



UNIVERSITÄT
HOHENHEIM

Institut für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut)

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

Prüfer: Prof. Dr. Folkard Asch

**Einfluss endophytischer Bazillusstämme auf die Morphologie und
Oxidationskraft von Nassreiswurzeln**

Bachelorarbeit

vorgelegt von

Gideon Frederik Handschuh
aus Herrenberg

Stuttgart-Hohenheim

17. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Eisentoxizität – Eine Folge der Überstauung.....	2
1.2 Endophytische Bakterien.....	4
1.2.1 <i>Bacillus megaterium</i>	5
1.2.2 <i>Bacillus pumilus</i>	6
1.3 Das Wurzelsystem von Reis.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Pflanzenanzucht.....	8
2.2 Klimakammer.....	10
2.3 Kultivierung der Bakterien und Inokulation.....	11
2.4 Eisenstress.....	12
2.5 pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Redoxpotential.....	13
2.6 Scoring.....	13
2.7 Messung der Oxidationskraft.....	14
2.8 Untersuchung der Morphologie der Wurzel.....	15
2.9 Bild und Datenauswertung.....	16
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Einfluss der Bakterienbehandlung auf den Score.....	21
3.2 Oxidationsfreudigkeit im Zeitverlauf.....	22
3.2.1 Sortenvergleich.....	22
3.2.2 Vergleich der Bakterienbehandlungen innerhalb der Sorten.....	23
3.2.3 Verhältnis der oxidierenden Wurzelfläche zur Gesamtwurzelfläche.....	26
3.3 Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Morphologie der Wurzel.....	28
3.3.1 Änderungen der Wurzellänge durch die Bakterienbehandlung mit und ohne Eisenstress.....	28
3.3.2 Änderung des Feinwurzelverhältnisses.....	29
3.3.3 Änderung des Wurzeldurchmessers.....	30
4 Diskussion.....	31
4.1 Score.....	31
4.2 Oxidationsfreudigkeit.....	32
4.3 Änderung der Morphologie der Wurzel.....	34
5 Fazit.....	37
Literaturverzeichnis.....	38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Hydrokultursystems.....	10
Abbildung 2: Bildliche Darstellung des Aufbaus.....	15
Abbildung 3: Einfluss der Bakterienbehandlung auf den mittleren Score.....	21
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Oxidationsfreudigkeit beider Kontrollen ohne Bakterieninokulation.....	22
Abbildung 5: Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei Suakoko8.....	23
Abbildung 6: Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei <i>IR31785</i>	25
Abbildung 7: Vergleich des Verhältnisses der oxidierten Fläche mit der Blauintensität bei der Kontrolle von <i>IR31785</i>	26
Abbildung 8: Wurzellängen der einzelnen Behandlungen.....	28
Abbildung 9: Verhältnis der Wurzelklasse 0-0,2mm zu der Klasse 0,2-1,2mm.....	29
Abbildung 10: Durchschnittlicher Wurzeldurchmesser.....	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Yoshida-Nährlösung 100%.....	9
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien zur Kultivierung der Bakterien.....	11
Tabelle 3: Anzahl kolonienbildender Einheiten (KBE) pro mL der Behandlungen.....	12
Tabelle 4: Bildtabelle zur Bestimmung der Wurzelfläche.....	17
Tabelle 5: Bildtabelle zur Bestimmung der Blausättigung und Fläche.....	19

1 Einleitung

Reis (*Oryza sativa* L.) ist neben Weizen, Kartoffeln und Mais eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel weltweit. Seit Jahrzehnten steigt die weltweite Produktionsmenge an und liegt inzwischen bei 782 Millionen Tonnen pro Jahr. Hauptproduzenten sind hierbei vor allem asiatische Staaten, die für etwa 90% der Produktionsmenge verantwortlich sind, wobei die größten Produzenten China und Indien sind (FAOSTAT, 2018).

Als semi-aquatische Pflanze, ist es möglich, Reis unter verschiedenen Anbaubedingungen zu kultivieren. Mit mehr als 80% der bewirtschafteten Fläche sind dabei der Bewässerungsanbau und der über Regen gespeiste Nassreisfeldanbau die bedeutendsten Anbauarten, die für mehr als 75% der weltweiten Produktionsmenge verantwortlich sind (Dobermann & Fairhurst, 2000). Anders als bei dem Anbau von Getreidearten in den mittleren Breiten, mit nur einer Ernte pro Jahr, sind in solchen Anbausystemen die Ernten von zwei bis drei Kurzsaisonkulturen, als Monokultur möglich. Bei passenden Bedingungen sind sogar innerhalb von zwei Jahren sieben Ernten möglich (Dobermann & Fairhurst, 2000). Es ist jedoch zu beachten, dass mit etwa 15 bis 20 Millionen Hektar auch ein signifikanter Anteil der Fläche in einem Wechsel mit anderen Kulturarten, wie Weizen angebaut wird (GRiSP, 2013). Von eher geringerer, jedoch weiterhin für die Nahrungsmittelsicherung entscheidenden Bedeutung, ist der Trockenreisfeldanbau und der Anbau in überflutungsgefährdeten Gebieten.

Die Vorteile des Anbaus von Reis auf überfluteten Feldern liegt darin, dass hiermit eine Ertragserhöhung von bis zu 53% im Vergleich zu einem Anbau auf angemessen bewässerten, jedoch nicht überfluteten Feldern möglich ist (Senewiratne & Mikkelsen, 1961). Weitere Vorteile sind die verbesserte Verfügbarkeit von Nährelementen, vor allem Stickstoff, Phosphor, Eisen und Mangan, eine erhöhte Stickstofffixierung, geringerer Unkrautdruck und wünschenswerte mikroklimatische Regulationen. Die im Vergleich hierzu ungefluteten Kulturen besitzen Vorzüge im Hinblick auf das Pflanzenwachstum im Jugendstadium, diese werden jedoch im weiteren Entwicklungsverlauf sowohl im vegetativen, als auch generativen Wachstum negiert, wodurch auch der Ertrag geringer ist, als in gefluteten Kulturen (Luh, 1991).

1.1 Eisentoxizität – Eine Folge der Überstauung

Eisen ist ein essenzielles Nährelement. Aufgrund seiner geringen Konzentration im Pflanzengewebe wird Eisen den Mikronährelementen zugeordnet. Eisen spielt eine wichtige Rolle in einem weiten Bereich physiologischer Vorgänge, wie der Photosynthese, der Zellatmung, der Stickstofffixierung, oder aber auch als Reduktions- oder Oxidationsmittel. Ein stärkerer Mangel hat somit erhebliche Einflüsse auf die Ertragsfähigkeit.

Ein starkes Überangebot an Eisen hat ebenfalls schädliche Folgen. Hinzu kommt der Umstand, dass Reispflanzen die Tendenz aufweisen erhöhte Mengen physiologisch wirksamen Fe^{2+} aufzunehmen (Becker & Asch, 2005). Wurde das Eisen in die Pflanzen aufgenommen, können die Ionen schädliche Prozesse in Gang setzen. Hierbei ist vor allem die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl: reactive oxygen species, ROS) mittels der Haber-Weiss- und der Fenton-Reaktion zu nennen. Über diese Reaktionen können somit freie Radikale, wie Superoxid ($\text{O}_2^\cdot$), Hydroxyl-Radikale ($\text{HO}^\cdot$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen. All diese Radikale sind in der Lage, unkontrolliert Zellbestandteile irreparabel zu schädigen (Thongbai & Goodman, 2000).

Ein Überangebot an Eisen ist im Nassreisanbau, geografisch betrachtet vor allem in West-Afrika anzutreffen (Audebert & Sahrawat, 2000). Die Gründe liegen hierbei vor allem in der biochemischen Natur. Wird ein Boden bis zur Wassersättigung überstaut, kann der gelöste Sauerstoff und gelöstes Nitrat bereits innerhalb von Stunden durch die sich im Boden befindlichen Bakterien respiratorisch vollständig verbraucht sein (Prade, 1987). Noch bevor jedoch der Sauerstoff und das Nitrat vollständig verbraucht sind, kann auch die Reduktion von Mn(IV)-Oxiden und -Hydroxiden einsetzen, jedoch ist deren Vorrat im Boden meist gering und somit versiegt die Manganreduktion innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen (Prade, 1987). Es folgt die mikrobielle Reduktion des schwerlöslichen Fe(III) in leicht lösliches Fe(II). Hierdurch können nun, je nach Bodenvorrat, große Mengen des physiologisch wirksamen Eisens freigesetzt werden. Mit weiter andauernder Überstauung setzt schließlich die Sulfatreduktion und zuletzt die Wasserstoff- und Methanbildung ein. Es ist zu beachten, dass im Verlauf das Redoxpotential der Bodens stark absinkt und sogar negativ werden kann. Weiterhin geht

gerade mit der Reduktion des Eisens eine erheblichen Protonenkompensation einher, wodurch der pH-Wert der Bodenlösung ansteigt (Prade, 1987).

Als Anpassung an hohe Eisenkonzentrationen im Boden, hat Reis verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt. Diese lassen sich in drei Haupttypen unterscheiden (Becker & Asch, 2005):

(I) Oxidation von Eisen an der Wurzeloberfläche und Ausschluss an der Wurzelmembran

Reis besitzt als Anpassung an eine Überstauung, zur Versorgung des Wurzelsystems mit Sauerstoff, ein Aerenchym. Überschüssiger Sauerstoff, der nicht in der Respiration verbraucht wurde, kann in die Rhizosphäre diffundieren und dort das Redoxpotential so stark erhöhen, dass vorhandenes gelöstes Eisen oxidiert wird und einen unlöslichen rostbraunen Belag auf der Wurzel bildet. Vor allem junge sekundäre Wurzeln und Wurzelspitzen sind dazu in der Lage. Konnte Eisen die Oxidationsbarriere überwinden, ist es der Wurzel möglich das Eisen an der Wurzelendodermis aktiv zurückzuhalten.

(II) Einlagerung von Eisen

Eisen, welches ins Xylem aufgenommen wurde, kann als metabolisch inaktives Eisen in der Wurzel, dem Stängel oder auch den Blättern eingelagert werden.

(III) Toleranz von Eisen im Symplasten

Ist Eisen im Symplasten aufgenommen worden, katalysiert es die Bildung von ROS. Um diese unschädlich zu machen, gibt es verschiedene enzymatische Mechanismen, wie die Superoxiddismutase, Peroxidasen oder nicht-enzymatische Mechanismen, mit Antioxidantien und Radikalfänger, wie Glutathion, Ascorbat oder Flavonoide.

1.2 Endophytische Bakterien

Endophytische Bakterien sind Bakterien, die innerhalb von oberflächendesinfizierten Pflanzengewebe auftreten oder aus innerem Pflanzengewebe extrahiert werden können, in welchem sie keinen sichtbaren Schaden an der Pflanze verursachen (Hallmann et al., 1997). Die Vorteile für eine Besiedelung einer Pflanze ist hierbei das Vorhandensein eines äußerst attraktiven Nährstoffreservoirs, welches die Pflanze eigentlich für sich selbst produziert. Aus diesem Grund stellen die Pflanzen auch eine große Bandbreite an verschiedenen antibakteriellen Substanzen, wie Terpenen, Flavonoide oder Isoflavon her. Andererseits ist es bei bestimmten Pflanzenarten äußerst schwierig ein ausreichendes Wachstum, bei dem Fehlen von Bakterien im Substrat zu erreichen (Hardoim et al., 2008). Solche Bakterien, welche das Pflanzenwachstum stimulieren, werden als „plant growth promoting bacteria“ (PGPB) bezeichnet und können dies auf drei Wegen: (1) Synthese von benötigten Stoffen für die Pflanze, (2) erleichtern der Nährstoffaufnahme aus dem Boden und (3) das Abschwächen oder Verhindern von Krankheiten und Pathogenen an der Pflanze. Dies kann sowohl direkt, als auch indirekt geschehen (Hayat et al., 2010). Eine direkte Wirkung ist gegeben, wenn die PGPB die Nährstoffaufnahme erleichtern. Dies ist zum Beispiel bei Rhizobien gegeben, welche direkt Luftstickstoff fixieren und der Pflanze zur Verfügung stellen. Weiter möglich ist eine erleichterte Phosphat- oder Eisenaufnahme. Andere direkte Einflüsse sind die Produktion von Wuchsstoffen und Hormonen, wie Auxinen, Ethylen oder Cytokininen. Hier werden entweder Vorstufen oder direkt die jeweiligen Stoffe gebildet und somit das Pflanzenwachstum beeinflusst. Indirekte Wirkungen sind die der Pathogenabwehr von Pilzen, Nematoden oder schädlichen Bakterien über die Produktion von antibakteriellen Substanzen, zellwandschädigende Enzyme, Senkung der Ethylenproduktion in der Pflanze oder die Senkung des für die Pathogene verfügbaren Eisens (Santoyo et al., 2016). Ein weiterer Mechanismus ist die Milderung von abiotischen Stressen und Umwelteinflüssen. Bakterien, welche in der Lage sind, 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure deaminase (ACC deaminase) herzustellen, können dadurch das vorhandene ACC als Stickstoffquelle nutzen. Da jedoch ACC eine Vorstufe in der Produktion von Ethylen ist, sinkt dadurch die Ethylenkonzentration in der Pflanze. Dies ist vor allem in trockengestressten Pflanzen von Bedeutung, da dort Ethylen als Stresshormon ausgeschüttet wird und somit das Pflanzen- und besonders das

Wurzelwachstum hemmt. Sinkt nun durch das Bakterium verursacht die Ethylenkonzentration, kann dadurch das Wurzelwachstum ansteigen, welches der Trockenstresstoleranz zuträglich ist (Dimkpa et al., 2009). Weiterhin können passende Bakterien über die Produktion von ACC/ACC Deaminase, oder aber über die Regulation von Natriumtransportern, den Salzstress von Pflanzen regulieren (Yang et al., 2009). Speziell bei der Eisentoxizität von Nassreis wird vermutet, dass die bakterielle Produktion von Superoxiddismutasen einen Einfluss auf die Minderung der Symptome hat (Dimkpa et al., 2009).

