

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



Bachelorarbeit

**Aufnahme und Verteilung
von endophytischen Bakterien in Reis**

Fakultät Agrarwissenschaften

Institut für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut)

Fachgebiet Wasserstress-Management bei Kulturpflanzen in den

Tropen und Subtropen (490g)

Prof. Dr. Folkard Asch

Sina Hartl

Studiengang Agrarbiologie

Prüfer: Prof. Dr. Folkard Asch

Stuttgart-Hohenheim, den 12.10.2017

Zusammenfassung

Der Anbau von Reis als einem der wichtigsten Grundnahrungsmittel der Welt findet überwiegend in weiten Teilen Asiens in Form von Nassreisanbau statt. Durch die dauerhafte Überflutung der Felder werden Eisenverbindungen im Boden reduziert, die von Reispflanzen aufgenommen werden und dort zu Eisenstress-Symptomen führen können. Hohe Ernteausfälle sind oft die Folge. Eine Besiedelung der Pflanzen durch endophytische Bakterien kann zur Abschwächung der Symptome beitragen.

Um die Wirkungsweise der Bakterien besser zu verstehen, wurden deren Aufnahme und Verteilung in den Wurzeln, Blattscheiden und Blattspreiten von Reispflanzen quantitativ erfasst. Dazu wurden zwei Reissorten (*IR 31785-58-1-2-3-3* und *TOX 4004-8-1-2-3*) im hydroponischen System unter zwei unterschiedlichen Luftfeuchtebedingungen mit den Stämmen *Bacillus megaterium* und *Bacillus pumilus* inokuliert. Bei der Hälfte der Pflanzen wurden zuvor die Wurzelspitzen verletzt.

In den Wurzeln aller Versuchspflanzen und in den oberirdischen Pflanzenorganen einiger Pflanzen wurden Bakterien gefunden. Die Kolonienzahlen in den Wurzeln waren deutlich höher. Zum Teil konnten Unterschiede zwischen den Sorten, Bakterienstämmen, Luftfeuchtebedingungen und dem Verletzen der Wurzeln erkannt werden. Die Ergebnisse können zum Verständnis der möglichen Transportwege in den Pflanzen beitragen und haben gezeigt, dass die weitere Erforschung der Aufnahme und Verteilung von endophytischen Bakterien in Reispflanzen interessant bleibt.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Folkard Asch für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit und die vielen Anregungen zu meinem Thema herzlich bedanken.

Frau Dipl.-Agr.Biol. Julia Hartmann danke ich für ihre umfassende Einarbeitung und Zusammenarbeit im Gewächshaus und im Labor und für die Unterstützung während meines Schreibprozesses.

Bei Frau Dr. agr. Sabine Stürz möchte ich mich bedanken, dass ich mich bei Fragen jederzeit an sie wenden konnte.

Dem BOGY-Praktikanten Marc danke ich für seine tatkräftige Mithilfe im Labor und beim unermüdlichen Zählen der Bakterienkulturen.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihr Interesse und ihre Unterstützung während meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand.....	2
2.1 Eisentoxizität	2
2.2 Vegetative Phase der Reispflanze	2
2.3 Endophytische Bakterien	4
<i>Verwendete Bakterienstämme.....</i>	5
2.4 Aufnahme und Verteilung von endophytischen Bakterien in der Pflanze – Allgemeiner Überblick	6
<i>Unterschiedliche Dampfdruckdefizite</i>	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Pflanzenanzucht	9
3.2 Klimakammern.....	11
3.3 Kultivierung der Bakterien und Inokulation der Pflanzen.....	13
<i>Herstellung des Nährmediums</i>	13
<i>Ansetzen der RINGER-Lösung</i>	13
<i>Herstellung der TSB-Lösung.....</i>	13
<i>Kultivierung und Inokulation.....</i>	14
3.4 Versuchsaufbau.....	14
3.5 Auswertung der Ergebnisse	16
4 Ergebnisse	17
4.1 Aufnahme der Bakterien in die Wurzeln	17
<i>Sortenunterschiede</i>	17
4.2 Aufnahme der Bakterien in oberirdische Pflanzenorgane	20
<i>Vergleich aller Behandlungen.....</i>	20
<i>Bakterien an den Außenseiten der Blätter</i>	22
<i>Bakterien innerhalb der Blätter</i>	22
<i>Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen und Wurzeln</i>	26

4.3	Bakterien im Saatgut	27
5	Diskussion.....	28
5.1	Aufnahme der Bakterien in die Wurzeln	28
	<i>Relationen innerhalb der Wurzeln</i>	30
5.2	Aufnahme von Bakterien in oberirdische Pflanzenorgane.....	30
	<i>Verteilung der Bakterien in den oberirdischen</i>	
	<i>Pflanzenorganen</i>	31
	<i>Prozentuale Verteilung in den Blättern</i>	33
	<i>Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen</i>	
	<i>und Wurzeln</i>	34
5.3	Mögliche Fehlerquellen und Verbesserungsvorschläge	36
5.4	Fazit und Ausblick	37
	Literaturverzeichnis	VII
	Eidesstattliche Erklärung	XIII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
ca.	Circa
cm	Zentimeter
EtOH	Ethanol
Fe	Eisen
FeNa EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
FG	Frischgewicht
g	Gramm
gr.	Griechisch
h	Stunde
ha	Hektar
kg	Kilogramm
L	Liter
PGPR	Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria
L1, L2, L3, L4	Blattspreiten der Altersstufen 1, 2, 3 und 4
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
NaOH	Natriumhydroxid
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S2, S2, S3	Blattscheiden der Altersstufen 2, 3 und 4
sp./spp.	species
TSB	Tryptic Soy Broth
VPD	Vapour Pressure Deficit

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteil der Proben an der Gesamtprobenzahl der einzelnen Behandlungen, in denen Bakterien nachgewiesen werden konnten.	20
Tabelle 2: Anzahl der gezählten Bakterienkolonien auf den Abdrücken der Blattspreiten.....	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze einer jungen Reispflanze	3
Abbildung 2: Röhrensystem, in dem die Reispflanzen fixiert wurden.	10
Abbildung 3: Setzlinge im hydroponischen System.	10
Abbildung 4: Aufbau der Klimakammern.	11
Abbildung 5: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum (Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit).	12
Abbildung 6: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum (VPD).	12
Abbildung 7: Anzahl der Bakterienkulturen in den Wurzeln.	18
Abbildung 8: Relation zwischen der Kolonienzahl an und in den Wurzeln gesamt und der Kolonienzahl innerhalb der oberflächendesinfizierten Wurzeln. ..	19
Abbildung 9: Bakterienkolonien in den Blattspreiten und Blattscheiden.	21
Abbildung 10: Verhältnisse der Kolonienzahlen von <i>B. megaterium</i> zwischen Blattscheiden und Blattspreiten in <i>IR 31</i>	23
Abbildung 11: Kolonienzahlen von <i>B. megaterium</i> in den Blättern von <i>IR 31</i> . ..	24
Abbildung 12: Kolonienzahlen in den Blättern von <i>IR 31</i>	25
Abbildung 13: Prozentuale Verteilung von <i>B. megaterium</i> in den Blättern von <i>IR</i> <i>31</i>	26
Abbildung 14: Relation zwischen den oberirdischen Pflanzenorganen und den Wurzeln.	27

1 Einleitung

Neben Weizen gehört Reis zu den bedeutendsten Grundnahrungsmitteln der Welt und dient rund der Hälfte der globalen Bevölkerung als wichtigster Energielieferant (Nayar, 2014). Vor allem in den am wenigsten entwickelten Ländern der Welt kommt Reis mit einem Verbrauch von rund 66,1 kg pro Kopf und Jahr eine weitaus größere Bedeutung zu als Weizen (27,4 kg/Kopf/Jahr) (FAOSTAT, 2017; Martens, 2002). Etwa 90 % des Reisanbaus finden im Süden, Südosten und Osten Asiens statt, verhältnismäßig kleine Mengen werden in weiteren Teilen Asiens und in Afrika südlich der Sahara überwiegend auf kleinen Farmen mit einer Größe von unter 3 ha angebaut. Mehr als die Hälfte aller Reisfelder dienen mit einer Fläche von rund 93 Mio. ha dem Nassreisanbau, welcher weit höhere Erträge als der Trockenreisanbau einbringt und 75 % der globalen Reispromuktion ausmacht (Maclean et al., 2013; Zeigler und Barclay, 2008). Im Trockenreisanbau wird der Reis zu Beginn der Regenzeit direkt auf dem Feld ausgesät, die Wasserzufuhr findet ausschließlich durch Regenfälle statt und der Boden ist nicht dauerhaft überflutet. Im Gegensatz dazu werden die Reisfelder im Nassreisanbau dauerhaft kontrolliert geflutet und Dämme verhindern das Abfließen des Wassers (Dobermann und Fairhurst, 2000). Im Nassreisanbau spielt Eisentoxizität als am häufigsten vorkommende Ernährungsstörung eine große Rolle und kann zu erheblichen Ertragseinbußen führen (Asch et al., 2005; Fageria et al., 2008). Abhängig von Reissorte, Eisenstressintensität und Bodenbedingungen können Ernteverluste von 12 bis zu 100% auftreten (Sahrawat, 2005). Aus Reiskörnern isolierte endophytische Bakterienstämme zeigten bei der Inokulation eisengestresster Reispflanzen eine deutliche Minderung der Stresssymptome in den Pflanzen (Asch und Padgam, 2005). Die Wirkungsweise der Bakterien ist noch unklar; um diese zu verstehen, sollen in dieser Arbeit Bakterienkulturen in Reispflanzen lokalisiert und quantitativ erfasst sowie Unterschiede in der Aufnahme und Verteilung zwischen den Reissorten und den Bakterienstämmen untersucht werden. Einflüsse durch ein verändertes Dampfdruckdefizit oder das Verletzen der Reiswurzeln sollen ebenfalls analysiert werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Eisentoxizität

Im Nassreisanbau werden Reisfelder bei einem Pflanzenalter von 25 bis 30 Tagen kontrolliert geflutet. Eine Woche bis 10 Tage vor der Ernte wird das Wasser über eine Drainage des Bodens abgeleitet (Fageria et al., 2008). Durch die Flutung des Bodens verdrängt Stauwasser die Luft in der Rhizosphäre, wonach Sauerstoff limitierend wird und das Redox-Potenzial des Bodens sinkt. Bei einem Redox-Potenzial zwischen +180 und +150 mV reduzieren anaerobe Mikroorganismen in überfluteten Böden Fe^{3+} zu Fe^{2+} , welches löslich und besser pflanzenverfügbar ist als Fe^{3+} (Fageria, 2014). Die Flutung des Bodens und die daraus resultierende Reduktion von Fe^{3+} in Fe^{2+} hat eine erhöhte Aufnahme von Eisenionen in die Pflanze durch den Transpirationsstrom zur Folge. Werden diese in zu hohen Mengen in die Blattgewebe weitertransportiert, kommt es dort zur Bildung von oxidierten Polyphenolen und die Blätter färben sich kupferbraun, was auch „bronzing“ genannt wird. Es bilden sich Sauerstoffradikale, welche die Proteine und Biomembranen der Zellen zerstören können (Dobermann & Fairhurst, 2000) und das Gleichgewicht essentieller Nährstoffe kann durch die Hemmung ihrer Aufnahme in die Pflanze verschoben werden (Fageria et al., 2008). Auch bei einem niedrigen pH-Wert kann es im Boden durch die Reduzierung von Eisen(III)hydroxiden zu einem Anstieg an Fe^{2+} -Ionen kommen.

2.2 Vegetative Phase der Reispflanze

Reispflanzen benötigen je nach Sorte und Umweltbedingungen 3-6 Monate bis zur Samenreife (Yoshida, 1981). Im diesem Versuch wurden die Pflanzen bereits in der vegetativen Phase nach Ausbildung der ersten Seitentriebe, 37 Tage nach der Aussaat, im Labor untersucht. Dies erleichterte ihre Handhabung in den Laborversuchen.

Die Blätter der Reispflanze bestehen aus Blattscheide, Blattspreite, Ligula und den Öhrchen. Jüngere Blätter werden von der Blattscheide der älteren Blätter umhüllt und wachsen durch diese nach oben, an äußerster Stelle befinden sich die ältesten Blätter (Abbildung 1). Das jüngste vollentwickelte Blatt S1/L1 (S = Blattscheide, L = Blattspreite) wird in dieser Arbeit dann als solches bezeichnet, wenn die Ligula ohne Fremdeinwirkung sichtbar wird. Das nächstältere Blatt wird als S2/L2 bezeichnet, es folgen S3/L3, S4/L4 usw. Die höchste metabolische Aktivität findet in den Blättern L1 sowie L3 und L4 statt. Die letzteren beiden besitzen von allen Blättern die höchste photosynthetische Aktivität und sind für die Versorgung der jüngeren Blätter zuständig. Sie sind am wichtigsten für das Wachstum der Pflanze (Yoshida, 1981).

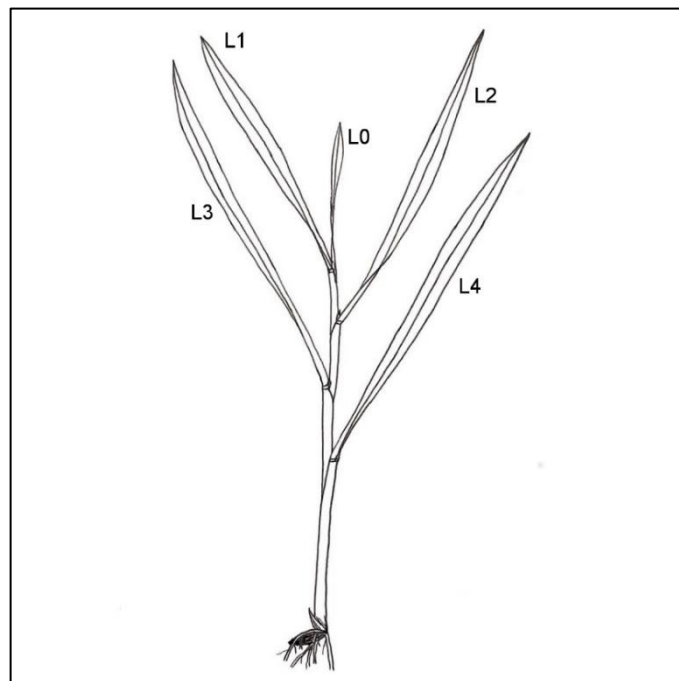


Abbildung 1: Skizze einer jungen Reispflanze mit unvollständig entwickeltem Blatt (L0), dem jüngsten vollentwickelten Blatt (L1) sowie den drei älteren vollentwickelten Blättern (L2, L3, L4).

