

**DIE BEDEUTUNG EKTOTROPHER MYKORRHIZA FÜR DIE
NÄHRSTOFFVERSORGUNG VON *NOTHOFAGUS OBLIQUA*.
UNTERSUCHUNGEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER
BODEN- UND NÄHRSTOFFBEDINGUNGEN DER
NOTHOFAGUS-WÄLDER IN SÜDCHILE IM HINBLICK AUF
WIEDERAUFFORSTUNG UND NACHHALTIGE
FORSTWIRTSCHAFT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

UNIVERSITÄT
BREMEN
dem Fachbereich Biologie
der Universität Bremen



vorgelegt
von
Maricel Alvarez



im Mai 2001

Aunque la tierra este reseca
habrá siempre un surco abierto
anhelando la bendición de la lluvia
y confiando en la germinación de la semilla.

[Enrique C. Alvarez]

**DIE BEDEUTUNG EKTOTROPHER MYKORRHIZA FÜR DIE
NÄHRSTOFFVERSORGUNG VON *NOTHOFAGUS OBLIQUA*.
UNTERSUCHUNGEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER
BODEN- UND NÄHRSTOFFBEDINGUNGEN DER
NOTHOFAGUS-WÄLDER IN SÜDCHILE IM HINBLICK AUF
WIEDERAUFFORSTUNG UND NACHHALTIGE
FORSTWIRTSCHAFT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

UNIVERSITÄT
BREMEN
dem Fachbereich Biologie
der Universität Bremen



vorgelegt
von
Maricel Alvarez



im Mai 2001

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Heyser, Universität Bremen.
2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Lieberei, Universität Hamburg.

Tag des öffentlichen Kolloquiums:

08. Juni 2001

ABKÜRZUNGEN

Ae	A=Mineralischer Oberbodenhorizont / e=eluvial
Ah	A=Mineralischer Oberbodenhorizont / h=humos
A _{HM}	Fläche des Hyphenmantels
A _{KW}	Fläche der Kurzwurzel und des Hartigsches Netzes
AM	Apikalmeristem
A _{MF}	Mykorrhizafläche
A _{PA}	Fläche Phosphataseaktivität
b.c	before christ
Berk.	M.J. Berkeley
Br.	Ch.E. Broome
Bresky.	A. Bresinsky
Bv	B=Mineralischer Unterbodenhorizont / v=verwittert
E	Endodermis
ELF-97	Enzyme-Labeled Fluorescence
EM	Ektomykorrhiza
FB	Fast Blue RR Salt
Fr.	E.M. Fries
Gill.	C.G. Gillet
HM	Hyphenmantel
HN	Hartigsches Netz
I _{PA}	gesamte Phosphataseaktivität
ISS	nuclear small subunit
ITS	internal transcribed spacers
Krbh.	J.V. v. Krombholz
L.	C. v. Linné
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MMN-Nährmedium	modifiziertes Melin-Norkrans-Nährmedium
Of	O=organisch / f=von schwedisch Förmultningskiktet
OI	O=organisch / I=von englisch litter (Streu)
<i>P. involutus</i>	<i>Paxillus involutus</i>
<i>P. tinctorius</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>
PA	Phosphataseaktivität
PD	Photodetektor
Pers.	Chr. Persoon
Phil.	Philippi
pNP	p-Nitrophenol-Phosphat
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
PR	Primäre Rinde
PS	Palmetti-Strukturen

Rom.	L. Romell
Scop.	J.A. Scopoli
Sing.	R. Singer
Agaricales s.l.	Agaricales sensu lato
Speg.	C. Spegazzini
Quél.	L. Quélet
Val.	E. Valenzuela
VA-Mykorrhiza	Vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
WD	Wurzelhaubenderivaten
YR	von englisch yellow-red (gelb-rot)
ZZ	Zentralzylinder

ABSTRACT

TITLE: The significance of ectotrophic mycorrhiza for the nutrient supply of *Nothofagus obliqua* under the consideration of local soil parameters in southern Chile. Aspects for future reforestation and sustainable forest management

Nothofagus species form the most important native constituents in the temperate humid forests of southern Chile. Due to extensive farming and non-sustainable forestry, their population has been reduced extensively for more than a century. As a consequence, vast areas are presently covered with monocultures of *Pinus radiata* and *Eucalyptus globulus*.

Differentiated symbiotic associations between plant roots and fungi, so-called mycorrhiza, have been shown to play a significant role not only for stable forest ecosystems, but also for reforestation. In this context, mycorrhiza can be of substantial importance for the basic nutrient supply and can increase the tolerance of trees against different kinds of environmental stress. Presently, there is little consolidated knowledge about the importance of the mycorrhizal associations, formed by *Nothofagus* species and its specific mycobionts.

The presented work concentrates on the evaluation of the relevance of several specific and non-specific ectomycorrhiza for *Nothofagus*. First, a general survey of ectomycorrhiza found in association to *N. obliqua* and *P. radiata* near Valdivia (Chile) is presented. Further work concentrated on the specific mycorrhizal fungi *Austropaxillus boletinoides*, *Boletus loyo*, *Austropaxillus statuum*, and *Descolea antarctica*. Investigated mycorrhizal fungi, not specifically restricted to *Nothofagus* are *Cenococcum geophilum*, *Paxillus involutus*, and *Pisolithus tinctorius*. Fruit-bodies and ectomycorrhiza were characterised morphologically and anatomically prior to systematic classification. The ectomycorrhiza *N. obliqua* – *A. boletinoides* and – *B. loyo* have been described for the first time in this context.

In order to obtain sterile stock cultures of the fungi for physiological experiments, mycelium was isolated from the collected fruit-bodies or from the mantle structure of *N. obliqua* mycorrhiza. Seedlings of *N. obliqua* were inoculated with specific and unspecific stock cultures in order to test for early stage mycorrhizal fungi.

The physiological experiments concentrated on an important feature of mycorrhiza. The extra-cellular and membrane bound phosphatase activity was determined in cultured mycelium, roots and entire mycorrhiza under different external parameters and growth conditions.

Detailed soil analysis, which were performed in the areas of investigation showed a remarkable low concentration of the available phosphate (P) fraction. Phosphatase activities of mycorrhiza-associations are of increased interest in areas of limited P supply, because they can enzymatically open the access to sources of phosphate, which are inaccessible for plants under isolated conditions. This holds especially in soils of volcanic origin, since they represent a natural sink for P due to highly active soil components like allophanes. Allophanes are weakly ordered aluminium-silicates which dominate in many volcanic ash soils in temperate humid regions (e.g. in Chile, Japan, and Germany). They hold important implications to the use and management in agriculture and forestry. In experiments, the PO_4^- binding capacity of allophane was determined at different pH (3-7) which resulted in an enhanced binding capacity for P with increasing pH-levels.

Extra-cellular and membrane bound phosphatase activity (PA) were quantified at different pH-values (3-7) in isolated cultures of *A. boletinoides*, *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antartica*, and *C. geophilum*, which had been adapted to grow in media with varying concentrations of dissolved P.

Extra-cellular PA were quantified by an established colorimetric method using p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP). For the detection of membrane bound PA in fungal hyphae, we compared the pNPP-method with a newly developed method based on enzyme activated fluorescence of ELF[®]-97 substrate and image processed confocal Laser-Scanning-Microscopy. ELF[®]-97 fluorescence has shown to reliably stain PA in fungal hyphae. For membrane bound PA, the fluorescence based method not only reproduced qualitatively the results obtained by pNPP, but additionally contributed valuable information about the structure and distribution of the phosphatase spots in the fungi.

The ELF[®]-97 method also provided reliable properties to be used for the determination of PA even in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of *N. obliqua*. In this case, a set of different physio-anatomical parameters were derived with image processed confocal Laser-Scanning-Microscopy for *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antartica*, and *C. geophilum*. Again, special attention was paid to variations in respect to differing pH-environments. The results showed that PA in ectomycorrhiza formed with *P. tinctorius* was three times higher than in non-mycorrhizal roots of *N. obliqua*. The other inoculants did not increase PA significantly or even decreased PA as it was observed with *D. antartica*, and *C. geophilum*.

In conclusion, total phosphatase activity and physio-anatomical parameters derived with image processed confocal Laser-Scanning-Microscopy in isolated fungal hyphae as well as in

mycorrhiza associations was found to vary intensively between fungi. The external variation of the pH-conditions had different effects on the phosphatase activity of isolated fungal hyphae, of mycorrhiza associations, and of non-mycorrhizal roots of *N. obliqua*.

The observations underline that positive effects of mycorrhiza associations for the plant highly depend on the specific partners, the specific nutrient, and the specific external conditions (pH). For defined conditions, certain mycorrhiza associations can significantly increase the phosphatase activity. This feature can be of essential importance in areas where direct accessible P-concentration are naturally low. Once the natural, local fungi spectrum in an area is lost due to extensive farming or non-sustainable forestry (especially monocultures of introduced species), reforestation with *N. obliqua* will possibly fail if the natural spectra of mycobionts is not considered sufficiently.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>HINTERGRUND UND MOTIVATION</u>	1
1.1	Gliederung der Arbeit	1
2.	<u>EINLEITUNG</u>	3
2.1	Ektomykorrhizen	3
2.2	Die ektotrophen Areale Südamerikas	4
2.2.1	Die Bedeutung der <i>Nothofagus</i> -Arten für die gemäßigten immerfeuchten Wälder Südchiles	5
2.2.2	Die Agaricales Chiles: Ektomykorrhizapartner von <i>Nothofagus</i>	9
2.3	Das Untersuchungsgebiet	11
2.3.1	Die Lokalisierung des Untersuchungsgebietes	11
2.3.2	Native Vegetation: <i>Nothofago-Perseetum linguae</i>	12
2.3.2.1	Anthropogene Einflüsse auf die native Vegetation Südchiles	13
2.3.2.2	Die Sonderrolle von <i>N. obliqua</i> als Pionierpflanze	14
2.3.3	Topographische und klimatische Bedingungen	14
2.3.4	Bodenbedingungen	16
2.3.4.1	Bodentypen	17
2.3.4.2	Allophan	18
2.4	Der Mineralstoff Phosphor als Nährelement der Pflanze	20
2.4.1	Phosphor in Böden	20
2.4.2	Die Bedeutung der Mykorrhiza für die Phosphataufnahme	21
2.4.3	Methoden zur Untersuchung der Phosphataseaktivität in Pilzhyphen und Mykorrhizen	22
2.4.4	Fluoreszenzbasierte Methoden	24
2.5	Aufgabenstellung	25
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	27
3.1	Symbiosepartner	27
3.1.1	Die Kultivierung von <i>N. obliqua</i>	27
3.1.2	Ektomykorrhizapilze: Systematische Klassifizierung und Züchtung aus dem Freiland	28

3.1.2.1	Fruchtkörper- und Ektomykorrhizasammlung im Untersuchungsgebiet	28
3.1.2.2	Konservierung der Fruchtkörper	29
3.1.2.3	Systematische Klassifizierung von Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten anhand von Fruchtkörpern	29
3.1.2.3.1	Makroskopische und chemische Untersuchungen des Frischmaterials	29
3.1.2.3.2	Mikroskopische Untersuchungen des konservierten Materials	30
3.1.2.4	Charakterisierung und Identifizierung der im Freiland gesammelten Ektomykorrhizen	31
3.1.2.4.1	Behandlung der Waldproben	31
3.1.2.4.2	Morphologische Untersuchungen der Ektomykorrhizen	31
3.1.2.4.3	Anatomische Untersuchungen des Hyphenmantels und der abziehenden Elemente	32
3.1.2.4.4	Chemische Untersuchungen	32
3.1.2.4.5	Längsschnitte der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i>	33
3.1.2.4.6	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	33
3.1.2.5	Isolierung und Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen aus Fruchtkörpern	33
3.1.2.6	Ausnahme: Isolierung von <i>Cenococcum geophilum</i> Fr. aus Ektomykorrhizen	34
3.1.3	Inokulation von <i>N. obliqua</i> : Aufbau der Rhizotrone	35
3.2	Bodenuntersuchungen	37
3.2.1	Bodenanalysen im Untersuchungsgebiet Quita Calzón	37
3.2.1.1	Bodenprofil	37
3.2.1.2	Physikalische Bodenparameter	37
3.2.1.3	Chemische Bodenparameter	38
3.2.2	Adsorptionskapazität von Allophan	39
3.3	Bestimmung der Phosphataseaktivität	40
3.3.1	Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen	41
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen mit Hilfe enzymgekoppelter Fluoreszenzaktivierung von Elf-97	42
3.3.2.1	Vorversuche zur Validierung der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungen der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen	43
3.3.2.1.1	Versuchsaufbau und Probenpräparation für Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	44
3.3.2.1.2	Trennung der Spektren der Autofluoreszenz der Proben und der Elf-97-Fluoreszenzen	44
3.3.2.1.3	Spezifität des Elf-97-Substrates bei der Lokalisierung der Phosphataseaktivität	46