1.2.1 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium ist ein Gram-positives, hauptsächlich aerobes, sporenbildendes Bakterium (Vary et al., 2007). Taxonomisch wird es unter den *Bacilli* der Gruppe von *B. subtilis* zugeordnet, auch wenn nur ein kleiner genomischer Unterschied zwischen *B. megaterium* und *B. subtilis* besteht. Mit 1,5 bis 4 µm gehört es zu den größeren Bakterien. Das Vorkommen ist sehr divers und kann in Seewasser, Sedimenten, Fischen und der normalen Flora vorkommen, ist jedoch hauptsächlich im Boden anzutreffen (Biedendieck, 2006). Anwendung findet das Bakterium bereits im industriellen Maßstab. So wird seine Eigenschaft der Proteinexsudation von verschiedenen alpha- und beta-Amylasen beim industriellen Brotbacken verwendet. Es ist auch bekannt, dass das Bakterium in der Lage ist Vitamin B₁₂ sowohl aerob, als auch anaerob zu produzieren (Biedendieck, 2006).

Weiterhin ist *B. megaterium* auch im pflanzenbaulichen Kontext als PGPB bekannt. Eine Inokulation bei *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) und *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) sorgt im Labor für eine erhöhte Biomasseproduktion und ein stark verändertes Wurzelsystem. Bei den veränderten Wurzelsystemen wurde vor allem die Hauptwurzel inhibiert, während verstärkt Seitenwurzeln und längere Wurzelhaare gebildet wurden. Diese Änderungen sind wahrscheinlich unabhängig von Auxin- oder Ethylensignalen hervorgerufen worden (López-Bucio et al., 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Cytokinin bei der Wachstumsstimulation eine wichtige Rolle spielt (Ortíz-Castro et al., 2008). Bei Reis ist *B. megaterium* als starker Antagonist gegen die Wurzelgallennematode *Meloidogyne graminicola* bekannt (Padgham & Sikora, 2007).

1.2.2 *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus ist ein Gram-positives, aerobes, sporenbildendes Bakterium. Es kommt hauptsächlich im Boden vor, ist aber auch in marinen Ökosystemen anzutreffen (Thomas, 2004).

Im landwirtschaftlichen Kontext wurde eine Wirkung als Biopestizid, zur Bekämpfung von pilzlichen Pflanzenkrankheiten erkannt (Lehman et al., 2001). Es ist *B. pumilus* auch möglich einen Einfluss auf die Trockenstresstoleranz von *Glycyrrhiza uralensis* (Chinesisches Süßholz) auszuüben. Dabei schwächt *B. pumilus* eventuell strukturelle Schäden, die durch Wassermangel hervorgerufen werden, an den Chloroplasten und Mitochondrien ab. In den Chloroplasten stieg dabei weiterhin in trockengestressten Pflanzen der Chlorophyll b und Chlorophyll a+b Gehalt deutlich an. Auch wurde durch eine Inokulation die Wassernutzungseffizienz erhöht (Zhang et al., 2019). Bei verschiedenen *Brassica* Arten sorgt *B. pumilus* für eine Erhöhung des Wurzelvolumen und der Wurzeloberfläche. Durch eine größere Wurzeloberfläche ist auch eine bessere Nährstoffaufnahmeeffizienz möglich. Die Inokulation hatte jedoch keinen Einfluss auf die Pflanzenbiomasseproduktion (Aung et al., 2015).

Bei Reis ist *B. pumilus* in der Lage die Schäden, welche durch Salzstress und hohe Bor-Gehalte verursacht werden abzuschwächen. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf einer Kontrolle der durch Salz induzierten Nährstoffstörung, oder der Produktion von Antioxidantien. Auch möglich ist eine erhöhte Nährstoffaufnahme, indem das Wurzelwachstum angeregt wird und, dass eine Anreicherung der Salzionen in den Blättern vermindert wird (Khan et al., 2016). Die Anregung des Wurzelwachstums geschieht wahrscheinlich über einen verbesserten Kohlenhydratmetabolismus und der Biosynthese von Phenylpropanoiden (Liu et al., 2020). Wie bei *Glycyrrhiza uralensis* schon beobachtet, erhöhte sich in den Blättern der Chlorophyll a und Chlorophyll b Gehalt. Der Stickstoff, Phosphor, Calcium und Magnesium-Gehalt, sowie die Aktivität der Katalase, Peroxidase und Superoxiddismutase nahmen zu (Liu et al., 2020).

Bei der Veränderung der Wurzelmorphologie, sind allerdings noch einige Besonderheiten zu beachten. So besteht ein Unterschied, ob Sporen oder vegetative Zellen als Inokulat verwendet werden. Mit einer Sporeninokulation wird das Wurzelsystem stärker vergrößert. Bei einer Inokulation mit vegetativen Zellen konnte kein signifikanter Effekt auf die Frischmasse von Schoss und Wurzel, sowie der Anzahl an Kron- und Seitenwurzeln festgestellt werden. Bei beiden Behandlungen ist aber ein

verstärktes Schoss und Wurzelwachstum zu beobachten. Bei der Inokulation mit Sporen wird vermutet, dass eine Unterdrückung von Cytokininsignalen für die Wachstumsstimulation von Kronwurzeln verantwortlich ist (Ngo et al., 2019).

1.3 Das Wurzelsystem von Reis

Reis ist ein Flachwurzler und entwickelt sein Wurzelsystem postembryonal. Die sich nach der Keimung bildende Primärwurzel, auch Seminalwurzel genannt, ist kurzlebig (Xu & Hong, 2013). Durch die Speicherreserven aus dem Samen ist es der Seminalwurzel möglich innerhalb von zwei bis drei Tagen nach der Keimung bereits um drei bis fünf cm zu wachsen. Die Rate der Verlängerung sinkt nachdem die Seminalwurzel eine Länge von zwölf cm erreicht hat. Weiterhin ist sie bis zum Erreichen des Dreiblatt-Stadiums üblicherweise auch die längste Wurzel (Gowda et al., 2011). Ebenfalls zwei bis drei Tage nach der Keimung, bilden sich Kronwurzeln aus. Diese sind auch in der Lage anschließend Seitenwurzeln auszubilden. Die Seitenwurzeln sind schließlich für einen Großteil des Wurzelsystems verantwortlich. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen. Seitenwurzeln der L-Klasse sind lang, grob und sind dazu fähig sich weiter aufzuspalten. Die Wurzeln der M-Klasse sind ebenfalls lang und grob, spalten sich jedoch nicht weiter auf. Die Wurzeln der S-Klasse sind kurze, feine und sich nicht verzweigende Wurzeln, die in großer Anzahl auftreten (Gowda et al., 2011). Bei der Wurzelentwicklung spielen eine Vielzahl an Phytohormonen eine Rolle. Auxine, meist Indol-3-essigsäure, regen, wie auch Abscisinsäure, die Bildung von Seitenwurzeln an. Cytokinine hingegen unterdrücken jedoch meist die Bildung von Seitenwurzeln und wirken so antagonistisch zu Auxinen. Ethylen steht wahrscheinlich mit Auxinen in Verbindung, kann jedoch in moderaten Konzentrationen das Wurzelwachstum inhibieren. Bei Reis ist Ethylen für die Zellproliferation von Adventivwurzeln notwendig. Gibberelline sind für das Wachstum der Primärwurzel notwendig und sind zusammen mit Ethylen für die Initiierung und das Wachstum von Adventivwurzel in Nassreis verantwortlich (Osmont et al., 2007).

Ziel der Arbeit ist die Gewinnung eines Einblickes, welchen Einfluss endophytische Bakterien, auf die Oxidationskraft und Morphologie von Nassreiswurzeln haben.

2 Material und Methoden

Die vorliegenden Versuche wurden am Institut für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut) der Universität Hohenheim in den dazugehörigen Laboren und Gewächshaus durchgeführt.

Verwendet wurden zwei Sorten Nassreis, *Suakoko8* und *IR31785-58-1-2-3-3* (im folgenden *IR31785*) welche sich in vorangegangenen Versuchen als tolerant (*Suakoko8*) oder sensitiv (*IR31785*) im Hinblick auf Eisentoxizität erwiesen haben. Das Saatgut stammt aus einer Nachzucht an der Universität Hohenheim. Beide Sorten wurden sowohl mit, als auch ohne Eisenstress behandelt. Zusätzlich wurden bei beiden Sorten, beide Behandlungen mit den Bakterien *Bacillus megaterium* (im folgenden *B. megaterium*), *Bacillus pumilus* (im folgenden *B.pumilus*) und ohne Bakterien als Kontrolle inokuliert. Jede Behandlung bestand aus drei Wiederholungen.

2.1 Pflanzenanzucht

Das Saatgut wurde in zwei Plastikboxen mit demineralisiertem Wasser bedeckt und im Gewächshaus bei einer Temperatur von etwa 27°C für zwei Tage im Dunkeln und vorgekeimt. Die Keimlinge wurden anschließend in eine Pflanzschale mit einer Pinzette in gewaschenem Sand in etwa 2cm Tiefe gesetzt. Darauffolgend wurden sie mit Leitungswasser überstaut. Sieben Tage nach Keimung wurde das Leitungswasser gegen eine 25%ige Yoshida-Nährlösung (Yoshida S. et al., 1976) ausgetauscht. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,6 eingestellt.

Tabelle 1: Yoshida-Nährlösung 100%

Element	Chemikalie	Stammlösung $[\frac{g}{L}]$	Stammlösung pro Liter $[\frac{mL}{L}]$
N	NH_4NO_3	114,25	1
P	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	50,38	1
K	K_2SO_4	89,25	1
Ca	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	146,73	1
Mg	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	405,00	1
Fe	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	9,6250	1
Mn	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,8750	
Zn	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0438	
Cu	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0398	
Mo	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,0920	
B	H_3BO_3	1,1675	

Elf Tage nach Keimung wurden die Pflanzen in Hydrokultur umgesetzt. Dazu wurden die Pflanzen aus dem Sand ausgewaschen und mittels eines Ceaprenstopfens fixiert. Der Wurzelhals ragte dabei etwa einen Millimeter unter dem Stopfen heraus. Eingesetzt wurden die Pflanzen in Plastikboxen mit den Innenmaßen 27*17*11,5 cm (Länge*Breite*Höhe) in welchen zusammengeschweißte Plastikröhren (vier Reihen mit je zwölf Röhren, etwa 9 cm lang, 3,9 cm Durchmesser) als Halterung dienen.



Abbildung 1: Aufbau des Hydrokultursystems

Eine Box enthielt jeweils um eine Reihe versetzt beide Sorten. Jede Box stellt hierbei eine Behandlung dar. Die Pflanzen waren vom Entwicklungsstadium her bei der Ausbildung des dritten Blattes. Aufgefüllt wurden die Boxen mit 50%iger Yoshida-Nährlösung (pH mit NaOH auf 5,5 eingestellt).

2.2 Klimakammer

Alle Boxen wurden in eine Klimakammer (CLF PlantClimatics GmbH, Percival E-75L1, DE-86637 Wertingen) gestellt. Eingestellt wurde der Tag von 8 Uhr morgens bis 20 Uhr abends, mit voller Lichtstärke. Die Tagestemperatur betrug dabei 26°C, bei einer relativen Luftfeuchte von 50%. Während des Nachtzyklus von 20 Uhr abends bis 8 Uhr morgens, wurde eine Temperatur von 20°C und eine relative Luftfeuchte von 85% eingestellt.