Die Wurzeln der Reispflanze können in die Primärwurzel, in Mesocotylwurzeln und in die sprossbürtigen Adventiwurzeln (Nodalwurzeln) aufgeteilt werden. Wurzelhaare werden hauptsächlich unter aeroben und weniger gut unter reduzierten Bedingungen ausgebildet. Sie sind 50 – 200 µm lang und haben einen Durchmesser von 5 – 10 µm. Im Rindenparenchym befinden sich Aerenchyme, die sich in Stängeln und Blättern fortsetzen und eine bessere Luftzufuhr unter überstauten Bedingungen gewährleisten. Wasser und Mineralstoffe können

aufgrund von Suberin- und Lignineinlagerungen nur in einer bestimmten Zone oberhalb der Wurzelspitze gut aufgenommen werden. Schneidet man die Hälfte der Wurzeln ab und stellt die Reispflanze für etwa 10 Tage in Nährlösung, so wachsen neue Wurzeln nach. Diese verfügen über eine geringere Aufnahmekapazität von Wasser und Nährstoffen, was möglicherweise an ihren geringeren Zuckergehalten und höheren Nährstoffgehalten liegt. Sie besitzen jedoch eine höhere Oxidationskapazität (Yoshida, 1981).

2.3 Endophytische Bakterien

In der wissenschaftlichen Literatur werden unterschiedliche Definitionen für endophytische Bakterien verwendet. Hallmann et al. (1997) bezeichnen sie als „those bacteria that can be isolated from surface-desinfected plant tissue or extracted from within the plant, and do not visibly harm the plant“. Wilson (1995) definiert Endophyten allgemeiner als “fungi or bacteria which, for all or part of their life cycle, invade the tissues of living plants and cause unapparent and asymptomatic infections entirely within plant tissues but cause no symptoms of disease”. Endophytische Bakterien sind überwiegend bodenbürtig und befinden sich ursprünglich in der Rhizosphäre, weshalb sie den Rhizobakterien zugeordnet werden können. Sie produzieren unter anderem Enzyme, Osmolyte, Siderophore, organische Säuren und Antibiotika und können die Entwicklung der Pflanze unterstützen, indem sie Pathogene unterdrücken, die Pflanzenverfügbarkeit von Nährstoffen fördern und deren Stresstoleranz verbessern (Dimkpa et al., 2009).

Bei „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria“ (PGPR) handelt es sich um Bakterien, die in der Rhizosphäre leben und das Pflanzenwachstum fördern können. Dies kann direkt durch die Synthese von wachstumsfördernden Substanzen oder durch die Erleichterung der Nährstoffaufnahme in die Pflanze geschehen. Indirekt kann eine Förderung durch die Hemmung von Pathogenen erfolgen (Santoyo et al., 2016). Gray und Smith (2005) unterteilen PGPR in zwei weitere Gruppen: Intrazelluläre PGPR (iPGPR) leben innerhalb der Pflanzenzellen, produzieren dort Knöllchen und halten sich in diesen Strukturen auf. Extrazelluläre

PGPR (ePGPR) besiedeln Hohlräume zwischen den Zellen des Rindenparenchyms, fördern dort das Pflanzenwachstum durch die Produktion verschiedener Signalstoffe, erhöhen die Krankheitsresistenz der Pflanze und verbessern die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden. Zu den ePGPR zählt auch die Gattung *Bacillus*. Die Aufteilung in intra- und extrazelluläre PGPR könnte eine wichtige Rolle spielen, um die Mechanismen der Bakterien bei der Steigerung der Stresstoleranz der Pflanze zu verstehen. Der Einfluss von endophytischen Bakterien auf Eisentoxizität in Reispflanzen ist wenig erforscht. Es gibt Hinweise, dass sie eine entscheidende Rolle für die Steigerung der Stresstoleranz in Pflanzen spielen können. Asch und Padgam (2005) haben nachgewiesen, dass Reispflanzen, die über den Zeitraum einer Woche mit *B. megaterium* im hydroponischen System inokuliert wurden, deutlich geringere Eisenstress-Symptome zeigten als die Kontrollpflanzen.

Verwendete Bakterienstämme

Bacillus megaterium (gr. mega = groß, teras = Monster, Ungeheuer) ist ein Gram-positives und hauptsächlich aerob lebendes, sporenbildendes Bakterium (Vary et al., 2007). Es wird durch runde bis längliche Stäbchen gebildet, die eine Größe von 2 x 5 µm erreichen können und ist größtenteils unbeweglich. Auf dem Nährboden bildet es zunächst weiße, schleimige Kolonien, die nach einigen Tagen eine gelbliche bis braune Farbe annehmen können (Seiler, 2010). *B. megaterium* kommt in sehr unterschiedlichen Habitaten vor und wurde nicht nur auf Reiskörnern, sondern auch in anderen Pflanzen und verschiedenen Lebensmitteln wie Fisch und Bienenhonig identifiziert (Vary, 1994). In der Industrie wird der Stamm vielfältig angewendet, zum Beispiel als Bodendetoxifizierer in herbizid- oder pestizidbelasteten Böden (Martens, 2002). *B. megaterium* produziert neben verschiedenen Enzymen und Toxinen (Vary et al., 2007) Siderophore, welche neben anderen Schwermetallen vor allem Eisen in Form von Fe³⁺ chelatisieren. Der entstehende Komplex kann bei Eisenmangel von den Bakterien aufgenommen werden (Arceneaux und Byers, 1980; Hu und Boyer, 1996).

Bei *Bacillus pumilus* (lat. *pumilus* = Zwerg) handelt es sich um ein sehr kleines, ebenfalls Gram-positives und sporenbildendes Bakterium. Es ist eines der Hauptbestandteile mariner Bakteriengesellschaften, wird aber auch häufig in Molkereiprodukten und anderen Lebensmitteln gefunden. Es weist eine hohe Resistenz gegenüber extremen Umweltbedingungen wie schlechter Nährstoffversorgung oder Belastungen durch Wasserstoffperoxid auf und scheidet unter anderem antibakterielle Substanzen aus (Parvathi et al., 2009; Seiler, 2010).

2.4 Aufnahme und Verteilung von endophytischen Bakterien in der Pflanze – Allgemeiner Überblick

Die Aufnahme von endophytischen Bakterien über das Wurzelsystem in die Pflanze wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Achari und Ramesh, 2014; Bacilio-Jiménez et al., 2001; Chi et al., 2005; Hurek et al., 1994; Lamb et al., 1996; Quadts-Hallmann und Kloepper, 1996; You et al., 1991). Durch das Ausscheiden von Wurzelexsudaten und den Austritt von Metaboliten aus verwundeten Stellen der Wurzel werden endophytische Bakterien im Boden von der Pflanze angelockt (Hallmann et al., 1997). Bei einigen Bakterien lösen organische Säuren aus den Exsudaten eine chemotaktische Reaktion aus (You et al., 1991). *Bacillus pumilus* und *Corynebacterium flavescentis*, beides aus Reis stammende Endophyten, zeigten eine deutliche Chemotaxis hin zu Reiswurzelexsudaten; im Gegensatz dazu zeigten zwei Kontrollbakterienstämme keine oder nur geringe Reaktionen (Bacilio-Jiménez et al., 2003). Nach Rosenblueth und Martínez-Romero (2006) können Pflanzen bestimmte Bakterien gezielt aus der Rhizosphäre selektieren; eine Analyse vor und nach Inokulation mit *Alcaligenes faecalis* in Reis ergab unterschiedliche Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe in den Wurzelexsudaten (You et al., 1991).

Für eine erfolgreiche Aufnahme und Verteilung in der Pflanze ist nach Reinhold-Hurek et al. (2006) eine effiziente Besiedelung der Wurzeloberfläche erforderlich. Dies verdeutlicht ein Versuch von Dörr et al. (1998): Eine *Azoarcus*-Mutante mit fehlenden Typ IV Pili war in der Kolonienbildung auf Reiswurzeloberflächen deutlich eingeschränkt und folglich an einer Ausbreitung in den Spross

gehindert. Das Anhaften kann auch durch die Produktion von Exopolysacchariden (Meneses et al., 2011) oder schleimigen Filamenten an der Wurzeloberfläche erfolgen, wie in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Besiedelung von *Azospirillum brasiliense* auf Reisswurzeln gezeigt wurde (Bacilio-Jiménez et al., 2001). Hohe Dichten an endophytischen Bakterien befinden sich auf der Wurzeloberfläche vor allem an natürlichen Öffnungen und Wunden, die hauptsächlich in der Wurzelstreckungs- und differenzierungszone auftreten, sowie an den Entstehungsorten der Lateralwurzeln und an Wurzelhaaren, unterhalb der schleimigen Wurzelhaube, in den Fugen zwischen epidermalen Zellen und unter deren zerstörter Oberfläche (Achari & Ramesh, 2014; Bacilio-Jiménez et al., 2001; Chi et al., 2005; Hallmann et al., 1997; Hurek et al., 1994; Quadt-Hallmann & Kloepper, 1996; Reinhold-Hurek et al., 2006; Vasse, 1995; You et al., 1991). Ein Eindringen in das Innere der Wurzel durch aktives Auflösen der epidermalen Zellwände mithilfe zellulolytischer und pektolytischer Enzyme ist von einigen Bakterien bekannt, wobei der Pflanze nicht geschadet wird (Hallmann et al., 1997; Hurek et al., 1994); ein Beispiel stellt der Endoglucanase bildende *Azoarcus* sp. Stamm dar, der die Abbauprodukte von Zellulose nachweislich nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann und Zellwände folglich nur begrenzt und lokal zur Besiedelung innerer Pflanzengewebe auflöst (Reinhold-Hurek et al., 2006).

Innerhalb der Wurzeln besiedeln endophytische Bakterien epidermale Zellen (Quadt-Hallmann & Kloepper, 1996), das Rindenparenchym (Mattos et al., 2008) und aerenchymatische Gewebe (Reinhold und Hurek, 1989). Sie konnten sowohl innerhalb von Zellen (Hurek et al., 1994) als auch in den Zellzwischenräumen (Hinton und Bacon, 1995; You et al., 1991) nachgewiesen werden. Eine weitere Verlagerung von den Wurzeln in die Leitgefäße erfordert die Überwindung der Endodermis, die eine wichtige Rolle als Barriere für die Nährstoffaufnahme in die Pflanze spielt. Eine Besiedelung der Endodermis konnte in mikroskopischen Aufnahmen von Compant et al. (2005) beobachtet werden. Nach Hallmann et al. (1997) kann das Durchdringen dieser Barriere durch Risse erfolgen, die beim Wurzelwachstum entstehen; einen Hinweis dafür lieferten Peterson et al. (1981), die einen apoplastischen Transport von fluoreszierenden Tracern in den Stängel nur in einem begrenzten Zeitraum nach Ausbildung der

Sekundärwurzeln in *Zea mays* und *Vicia faba* feststellen konnten. Desweiteren ist ein Transport der Bakterien über nicht vollständig ausdifferenzierte Endodermiszellen möglich.

Das Vorhandensein von endophytischen Bakterien in Xylemgefäßen konnte unter anderem in Luzerne (Gagné et al., 1987), Zitruspflanzen (Gardner et al., 1982), Weizen (Ruppel et al., 1992), Weinreben (Compant et al., 2005) sowie in Auberginen und Chili (Achari & Ramesh, 2014) bestätigt werden. Ein Eindringen findet auch hier möglicherweise durch die Degradation der Zellwände mithilfe von Endoglucanase statt (Reinhold-Hurek et al., 2006; Vasse, 1995). Ob sich die endophytischen Bakterien nach Eintritt in die Xylemgefäße dort ansiedeln und vermehren oder ob sie über den Stängel direkt in die Blätter weitertransportiert werden, ist noch unklar. Hallmann et al. (1997) gehen von einem direkten Transport aus, da eine Besiedelung der Gefäße zu Verklumpungen und damit zur Pathogenität der Bakterien führen können. In zahlreichen Studien konnten endophytische Bakterien neben Stängeln und Blättern in Früchten, Blüten und Samen gefunden werden (Compant et al., 2011). Übereinstimmend wird von deutlich höheren Bakteriendichten in den Wurzelgeweben gegenüber oberirdischen Pflanzengeweben berichtet (Lamb et al., 1996; Quadt-Hallmann & Kloepper, 1996).

Unterschiedliche Dampfdruckdefizite

Die Versuchspflanzen waren zwei unterschiedlichen Dampfdruckdefiziten (VPD = Vapour Pressure Deficit) ausgesetzt. Dabei handelt es sich um ein relatives Maß für die Luftfeuchtigkeit. Reispflanzen unter hohem VPD (VPD +) und einer damit verbundenen geringeren relativen Luftfeuchtigkeit haben eine um das 1,5 bis 2-fach höhere Transpirationsrate als Reispflanzen unter niedrigem VPD (VPD -) (Ku wagata et al., 2012). Es soll untersucht werden, ob die veränderte Transpirationsrate einen Einfluss auf die Aufnahme und Verteilung der Bakterien in den Pflanzen hat.

3 Material und Methoden

Der vorliegende Versuch wurde am Institut für Tropische Agrarwissenschaften (Hans-Ruthenberg-Institut) der Universität Hohenheim in Stuttgart und im zugehörigen Gewächshaus durchgeführt.

