

UNIVERSITÄT HOHENHEIM

Bachelorarbeit

Aufnahme und Verteilung von endophytischen Bazillusstämmen in Nassreis

Fakultät Agrarwissenschaften

Institut für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut)

Fachgebiet Wasserstress-Management bei Kulturpflanzen in den Tropen und Subtropen
(490g)

Prof. Dr. Folkard Asch

Rebekka Steinhart

Studiengang Nachwachsende Rohstoffe und Bioenergie

Prüfer: Prof. Dr. Folkard Asch

Stuttgart-Hohenheim, den 16.08.2019

Abstract

Reis ist weltweit ein wichtiges Grundnahrungsmittel, das auf einem großen Teil der Erde angebaut wird und das Hauptnahrungsmittel von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung ist. Beim Reisanbau sind die Pflanzen verschiedenen abiotischen und biotischen Stressen ausgesetzt. Ein Stress, der häufig bei Reisanbau auftritt, ist die Eisentoxizität. Eisentoxizität kann zu Ernteverlusten von zwischen 12 und 100 % führen. Die Inokulation von eisengestressten Reispflanzen mit bestimmten Endophyten kann diese Ernteverluste verringern.

Um ein besseres Verständnis über die Wirkungsweise der Endophyten zu erlangen, wurde in dieser Arbeit eruiert, ob die Bakterienstämme *Bacillus megaterium* und *Bacillus pumilus* die Reissorten Sahel108 und Suakoko8 besiedeln und wohin sie sich in der Pflanze verteilen. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Dampfdruckdefizite und das Verletzen der Reisswurzeln auf die Aufnahme und Verteilung der beiden Bakterienstämme haben.

Der zur Inokulation verwendete Bazillusstamm *B. pumilus* konnte nicht in den Pflanzen nachgewiesen werden, *B. megaterium* konnte in allen Versuchspflanzen gefunden werden. Bei dem Eintritt von *B. megaterium* in die Wurzeln konnten Unterschiede zwischen den Reissorten nachgewiesen werden. Das Dampfdruckdefizit beeinflusst das Eindringen und die Verteilung von *B. megaterium* in den Pflanzen, die Wurzelbehandlung hat keinen Einfluss auf das Eindringen, jedoch auf die Verteilung. Es konnte also ein Einfluss des Dampfdruckdefizits und der Wurzelbehandlung auf die Verteilung von *B. megaterium* in den Pflanzen nachgewiesen werden. Nun kann in weiteren Untersuchungen genauer darauf eingegangen werden in welchen Pflanzengewebe *B. megaterium* sich aufhält, wie es sich in den Pflanzen verteilt und welche Wirkungen es auf Pflanzen ausübt, die unter Eisentoxizität leiden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Reispflanzen	3
2.2 Endophytische Bakterien	4
2.3 Die verwendeten Bakterienstämme	5
2.4 Aufnahme und Verteilung von Endophyten in der Pflanze	5
2.4.1 Auftreten	5
2.4.2 Endophyten in der Rhizosphäre	6
2.4.3 Besiedelung der Pflanze	7
3 Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.2 Pflanzen	11
3.2.1 Keimung	11
3.2.2 Hydroponisches System	11
3.3 Klimakammern	12
3.4 Kultivierung der Bakterien	13
3.5 Inokulation der Pflanzen	14
3.6 Versuchsaufbau	14
3.7 Nachweis der Bakterien in der Nährlösung	15
3.8 Mikroskopieren	15
3.9 Auswertung der Ergebnisse	15
4 Ergebnisse	17
4.1 Nachweis der Bakterien in der Nährlösung	17
4.2 Mikroskopische Untersuchung der Bakterienkolonien	18
4.3 Nachweis der Bakterien in den Pflanzen	20
4.4 Nachweis der Bakterien in den Wurzeln	20
4.5 Sortenunterschiede	20
4.6 Aufnahme der Bakterien in oberirdischen Pflanzenorgane	21
4.7 Vergleich aller Behandlungen	21
4.8 Bakterien innerhalb der Blätter	22
4.9 Verteilung der KBE zwischen Blattspreite und Blattscheide	23

4.10 Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen und Wurzeln	24
5 Diskussion	26
5.1 Bakterien in der Nährlösung.....	26
5.2 Mikroskopische Untersuchung der Bakterienkolonien	27
5.3 Einfluss der relativen Luftfeuchte	27
5.4 Einfluss der Wurzelbehandlung	28
5.5 Unterschiede zwischen den Sorten.....	29
5.6 Verhältnis oberirdischer Pflanzenorgane zu Wurzel.....	30
5.7 Mögliche Fehlerquellen und Verbesserungsvorschläge	31
6 Fazit und Ausblick.....	32
7 Literaturverzeichnis.....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum	13
Abbildung 2: Probe der Nährlösung der Kontrolle	17
Abbildung 3: Probe der mit <i>B. megaterium</i> inokulierten Nährlösung	17
Abbildung 4: Probe der mit <i>B. pumilus</i> inokulierten Nährlösung	17
Abbildung 5: <i>B. pumilus</i> aus dem Glycerolstock	18
Abbildung 6: Ein aus der Blattspreite von Suakoko8 isoliertes Bakterium	18
Abbildung 7: Ein weiteres aus Suakoko8 isoliertes Bakterium	18
Abbildung 8: <i>B. megaterium</i> aus dem Glycerolstock	19
Abbildung 9: Aufnahme eines aus einer Suakoko8 Probe inokulierten Bakteriums	19
Abbildung 10: Bakterienisolat aus einer nicht inokulierten Sahel108 Kontrollpflanze	19
Abbildung 11: Bakterienisolat aus einer mit <i>B. pumilus</i> inokulierten Suakoko8-Pflanze	19
Abbildung 12: Mittelwerte der <i>B. megaterium</i> KBE pro g FG in den Wurzeln	20
Abbildung 13: Verteilung von <i>B. megaterium</i> auf die einzelnen Blattorgane	22
Abbildung 14: KBE pro g FG in den Blattorganen der unterschiedlichen Altersstufen	23
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der KBE in den Blattscheiden und Blattspreiten	24
Abbildung 16: Relation der Anzahl an KBE in den Blättern und in den Wurzeln	25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Yoshida Nährlösung 100 %	10
Tabelle 2: Anteil der Proben in denen <i>B. megaterium</i> nachgewiesen wurde.	21

Abkürzungsverzeichnis

B.	Bacillus
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
ePGRP	Extracellular Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria
FG	Frischgewicht
g	Gramm
gr.	Griechisch
ha	Hektar
iPGRP	Intracellular Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria
kg	Kilogramm
KBE	Koloniebildende Einheit
lat.	Latein
L	Liter
L0, L1, L2, L3	Blattspreiten der Altersstufen 0, 1, 2, und 3
m	Meter
µm	Micrometer
µl	Microliter
M	Mol
mg	Milligramm
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
nm	Nanometer
O	Oberirdische Pflanzenorgane
OD	Optische Dichte
PGRP	Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₂ O ⁺ Ionenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute
S1, S2, S3	Blattscheiden der Altersstufen 1, 2, und 3
t	Tonnen
TKG	Tausendkorngewicht
TSB	Tryptic Soy Broth
Tsd.	Tausend
uv	Unverletzte Wurzeln
v	Verletzte Wurzeln
VPD	Vapour Pressure Deficit
W	Wurzeln

1 Einleitung

Reis spielt weltweit eine wichtige Rolle als Grundnahrungsmittel. Er wird auf einem großen Teil der Erde angebaut und ist das Hauptnahrungsmittel von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung (FAOSTAT, 2018). Die größte reisproduzierende und -verbrauchende Region ist Asien, wobei Reis sich in den letzten Jahren auch stark in Afrika ausgebreitet hat. (FAOSTAT, 2018; Zeigler and Barclay, 2008). Dort wird er vor allem von der wachsenden urbanen Bevölkerung als Conveniencefood zu sich genommen (Seck et al., 2012). Reis lieferte 2005 20 % der weltweit konsumierten Kalorien, 2/3 der Menschen in Armutsverhältnissen ernähren sich hauptsächlich von Reis (IRRI). In vielen asiatischen Ländern, wie auch in manchen afrikanischen Ländern nehmen die Menschen jährlich mehr als 100 kg Reis zu sich (Seck et al., 2012). Weltweit ist Reis, nach Weizen, das am zweit-häufigsten angebaute Getreide und hat einen höheren Kalorien-Hektarertrag als jedes andere Getreide (Fageria, 2007). Allein im Jahr 2016 wurden insgesamt 740 961 Tsd. t Reis produziert (FAO, 2018). Nach den Prognosen der FAO nimmt der Zuwachs der globalen Reisproduktion ab, es ist aber weiterhin ein Zuwachs erkennbar (OECD-FAO, 2015). Somit bleibt Reis weiterhin, besonders durch den wachsenden Konsum in Afrika, ein wichtiges Produkt.

Weltweit wird auf 93 Mio. ha Reis im Nassreisanbauverfahren angebaut, was 75 % der globalen Reisproduktion ausmacht (MacLean et al., 2013). Dieses Verfahren wird seit Jahrtausenden angewendet und wird als eines der produktivsten Reisanbausysteme betrachtet. (Fairhurst and Dobermann, 2002). Dabei werden die Reisfelder dauerhaft geflutet und mit Hilfe von Dämmen wird verhindert, dass das Wasser abfließen kann. Bei dem Anbau von Reis sind die Pflanzen verschiedenen abiotischen und biotischen Stressen ausgesetzt. Eine Toxizität, die häufig beim Reisanbau in Gebieten wie Westafrika auftritt, ist die Eisentoxizität (Audebert and Sahrawat, 2000; Dobermann and Fairhurst, 2000). Eisentoxizität kann zu Ernteverlusten von zwischen 12 und 100 % führen (Abifarin, 1988; Sahrawat et al., 1996; Sahrawat, 2004). Die Inokulation von eisengestressten Reispflanzen mit bestimmten Endophyten kann diese Ernteverluste verringern. Dies kommt daher, dass die Endophyten wachstumsfördernde Substanzen synthetisieren, die Nährstoffaufnahme in die Pflanze erleichtern, oder die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegen Phytopathogene erhöhen können (Santoyo et al., 2016). Es wurde festgestellt, dass verschiedene Bazillusstämme unterschiedliche Einflüsse auf die Toleranzen der Pflanzen gegenüber Eisenstress haben. So wurde nachgewiesen, dass sich bei einer Inokulation von *Bacillus megaterium* in vier Reisgenotypen die Blattsymptome mindern und sich die Eisenkonzentration in den Blättern verringert. Auch bei der Inokulation mit *Bacillus subtilis* hat sich die

Eisenkonzentration im Blatt gesenkt, die Auswirkungen des Bazillusstammes auf die Blatt-symptome waren gering (Asch, 2006). Obwohl die exakte Wirkungsweise von Endophyten noch nicht geklärt ist, ist bekannt, dass sie sich je nach Bakterienstamm und Reissorte unterscheidet. Weshalb dies der Fall ist und wie die genaue Wirkungsweise der Endophyten ist, ist noch nicht geklärt.

Um die Wirkungsweise der verschiedenen endophytischen Bazillusisolate besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Aufnahme und die Verteilung der Bakterienstämme *Bacillus megaterium* und *Bacillus pumilus* im Gewebe von zwei Reissorten untersucht. Dabei wurde außerdem analysiert, welchen Einfluss unterschiedliche Dampfdruckdefizite und die daraus resultierenden verschiedenen Transpirationsraten, sowie eine Verletzung der Wurzeln auf die Verteilung der Bakterien in der Pflanze haben.

2 Kenntnisstand

2.1 Reispflanzen

Reis (*Oryza sativa* L.) ist eine Halbwasserpflanze, die einjährig angebaut wird, aber auch mehrjährig wachsen kann. Eine reife Reispflanze besteht aus einem Stängel mit mehreren Bestockungstrieben und kann, je nach Sorte und Umwelt, von 0,4 m bis zu mehr als 5 m hoch werden. (MacLean et al., 2013). Die Wachstumsperiode von Reis bis zur Samenreife beträgt je nach Sorte und Umwelt 3-6 Monate. Dieser Zeitraum lässt sich in die vegetative, die reproduktive und die reife Phase einteilen. Die vegetative Phase umfasst die Keimung und die Jungpflanzenentwicklung mitsamt Bestockung. In dieser Phase wächst die Pflanze und beginnt Blätter zu bilden (MacLean et al., 2013).