3.3.2.1.4	Sättigungskinetik der enzymatischen Aktivierung von Elf-97	47
3.3.2.1.5	Kontrolle des pH-Wertes	48
3.3.2.2	Definition der Messparameter zur Detektion der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Pilzhyphen	50
3.3.2.3	Messung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i>	52
3.3.2.3.1	Versuchsaufbau und Probenpräparation für Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln	53
3.3.2.3.2	Definition der Messparameter zur Detektion der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln	54
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	57
4.1	Die Kultivierung von <i>N. obliqua</i>	57
4.2	Artenbestand der Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten im Untersuchungsgebiet	58
4.2.1	Systematische Klassifizierung spezifischer Ektomykorrhizapartner von <i>Nothofagus</i> -Arten	59
4.2.1.1	Allgemeine Charakteristiken der Gattung <i>Austropaxillus</i> Bresinsky und Jarosch gen. nov.	59
4.2.1.1.1	<i>Austropaxillus boletinoides</i> (Sing.) Bresinsky et Jarosch	60
4.2.1.1.2	<i>Austropaxillus statuum</i> (Speg.) Bresinsky et Jarosch	61
4.2.1.2	Allgemeine Charakteristiken der Familie Bolbitaceae Sing.	62
4.2.1.2.1	<i>Descolea antartica</i> Sing.	62
4.2.1.3	Allgemeine Charakteristiken der Familie Boletaceae Chevalier	63
4.2.1.3.1	<i>Boletus loyo</i> Phil. ex Speg.	63
4.2.1.3.2	<i>Boletus chilensis</i> Sing.	64
4.2.2	Systematische Klassifizierung unspezifischer Ektomykorrhizapartner von <i>Nothofagus</i> -Arten	65
4.2.2.1	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch: Fr.) Fr.	66
4.2.2.2	<i>Xerocomus rubellus</i> (Krbh.) Quéf.	66
4.3	Charakterisierung und Identifizierung der Ektomykorrhizen von <i>N. obliqua</i> mit <i>B. loyo</i> , <i>D. antartica</i> und <i>A. boletinoides</i>	68
4.3.1	Boletaceae	68
4.3.1.1	<i>Boletus loyo</i>	68
4.3.2	Bolbitaceae	71
4.3.2.1	<i>Descolea antartica</i>	71
4.3.3	Gymnopaxillaceae	74
4.3.3.1	<i>Austropaxillus boletinoides</i>	74
4.4	Wachstumsverhalten des Fruchtkörpermyzels in Reinkultur	77

4.5	Isolierung von <i>Cenococcum geophilum</i> und Wachstumsverhalten in Reinkultur	79
4.6	Inokulation von <i>N. obliqua</i> – Auswahl der Ektomykorrhizapilze	80
4.7	Bodenuntersuchungen	81
4.7.1	Bodenprofil	81
4.7.2	Physikalische Bodenparameter	83
4.7.3	Chemische Bodenparameter	83
4.7.4	Adsorptionskapazität von Allophan	84
4.8	Bestimmung der Phosphataseaktivität	86
4.8.1	Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von pNPP	86
4.8.2	Methodenvergleich der spektrometrischen und der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen	92
4.8.3	Strukturelle Untersuchungen der oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von ELF-97	96
4.8.4	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i>	102
5.	<u>DISKUSSION</u>	109
5.1	Auswahl der Ektomykorrhizapartner von <i>N. obliqua</i> für weitergehende physiologische Untersuchungen	109
5.1.1	Ektotrophe Mykorrhizapilze: Artenbestand in den Untersuchungsgebieten und Pilzisolierung in Reinkultur	109
5.1.1.1	Spezifische Ektomykorrhizapilze von <i>Nothofagus</i>	110
5.1.1.2	Nicht spezifische Ektomykorrhizapilze von <i>Nothofagus</i> und ihre Assoziationen mit <i>P. radiata</i> und <i>E. globulus</i>	113
5.1.2	Morphologisch-anatomische Kriterien der <i>N. obliqua</i> - Ektomykorrhizen zur Auswahl der Mykobionten für weitergehende physiologische Untersuchungen	116
5.1.3	Inokulationsversuche von <i>N. obliqua</i> unter besonderer Beachtung der Mykobionten in ihrer Funktion als „early“, „multi-“ und „late-stage“ -fungi	123
5.2	Bodenbedingungen im Untersuchungsgebiet von Quita Calzón	125
5.2.1	Die Relevanz chemischer Bodenparameter	125

5.2.2	Die Relevanz physikalischer Bodenparameter	129
5.2.3	Abschließende Diskussion der Bodenparameter	130
5.3	Bestimmung der Phosphataseaktivität	132
5.3.1	Spektrometrische Bestimmung der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Phosphatangebotes	132
5.3.1.1	Extrazelluläre Phosphataseaktivität	133
5.3.1.2	Oberflächengebundene Phosphataseaktivität	135
5.3.2	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmungen der membrangebundenen Phosphataseaktivität	137
5.3.2.1	Validierung der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen	138
5.3.2.2	Quantitativ-strukturelle Überlegungen zur oberflächengebundenen Phosphataseaktivität auf den Hyphen der Pilzisolat	141
5.3.2.3	Quantitativ-strukturelle Überlegungen zu oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln	144
5.4	Die Bedeutung der Ektomykorrhizen für <i>Nothofago-Perseetum linguae</i>	148
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	155
7.	<u>LITERATUR</u>	159
8.	<u>ANHANG</u>	173
8.1	Anatomisch-morphologische Untersuchungen an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i>	173
8.1.1	Einbettungsverfahren der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i> für die Lichtmikroskopie	173
8.1.2	Präparation der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von <i>N. obliqua</i> für rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen	173
8.1.3	Merkmalstafel zur Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen	174
8.1.4	Aufnahmen einer unmykorrhizierten Kurzwurzelspitze von <i>N. obliqua</i>	175
8.2	Zusammensetzung des von Marx modifi- zierten Melin-Norkrans (MMN) -Nährmedium zur Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen	175

8.3	Zusammensetzung des MMN-Nährmediums zur Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen unter Variation des Phosphatangebotes	176
8.4	Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität mit Hilfe von pNPP	177
8.5	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität mit Hilfe von ELF-97	179
9.	<u>DANKSAGUNG</u>	185

1. HINTERGRUND UND MOTIVATION

Die einst ausgedehnten gemäßigten immerfeuchten Wälder Südamerikas wurden im Verlauf der letzten Jahrhunderte auf wenige Restbestände zurückgedrängt. Nicht regulierte weide-, land- und forstwirtschaftliche Nutzung gefährdet akut die noch verbleibenden Waldgebiete. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Urwälder der *Nothofago-Perseetum linguae* in Südchile benötigen 400 Jahre, um nach einer Zerstörung das ursprüngliche sozio-ökologische Gleichgewicht wieder zu erlangen. Damit sich ein Gleichgewicht überhaupt wieder einstellen kann, ist es Voraussetzung, dass nachwachsenden Baumarten ihre natürlichen Pilzpartner (Mykobionten) zur Verfügung stehen. Mit diesen Mykobionten bilden die Wurzeln der Bäume symbiotische Funktionseinheiten, die für beide Partner überlebenswichtig sind. Welche Mykobionten ein Baum benötigt, hängt von Randbedingungen wie Klima, lokalen Bodenbeschaffenheiten sowie dem Wachstumsstadium des Baumes ab. Da durch Abholzung von Wirtsbäumen auch das spezifische Mykobiontenpektrum zerstört wird, muss dieses im Verlauf einer Aufforstung wieder hergestellt werden. Die vorliegende Arbeit soll ihren Beitrag leisten, die noch geringen Kenntnisse über das spezifische Mykobiontenpektrum von *Nothofagus obliqua* zu erweitern, um dringend benötigtes Grundlagenwissen für Projekte der Wiederaufforstung oder der nachhaltigen Forstwirtschaft bereitzustellen.

1.1 Gliederung der Arbeit

Die wesentlichen Teile dieser Arbeit gliedern sich zunächst in eine Einleitung (Kap. 2), in eine Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden (Kap. 3), in einen Ergebnisteil (Kap. 4) und in eine Diskussion und Interpretation der Ergebnisse (Kap. 5). Dabei ist zu berücksichtigen, dass in jedem der Kapitel eine Unterteilung nach den folgenden Themenschwerpunkten vorgenommen wird. Diese sind:

- I. Die Charakterisierung des Untersuchungsgebietes *Nothofago-Perseetum linguae*.
- II. Die Isolation und Aufzucht von Mykobionten und Sämlingen von *Nothofagus obliqua*.
- III. Die Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten.

Zu Punkt III. ist anzumerken, dass Ergebnisse und Diskussionen, die im Verlauf der Entwicklung und Validierung einer neuen Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung oberflächengebundener Phosphataseaktivitäten an Pilzhyphen stehen, ebenfalls in Kapitel 3 eingeordnet sind. Zu den Kapiteln Zusammenfassung (Kap. 6), Literatur (Kap. 7), Anhang (Kap. 8) und der abschließenden Danksagung (Kap. 9) sind keine Anmerkungen nötig.

2. EINLEITUNG

2.1 Ektomykorrhizen

Zwischen Pilzen und Wurzeln höherer Pflanzen bildet sich unter bestimmten Bedingungen eine besondere symbiotische Funktionseinheit, die Mykorrhiza. Mykorrhizen sind seit dem Jahre 1885 durch Frank bekannt und können, wie wir heute wissen, von nahezu 90 % aller Landpflanzen ausgebildet werden. Das wohl wesentlichste Merkmal der Mykorrhiza ist der bidirektionale Stoffaustausch. Bei diesem Stoffaustausch verbessern die Pilze die Wasser- und Nährstoffversorgung der Pflanze und werden dafür von dieser mit Assimilaten versorgt.

Entsprechend dem morphologisch-anatomischen Aufbau sowie den beteiligten Pflanzen- und Pilzgruppen lassen sich verschiedene Mykorrhiza-Typen unterscheiden: Ektomykorrhizen (EM), Ektendomykorrhizen, vesikulär-arbuskuläre (VA) Mykorrhizen, verschiedene Formen von Ericales-Mykorrhizen (ericoid, arbutoid, monotropoid) sowie Orchideen-Mykorrhizen (Smith & Read 1997).

Ektomykorrhizen kommen hauptsächlich an Waldbäumen vor, ebenso an Sträuchern, seltener an Kräutern. Sie werden von Pilzen aus mehreren Familien der Basidiomyceten, von einigen Ascomyceten, von *Fungi imperfecti* sowie von einigen wenigen Zygomyceten gebildet.

Zu den wesentlichsten Merkmalen von Ektomykorrhizen zählt der Hyphenmantel, der die Wurzel umhüllt (Abb. 4.10.a), und das Hartigsche Netz. Das Hartigsche Netz dringt in die Zellwände zwischen Epidermis- und Rindenzellen vor (Abb. 4.10.b). Es erstreckt sich interzellulär maximal bis zur Endodermis. Bei älteren Mykorrhizen dringen die Pilzhyphen manchmal auch in Rindenzellen ein (Smith & Read 1997).

Von den Hyphenmänteln ziehen Hyphen und/oder Rhizomorphen ab und stellen ein Netz enger Verbindungen zum umgebenden Boden her (Abb. 4.8.a-b).

Da Ektomykorrhizen, wie erwähnt, von verschiedenen Pilzarten gebildet werden, sind die oben genannten Merkmale unterschiedlich ausgeprägt. Diese Unterschiede können sich auch in unterschiedlichen Funktionen widerspiegeln (Agerer *et al.* 1986).

Der Hyphenmantel der Mykorrhizen erfüllt mehrere Funktionen (Gronbach 1988):

- Übernahme und Weitertransport von Nährsubstanzen zum Hartigschen Netz und Wurzelgewebe. Transport von Kohlenhydraten in entgegengesetzter Richtung.