Der Versuchsaufbau bestand aus folgenden Faktoren: 2 Reissorten, 2 Luftfeuchtebedingungen, 3 Bakterienbehandlungen (Kontrolle und 2 Bakterienstämme) und das Verletzen bzw. Nichtverletzen der Wurzeln. Somit ergab sich eine Pflanzenzahl von 24 Pflanzen mit 3 Wiederholungen, von denen jeweils 9 Proben aus unterschiedlichen Geweben genommen wurden. Zusätzlich wurden von jeder Behandlung Blattabdrücke vorgenommen.

3.1 Pflanzenanzucht

Verwendet wurden zwei Reissorten: Die Sorte *IR 31785-58-1-2-3-3* (*IR 31*) stammt vom International Rice Research Institute (IRRI). *TOX 4004-8-1-2-3* (*TOX*) ist eine Sorte des International Institute for Tropical Agriculture (IITA). Die beiden Sorten unterscheiden sich in ihrer Toleranz gegenüber Eisenstress, *IR 31* reagiert äußerst sensitiv auf erhöhte Eisenwerte (2000 mg/L für 3 Tage) und zeigt eine starke Kupferfärbung der Blätter; *TOX* ist sehr tolerant und zeigt nur geringe Symptome (Asch et al., 2005). Die Keimung erfolgte bei 20 – 25 °C im Dunkeln, nach 11 Tagen wurden die Einzelpflanzen in das hydroponische System in 25 % Yoshida Nährlösung (Yoshida, 1976) umgesetzt, Eisen wurde als FeNa EDTA zugegeben. Die Konzentration der Nährlösung wurde nach 3 Tagen auf 50 % und weiteren 3 Tagen auf 100 % erhöht, ihr pH wurde durch Natriumhydroxid (1M NaOH, Roth, Deutschland) auf einen Wert von 5,5 eingestellt. Evapotranspirationsverluste wurden mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die hydroponische Kultur der Reispflanzen wurde gewählt, um eine einheitliche Nährstoffversorgung zu garantieren, Bodenmikroorganismen auszuschließen und die Inokulation mit den gewünschten Bakterienstämmen zu vereinfachen.

Das hydroponische System bestand pro Behandlung aus einer Kiste mit 5 L Fassungsvermögen (30 x 20 x 12 cm) (Auer Packaging, Deutschland), in die ein Röhrensystem aus 30 miteinander verschweißten Kunststoffröhren (9 cm lang, ca. 4 cm Durchmesser) herausnehmbar hängend eingepasst wurde (Abbildungen 2 und 3). Jede einzelne Pflanze wurde mithilfe von der Länge nach eingeschnittenen Schaumstoffzylindern (3 cm lang, 3,6 cm Durchmesser) (Ceaprenstopfen, 36 mm, Greiner Bioone, Deutschland) im Röhrensystem fixiert. 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.



Abbildung 2: Röhrensystem, in dem die Reispflanzen fixiert wurden.



Abbildung 3: Setzlinge im hydroponischen System.

3.2 Klimakammern

Eine Woche nach dem Umsetzen in das hydroponische System wurden die Pflanzen in die Klimakammern gestellt. Die Kammern bestehen aus einem Holzrahmen mit Plexiglaswänden. An ihrer Vorderseite sind Plastikplanen angebracht, die Zugang zu den Kammern ermöglichen (Abbildung 4a).

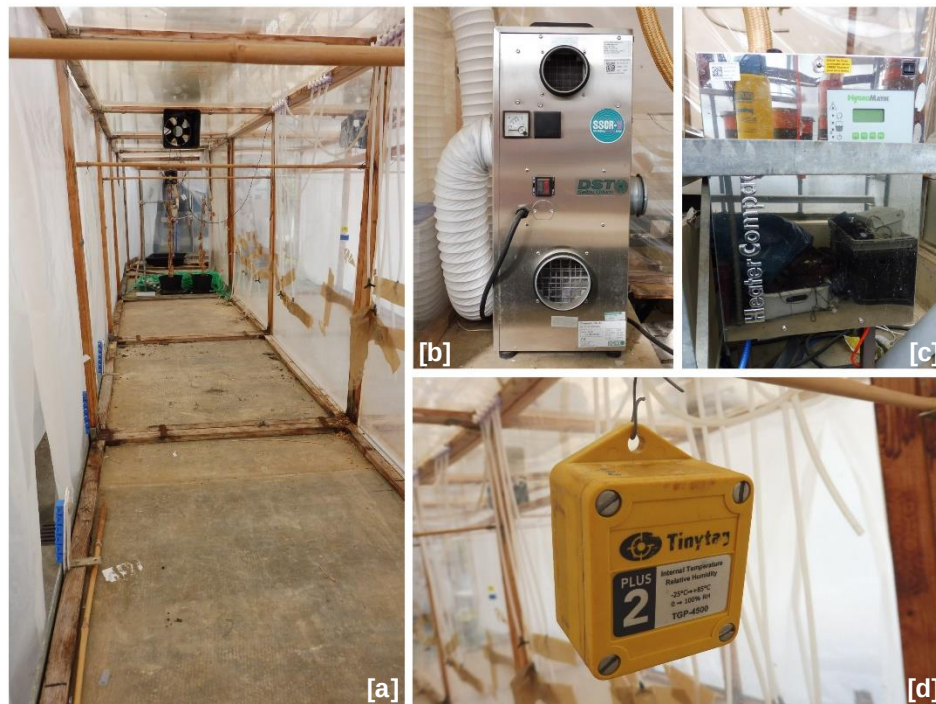


Abbildung 4: Aufbau der Klimakammern. [a] Leere Klimakammer; [b] Luftentfeuchter; [c] Dampfluftbefeuchter; [d] Temperatur- und Feuchte-Datenlogger.

Die durchschnittliche Temperatur beider Kammern lag über den Versuchszeitraum bei 30 °C. Die Kammer mit hohem VPD (VPD +) wurde mit einem Luftentfeuchter (Consoorb DC-10, Seibu Giken DST, Schweden) (Abbildung 4b) bei einer durchschnittlichen relativen Luftfeuchtigkeit von rund 41 % gehalten. In der Kammer mit niedrigem VPD (VPD -) wurde die Luft mit einem Dampfluftbefeuchter (Heater Compact Comfort, HygroMatik GmbH, Deutschland) (Abbildung 4c) auf durchschnittlich 88,5 % relative Luftfeuchtigkeit befeuchtet. Zur besseren Durchlüftung der Kammern war ein Axiallüfter der Größe 120 x 120 cm (Sunon KD1212PTS-6A, Sunonwealth Electric Machine Industry Co., Taiwan) jeweils an den beiden Seitenwänden sowie in der Mitte der Kammern an der Decke angebracht. Zur Erfassung von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit

wurde pro Kammer ein Temperatur- und Feuchte-Datenlogger (Tinytag TGP-4500, Gemini Data Loggers Ltd, United Kingdom) (Abbildung 4d) ca. 80 cm über dem Bestand befestigt, eine Messung erfolgte alle 15 Minuten. Die folgenden Abbildungen zeigen die Tagesmittel der Klimadaten im Zeitraum der Nutzung der Klimakammern (Abbildungen 5 und 6).

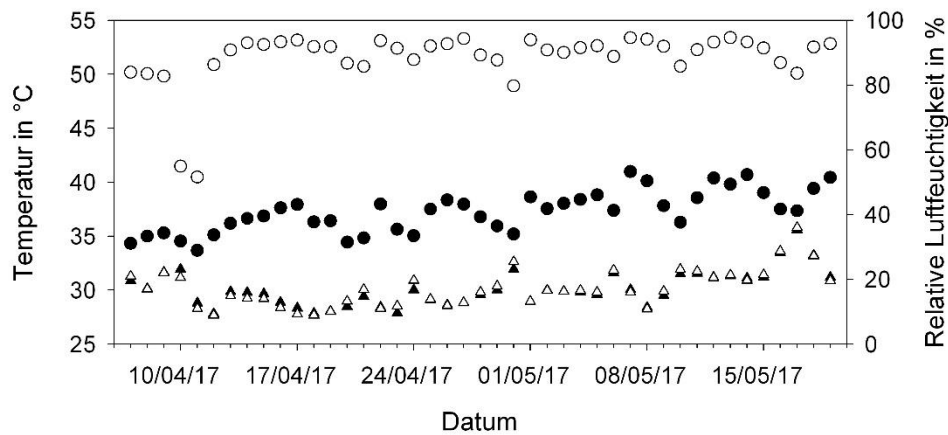


Abbildung 5: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind die Temperaturen bei hohem ($\blacktriangle$) bzw. niedrigem ($\triangle$) VPD sowie die relative Luftfeuchtigkeit bei hohem ($\bullet$) bzw. niedrigem ($\circ$) VPD.

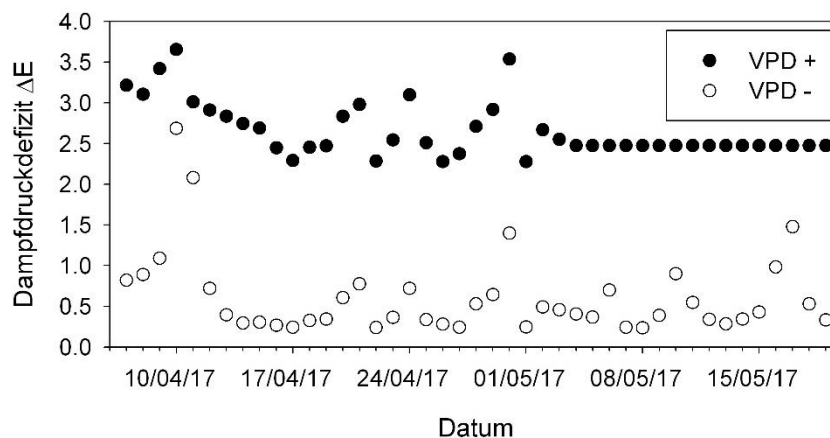


Abbildung 6: Klimatische Bedingungen in den Klimakammern über den Versuchszeitraum. Dargestellt ist der Unterschied der Dampfdruckdefizite (VPD) zwischen der Klimakammer mit hohem (+) und der mit niedrigem (-) VPD.

3.3 Kultivierung der Bakterien und Inokulation der Pflanzen

Herstellung des Nährmediums

Zur Kultivierung und zum Nachweis der Bakterienreinkulturen wurden Agar-Platten mit einem Nährmedium verwendet, das die gewünschten Kulturen optimal versorgt, so können die Kolonien zum Nachweis ohne großen Aufwand gezählt werden. Für die Agar-Platten wurden 5,6 g Agar-Agar (dänisch, pulv., Carl Roth GmbH & Co., Deutschland) und 12 g TSB (Tryptic Soy Broth, mikrobiologisch getestet, Fluka Analytical) in 400 ml Wasser gelöst und zur Sterilisation bei 121 °C für 20 min im Laborautoklaven (Systec DB-23, Systec GmbH, Deutschland) autoklaviert.

Nach Abkühlung des Nährmediums auf ca. 50°C wurde unter der Sterilbank (NordicSafe® Low Noise, Class II Biological Safety Cabinets, ESCO Micro Pte Ltd., Singapur) eine ca. 3 - 4 mm dicke Schicht in sterile Petrischalen gegossen. Zur Lagerung nach vollständiger Abkühlung wurden die Schalen mit Deckeln versehen und auf den Kopf gestellt, um die Bildung von Kondenswasser auf dem Nährmedium zu vermeiden.

Ansetzen der RINGER-Lösung

Für die RINGER-Lösung wurde eine Lösung aus Ringers solution ¼ strength tablets (FLUKA Analytics, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und sterilem demineralisiertem Wasser hergestellt. Dafür wurde in 500 ml Wasser je eine Tablette aufgelöst.

Herstellung der TSB-Lösung

Zur Flüssigkultur der Bakterien wurde 30 g TSB in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

Kultivierung und Inokulation

Die Bakterienstämme *Bacillus pumilus* D7.4 und *Bacillus megaterium* waren bei -80°C im Ultratiefkühlschrank (Fryka Kältetechnik, TS 80-100) zur Langzeitaufbewahrung eingefroren. Zur Kultivierung wurden sie mit einer sterilen Impföse auf Agar-Platten ausgestrichen und 24 h bei 28 °C im Inkubator inkubiert (TH 30, Edmund Bühler GmbH, Deutschland). Je nach Entwicklung der Kolonien nach 24 h wurden mithilfe steriler Impfösen 2-3 Abstriche in 50 ml flüssiges TSB-Medium umgeimpft und nochmals für 24 h bei 28 °C auf dem Schüttelinkubator (SM-30, Edmund Bühler GmbH, Deutschland) inkubiert.

Um für jede Behandlung der Versuchspflanzen die gleiche Menge an Bakterienkulturen zu erreichen, wurden die Bakterien zunächst für 20 min bei 4750 rpm (revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute) und 4 °C abzentrifugiert (Beckman Coulter, Allegra® X-i5R Centrifuge, Deutschland) und das Pellet in 50 ml RINGER-Lösung gelöst. Die optische Dichte der Bakterienlösung wurde mit einem Spektrophotometer (Infinite M200 Pro, TECAN, Schweiz) bestimmt, die Verdünnungsfaktoren berechnet und mit Ringer-Lösung verdünnt, sodass schließlich für jede Pflanzenkiste ca. 0,5 L RINGER-Lösung mit der gleichen Menge an Bakterien zur Verfügung standen.

Am 23. Tag nach der Aussaat wurden die Reiswurzeln mit den Bakterien inkubiert. Pro Pflanzenkiste wurden 0,5 L Bakterien in RINGER-Lösung und 3,5 L 100-Prozentige Nährlösung gemischt. Bei einer Hälfte der Reispflanzen wurden die Wurzelspitzen abgeschnitten (verletzt), die Wurzeln der anderen Hälfte wurden in ihrem Zustand belassen (unverletzt). Die Pflanzen wurden anschließend entsprechend markiert.