Reiskörner bestehen aus einer Karyopse und der diese umhüllenden Reisspelze. Wird der Samen unter aeroben Bedingungen kultiviert, bildet sich zuerst die Koleoptile. Die Wurzeln entwickeln sich sobald die Koleoptile belüftete Regionen der Umgebung erreicht hat. Nach dem Austreten teilt sich die Koleoptile auf und das erste Blatt tritt aus. Die Bestockung beginnt sobald die Pflanze fünf Blätter hat und sich selbst versorgen kann (MacLean et al. 2013). Der Stängel der Reispflanze besteht aus Nodien und Internodien. Die Blattspreite ist über die Blattscheide mit einem Nodium verbunden, wobei die Blattscheide das Nodium umwickelt. An dem Ort, an dem Blattscheide und Blattspreite zusammenkommen, befinden sich kleine von Härchen bedeckte Auswüchse, die so genannten Öhrchen. Über den Öhrchen befindet sich eine dünne Membran, die Ligula. (MacLean et al., 2013). Die jüngeren Blätter wachsen durch die Blattscheide der älteren Blätter nach oben, somit befinden sich innen die jungen und außen die älteren Blätter. Die Blätter werden vom jüngsten zum ältesten hin nummeriert. Das jüngste Blatt wird als L0 bezeichnet, das jüngste vollentwickelte Blatt als L1/S1. Bei dem jüngsten vollentwickelten Blatt muss die Ligula ohne Fremdeinwirkung erkennbar sein. Es folgen Blatt L2, Blatt L3 und so weiter.

Das Wurzelsystem von Reis wird in Keimwurzeln, Mesocotylwurzeln und Nodalwurzeln unterteilt. Die einzelnen Wurzeln können einen Durchmesser von 40-1000 µm haben. Die Wurzelhaare haben einen Durchmesser von 5-10 µm und werden 50-200 µm lang. Das Wurzelsystem von Reispflanzen kann 40-100 cm lang werden, wobei die Wurzeln in anaeroben Umwelten selten tiefer als 40 cm in den Boden reichen. (Yoshida, 1981)

2.2 Endophytische Bakterien

Als endophytische Bakterien werden, wie der Name sagt (gr. endon = drinnen, phyton = Pflanze) (Schulz et al., 2006) Bakterien klassifiziert, die das innere Pflanzengewebe besiedeln. Laut Mano (Mano and Morisaki, 2008) ist eine der adäquatesten Definitionen für sie die von Hallmann (1997), dieser definiert: "We consider any bacterium as an endophyte if it can be isolated from surface-desinfested plant tissue or extracted from inside the plant, and if it does not visibly harm the plant" (Hallmann et al., 1997). Endophyten sind ubiquitär und können in allen Pflanzenspezies entweder latent oder als aktiv die Pflanze kolonisierend vorkommen. (Afzal et al., 2014). Manche Endophyten gehören zu den Plant Growth-Promoting Rhizobacteria“ (PGPR). Dies sind Rhizobakterien, die einen positiven Einfluss auf das Pflanzenwachstum und die Pflanzenentwicklung haben. Es gibt zwei Typen von PGPR, die einen leben in den Pflanzenzellen und werden als intrazelluläre PGPR (iPGPR) bezeichnet, die anderen, die extrazellulären PGPR (ePGPR), leben in der Rhizosphäre, der Rhizoplane oder in dem Raum zwischen den Zellen der Wurzelcortex. (Verma et al., 2010).

Die Forschung, die sich mit Bakterien befasst, die sich im inneren Gewebe von Pflanzen befinden, begann schon in den 1870ern (Mano and Morisaki, 2008). Anfangs wurde davon ausgegangen, dass das Vorhandensein von jeglichen Bakterien im pflanzlichen Gewebe pathologisch ist. Erst später hat Perotti (1926) das Vorhandensein von nichtpathogenen Bakterien in Pflanzengewebe nachgewiesen. In den 1990er Jahren wuchs das Interesse an bakteriellen Endophyten stark, nachdem bewiesen werden konnte, dass die Impfung mit nicht-pathologischen Bakterien einen positiven Effekt auf Pflanzenwachstum und -gesundheit haben kann (Dimkpa et al., 2009). Dieser positive Effekt kommt entweder direkt, durch die Synthese wachstumsfördernder Substanzen oder die Erleichterung der Nährstoffaufnahme in die Pflanze, oder indirekt, durch eine Erhöhung der Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegen Phytopathogene, zustande. (Santoyo et al., 2016). Die Wirkung der PGPR auf das Pflanzenwachstum hängt vermutlich mit den Stoffen zusammen, die von den PGPR freigesetzt werden. Verschiedene PGPRs können die Hauptphytohormonklassen Auxine, Cytokine, Gibberelline, Abscisinsäure und Ethylen produzieren. Diese Hormone stimulieren das Pflanzenwachstum. (Dimkpa et al., 2009). Andere von Rhizobakterien produzierte Stoffe sind Enzyme, Stickoxide, Osmolyte, Siderophore, organische Säuren und Antibiotika. Diese Stoffe können für die direkte Stimulierung verantwortlich sein, die zur Unterdrückung von Pathogenen, zur Verbesserung der Aufnahme von Mineralen und zur Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegenüber Stress führt. (Dimkpa et al., 2009). Obwohl die Beziehungen zwischen Pflanzen und Bakterien bereits viele Jahre erforscht

wurden, herrscht noch kein komplettes Verständnis für die Mechanismen von PGPR. Dieses ist notwendig, um deren Vorteile für Pflanzen optimal auszuschöpfen (Santoyo et al., 2016).

2.3 Die verwendeten Bakterienstämme

Bei einem der verwendeten Bakterienisolate handelt es sich um *Bacillus megaterium* (gr. mega = groß, teras = Monster, Ungeheuer), dieser wurde vor mehr als 100 Jahren das erste Mal beschrieben. *B. megaterium* ist ein Gram-positives, hauptsächlich aerobes, sporenbildendes Bakterium (Vary et al., 2007). Es bildet relativ große Stäbchen, die 2 x 5 µm groß sind. Die Zellen sind unbeweglich und nur bei guter Belüftung leicht beweglich. Die Form der Sporen kann von rundlich bis länglich variieren. Wenn die Spezies auf Glucose-Agar angezogen wird, bildet sie mucoide Kolonien (Seiler, 2010). Obwohl es ein Bodenorganismus ist, kann *B. megaterium* in vielen verschiedenen Umwelten wie Reis, getrocknetem Essen, Meerwasser, Sedimenten, Fisch und Honig gefunden werden (Vary et al., 2007). Ursache hierfür ist, dass die Spezies für das Wachstum keine organischen Stickstoffquellen oder Vitamine benötigt, und bei Temperaturen von 5-40 °C wachsen kann (Seiler, 2010). *B. megaterium* stellt Proteine wie Penicillin Acylase (Martin et al. 1995, Suga et al. 1990), verschiedene Amylasen (Hebeda et al. 1988; Metz et al. 1988) und Glucose Dehydrogenase her (Nagao et al. 1992).

Bei dem zweiten verwendeten Bakterienisolat handelt es sich um *Bacillus pumilus* (lat. Pumilus = Zwerg). Dieses ist ein Gram-positives Bakterium (Gordon et al., 1973). *B. pumilus* ist ein relativ kleiner Bazillus mit starker Beweglichkeit (Seiler, 2010). Die Stäbchen sind ungefähr 0,6 x 3 µm groß (Gordon et al., 1973). Die Sporen sind ellipsoid oder zylindrisch (Gordon et al., 1973). Die natürlichen Lebensräume, in denen die Spezies gefunden werden kann, sind in Lebensmitteln, im Boden, in Oberflächenwasser, in verrottendem Pflanzenmaterial und oft in Molkereiprodukten (Seiler, 2010).

2.4 Aufnahme und Verteilung von Endophyten in der Pflanze

2.4.1 Auftreten

Endophyten sind Bakterien, die das innere Pflanzengewebe von Pflanzen besiedeln, ohne diesem zu schaden (Hallmann et al., 1997). Sie stammen aus Samen (McInroy and Kloepper 1995; Misaghi and Donndelinger 1990; Mundt and Hinkle 1976), aus vegetativem Pflanzenmaterial (Dong et al 1994, Sturz 1995), aus der Rhizosphäre (Patriquin et al 1983), und aus der Phyllosphäre (Beattie and Lindow 1995). Auch die Spermosphäre konnte als Ursprung von

Endophyten nachgewiesen werden (Musson et al. 1995). Die Rolle von Samen als Ursprung von Endophyten wird noch kontrovers diskutiert. Sato hat in seinen Studien keine Endophyten in Reissamen gefunden (Mano et al., 2008). In anderen Studien wurden Endophyten in überlebensfähigen Mengen in Reiskörnern beobachtet (Mano et al. 2006, Okunishi, 2005). Da davon ausgegangen wird, dass Endophyten gegeneinander und gegen andere endophytische Organismen, wie Pilze, um den limitierten Platz in der Wirtspflanze konkurrieren (Fisher 1992, Quadt-Hallmann et al., 1997), haben in den Samen lebende Endophyten möglicherweise den Vorteil, dass sie die nächste Pflanzengeneration direkt nach der Keimung infizieren können. (Mano et al. 2008).

2.4.2 Endophyten in der Rhizosphäre

Der Raum und die vorhandenen Nährstoffe in der Rhizosphäre sind begrenzt, daher ist diese eine kompetitive Umwelt für die dort lebenden Mikroorganismen (Raaijmakers et al., 2002). Das führt dazu, dass sich die Mikroorganismen in der Umgebung verteilen (Haas and Keel, 2003). Dabei spielen Faktoren wie die Beweglichkeit und die Polysaccharid-Produktion in der Rhizosphäre eine wichtige Rolle. Diese Faktoren erleichtern die Kolonisierung von Wurzeln durch bestimmte Bakterienstämme (You et al., 1995; Bashan and Holguin, 1993; Bashan and Holguin, 1995). Die Bewegung von Rhizobakterien vom Ort der Inokulation, hin zu den wachsenden Wurzeln wird von zwei fundamentalen Mechanismen kontrolliert. Erstens von der aktiven Beweglichkeit der Bakterien, und zweitens von der passiven Bewegung von Bakterien in Sickerwasser oder anderen Vektoren. Welcher der Mechanismen mehr Einfluss hat, hängt vom Bodentyp, der Wirtspflanze und den Eigenschaften der Bakterien ab (Benizri et al., 2001). Lugtenberg et al. (1996) untersuchten unbewegliche Bakterien auf ihre Fähigkeit, die Wurzelspitzen von Tomaten und Kartoffeln zu kolonisieren. Diese Nachforschungen ergaben, dass die Chemotaxis von Bakterien gegenüber Wurzelexsudaten bei der Kolonisierung der Wurzeln eine große Rolle spielen. Gamliel und Katan (1992) schlugen vor, dass die Fähigkeit von *P. fluorescens* Stämmen in sterilisierten Böden von Tomatensamenexsudaten angezogen zu werden bei der Kolonisierung der Rhizosphäre eine große Rolle spielt. Die Rolle, die Exsudate als Chemoattraktant spielen, ist pflanzenspezifisch. Mandimba et al. (1986) demonstrierten, dass Bakterienstämme, die aus der Maisrhizosphäre isoliert wurden, eine Chemotaxis zu Maiswurzelexsudaten aufwiesen, im Gegensatz zu Stämmen aus der Reiserhizosphäre, die diese Chemotaxis nicht aufwiesen.

2.4.3 Besiedelung der Pflanze

Die aus der äußeren Umgebung von Pflanzen stammenden Endophyten können durch Stomataöffnungen, an Blättern und jungen Stängeln (Roos and Hattingh, 1983), Lentizellen (Scott et al., 1996), durch Verletzungen und an den Austrittsstellen von Seiten- und Keimwurzeln in die Pflanzen eindringen (Huang J.S. 1986). Für die meisten Endophyten scheinen natürliche Verletzungen an den Wurzeln, wie an den Austrittsstellen von Seitenwurzeln oder, bedingt durch Pflanzenwachstum, an den Wurzelspitzen (Kobayashi and Palumbo 2000; Mano et al., 2008) oder der Eintritt durch die Wurzelhaare die Haupteintrittsstellen in die Pflanzen zu sein (Hallmann et al., 1997). Die Wurzelkolonisierung ist ein komplexer Prozess der von Parametern wie den Eigenschaften der Bakterien, den Wurzelexsudaten, biotischen und abiotischen Faktoren beeinflusst wird (Benizri et al., 2001). Bevor Endophyten in die Wurzel eindringen können, müssen sie sich in der Rhizosphäre anreichern und sich an die Wurzeloberfläche anhängen. An Wurzelverletzungen werden Wurzelexsudate und Metabolite ausgeschieden, die Rhizobakterien anlocken. Die systematische Kolonisierung der Wirtspflanze kann mit einer einzelnen Eintrittsstelle erreicht werden (Hallmann et al. 1997). Die Kolonisierung selbst beginnt mit der Migration der Bakterien durch den Keimschlitz in das stärkehaltige Endosperm. Von dort aus kolonisieren sie die Keimwurzel und die Koleoptile (Hinton and Bacon 1995). Anschließend können sie entweder in einem bestimmten Gewebe wie der Wurzelcortex bleiben, oder sie verteilen sich systematisch durch den Transport durch Leitgefäße oder den Apoplast in der Pflanze (Hurek et al. 1994; Mahaffee et al. 1997; Quadt-Hallmann et al. 1997; Patriquin and Döbereiner 1978). Die systematische bakterielle Kolonisierung des inneren pflanzlichen Gewebes scheint von Pflanzenteilen beeinflusst zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach einer Samenbehandlung zwei Endophyten, *Pseudomonas fluorescens* 89B-27 und *Enterobacter asburiae* JM22, das kortikale und das vaskuläre Wurzelgewebe der Gartenbohne kolonisierten, aber nur JM22 das Stängelgewebe kolonisierte (Mahaffee et al. 1997). Sobald die Endophyten sich im pflanzlichen Gewebe etabliert haben können sie vegetativ übertragen werden (Hallmann et al., 1997).