- Speicherfunktion für verschiedene Substanzen (Phosphate, Stickstoff, Kalium, Calcium und die von der Pflanze gelieferten Kohlenhydrate).
- Abkapselung der Wurzel vom Boden, um mechanischen und stofflichen Schutz vor eindringenden Pathogenen zu bieten.
- Erhöhung der Toleranzgrenze der Pflanze gegenüber toxischen Metallen (Falandysz & Chwir 1997).

Das Hartigsches Netz stellt die Kontakt-Austauschzone zwischen dem Pilz und den Zellen der Pflanze dar.

Die abziehenden Hyphen und Rhizomorphen übernehmen die Funktion fehlender Wurzelhaare. Zudem bewirken sie im Substrat eine starke Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche und erhöhen so das Bodenvolumen, das für die Wasser- und Nährstoffaufnahme zugänglich ist (Smith & Read 1997).

2.2 Die ektotrophen Areale Südamerikas

Auf dem Südamerikanischen Kontinent nehmen Gehölze an vegetationsfeindlichen, extremen Standorten (die sogenannten Ektotrophenwälder) im Vergleich zu Gehölzen an vegetationsfreundlichen Standorten (sogenannte Anektotrophenwälder) eine vergleichsweise geringe Ausdehnung an. Daher ist auf diesem Kontinent der Anteil der Gebiete, in denen ektotrophe Formen von Mykorrhiza-Assoziationen vorkommen, relativ gering (Singer 1964). In der bislang wohl umfangreichsten und exaktesten Arbeit über ektotrophe Mykorrhiza-Assoziationen in Südamerika gibt Garrido 1988 einen umfassenden Überblick über die wichtigsten ektotrophen Regionen, die im Folgenden kurz zusammengefasst sind.

In Kolumbien befinden sich die sog. **Quercus-Areale**, welche durch zwei *Quercus*-Arten (*Q. columbiana* und *Q. humboldtii*) definiert werden und deren mykologischer Aspekt erstmals von Singer (1973, 1978a), Moser & Horak (1975) und Singer *et al.* (1983) beschrieben wurde.

Im Verlauf der Andenkette (von Mexiko bis Nordargentinien) bilden *Alnus*-Arten das sog. **Alnus-Areal** (Singer 1964). Diesem Gebiet werden auch Regionen zugeordnet, in denen *Salix humboldtiana* angetroffen wird (vornehmlich in Venezuela, Kolumbien und Peru, Singer *et al.* 1983).

Das größte der ektotrophen Areale Südamerikas wird durch Vorkommen von *Nothofagus*-Arten in Chile und Argentinien bestimmt und als **Nothofagus-Areal** bezeichnet. Singer,

Moser und Horak haben über dieses Areal grundlegende Beschreibungen durchgeführt, die sich allerdings hauptsächlich auf die Gebiete Patagoniens bezogen (s. Kap. 2.2.2).

Auch im Einzugsbereich der Amazonasregion kommen ektotrophe Mykorrhiza-Assoziationen in Arealen der Igapó- und Campinara-Vegetation vor (Singer 1984). Sie assoziieren mit Leguminosae, Nyctaginaceae, Sapotaceae, Rubiaceae, Palmaceae, Sapindaceae, Lecythidaceae und Euphorbiaceae (Singer 1978a, 1978b, 1984, Singer & Araujo 1979, Singer *et al.* 1983). Abseits der Amazonasregion existieren ektotrophe Mykorrhiza-Assoziationen im Cerrado-Gebiet, hier in Verbindung mit Myrtaceae und Leguminosae (Thomazini 1974).

In grundlegenden Arbeiten über die *Nothofagus*-Areale (z. B. Singer & Morello 1960 und Singer & Moser 1965) wurde auf die Existenz von ektotrophen Mykorrhiza-Assoziationen noch weitgehend dadurch geschlossen, dass Fruchtkörper eines bekannten ektotrophen Mykorrhizapilzes unter *Nothofagus*-Arten wuchsen. Untersuchungen, die das Wurzelsystem der Vegetation stärker mit einbezogen, wurden in Chile hingegen erst von Garrido (1988) und Carrillo *et al.* (1992) vorgenommen. Durch mikroskopische Untersuchungen wies Garrido 1988 erstmals die Präsenz ektotropher Mykorrhiza bei 8 *Nothofagus*-Arten nach (*N. alessandrii*, *N. alpina*, *N. antartica*, *N. dombeyi*, *N. glauca*, *N. leoni*, *N. obliqua* und *N. pumilio*). Garrido beobachtete weiter ektotrophe Mykorrhiza bei der Myrtaceae *Ugni molinae*. Bei der Myrtaceae *Luma apiculata* beschrieb er sowohl ektotrophe als auch ektendotrophe Charakteristiken. Carrillo *et al.* fanden 1992 weitere Ektomykorrhiza-Assoziationen mit *N. antartica*, *N. dombeyi* und *N. obliqua*. In den genannten Myrtaceae berichteten diese Autoren aber auch über endotrophe Formen von Mykorrhiza-Assoziationen.

Abschließend ist hervorzuheben, dass alle Gymnospermen der gemäßigten Wälder Südamerikas (Definition s. 2.2.1) im Gegensatz zu den Gymnospermen der Nordhemisphäre keine Ektomykorrhiza-Assoziation aufweisen.

2.2.1 Die Bedeutung der *Nothofagus*-Arten für die gemäßigten immerfeuchten Wälder Südchiles

Obwohl die gemäßigten Wälder der Erde denen in tropischen Regionen an Artenreichtum nachstehen, haben sie aufgrund ihrer Ausdehnung doch große Bedeutung. In ihrer Produktivität reichen die gemäßigten Wälder sogar teilweise an die Produktivität in tropischen Zonen heran.

Die Naturwälder im Süden von Argentinien und Chile werden als gemäßigte Wälder klassifiziert. Sie sind im Winter niedrigen Temperaturen ausgesetzt, welche das Wachstum

der vorhandenen Vegetation limitieren (Armesto *et al.* 1997). Die gemäßigten Wälder dieser Region stellen seit dem Quartär eine wahre biogeographische Insel mit einzigartigen klimatischen und topographischen Bedingungen dar (Donoso 1996). Ihre Barrieren sind der atlantische und der pazifische Ozean sowie die großen angrenzenden ariden Gebiete, z.B. die Atacama Wüste. Diese vollständige Isolierung hinsichtlich eines Austauschs von Flora und Fauna macht diese Region in Bezug auf Aspekte der Ökologie und der Evolution besonders interessant. Viele der auffälligen Charakteristiken (wie beispielsweise der ausgeprägte Endemismus und der Endotrophismus) können durch diese lang anhaltende Isolationszeit erklärt werden.

Die Naturwälder der Region erstrecken sich auf einem größtenteils recht schmalen Vegetationsstreifen (~120 km) über mehr als 2000 km in Nord-Süd-Richtung. Die ausgeprägten Höhenunterschiede in West-Ost Richtung (0 m bis 6000 m), welche durch die Andenkette definiert sind, sowie vulkanische Aktivitäten schaffen dabei äußerst heterogene Bedingungen hinsichtlich der Klima- und Bodenbedingungen mit starken Auswirkungen auf die örtliche Vegetationszusammensetzung (Armesto *et al.* 1997).

Teile dieser Naturwälder sind die sog. **gemäßigten Wälder**. Sie befinden sich in der Zentral-Region Chiles (33-37°S) und sind im Norden durch sklerophylle Vegetation begrenzt. Als **gemäßigte immerfeuchte Wälder** werden im Allgemeinen Wälder der Regionen ab 37°S referenziert, welche die regenreichen Regionen westlich der Andenkette bedecken. Zwischen 37 und 43°S liegen die **Valdivianischen immerfeuchten Wälder**. Zwischen 43 und 47°S dominieren die **Nordpatagonischen immerfeuchten Wälder** und weiter südlich abschließend die **Magellanischen immerfeuchten Wälder** (Veblen *et al.* 1997).

Jährliche Niederschlagsmengen von über 1400 mm/a und mittlere Höchsttemperaturen von nicht mehr als 16°C sind Voraussetzungen für die Entwicklung gemäßigter immerfeuchter Wälder (Alaback 1991). Eine genauere Beschreibung der lokalen klimatisch-topographischen Bedingungen erfolgt in Kapitel 2.3.3. Die Vegetation der gemäßigten immerfeuchten Wälder in Südamerika besteht nach Arroyo *et al.* (1997) aus folgenden Gruppen:

1. Ein Anteil von 34 % ist endemische Vegetation, welche ausschließlich in den phytographischen Regionen Chiles vorhanden ist.
2. Ein Anteil von 25 % besteht aus neotropischer Vegetation, die bis in tropische Zonen hineinreicht.
3. Der größte Anteil von 38 % besteht aus Vegetation gondwanischen Ursprungs, die ebenfalls in Australien, Tasmanien, Neuseeland und in weiteren gondwanischen Gebieten zu

finden ist. Zu diesem Kontingent gehört unter anderem die Gattung *Nothofagus*, die ausschließlich in der Südhemisphäre vorkommt. 75 % der *Nothofagus*-Wälder mit 31 Arten befinden sich in Australasien und lediglich 25 % mit 9 Arten in Südamerika. Aufgrund von Fossilfunden von *Nothofagus* aus dem Tertiär auf dem antarktischen Kontinent wird angenommen, dass *Nothofagus*-Bestände der australasiatischen und der südamerikanischen Kontinente einst verbunden waren (Melville 1973).

4. Die eingeführte Vegetation aus angrenzenden Ökosystemen macht nur einen sehr kleinen Anteil der Gesamtvegetation aus.
5. Ein weiterer sehr kleiner Anteil an Gattungen wurde aus borealen Zonen der Nordhemisphäre eingeführt.

Die Gattung *Nothofagus* ist die einzige Gattung der Familie der Nothofagaceen. Sie gehört zu der Ordnung der Fagales, der Klasse der Rosopsida, und ist eine Angiospermae. Diese urtümliche, sehr isolierte und bis in die Kreideperiode zurückgehende südhemisphärisch-antarktische Familie verknüpft die Familie der Fagaceae mit der Familie der Betulaceae (Ehrendorfer 1998).

In Südamerika existieren 9 Arten der Gattung *Nothofagus*: *N. alessandrii*, *N. glauca*, *N. alpina*, *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *N. pumilio*, *N. antartica*, *N. nitida* und *N. betuloides* (Abb. 2.1). Von diesen Arten existieren auch einige Hybriden: *N. glauca* X *obliqua* = *N. leoni* (Donoso & Landrum 1979), *N. obliqua* X *alpina* (Donoso *et al.* 1990), *N. dombeyi* X *nitida*, *N. dombeyi* X *betuloides* und *N. nitida* X *betuloides* (Donoso & Aienza 1983). Diese Arten verteilen sich in Südamerika vom 33. bis zum 56. Breitengrad Süd und bilden integrale Bestandteile der gemäßigten Wälder dieser Region.

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, wachsen die aufgeführten *Nothofagus*-Arten präferentiell unter bestimmten geographischen Bedingungen. Die am weitesten nördlich vorkommende *Nothofagus*-Art ist *N. glauca*. In *N. glauca*-Wäldern sind Baumgruppen von *N. alessandrii* zu finden. Beide wachsen in mittleren Höhen und werden sowohl an der oberen als auch an der unteren Grenze von *N. obliqua* eingegrenzt. Weiter südlich wachsen der Höhe nach *N. obliqua*, *N. alpina*, *N. dombeyi*, *N. pumilio* und *N. antartica*. Ganz im Süden bilden ebenfalls *N. obliqua* und *N. antartica* den Extrembewuchs. In mittleren Höhen wachsen hier *N. nitida* und *N. betuloides*.