3.4 Versuchsaufbau

37 Tage nach Aussaat wurden die Versuchspflanzen im Labor auf die Verteilung der Bakterien untersucht. Drei Reispflanzen jeder Behandlung wurden unterteilt in die vier jüngsten vollentwickelten Blattspreiten L1, L2, L3, L4 (wenn vorhanden) sowie in die dazugehörigen Blattscheiden S2, S3, S4 (wenn vorhanden) und die Wurzeln. Die Wurzeln wurden in zwei gleich große Teile geteilt

und eine Hälfte in 70 % Ethanol (EtOH) und anschließend in demineralisiertes Wasser getaucht. Die Pflanzenteile wurden mit einer Schere kleingeschnitten und in verschraubbare Mikroröhrchen (2 mL, Sarstedt, Deutschland) mit 6 Precellys-Keramikkugeln 2,8 mm und 0,2 g Precellys-Keramikkugeln 1,4 mm überführt und das Gewicht der Pflanzenprobe notiert (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG, Schweiz).

Die Mikroröhrchen mit den Proben wurden anschließend mit jeweils 1000 µl RINGER-Lösung versetzt und mit dem Homogenisator (FastPrep®-24 *Classic* Instrument; QuickPrep™ 1 24 x 2 mL Adapter, MP Biomedicals) für eine Minute bei 6 rpm geschüttelt. Dabei wurden die Zellen mithilfe der Keramik-Kugeln zerstört und ihr Inhalt freigegeben. Die Proben wurden anschließend für 3 min bei 8000 rpm abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Deutschland), aus dem Überstand wurden unter der Sterilbank je 200 µl auf eine Agar-Platte gegeben und mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Die Proben der ungewaschenen Wurzeln aus den Versuchspflanzen, die mit Bakterien behandelt wurden, wurden mit einer Verdünnung von 1:10 mit RINGER-Lösung verdünnt, da eine hohe Anzahl an Bakterien erwartet wurde und das Auszählen der Bakterien bei einer unverdünnten Probe schwierig gewesen wäre.

Die Agar-Platten wurden mit Parafilm verschlossen und auf dem Deckel stehend bei 28°C über Nacht inkubiert. Innerhalb dieser Zeit konnten die Bakterienkulturen zu einer ausreichenden Größe heranwachsen, damit sie am darauffolgenden Tag ausgezählt werden konnten. Dazu wurde mithilfe eines Permanentmarkers jede sichtbare Kultur markiert und dabei gezählt, die Ergebnisse wurden dokumentiert.

Durch Blattabdrücke auf Agar-Platten wurde das Vorkommen der Bakterienkulturen an der Außenseite der Blätter untersucht. Dazu wurden von jeweils einer Pflanze jeder Behandlung die drei jüngsten vollentwickelten Blattspreiten abgetrennt und ihre Ober- und Unterseiten unter der Sterilbank auf die Agar-Platten gedrückt. Die Blätter selbst wurden anschließend wieder entfernt, die verschlossenen Agar-Platten bei 28 °C über Nacht inkubiert und die gewachsenen Kulturen ausgezählt.

Um das verwendete Saatgut auf bereits vorhandene Bakterien zu untersuchen, wurden einige trockene und einige über Nacht eingeweichte Reissamen zerschnitten, auf die Agarplatten gedrückt und bei 28 °C über Nacht inkubiert.

3.5 Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden alle dokumentierten Daten in Microsoft Excel 2013 erfasst. Da die Proben unterschiedliche Gewichte hatten und die gezählten Bakterienkolonien für sich nicht aussagekräftig waren, wurde die Anzahl der Kolonien auf 1 g Frischgewicht (FG) der Blattmasse umgerechnet. Für die Mittelwerte der drei Wiederholungen wurde jeweils der Standardfehler berechnet und in die Grafiken eingefügt. Da die Wiederholungen zusammen in denselben Pflanzenkisten gewachsen sind, handelt es sich nicht um echte Wiederholungen, sondern um Pseudo-Replikationen.

Alle Grafiken wurden mit dem Programm SigmaPlot (Version 10, Systat Software GmbH) erstellt. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde in Microsoft Excel 2013 ein Zweistichproben t-Test unter Annahme gleicher Varianzen durchgeführt ($\alpha = 0,05$).

4 Ergebnisse

In allen Proben der Wurzeln sowie in einigen Proben der oberirdischen Pflanzenorgane konnten in beiden untersuchten Reissorten Bakterien der zuvor inkulierten Stämme nachgewiesen werden. Die Kolonienzahlen in den Wurzeln waren deutlich höher als in den Blattscheiden und Blattspreiten. Starke Unterschiede zwischen den Behandlungen und auch innerhalb der Wiederholungen führten teilweise zu hohen Standardfehlern. Auch an einigen Abdrücken der Blattaußenseiten sind Bakterienkulturen gewachsen. Im Saatgut von *IR 31* und *TOX* konnten Bakterienstämme festgestellt werden, diese wurden jedoch nicht identifiziert.

4.1 Aufnahme der Bakterien in die Wurzeln

In den Wurzelproben aller Behandlungen konnten die zuvor inkubierten Bakterien nachgewiesen werden.

Sortenunterschiede

Ein Vergleich der beiden verwendeten Reissorten zeigt Unterschiede in der Anzahl der Bakterienstämme in den Wurzeln (Abbildung 7). Bei *IR 31* waren unter beiden Luftfeuchtebedingungen höhere Kolonienzahlen von *B. megaterium* in den Wurzeln vorhanden als von *B. pumilus*. Die Sorte *TOX* enthielt in den Wurzeln bei hohem VPD von beiden inkubierten Bakterienstämmen ähnlich viele Kolonien, bei niedrigem VPD wurde *B. megaterium* nur geringfügig aufgenommen. Unterschiede in der Aufnahme zwischen Pflanzen mit verletzten und unverletzten Wurzeln konnten nicht festgestellt werden. Die hohen Abweichungen innerhalb der Wiederholungen ergaben bei einigen Behandlungen hohe Standardfehler. Signifikante Sortenunterschiede ließen sich bei hohem VPD zwischen den mit *B. pumilus* inkubierten Pflanzen ohne zuvor angeschnittene Wur-

zeln ($P = 0,00247$) sowie bei niedrigem VPD jeweils in den Pflanzen mit angeschnittenen Wurzeln (*B. megaterium*: $P = 0,02900$; *B. pumilus*: $P = 0,03937$) feststellen.

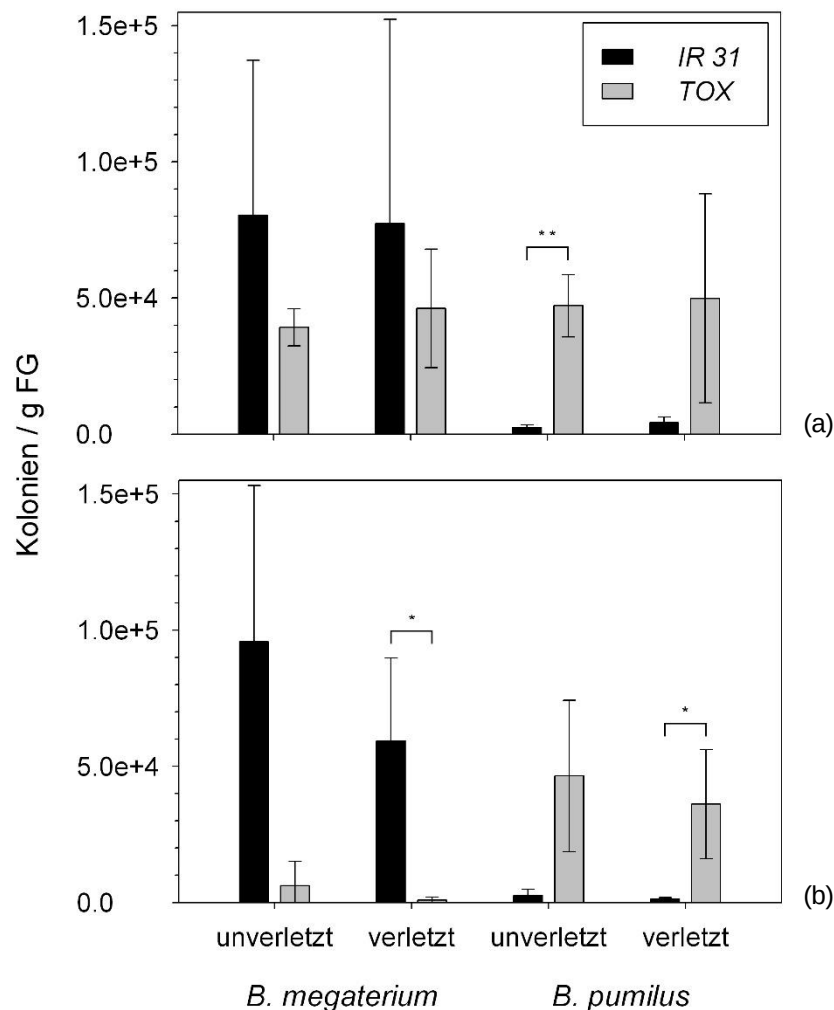


Abbildung 7: Anzahl der Bakterienkulturen der jeweiligen Bakterienstämme in den Reissorten *IR 31* und *TOX* in den oberflächendesinfizierten Wurzeln pro g FG unter (a) hohem VPD bzw. (b) niedrigem VPD. Auf der x-Achse wird zwischen den unverletzten und verletzten Wurzeln unterschieden. Berechnet wurden jeweils die Mittelwerte der drei Wiederholungen. * = signifikanter Unterschied; ** = hoch signifikanter Unterschied.

Die Relationen zwischen den Kolonienzahlen der nicht desinfizierten und der oberflächendesinfizierten Wurzeln (Abbildung 8) sind bei *B. megaterium* innerhalb der beiden Reissorten ähnlich hoch und liegen im Schnitt bei 3,0 (*IR 31*) und 4,2 (*TOX*). *TOX* wies nach Inokulation mit *B. megaterium* bei niedrigem VPD und verletzten Wurzeln eine signifikant höhere Relation auf als *IR 31* ($P =$

0,02447). Bei *IR 31* liegen die Mittelwerte der mit *B. pumilus* inokulierten Pflanzen bei über 10, bei *TOX* sind diese deutlich niedriger. Ein hoch signifikanter Unterschied ließ sich hier zwischen den beiden Reissorten bei hohem VPD und unverletzten Wurzeln feststellen ($P = 0,00268$). Bei *TOX* waren die Werte für *B. pumilus* bei niedrigem VPD höher als bei hohem VPD. Dieser Unterschied ist in der Behandlung mit verletzten Wurzeln signifikant ($P = 0,03001$).

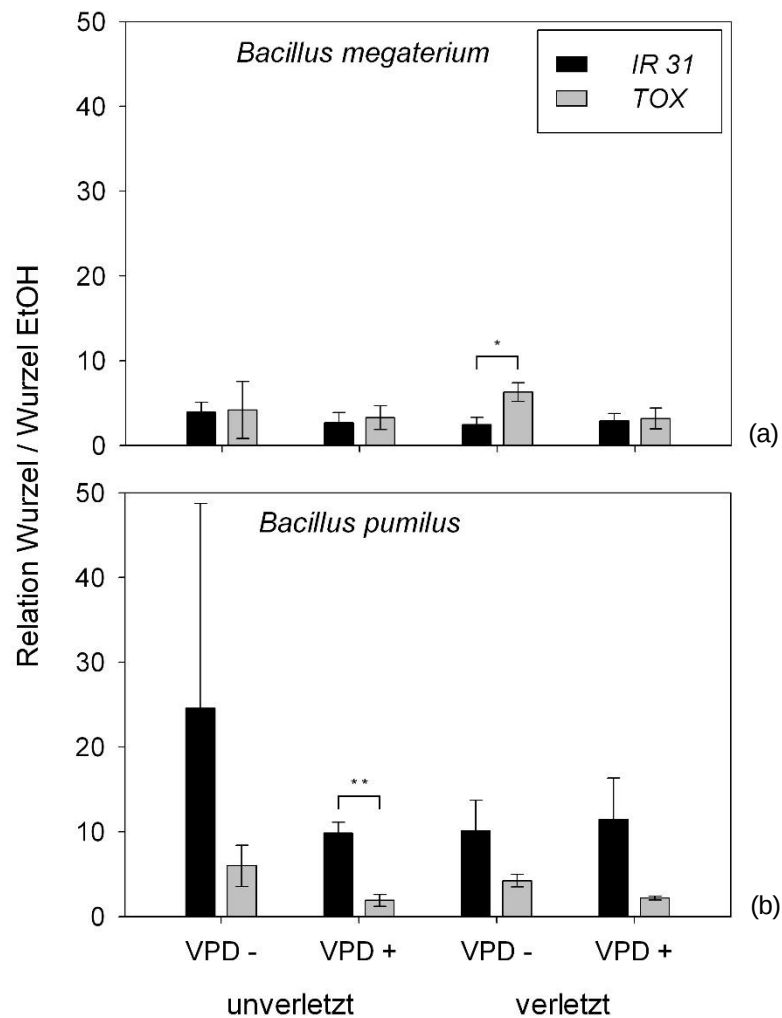


Abbildung 8: Relation zwischen der Kolonienzahl an und in den Wurzeln gesamt (Wurzel) und der Kolonienzahl innerhalb der oberflächendesinfizierten Wurzeln (Wurzel EtOH) nach Inokulation der zwei Reissorten *IR 31* und *TOX* mit (a) *B. megaterium* und (b) *B. pumilus* nach Verletzen bzw. Nichtverletzen der Wurzeln unter niedrigem (-) bzw. hohem (+) VPD. * = signifikanter Unterschied; ** = hoch signifikanter Unterschied.

4.2 Aufnahme der Bakterien in oberirdische Pflanzenorgane

In einigen Proben konnten keine Bakterien nachgewiesen werden, weshalb die Auswertung der Kolonienzahlen in den oberirdischen Pflanzenorganen sehr diverse Ergebnisse lieferte, auch innerhalb der Wiederholungen. Tabelle 1 zeigt den Prozentsatz an Proben der Blattscheiden und Blattspreiten, in welchen Bakterien vorgekommen sind. In über der Hälfte aller Proben sind keine Bakterienkolonien auf den Agarplatten gewachsen. Innerhalb der Wiederholungen waren in 53 % der Fälle ein oder zwei Proben ohne Befund, wodurch teilweise hohe Standardfehler entstanden sind. Negative Befunde traten vor allem bei TOX und der Inokulation mit *B. pumilus* auf.