Endophyten kolonisieren hauptsächlich interzelluläre Räume und das vaskuläre System der Wirtspflanzen, es gibt nur wenige beschriebene Fällen von intrazellulärer Kolonisierung (Hallmann, 1997). Endophyten konnten bereits in Stängeln, Blättern, Früchten, Blüten und Samen nachgewiesen werden (Compant et al., 2011). Die Bakterienmenge ist am höchsten im Wurzelgewebe, vermutlich weil dort die Infektion startet (Kobayashi and Palumbo 2000; Hallmann et al. 1997). In den Wurzeln werden von den Endophyten epidermale Zellen (Quadt-Hallmann

and Kloepper, 1996), das Rindenparenchym (Mattos et al., 2008) und das aerenchymatische Gewebe (Reinhold and Hurek, 1989) kolonisiert.

3 Material und Methoden

Der in dieser Arbeit beschriebene Versuch wurde am Institut für tropische Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim durchgeführt. Es wurden die zu dem Institut gehörenden Labore und das Gewächshaus genutzt.

Der Versuchsaufbau bestand aus den folgenden Faktoren: 2 Reissorten, 2 Luftfeuchtebedingungen, 3 Bakterienbehandlungen (Kontrolle und 2 Bakterienstämme) und verletzten bzw. unverletzten Wurzeln. Somit ergab sich eine Pflanzenzahl von 24 in beiden Wiederholungen, von denen jeweils 8 Proben aus unterschiedlichen Geweben genommen wurden.

3.1 Material

Keimboxen: Eine durchsichtige Box aus Kunststoff wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit einem Filterpapier ausgelegt. Sie wurde mit einem Deckel verschlossen, der durch Öffnungen eine durchlaufende Lüftung ermöglichte.

Sand: Der verwendete Sand war Spielkastensand aus dem Baumarkt der drei Mal mit Leitungswasser gewaschen wurde.

Pflanzenkisten: Bei den Kisten handelte es sich um Kunststoffboxen mit einem Fassungsvermögen von 5 L (30x20x12 cm; Auer Packaging, Deutschland). In den Kisten war Platz für 24 Pflanzen, in jede Kiste wurden zwischen 19 und 20 Pflanzen gepflanzt, je nachdem wie viele gekeimte Samen zur Verfügung standen. Die einzelnen Kisten wurden je nach Wiederholung, Klimakammer und Bakterium beschriftet.

TSB-Nährmedium: Das flüssige TSB-Nährmedium wurde hergestellt indem 30 g TSB (Tryptic Soy Broth, mikrobiologisch getestet, Fulka Analytical) in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst und autoklaviert wurden.

Ringer-Lösung: Die Ringer-Lösung wurde mit Ringer solution ¼ strength tablets (FLUKA Analytics, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hergestellt. Dabei wurde je eine Tablette in 500 ml demineralisiertem Wasser aufgelöst. Die fertige Ringerlösung wurde für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Mikroröhrchen (2 ml, Sarstedt, Deutschland): Die verschraubbaren Röhrchen wurden mit Labornummern beschriftet und mit 6 Precellys-Kreamikkugeln (2,8 mm) und ca. 0,6 g Precellys Keramikugeln (1,4 mm) befüllt.

Agarplatten: Zur Herstellung der Agarplatten wurden 9,6 g Agar-Agar (dänisch, pulv., Carl Roth GmbH & Co., Deutschland) und 24 g TSB (Tryptic Soy Broth, mikrobiologisch getestet, Fulka Analytical) in 800 ml demineralisiertem Wasser gelöst und zur Sterilisation für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert (Systec VE-95, Deutschland). Danach wurde die Nährlösung in einem Wasserbad (GFL, 1092 Schüttelwasserbad, Deutschland) warmgehalten, um anschließend unter einer Sterilbank (NordicSafe® Low Noise, Class II Biological Safety Cabinets, ESCO Micro Pte Ltd., Singapur) in Kunststoffpetrischalen gegossen zu werden. In jede Schale kamen 15-25 ml Nährmedium. Die fertig gegossenen Petrischalen blieben offen für eine halbe bis dreiviertel Stunde unter der Sterilbank liegen, um abzukühlen und zu trocknen. Die abgekühlten Platten wurden mit Deckeln verschlossen und konnten zusammengepackt und umgedreht, damit sich das Kondenswasser nicht auf dem Nährmedium sammelt, in den Kühlschrank gestellt werden.

Yoshida-Nährlösung: Es wurde eine Nährlösung nach Yoshida (1976) angewendet, die an Reis angepasst ist. Die Nährstoffe zur Herstellung der Nährlösung werden in Tabelle 1 angegeben. Der pH-Wert der Nährlösung wurde mit Natriumhydroxid (1 M NaOH, Roth, Deutschland) auf 5,5-5,8 eingestellt

Tabelle 1: Yoshida Nährlösung 100 %

Element	Chemikalie	Stammlösung [g/L]	Stammlösung pro Liter [ml/L]
N	NH ₄ NO ₃	114,29	1
P	NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	50,37	1
K	K ₂ SO ₄	89,14	1
Ca	CaCl ₂ *2H ₂ O	146	1
Mg	MgSO ₄ *7H ₂ O	73	1
Fe	FeNa -EDTA	405,64	1
Mn	MnCl ₂ *4H ₂ O	15,08	1
Zn	ZnSO ₄ *4H ₂ O	1,8750	
Cu	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0440	
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0,0393	
B	H ₃ BO ₃	1,1675	

3.2 Pflanzen

3.2.1 Keimung

Es wurden zwei Reissorten verwendet, Sahel108 und Suakoko8. Von beiden Sorten wurden mit Hilfe des TKG 100 Samen abgewogen. Diese wurden in der mit Filterpapier ausgelegten Kunststoffbox gleichmäßig verteilt. Die Box wurde mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt bis das Wasser bis zur halben Samenhöhe stand, dann wurde sie verschlossen. Die Samen wurden bei einer Raumtemperatur von 22-25 °C im Dunkeln gekeimt. Nach 24 Stunden wurden von beiden Sorten 70 der Samen in Sand umgesetzt. Die Pflanzen blieben für 10 Tage im Sand und wurden dann in ein hydroponisches System umgesetzt.

3.2.2 Hydroponisches System

Es wurden pro Wiederholung sechs Kisten (30x20x12 cm, Auer Packaging, Deutschland) verwendet. In jede Kiste wurde ein Röhrensystem, das aus zusammengeschweißten Kunststoffröhren (9 cm lang, ungefähr 4 cm Durchmesser) bestand, gesetzt. In jede Röhre konnte eine Pflanze mit Hilfe eines Schaumstoffzylinder (3 cm lang, 3,6 cm Durchmesser; Ceaprenstopfen, 36 mm, Greiner Bioone, Deutschland) platziert werden. Die Blattwerke der Pflanzen waren zum Zeitpunkt des Umsetzens 3-10 cm hoch. Sie wurden aus dem Sand genommen und ihre Wurzeln wurden in deionisiertem Wasser von Sand gereinigt. Dann wurden sie in die längs eingeschnittenen Schaumstoffzylinder gesetzt. Dazu wurden diese aufgeklappt und die Pflanzen wurden so eingeführt, dass unten der Samen und oben die Blätter rausschauten. Bei Pflanzen, deren Blattwerk noch nicht lang genug dafür war, wurde der Samen in die Mitte des Schaumstoffzylinders gesetzt, so dass unten nur noch die Wurzeln herausschauten. Anschließend wurde das Ganze in die Röhren gesetzt. In den Kisten wurden beide Sorten nebeneinander in Reihen gesetzt und markiert. Sobald die Pflanzen umgesetzt wurden, wurde ihnen 25 % Yoshida Nährlösung (Yoshida, 1976) zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Konzentration der Nährlösung auf 50 % und nach weiteren drei Tagen auf 100 % erhöht. Am 17. Tag nach der Keimung wurde die Nährlösung auf 100 % Yoshida gewechselt und die Pflanzen in die Klimakammern gestellt. Um Transpirationsverluste auszugleichen wurden die Pflanzenkisten zwischendurch mit VE-Wasser aufgefüllt. Am 30. Tag nach der Keimung wurden die Pflanzen geerntet.

Die Reispflanzen wurden in einem hydroponischen System kultiviert, da dieses eine einheitliche Nährstoffversorgung garantiert, die Anzahl unerwünschter Bodenorganismen verringert

und die Inokulation mit den gewünschten Bakterienstämmen vereinfacht. Die Pflanzen wurden täglich von 8 bis 20 Uhr mit einer Assimilationsbelichtung (DH Licht GmbH, SON-K 400) mit Natriumdampflampe (Philips SON-T Agro 400W), 1,20 m über dem Bestand hängend, beleuchtet.

3.3 Klimakammern

Für den Versuch wurden die Pflanzen unter zwei verschiedenen Dampfdruckdefiziten (VPD = Vapour Pressure Deficit) kultiviert, was ein relatives Maß für die Luftfeuchte ist. Es wurde nachgewiesen, dass Reispflanzen unter einem hohen VPD (VPD+) eine um den Faktor 1,5-2 höhere Transpirationsrate aufweisen, als Reispflanzen unter einem niedrigen VPD (VPD-) (Kuwugata et al. 2012).

Drei Boxen jeder Wiederholung kamen in eine Klimakammer mit hohem VPD, die anderen drei Boxen kamen in eine Klimakammer mit niedrigem VPD. Die Klimakammern standen im Gewächshaus. Sie hatten einem Holzrahmen mit Plexiglaswänden und wurden nach außen durch Kunststoffvorhänge abgeschirmt. Über den Versuchszeitraum lag die durchschnittliche Temperatur in den Kammern bei 31,2 °C. In der Kammer mit der höheren VPD (VPD +) wurde die durchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit mit einem Luftentfeuchter (Condorb DC-10, Seibu Giken DST, Schweden) bei ungefähr 43,8 % gehalten. In der Kammer mit dem niedrigen VPD (VPD -) wurde die Luft mit einem Dampfluftbefeuchter (Heater Compact Comfort, HygroMatik GmbH, Deutschland) auf ca. 83,7 % relative Luftfeuchtigkeit befeuchtet. An beiden Seitenwänden, sowie an der Decke der Kammern war ein Axiallüfter (120x120 cm, Sunon KD1212PTS-6A, Sunonwealth Electric Machine Industry Co., Taiwan) angebracht, um eine gute Durchlüftung der Kammern zu gewährleisten. In jeder Kammer hat ein Temperatur- und Feuchte- Datenlogger (Tinytag TGP-4500, Gemini Data Loggers Ltd, United Kingdom), alle 30 Minuten die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit erfasst. In der folgenden Abbildung werden die Tagesmittel der Klimadaten in dem Zeitraum, in dem die Pflanzen in den Klimakammern standen, dargestellt (Abbildung 1).

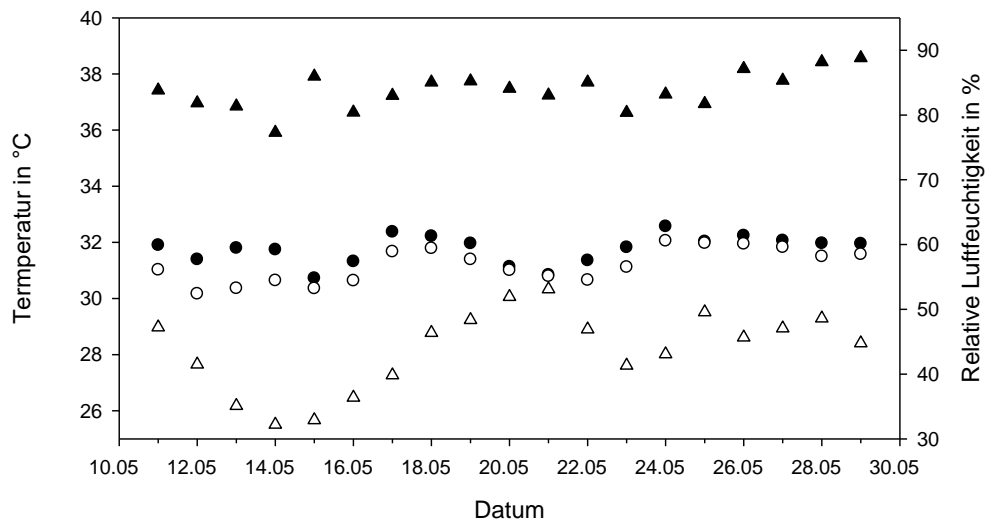


Abbildung 1: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind die Temperaturen bei hohem (●) und niedrigem (○) VPD, sowie die relative Luftfeuchtigkeit unter einem hohen (▲) und unter einem niedrigen (△) VPD.