Im Gegensatz zu den gemäßigten Wäldern Nordamerikas dominieren in den südamerikanischen gemäßigten Wäldern immergrüne Pflanzen (Arroyo *et al.* 1997). In Südamerika bildet die Gattung *Nothofagus* jedoch eine Ausnahme, da ihr bei 6 sommergrünen nur 3

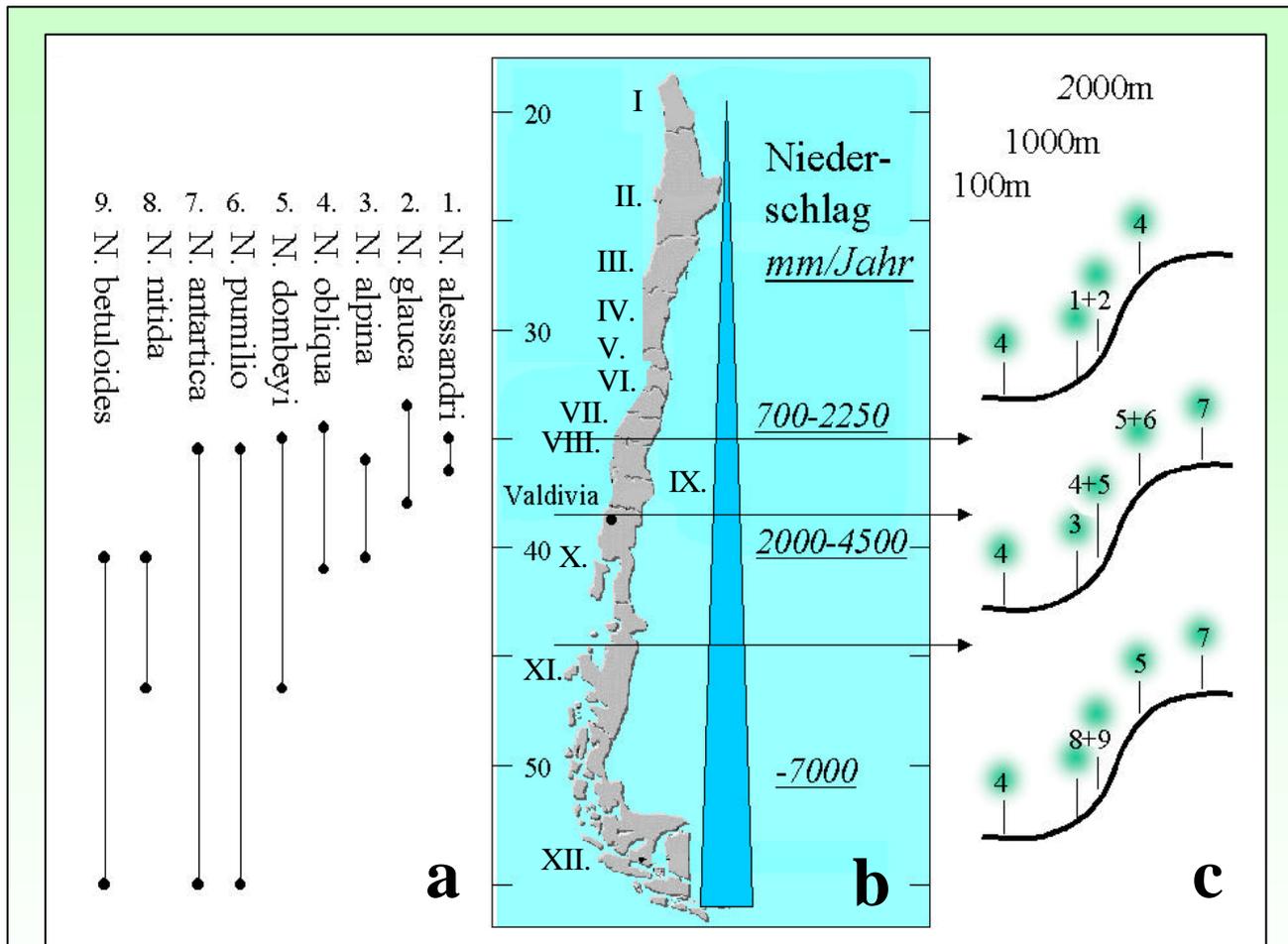


Abb. 2.1: *Nothofagus*-Arten in Chile. [a]: Verteilung von *Nothofagus*-Arten in Abhängigkeit des Breitengrades. [b]: Jährliche Niederschlagsmengen in Abhängigkeit des Breitengrades. [c]: Verteilung von *Nothofagus*-Arten in Abhängigkeit des Breitengrades und in Abhängigkeit der Wachstumshöhe über dem Meeresspiegel (modifiziert nach Donoso 1995).

immergrüne Arten gegenüberstehen (*N. dombeyi*, *N. nitida* und *N. betuloides*). In Gebieten mit hauptsächlich sommergrünen *Nothofagus*-Wäldern bilden die immergrünen Arten aber immer noch bedeutende Anteile. In Australasien stehen hingegen einer sommergrünen Art 31 immergrüne Arten gegenüber (*N. gunni* in Tasmanien). Donoso (1995) definiert in Chile 12 unterscheidende Waldarten. In 10 von ihnen dominieren *Nothofagus*-Bestände. In den verbleibenden 2 stellen sie noch bedeutende Anteile dar.

Die geschätzten Flächen an nativen Wäldern, die in Chile zur nachhaltigen Forstwirtschaft genutzt werden, betragen etwa 7.611.900 ha (Holzvolumen von ca. $940 \cdot 10^6 \text{ m}^3$). Fast 50 % davon befinden sich in der X. Region Chiles (zwischen 39° und 45°S , s. Abb. 2.1 und Kap. 2.3.1). Auf diesem Flächenanteil von etwa 50 % befinden sich fast 80 % des gesamten Holzvolumens Chiles. Dieses Holzvolumen setzt sich hauptsächlich aus *Nothofagus*-Arten zu-

sammen, gefolgt von *Fitzroya cupressoides*, *Pilgerodendron uviferum* und anderen immergrünen Arten (Donoso & Lara 1997).

2.2.2 Die Agaricales Chiles: Ektomykorrhizapartner von *Nothofagus*

Untersuchungen der Agaricales *s. l.* in Chile fanden ihren Anfang im 19. Jahrhundert mit den Arbeiten von Bertero (1828, 1829). Es folgten Sammlungen von europäischen Expeditionsreisenden (unter ihnen auch Darwin). Die Analysen dieses Materials erfolgten durch Montagne (1853), Berkeley (1841, 1842, 1847, 1877), Hariot (1889), Philippi (1869), Bresadola (1900), Bommer & Rousseau (1900) und Romell (1926). Der italienisch-argentinische Wissenschaftler Spegazzini beschrieb die chilenischen Agaricales in seinen Werken zwischen 1910 und 1925.

Während der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde insbesondere mit den Arbeiten von Singer, z. B. mit der grundlegenden taxonomischen Arbeit „**Mycoflora Australis**“ (Singer 1969), ein wichtiger Schritt zur Erforschung der Agaricales des *Nothofagus*-Arealen getan. Für *Cortinari*-Arten ist die Veröffentlichung von Moser & Horak (1975) von Bedeutung. Horak leistete darüber hinaus mit „*Fungi, Basidiomycetes. Agaricales y Gasteromycetes secotioides*“ (Horak 1979a) und seiner Untersuchung über *Boletus*-Arten in der Region um Valdivia (Horak 1977) einen bemerkenswerten Beitrag.

Unter den chilenischen Mykologen ist Espinosa mit seinen Arbeiten aus der Zeit von 1915-1940 hervorzuheben (s. insb. 1926, 1937). Lazo untersuchte ab 1966 hauptsächlich das Zentralgebiet Chiles (s. insb. 1982, 1983, 1984). Donoso forschte in Chile insbesondere mit *Agaricales lignicols* (1981a, 1981b). Die erwähnten Arbeiten widmen sich vor allem isolierten taxonomischen Untersuchungen der Fruchtkörper. Einige Autoren gehen auch sehr kurz auf den Habitus ein und klassifizieren die Agaricales als saprophytische oder Mykorrhizenbildende Pilze.

Mykosoziologische und ökologische Untersuchungen über Assoziationen zwischen Agaricales *s. l.* und den *Nothofagus*-Arten Südamerikas sind kaum vorhanden. Singer & Morello (1960) führten hierzu erste Versuche durch. Singer (1971), Wright (1988) und Godeas *et al.* (1993a, 1993b, 1993c) widmeten sich dem andino-patagonischen Gebiet. Garrido (1985) erbrachte mit seiner Arbeit „*Index Agaricalium Chilensium*“, mit seiner Arbeit über die Agaricales Zentralchiles und mit zahlreichen Veröffentlichungen über Agaricales in Assoziation mit *P. radiata*-Pflanzungen einige herausragende Beiträge.

Systematisch-ökologische und mykosoziologische Untersuchungen für das Gebiet um Valdivia existieren hauptsächlich für die Region der Küstenkordillere (Singer & Moser 1965 und **Valenzuela 1993**, s. Kap. 2.3.3). Valenzuela erstellte dabei einen Katalog und eine systematische taxonomische, chorologische und ökologische Untersuchung der Agaricales *s. l.* in den nativen *Nothofagus*-Wäldern der X. Region.

Ektomykorrhizen zwischen Agaricales *s. l.* und *Nothofagus*-Arten wurden bislang nur hinsichtlich der Vegetationsbedingungen untersucht, welche die wachsenden Pilzarten definieren. Über anatomische und histologische Strukturierung von Mykorrhizen der *Nothofagus*-Arten Südamerikas ist bisher kaum etwas bekannt. Garrido (1988) beschrieb als erster Autor morphologische und anatomische Charakteristiken von *Nothofagus*-Arten. Er synthetisierte im Labor Ektomykorrhizen mit Reinkulturen von *Amanita muscaria*, *Paxillus involutus* und *Paxillus statuum* (vergl. neue Nomenklatur in Kap. 4.2.1).

In Chile führten erstmals Palfner (1996, 1997) und Palfner & Godoy (1996a, 1996b) morphologische und anatomische Beschreibungen von Ektomykorrhizen in ihrem natürlichen Habitat durch. Darunter: *N. pumilio* / *Thaxterogaster albocanus*, *N. alpina* / *Descolea antartica*, *N. pumilio* / *Nothofagihiza vinicolor* und *N. pumilio* / *Russula fuegiana*. Godoy & Palfner (1997) beschrieben außerdem die Ektomykorrhizen-Assoziationen von *N. dombeyi* / *Laccaria laccata* und *N. alpina* / *Paxillus involutus*. *Cenococcum geophilum*, der häufigste Ektomykorrhizapilz, der sowohl in der südlichen als auch in der nördlichen Hemisphäre auftritt, wurde vom morphologisch-anatomischen Standpunkt bei der Bildung von Ektomykorrhizen mit *Nothofagus* von Garrido (1988) und Flores *et al.* (1997) charakterisiert. Garrido (1988) weist auf 621 Mykobionten als mögliche Ektomykorrhizapartner für *Nothofagus* hin.

Die morphologische und anatomische Charakterisierung der Ektomykorrhizen von *Nothofagus*-Arten ist demnach noch ein recht offenes Arbeitsgebiet, in dem es noch viel Grundlegendes zu beschreiben und zu definieren gilt.

2.3 Das Untersuchungsgebiet

2.3.1 Die Lokalisierung des Untersuchungsgebietes

Chile ist politisch in XII. Regionen unterteilt (Abb. 2.1). Das Gebiet, auf das sich alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beziehen, trägt den Namen Quita Calzón.

Es befindet sich in der X. Region, nahe der Stadt Valdivia, 39°78' südlicher Breite und 73°02' westlicher Länge (s. Abb. 2.1 und Abb. 2.2).

In diesem Gebiet wird die ursprüngliche Vegetation von *N. obliqua* bestimmt (Kap. 2.3.2). Anthropogene Einflüsse bewirken noch immer, dass die bestehenden Waldflächen mit *N. obliqua* zurückgedrängt werden und durch Pflanzungen von *Pinus radiata* und *Eucalyptus globulus* ersetzt werden (s. Kap. 2.3.2.1).