			Blattspreite		Blattscheide	
			B. megaterium	B. pumilus	B. megaterium	B. pumilus
IR 31	uv	-	75.00	8.33	100.00	11.11
		+	58.33	55.56	100.00	66.67
	v	-	83.33	36.36	88.89	25.00
		+	66.67	30.00	66.67	14.29
TOX	uv	-	50.00	41.67	14.29	55.56
		+	33.33	41.67	33.33	33.33
	v	-	0.00	100.00	0.00	100.00
		+	33.33	54.55	44.44	37.50

Tabelle 1: Anteil der Proben an der Gesamtprobenzahl der einzelnen Behandlungen, in denen Bakterien nachgewiesen werden konnten. uv = unverletzte Wurzeln; v = verletzte Wurzeln; „-“ = niedriges Dampfdruckdefizit; „+“ = hohes Dampfdruckdefizit.

Vergleich aller Behandlungen

Um die Kolonienzahlen der Bakterien in den oberirdischen Pflanzenorganen darzustellen, wurden die Mittelwerte der Wiederholungen für jede Blattscheide und Blattspreite in der folgenden Grafik logarithmiert (Abbildung 9). Bakterienkolonien wurden nach Inokulation von IR 31 mit *B. megaterium* in fast allen Blättern nachgewiesen. Eine durchgehend hohe Anzahl an Kolonien wurde in TOX bei geringem VPD nach Inokulation mit *B. pumilus* festgestellt, die Mittelwerte liegen hier zwischen 760 und 3400 Kolonien / g FG. Alle anderen Behandlungen wiesen fehlende Werte oder nur geringe Mittelwerte von meist 20 bis 80 Kolonien / g FG auf.

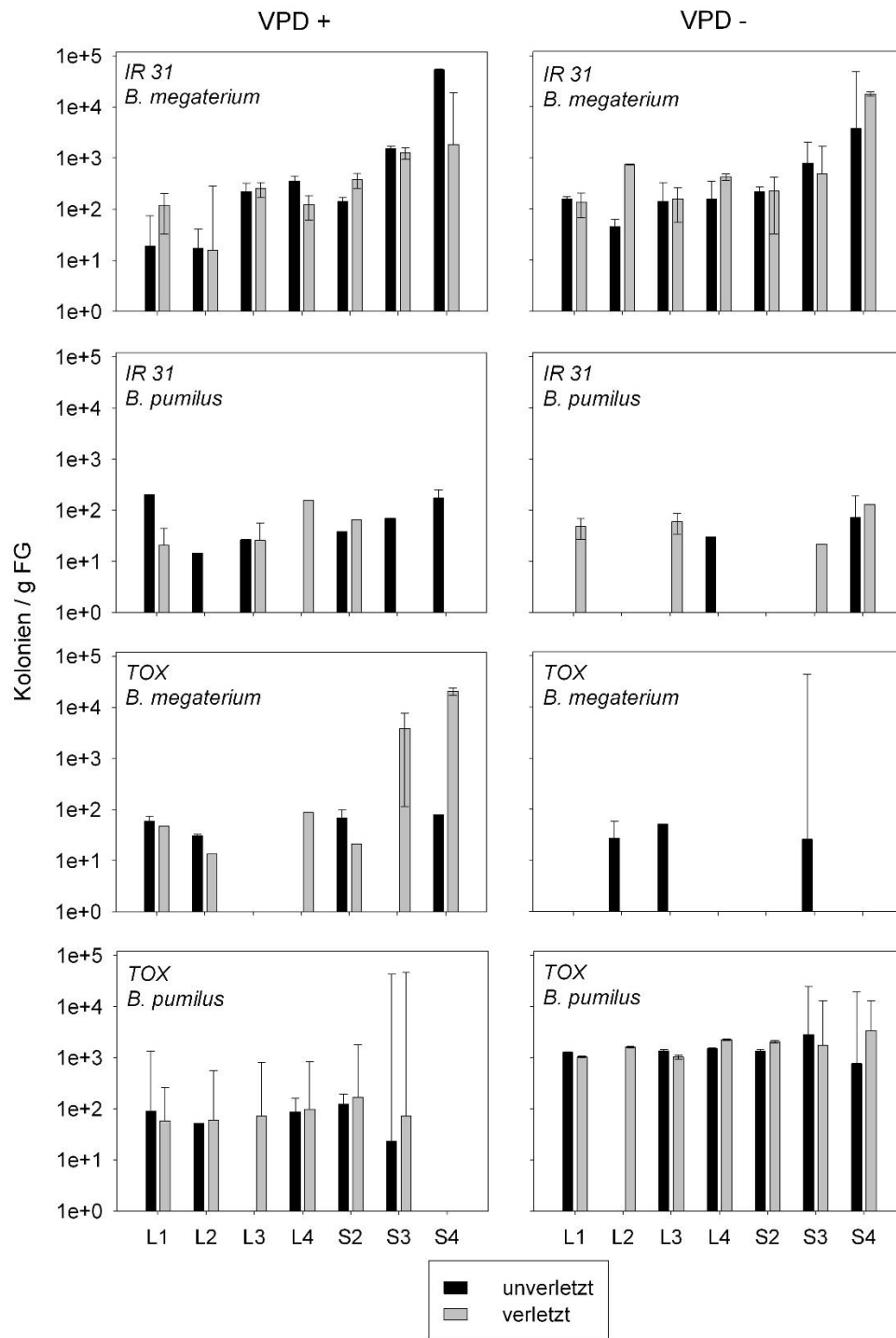


Abbildung 9: Logarithmierte Darstellung der Mittelwerte der Bakterienkolonien pro g FG in den Blattspreiten der vier Altersstufen (L1 - L4) und in den zugehörigen Blattscheiden (S2 - S4) für alle Reissorten und Bakterienstämme. Verglichen wurde zwischen unverletzten und verletzten Wurzeln. In der linken Spalte befinden sich die Ergebnisse unter hohem VPD (VPD +) und in der rechten Spalte die unter niedrigem VPD (-).

Bakterien an den Außenseiten der Blätter

Die Abdrücke der Blattaußenseiten lieferten vor allem bei *IR 31* in Kombination mit *B. megaterium* sowie bei *TOX* mit *B. pumilus* viele positive Ergebnisse, wie in Tabelle 2 zu sehen ist. Die wenigsten Nachweise wurden an den Blattspreiten von *TOX* nach Inokulation mit *B. megaterium* erbracht.

Sorte	Bakterienstamm	Wurzeln	VPD	L1	L2	L3
IR 31	B. megaterium	uv	-	6	1	3
			+		1	2
		v	-	4	3	3
			+	1	3	19
	B. pumilus	uv	-		2	3
			+		1	3
		v	-	1	3	
			+			2
TOX	B. megaterium	uv	-		1	
			+	1	2	
		v	-			
			+			
	B. pumilus	uv	-	8	10	9
			+	2	15	12
		v	-	6	6	17
			+	5	6	10

Tabelle 2: Anzahl der gezählten Bakterienkolonien auf den Abdrücken der Blattspreiten beider Reissorten mit jeweils unverletzten (uv) und verletzten (v) Wurzeln und beider Bakterienstämme unter niedrigem (-) und hohem (+) VPD. Beprobte wurden das jüngste (L1), zweitjüngste (L2) und drittjüngste (L3) vollentwickelte Blatt jeder Pflanze. Die Werte haben keinen Bezug auf die Blattfläche.

Bakterien innerhalb der Blätter

Nur in der Kombination von *IR 31* mit *B. megaterium* konnten ausreichend viele Daten erfasst werden, um eine vollständige und aussagekräftige Darstellung der Verhältnisse zwischen den Kolonienzahlen der Blattscheiden und Blattspreiten zu erreichen. Aus der logarithmierten Darstellung der Verhältnisse in den einzelnen Wiederholungen (Abbildung 10) ist zu sehen, dass in allen Pflanzen mit verletzten Wurzeln Kolonien von *B. megaterium* in den Blattscheiden

nachgewiesen werden konnten. Die Kolonienzahlen waren stets höher als in den Blattspreiten. In den Pflanzen mit verletzten Wurzeln waren zum Teil mehr Bakterienkolonien in den Blattspreiten. Je eine Wiederholung bei hohem und eine bei niedrigem VPD wiesen Bakterienkolonien ausschließlich in den Proben der Blattspreiten auf. In den Proben von zwei Einzelpflanzen konnten keine Bakterien nachgewiesen werden (Wurzeln unverletzt, hohes VPD, Blatt 2 und 4 der 3. Wiederholung).

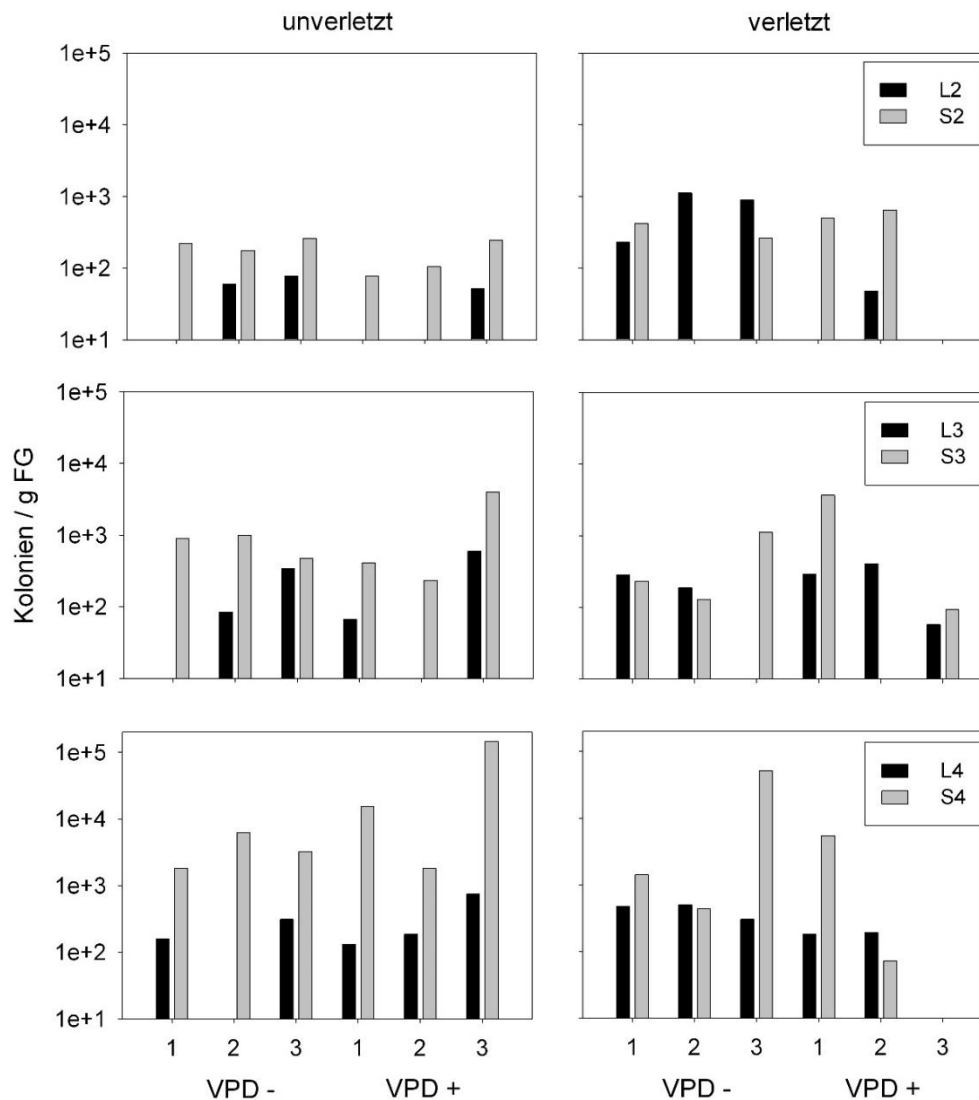


Abbildung 10: Logarithmierte Darstellung der Verhältnisse der Kolonienzahlen von *B. megaterium* pro g FG zwischen Blattscheide (S) und Blattspreite (L) der verschiedenen Altersstufen jeder einzelnen Wiederholung in *IR 31*. Auf der x-Achse sind jeweils die drei Wiederholungen (1, 2, 3) unter niedrigem (-) und hohem (+) VPD gezeigt. In der linken bzw. rechten Spalte befinden sich die Ergebnisse der Pflanzen mit unverletzten bzw. verletzten Wurzeln.

Weitere Unterschiede konnten zwischen den Altersstufen der Blätter festgestellt werden. Wie Abbildung 11 zeigt, wurden in den jeweils älteren Blattscheiden in allen Behandlungen im Mittel mehr Bakterien gefunden als in den jüngeren Blattscheiden (a). Dieser Trend konnte in den Blattspreiten nur teilweise festgestellt werden (b).