3.4 Kultivierung der Bakterien

Für die Bakterienkultivierung wurden Glycerolstocks der verwendeten *Bacillus megaterium* und *Bacillus pumilus* Isolate verwendet, die bei -80 °C in einem Ultratiefkühlschrank (Fryka Kältetechnik, TS 80-100) gelagert wurden. Unter einer Sterilbank (NordicSafe® Low Noise, Class II Biological Safety Cabinets, ESCO Micro Pte Ltd., Singapur) wurde jedes Isolat mit einer Impföse in einem Verdünnungsviereck auf TSB-Agarplatten ausgestrichen und anschließend bei 28 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden, je nach Größe der Kolonien, ein bis zwei Kolonien mit einem sterilen Holzspachtel aufgenommen und mit 200 ml flüssigem TSB-Nährmedium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden anschließend bei 28 °C und 125 rpm auf einem Schüttelinkubator (SM-30, Edmund Bühler GmbH, Deutschland) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Flüssigkulturen aus dem Schüttler entnommen und die optische Dichte (OD) wurde mit einem Spektrophotometer (DU-640 Spectrophotometer, Beckman, USA) bei 550 und 600 nm bestimmt. Das reine TSB-Nährmedium wurde als Referenzmedium verwendet. Wenn die gemessene OD-Wellenlänge unter 0,8-1 lag, wurde die Kultur für eine weitere Stunde in den Schüttler gestellt, damit die Bakterien sich weiter vermehren konnten. Anschließend wurden die Bakterien in einer Zentrifuge (Beckman Coulter, Allegra® X-15R Centrifuge, Deutschland) für 15 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde abgeschüttet. Die zurückgebliebenen Bakterienpellets wurden je nach OD₅₅₀ mit so viel

Ringerlösung verdünnt, dass für jede Kiste 50 ml Bakteriensuspension mit $OD_{550} = 1,4$ zur Verfügung stand. Die OD_{550} wurde dazu nochmals überprüft, gegebenenfalls wurde nochmals mit Ringerlösung verdünnt.

3.5 Inokulation der Pflanzen

Insgesamt 23 Tage nach der Keimung wurden die Pflanzen mit den Bakterien inokuliert. Als die Bakterien zu den Pflanzen gegeben wurden, wurden die Boxen erst komplett entleert und dann mit jeweils 3,5 Liter 100 % Yoshida Nährlösung aufgefüllt. Dieser Nährlösung wurden dann entweder 50 ml Bakteriensuspension oder im Fall der Kontrolle 50 ml $\frac{1}{4}$ Ringerlösung zugegeben. Bei der Hälfte der Pflanzen wurden die Wurzeln angeschnitten (verletzt), bei der anderen Hälfte nicht (unverletzt). Bei der ersten Wiederholung wurden die Wurzeln einen Tag nach der Inokulation angeschnitten, bei der zweiten Wiederholung direkt am Tag der Inokulation.

3.6 Versuchsaufbau

30 Tage nach der Aussaat wurden die Versuchspflanzen geerntet, um sie auf die Aufnahme und Verteilung der Bakterien zu untersuchen. Dafür wurden die Pflanzen in die vier jüngsten vollentwickelten Blattspreiten L0, L1, L2 und L3 (insofern vorhanden), die dazugehörigen Blattscheiden S1, S2 und S3 (insofern vorhanden) und die Wurzeln aufgeteilt. Als L0 wurde die gesamte jüngste Blattspreite mitsamt Blattscheide gewertet.

Die Pflanzen wurden einzeln aus den Kisten genommen und ihre Wurzeln wurden mit einer Schere abgetrennt. Die Pflanze wurde in ihre einzelnen Blattspreiten und Blattscheiden aufgetrennt. Alle Pflanzenteile wurden für 1,5 Minuten in separate, mit 70 % Ethanol (EtOH) gefüllte Bechergläser gelegt. Danach kamen die Pflanzenteile in 1 % Bleach. Nach 10 Minuten wurden sie 5 Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und kurz abgetrocknet. Von jedem Pflanzenteil wurden ungefähr 0,1 g Probe mit einer Feinwaage (Precisa XB 220 A, Precisa Gravimetrics AG, Schweiz). in ein Mikroröhrchen (2 ml, Sarstedt, Deutschland) eingewogen und das exakte Gewicht jeder Probe wurde notiert Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert, damit enzymatische Aktivitäten eingeschränkt werden konnten. Mit Hilfe eines Dispensers wurde jeder Probe 1 ml Ringer-Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 6 rpm in den Homogenisator (FastPrep®-24 Classic Instrument; QuickPrep™ 1 24x2 ml

Adapter, MP Biomedicals) gegeben. In dem Homogenisator wurden, mit Hilfe von Keramik-Kugeln, die Zellwände der Pflanzenteile zerstört und die Proben wurden homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Deutschland). Von den fertig behandelten Proben wurden dann, unter der Sterilbank, jeweils 200 µl mit einer Pipette auf eine Agarplatte gegeben und mit einem sterilen Drigalski-Spatel verteilt. Die Platten wurden mit einem Deckel verschlossen und kopf-über über Nacht bei 30 °C in einen Trockenschrank (Heraeus, BK 5060 Brutschrank, Deutschland) gestellt. Bei der Auszählung wurden die einzelnen Bakterienkulturen von der Unterseite der Platten mit einem Marker markiert. Die ausgezählten Ergebnisse wurden vermerkt.

3.7 Nachweis der Bakterien in der Nährlösung

Bei der zweiten Wiederholung wurden Proben der Nährlösungen genommen, um zu prüfen, ob und wie stark sich die Bakterien in der Nährlösung vermehrt hatten. Dazu wurden am Tag der Inokulation, sowie am dritten und sechsten Tag nach der Inokulation von allen Kisten je 1 ml Probe genommen. Von diesen Proben wurden jeweils 200 µl auf TSA-Agarplatten ausgestrichen.

3.8 Mikroskopieren

Um zu überprüfen ob die aus den Pflanzenproben stammenden Bakterienstämme die gleichen waren, die zuvor inokuliert wurden, wurden einzelne Bakterienkolonien, die sich auf den Agarplatten der Proben gebildet hatten, mikroskopiert. Als Referenz wurden ausgestrichene Glycerolstocks der jeweiligen Isolate verwendet. Zum Mikroskopieren wurden die Kolonien auf den Objektträger auf einen Glycerin-Tropfen (Glycerin, ROTIPURAN®, Carl Roth, Deutschland) positioniert. Um die Proben vergleichen zu können, wurden von ihnen Bilder gemacht.

3.9 Auswertung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde Microsoft Excel verwendet. Die Anzahl der Kolonien wurde auf koloniebildende Einheiten (KBE) pro 1 g Frischgewicht (FG) der Blattmasse umgerechnet, da die gezählten Bakterienkolonien aus Proben unterschiedlicher Größe stammten, und somit nicht ausdrucksstark waren. Die Standardfehler der Mittelwerte der Wiederholungen wurden berechnet und in die Grafiken eingefügt.

Die Grafiken wurden mit SigmaPlot (Version 10, Systat Software GmbH) erstellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Zweistichproben t-Tests unter der Annahme gleicher Varianzen ($\alpha = 0,05$) mit Microsoft Excel gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Bakterien in der Nährlösung

Um zu überprüfen, ob und wie stark sich die zur Inokulation der Pflanzen verwendeten *Bacillus*-Isolate in der Yoshida-Nährlösung vermehrt haben, wurden am Tag der Inokulation, am dritten und am siebten Tag nach der Inokulation Proben genommen. Die Proben vom Tag der Inokulation waren nicht auswertbar.

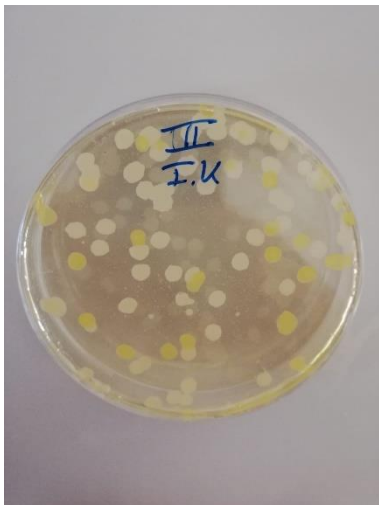


Abbildung 2: Probe der Nährlösung der Kontrolle am siebten Tag nach der Inokulation

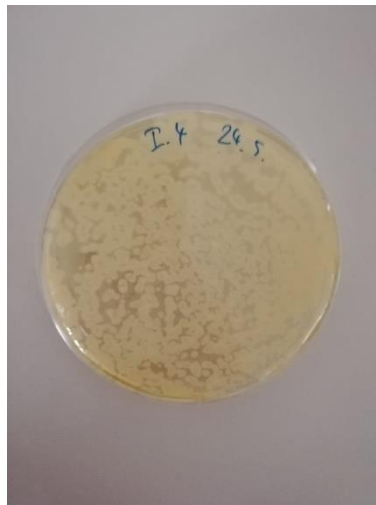


Abbildung 3: Probe der mit *B. megaterium* inokulierten Nährlösung am dritten Tag nach der Inokulation



Abbildung 4: Probe der mit *B. pumilus* inokulierten Nährlösung am siebten Tag nach der Inokulation

Auf den Platten der Kontrollen sind verschiedene Bakterienstämme gewachsen, deren Kolonien sich in ihrer Größe, Form und Farbe voneinander unterscheiden (Abbildung 2).

Die Platte der zweiten Probenahme von der mit *B. megaterium* inokulierten Nährlösung war, wie in Abbildung 3 zu sehen mit Kolonien überdeckt, die Platte der dritten Probenahme ebenfalls. *B. megaterium* ist gut in der Nährlösung gewachsen, es sind keine anderen Bakterienstämme auf der Platte zu sehen.

In der mit *B. pumilus* inokulierten Nährlösung sind in beiden Proben verschiedene Bakterienstämme gewachsen (Abbildung 4). Es war kein Unterschied zu den Platten der nicht inokulierten Nährlösung erkennbar.

4.2 Mikroskopische Untersuchung der Bakterienkolonien

In den oberflächenbehandelten Proben wurden in den meisten Fällen verschiedene Bakterien gleichzeitig nachgewiesen, deren Kolonien unterschiedliche Formen und Farben aufwiesen. Um eine bessere Identifizierung der verwendeten Bazillusstämmen gewährleisten zu können, wurden unterschiedlich aussehende Kolonien unter dem Mikroskop betrachtet. Der jeweilige Glycerolstock des für die Inokulation verwendeten Bazillusisolats wurde dabei als optischer Vergleich herangezogen.

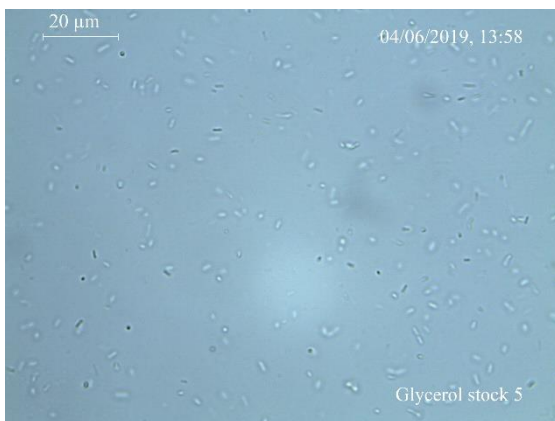


Abbildung 5: *B. pumilus* aus dem Glycerolstock



Abbildung 6: Ein aus der Blattspreite von Suakoko8 isoliertes Bakterium



Abbildung 7: Ein weiteres, aus Suakoko8 isoliertes Bakterium

Die in Abbildung 5 zu sehenden Bakterien stammen aus dem Glycerolstock und sind die, mit denen die Pflanzen inokuliert wurden. Die Bakterien zeigen das für *B. pumilus* typische Aussehen: Sie sind sehr klein und rundlich. In Abbildung 6 sind die Bakterien zu sehen, die aus einer Suakoko8 Probe stammen und zunächst als *B. pumilus* ausgezählt wurden. Die Bakterien auf den Bildern sind groß und länglich. Abbildung 7 zeigt Bakterien, die von einer Kolonie aus

einer weiteren Suakoko8 Probe stammen die ebenfalls zunächst als *B. pumilus* gezählt wurde. Auch diese Bakterien sind groß und länglich.



