der Rhizosphäre ein vielschichtiges und – in meinen Augen – auch wunderschönes System betrachtet. Es hat mir ganz einfach Freude bereitet, einen Teil dieses Systems erforschen und ansatzweise verstehen zu dürfen. Ich staune über Gott, dessen Reichtum so groß ist, dass er nicht einmal zwei Wurzeln auf die selbe Weise wachsen lässt. Und ich danke ihm dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, an diesem System zu arbeiten, und auch für die vielen Menschen, die mir während dieser Zeit und bei dieser Arbeit geholfen haben.

Namentlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei danken, mir dieses spannende Thema vorgeschlagen zu haben, und für die hilfreiche Diskussion, wenn es um die Feinheiten der Formulierung ging.

Frau Dr. Petra Marschner möchte ich für die erstklassige Betreuung danken, die auch durch Aufenthalte auf der anderen Hemisphäre nicht eingeschränkt wurde. – Schließlich ist es wohl nicht alltäglich, wenn der am Abend verfasste Text am nächsten Morgen ausgiebig kommentiert und gründlich durchgesehen wieder auf dem Bildschirm erscheint. Ganz besonders möchte ich mich auch dafür bedanken, dass sie das DfG-Projekt MA 1675/4-1 beantragt hat, das mir zwei Jahre lang Gehalt und Forschungsgelder beschert hatte. Ganz abgesehen davon war Petra eine ungewöhnlich nette und lustige Laborgefährtin und die Danksagung wäre nicht vollständig, bliebe unerwähnt, dass sie mich aus der Abstellkammer wieder herausgelassen hat.

Frau Karen Baumanns praktischem Einfallsreichtum verdanke ich die Beschleunigung vieler meiner Arbeitsschritte. Ohne sie wäre die Arbeit im Labor mit nur halb so viel Gelächter getan worden – und der Schreibraum der Bucerius-Law-School unter der Clean-Bench hätte auf seinen Deckenschmuck verzichten müssen. Ihr und Frau Dr. Martina Skatulla verdanke ich, dass mir das Institut für Angewandte Botanik ein zweites Zuhause geworden ist. Frau Dr. Esther Hoberg bin ich für den vielen Tee und für die Langmut, mit der sie die Teepfützen neben dem Waschbecken ertragen hat, zu Dank verpflichtet. Frau Jessica Lied und Frau Maren Manske danke ich, mir das Einleben im Container erleichtert und mich mit ungeahnten Seiten des Internets bekannt gemacht zu haben. Herrn Dr. Helmut Kassner verdanke ich die erste Bekanntschaft mit dem Gaschromatographen. Und natürlich habe ich auch die Kameradschaft aller nicht namentlich erwähnten Nubier sehr genossen.

Dem Leiter dem Versuchsfeldes, Herrn Dr. Ibenhal, und allen Mitarbeitern in Wulfsdorf möchte ich für die Hilfe danken, die Feldversuche ermöglicht haben.

Ich hätte wohl kaum gewagt, den Ergebnissen der Hauptkomponenten- und Redundanzanalysen zu vertrauen, hätte mein Bruder, Dr. Matthias Rumberger, mir nicht die Theorie dieser Methoden verständlich gemacht.

Meinen Eltern, Prof. Dr. Ekkehart Rumberger und Dr. Monika Rumberger, danke ich, abgesehen von der finanziellen und moralischen Unterstützung, auch dafür, den Löwenanteil des Korrekturlesens übernommen zu haben. Mein Dank gilt natürlich auch den übrigen fleißigen Korrigieren, Maren Manske, Jessica Lied, Vera Böhm und Roland Gros.

Schließlich bleibt noch mein Mann zu erwähnen, der zwar zu dieser Arbeit nicht viel beigetragen hat, den ich aber trotzdem mit keinem anderen tauschen möchte.