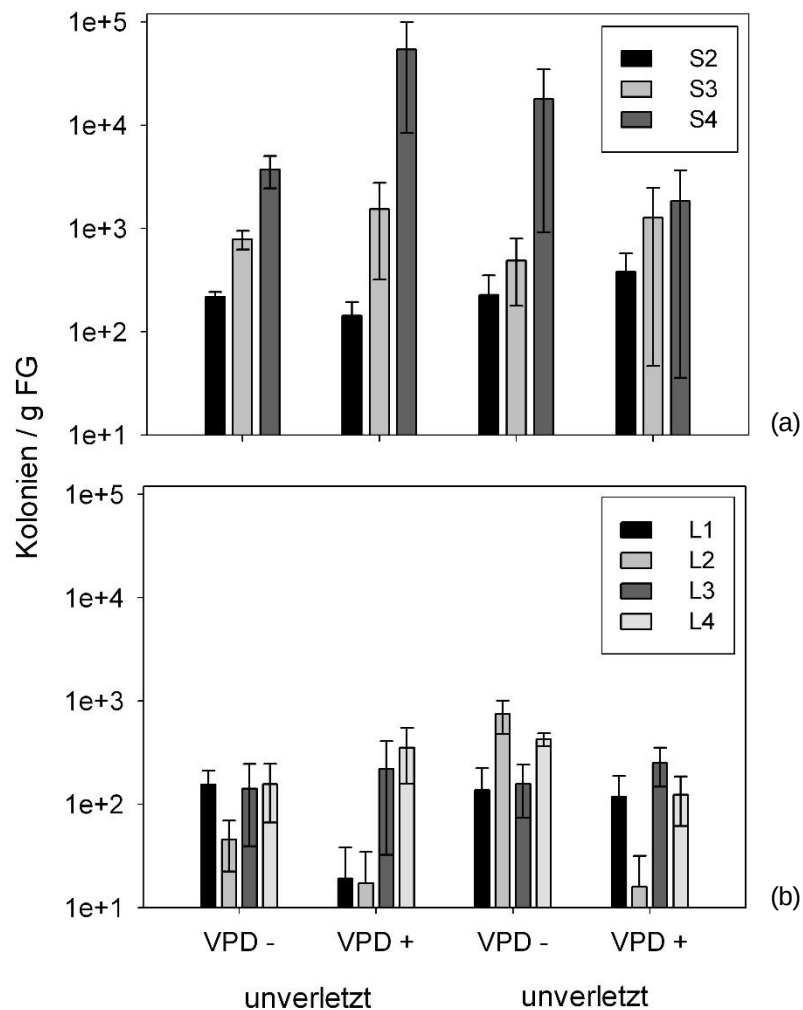


Abbildung 11: Logarithmierte Darstellung der Mittelwerte der Kolonienzahlen pro g FG in den Blattscheiden der Altersstufen 2-4 (a) und Blattspreiten der Altersstufen 1-4 (b) von *IR 31* nach Inokulation mit *B. megaterium* unter niedrigem (-) bzw. hohem (+) VPD.

Ein Vergleich der Mittelwerte zwischen den Kolonienzahlen der Blattscheiden und Blattspreiten ist in Abbildung 12 für die Sorte *IR 31* dargestellt. Auch hier sieht man, dass die Kolonien von *B. megaterium* häufiger in den Blattscheiden vorkommen (a). Bei *B. pumilus* sind nur in wenigen Proben Bakterien gewach-

sen, die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen Blattscheiden und Blattspreiten sind deutlich geringer. Ein Vergleich der Bakterienstämme in *IR 31* zeigt in allen Behandlungen höhere Kolonienzahlen bei *B. megaterium* als bei *B. pumilus* (b).

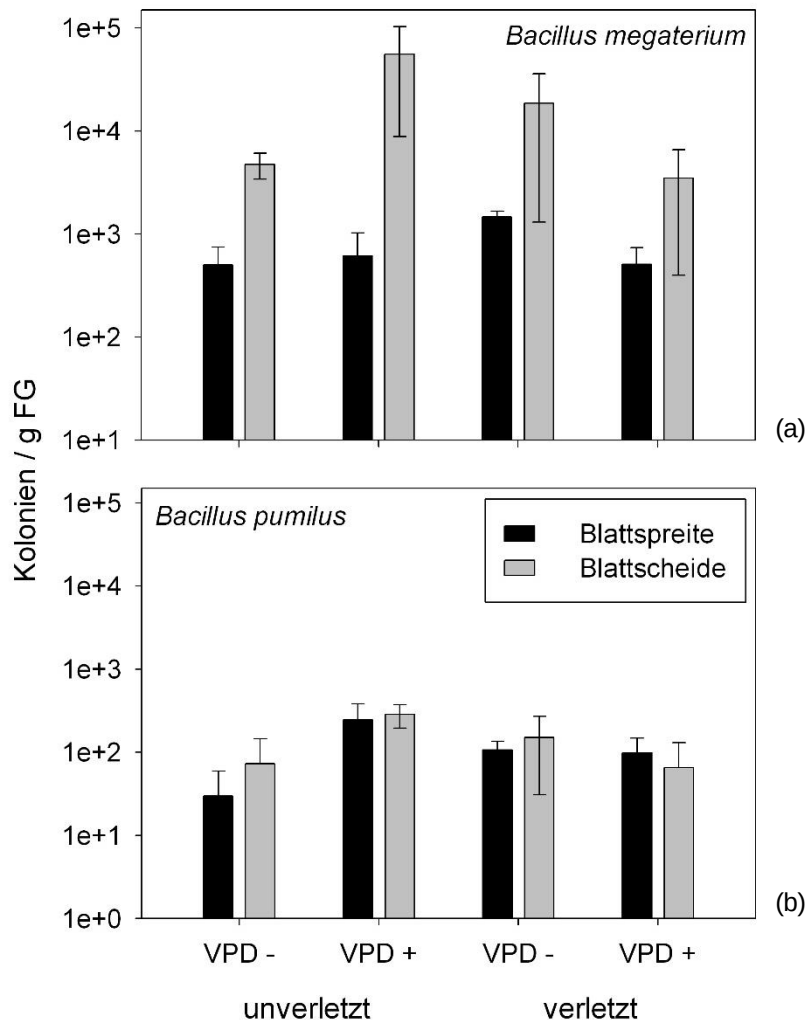


Abbildung 12: Logarithmierte Darstellung der Mittelwerte der Kolonienzahlen pro g FG in den Blattspreiten und Blattscheiden von *IR 31* unter niedrigem (-) bzw. hohem (+) VPD nach Inokulation mit *B. megaterium* (a) und *B. pumilus* (b) und dem Verletzen bzw. Nichtverletzen der Wurzeln.

In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die prozentuale Verteilung von *B. megaterium* in die Blattspreiten von *IR 31* höher ist, wenn die Reiswurzeln vor der Inokulation verletzt wurden. In diesem Fall waren über 50 % der gezählten Bakterienkulturen der Blätter in den Blattspreiten. In den Pflanzen mit unverletzten Wurzeln waren die Bakterien bei beiden Luftfeuchtebedingungen größtenteils in den Blattscheiden.

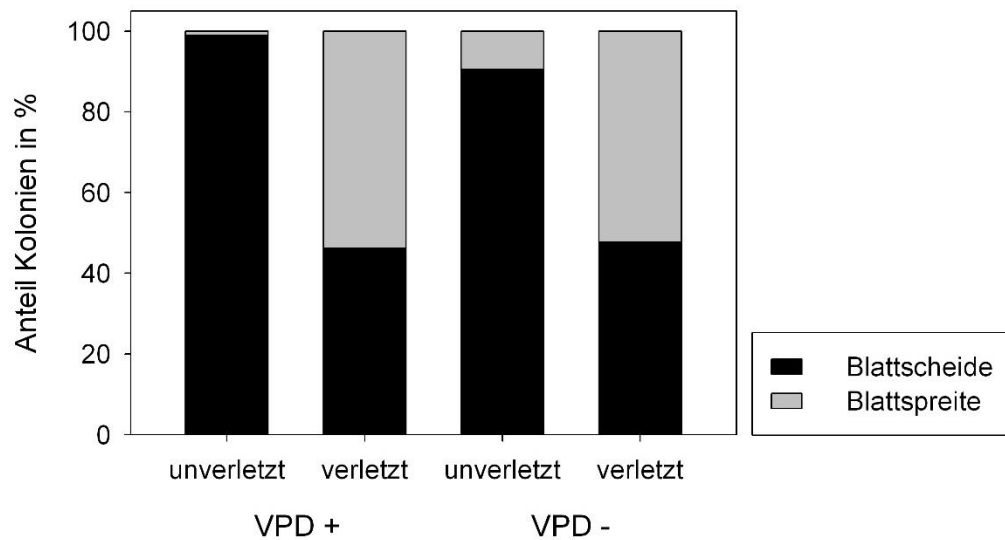


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Bakterienkolonien in den Blattscheiden und Blattspreiten von *IR 31* nach Inokulation mit *B. megaterium* in den Pflanzen mit unverletzten und verletzten Wurzeln unter hohem (+) bzw. niedrigem (-) VPD.

Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen und Wurzeln

Abbildung 14 zeigt das Verhältnis zwischen den Mittelwerten der Kolonienzahlen in den oberirdischen Pflanzenorganen (O) insgesamt zu denen innerhalb der Wurzeln (W). Die Mittelwerte sind alle kleiner als 1, es wurden somit in allen Behandlungen mehr Bakterien in den Wurzeln gefunden als in den oberirdischen Pflanzenorganen. Bei *IR 31* sind die Werte höher bei hohem VPD in Kombination mit unverletzten Wurzeln sowie bei geringem VPD und verletzten Wurzeln. Dies gilt für beide Bakterienstämme, die Werte für *B. megaterium* sind etwas größer. Bei *TOX* liegt ein hohes Verhältnis in zwei Kombinationen vor: Bei *B. megaterium*, hohem VPD und verletzten Wurzeln (Relation $OW = 0,72$) sowie bei *B. pumilus*, niedrigem VPD und verletzten Wurzeln (Relation $OW = 0,47$).

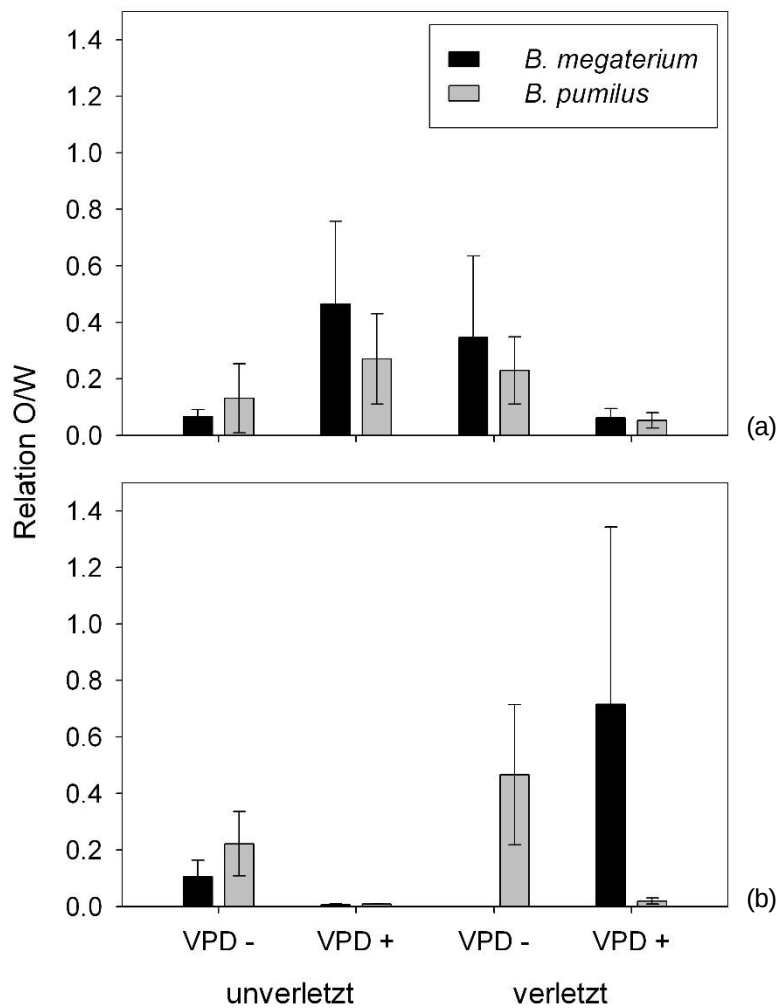


Abbildung 14: Relation zwischen der Gesamtkolonienzahl der zwei Bakterienstämme in den oberirdischen Pflanzenorganen (O) und der Kolonienzahl in den Wurzeln (W) von *IR 31* (a) und *TOX* (b) bei niedrigem (-) bzw. hohem (+) VPD nach Verletzen bzw. Nichtverletzen der Wurzeln.

4.3 Bakterien im Saatgut

Bei der Untersuchung des Saatgutes von *IR 31* und *TOX* auf Bakterien konnte nach Andrücken der zum Teil aufgeschnittenen Samen auf die Agarplatten ein Wachstum verschiedener Bakterienkulturen festgestellt werden. Die gefundenen Bakterien wurden nicht weiter identifiziert.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob *B. megaterium* und *B. pumilus* als endophytische Bakterien in den inneren Geweben von Reispflanzen nachgewiesen werden können und wie sie sich innerhalb der Pflanzen verteilen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen den Reissorten *IR 31* und *TOX* gibt und ob ein verändertes Dampfdruckdefizit oder das Verletzen der Reiswurzeln bei der Inokulation einen Einfluss auf die Aufnahme oder die Verteilung der Bakterien haben.

5.1 Aufnahme der Bakterien in die Wurzeln

In allen Proben, die aus den Wurzeln der zwei Reissorten gewonnen wurden, konnten die jeweils zugeführten Bakterienstämme nachgewiesen werden. Auch in den zuvor in Ethanol gewaschenen Wurzeln waren Bakterien enthalten. Von einer vollständigen Desinfektion der Wurzeloberfläche kann man nicht sicher ausgehen, jedoch wurden in fast allen Proben der oberflächendesinfizierten Wurzeln weniger Bakterienkulturen gezählt als in den Proben der nicht desinfizierten Wurzeln.

Unterschiede in der Aufnahme der Bakterienstämme zwischen den Reissorten zeigen sich in den Ergebnissen in Abbildung 7. Die Bakterienstämme unterscheiden sich in ihrer Größe und Beweglichkeit voneinander, weshalb eine unterschiedliche Aufnahme und Verteilung in der Reispflanze denkbar ist: *B. pumilus* ist kleiner und beweglicher als *B. megaterium* (Seiler, 2010). In *IR 31* wurde *B. megaterium* jedoch unter beiden Luftfeuchtebedingungen stärker in die Wurzeln aufgenommen als *B. pumilus*. In *TOX* war die Aufnahme der beiden Bakterienstämme unter hohem VPD ähnlich hoch. Unter geringem VPD waren die Kolonienzahlen von *B. pumilus* höher als von *B. megaterium*. Die Annahme, *B. pumilus* könne durch seine geringere Größe generell besser in die Wurzeln aufgenommen werden, konnte nicht bestätigt werden.