Abbildung 8: *B. megaterium* aus dem Glycerolstock



Abbildung 9: Aufnahme eines aus einer Suakoko8 Probe isolierten Bakteriums

Abbildung 8 zeigt Bakterien, die aus dem *B. megaterium* Glycerolstock stammen. Die Bakterien sind relativ groß und länglich. In Abbildung 9 sind Bakterien zu sehen, die aus einer Suakoko8 Probe stammen. Ihr Aussehen zeigt die für *B. megaterium* typische Größe und Form auf.

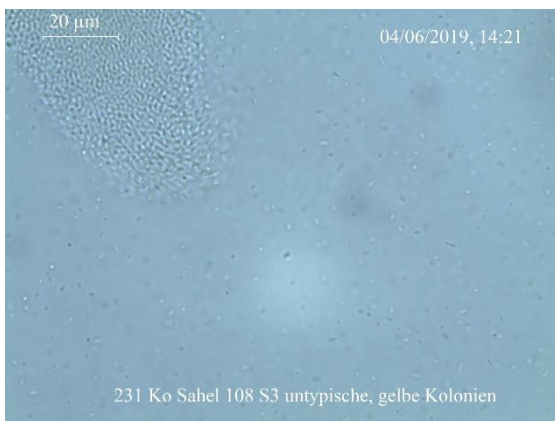


Abbildung 10: Bakterienisolat aus einer nicht inokulierten Sahel108 Kontrollpflanze. Die gebildeten Kolonien zeigten Bazillus untypische Form und Farbe auf

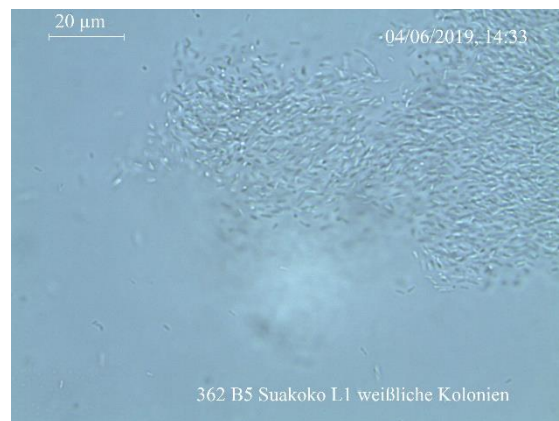


Abbildung 11: Bakterienisolat aus einer mit *B. pumilus* inokulierten Suakoko8-Pflanze. Die gebildeten Kolonien zeigten Bazillus untypische Form und Farbe auf.

In manchen Proben sind untypische Kolonien, die sich äußerlich stark von den inokulierten Bakterien unterschieden haben, gewachsen. In den Abbildungen 10 und 11 sind Bakterien aus zwei solcher Isolate abgebildet. In beiden Fällen sind die Bakterien sehr klein und untypisch für *B. megaterium*.

4.3 Nachweis der Bakterien in den Pflanzen

Bei der Auszählung wurden zunächst die Kolonien beider inokulierten Bakterienstämme gezählt. Auf Grund der mikroskopischen Untersuchung werden die Ergebnisse von *B. pumilus* in der Auswertung nicht betrachtet, es wird im Folgenden lediglich auf die Daten von *B. megaterium* eingegangen.

4.4 Nachweis der Bakterien in den Wurzeln

B. megaterium konnte in 93 % der Proben der Wurzeln nachgewiesen werden. Da die Wurzeloberfläche desinfiziert wurde, ist davon auszugehen, dass die Bakterien sich in den Wurzeln gebildet haben und nicht lediglich an der Wurzeloberfläche gewachsen sind.

4.5 Sortenunterschiede

Bei Betrachtung der Anzahl der KBE in den Wurzeln sind Unterschiede zwischen den Reissorten zu erkennen. In Abbildung 12 wird die logarithmierte Anzahl der KBE pro g FG in Suakoko8 und Sahel108 dargestellt. In Suakoko8 gab es nur geringe Unterschiede zwischen der Anzahl an KBE in den verschiedenen Behandlungen. In Sahel108 dagegen gab es in den einzelnen Behandlungen erkennbare Differenzen zwischen der Anzahl der KBE. Unter einem hohen VPD konnte eine höhere Anzahl an KBE nachgewiesen werden als unter einem niedrigen VPD. Zwischen den beiden Wurzelbehandlungen gab es nur geringe Unterschiede.

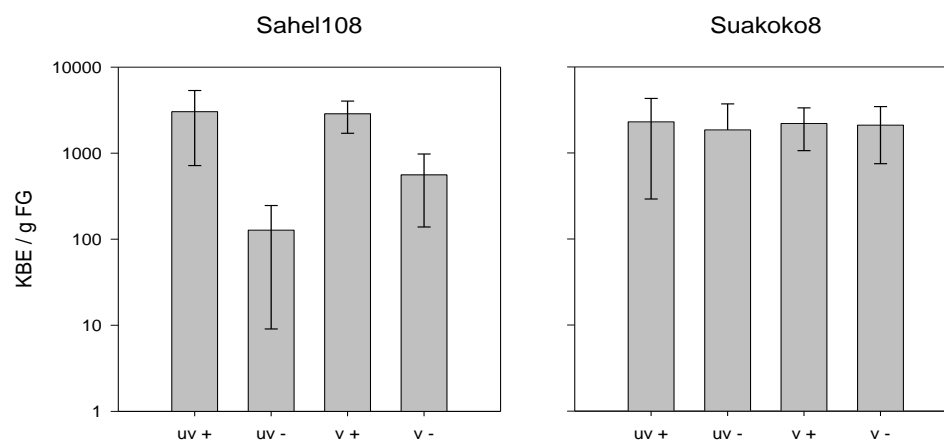


Abbildung 12: Mittelwerte der *B. megaterium* KBE pro g FG in den Wurzeln der Reissorten Sahel 108 und Suakoko8. Auf der x-Achse wird zwischen unverletzten (uv) und verletzten (v), sowie einem hohen VPD (VPD +) und einem niedrigen VPD (VPD -) unterschieden.

4.6 Aufnahme der Bakterien in oberirdischen Pflanzenorgane

Im Verlauf dieses Versuches stellten sich manche Platten als nicht auswertbar heraus und nur in 83 % der Proben der oberirdischen Pflanzenorgane konnte *B. megaterium* nachgewiesen werden. Dies hat zur Folge, dass sich die Mengen der Proben der einzelnen Blattorgane in denen KBE nachgewiesen werden konnten, unterschieden. Bei Betrachtung der alten Blattorgane konnte in L3 in 44 % und in S3 in 37 % der Proben *B. megaterium* nicht gefunden werden. Mehrmals konnten *B. megaterium* in nur einer der beiden Wiederholungen nachgewiesen werden. In Tabelle 2 wird der Prozentsatz an Proben der Blattscheiden und Blattspreiten gezeigt, in denen *B. megaterium* gefunden werden konnte.

Tabelle 2: Anteil der Proben an der Gesamtzahl der einzelnen Behandlungen, in denen *B. megaterium* nachgewiesen werden konnte. uv = unverletzte Wurzeln, v = verletzte Wurzeln; - = niedriges VPD, + = hohes VPD.

			<i>B. megaterium</i>	
			Blattspreite	Blattscheide
Sahel108	VPD -	Unverletzt	50 %	83 %
		Verletzt	100 %	83 %
	VPD +	Unverletzt	88 %	83 %
		Verletzt	88 %	83 %
Suakoko8	VPD -	Unverletzt	88 %	83 %
		Verletzt	88 %	67 %
	VPD +	Unverletzt	88 %	83 %
		Verletzt	88 %	83 %

4.7 Vergleich aller Behandlungen

Um die Anzahl der KBE pro g FG in den beprobten oberirdischen Pflanzenorganen darzustellen, wurden die Auswertungen für die einzelnen Blattscheiden und Blattspreiten logarithmiert (Abbildung 13).

Die Inokulation von Sahel108 mit *B. megaterium* resultierte unter einem hohen VPD in einer signifikant höheren Anzahl an KBE in den Blättern als unter einem niedrigen VPD ($p = 0,00595$). In Sukoko8 konnten ebenfalls unter einem hohen VPD signifikant mehr KBE in den Blättern nachgewiesen werden als unter einem niedrigen VPD ($p = 0,01944$). Die Suakoko8-Pflanzen wiesen signifikant mehr KBE in den Blättern auf als die Sahel108-Pflanzen ($p = 0,00289$). In den verletzten Sahel108-Pflanzen konnten in den Blättern signifikant mehr KBE nachgewiesen als in den Blättern der unverletzten Pflanzen ($p = 0,0346$). In der Mehrzahl

der Fälle konnten in den Pflanzenorganen der verletzten Pflanzen mehr KBE nachgewiesen werden als in denen der unverletzten, dennoch konnten in den einzelnen Blattorganen keine Signifikanzen zwischen verletzten und unverletzten Pflanzen nachgewiesen werden.

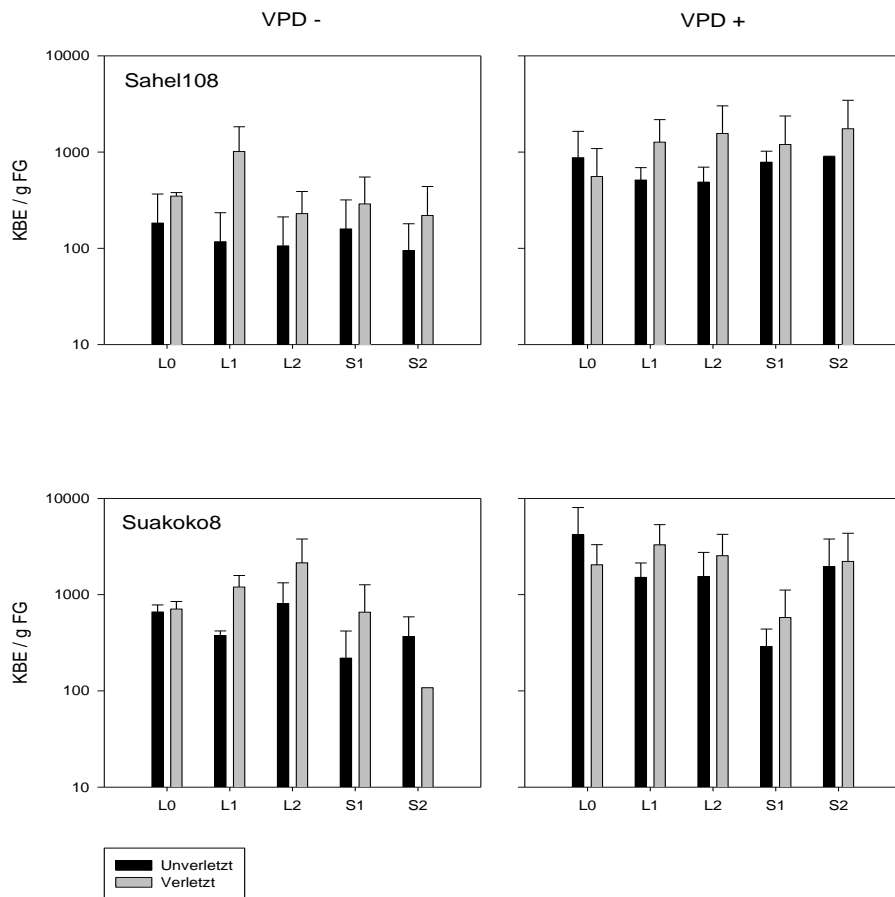


Abbildung 13: Logarithmierte Darstellung der Mittelwerte der *B. megaterium* KBE pro g FG in den Blattspreiten der drei Altersstufen (L0, L1, L2) und in den zugehörigen Blattscheiden (S1, S2) in beiden Reissorten. Verglichen wurde zwischen unverletzten und verletzten Wurzeln. In der linken Spalte befinden sich die Ergebnisse unter einem niedrigen VPD (VPD-) und in der rechten Spalte unter einem hohen VPD (VPD+).

4.8 Bakterien innerhalb der Blätter

B. megaterium wurde in beiden Reissorten unter beiden Luftfeuchtebedingungen sowohl in den Blattspreiten als auch in den Blattscheiden nachgewiesen. In Suakoko8 wurden signifikant mehr KBE in den Blattspreiten als in den Blattscheiden nachgewiesen ($p = 0,0337$). In Sahel108 unterscheidet sich die Anzahl der KBE zwischen Blattscheiden und Blattspreiten nur marginal. In Abbildung 14 ist die logarithmierte Anzahl der KBE pro g FG in den unterschiedlich alten Blattorganen, unterteilt in Blattscheide und Blattspreite, dargestellt. Es ist nicht möglich, zwischen den Altersstufen einen eindeutigen Trend bei der Verteilung der KBE zu erkennen. In

den jungen Blattorganen (L1, L2, S1, S2) der Pflanzen, die unter einem hohen VPD gewachsen sind, wurden signifikant mehr KBE nachgewiesen, als in den jungen Blattorganen der Pflanzen, die unter einem niedrigen VPD gewachsen sind ($p = 0,00435$).