2.3 Kultivierung der Bakterien und Inokulation

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien zur Kultivierung der Bakterien

Medium	Herstellung
TSB	TSB (Tryptic Soy Broth, mikrobiologisch getestet, Fluka Analytical) in der Konzentration von $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurde in demineralisiertem Wasser für 20 min bei 121°C autoklaviert.
TSA	TSB in der Konzentration $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurde mit Agar (dänisch, pulv., Carl Roth GmbH & Co., Deutschland) in der Konzentration $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in demineralisiertem Wasser vereint und für 20 min bei 121°C autoklaviert.
Ringer-Lösung	Eine Ringer solution $\frac{1}{4}$ strength tablets (FLUKA Analytics, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), gelöst in 500ml demineralisiertem Wasser. Anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Die Agarplatten wurden aus TSA hergestellt. Die Arbeiten zur Kultivierung der Bakterien wurden unter einer Sterilbank (NordicSafe® Low Noise, Class II Biological Safety Cabinets, ESCO Micro Pte Ltd., Singapur) durchgeführt. Mithilfe von sterilen Einwegimpfösen wurde etwas Bakterienisolat aus den Glycerolstocks gekratzt und auf TSA-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten für 24h bei 28°C inkubiert. Zur weiteren Vermehrung wurden nach der Inkubation je eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Holzspatel von der Agarplatte abgenommen und in 300ml TSB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte für 24h in einen Schüttler (SM-30, Edmund Bühler GmbH, Deutschland) bei 125rpm (Umdrehungen pro Minute) und 28°C . Für einen ersten Anhaltswert der Entwicklung wurde die Optische Dichte bei 550nm und 600nm (OD_{550} und OD_{600}) mit einem Photospektrometer (DU-640 Spectrophotometer, Beckman, USA) gemessen. Als Blank diente dabei nicht-inokuliertes TSB-Medium. Zielwert der Extinktion war 0,9 bis 1,1. Frühere Versuche haben gezeigt, dass bei einer OD_{600} und einem Wert von 1,1 die Bakterienkonzentration bei etwa $7\cdot 10^7\cdot\text{ml}^{-1}$ liegt (Weinand, T., persönl. Kommunikation, 30.07.20). War der Zielwert erreicht, wurden die Bakterien bei 3000g und 23°C für 20 min zentrifugiert

(Beckman Coulter, Allegra® X-15R Centrifuge, Deutschland) . Nachdem der Überstand abgegossen war, wurde das Pellet in 120ml Ringer-Lösung resuspendiert und die Optische Dichte erneut überprüft. Es wurde Ringer-Lösung als Blank verwendet.

14 Tage nach Keimung wurden die Pflanzen inokuliert. Dazu wurden die Boxen entleert und zuerst je nach Behandlung mit 50ml Bakteriensuspension oder im Falle der Kontrolle mit 50ml Ringerlösung befüllt. Anschließend wurden vier Liter 100%ige Yoshida-Nährlösung hinzugefügt. Zur Messung der Bakterienkonzentration wurden 200 μL aus den Boxen direkt abpipettiert.

Messung der Bakterienkonzentration

Die abpipettierte Suspension stellt die Situation in den einzelnen Behandlungen direkt dar und ist nicht die Konzentration der Inokulate. Die Suspension wurde weiter um den Faktor 1:100 herunterverdünnt. Von dieser Verdünnung wurden anschließend 100 μL auf den beschriebenen Agarplatten ausplattiert und bei 28°C für 24h inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden ausgezählt.

Tabelle 3: Anzahl kolonienbildender Einheiten (KBE) pro mL der Behandlungen

Behandlung	Bakterium	Eisenstress	KBE $\cdot \text{mL}^{-1}$
1	Keines	Ja	$5,68 \cdot 10^6$
2	<i>B. megaterium</i>	Ja	$48,52 \cdot 10^6$
6	<i>B. pumilus</i>	Ja	$27,20 \cdot 10^6$
5	Keines	Nein	$2,08 \cdot 10^6$
4	<i>B. megaterium</i>	Nein	$37,20 \cdot 10^6$
3	<i>B. pumilus</i>	Nein	$78,16 \cdot 10^6$

2.4 Eisenstress

Am Tag 21 nach der Keimung wurden die Pflanzen unter Eisenstress gesetzt. Dazu wurden alle Boxen entleert. Die Boxen mit den Behandlungen ohne Eisenstress wurden erneut mit vier Litern Yoshida-Nährlösung (pH=5,55) aufgefüllt. Bei den Behandlungen

mit Eisenstress wurde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in der Konzentration von $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, welche 1000ppm entspricht, verwendet. Damit das Eisen nicht als $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ausfällt, wurden je ein Liter Eisenlösung (der pH-Wert liegt bei etwa 4) zur Vermengung in je drei Liter 100%ige Yoshida-Nährlösung, deren pH-Wert auf etwa 7 eingestellt wurde, gegeben. Anschließend wurde der pH-Wert aller Boxen mit NaOH auf 5,5 eingestellt. Um eine Eisenausfällung durch einer Reaktion mit Sauerstoff stark zu verlangsamen, wurden ab diesem Zeitpunkt alle Boxen, alle zwei Stunden für 15 min mit Stickstoff begast.

2.5 pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Redoxpotential

In der folgenden Zeit wurde der pH-Wert nicht nachkorrigiert. Es wurden bis zur weiteren Untersuchung der pH-Wert (SD300 pH incl. pH/Temp. Kunststoff-Elektrode Typ 230, AquaLytic, DE-44287 Dortmund), der Sauerstoffgehalt (Multi 3510 IDS Set 4 incl. FDO 925, Xylem Analytics, DE-82362 Weilheim) und das Redoxpotential (SD300 pH incl. Redox-Elektrode Kunststoff-Typ 240, AquaLytic, DE-44287 Dortmund) gemessen.

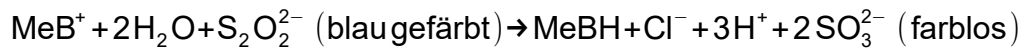
Der Sauerstoffgehalt in allen Behandlungen schwankte um $1\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, das Redoxpotential betrug 150-300mV und der pH-Wert sank auf 3,5-4 ab. Es war keine rostbraune Eisenausfällung erkennbar. Der tabellarische Wert des Redoxpotentials der Eisenreduktion liegt bei 120mV (pH 7) (Trolldenier, 1995).

2.6 Scoring

Am 27. Tag nach der Keimung wurden alle Pflanzen, die unter Eisenstress standen gescort. Verwendet wurde dabei eine nach Asch et al. (2005) an Eisentoxizität angepasste Erweiterung der *Standard Evaluation System for scoring for leaf blast lesions* des *International Network for the Genetic Evaluation of Rice* (INGER; IRRI, 1996). Es wurden die folgenden Prozentzahl/Boniturwert Kombinationen genutzt: 0-9=1; 10-19=2; 20-29=3; 30-39=4; 40-49=5; 50-59=6; 60-69=7; 70-79=8; 80-89=9; 90-100=10 (abgestorbenes Blatt).

2.7 Messung der Oxidationskraft

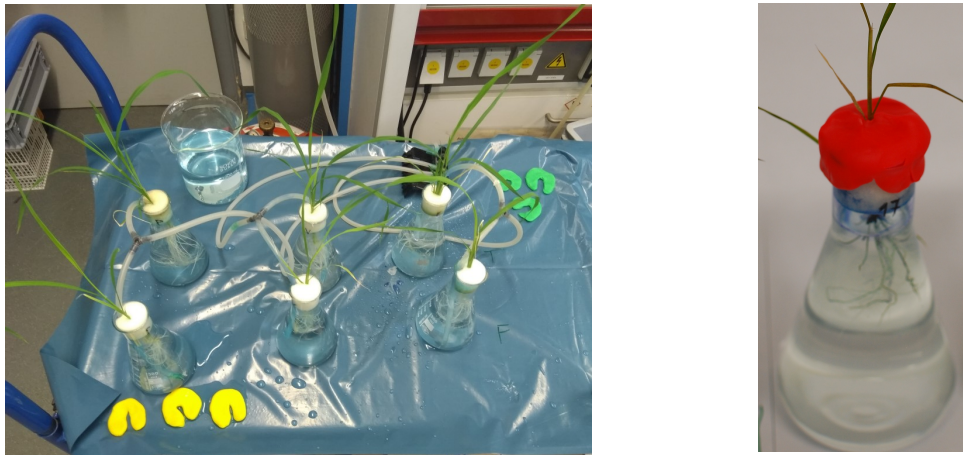
In Anschluss an das Scoring wurden zur Vorbereitung die Ceaprenstopfen aller Pflanzen ausgetauscht. Um die Oxidationskraft sichtbar zu machen wurde Methylenblau als Indikator verwendet. Wird dieses in Lösung gebracht und anschließend mit Natriumdithionid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) reduziert, wird die Lösung farblos. Dies geschieht mittels folgender Reaktion (Barton & Ollis, 1979):



Die Lösung bleibt solange farblos, bis ein Oxidationsmittel (in diesem Falle, der durch die Wurzeln abgegebene Luftsauerstoff) die Reaktion umkehrt. Um dem verwendeten Wasser den vorhandenen gelösten Sauerstoff zu entziehen, um somit eine vorzeitige Reaktion mit Methylenblau zu verhindern, wurde das Wasser vor Verwendung für mindestens 20 min mit Stickstoff begast (Butler, 1994).

Verwendet wurde ein 0,1%iger Agar. In diesem wurden $0,012 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Methylenblau mit $0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Natriumdithionit reduziert. Diese etwa 20-fache molare Überkonzentration des Reduktionsmittels verhindert eine vorschnelle Blaufärbung durch Luftsauerstoff, da nicht unter Schutzgas gearbeitet wurde. Die Ceaprenstopfen wurden getauscht und zur Randabdichtung mit Vaseline bestrichen. Die Pflanzen wurden in mit der reduzierten Lösung gefüllte Erlenmeyerkolben eingeführt. Die Lösung wurde unterdessen weiter mit Stickstoff begast. Die Kolben wurden als weitere Gassperre an den Kolbenöffnungen mit Knete (Play-Doh Knete, Hasbro Inc, USA) verschlossen.

Abbildung 2: Bildliche Darstellung des Aufbaus



Die Kolben wurden anschließend vor einem weißen Hintergrund aufgestellt und alle 30 min für insgesamt sieben Stunden mit einer Kamera (D40, Nikon Corp, Japan, mit dem Objektiv AF-S DX NIKKOR 35 mm 1:1,8G, Nikon Corp, Japan) aus 30 cm Abstand fotografiert.

2.8 Untersuchung der Morphologie der Wurzel

Am folgenden Tag wurden alle Pflanzenwurzeln mittels eines Scanners (Expression 11000XL, Seiko Epson K.K., Japan) und einer Analysesoftware (WinRHIZO Basic 2013a, Regent Instruments Inc., Kanada) analysiert. Dazu wurden alle Wurzeln der Pflanzen abgeschnitten und weit aufgefächert auf den Scanner gelegt. Um eine Klassierung in Kron- und Feinwurzeln zu erreichen wurden die Größenklassen von 0 bis 0,2mm für die Feinwurzeln festgelegt. Die Klasse 0,2mm bis 1,2mm stellt die Kronwurzeln dar. Die dritte Klasse von 1,2 bis 10mm verhindert, dass größere Objekte, wie Wurzelansatzreste, nicht der Klasse der Kronwurzeln zugeordnet wurden.

2.9 Bild und Datenauswertung

Für die Auswertung der Bilder wurde das Programm *Fiji is just ImageJ* (open source, Version 1.53c) verwendet. Ziel war, über die Intensität der Blaufärbung Rückschlüsse über die Oxidationskraft der einzelnen Pflanzen zu ziehen. Zunächst wurde die gesamte

messbare Wurzelfläche auf einem möglichst kontraststarkem Bild bestimmt. Hierfür wird ein Bild ausgewählt und anschließend in den HSV-Farbraum überführt. Der HSV-Farbraum stellt hierbei eine Alternative zum normalerweise für Pixel verwendeten RGB-Farbraum dar. Farben werden im RGB-Farbraum als eine Mischung der Grundfarben Rot, Grün und Blau dargestellt. Im HSV-Farbraum hingegen wird eine Farbe über ein Tripel des Hue=Farbton, Saturation=Sättigung und Value=Hellwert/Helligkeit beschrieben. Der Farbton beschreibt, welche Farbe von allen möglichen Farbmischungen ausgewählt wird. Die Sättigung beschreibt, wie rein der Farbton im Vergleich zu Neutralgrau erscheint. Die Helligkeit beschreibt die Beleuchtungsintensität des Farbtons.