Eine erfolgreiche Besiedelung der Wurzeloberfläche ist vermutlich ein wichtiger Faktor, um in die Wurzeln der Reispflanzen einzudringen (Reinhold-Hurek et

al., 2006). Die Wurzelepidermis stellt eine Barriere dar, die von den Bakterien überwunden werden muss, um in die inneren Gewebe zu gelangen. Von einigen endophytischen Bakterienstämmen ist bekannt, dass sie die epidermalen Zellwände durch hydrolytische Enzyme wie Zellulasen oder Pektinasen zersetzen und so in die Wurzeln eindringen können (Hallmann et al., 1997). Die Exkretion zellulolytischer Enzyme konnte in Bakterienstämmen von *Azoarcus* spp. nachgewiesen werden, die in die Wurzeln von Gräsern eindringen können (Reinhold-Hurek et al., 1993). Bacilio-Jiménez et al. (2001) konnten in ihrer Studie zeigen, dass *B. pumilus* als endophytisches Bakterium in Reis vorkommt. Die Bakterien haben sich vor allem an Rissen und Wunden der Wurzeln angesiedelt und könnten durch sie auch in die inneren Gewebe eingedrungen sein. Dies führt zur Annahme, dass nach dem Abschneiden der Wurzelspitzen vor der Inokulation mit den Bakterien eine erhöhte Aufnahme in die inneren Gewebe stattfindet. Ein solches Ergebnis konnte jedoch nicht gefunden werden, da in den zuvor verletzten Wurzeln keine höheren Kolonienzahlen festgestellt wurden als in den unverletzten Wurzeln (Abbildung 7). Es wäre interessant zu wissen, ob es tatsächlich keine Unterschiede in der Aufnahme gab oder ob sich die Anzahl der Kolonien in der Pflanze in den Tagen nach der Inokulation reguliert hat.

Die Aufnahme der Bakterien könnte auch weniger von einer erfolgreichen Überwindung der Barrieren abhängen als beispielsweise von einem passiven Transport mit dem Transpirationsstrom. Dafür spricht die erhöhte Aufnahme von *B. megaterium* in *TOX* bei hohem VPD, da die Reispflanzen unter diesen Luftfeuchtebedingungen stärker transpirieren. Gegen diese Vermutung spricht die hohe Aufnahme von *B. megaterium* bei geringem VPD in *IR 31*. Die Ursache dafür kann in einer allgemein höheren Transpirationsrate der Sorte *IR 31* liegen.

Es ergaben sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den Sorten oder Luftfeuchtebedingungen. Dies liegt vermutlich an den hohen Standardfehlern der einzelnen Behandlungen. Um diese zu minimieren, ist eine höhere Anzahl an Wiederholungen notwendig, was durch den hohen Arbeitsaufwand schwierig umzusetzen ist. Da trotz der hohen Standardfehler in drei Behandlungen signifikante Unterschiede in der Bakterienaufnahme zwischen den Reissorten gefunden wurden, besteht die Möglichkeit, dass es bei ähnlichen Ergebnissen mit

einer höheren Anzahl an Wiederholungen und geringeren Standardfehlern zu einer höheren Anzahl an signifikanten Ergebnissen kommt.

Relationen innerhalb der Wurzeln

Je geringer die Relation zwischen der Kolonienzahl der nicht desinfizierten und der oberflächendesinfizierten Wurzeln, desto mehr Bakterien wurden vermutlich in die Wurzeln aufgenommen (Abbildung 8). Nach Inokulation mit *B. megaterium* ist diese Relation in *IR 31* etwas geringer als in *TOX*. Bei *B. pumilus* ist es anders herum, hier zeigen sich niedrigere Werte und somit eine höhere Aufnahme bei *TOX*. Innerhalb der Sorte *TOX* sind die Werte bei hohem VPD geringer als bei niedrigem VPD, in der Behandlung mit abgeschnittenen Wurzeln ist dieser Unterschied signifikant. Trifft die Annahme zu, dass *B. pumilus* bei hohem VPD besser in die Wurzeln aufgenommen wird, so kann dieses Ergebnis für einen Transport über den Transpirationsstrom sprechen.

Die Unterschiede in der Relation geben nicht nur Aufschluss über die Aufnahme der Bakterien in die Wurzeln, sie können ebenso gut ein Hinweis dafür sein, wie erfolgreich die Bakterienbesiedelung auf der Wurzeloberfläche oder wie hoch die Bakteriendichte außerhalb der Wurzeln in der Nährlösung war. Diese wurde am Ende des Versuches nicht untersucht, was eine genaue Aussage über die Aufnahme der Bakterien erschwert.

5.2 Aufnahme von Bakterien in oberirdische Pflanzenorgane

Die Auswertung der oberirdischen Pflanzenorgane ergab äußerst diverse Ergebnisse, auch innerhalb der Wiederholungen. Dies erschwerte eine klare und aussagekräftige Ergebnisdarstellung. Pro Behandlung gab es nur drei Wiederholungen, in etwa der Hälfte aller Fälle wurden in ein oder zwei Wiederholungen keine Bakterien gefunden (Tabelle 1). Die Berechnung des Mittelwertes dieser drei Wiederholungen führte deshalb zu hohen Standardfehlern. Eine hohe An-

zahl an Proben von *IR 31* in Kombination mit *B. megaterium* beinhalteten Bakterien, weshalb vor allem mit diesen Ergebnissen weitere Vergleiche durchgeführt wurden.

Verteilung der Bakterien in den oberirdischen Pflanzenorganen

Die Werte in Abbildung 9 wurden logarithmisch dargestellt. Mit einer linearen Skala wären die Größenunterschiede zwar besser zu erkennen, diese sind jedoch zu groß für eine anschauliche Darstellung. Die Werte zur Verteilung der Bakterien in die Blattscheiden und Blattspreiten lieferten hauptsächlich bei *IR 31* in Kombination mit *B. megaterium* ausreichend viele Ergebnisse zur Interpretation. Auch für *TOX / B. pumilus* unter hohem VPD sind für die meisten Blätter Ergebnisse vorhanden, deren Mittelwerte bestehen jedoch meistens aus zwei Nullwerten und nur einer positiven Probe. Eine Interpretation der Daten ist daher nur bedingt möglich und sollte kritisch hinterfragt werden. In *TOX / B. pumilus* unter geringem VPD wurden in sehr vielen Proben hohe Kolonienzahlen dokumentiert. Die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Altersstufen der Blätter sind im Vergleich zu den anderen Grafiken gering. Auch wenn die Arbeitsschritte im Labor immer gleich abliefen und die Arbeitsgeräte und –flächen nach jeder untersuchten Pflanze gründlich gereinigt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Laborarbeit in dieser Versuchsreihe Fehler gemacht wurden, woraufhin die Proben mit Bakterien verunreinigt wurden. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, wurden bei *TOX / B. pumilus* auch an den Blattaußenseiten deutlich mehr Bakterienkolonien gefunden als in den anderen Behandlungen. Die Blatabdrücke wurden mit anderen Versuchspflanzen aus den gleichen Boxen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt. Dies macht eine Verunreinigung während der Laborarbeit als Grund für die hohen Werte unwahrscheinlicher. Somit bleibt die Möglichkeit eines erhöhten Transportes in die oberirdischen Pflanzenorgane und sogar an die Blattaußenseiten bestehen. Für eine sichere Aussage sollte der Versuch wiederholt werden. Da sich die Kolonienzahlen in Tabelle 2 nicht auf eine bestimmte Blattfläche beziehen, können sie nicht direkt miteinander verglichen werden.

Über die Kombination *IR 31* mit *B. megaterium* können einige Aussagen zur Verteilung in die Blätter getroffen werden. In den Blattscheiden der zwei ältesten Blätter wurden mehr Bakterienkolonien nachgewiesen als in der Blattscheide des zweiten Blattes und in den Blattspreiten. Eine genauere Darstellung ist in den zwei darauffolgenden Abbildungen zu sehen. In Abbildung 10 wurde das Verhältnis zwischen den Blattscheiden und Blattspreiten für jede Wiederholung einzeln dargestellt. Grund dafür sind die großen Unterschiede der Werte innerhalb der Wiederholungen, wodurch die Verhältnisse nach der Bildung der Mittelwerte nicht korrekt wiedergegeben wurden. Durch die Darstellung der einzelnen Wiederholungen ist erkennbar, dass in den Pflanzen mit unverletzten Wurzeln in allen Blättern mehr Kolonien in den Blattscheiden als in den Blattspreiten vorgekommen sind. In den Pflanzen mit verletzten Wurzeln waren zum Teil höhere Kolonienzahlen in den Blattspreiten. Da in den verletzten Wurzeln die Barrieren fehlen und es zu einer höheren Transpirationsrate kommen kann (Yoshida und Hasegawa, 1982), kann das Abschneiden der Wurzeln bei manchen Pflanzen eine unkontrollierte Verteilung zur Folge gehabt haben. Dies würde für einen Transport der Bakterien mit dem Transpirationsstrom durch das Xylem sprechen.

In den älteren Blättern sind tendenziell mehr Bakterienkolonien aufgetreten als in den jüngeren Blättern, was in Abbildung 11 durch die Mittelwertbildung der Wiederholungen verdeutlicht wurde: In den älteren Blattscheiden sind mehr Bakterien vorgekommen als in den jeweils jüngeren Blattscheiden (Abbildung 11a). Da zumindest die ältesten und damit äußersten Blätter des Triebes an der Oberfläche nicht desinfiziert wurden und es nicht auszuschließen ist, dass der Trieb an der Außenseite mit Nährlösung in Kontakt gekommen ist, besteht die Möglichkeit, dass Bakterien von außen auf die Blattoberfläche übertragen wurden. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist deshalb gering.

Die Verteilung in den Blattspreiten führt den Trend der Blattscheiden nur bedingt fort (Abbildung 11b). Bei hohem VPD gab es eine deutlich geringere Verteilung der Bakterien nach L2. Die Entwicklung dieses Blattes erfolgte vermutlich zum Zeitpunkt der Inokulation mit *B. megaterium*. Das Blatt hatte somit während der Inokulation eine geringe Transpirationsrate. Die älteren Blätter (L3 und L4) hatten währenddessen eine höhere Transpirationsrate, in ihnen wurden

auch höhere Kolonienzahlen festgestellt. Dieses Ergebnis spricht für den Transport der Bakterien mit dem Transpirationsstrom durch das Xylem.

In den jüngsten vollentwickelten Blättern (L1) bei den Pflanzen unter hohem VPD und mit verletzten Wurzeln wurden höhere Kolonienzahlen gefunden. Diese Blätter sind in der Woche nach der Inokulation gewachsen, in der vermutlich weniger Bakterien in der Nährlösung waren als in der Woche zuvor. Auch die jüngsten vollentwickelten Blätter in den Pflanzen unter geringem VPD und damit auch mit geringerer Transpirationsrate wiesen höhere Kolonienzahlen auf, was wiederum gegen die Aussage spricht, dass die Bakterien mit dem Transpirationsstrom transportiert werden. Die hohen Kolonienzahlen könnten in diesem Fall darauf hindeuten, dass die Bakterien schon in den jungen unentwickelten Blättern vorhanden waren und nicht erst nachträglich hineintransportiert wurden. Da die neu wachsenden Blätter durch die älteren Blätter über das Phloem versorgt werden, ist auch die Möglichkeit eines Transportes der Bakterien über das Phloem nicht auszuschließen. Eine höhere Anzahl an Wiederholungen könnte möglicherweise besser Aufschluss über diese Dynamiken geben.

Auch der direkte Vergleich der Blattscheiden und Blattspreiten in Abbildung 12 zeigt nach Inokulation von *IR 31* mit *B. megaterium*, dass im Mittel mehr Bakterien in den Blattscheiden vorgekommen sind. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von *B. pumilus* zeigt, dass die Unterschiede dort gering waren. Bei hohem VPD und angeschnittenen Wurzeln waren im Schnitt sogar mehr Bakterienkolonien in den Blattspreiten. Allerdings muss auch in diesem Fall hinzugefügt werden, dass in den meisten Proben keine Bakterien nachgewiesen werden konnten und es fraglich ist, ob die Mittelwerte eine ausreichende Aussagekraft haben.

Prozentuale Verteilung in den Blättern

Der Vergleich der prozentualen Verteilung von *B. megaterium* in den Blättern von *IR 31* (Abbildung 13) stellt einen möglichen Zusammenhang mit der Eisenstress-Symptomatik in Reispflanzen dar. Das Abschneiden der Reiswurzeln vor der Inokulation mit den Bakterien hat ergeben, dass mehr Bakterien aus den

Blattscheiden in die Blattspreiten weitertransportiert wurden. In Versuchen mit eisengestressten Reispflanzen der Sorte *I Kong Pao* kamen Terre et al. (2009) zu dem Ergebnis, dass die Pflanzen mit zuvor abgeschnittenen Wurzeln nach der Inokulation mit *B. megaterium* geringere Krankheitssymptome in den Blattspreiten aufzeigten als die Pflanzen ohne abgeschnittene Wurzeln. *I Kong Pao* reagiert auf Eisenstress moderat empfindlich, wie Versuche von Asch et al. (2005) gezeigt haben. Nimmt man an, dass bei *IR 31* als eine ebenfalls sensitive Sorte ähnliche Vorgänge stattfinden wie in *I Kong Pao*, so kann die Abschwächung der Symptome in den Blattspreiten mit dem erhöhten Vorkommen von *B. megaterium* in den Blattspreiten zusammenhängen. Die starke Verletzung der Wurzeln könnte damit den Transport von *B. megaterium* in die Blattspreiten fördern, woraufhin sich die Eisenstress-Symptome dort abschwächen.