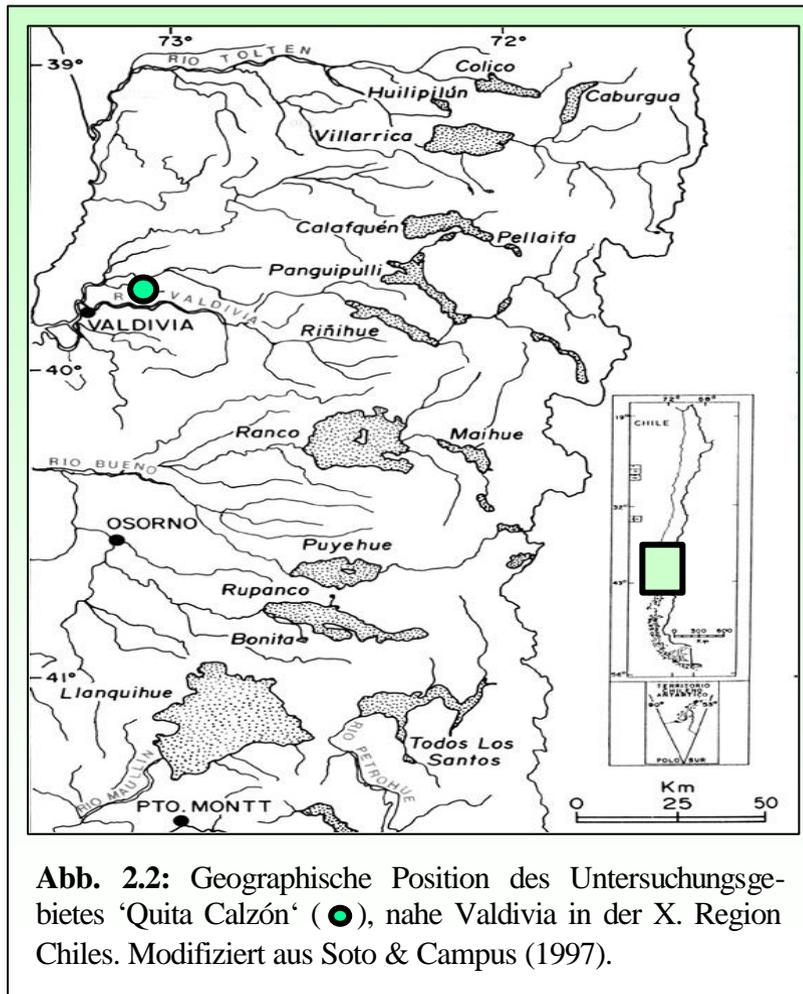


Abb. 2.2: Geographische Position des Untersuchungsgebietes 'Quita Calzón' (●), nahe Valdivia in der X. Region Chiles. Modifiziert aus Soto & Campus (1997).

Außerdem sind Vieh- und Landwirtschaft in diesem Gebiet stark konzentriert. Folgende Flächen wurden für Untersuchungen ausgewählt:

1. Flächen mit nativer Waldvegetation des Typs *Nothofago-Perseetum lingueae* (s. Kap. 2.3.2).
2. Flächen mit Monokulturpflanzungen von *Pinus radiata*. Alter: 15 Jahre.
3. Flächen mit Monokulturpflanzungen von *Eucalyptus globulus*. Alter: 10 Jahre.
4. Landwirtschaftlich genutztes Weideland.

2.3.2 Native Vegetation: *Nothofago-Perseetum linguae*

Die Vegetation der nativen Wälder des Untersuchungsgebietes Quita Calzón lässt sich phytosoziologisch als teilweise sommergrüne Mischwaldassoziation klassifizieren. Sie gehört



Abb. 2.3: Native Vegetation: *Nothofago-Perseetum linguae* in Quita Calzón.

zu der Gruppe der *Nothofago-Perseetum linguae*, welche auch unter der Bezeichnung “Roble-Laurel-Lingue“ bekannt ist (Tomaselli 1981, San Martín & Ramirez 1987). Eine synökologische Studie über *Nothofago-Perseetum linguae* der Zentral- bis südlichen Region Chiles wurde 1991 von San Martín *et al.* veröffentlicht.

Die Wälder erreichen Wipfelhöhen bis zu 40 m und sind zu bedeutenden Anteilen aus *Nothofagus obliqua* (Roble) zusammengesetzt. *Laurelia sempervirens* (Laurel) und *Persea lingue* (Lingue) tragen mit ihren immergrünen Wipfeln, insbesondere in der mittleren Baumschicht, bedeutend zum Erscheinungsbild der Pflanzengemeinschaft bei (s. Abb. 2.3).

Da der Mensch in entscheidender Form den Charakter dieser Waldgebiete geprägt hat und auch noch weiterhin prägen wird, soll an dieser Stelle zusammenfassend auf die wichtigsten historischen Zusammenhänge eingegangen werden.

2.3.2.1 Anthropogene Einflüsse auf die native Vegetation Südchiles

Frühe Funde menschlicher Überreste in den walddreichen Regionen werden auf das Jahr 9000 bc. datiert (Mooney 1977). Der Einfluss dieser Menschengruppe auf die Pflanzensoziologie der Zone wird jedoch gemeinhin als gering angenommen (Rundel 1981).

Sicherer wird die Geschichtsschreibung mit der Ankunft der Spanier in der Zentral-Südlichen Region. Es wird von etwa 1 Million Bewohnern, den "Huilliches" (Süd-Menschen), berichtet. Diese Siedler bewirtschafteten von ihnen gerodetes Land durch Ackerbau und durch großflächige Weiden, auf denen sie Guanacos züchteten (Donoso 1995).

Nachdem die Spanier nahezu die gesamte Gemeinschaft der Huilliches entweder vertrieben oder ermordet hatten, wurden durch Brandrodung weitere Flächen zum Ackerbau und zur nun eingeführten Viehzucht nutzbar gemacht. Holz wurde ebenfalls zur Konstruktion und als Brennstoff verwendet. Insbesondere *N. obliqua* wurde selektiv wegen seiner guten Eigenschaften für Konstruktionszwecke geschlagen (Mooney *et al.* 1972, Saelzer 1977).

Teile des Landes (insbesondere der Regionen zwischen Concepción und Valdivia) wurden jedoch bald von Gruppen des indigenen Stammes der Mapuches vollständig zurückerobert, was zur Folge hatte, dass sich die Waldgebiete über eine Dauer von 3 Jahrhunderten fast ungestört regenerieren und entwickeln konnten.

Mit der Ankunft vorwiegend deutscher Siedler ab 1856 wendete sich jedoch das Blatt wieder und durch intensive und großflächige Brandrodungen wurden die Waldgebiete erneut entscheidend zurückgedrängt (Wilhelm 1968). Die Mapuches leisteten noch bis zum Jahr 1881 Widerstand. Nach deren vollständiger Niederlage rodeten schweizer und italienische Siedler mehr als 300.000 ha Wald und betrieben durch Monokulturen geprägten Getreideanbau. Diese Wirtschaftsform hatte großskalige Erosionsbewegungen zur Folge, von deren Auswirkungen sich bis heute noch nicht alle Gebiete erholt haben (Cunill 1970).

Die forstwirtschaftliche Nutzung der Restbestände der Naturwälder erfolgte bis etwa 1970 ohne durchgreifende Regulierungen. Zwar wurden verschiedentlich gesetzliche Maßnahmen zur Eindämmung der Misswirtschaft und zur regulierten Wiederaufforstung unternommen (erstmalig 1931), sie wurden jedoch kaum durchgesetzt (Donoso 1995). Insbesondere die Einführung von *Pinus radiata* als Nutzholz (welche auf die Jahre 1880 bis 1890 zurückgeht) veränderte weiträumig den Charakter der Waldgebiete (Donoso 1983). 1971 waren die Naturwälder auf wenige unzugängliche Gebiete zurückgedrängt.

Erst seit 1971 veränderte sich langsam das Bewusstsein und die Einstellung der chilenischen Bevölkerung hinsichtlich der Nutzung der Waldgebiete. Erste universitäre Forstprojekte

zur nachhaltigen Forstwirtschaft wurden initiiert, und es wurden Flächen zur Wiederherstellung der nativen Vegetation ausgewiesen (Donoso & Lara 1997).

Auch im Jahr 2001 besteht der landschaftliche Charakter noch aus großflächigen Weiden sowie aus Anpflanzungen von Monokulturen mit *P. radiata* und *E. globulus*. Die als „nativ“ bezeichneten Waldflächen setzen sich zu großen Anteilen aus den Arten *N. obliqua* und *L. sempervirens* zusammen (Ramirez *et al.* 1989).

Der Grund, warum auch bereits seit mehreren Jahrzehnten sich selbst überlassene Waldflächen noch eine alterierte Artenzusammensetzung zeigen, ist folgender: Es werden etwa 400 Jahre benötigt, damit Waldgebiete von *Nothofago-Perseetum linguae* ein sozioökologisches Gleichgewicht erreichen (Donoso 1995, Armesto *et al.* 1998). Daher sind Flächen, in denen von einem solchen Gleichgewicht ausgegangen werden kann, nicht vorhanden.

2.3.2.2 Die Sonderrolle von *N. obliqua* als Pionierpflanze

Vor dem Hintergrund der Dynamik der Pflanzengemeinschaften in Waldgebieten von *Nothofago-Perseetum linguae* nimmt *N. obliqua* eine Sonderrolle ein. *N. obliqua* besitzt Eigenschaften einer Pionierpflanze mit einer ausgeprägten Toleranz für extreme Bedingungen (Ausnahme Schatten). Nach Waldbränden oder Rodungen besiedelt *N. obliqua* freie Flächen in etwa 10 Jahren. Insbesondere durch schnelle Samenkeimung und Sämlingsentwicklung, aber auch durch die Fähigkeit, aus noch intakten Baumstümpfen neu auszutreiben, erreichen *N. obliqua*-Bestände bereits nach 30 bis 40 Jahren ihre natürliche Größenverteilung.

Durch das Wachstum unter diesen "extremen" Bedingungen schafft *N. obliqua* erst die nötigen Voraussetzungen, die andere ehemals vorhandene Arten für ihre Entwicklung benötigen (z.B. *L. sempervirens*, *P. lingue* und *Aextoxicon punctatum*). Durch ihre Eigenschaft, sich auch in stärkeren Schattenzonen entwickeln zu können, besitzen *L. sempervirens*, *P. lingue* und *Aextoxicon punctatum* einen Wachstumsvorteil und verdrängen *N. obliqua* als dominante Art (Donoso 1995). Die Vorkommen von *N. obliqua* in den gemäßigten immerfeuchten Wäldern sind demnach stark von größeren, aber auch kleineren Naturkatastrophen abhängig (Veblen & Ashton 1978, Veblen 1985, Veblen *et al.* 1997).

2.3.3 Topographische und klimatische Bedingungen

Die Region um Valdivia kann in West-Ost-Richtung geomorphologisch in drei klar voneinander abgesetzte tektonische Elemente gegliedert werden:

1. Im Westen liegt die **Küstenkordillere** (mit maximalen Erhebungen von 2000 m bei 38°S und 800 m bei 42°S).

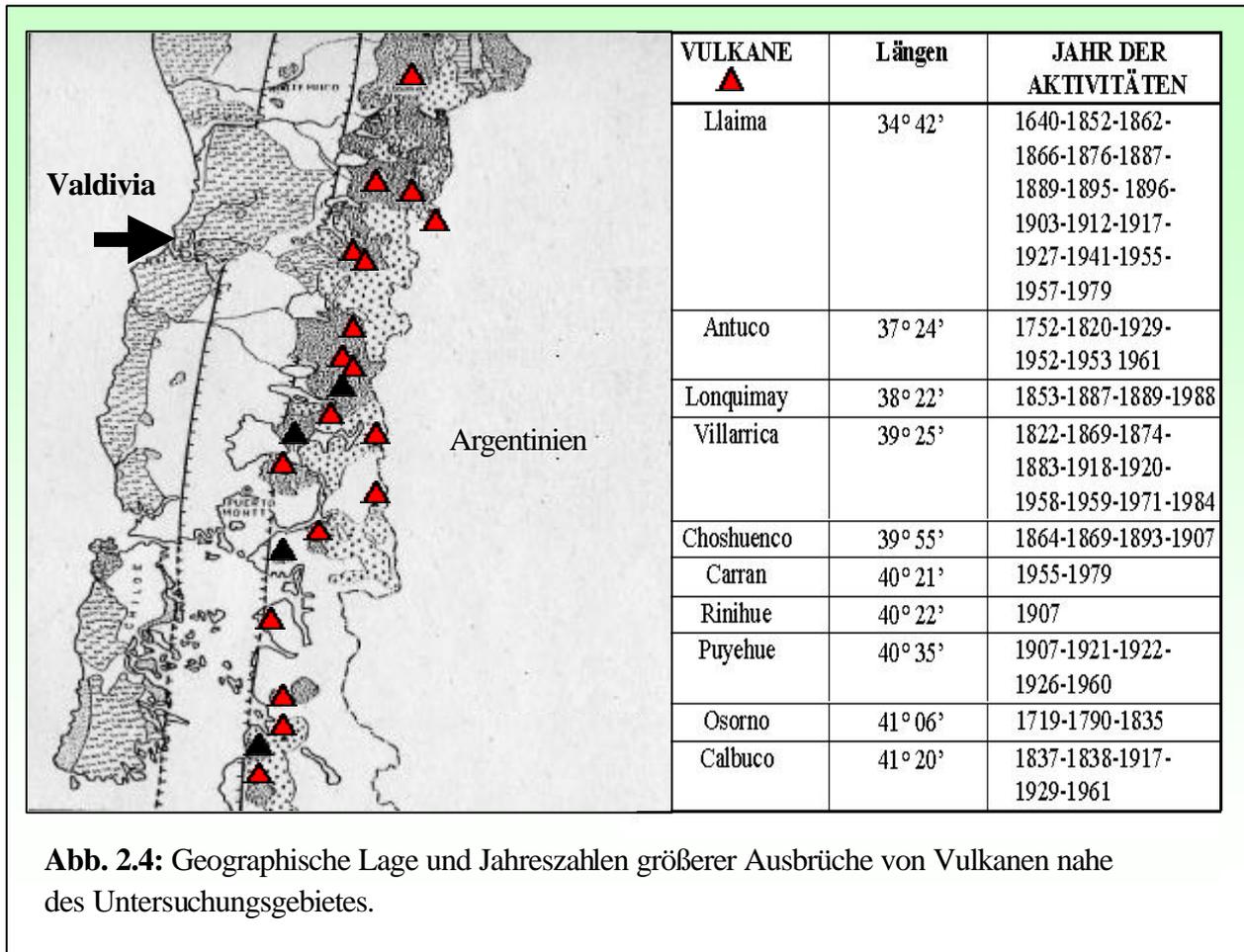


Abb. 2.4: Geographische Lage und Jahreszahlen größerer Ausbrüche von Vulkanen nahe des Untersuchungsgebietes.

2. Weiter im Osten befindet sich die **Längstalsenke** (*Valle Central*), eine landwirtschaftlich sehr stark genutzte, fruchtbare Zone.
3. Als drittes tektonisches Element schließt sich östlich die **Andenkordillere** an. Sie übersteigt in ihrer Höhe 3000 m und schließt aktive Vulkane mit ein (Abb. 2.4).

Das Untersuchungsgebiet wird den gemäßigten immerfeuchten Wäldern zugeordnet (vergl. Kap. 2.2.1). Im Sommer wie im Winter kommt es zu starken Niederschlägen, welche ihr Maximum im Herbst und im späten Winter erreichen (Huber 1975, Armesto *et al.* 1997). Die Niederschläge fallen vorrangig an den Westhängen der Küsten- und der Andenkordillere und nehmen von Norden nach Süden hin stetig zu (1.500 mm bei 39°S bis 4.500 mm bei 47°S, Di Castri & Hajek 1976, s. Abb. 2.1). Auch im Verlauf der tektonischen Elemente kommt es von Westen nach Osten zu starken Niederschlagsvariationen. Sie erreichen bei 40°S an der Küstenkordillere jährlich zwischen 3000-4000 mm, reduzieren sich in der Längstalsenke auf lediglich 1.400-2.500 mm und verstärken sich erneut an der Andenkordillere auf 4.500-5000 mm (Veblen *et al.* 1997).

Da die Wolkenbildung größtenteils über dem Pazifischen Ozean erfolgt, ist die Wasserqualität aufgrund vernachlässigbarer anthropogener Einträge eine der reinsten der Erde. Wegen beider Gebirgsbarrieren findet zwischen dem Pazifischen Ozean und dem Südamerikanischen Kontinent ein sehr eingeschränkter Luftmassenaustausch statt.

Von bestimmender Bedeutung für das Klima in Süd- und Mittelchile ist darüber hinaus das weltweit größte Auftriebsgebiet ozeanischen Tiefenwassers vor der chilenischen Küste, welches mit den antarktisch geprägten Wassermassen des Humboldtstroms interferiert. Als Folge davon variieren die Wassertemperaturen an der valdivianischen Küste zwischen Sommer und Winter lediglich um etwa 1°C (12 bis 13°C). Die Wassermassen bilden so einen bedeutenden, stabilen Temperaturpuffer mit einem bestimmenden Einfluss auf das Festlandsklima. Die Lufttemperaturen schwanken in ihren Extremen zwischen Sommer und Winter um nicht mehr als 20°C, die mittleren Jahrestemperaturen in den Regionen um das Untersuchungsgebiet liegen zwischen 10 und 15°C.

Es herrscht eine gleichmäßige, hohe Luftfeuchtigkeit mit einer starken Tendenz zur Nebelbildung, welche einen guten Schutz vor Waldbränden darstellt (Arroyo *et al.* 1997). In anderen Erdteilen haben Waldbrände einen bestimmenden Einfluss auf die Ökologie großer Waldgebiete. Die stabilen klimatischen Bedingungen zeichnen die gemäßigten immerfeuchten Wälder Chiles in besonderer Weise aus und müssen bei Vergleichen mit anderen Waldgebieten unbedingt berücksichtigt werden (Axelrod 1992). Sie werden auch nicht von großskaligen meteorologischen Ereignissen, wie dem "El Niño"-Phänomen, beeinflusst, welcher weiter nördlich für Flora und Fauna relevante klimatische Abnormalitäten induziert.

Die klimatischen Eigenschaften der Region sind auch in Hinsicht auf die Bildung der aktiven Bodenkomponente Allophan wichtig (vergl. Kap.2.3.4.2). Denn die Bildung von Allophan in Böden aus vulkanischen Aschen ist nur unter der Voraussetzung ausreichender Feuchtigkeit und Drainage möglich. In aridem und auch in kaltem Klima bildet sich kein Allophan oder nur in geringer Menge (Besoain 1969, 1974).

2.3.4 Bodenbedingungen

Böden vulkanischen Ursprungs kommen auf allen Kontinenten der Erde vor. Sie werden definiert durch ihre Distanz zu den jeweiligen eruptiven Zentren, der Größe der Eruptionen, der regionalen Topographie, der Form der Verteilung des vulkanischen Materials sowie den klimatischen Bedingungen (Grez 1977).

Chile befindet sich in seiner ganzen Länge genau auf der Grenze zweier sich übereinander schiebender Kontinentalplatten (der Nasca- und der Südamerikanischen Platte). Die gesamte Region ist vulkanisch und tektonisch aktiv (Abb. 2.4). Besoain (1969) teilt Chile in zwei Sektoren ein, die hinsichtlich ihrer vulkanischen Aktivitäten charakterisiert sind. Zonen mit starken vulkanischen Aktivitäten befinden sich zum einen im Norden ($17^{\circ}20'$ - $27^{\circ}30'S$), zum anderen im Süden ($35^{\circ}15'$ - $45^{\circ}S$), wo auch das in dieser Arbeit behandelte Untersuchungsgebiet liegt (Kap. 2.3.1). Die vulkanische Aktivität hatte im Tertiär ihr Maximum und verringerte sich bis zum Quartär (Veit & Garleff 1997). Momentan befinden sich noch 21 aktive Vulkane auf chilenischem Gebiet.

Wegen der geographischen Verteilung der aktiven Zentren sowie der Stärke ihrer Aktivität ist ein großer Anteil des chilenischen Territoriums mit Böden vulkanischen Ursprungs bedeckt. Im Süden Chiles dominieren basische Basalt-Böden mit hohen Anteilen an Siliziumoxids (45 bis 52 %, Fassbender 1975). Sie enthalten darüber hinaus vulkanisches Glas, Augit, Magnetit, Hornblende, Olivin, Orthoklas, Plagioklas, Quarz und weitere Mineralien (Moreno 1974). Ebenfalls Folge vulkanischer Aktivitäten sind die hohen Konzentrationen an Aluminium, Schwefel und Eisen. Verschiedene Bodentypen können durch unterschiedliche Verwitterung des vulkanischen Materials entstehen.

2.3.4.1 Bodentypen

Als Oberbegriff für Bodenbildungen aus rezenten Aschen vulkanischen Ursprungs wird im Allgemeinen "Andosol" (Greze 1977, FAO-UNESCO 1971, 1988) oder auch "Andepts" (USDA Soil Survey Staff 1975, Rovira 1984) verwendet. Der Hauptanteil der Böden in der Region des Untersuchungsgebietes besteht aus schwach entwickelten Böden unterschiedlicher Entwicklungsstufen. Die Entwicklung dieser Böden erfolgte aus Andosolen, die ihren Ursprung wahrscheinlich während des Postglazial / Holozän haben (Laugénie *et al.* 1975).

Die jüngsten in der Region des Untersuchungsgebietes vorkommenden Andosole werden als "Ranker-Andosole" bezeichnet (Greze 1977). Aufgrund deutlicher Humusakkumulationen wird dieser Bodentyp auch "Humus-Andosol" genannt. In ihnen weist das Gestein graue bis violette Farbtöne auf.

Andosole mittlerer Entwicklungsstufe, die in dieser Region vorkommen, entsprechen dem Typ "Brauner Andosol". Sie sind in Chile unter der Bezeichnung "Trumao Böden" bekannt, was in der indigenen Mapuche-Sprache "Staubanhäufung" bedeutet. Es kommen ebenfalls Andosole aus älteren Entwicklungsstadien vor, die unter "Rotbrauner Andosol" bekannt sind. Andosole mit einer Entwicklungszeit von mehr als 2000 Jahren weisen in der Regel eine

rotbraune bis rotviolette Verwitterungsfarbe auf. Sie werden nach Grez (1977) als "Roter Andosol" bezeichnet. In Chile ist dieser Bodentyp allgemein als "Rojos arcillosos" bekannt. Mit dieser Bezeichnung muss allerdings vorsichtig umgegangen werden, da unter "Rojos arcillosos" auch die seltener vorkommenden Rotlehme zusammengefasst werden, die nicht vulkanischen Ursprungs sind. Außerdem werden als "Rojos arcillosos" ebenfalls Rotlehme vulkanischer Aschen aus dem Pleistozän bezeichnet, die Schlatter (1999) unter der Bezeichnung "Ultisol" führt.

Weitere Bodentypen, die nahe des Untersuchungsgebietes vorkommen und gleichfalls aus rezenten vulkanischen Sedimenten entstanden sind, werden unter den Bezeichnungen "Acuepts" (USDA Soil Survey Staff 1975, Rovira 1984), "Placandeps" (Mella & Kühne 1985) und "Gleysole" (FAO-UNESCO 1971) klassifiziert. Diese Böden tragen in Chile den Namen Ñadis-Böden und befinden sich bevorzugt in Niederungen (Veit & Garleff 1997).

2.3.4.2 Allophan

Die Hauptverteilung von Allophanen liegt in Gebieten vulkanischen Ursprungs im circumpazifischen Raum, vorwiegend in Japan, auf den Philippinen, in Indonesien, Mexiko, Ecuador, Peru und Chile, jedoch auch in Kamerun, Ostafrika und auf Island. In Deutschland finden sich Allophane in der Eifel und in einigen anderen Mittelgebirgen (Sakr & Meyer 1970, Scheffer & Schachtschabel 1998). Allophane sind wasserreiche, sekundäre Aluminiumsilicate mit einem Si/Al-Molverhältnis zwischen 0,5 und 1, zum Teil bis 4. Allophane entstehen durch Verwitterung frisch gefallener vulkanischer Aschen unter humiden Bedingungen. Der spezifische Verwitterungsprozess wird im Folgenden kurz zusammengefasst (Freiberg 1985):

- Frisch gefallene Aschen reagieren wegen schwefelhaltiger Anteile zunächst stark sauer. Da die sauren Elemente durch Regenwasser relativ einfach herausgelöst und verfrachtet werden können, erhöht sich der pH-Wert und es entsteht ein fast neutrales Milieu.
- In Ascheteilchen mit einem hohen Oberflächen/Volumen-Verhältnis und hoher innerer Drainage schreitet die Verwitterung, insbesondere durch humides Klima, rasch voran (s. Kap. 2.3.3). Es findet ein Basenaustrag aus den Aschen statt, wodurch der pH-Wert des Bodens erneut sinkt. Es werden Si- und Al-Gele gebildet, die sich zu Allophan verbinden.
- Die Weiterentwicklung des Allophans verläuft über hydratisiertes Metahalloysit und Gibbsit schließlich zum Kaolinit.