In diesem Farbraum wird nun lediglich der Kanal für den Hellwert betrachtet, da sich in diesem Kanal die Wurzeln stark hervorheben. Zur Bestimmung der Wurzelfläche wird die Region der Wurzel manuell auf dem Bild ausgewählt, die Umgebung der Auswahl wird gelöscht. Anschließend wird ein Schwellenwert für einen minimalen und maximalen Hellwert angelegt. Bei Standardeinstellungen ist noch eine Invertierung des Bildes nötig, um nur den Wurzelbereich zu messen. Die Messung der Fläche geschieht über die Analyse, welche jedoch an den Schwellenwert gebunden werden muss. Das Ergebnis ist die Anzahl der Pixel, welche im Schwellenwertbereich liegen. Nachfolgend wird der Ablauf bildlich an einem Beispiel dargestellt.

Tabelle 4: Bildtabelle zur Bestimmung der Wurzelfläche



Bild 1



Bild 2

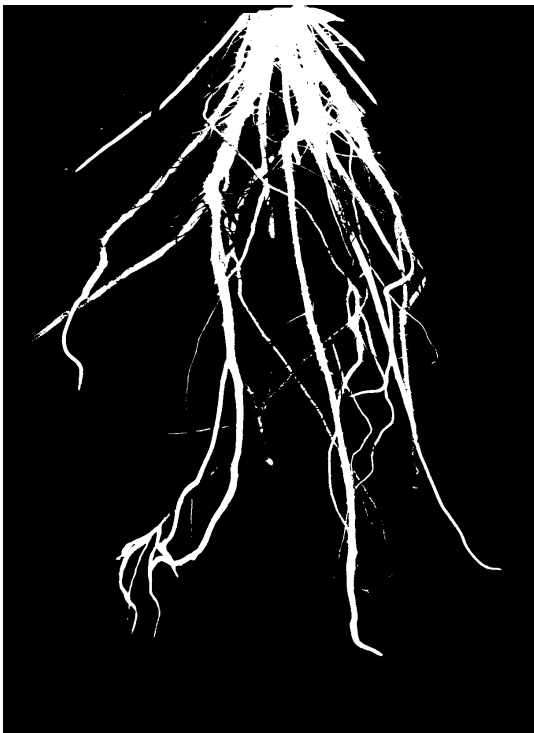


Bild 3

Bild 1: Originalbild

Bild 2: Der Wurzelbereich wurde ausgewählt, das Bild wurde in den HSV-Farbraum überführt und der Hellwert wurde ausgewählt.

Bild 3: Der Schwellenwert wurde angelegt.

Für die Messung der Blaufärbung wird ähnlich verfahren. Zunächst wird ebenfalls die Wurzel manuell ausgewählt und anschließend die Umgebung gelöscht. Um lediglich blaugefärbte Pixel auszuwählen wird ein Farbschwellenwert angelegt. Verwendet werden folgende Einstellungen (Es ist zu beachten, dass die Zahlenwerte in 8bit, also $2^8=256$ mögliche Zuständen angegeben werden. Um Umrechnungsfehler zu vermeiden, wurden diese Werte nicht umgerechnet): Farbton von 85 bis 255, da dies auch alle möglichen Mischfarben mit Blau beinhaltet. Sättigung von 15 bis 255, da niedrigere Werte ein zu hohes Signalrauschen verursachen. Hellwert von 0 bis 255, damit sämtliche dunklen und hellen Blautöne erfasst werden. Damit nun auch neben der blaugefärbten Fläche die Intensität der Blaufärbung festgestellt werden kann, wird das Bild in den HSV-Farbraum überführt. Dort wird der Kanal der Sättigung ausgewählt. Nun kann das Bild analysiert werden. Es werden zwei Werte ausgegeben. Zum einen der Wert der mittleren Blausättigung, zum anderen die gesamte Anzahl an Pixeln, die im Bereich des Farbschwellenwertes liegen. Alternativ kann auch ein Histogramm aller einzelnen summierten Pixelwerte innerhalb des Schwellenwertes ausgegeben werden. Nachfolgend wird der Ablauf bildlich an einem Beispiel dargestellt.

Tabelle 5: Bildtabelle zur Bestimmung der Blausättigung und Fläche



Bild 1

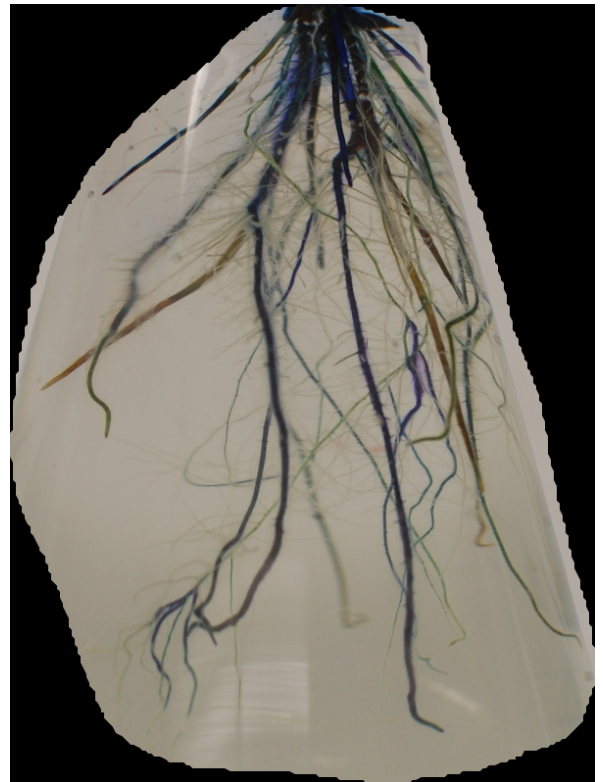


Bild 2

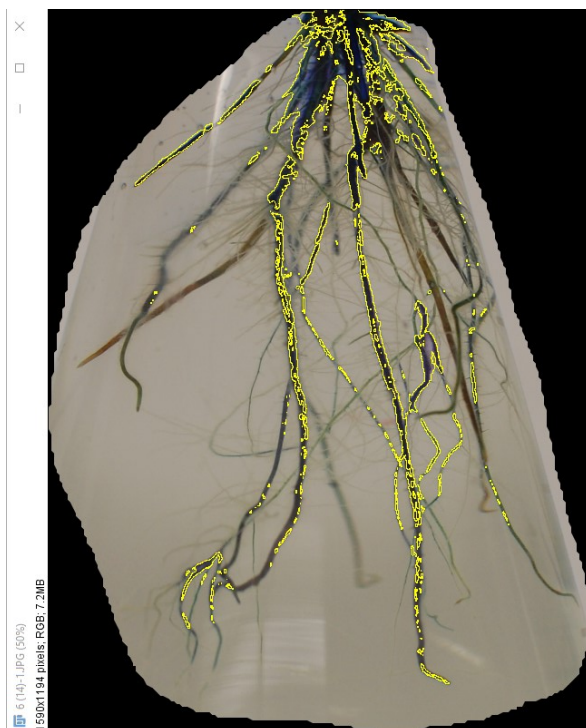


Bild 3



Bild 4

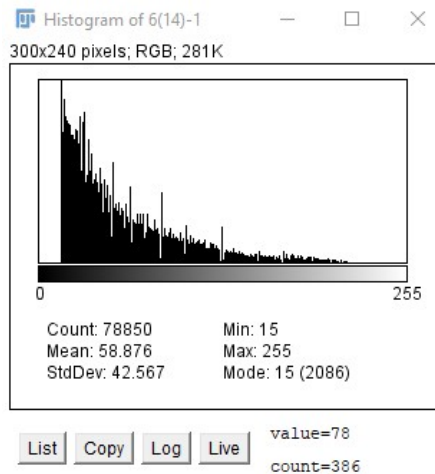


Bild 5

Bild 1: Originalbild

Bild 2: Der Wurzelbereich wurde ausgewählt, die Umgebung der Auswahl wurde entfernt

Bild 3: Der Farbschwellenwert wurde angewendet, alle Pixel, die in dem gelben Bereichen liegen sind ausgewählt und aktiv.

Bild 4: Das Bild wird in den HSV-Farbraum überführt, es wird der Kanal der Sättigung ausgewählt.

Bild 5: Analysehistogramm aller Pixel. Count stellt die Fläche dar, Mean die mittlere Blausättigung.

Damit nun ein wiederholbarer und vergleichbarer Wert für die Oxidationskraft aus den Bildern ausgelesen werden konnte, war die Einführung eines neuen Wertes nötig. Dieser wird im weiteren als *Oxidationsfreudigkeit* bezeichnet. Dieser einheitenlose Wert beschreibt dabei das Verhältnis der Anzahl der blauen Pixel zu der Anzahl an Pixeln der gesamten Wurzel, multipliziert mit der mittleren Blausättigung. Es gilt zu beachten, dass die Oxidationskraft einer Wurzel beschreibt, wie weit die Wurzel in der Lage ist, Sauerstoff in die Rhizosphäre hinweg abzugeben. Die Oxidationsfreudigkeit umschreibt an dieser Stelle hingegen die Oxidationskraft, als Anteil der oxidierenden Wurzelfläche, multipliziert mit der Intensität der Oxidation.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der statistischen Analyse von SigmaPlot (Version 14, Systat Software Inc.) durchgeführt. Verwendet wurde ein zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen ($\alpha=0,05$). Die in den Tabellen angegebenen Fehlerbalken sind die Standardfehler der Mittelwerte.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Bakterienbehandlung auf den Score

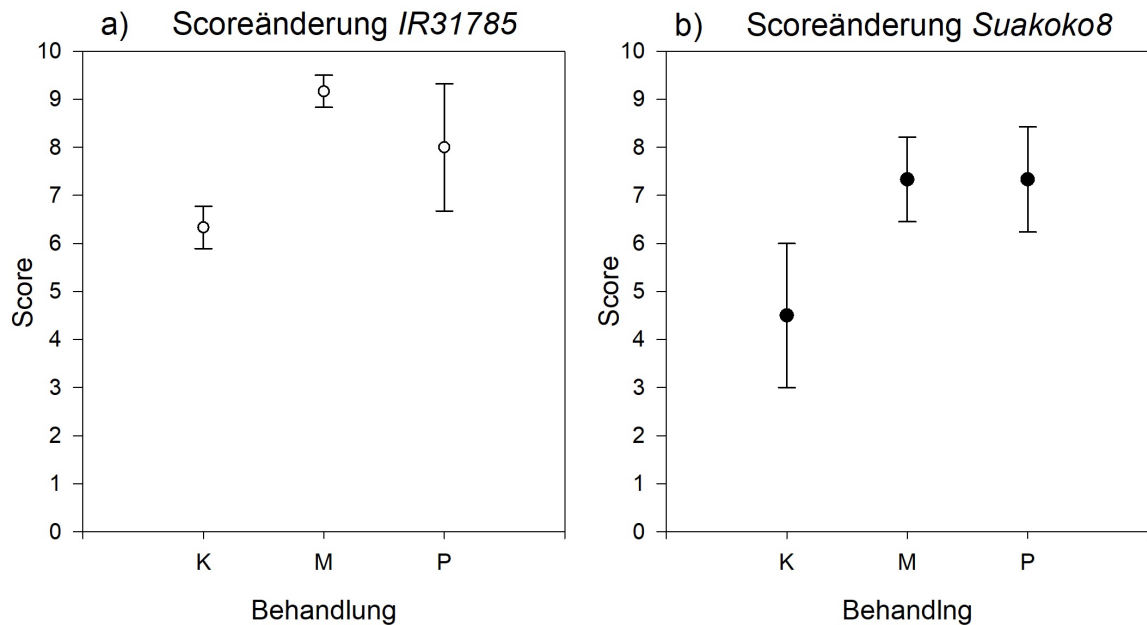


Abbildung 3: Einfluss der Bakterienbehandlung auf den mittleren Score

Der Buchstabe steht für die Bakterienbehandlung. P steht somit für eine Behandlung mit *B. pumilus*, M für eine Behandlung mit *B. megaterium* und K steht für keine Bakterienbehandlung.

Der Score von IR31785 ist tendenziell höher als der von Suakoko8.

Eine Inokulation von IR31785 mit *B. megaterium* verschlechtert den Score signifikant ($p=0,007$). Alle weiteren Inokulationen zeigen eine Tendenz zur Verschlechterung. Diese ist jedoch statistisch nicht signifikant, da die Messungen zu sehr streuen.