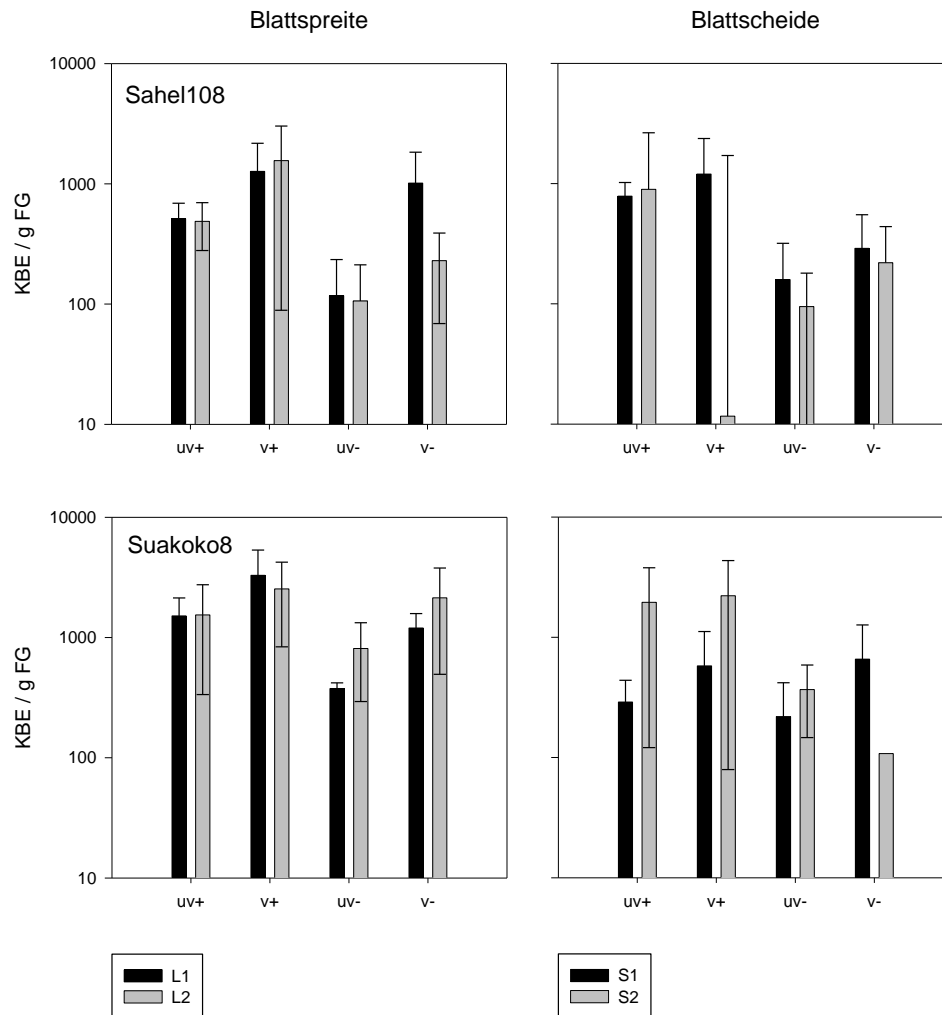


Abbildung 14: Logarithmierte Darstellung der Mittelwerte der KBE pro g FG in den Blattscheiden der Altersstufen 1 & 2 (rechts) und in den Blattspreiten der Altersstufen 1 & 2 (links) unter einem niedrigen (-) und einem hohen (+) VPD bei verletzten (v) und unverletzten (uv) Wurzeln.

4.9 Verteilung der KBE zwischen Blattspreite und Blattscheide

In Abbildung 15 wird die prozentuale Verteilung von *B. megaterium* auf die Blattspreiten und die Blattscheiden dargestellt. In Suakoko8 waren bei allen Behandlungen mehr KBE in den Blattspreiten als in den Blattscheiden. In Sahel108 waren mehr in der Blattscheide, außer bei der Behandlung mit verletzten Wurzeln unter niedrigem VPD, bei welcher mehr KBE in der Blattspreite waren. Die verletzten Pflanzen beider Sorten wiesen immer einen höheren Anteil an KBE in den Blattspreiten auf als die unverletzten.

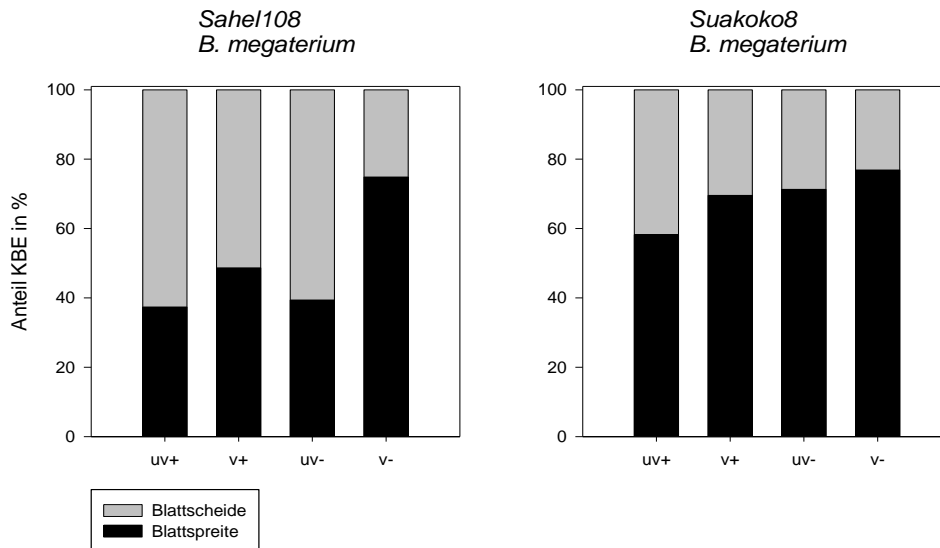


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der KBE in den Blattscheiden und Blattspreiten unter einem niedrigen (-) und einem hohen (+) VPD bei unverletzten (uv) und verletzten (v) Wurzeln.

4.10 Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen und Wurzeln

In Abbildung 16 wird das Verhältnis der Anzahl der KBE in den beprobten oberirdischen Pflanzenorganen (L0, L1, L2, S1, S2), zu denen innerhalb der Wurzeln dargestellt. Bei den Behandlungen, bei denen das Verhältnis unter Eins ist, konnten mehr KBE in den Wurzeln gefunden werden. Wenn das Verhältnis größer als Eins ist, wurden in den oberirdischen Pflanzenorganen mehr KBE nachgewiesen.

In allen Behandlungen von Sahel108 gab es mehr KBE in den Wurzeln als in den oberirdischen Blattorganen. In Suakoko8 gab es bei unverletzten Wurzeln unter einem hohen VPD und bei verletzten Wurzeln unter einem niedrigen VPD mehr KBE in den oberirdischen Blattorganen, ansonsten waren mehr KBE in den Wurzeln.

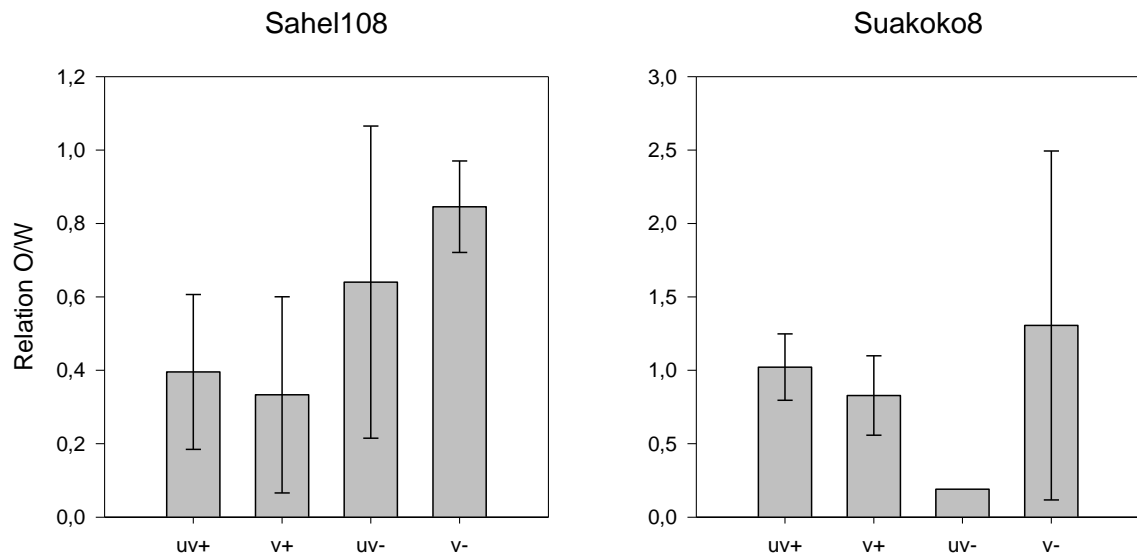


Abbildung 16: Relation der Anzahl an KBE von *B. megaterium* in den oberirdischen Pflanzenorganen (O) und in den Wurzeln (W) von Sahel108 (links) und Suakoko8 (rechts) unter niedrigem (-) und hohem (+) VPD bei verletzten (v) und unverletzten (uv) Wurzeln.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es zu eruieren, ob die Bakterienstämme *Bacillus megaterium* und *Bacillus pumilus* die Reissorten Sahel108 und Suakoko8 besiedeln und wenn ja, wohin sie sich in den Pflanzen verteilen. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss unterschiedliche Dampfdruckdefizite und das Verletzen der Reiswurzeln auf die Aufnahme und Verteilung der beiden Bakterienstämme haben.

B. megaterium konnte in 83 % der beprobten oberirdischen Pflanzenorgane und in 96 % der Wurzelproben nachgewiesen werden. Nicht in allen Pflanzen haben sich in dem Versuchszeitraum drei vollentwickelte Blätter ausgebildet, daher fehlen für L3 und S3 teilweise Daten. Zudem war der Anteil der Proben, in denen die inokulierten Bakterien nachgewiesen werden konnten, bei der Untersuchung der ältesten Blattorganen am geringsten. Bei der Betrachtung von L3 konnte in 44 % und bei S3 in 37 % der Proben *B. megaterium* nicht gefunden werden, mehrmals konnte es nur in einer der beiden Wiederholungen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund können mit den Ergebnissen dieser Proben keine stichhaltigen Aussagen getroffen werden, weshalb diese im Folgenden nicht dargestellt und ausgewertet werden.

Da bei dieser Arbeit nur zwei Wiederholungen durchgeführt wurden, ist eine statistische Auswertung nur bedingt möglich. Die Anzahl der Bakterien in den zwei Wiederholungen der einzelnen Behandlungen war oft weit gestreut, was zu hohen Standardfehlern führte.

5.1 Bakterien in der Nährlösung

In der mit *B. megaterium* inokulierten Nährlösung konnte *B. megaterium* nachgewiesen werden. *B. megaterium* hat sich in der Nährlösung angesiedelt und vermehrt. Da sich die Proben der mit *B. pumilus* inokulierten Nährlösung und die der Kontrolle sehr ähneln, ist es fraglich, ob tatsächlich *B. pumilus* in der Nährlösung vorhanden war. Möglicherweise hat es sich gar nicht erst in der Nährlösung ansiedeln können, oder die Bakterien konnten sich ansiedeln und sind danach gestorben. Der Grund dafür kann eine geringe Konkurrenzkraft des Stammes gegenüber anderen Bazillusstämmen sein, die in die Nährlösung gelangt sind. Dadurch könnte die Ausbreitung und Vermehrung von *B. pumilus* in der Nährlösung stark eingeschränkt bzw. gänzlich unterbunden worden sein. Ebenfalls möglich ist, dass der pH-Wert oder die Temperatur der Nährlösung nicht mit den für das Überleben der Bakterien benötigten Werten übereinstimmten und diese sich deshalb nicht vermehrt haben.

5.2 Mikroskopische Untersuchung der Bakterienkolonien

Bei dem Vergleich der *B. megaterium* Kolonien lassen sich Übereinstimmungen der Bakterien in Abbildung 8 mit denen in Abbildung 9 erkennen. Die Bakterien der Kolonie aus dem Glycerolstock sind, wie auch die aus den Kolonien der Probe, länglich und groß. Dies spricht dafür, dass es sich auch bei den Bakterien aus der Suakoko8 Probe um *B. megaterium* handelt.

Die in Abbildungen 6 und 7 abgebildeten Bakterien unterscheiden sich stark in ihrem Aussehen von den in Abbildung 5 gezeigten Bakterien. Die Bakterien, die ursprünglich inokuliert wurden, sind wesentlich kleiner und runder als die Bakterien deren Kolonien später tatsächlich gezählt wurden. Der Vergleich der mikroskopischen Bilder spricht dafür, dass die auf den Platten gezählten Bakterien nicht zu dem *B. pumilus* Stamm gehören, mit dem zuvor inokuliert wurde. Auch die anderen, auf den entsprechenden Platten gewachsenen Kolonien zeigten kein typisches *B. pumilus* Aussehen. Keine der Kolonien auf den Platten der Nährlösung konnte eindeutig als *B. pumilus* identifiziert werden. Der zur Inokulation verwendete Bazillusstamm konnte nicht in den Pflanzen nachgewiesen werden.