Der Anteil von Allophan in Böden hängt demnach stark vom Fortschritt des Verwitterungsprozesses und damit vom Alter eines Bodens ab. In jungen Bodentypen des Typs Andosol-Ranker (vergl. Kap. 2.3.4.1) ist somit der Anteil an Allophan noch sehr gering und es dominieren die Primärminerale (u.a. vulkanisches Glas und Feldspat). Als eine Hauptkomponente der Tonfraktion erreicht Allophan einen maximalen Anteil in Braunen Andosolen. In Braunen Andosolen ist das Gibbsit und/oder Metahalloysit noch relativ wenig vorhanden. Die Fraktion an Gibbsit / Metahalloysit steigt in Rotbraunen Andosolen schließlich durch Verwitterung des Allophananteils an. Roter Andosol enthält letztendlich einen überwiegenden Anteil an Gibbsit / Metahalloysit (Grez 1977).

Die Struktur der Allophane besteht aus Hohlkugeln mit mittleren Durchmessern von 3,5 bis 5 nm und äußeren Wandstärken zwischen 0,7 und 1 nm. Die Wände dieser Hohlkugeln bestehen aus gebogenen Al-O-OH-Oktaederschichten. An Innen- und Außenseiten dieser Wände sind unvollständige Si-O-OH-Tetraederschichten über O-Brücken gebunden (Scheffer & Schachtschabel 1998). Die Kristallordnung erstreckt sich bei Allophan nur über den sehr kleinen Bereich der Hohlkugeln (Nahordnung). Daher werden Allophane im Gegensatz zu den anderen Tonmineralen oft als amorph bezeichnet. Ebenfalls im Gegensatz zu anderen Tonmineralien besitzen Allophane keine permanenten Oberflächenladungen, sondern adsorbieren in Abhängigkeit vom pH-Wert und auch von der Salzkonzentration unterschiedliche Mengen an Kationen oder Anionen. Der Ladungsnullpunkt des Allophans liegt zwischen pH 6 und 7. Da es demzufolge im sauren pH-Bereich vorwiegend positive Ladungen trägt, werden zum Ausgleich vorzugsweise Anionen adsorbiert (Scheffer & Schachtschabel 1998).

Aufgrund der hohen Ionen-Austauschkapazität adsorbieren Allophane insbesondere für Pflanzen verfügbares Phosphat (vorwiegend primäres Phosphat: H_2PO_4^-). Allophane adsorbieren aber nicht nur lösliches Phosphat, sie wandeln es darüber hinaus in für die Pflanze unzugängliche Variscit- oder Strengitmineralien um (Lindsay *et al.* 1989). Diese phosphathaltigen Minerale werden in die Umgebung abgegeben. So entsteht am Allophanteilchen Platz für eine erneute Adsorption. Es handelt sich also nicht nur um eine Sättigungsreaktion, sondern um eine Katalysatorreaktion, welche dem Boden ständig Phosphate entziehen kann. Böden, in denen eigentlich genügend große Mengen an Phosphat vorhanden sind, verlieren so große Anteile an für die Pflanze nutzbarem Phosphat, und auch bei zusätzlicher Phosphatdüngung wird ein wesentlicher Anteil in unlösliche Verbindungen umgewandelt (Zunino & Borie 1985). Durch die pH-Wert-abhängige Adsorptionskapazität von Allophan wird allerdings der Humusanteil in Böden erhöht. Es kommt zur Bildung von Humus-Allophan-Komplexen großer Stabilität.

2.4 Der Mineralstoff Phosphor als Nährelement der Pflanze

Dem Makronährelement Phosphor kommt neben dem Stickstoff eine grundlegende Bedeutung bei der Regulierung des Pflanzenwachstums zu. Phosphor trägt ca. 0,2 % zum Trockengewicht von Pflanzen bei und spielt eine wichtige Rolle als Baustein biologisch aktiver Moleküle. Eine Regulierung der zellulären Energieversorgung, die Weitergabe von Erbinformation oder die Aufrechterhaltung der Membranintegritäten sind ohne Phosphor nicht denkbar. Phosphor ist u.a. Bestandteil von Nukleotiden und deren Derivaten, von Nukleinsäuren, Zuckerphosphaten, Phospholipiden, Enzymen und von dem Phytin der Aleuronglobuline.

Trotz der unangefochtenen Relevanz dieses Nährelements für Pflanzen sind verschiedene Aspekte der Phosphataufnahme und des Phosphattransports noch unzulänglich geklärt. Dies hat zunächst seine Ursache in der Vielfalt der Verbindungen, in denen Phosphor in Böden anzutreffen ist (s. Kap. 2.4.1). Daraus resultiert, dass Pflanzen große Anpassungsfähigkeiten besitzen müssen, um unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen bestehen zu können. Es existieren starke Hinweise, dass Pflanzen eine Auswahl an verschiedenen Phosphat-Transportern zur Verfügung steht, die je nach temporären und räumlichen Bedingungen exprimiert und so den äußeren Bedingungen möglichst optimal angepasst werden können (Schachtman *et al.* 1998).

2.4.1 Phosphor in Böden

Phosphor (P) liegt in Böden überwiegend in fester Form vor. Gebundenes P findet sich in anorganischen Salzen (Al-, Fe- oder Ca-Phosphaten), an Oberflächen von anorganischen Sorbenten gebunden (Fe- und Al-Oxide, Allophane, Kaolinit und Calcit), in organischen Verbindungen (Phytate, Nukleotid-Phosphate und Phospholipide) oder in Bodenorganismen (Scheffer & Schachtschabel 1998). Die organischen Verbindungen stellen dabei mit einem prozentualen Anteil von 20-80 % ein besonders wichtiges P-Reservoir dar (Richardson 1994). Die anorganische P-Fraktion beinhaltet etwa 170 verschiedene Mineralformen (Holford 1997). Die gebundenen Formen sind über Bodenlösungen miteinander verbunden. In diesen beträgt der P-Anteil allerdings nur etwa 0,1 % (Scheffer & Schachtschabel 1998). Gerade sie bilden aber die wesentlichen Phosphatfraktionen, die den Umsatz und die Anlieferung an die Pflanzenwurzel bestimmen. Phosphor wird von der Pflanze als Dihydrogenphosphat (H_2PO_4^-) unter sauren Bodenbedingungen und als Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) unter neutralen Bedingungen aufgenommen (Richter 1998). Abweichend von Nitrat- und Sulfat-Ionen wird das Phosphat-Ion jedoch nicht reduziert, sondern direkt vom pflanzlichen Organismus eingebaut.

Im Gegensatz zu wasserlöslichen Nährmineralien, wie beispielsweise dem Kalium, wird P nur zu einem unbedeutenden Anteil über den Wasserfluss transportiert. Es dominiert hingegen der recht langsame Transport über Diffusionsprozesse entlang von Konzentrationsgradienten (10^{-12} - 10^{-15} $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), wodurch auch die bekannten P-verarmten Zonen um Pflanzenwurzeln zu erklären sind (Schachtman *et al.* 1998). Aus diesen Erkenntnissen wird bereits klar, dass morphologischen Wurzelparametern aus einfachen geometrischen Gründen, wie der Optimierung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses, eine große Bedeutung bei der P-Aufnahme zukommt (Lynch 1995). Dieser Aspekt lässt bereits einen Vorteil von mykorrhizierten gegenüber unmykorrhizierten Pflanzenwurzeln für die P-Acquisition erahnen, auf die in Kapitel 2.4.2 genauer eingegangen werden wird. Aber auch ohne Mykorrhizierung können Wurzeln einiger Pflanzen auf P-Limitierung reagieren. Unter anderem geschieht dies durch Veränderungen der Wurzelmorphologie (z.B. Bildung von sog. Proteoid-Wurzeln). Außerdem können Pflanzenwurzeln durch Ausstoß organischer Säuren die pH-Werte in umliegenden Böden erniedrigen und die Bildung von Metall-Chelat-Komplexen fördern. P und weitere Nährstoffe werden dadurch freigesetzt und für die Pflanze verfügbar gemacht (s. z.B. Marschner 1995).

2.4.2 Die Bedeutung der Mykorrhiza für die Phosphataufnahme

Mykorrhizen können aus verschiedenen Gründen die Phosphataufnahme von Wirtspflanzen begünstigen. Hier ist zunächst ein Argument rein morphologischer Natur zu nennen: Die in Kapitel 2.4.1 bereits angesprochene Optimierung des Verhältnisses von Oberflächen zu Volumen durch Mykorrhizierung der Pflanzenwurzel. Insbesondere den abzweigenden Rhizomorphen kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu.

Über den morphologischen Aspekt hinaus üben Mykorrhizen aber auch biochemische Einflüsse auf den umgebenden Boden aus. Erste Beobachtungen, dass schlecht lösliches, an Bodenkomponenten gebundenes Phosphat durch Ektomykorrhizen (darunter auch die Mykorrhiza-Assoziation *P. radiata* / *C. geophilum*) absorbiert werden konnte, gehen auf Stone (1950) und Bowen & Theodorou (1967) zurück. Ansäuerungen des Bodens sowie ein vermehrtes Auftreten von Calcium-Oxalaten wurden von Cromack *et al.* (1979) im Bereich von Mykorrhizen festgestellt. Organische Säuren können mit Metallkomponenten Chelatbindungen eingehen und dadurch P von der Bindung an Fe und Al befreien (Smith & Read 1997).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in Bodenproben verstärkte Verwitterungserscheinungen festgestellt, welche durch aktive Oxalate in Hyphennähe hervorgerufen worden waren. Auch die Mykorrhiza-Assoziation *P. radiata* / *P. tinctorius* konnte P von unlöslichen

Aluminium-Phosphatverbindungen durch Ansäuerungen oder den Ausstoß von Zitraten adquiren (Cummings & Weinstein 1990). In oberflächennahen Waldböden, also gerade dort, wo auch die meisten Ektomykorrhizen lokalisiert sind, liegt P insbesondere in organischen Verbindungen vor (Harrison 1983). Darunter existiert P in Phosphormonoester-Verbindungen, wie den Phytaten (Inositol Hexaphosphat), aber auch als Phosphordiester, wie in Nucleinsäuren und Phospholipiden (Smith & Read 1997). Hier sind insbesondere enzymatisch aktive Komponenten der Mykorrhiza, wie Phosphomono- und Phosphodiesterasen, von hoher Bedeutung. Phosphomonoesterasen (oder Phytasen, erstmals direkt nachgewiesen von Theodorou 1968) können zunächst in drei Klassen eingeteilt werden, die **zytoplasmatischen**, die **extrazellulären** und die **oberflächengebundenen Phosphatasen**. Als extrazelluläre Phosphatasen werden dabei gemeinhin jene Enzyme bezeichnet, die von den produzierenden Zellen an ein äußeres Medium abgegeben werden. Unter oberflächengebundenen Phosphatasen hingegen werden verschiedene Unterfraktionen subsummiert:

1. Die membrangebundenen Phosphatasen (lokalisiert an der Plasmamembran von Zellen).
2. Die löslichen, an die Zellwand gebundenen Phosphatasen.
3. Die unlöslichen, an die Zellwand gebundenen Phosphatasen.

Unterschiedliche Autoren verwenden dabei verschiedene Behandlungsmethoden, um zwischen löslichen und unlöslichen Phosphatasen zu unterscheiden (NaCl, Ultraschallbehandlung, Enzymbehandlung, s. Straker & Mitchell 1986 und McElhinney & Mitchell 1993).

Durch die Beobachtung, dass die Aktivitäten von Phosphomonoesterasen unterschiedliche pH-Optima aufwiesen und außerdem in der Lage waren, nicht nur organische P-Verbindungen, sondern auch anorganische Pyrophosphatquellen zu erschließen, ließen bald die Vermutung auf die Existenz charakteristischer, sehr spezialisierter Enzymgruppen zu (Barlett & Lewis 1973). Ebenfalls wichtig war die Entdeckung der adaptiven Fähigkeiten von Mykorrhizen, sich an unterschiedliche Bodenbedingungen anzupassen. In diesem Zusammenhang wurde die Aktivität von Phosphatasen umgekehrt proportional zum verfügbaren Phosphatanteil in Böden festgestellt (Alexander & Hardy 1981), was allerdings nicht immer bestätigt wird (Straker & Mitchell 1986, Kap. 5.3.1.1-2). Die Aktivität von Phosphatasen kann neben dem pH-Wert auch von den Temperaturbedingungen abhängen (Antibus *et al.* 1986).