3.2 Oxidationsfreudigkeit im Zeitverlauf

3.2.1 Sortenvergleich

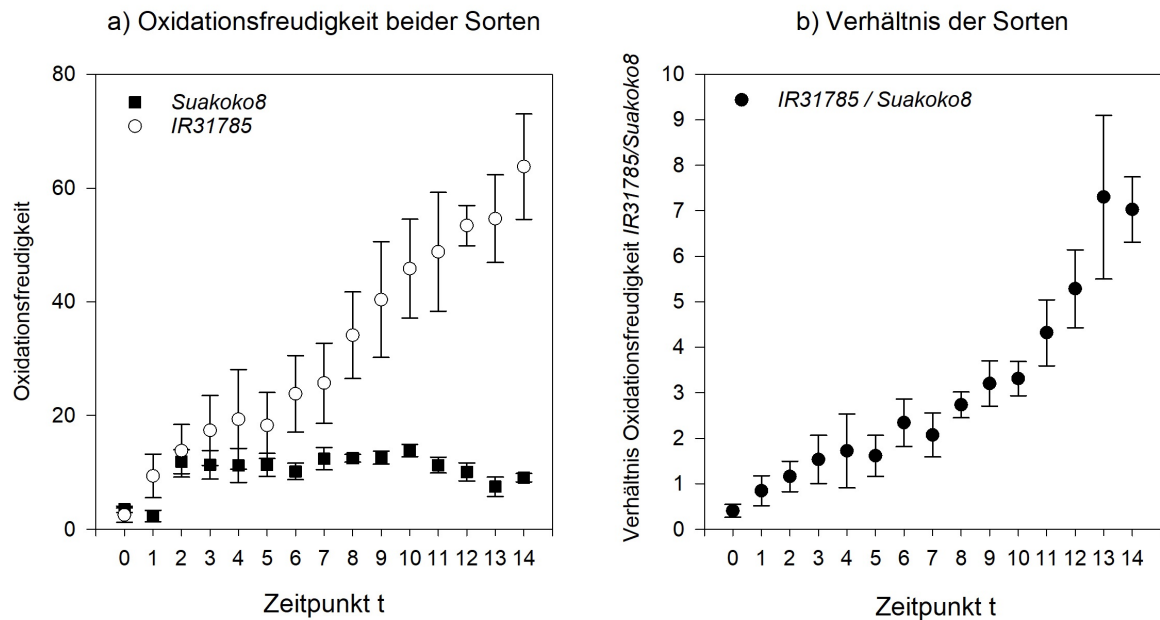


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Oxidationsfreudigkeit beider Kontrollen ohne Bakterieninokulation.

Ein Zeitabschnitt entspricht 30 min.

Die Oxidationsfreudigkeit der toleranten Sorte *Suakoko8* ist deutlich geringer als die der empfindlichen Sorte *IR31785*. Weiterhin ist bei *IR31785* ein annähernd linearer Anstieg zu verzeichnen, während *Suakoko8* lediglich zu Beginn des Versuchs einen Anstieg aufweist und im weiteren Verlauf keine großen Änderungen darlegt.

3.2.2 Vergleich der Bakterienbehandlungen innerhalb der Sorten

Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei *Suakoko8*

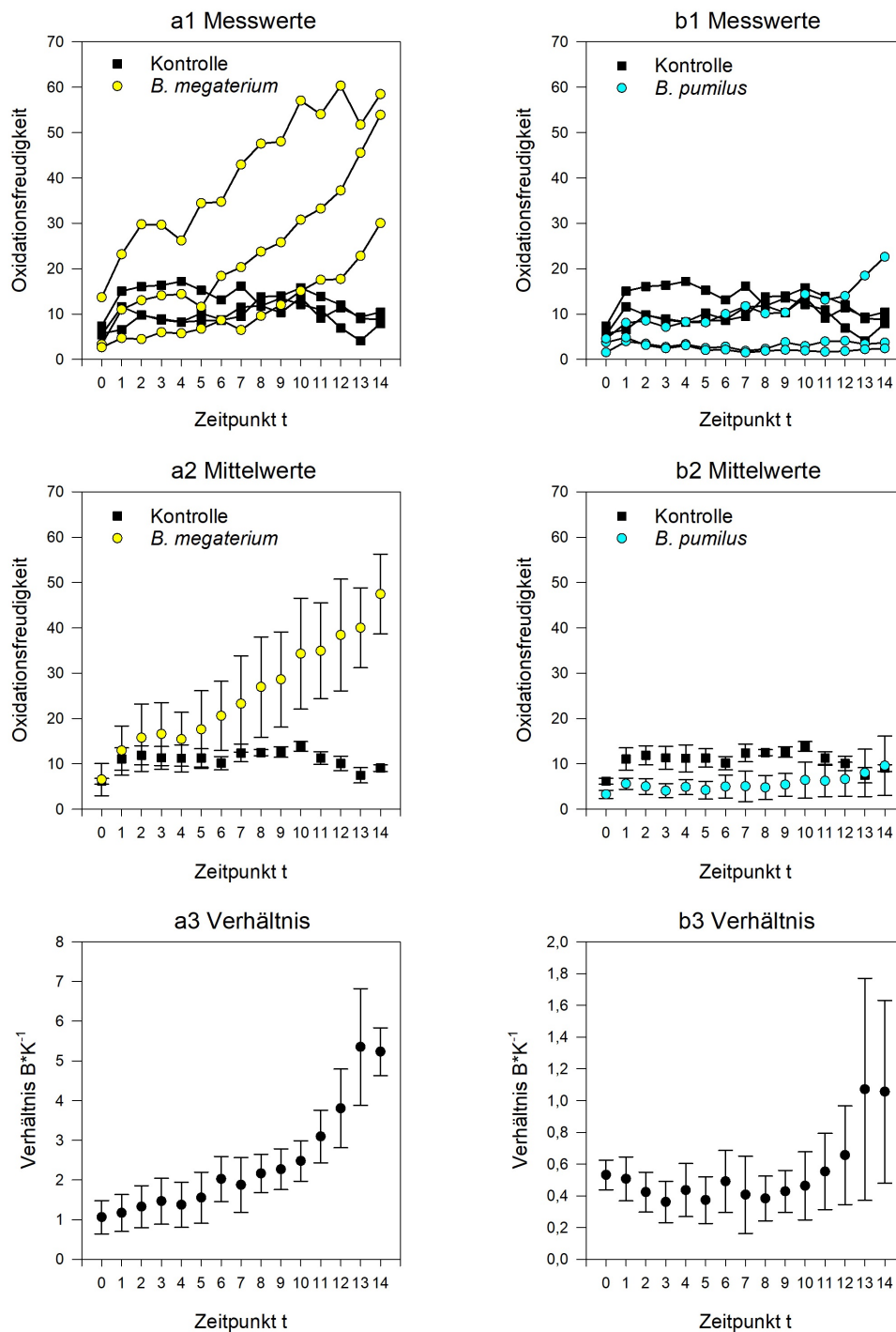


Abbildung 5: Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei *Suakoko8*.

Ein Zeitabschnitt entspricht 30 min. Die in den Grafiken a1 und b1 eingezeichneten Verbindungslinien der Messpunkte sind lediglich zu besseren Lesbarkeit eingetragen. In den Grafiken a3 und b3 entspricht B der Bakterienbehandlung und K der Kontrolle. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

Bei *Suakoko8* steigt die Oxidationsfreudigkeit mit der Inokulation von *B. megaterium* sehr stark an. Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Werte der Wiederholungen zueinander. Eine Wiederholbarkeit ist jedoch gegeben ($\sigma_{\text{rel},B.\text{megaterium},t14}=0,321$). Bei einer Inokulation mit *B. pumilus* sinkt die Oxidationsfreudigkeit leicht. Die Wiederholbarkeit ist nur schwach ausgeprägt ($\sigma_{\text{rel},B.\text{pumilus},t14}=1,181$). Bei einer Betrachtung der Mittelwerte und des Verhältnisses ist zu erkennen, dass die Oxidationsfreudigkeit abnimmt.

Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei IR31785

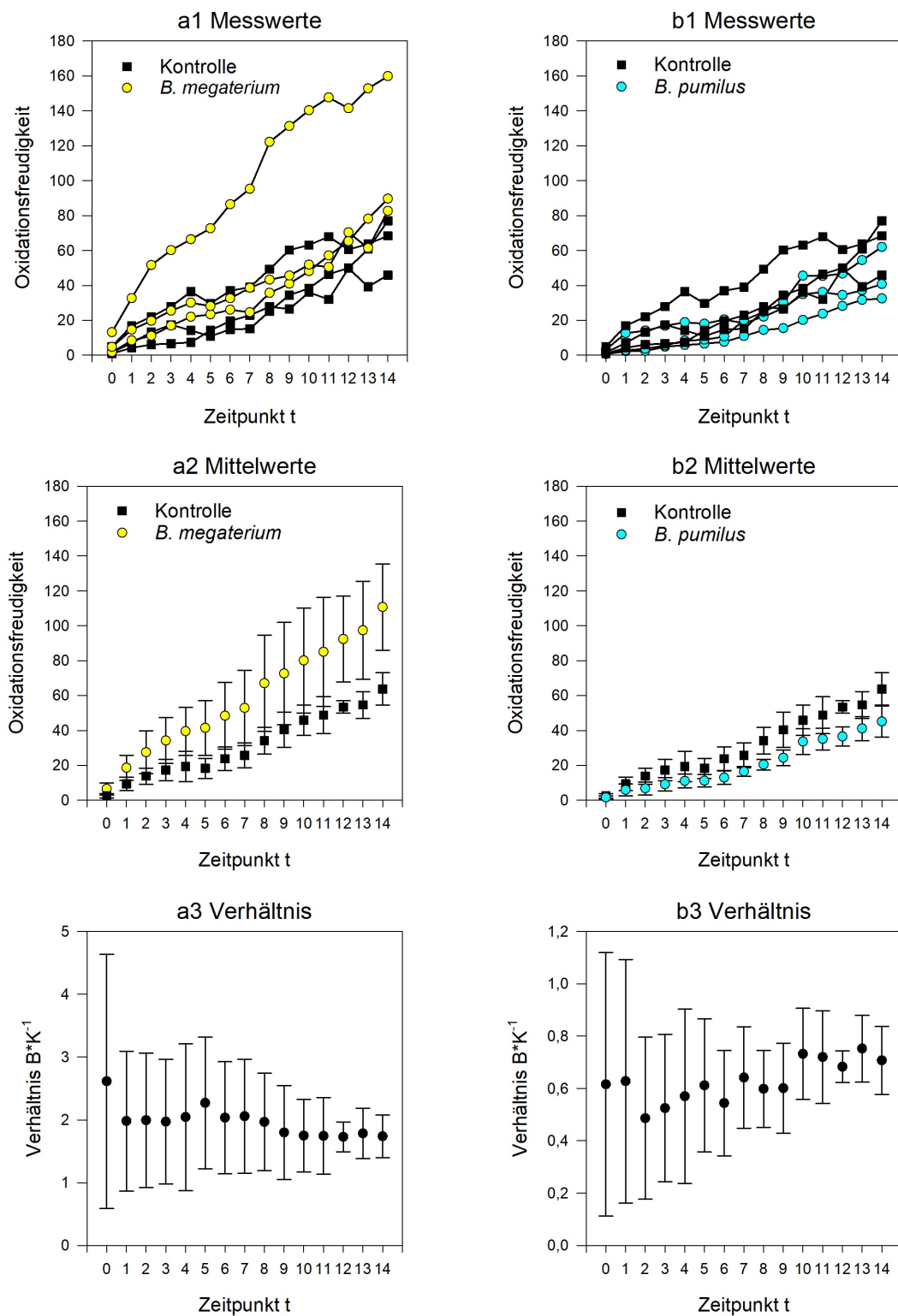


Abbildung 6: Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit bei IR31785.

Ein Zeitabschnitt entspricht 30 min. Die in den Grafiken a1 und b1 eingezeichneten Verbindungslinien der Messpunkte sind lediglich zu besseren Lesbarkeit eingetragen. In den Grafiken a3 und b3 entspricht B der Bakterienbehandlung und K der Kontrolle. Man beachte die unterschiedliche Skalierung.