5.3 Einfluss der relativen Luftfeuchte

Das Eindringen der Bakterien in die Pflanze kann möglicherweise mit Hilfe des Transpirationsstromes geschehen. Wäre dies der Fall, müssten in den Pflanzen, die unter einem hohen VPD, also bei einer höheren Transpirationsrate gewachsen sind, mehr KBE in den Wurzeln nachgewiesen werden können. Wie in Abbildung 12 dargestellt, sind in Sahel108 Unterschiede zwischen den VPDs erkennbar. Unter einem hohen VPD konnten mehr KBE in den Wurzeln nachgewiesen werden als unter einem niedrigen VPD. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die relative Luftfeuchte einen Einfluss auf die Besiedelung der Pflanze hat und die Bakterien bei einem hohen VPD einfacher in die Wurzeln eindringen können.

Auch der Transport der Bakterien durch die Pflanzen erfolgt möglicherweise passiv im Zuge des Transpirationsstroms. Unter Berücksichtigung dieser Annahme müssten bei einem hohen VPD mehr Bakterien in die Blätter transportiert werden als bei einem niedrigen, da es bei einem hohen VPD zu einem stärkeren Transpirationsstrom kommt als bei einem niedrigen. Sowohl in Suakoko8 ($p = 0,01944$) als auch in Sahel108 ($p = 0,00289$) konnten signifikant mehr KBE in den jungen Blattorganen (L0-L2, S1, S2) der Pflanzen nachgewiesen werden konnten, die unter einem hohen VPD gewachsen sind, als in denen die unter einem niedrigen VPD gewachsen sind. Diese Beobachtung wird in Abbildung 13 noch einmal verdeutlicht. An dieser lässt sich ablesen, dass bei den beprobten Blattorganen in den jungen Blättern beider Sorten unter einem

niedrigen VPD weniger *B. megaterium* vorhanden war als unter einem hohen VPD. Die Betrachtung der hier erläuterten Ergebnisse lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Luftfeuchte einen Einfluss auf die Verteilung der Bakterien in den Blattorganen hat, da bei einem hohen VPD mehr KBE die beprobten Blattorgane besiedelten als bei einem niedrigen.

Bei Betrachtung der Relation der KBE in der Blattspreite zu den KBE in der Blattscheide in Sahel108, dargestellt in Abbildung 15, ist erkennbar, dass es unter den verschiedenen Luftfeuchten nur bei den verletzten Wurzeln Unterschiede gibt. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der VPD in Sahel108 keinen Einfluss auf die Verteilung von *B. megaterium* zwischen Blattspreiten und Blattscheiden hat. Da in Suakoko8 sowohl unter einem hohen VPD als auch unter einem niedrigen VPD mehr KBE in den Blattspreiten als den Blattscheiden gefunden wurden, kann auch dort kein Einfluss der Luftfeuchte auf die Verteilung nachgewiesen werden. Der VPD scheint sich somit in beiden Reissorten nicht auf die Verteilung der Bakterien zwischen Blattspreite und Blattscheide auszuwirken.

5.4 Einfluss der Wurzelbehandlung

Damit Bakterien in die Wurzeln eindringen können, müssen sie die Wurzelepidermis überwinden. Da diese Barriere bei verletzten Wurzeln nicht mehr überwunden werden muss, kann das möglicherweise das Eindringen der Bakterien in die Wurzeln erleichtern. In Suakoko8 fand sich bei allen Behandlungen eine ähnlich hohe Anzahl an *B. megaterium* in den Wurzeln. In Sahel108 gab es unter einem hohen VPD bei beiden Wurzelbehandlungen eine ähnlich starke Aufnahme von *B. megaterium*, unter einem niedrigen VPD gab es in den verletzten Pflanzen etwas mehr *B. megaterium*. Die Ergebnisse von Suakoko8 sprechen eindeutig gegen den Einfluss vom Zustand der Wurzeln auf das Eindringen von Bakterien in diese, da die Anzahl der KBE sich zwischen den Wurzelbehandlungen nur marginal unterscheiden. Auch in Sahel108 sind die Unterschiede der Anzahl an KBE zwischen den Wurzelbehandlungen gering, hier kann die Vermutung ebenfalls nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse können die These des Einflusses des Zustandes der Wurzeln auf das Eindringen der Bakterien in die Wurzel nicht belegen. Auch in den Versuchen von Hartl konnte bei keiner der Wurzelbehandlungen eine bessere Aufnahme nachgewiesen werden (Hartl, 2017).

Da bei verletzten Wurzeln die Epidermis zerstört wurde, kann dies, durch das Fehlen dieser Barriere, möglicherweise zu einer erhöhten Transpirationsrate führen. Demnach würde das Abschneiden der Wurzeln zu einer stärkeren Verteilung der Bakterien mit Hilfe des Transpirationsstrom führen. Unter Voraussetzung dieser Annahme müssten sich in den verletzten Pflanzen

mehr Bakterien in den Blättern ansammeln, da sie mit dem stärkeren Transpirationsstrom vermehrt dorthin transportiert werden würden.

Bei der Betrachtung der einzelnen beprobten Blattorgane der verletzten und unverletzten Pflanzen in Abbildung 13 ist erkennbar, dass unter beiden VPDs, abgesehen von wenigen Ausnahmen, in den verletzten Pflanzen mehr Bakterien die beprobten Blattorgane besiedeln als in den unverletzten Pflanzen. In Sahel108 waren in den verletzten Pflanzen signifikant mehr KBE in den beprobten Blattorganen als in den unverletzten Pflanzen ($p = 0,0346$). Ergo hat die Wurzelbehandlung einen Einfluss auf die Verteilung der Bakterien in der Pflanze.

Bei der in Abbildung 15 dargestellten Analyse der Pflanzen können Unterschiede zwischen den beiden Wurzelbehandlungen festgestellt werden. Die Wurzelbehandlungen üben einen Einfluss auf die Verteilung der KBE zwischen Blattspreite und Blattscheide aus. Bei beiden Reissorten konnten in den Pflanzen, die unter demselben VPD gewachsen sind, immer in den verletzten Pflanzen mehr KBE in den Blattspreiten nachgewiesen werden als in den unverletzten. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass bei verletzten Wurzeln der Transpirationsstrom stärker ist und deshalb die Bakterien besser in die Blattspreite transportiert werden können.

5.5 Unterschiede zwischen den Sorten

Abbildung 12 stellt das Vorkommen von *B. megaterium* in den Wurzeln in Abhängigkeit von der Wurzelbehandlung dar. Es fällt auf, dass es im Falle von Suakoko8, im Gegensatz zu Sahel108, keinen Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen gibt. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Eintrittsmethoden von *B. megaterium* in Suakoko8 und Sahel108 zurückzuführen. Um Rückschlüsse darüber zu ziehen, ob dies der Grund für den Unterschied zwischen den Sorten ist, müssen Versuche gemacht werden, die das Eindringen von *B. megaterium* in die beiden Reissorten erforschen und vergleichen.

In den Blättern von Suakoko8 konnten signifikant mehr Bakterien als in denen von Sahel108 nachgewiesen werden ($p = 0,01944$). Wenn man von der Annahme ausgeht, dass die Bakterien passiv mit dem Transpirationsstrom durch die Pflanze transportiert werden, könnten die verschieden hohe Transpirationsraten der Sorten die Ursache davon sein.

Die prozentuale Verteilung der Bakterien zwischen Blattspreite und Blattscheide in den beiden Sorten (Abbildung. 15) spricht ebenfalls für unterschiedliche Transpirationsraten in den beiden Reissorten. In Suakoko8 wurde *B. megaterium* bei allen Behandlungen vermehrt in den Blattspreiten nachgewiesen. In Sahel108 war die Verteilung je nach Behandlung unterschiedlich, nur in verletzten Pflanzen, die unter niedrigem VPD gewachsen sind, waren mehr Bakterien in

der Blattspreite. Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass Suakoko8 auf Grund einer höheren Transpirationsrate mit dem stärkeren Transpirationsstrom die Bakterien besser in die Blattspreite transportieren kann. Der Transpirationsstrom von Sahel108 ist vermutlich geringer und transportiert daher weniger Bakterien in die Blattspreiten.

Bei Betrachtung der verletzten Pflanzen (Abbildung 15) befanden sich in Suakoko8 mehr Bakterien in den Blattspreiten. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Forschungsergebnissen überein. Es konnte nachgewiesen werden, dass in verletzten Reispflanzen der Sorten IR 31 785-58-1-2-3-3 und TOX 4004-8-1-2-3 tendenziell mehr Bakterien die Blattspreiten als die Blattscheiden besiedelt haben (Hartl, 2017). In Sahel108 gab es nur marginale Unterschiede bei der Verteilung der Bakterien zwischen Blattspreite und Blattscheide. Ursache für die unterschiedliche Verteilung können möglicherweise die Transpirationsraten der verschiedenen Reissorten sein. Um zu überprüfen, ob die unterschiedlich starken Transpirationsströme der beiden Reissorten der Grund für die Sortenunterschiede sind, oder ob andere Faktoren daran beteiligt sind, müssen die Transpirationsraten der beiden Reissorten gemessen und verglichen werden. Erst dann kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich die Bakterien tatsächlich aufgrund unterschiedlich starker Transpirationsströme in verschiedenen Pflanzenorganen der jeweiligen Reissorte verteilen, oder nicht.

5.6 Verhältnis oberirdischer Pflanzenorgane zu Wurzel

Die in Abbildung 16 dargestellten Verhältnisse der Anzahl an KBE zwischen oberirdischen Blattorganen und Wurzeln lassen Unterschiede in der Verteilung erkennen.

In anderen Arbeiten, in denen die Verteilung von Bakterien in Pflanzen betrachtet wurde, konnten in den Wurzeln größere Anteile der Bakterien als in den anderen Pflanzenorganen gefunden werden. Dies war der Fall bei der Inokulation von Weizen, Hafer, Mais und anderen Kulturpflanzenarten mit *Pseudomonas aurofaciens* (Lamb et al., 1996) und bei der Inokulation von IR 31 785-58-1-2-3-3 und TOX 4004-8-1-2-3 mit *B. megaterium* und *B. pumilus* (Hartl, 2017). Diese Verteilung konnte in dieser Arbeit für *B. megaterium* ebenfalls beobachtet werden. Bei den Sahel108-Pflanzen war das Verhältnis von KBE in den oberirdischen Pflanzenorganen zu Wurzeln immer unter Eins. Auch in Suakoko8 konnten auch bei der Kombination von unverletzten Wurzeln mit hohem VPD und verletzten Wurzeln mit niedrigem VPD mehr Bakterien in den Wurzeln gefunden werden.

5.7 Mögliche Fehlerquellen und Verbesserungsvorschläge

Im Laufe der Arbeit hat sich gezeigt, dass der gewählte Versuchsaufbau einige mögliche Fehlerquellen aufweist. Bei der Auswertung der nicht inokulierten Kontrollpflanzen fiel auf, dass auch ohne Inokulation Endophyten auf den verwendeten TSA-Platten unter den gewährleisteten Inkubationsbedingungen nachweisbar sind. Eine absolut sichere Unterscheidung der verwendeten Bazillusstämme von sonstigen Bakterien ist durch die alleinige Betrachtung der Koloniebeschaffenheit nicht möglich. Aus diesem Grund sollte man das Vorkommen unerwünschter Endophyten nach allen Möglichkeiten reduzieren. Eine Maßnahme, die deshalb ergriffen werden sollte, ist es steriles Wasser zum Gießen der Pflanzen zu verwenden.

Die Ernte der Pflanzen sollte erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, damit möglichst viele Pflanzen zum Erntezeitpunkt mindestens 3 vollentwickelte Blätter ausgebildet haben. In Vergleichsversuchen wurden die Pflanzen erst nach 37 Tagen, also 7 Tage später als in dieser Arbeit geerntet (Hartl, 2017).

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist aufgefallen, dass es durch die geringe Zahl der Wiederholungen zu hohen Standardfehlern kam und kaum signifikante Ergebnisse nachgewiesen werden konnten. Um dies bei einer erneuten Durchführung dieses Versuches zu verhindern, sollten mindestens drei Wiederholungen durchgeführt werden.

6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme und Verteilung von *B. megaterium* und *B. pumilus* in zwei verschiedenen Reissorten analysiert. In der Nährlösung konnte *B. pumilus* nicht nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich der mikroskopischen Bilder der inokulierten Bakterienstämme und den ausgezählten Stämmen der Probe hat sich herausgestellt, dass es sich nicht um denselben Bakterienstamm handelt. Es ist nicht klar, ob *B. pumilus* sich überhaupt in der Nährlösung und darauffolgend in den Reispflanzen ansiedeln konnte. Die Ergebnisse zur Aufnahme und Verteilung von *B. pumilus* sind nicht verwertbar.