Verhältnis zwischen oberirdischen Pflanzenorganen und Wurzeln

Die Mittelwerte der Verhältnisse zwischen den Kolonienzahlen in den Blättern zu denen in den Wurzeln sind kleiner als 1 und verdeutlichen nochmals, dass in den Wurzeln mehr Bakterienkolonien vorhanden waren als in den oberirdischen Pflanzenorganen (Abbildung 14). Dieses Ergebnis deckt sich mit Studien über andere Pflanzenarten und Bakterienstämme, wie beispielsweise den Versuchen von Lamb et al. (1996): Nach der Inokulation von Weizen, Hafer, Mais und weiteren Kulturpflanzenarten mit *Pseudomonas aureofaciens* wurde eine höhere Dichte von Bakterien in den Wurzeln festgestellt, weniger davon wurden in die Blätter transportiert. Die hier gewählte Darstellung hat den Vorteil, dass die Verteilung in die Blätter unabhängig von der Bakteriendichte in den Wurzeln abgebildet wird, da ein Verhältnis hergestellt wurde. Je näher der Wert gegen 1 geht, desto mehr Bakterien wurden in den oberirdischen Pflanzenorganen im Verhältnis zur Wurzel gefunden. In *IR 31* gab es eine bessere Aufnahme beider Bakterienstämme in den Pflanzen mit unverletzten Wurzeln in Kombination mit einer erhöhten Transpirationsrate bei hohem VPD sowie bei verletzten Wurzeln und geringem VPD (Abbildung 14b). Die Mittelwerte von *B. megaterium* sind höher als die von *B. pumilus*. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, denn eine bessere Verteilung in die Blätter wurde bei hohem VPD und verletzten Wurzeln bereits vermutet. Dafür müsste jedoch auch die Kombination von hohem VPD

und angeschnittenen Wurzeln eine erhöhte Relation zwischen den Kolonienzahlen der Blätter und der Wurzeln ergeben. Dies war nicht der Fall, die Werte sind für beide Bakterienstämme sehr niedrig.

Die Grafik zeigt, dass es in *IR 31* Unterschiede in der Verteilung der Bakterien zwischen den Luftfeuchtebedingungen und dem Verletzen der Wurzeln gibt. Diese Unterschiede wurden beim Vergleich der Aufnahme in die Wurzeln (Kapitel 4.1) nicht festgestellt. Innerhalb der Wurzeln waren die Kolonienzahlen von *B. megaterium* deutlich höher als die von *B. pumilus*. Dieser Unterschied ist in Abbildung 14a kaum zu sehen, allerdings sind nur in 15 – 30 % der Proben Bakterien gewachsen; bei *B. megaterium* waren es 66 %. Die geringeren Kolonienzahlen von *B. pumilus* in den Wurzeln von *IR 31* spiegeln sich also auch in den vielen negativen Proben der Blätter wieder. Ein Vergleich mit den Kolonienzahlen aus den Blättern zeigt wiederum eine klare Übereinstimmung: Dort, wo hohe Kolonienzahlen vorhanden waren, ist die Relation und damit der Transport in die Blätter höher.

Die Ergebnisse von *TOX* unterscheiden sich von *IR 31* (Abbildung 14b). Unter niedrigem VPD waren die Kolonienzahlen in den Wurzeln von *B. pumilus* höher als von *B. megaterium*. In den Proben der Blätter wurden bei *B. pumilus* häufiger Bakterien gefunden, in den Pflanzen mit verletzten Wurzeln sogar in 100 % der Proben. Bei *B. megaterium* wurden in der gleichen Behandlung keine Bakterien gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit Abbildung 14b überein: Unter hohem VPD war die Aufnahme der Bakterienstämme in die Wurzeln von *TOX* ähnlich hoch. Es wurden vergleichsweise wenige Kolonien in den Blättern nachgewiesen. Nur in den Pflanzen mit verletzten Wurzeln ist nach Inokulation mit *B. megaterium* eine hohe Relation zwischen den oberirdischen Pflanzenorganen und den Wurzeln zu sehen. In den betreffenden Pflanzen wurden vor allem in den Blattscheiden höhere Kolonienzahlen gefunden, jedoch nur in 33 % der Proben. Wie die Grafik zeigt, hat eine hohe Kolonienzahl in den Wurzeln der Pflanzen nicht automatisch einen erhöhten Transport in die Blätter zur Folge. Auch ein Einfluss der Luftfeuchtebedingungen und des Verletzens der Reiswurzeln auf die Verteilung der Bakterien ist nicht klar erkennbar.

5.3 Mögliche Fehlerquellen und Verbesserungsvorschläge

Während der Durchführung des Versuches kamen einige Ideen zur Optimierung der Versuchsabläufe auf. Wie schon in Kapitel 4.2 angesprochen, sollte eine Oberflächendesinfektion der Blätter in Betracht gezogen werden. Dies kann hauptsächlich an den äußeren Blattscheiden sinnvoll sein, da diese leicht in Kontakt mit der Nährlösung geraten können. Auch durch eine Oberflächendesinfektion des Saatguts vor der Keimung könnten zukünftig Fehlerquellen vermieden werden, da dort Bakterien gefunden wurden, die möglicherweise als *B. megaterium* oder als *B. pumilus* identifiziert werden können. Zusätzlich zu den durchgeführten Untersuchungen ist es sinnvoll, die Nährlösung über den Versuchszeitraum ab der Inokulation regelmäßig zu beproben und die darin vorhandenen Bakterienkulturen zu erfassen. Die Daten wären vor allem am Tag der Probennahme der Pflanzen hilfreich gewesen, um mögliche Zusammenhänge der Kolonienzahlen zwischen den Pflanzenorganen und der Nährlösung zu finden. Denkbar ist zudem eine Inokulation der Pflanzen gleich zu Beginn des Versuches oder sogar die Inokulation des Saatguts vor der Keimung. Dies würde die realen Bedingungen besser wiedergeben, da die Bakterienkulturen wahrscheinlich auch unter Feldbedingungen schon von Beginn der Keimung an im Boden oder im Saatgut vorhanden sind. Sieht man von dem hohen Arbeitsaufwand und verschiedenen Störfaktoren wie fremden Bakterienkolonien im Boden ab, kann auch ein Feldversuch interessante Ergebnisse bringen: In den hydroponisch gewachsenen und mit *Pseudomonas aureofaciens* inokulierten Maispflanzen von Lamb et al. (1996) wurden deutlich weniger Bakterien in den Stängeln gefunden als in den im Boden gewachsenen Maispflanzen. Eine mögliche Ursache war vermutlich das geringere Wurzelwachstum im hydroponischen System, wodurch eine kontinuierliche Aufnahme der Bakterien erschwert wurde; die vorhandenen Bakterien gingen mit der Zeit vermutlich durch Abwehrmechanismen der Pflanze zugrunde.

Auch eine Untersuchung der Wurzeloberflächen, zum Beispiel durch Abdrücke auf den Agarplatten oder durch Abstriche, kann zu weiteren interessanten Erkenntnissen führen. Durch das Ermitteln der Bakterienkolonien pro Blattfläche

oder Trockengewicht könnten genauere Ergebnisse erzielt werden. Die Erstellung eines DNA-Profiles stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Anzahl der vorhandenen Bakterien quantitativ zu ermitteln.

5.4 Fazit und Ausblick

In der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *B. megaterium* und *B. pumilus* in die Reispflanzen aufgenommen und teilweise auch in die oberirdischen Pflanzenorgane transportiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen wissenschaftlichen Studien überein, in welchen beide Bakterienstämme bereits als Endophyten charakterisiert wurden (Bacilio-Jiménez et al., 2003; Liu et al., 2006).

Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sowohl zwischen *IR 31* und *TOX* als auch innerhalb der Reissorten Unterschiede in der Aufnahme und Verteilung der Bakterien gibt. Dies kann an den Eigenschaften der Bakterien liegen, die sich an Größe und Beweglichkeit voneinander unterscheiden, oder an deren direkter oder indirekter Wirkung auf die Reispflanzen. Die Pflanzen könnten entsprechend durch Abwehrmechanismen auf einen Bakterienstamm stärker reagieren als auf einen anderen oder deren Vermehrung und Entwicklung durch die Bereitstellung von Nährstoffen fördern.

In manchen Behandlungen konnten Unterschiede zwischen den Luftfeuchtebedingungen festgestellt werden. Für die Verteilung mit dem Transpirationsstrom sprechen zum Beispiel die erhöhte Aufnahme von *B. megaterium* in die Blattspreiten von *IR 31* mit dem Verletzen der Wurzeln oder die höheren Kolonienzahlen von *B. megaterium* in den älteren und stärker transpirierenden Blattscheiden von *IR 31*. Dagegen sprechen die erhöhten Kolonienzahlen in den Blattspreiten der jüngsten vollentwickelten Blätter.

Durch die Bearbeitung der Arbeit haben sich einige neue Fragen aufgetan, deren Beantwortung zum besseren Verständnis der Wirkung endophytischer Bakterien in Reis notwendig ist. Dazu gehören unter anderem:

- In welchen Geweben halten sich die Bakterien genau auf und siedeln sie sich dort intra- oder interzellulär an?

- Durch welche Gewebe gelangen die Bakterien in die oberirdischen Pflanzenorgane; durch Xylem- oder Phloemgefäße, auf dem apoplastischen Weg oder sogar an den Blattaußenseiten?
- Warum halten sich die Bakterien in den entsprechenden Bereichen auf und wie wirken sie dort, um die Vergiftungserscheinungen der Reis-pflanzen unter Eisenstress zu minimieren?

Literaturverzeichnis

- Achari, G. A. & Ramesh, R. (2014): Diversity, biocontrol, and plant growth promoting abilities of xylem residing bacteria from solanaceous crops. *International journal of microbiology*, 2014, p. 296521.
- Arceneaux, J. E. & Byers, B. R. (1980): Ferrisiderophore reductase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 141 (2), pp. 715–721.
- Asch, F., Becker, M. & Kpongpor, 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.
- Asch, F. & Padgam, J. (2005): Root associated bacteria suppress symptoms of iron toxicity in lowland rice. *Deutscher Tropentag 2005*. Verfügbar unter: <http://www.asch-online.eu/downloads/FA-Asch-padgham-DTT2005-Poster.pdf> [02.10.2017].
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., del Valle, M.V., Pérez, A., Zepeda, A. & Zenteno, E. (2001): Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (2), 167–172.
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S. & Zenteno, E. (2003): Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249 (2), 271–277.
- Chi, F., Shen, S.-H., Cheng, H.-P., Jing, Y.-X., Yanni, Y. G. & Dazzo, F. B. (2005): Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and environmental microbiology*, 71 (11), pp. 7271–7278.
- 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.

- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. & Ait Barka, E. (2005): Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, 71 (4), pp. 1685–1693.
- 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.
- Dörr, J., Hurek, T. & Reinhold-Hurek, B. (1998): Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular Microbiology*, 30 (1), 7–17.
- Fageria, N. K. (2014): Mineral nutrition of rice, 1. Auflage. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Fageria, N. K., Santos, A. B., Barbosa Filho, M. P. & Guimarães, C. M. (2008): Iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition*, 31 (9), 1676–1697.
- FAOSTAT (2017): Food and agriculture data. Verfügbar unter: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> [02.10.2017].
- Gagné, S., Richard, C., Rousseau, H. & Antoun, H. (1987): Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 33 (11), 996–1000.
- Gardner, J. M., Feldman, A. W. & Zablotowicz, R. M. (1982): Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of florida citrus trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (6), 1335–1342.
- Gray, E. J. & Smith, D. L. (2005): Intracellular and extracellular PGPR. Commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (3), 395–412.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (10), 895–914.
- Hinton, D. M. & Bacon, C. W. (1995): *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129 (2), pp. 117–125.

- Hu, X. & Boyer, G. L. (1996): Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11), 4044–4048.
- 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.
- 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.
- Liu, X., Zhao, H. & Chen, S. (2006): Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52 (3), 186–190.
- Macleán, 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.
- Martens, J.-H. (2002): Gezielte Entwicklung von *Bacillus megaterium* für biotechnologische Anwendungen. *Dissertation*. Verfügbar unter: https://publikationsserver.tu-braunschweig.de/receive/dbbs_mods_00001404 [02.10.2017].
- 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.
- Meneses, C. H. S. G., Rouws, L. F. M., Simoes-Araujo, J. L., Vidal, M. S. & Baldani, J. I. (2011): Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular plant-microbe interactions*, 24 (12), pp. 1448–1458.
- Nayar, N. M. (2014): Origins and phylogeny of rices, 1. Auflage. Oxford: Elsevier.

- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N. & Nair, S. (2009): Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40 (2), pp. 269–275.
- Peterson, C. A., Emanuel, M. E. & Humphreys, G. B. (1981): Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Botany*, 59 (5), 618–625.
- 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.
- 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.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Claeysens, M. & van Montagu, M. (1993): Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. *Journal of Bacteriology*, 175 (21), pp. 7056–7065.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., van Montagu, M. & Hurek, T. (2006): An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular plant-microbe interactions*, 19 (2), pp. 181–188.
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E. (2006): Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19 (8), pp. 827–837.
- Ruppel, S., Hecht-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U. & Schmelzer, R. (1992): Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat. An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil*, 145 (2), 261–273.
- Sahrawat, K. L. (2005): Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. *Journal of Plant Nutrition*, 27 (8), 1471–1504.

- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. d. C. & Glick, B. R. (2016): Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, pp. 92–99.
- Seiler, H. (2010): Foto-Bibliothek für lebensmittelassoziierte aerobe Sporenbildner. Verfügbar unter: <http://www.micbio.wzw.tum.de/cms/docs/Stammsammlung/Foto%20Bibliothek%20Bacillus.pdf> [02.10.2017].
- Terre, S., Asch, F. & Becker, M. (2009): Effects of rhizobacteria on iron uptake in lowland rice under conditions of iron toxicity. *Deutscher Tropentag 2009*. Verfügbar unter: <http://www.asch-online.eu/downloads/FA-Terre-TT09-Poster.pdf> [02.10.2017].
- Vary, P. S. (1994): Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology (Reading, England)*, 140 (Pt 5), pp. 1001–1013.
- 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.
- Vasse, J. (1995): Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 8 (2), 241.
- Wilson, D. (1995): Endophyte. The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73 (2), 274.
- 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.
- Yoshida, S. & Hasegawa, S. (1982): The rice root system. Its development and function. In International Rice Research Institute (Hrsg.), *Drought resistance in crops with emphasis on rice* (pp. 97–114). Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- You, C. B., Song, W., Wang, H. X., Li, J. P., Lin, M. & Hai, W. L. (1991): Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice. *Plant and Soil*, 137 (1), 81–85.

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