Auch bei *IR31785* verursacht *B. megaterium* im Mittel einen Anstieg der Oxidationsfreudigkeit, allerdings nicht in einem starken Ausmaß. Es fällt auf, dass es einen Ausreißer mit stark erhöhter Oxidationsfreudigkeit gibt. Dadurch bedingt ist die Wiederholbarkeit etwas schwächer ($\sigma_{\text{rel},B.\text{megaterium},t14}=0,386$). Bei *B. pumilus* liegen ebenfalls ähnliche Ergebnisse vor. Diese sind jedoch etwas deutlicher, da ein wiederholbares ($\sigma_{\text{rel},B.\text{pumilus},t14}=0,338$) Absinken der Oxidationsfreudigkeit gemessen werden kann. Insgesamt reagiert *IR31785* schwächer auf die Bakterienbehandlung als *Suakoko8*.

3.2.3 Verhältnis der oxidierenden Wurzelfläche zur Gesamtwurzelfläche

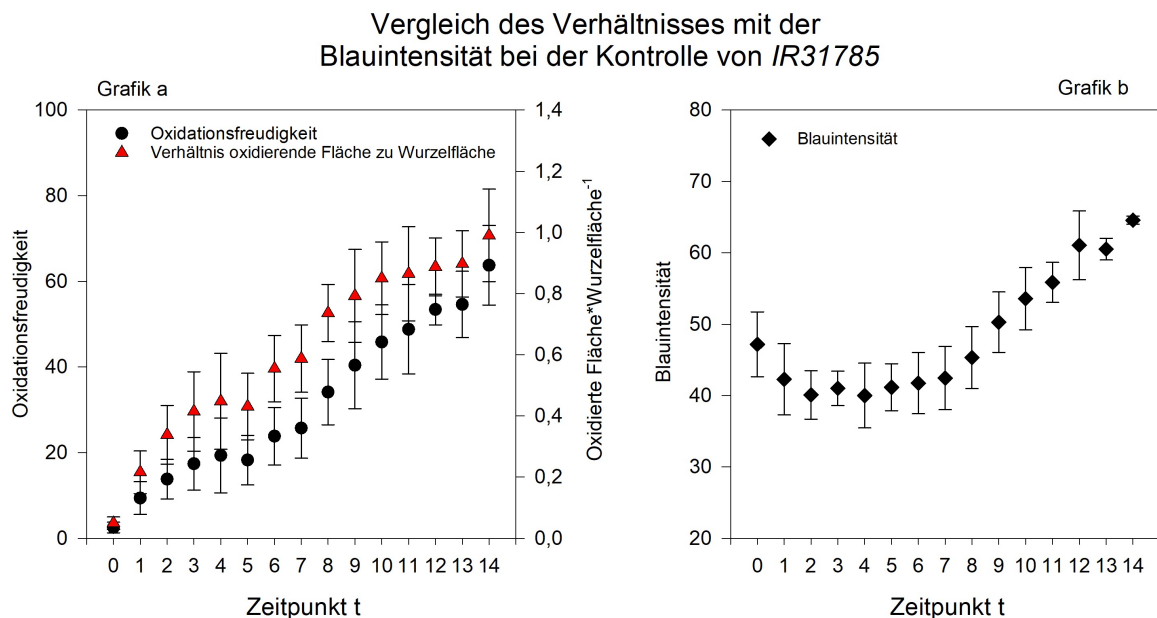


Abbildung 7: Vergleich des Verhältnisses der oxidierten Fläche mit der Blauintensität bei der Kontrolle von *IR31785*

Ein Zeitabschnitt entspricht 30 min. Die Grafik a stellt sowohl die errechnete Oxidationsfreudigkeit dar, als auch den Verlauf des Verhältnisses der oxidierten und blaugefärbten Fläche zu der gemessenen Wurzelfläche. Der Verlauf beider Kurven ist ähnlich. Die Grafik b zeigt den zeitlichen Verlauf der mittleren Intensität der blaugefärbten Fläche.

Das Verhältnis von oxidierender Wurzelfläche zur Gesamtwurzelfläche richtet sich sehr stark nach der Oxidationsfreudigkeit der Pflanze. Der Verlauf der Oxidationsfreudigkeit

über die Zeit ist annähernd linear. Der Verlauf des Verhältnisses der oxidierten Fläche zur gesamten Wurzelfläche ist ebenfalls annähernd linear, Änderungen der Oxidationsfreudigkeit folgen proportional der Änderung des Verhältnisses. Der Verlauf der Intensität der Blaufärbung besitzt ein Minimum.

3.3 Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Morphologie der Wurzel

3.3.1 Änderungen der Wurzellänge durch die Bakterienbehandlung mit und ohne Eisenstress

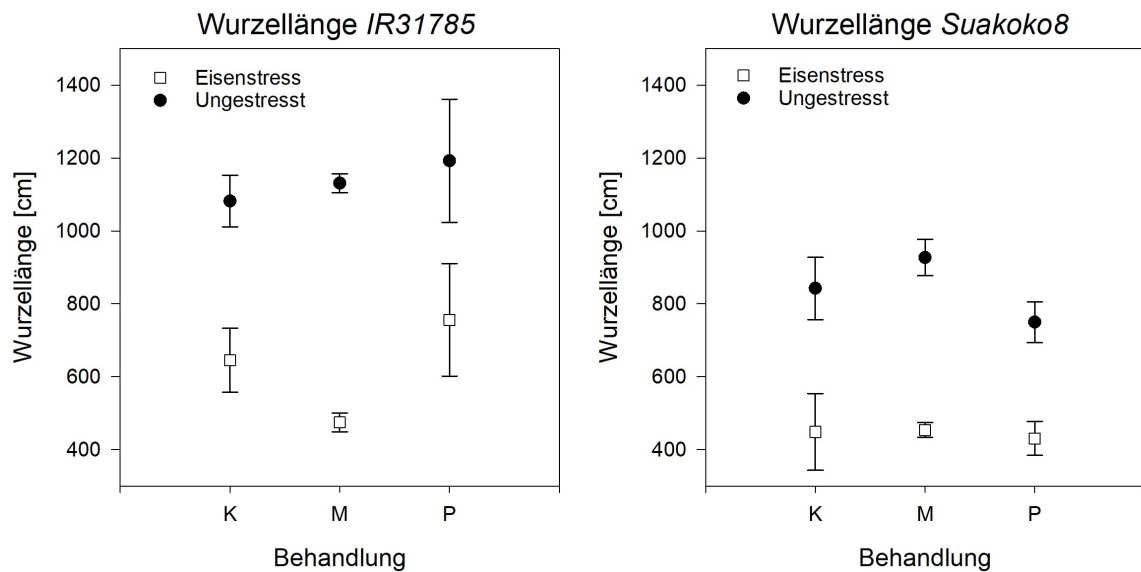


Abbildung 8: Wurzellängen der einzelnen Behandlungen

Der Buchstabe steht für die Bakterienbehandlung. P steht somit für eine Behandlung mit *B. pumilus*, M für eine Behandlung mit *B. megaterium* und K steht für keine Bakterienbehandlung.

IR31785 besitzt ein tendenziell länger ausgebildetes Wurzelsystem als *Suakoko8*. Dies ist sowohl unter Eisenstress, als auch ohne Eisenstress der Fall. Unter Eisenstress wird die Wurzellänge von allen Behandlungen reduziert. Der Abfall ist bei *IR31785* etwas stärker ausgeprägt. Eine Inokulation mit *B. megaterium* sorgt bei beiden Sorten für ein gleichmäßiges Wurzellängenwachstum der einzelnen Behandlungen. Dies tritt sowohl mit, als auch ohne Eisenstress auf. *B. megaterium* verringert bei *IR31785* unter Eisenstress die Wurzellänge. In den weiteren Behandlungen (*IR31785* ungestresst, *Suakoko8* ungestresst und mit Eisenstress) sind keine Differenzen mehr messbar. *B. pumilus* erhöht bei *IR31785* sowohl unter Eisenstress, als auch ungestresst die Differenz

zwischen den einzelnen Messwerten und damit die Streuung. Ein weiterer Einfluss durch *B. pumilus* auf die Wurzellänge ist bei beiden Sorten nicht feststellbar.

3.3.2 Änderung des Feinwurzerverhältnisses

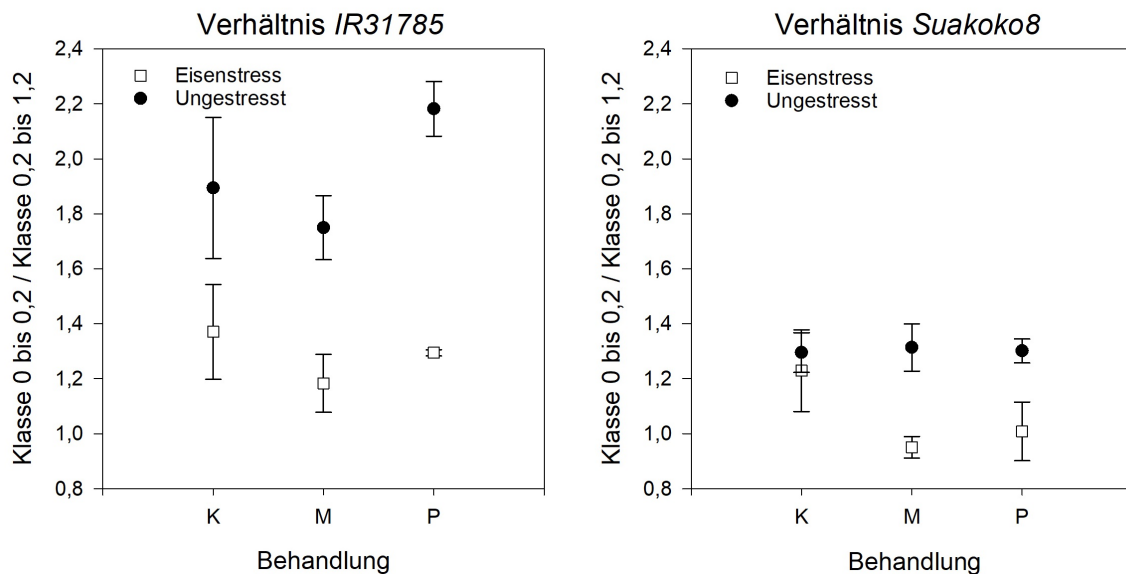


Abbildung 9: Verhältnis der Wurzelklasse 0-0,2mm zu der Klasse 0,2-1,2mm

Der Buchstabe steht für die Bakterienbehandlung. P steht somit für eine Behandlung mit *B. pumilus*, M für eine Behandlung mit *B. megaterium* und K steht für keine Bakterienbehandlung. Je höher das Verhältnis ist, umso mehr Feinwurzeln wurden ausgebildet.

Ohne Eisenstress ist der Anteil der Feinwurzeln bei *IR31785* höher als bei *Suakoko8*. Unter Eisenstress sinkt das Verhältnis bei *IR31785* auf das Niveau von *Suakoko8* ab. Bei *Suakoko8* gibt es keine Änderungen. *B. megaterium* senkt lediglich in der Behandlung von *Suakoko8* unter Eisenstress das Feinwurzerverhältnis ab. Bei den weiteren Behandlungen gibt es keine Änderungen zur Kontrolle. *B. pumilus* erhöht das Feinwurzerverhältnis bei der ungestressten Behandlung von *IR31785*. Bei den weiteren Behandlungen sind keine großen Unterschiede zur Kontrolle vorhanden. Das leichte Absinken des Verhältnisses bei einer Behandlung von *Suakoko8* unter Eisenstress ist mit einer großen Streuung verbunden.

3.3.3 Änderung des Wurzeldurchmessers

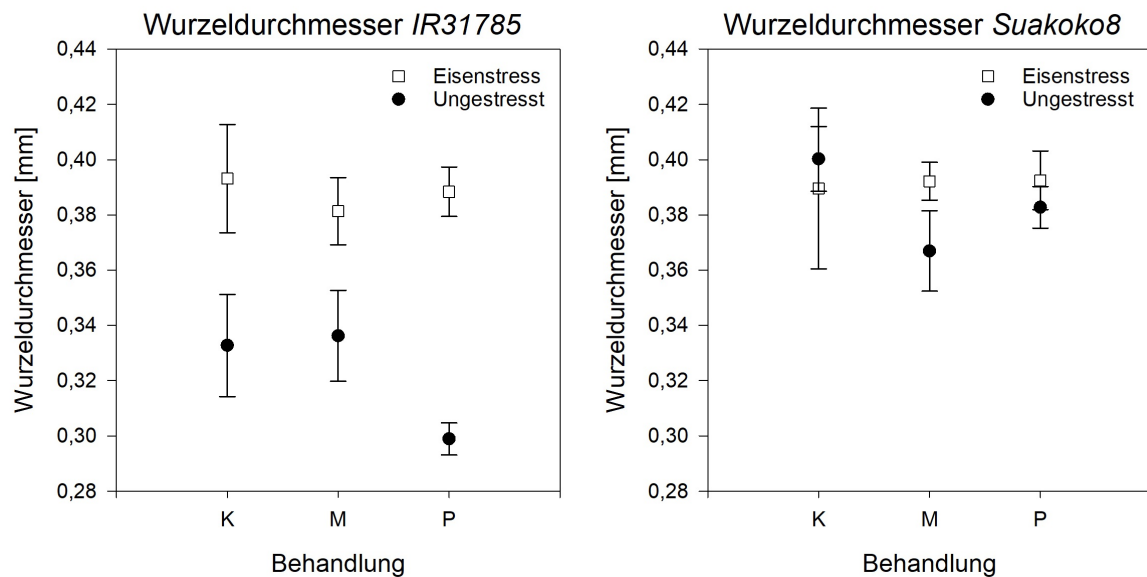


Abbildung 10: Durchschnittlicher Wurzeldurchmesser

Der Buchstabe steht für die Bakterienbehandlung. P steht somit für eine Behandlung mit *B. pumilus*, M für eine Behandlung mit *B. megaterium* und K steht für keine Bakterienbehandlung.