B. megaterium konnte in der Nährlösung, den Wurzeln und in allen oberirdischen Pflanzenorganen gefunden werden. Es haben sich Unterschiede bei der Verteilung von *B. megaterium* in den beiden Reissorten ergeben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Besiedelung der Wurzeln abhängig von der Reissorte ist. In den beprobten Blattorganen von Suakoko8 konnten mehr Bakterien nachgewiesen werden als in denen von Sahel108. Dies kann entweder an unterschiedlichen Transpirationsraten oder anderen Einflüssen der Pflanzen auf die Bakterien liegen.

Es konnte eine Beeinflussung des Eintritts von *B. megaterium* in die Wurzeln durch die Luftfeuchtigkeit nachgewiesen werden. In den Wurzeln der Sahel108-Pflanzen, die unter einem hohen VPD gewachsen sind, lies sich mehr *B. megaterium* nachweisen, als in denen der Pflanzen, die unter einem niedrigen VPD gewachsen sind. Da sowohl in Suakoko8 ($p = 0,01944$) als auch in Sahel108 ($p = 0,00289$) signifikant mehr KBE in den Blattorganen der Pflanzen nachgewiesen werden konnten, die unter einem hohen VPD gewachsen sind, als in denen die unter einem niedrigen VPD wuchsen, wurde ein Einfluss des VPDs auf die Verteilung von *B. megaterium* in der Pflanze nachgewiesen.

Die Wurzelbehandlung hatte keinen Einfluss auf das Eindringen von *B. megaterium* in die Wurzeln. Es konnte allerdings bei den Wurzelbehandlungen ein Einfluss auf die Verteilung von *B. megaterium* innerhalb der Pflanze festgestellt werden, da die verletzten Sahel108-Pflanzen signifikant mehr KBE in den Blättern aufwiesen als die unverletzten Sahel108-Pflanzen ($p = 0,0346$).

In dem Themengebiet der endophytischen Bakterien besteht weiterhin noch ein großer Forschungsbedarf. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass *B. megaterium* die Reispflanzen besiedelt und sowohl die Wurzelbehandlung als auch die Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf die Verteilung von *B. megaterium* hat, ist noch nicht geklärt in welchem Pflanzengewebe sich die Bakterien aufhalten und auf welchem Weg sie sich in der Pflanze verteilen.

7 Literaturverzeichnis

- Abifarin, A.O. 1988. Grain yield loss due to iron toxicity. West African Rice Development Association (WARDA) Technical Newsletter 8, 1-2
- Afzal, M., Khan, Q.M. & Sessitsch, A. 2014. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere* 117: 232-242
- Audebert, A., Sahrawat, K.L. 2000. Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice, *Journal of Plant Nutrition*, 23:11-12, 1877-1885
- Asch, F. 2006. Pflanzliche Reaktionen auf abiotischen Stress unter variablen Umweltbedingungen. Habilitationsschrift. Landwirtschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. Pp 75.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J.Gen.Microbiol.* 139, 379-385.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1995. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2120-2131.
- Beattie, G.A., and Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 145-172.
- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A. 2001. Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Biocontrol Science and Technology*, 11:5, 557-574.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H. & Sessitsch, A. 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds. Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of Colonization. *Microbial Ecology*, 62 (1), 188–197
- Dimkpa, C., Weinand, T. & Asch, F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment*, 32 (12), pp. 1682–1694.
- Dobermann, A., Fairhurst, T. 2000. Rice. Nutrient disorders & nutrient management, 1. Auflage. Singapore: Potash & Phosphate Institute, East & Southeast Asia Programs; IRRI
- Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Cabadilla, C.F., Ortega, E., and Rodes, R. 1994. A nitrogenfixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147i
- Fageria N.K. 2007. Yield Physiology of Rice, *Journal of Plant Nutrition*, 30:6, 843-979.

Fairhurst, T.H., Dobermann, A., 2002. Rice in the Global Food Supply. Better Crops International, 16

FAO. 2018. World Food and agriculture – Statistical Pocketbook 2018. Rome. 254 pp. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAOSTAT (2018): Food and agriculture data. Verfügbar unter: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [09.07.2019].

Fisher, P.J., O. Petrini, and H.M.L. Scott. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zey mays* L.). *New Phytol.* 122:299-305.

Gamliel, A. & Katan, J. 1992. Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinated seeds in solarized soil. *Phytopathology* 80, 328-332

Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H.N. 1973. "The Genus *Bacillus*," Agriculture Handbook No. 427, Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture, Washington D. C.

Haas, D., Keel, C., 2003. Regulations of antibiotic production in root-colonising *Pseudomonas spp.*: and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41, 117-153.

Hallmann J., A. Quadt-Hallmann, W.F. Manhaffee, and J.W. Kleopfer. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.

Hartl, S. 2017. Aufnahme und Verteilung von endophytischen Bakterien in Reis. Bachelorarbeit. Fakultät Agrarwissenschaften, Universität Hohenheim, Hohenheim-Stuttgart.

Hebeda R.E., Styrlund C.R., Teague W.M. 1988. Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. *Starch* 40:33–36

Hinton, D.M., and Bacon, C.W. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129; 117-125.

Huang J.S. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants, *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:141-157.

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., van Montagu, M. & Kellenberger, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, 176 (7), pp. 1913–1923

IRRI, International Rice Research Institute. Verfügbar unter: <https://www.irri.org/> [09.07.2019]

- Kobayashi D.Y., Palumbo J.D. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, pp 199-236
- Kuwagata, T., Ishikawa-Sakurai, J., Hayashi, H., Nagasuga, K., Fukushi, K., Ahamed, A., Takasugi, K., Katsuhara, M. & Murai-Hatano, M. 2012. Influence of low air humidity and low root temperature on water uptake, growth and aquaporin expression in rice plants. *Plant & cell physiology*, 53 (8), pp. 1418–1431.
- Lamb, T. G., Tonkyn, D. W. & Kluepfel, D. A. 1996: Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 42 (11), 1112–1120.
- Lugtenbert, B., Van der Bu, A., Blemberg, G. Woeng, T.C.A., Dekkers, L., Kravchenko, L., Mulders, I., Phoelich, C., Simons, M., Spaik, H., Tikhonovich, I., De Weger, L. & Wuffelman, C. 1996. Molecular basis of rhizosphere colonisation by *Pseudomonas* bacteria, in *Biology of Plant-Microbe Interactions* (Stacey, G., Mullin, B. & Gresshoff, P.M., Eds) Proceedings of the 8th International Symposium on Molecular Plant Microbe Interactions, pp. 433-440, Knoxville, Tennessee.
- MacLean, J. L., Dawe, D. C., Hardy, B. & Hettel, G. P. 2013. Rice almanac. Source book for one of the most economic activities on Earth, 4. Auflage. Los Baños, Philippines: IRRI
- Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W., Van Vuurde, J.W.L., Van der Wolf, J.M., and Van der Brink, M. 1997. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. Improving plant productivity in rhizosphere bacteria. Edited by M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 180.
- Mandimba, G., Heulin, T., Bally, R., Guckert, A. & Balandreau, J. 1986. Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant and Soil* 90, 129-139.
- Mano, H., F. Tanaka, A. Watanabe, H. Kaga, S. Okunishi, and H. Morisaki. 2006. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ.* 21:86-100.
- Mano, H., F. Tanaka, C. Nakamura, H. Kaga, and H. Morisaki. 2008. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of the rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ.* 22:175-185.

- Mano, H., Morisaki, H., 2008. Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes Environ.* 23:109-117.
- Martin, L., Prieto, M.A., Cortes, E., Garcia, J.L. 1995. Cloning and sequencing of the pac gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiol Lett* 125:287–292
- Mattos, K. A., Pádua, V. L. M., Romeiro, A., Hallack, L. F., Neves, B. C., Ulisses, T. M. U., Barros, C. F., Todeschini, A. R., Previato, J. O. & Mendonça-Previato, L. 2008: Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 80 (3), pp. 477–493.
- McInroy, J.A., and Kloepper, J.W. 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Can. J. Microbiol.* 41: 895-901.
- Metz, R.J., Allen, L.N., Cao, T.M., Zeman, N.W. 1988. Nucleotide sequence of an amylase gene from *Bacillus megaterium*. *Nucleic Acids Res* 16:5203
- Misaghi, I.J., and Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80: 808-811
- Mundt, J.O., and Hinkle, N.F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.
- Musson, G., McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria in cotton. *Biocontrol. Sci. Technol.* 5: 407-416
- Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X.H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I. and Okada, H. 1992 Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J Bacteriol* 174:5013–5020
- OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en
- Okunishi, S., Sako, K., Mano, H., Imamura, A. and Morisaki, H. 2005. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes Environ.* 20:168-177.
- Patriquin, D.G., and Döbereiner, J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24:735-742

- Patriquin, D.G., Döbereiner, J. and Jain, D.K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-915.
- Perotti, R. 1926. On the limits of biological enquiry in science. *Proc. Int. Soc. Soil Sci.* 2: 146-161
- Quadt-Hallmann, A., Kloepper, J. W. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology*, 42 (11), 1144–1154.
- Quadt-Hallmann, A., J. Hallmann, and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* 43:254-259.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 537-547
- Reinhold, B. & Hurek, T. 1989. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. In F. A. Skinner, R. M. Boddey & I. Fendrik (Hrsg.), *Nitrogen fixation with non-legumes. The fourth international symposium on 'nitrogen fixation with non-legumes'*, Rio de Janeiro, 23-28 August 1987 (S. 209–218). Dordrecht: Springer Netherlands
- Roos, I.M.M., Hattingh, M.J., 1983. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet cherry leaves. *Phytopathology Z* 108, 18-25
- Sahrawat, K.L., Mulbah, C.K., Diatta, S., De Laune, R.D., Patrick, W.H.Jr., Singh, B.N., & Jones, M.P. 1996. The role of tolerant genotypes and nutrients in the management of iron toxicity in lowland rice. *Journal of Agricultural Sciences Cambridge*, 128, 146-149.
- Sahrawat, K.L. 2004. Iron toxicity in wetland rice and its role of other nutrients. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1471–1504.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., Glick, B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92-99.
- Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T.N. (Eds.) 2006. What are Endophytes. *Soil Biology 9: Microbial Root Endophytes*
- Scott, R.I., Chard, J.M., Hocart, M.J., Lennard, J.H., Graham, D.C., 1996. Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Res.* 39, 333-344.

Seck, P.A., Diagne, A., Mohanty, S., Wopereis. M.C.s., 2012. Crops that feed the world 7: Rice. In Food Security 4 (1)

Seiler, H. 2010. Foto-Bibliothek für lebensmittelasoziierte aerobe Sporenbildner. Verfügbar unter: <http://www.micbio.wzw.tum.de/cms/docs/Stammsammlung/Foto%20Bibliothek%20Bacillus.pdf> [09.07.2019]

Sturz, A.V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. Plant Soil, 175: 257-263

Suga, K., Shiba, Y., Sorai, T., Shioya, S., Ishimura, F. 1990. Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*. Ann N Y Acad Sci 613:808–815

Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.- D. & Jahn, D. 2007. *Bacillus megaterium* - from simple soil bacterium to industrial protein production host. Applied microbiology and biotechnology, 76 (5), pp. 957–967.

Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Singh, L.&V. 2010. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. International Journal of Agricultural Research 5 (11): 954-983

You, C.B., Lin, M., Fang, X.J., Song, W., 1995. Attachment of *Alcaligenes* to the rice roots. Soil Biol. Biochem. 27, 463-466.

Yoshida, S. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice, 3. Auflage. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute

Yoshida, S. 1981. Fundamentals of rice crop science, 1. Auflage. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute

Zeigler, R. S. & Barclay, A. .2008. The relevance of rice. Rice, 1 (1), 3–10.

Erklärung*

Hiermit erkläre ich,

Name, Vorname

Matrikelnummer

dass ich bei der vorliegenden

- | | | | |
|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Bachelor-Arbeit | <input type="checkbox"/> | Master-Thesis/Master-Arbeit |
| <input type="checkbox"/> | Seminararbeit | <input type="checkbox"/> | Diplomarbeit |

die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten habe. Ich habe diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Betreuende/r
Dozent/in

Thema der Arbeit

Semester

Ich erkläre weiterhin, dass das unverschlüsselte digitale Textdokument der Arbeit übermittelt wurde, das in Inhalt und Wortlaut ausnahmslos der gedruckten Ausfertigung entspricht. Ich bin damit einverstanden, dass diese elektronische Form anhand einer Analyse-Software auf Plagiate überprüft wird.

Ort, Datum, Unterschrift

* Diese Erklärung ist der eigenständig erstellten Arbeit als Anhang beizufügen. Arbeiten ohne diese Erklärung werden nicht angenommen.