Ohne Eisenstress ist der Wurzeldurchmesser von *IR31785* geringer als bei *Suakoko8*. Eine Behandlung von *IR31785* mit *B. megaterium* erzeugt keine Veränderungen, jedoch sinkt der Durchmesser bei einer Behandlung mit *B. pumilus*. Bei *Suakoko8* erzeugt lediglich eine Behandlung mit *B. megaterium* einen etwas verringerten Wurzeldurchmesser. Mit Eisenstress steigt der Wurzeldurchmesser bei *IR31785* an, bei *Suakoko8* gibt es keine Änderung. Eine Bakterienbehandlung hat nun bei beiden Sorten keine Auswirkung auf den Wurzeldurchmesser.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist ein Einblick in die Veränderungen, welche verschiedene endophytische Bakterien im Hinblick auf die Oxidationskraft und Morphologie von Nassreiswurzeln ausüben.

4.1 Score

Aus Abbildung 3 (Seite 21) ersichtlich ist der Score von *IR31785* lediglich tendenziell schlechter, als der von *Suakoko8*. Es ist jedoch zu beachten, da *Suakoko8* bekanntermaßen toleranter als *IR31785* ist (Kpongpor, 2003), dass bei dem Scoring der Kontrolle von *Suakoko8* ein eventueller Ausreißer vorliegt, der den mittleren Score stark erhöht. Hierfür spricht, dass in einem ähnlichen Versuch, die Unterschiede zwischen den Sorten ebenfalls sichtbar waren (Kpongpor, 2003).

Die Auswirkungen der Bakterienbehandlungen auf die einzelnen Sorten sind nicht eindeutig. In dem vorliegenden Versuch verstärken beide Bakterienstämme die Toxizitätssymptome. Dies ist jedoch nur bei der Behandlung von *IR31785* mit *B. megaterium* signifikant ($p=0,007$). Bei den weiteren Behandlungen liegt keine statistische Signifikanz vor, dies ist wahrscheinlich den Ausreißern und des geringen Stichprobenumfanges geschuldet. Der Trend zur Verschlechterung ist jedoch ersichtlich. Weitere Versuche zeigen ein teilweise anderes Bild. *B. pumilus* hat ebenfalls den Score verschlechtert (Terre et al., 2009), jedoch wurde hierbei insgesamt 44 Tage alte Pflanzen und die eisensensitive Sorte *I Kong Pao* verwendet. Weinand et al. (2020) zeigte, dass im Falle einer Inokulation von insgesamt 35 Tage alten Pflanzen bei *IR31785* eine Reduktion des Scores messbar war, bei *Suakoko8* der Score jedoch anstieg. Mit *B. megaterium* war es bei *IR31785* möglich den Score zu verbessern (Terre et al., 2007). Dies zeigte sich auch bei Weinand et al. (2020), jedoch verschlechterte eine Inokulation den Score bei *Suakoko8*. Grund für die Verschlechterung des Scores könnte in einer durch die Bakterien vermittelte erhöhten toxisch wirkenden Eisenaufnahme liegen, oder aber der Produktion von Stoffen, die die Erzeugung von ROS fördern. Bei Terre-Fornies (2009) sanken im Falle von *B. megaterium* bei *Suakoko8* die Eisengehalte sowohl in

der Wurzel, als auch im Spross, bei *IR31785* war dies nicht messbar. Mit einer Inokulation mit *B. pumilus* blieben die Eisengehalte gleich, jedoch wurde intern Eisen vom Spross in die Wurzel umgelagert. Bei Weinand et al. (2020) korrelierten die Eisengehalte im Spross als auch den Blattscheiden nicht mit dem Score, während eine Eiseneinlagerung in den Blattspreiten für eine bessere Toleranz gegen Eisentoxizität sorgen könnte. Eine Inokulation von *IR31785* und *Suakoko8* mit *B. megaterium* erhöhte den prozentualen Anteil des gesamtpflanzlichen Eisens im Spross. Dahingehend sollte der vorliegende Versuch mit einer weitaus höheren Anzahl an Wiederholungen erneut durchgeführt werden, um herauszufinden, inwieweit der Score durch die Bakterien beeinflusst wird.

4.2 Oxidationsfreudigkeit

Der in der Abbildung 4 (Seite 22) gezeigte Vergleich der Oxidationsfreudigkeit zwischen den Sorten, zeichnet sich vor allem durch die weitaus höhere Oxidationsfreudigkeit von *IR31785* im Gegensatz zu *Suakoko8* aus. Da *Suakoko8* allerdings als die tolerantere Sorte bekannt ist (Kpongor, 2003), ist dieser Umstand auf den ersten Blick verwunderlich, zumal diese Sorte eigentlich eine vergleichsweise ausgesprochen hohe Oxidationskraft besitzt und bei der verwendeten Methode einen großen Blauschleier um die Wurzel herum erzeugen soll (Onyango et al., 2020). Eine mögliche Erklärung wäre, dass *Suakoko8* durchaus eine hohe Oxidationskraft besitzt, jedoch in dem vorliegenden Versuch bereits eine sehr hohe Menge an Eisen an der Wurzel oxidiert hat. Durch diesen entstandenen Wurzelbelag wäre es der Pflanze folglich zum Zeitpunkt der Messung der Oxidationsfreudigkeit nicht mehr effektiv möglich, Sauerstoff durch den Belag hinweg abzugeben. Sollte dies der Fall sein, müsste *Suakoko8* vor allem in den Bereich stark oxidierender Wurzelzonen, wie Wurzelspitzen und junge Sekundärwurzeln einen deutlich dickeren Belag aufweisen, als *IR31785*. Gestützt wird dies durch den Umstand, dass *Suakoko8* erhöhte Lignin- und Suberineinlagerungen in den oberen Bereichen der Wurzel aufweist, wodurch die Sauerstoffabgabe in den Wurzelspitzen konzentriert wird, welche besonders bedeutend für die Eisenaufnahme sind. Hierdurch sollte das Wurzelwachstum durch Eisen weniger stark inhibiert werden (Onyango et al., 2020). Dafür spricht auch, dass das

Wurzelwachstum unter Eisenstress im vorliegenden Versuch im Vergleich zu *IR31785* weniger stark beeinträchtigt war. Eine Alternative wäre, dass *Suakoko8* im Gegensatz zu *IR31785* eine höhere Eisentoleranz im Pflanzengewebe besitzt und somit keine hohe Oxidationskraft besitzen muss. *IR31785* besitzt hierbei diese Toleranz nicht und versucht folglich dies durch eine hohe Oxidationskraft zu kompensieren, um hierdurch die Eisenkonzentrationen im Gewebe möglichst klein zu halten. Gegen diese zweite These spricht der Umstand, dass *Suakoko8* niedrige Eisengehalte im Gewebe aufweisen soll, welches auch für eine hohe Oxidationskraft spricht, da diese eine hohe Eisenaufnahme verhindert (Onyango et al., 2018). Auch möglich ist, dass die Pflanzen zu jung waren und es ihnen somit nicht möglich war, ihre volle Sauerstoffabgabe zu realisieren. Um dies zu überprüfen, wäre ein Vergleich der Oxidationsfreudigkeit beider Sorten im ungestressten oder nur leicht gestressten Zustand unter Variation des Alters nötig.

Abbildung 5 (Seite 23) und 6 (Seite 25) zeigen den Einfluss der Bakterienbehandlung auf die Oxidationsfreudigkeit der jeweiligen Sorte. Lediglich eine Behandlung von *Suakoko8* mit *B. megaterium* weist eine statistisch signifikante Erhöhung der Oxidationsfreudigkeit nach sieben Stunden auf ($p=0,0122$). Im Mittel ist jedoch bei beiden Sorten, bei einer Inokulation mit *B. megaterium* eine Steigerung der Oxidationsfreudigkeit zu beobachten, bei einer Inokulation mit *B. pumilus* eine leichte Senkung. Auffällig ist, dass die Einflüsse der Bakterien auf *Suakoko8* als tolerante Sorte stärker ausfallen, als auf *IR31785*. Gerade bei *IR31785* ist fraglich, inwieweit beide Bakterienstämme überhaupt einen Effekt hatten, da die einzelnen Messwerte nahe aneinander liegen und hier eine zufällige Schwankung vorliegen kann. Im Falle von *B. megaterium* sollte der Versuch wiederholt werden, da nicht ersichtlich ist, inwieweit hier ein Ausreißer vorliegt. Es stellt sich hierbei die Frage, welchen Einfluss die jeweilige Toleranzstrategie einer Sorte auf die Pflanzen-Bakterien Interaktion hat.

Über die Gründe der Änderungen kann an dieser Stelle lediglich spekuliert werden. Denkbar wären die Produktion verschiedener Phytohormone, welche die Ausbildung des Aerenchyms verbessern, oder aber eine schnellere Alterung einleiten. Auch möglich wäre die Produktion von eisenlösenden Exsudaten, wodurch der Eisenbelag auf den Wurzeln dünner wird und Sauerstoff besser aus der Wurzel herausdiffundieren kann. Es wäre eine Messung von Enzymaktivitäten sinnvoll.

Eine weitere Beobachtung bei der Betrachtung der Oxidationsfreudigkeit ist die Bedeutung des Anteils der oxidierenden Wurzelfläche. Ein hoher Anteil oxidierender Wurzelfläche ist dabei weitaus bedeutender für eine hohe resultierende Oxidationsfreudigkeit, als einige wenige intensiv oxidierende Wurzelbereiche. Dies wird in Abbildung 7 (Seite 26) dargestellt. Die Konsequenz hieraus ist, dass eine hohe Oxidationsfreudigkeit nicht automatisch eine hohe Minderung der Eisenaufnahme bedingt. Dies kann vielmehr ein Hinweis auf einen hohen radialen Sauerstoffverlust entlang der Wurzel sein. Dieser abgegebene Sauerstoff steht damit jedoch nicht mehr den Wurzelspitzen zur Verfügung. Daraus schlussfolgernd dürfte *B. megaterium* die Wurzel anregen, eher ganzflächig Sauerstoff abzugeben, während *B. pumilus* entweder keinerlei Veränderungen hervorruft, die Oxidationsfreudigkeit im Gesamten senkt, oder aber eine lokale stärkere Oxidation fördert.

4.3 Änderung der Morphologie der Wurzel

Bevor der Einfluss der Bakterien auf die einzelnen Sorten diskutiert werden soll, werden zunächst die Unterschiede zwischen den Sorten erläutert. Anhand der Abbildungen 8, 9 und 10 (Seiten 28-30) können mehrere Tendenzen beobachtet werden. Es gilt zu beachten, dass alle folgenden Differenzen zwischen den Messungen aufgrund der hohen Streuung und geringen Anzahl an Wiederholungen nicht statistisch signifikant voneinander verschieden sind.

Zunächst sei gesagt, dass *IR31785* im Vergleich zu *Suakoko8* im ungestressten Zustand die Tendenz zu einem längeren, durchschnittlich dünneren und zu einem höheren Feinwurzelanteil neigenden Wurzelsystem besitzt. Dieser Umstand spricht für eine bessere Nährstoffakquirierung durch *IR31785*, da ein größeres Bodenvolumen, feiner erschlossen werden kann. Dies ändert sich jedoch unter Eisenstress. Das Wurzelsystem beider Sorten wird kürzer, die Wurzeln werden im Schnitt dicker und der Anteil der Feinwurzeln verringert sich. Dieser Einbruch ist jedoch bei *IR31785* deutlich prominenter, als bei *Suakoko8*. Das Wurzelsystem von *Suakoko8* wird kürzer, weist jedoch einen ähnlichen Anteil an Feinwurzeln auf und behält den durchschnittlichen Wurzeldurchmesser bei. In allen Parametern ähnelt nun das Wurzelsystem von *IR31785* dem von *Suakoko8*. Dies bedeutet, dass *Suakoko8* als tolerante Sorte zwar ein

schwächer ausgebildetes Wurzelsystem besitzt, jedoch in der Lage ist das Wurzelsystem auch unter Eisenstress beizubehalten. *IR31785* als empfindliche Sorte ist hierzu nicht in der Lage und besitzt durch das größere Wurzelsystem auch noch den weiteren Nachteil, dass große Mengen an Eisen potenziell aufgenommen werden können. Im Folgenden wird nun auf die Änderungen, welche die Bakterieninokulationen hervorgerufen haben, eingegangen.

Bacillus megaterium

Die Veränderungen, die *B. megaterium* bei den beiden Sorten hervorruft, sind schwach. Im ungestressten Zustand der Pflanzen zeigten sich bei *IR31785* keine Auswirkungen, bei *Suakoko8* sank der durchschnittliche Wurzeldurchmesser leicht. Weitere Änderungen lassen sich mit den gemessenen Werten nicht feststellen. Unter Eisenstress erzeugte eine Inokulation bei *Suakoko8* für ein gesunkenes Feinwurzelverhältnis, bei *IR31785* für eine gesunkene Wurzelgesamtlänge. Weitere Änderungen sind mit den vorliegenden Messwerten nicht feststellbar. Es ist jedoch eine Besonderheit bei der Wurzellänge zu nennen. Mit einer Inokulation wurde die Gesamtwurzellänge beider Sorten sowohl im ungestressten Zustand, als auch unter Eisenstress gleichmäßig lang, die Streuung der einzelnen Messwerte zueinander nahm deutlich ab. Eine Funktion des Bakteriums als wachstumsstimulierend, wie dies López-Bucio et al. (2007) beschrieben haben, konnte in dem vorliegenden Versuch nicht bestätigt werden. Es liegt im Falle von Eisenstress möglicherweise sogar eine ungünstige Wirkung, durch verkleinern des Wurzelsystems oder Senkung der für die Nährstoffaufnahme wichtigen Feinwurzeln, vor.

Bacillus pumilus

Die Veränderungen durch *B. pumilus* sind bei beiden Sorten schwach ausgeprägt. Im ungestressten Zustand der Pflanzen zeigt sich bei *IR31785* keine Änderung der durchschnittlichen Wurzellänge, eine leichte Senkung des durchschnittlichen Wurzeldurchmessers und eine leichte Erhöhung des Feinwurzelverhältnisses. Diese Effekte sind bei *Suakoko8* nicht vorhanden. Unter Eisenstress erzeugt eine Inokulation mit *B. pumilus*, bei beiden Sorten keine Änderungen an den gemessenen Parametern. Damit liegen ähnliche Ergebnisse vor, wie dies bereits Ngo et al. (2019) und Liu et al. (2020) berichtet haben. Es gibt jedoch einige Unterschiede. In beiden Arbeiten wurden

jeweils nur eine Sorte verwendet. Die in diesem Versuch auftretende Änderung der Wurzelmorphologie erzeugte lediglich bei *IR31785* für ein feineres Wurzelsystem. Da die Stimulation des Wurzelwachstums bei den beiden verwendeten Sorten, nur bei einer Sorte (*IR31785*) auftrat, stellt sich die Frage, ob das verwendete Bakterium sortenspezifisch wirkt. Eine weitere Beobachtung ist die Auswirkung von Eisenstress. Hierbei scheint eine Inokulation keine Auswirkung mehr auf das Wurzelsystem zu haben. Dies wurde in den anderen Arbeiten nicht untersucht. Um diese Unterschiede zu überprüfen ist eine Wiederholung des Versuches mit deutlich erhöhtem Stichprobenumfang nötig.

5 Fazit

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen: Der erste Teil beschreibt die Entwicklung einer Methode um mit moderner Bildverarbeitung chemische Vorgänge und Morphologien von Wurzeln automatisiert auszuwerten. Dadurch wird die subjektive Verwendung von Farbtafeln durch eine schnelle und wiederholbare Methodik ersetzt. Der zweite Teil beschreibt die Anwendung der Methodik auf Einflüsse von endophytischen Bakterien auf die Oxidationskraft und Morphologie von Nassreiswurzeln.

Bacillus megaterium verschlechtert den Score von eisengestressten Pflanzen. Das Bakterium erhöht dabei im Mittel die Oxidationsfreudigkeit der Pflanzen. Auf die Morphologie der Wurzel hat *Bacillus megaterium* bei beiden verwendeten Sorten, ohne Eisenstress keinen Einfluss. Unter Eisenstress ist das Bakterium möglicherweise durch eine Verkleinerung der Wurzel schädlich.

Bacillus pumilus verschlechtert ebenfalls tendenziell den Score von unter Eisentoxizität leidenden Reispflanzen. Das Bakterium senkt die Oxidationsfreudigkeit im Mittel leicht ab. Auf die Morphologie der Wurzel hat *Bacillus pumilus* bei *Suakoko8* sowohl mit, als auch ohne Eisenstress keinen Einfluss. Bei *IR31785-58-1-2-3-3*, verringert das Bakterium den durchschnittlichen Wurzeldurchmesser, erhöht die Gesamtwurzellänge und das Feinwurzelverhältnis. Dies ist jedoch nur bei ungestressten Pflanzen der Fall. Die positiven Effekte von *Bacillus pumilus* auf *IR31785-58-1-2-3-3* sind unter Eisenstress nicht messbar oder an der Nachweisgrenze.

Die verwendeten Methoden sind auch auf weitere Fragestellungen anwendbar, da sie eine schnelle, zielgerichtete und automatisierte Auswertung ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Asch, F., Becker, M., & Kpongor, D. S. (2005). A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(6), 764–773. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520540>
- Audebert, A., & Sahrawat, K. L. (2000). Mechanisms for iron toxicity tolerance in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11–12), 1877–1885. <https://doi.org/10.1080/01904160009382150>
- Aung, H. P., Djedidi, S., Oo, A. Z., Aye, Y. S., Yokoyama, T., Suzuki, S., Sekimoto, H., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2015). Growth and ¹³⁷Cs uptake of four Brassica species influenced by inoculation with a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus pumilus* in three contaminated farmlands in Fukushima prefecture, Japan. *Science of The Total Environment*, 521–522, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.109>
- Barton, D., & Ollis, W. D. (Hrsg.). (1979). *Comprehensive organic chemistry: The synthesis and reactions of organic compounds* (4th. ed). Pergamon Press.
- Becker, M., & Asch, F. (2005). Iron toxicity in rice—Conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558–573. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520504>
- Biedendieck, R. K. J. (2006). *Bacillus megaterium: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins*. Technische Universität Braunschweig.
- Butler, I. (1994). Removal of dissolved oxygen from water: A comparison of four common techniques. *Talanta*, 41(2), 211–215. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)80110-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)80110-X)
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions: Plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell &*

Environment, 32(12), 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>

- Dobermann, A., & Fairhurst, T. (2000). *Rice: Nutrient disorders & nutrient management*. Potash & Phosphate Institute, East & Southeast Asia Programs ; IRRI.
- FAOSTAT. (2018). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gowda, V. R. P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E., & Serraj, R. (2011). Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research*, 122(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.03.001>
- GRiSP (Hrsg.). (2013). *Rice almanac: Source book for the most important economic activities on Earth* (Fourth Edition). The International Rice Institute.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- INGER; IRRI. (1996). *Standard evaluation system for rice* (4. Aufl.). The International Rice Institute.
- Khan, A., Sirajuddin, Zhao, X. Q., Javed, M. T., Khan, K. S., Bano, A., Shen, R. F., & Masood, S. (2016). *Bacillus pumilus* enhances tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to combined stresses of NaCl and high boron due to limited uptake of Na⁺. *Environmental and Experimental Botany*, 124, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.12.011>

- Kpongor, D. S. (2003). *Developing a Standardized Procedure to Screen Lowland Rice (Oryza sativa) Seedlings for Tolerance to Iron Toxicity*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Lehman, L. J., McCoy, R. J., Messenger, B. J., Manker, D. C., Orjala, J. E., Lindhard, D., & Marrone, P. G. (2001). *Strain of Bacillus pumilus for controlling plant diseases caused by fungi* (Patent Nr. US 6,245,551 B1).
- Liu, H., Wang, Z., Xu, W., Zeng, J., Li, L., Li, S., & Gao, Z. (2020). Bacillus pumilus LZP02 Promotes Rice Root Growth by Improving Carbohydrate Metabolism and Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 33(10), 1222–1231. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-20-0106-R>
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). Bacillus megaterium Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 20(2), 207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0207>
- Luh, B. S. (Hrsg.). (1991). *Rice: Bd. Production* (2nd ed). Van Nostrand Reinhold.
- Ngo, N. P., Yamada, T., Higuma, S., Ueno, N., Saito, K., Kojima, K., Maeda, M., Yamaya-Ito, H., Ohkama-Ohtsu, N., Kanekatsu, M., & Yokoyama, T. (2019). Spore inoculation of Bacillus pumilus TUAT1 strain, a biofertilizer microorganism, enhances seedling growth by promoting root system development in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 65(6), 598–604. <https://doi.org/10.1080/00380768.2019.1689795>
- Onyango, D. A., Entila, F., Dida, M. M., Ismail, A. M., & Drame, K. N. (2018). Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 1. Morpho-physiological and biochemical responses. *Functional Plant Biology*, 46(1), 93–105. <https://doi.org/10.1071/FP18129>

- Onyango, D. A., Entila, F., Egdane, J., Pacleb, M., Katimbang, M. L., Dida, M. M., Ismail, A. M., & Drame, K. N. (2020). Mechanistic understanding of iron toxicity tolerance in contrasting rice varieties from Africa: 2. Root oxidation ability and oxidative stress control. *Functional Plant Biology*, 47(2), 145–155. <https://doi.org/10.1071/FP19054>
- Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(4), 263–265. <https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204>
- Osmont, K. S., Sibout, R., & Hardtke, C. S. (2007). Hidden Branches: Developments in Root System Architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 93–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.104006>
- Padgham, J. L., & Sikora, R. A. (2007). Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection*, 26(7), 971–977. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.004>
- Prade, K. (1987). *Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Eisentoxizität bei Nassreis (Oryza sativa L.) in der Basse Casamance, Senegal* (Bd. 3). HochschulVerlag.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Senewiratne, S. T., & Mikkelsen, D. S. (1961). Physiological factors limiting growth and yield of *Oryza sativa* under unflooded conditions. *Plant and Soil*, 14(2), 127–146.
- Terre, S., Asch, F., & Becker, M. (2009). *Effects of Rhizobacteria on iron uptake in lowland rice under conditions of iron toxicity*. Tropentag 2009, Hamburg. <http://www.asch-online.eu/downloads/FA-Terre-TT09-Poster.pdf>
- Terre, S., Asch, F., Padgam, J., & Becker, M. (2007). *Influence of root zone bacteria on root iron sequestration in rice subjected to iron toxicity*. Tropentag 2007, Kassel-

- Witzenhausen. <http://www.asch-online.eu/downloads/FA-Terre-Asch-TT07-Poster.pdf>
- Terre-Fornies, S. (2009). *Effects of Rhizobacteria on iron uptake and root iron plaque formation in lowland rice under conditions of iron toxicity* [Master of Science]. Universität Bonn.
- Thomas, P. (2004). Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 114–123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02279.x>
- Thongbai, P., & Goodman, B. A. (2000). Free radical generation and post-anoxic injury in rice grown in an iron-toxic soil. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11–12), 1887–1900. <https://doi.org/10.1080/01904160009382151>
- Trolldenier, G. (1995). Die Ökophysiologie der Wurzeln und der Rhizosphäre. *Biologie in unserer Zeit*, 25(3), 197–202. <https://doi.org/10.1002/biuz.19950250318>
- 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), 957–967. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3>
- Weinand, T., Zeeshan, I. G., Hartmann, J., & Asch, F. (2020). *Bacillus-mediated Changes in Iron Partitioning in Lowland Rice under Iron Toxic Conditions*. Tropentag 2020. <https://www.tropentag.de/2020/abstracts/posters/437.pdf>
- Xu, J., & Hong, J. H. (2013). Root Development. In Q. Zhang & R. A. Wing (Hrsg.), *Genetics and Genomics of Rice* (S. 297–316). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7903-1_20
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>

- Yoshida S., Forno, D. A., Cock, J. H., & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice* (3. Aufl.). The International Rice Institute.
- Zhang, W., Xie, Z., Zhang, X., Lang, D., & Zhang, X. (2019). Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 580–589. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1680752>