2.4.3 Methoden zur Untersuchung der Phosphataseaktivität in Pilzhyphen und Mykorrhizen

Erste Versuche, enzymatische Aktivitäten von Phosphatasen zu bestimmen, gehen auf die 30er Jahre des 20. Jahrhunderts zurück (Tibbett *et al.* 1998). Es wurde hier zunächst noch

indirekt die Freisetzung von Phosphat aus β -Glycerophosphat bestimmt (Kay 1930, Bodansky 1933). Heute etablierte Methoden zur Untersuchung der Phosphataseaktivität (PA) in Pilzhyphen und Mykorrhizen lassen sich zunächst einmal grob in qualitative und quantitative Methoden untergliedern, die sowohl direkt als auch indirekt Rückschlüsse auf die PA zulassen. Zu den direkten, qualitativen Methoden gehörte bislang die Mikroskopie. Die Aktivität alkalischer Phosphatasen kann hierbei direkt als dunkle Anfärbung mit Hilfe einfacher Durchlichtmikroskopie sichtbar gemacht werden (Anfärbung z.B. mit *Fast Blue RR Salt* (FB) (*4-benzoylamino-2,5-dimethoxybenzediazonium chloride hemi[zinc chloride] salt*), Tisserant *et al.* 1993). Diese Methode ist auch im Zusammenhang mit Vitalitätsmessungen von VA-Mykorrhizen vorgeschlagen worden (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi 1995). Als Alternative zur lichtmikroskopischen Detektion der PA von Pilzhyphen, aber auch in ganzen VA-Mykorrhizen, wurde unlängst das alkaline Phosphatase-Substrat ELF-97 von van Aarle *et al.* (2001) vorgeschlagen. Das Präzipitat des enzymaktivierten Fluorophors ELF-97 (s. Kap. 3.3.2) formt nach diesen Ergebnissen kristalline Agglomerationen um phosphataseaktive Zentren in biologischem Material. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wird hier eine direkte, im Vergleich zu FB-Salz um viele Details verbesserte qualitative Visualisierung der phosphataseaktiven Zentren ermöglicht (van Aarle *et al.* 2001).

Zu den quantitativen Methoden der direkten Bestimmung der PA gehören bislang vor allem colorimetrische Verfahren. Sehr verbreitet für Messungen der PA in Böden (Tabatabai & Bremner 1969), Pflanzenwurzeln und Mykorrhizen (Woolhouse 1969, Barlett & Lewis 1973) ist das Substrat p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP, s. Kap. 3.3.1). Die Reaktion basiert auf einer Hydrolyse von pNPP durch Phosphomonoesterasen in p-Nitrophenol-Phosphat (pNP) + P (Abb. 3.2.a). Zur Quantifizierung der Aktivitäten von Phosphodiesterasen wird auch das Substrat bis-pNPP verwendet (Hayano 1987, Antibus *et al.* 1997).

Ebenfalls zu den quantitativen, direkten Methoden zur PA-Bestimmung gehört der direkte Nachweis von hydrolytischen Produkten aus angebotenen organischen, aber auch anorganischen P-haltigen Substraten. Die Quantifizierung der verschiedenen hydrolytischen Produkte erfolgt hier meist chromatographisch oder über colorimetrische Methoden (s. z.B. Barlett & Lewis 1973).

Eine indirekte Methode, die hydrolytische Spaltung und Aufnahme von P aus organischen Verbindungen, wie beispielsweise dem Inositol-Phosphat, zu verfolgen, basiert auf der Verwendung von P-Isotopen, wie ^{32}P oder ^{33}P . Hierbei kann die P-Isotopenaufnahme qualitativ visualisiert werden (z.B. durch Autoradiographie, Finlay & Read 1986). Durch Szintilla-

tionsmessungen können aber auch quantitative Abschätzungen der ^{32}P -Spaltung und P-Aufnahme erfolgen (Antibus *et al.* 1997).

Obwohl durch gel-elektrophoretische Detektion und Quantifizierung von phosphataseaktiven Isoenzymen aus biologischem Material (oder deren subzellulären Fraktionen) zwar nicht direkt auf die Aktivität einzelner Isoenzyme in ihrer natürlichen Umgebung geschlossen werden kann, so bildet diese Technik jedoch eine wichtige Ergänzung zu den bereits besprochenen Methoden. Sie erlaubt als einzige einen direkten Nachweis der genetischen Vielfalt der Isoenzyme, wodurch auf die Adaptationsfähigkeit der Symbiosepartner rückgeschlossen werden kann. Hierbei wird meist α -Naphthyl-Phosphat zur Anfärbung der phosphataseaktiven Isoenzymen aus Wurzelmaterial, Pilzhyphen und Mykorrhizen verwendet (Ho & Zak 1979, Tibbet *et al.* 1998).

2.4.4 Fluoreszenzbasierte Methoden

Da sich ein Teil dieser Arbeit der Entwicklung einer kombiniert quantitativ-morphologischen Methode zur Bestimmung der PA in Pilzhyphen, Kurzwurzel- und Mykorrhiza-Querschnitten mit Hilfe des durch Enzyme aktivierten Fluorophors ELF-97 widmet (Kap. 3.3.2), soll in diesem Kapitel kurz auf die wesentlichen Grundlagen von Fluoreszenzerscheinungen eingegangen werden. Die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz müssen bei der Validierung der Methode (Kap. 3.3.2.1) unbedingt berücksichtigt werden.

Bei Fluoreszenzerscheinungen wechseln Elektronen zwischen energetisch höher gelegenen und energetisch niedriger gelegenen elektronischen Zuständen. Sie absorbieren und emittieren dabei Photonen definierter Wellenlängen, deren Strahlungsenergie gerade der Energiedifferenz zwischen den elektronischen Niveaus entspricht. Elektronenniveauübergänge folgen dem Franck-Condon-Prinzip, bei dem Übergangswahrscheinlichkeiten aus den radial überlappenden Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Elektronenwellenfunktionen hergeleitet werden können (z.B. Lakowicz 1983).

Fluoreszenzspektroskopische und -mikroskopische Analysetechniken basieren demnach auf den grundlegenden Gesetzen der atomaren und molekularen Wechselwirkungen und deren Einfluss auf die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Elektronenwellenfunktionen, wodurch Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften induziert werden.

Fluoreszenzerscheinungen können in statische Prozesse (einmalige, dann aber dauerhafte Veränderungen der molekularen Fluorophorstruktur) und in dynamische Prozesse eingeteilt werden. Bei den dynamischen Prozessen dominieren Wechselwirkungen, die nur in dem Zeit-

raum stattfinden, in denen sich ein Fluorophor in einem angeregten Zustand befindet. Die mittlere Lebensdauer τ eines angeregten elektronischen Molekülzustandes bis zum Übergang in den Grundzustand beträgt in fluoreszierenden Molekülen zwischen 10^{-10} und 10^{-8} s.

Aus der Vielzahl der unterschiedlichen Parameter, welche im Zusammenhang mit fluoreszenzbasierten Techniken detektiert werden können, haben im Rahmen dieser Arbeit lediglich Veränderungen der Fluoreszenzintensität sowie der spektralen Veränderung des Exzitations- beziehungsweise des Emissionsspektrums Bedeutung. Diese sind auf statische Veränderung der Molekülstruktur des Fluorophors ELF-97 zurückzuführen (vergl. Kap. 3.3.2). Durch die Veränderung der Molekülstruktur werden die Elektronenwellenfunktionen und damit die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten verändert. Die Übergangswahrscheinlichkeiten und auch die Übergangsenergien werden dadurch auf charakteristische Weise beeinflusst.

Stark fluoreszierende Moleküle zeichnen sich generell durch delokalisierte Elektronen konjugierter Doppelbindungen aus (Lakowicz 1983). Die Fähigkeit zur Fluoreszenz wird durch den Parameter Quantenausbeute Q definiert ($Q = n_e / n_a$, n_e : Anzahl der emittierten Photonen, n_a : Anzahl der absorbierten Photonen). Photonenaufnahme oder Photonenemission finden innerhalb von 10^{-15} s statt.

2.5 Aufgabenstellung

Über das Mykobiontenpektrum der *Nothofago-Perseetum linguae* ist bis heute kaum etwas bekannt. Von den über 600 möglichen Mykobionten von *Nothofagus*-Arten sind bislang lediglich 9 Ektomykorrhiza-Assoziationen morphologisch-anatomisch charakterisiert (s. Kap. 2.3.2). Physiologische Zusammenhänge sind noch fast vollständig ungeklärt.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bewertet zunächst den Artenbestand und beschreibt die Charakteristiken spezifischer und unspezifischer Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus*-Arten, die in drei Untersuchungsgebieten (eines mit *Nothofago-Perseetum linguae*, eines mit Monokulturen von *Pinus radiata* und eines mit *Eucalyptus globulus*) zwischen Februar und Juni 1998 gefunden wurden. Im Zusammenhang damit werden die spezifischen Bodenbedingungen der Untersuchungsgebiete analysiert und Besonderheiten in Bezug auf das reduzierte Phosphatangebot der Böden aus rezenten Aschen vulkanischen Ursprungs herausgearbeitet (s. Kap. 2.3.4).

Um weiterführende physiologische Untersuchungen mit ausgewählten Mykobionten sowie mykorrhizierten und unmykorrhizierten Sämlingen von *N. obliqua* durchführen zu können, müssen diese Systeme zunächst unter Laborbedingungen als sterile Isolate gewonnen

und routinemäßig gezüchtet werden. Den Versuchen und Methoden hierzu ist ein weiterer Themenkreis in dieser Arbeit gewidmet.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit konzentriert sich auf physiologische Untersuchungen. Diese nehmen direkten Bezug auf das festgestellte reduzierte Phosphatangebot der untersuchten Böden (s. Kap. 4.7.3). Bei Mykorrhizen sind unterschiedliche Strategien zur Steigerung der Phosphatversorgung ihrer Wirtspflanzen bekannt. Von besonderer Relevanz sind in diesem Zusammenhang die Aktivitäten extrazellulärer und an die Oberflächen von Pilzhyphen gebundene Phosphatasen (Phosphat spaltende Enzyme, s. Kap. 2.4.2). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Aktivitäten der Phosphatasen unter verschiedenen Randbedingungen untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wird einem entwickelten fluoreszenzmikroskopischen Ansatz zur Quantifizierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität an Pilzhyphen sowie an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* mit Hilfe des Fluorophors ELF-97 gewidmet (s. Kap. 3.3.2). Mit dieser Methode ist möglich, kombiniert quantitativ-qualitative Einblicke der Organisation der Phosphatasen unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen. Die Validierung dieser Methode und die mit ihr gewonnenen Ergebnisse werden im Kontext bislang gewonnener Erkenntnisse zu Struktur und Funktion oberflächengebundener Phosphatasen eingehend diskutiert (Kap. 5.3.2).

Abschließend werden die neu gewonnenen Erkenntnisse bezüglich möglicher Strategien einer erfolgreichen Wiederaufforstung und nachhaltiger Forstwirtschaft von *Nothofago-Perseetum linguae* eingeordnet (Kap. 5.4).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Symbiosepartner

3.1.1 Die Kultivierung von *N. obliqua*

Als Versuchspflanze diente *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. (Angiospermae, Rosopsida, Fagales, Nothofagaceae), Bezeichnung in Europa: „Sommergrüne Antarktische Buche“, „Scheinbuche“ oder „Südbuche“. Bezeichnung in Chile: „Roble“. Das Saatgut von *N. obliqua* (Fa. Forestal Niebla und Ing. Agr. Iván Basso) stammt aus dem Jahr 1998. Die Lagerung erfolgte in Stoffbeuteln, trocken, im Dunkeln, bei 4°C.

Kultivierungen von *N. obliqua* unter Freilandbedingungen sind bereits erfolgreich durchgeführt worden (Donoso *et al.* 1999). Unter sterilen Bedingungen in Sand oder Perlit wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf Behandlungsmethoden zur Unterbrechung der Samenruhe im Zusammenhang mit drei Verfahren zur Sterilisierung der Samenoberfläche auf ihren Erfolg hin getestet (Tab. 3.1).

- Es erfolgte zunächst eine Präselektion der Samen nach Gewicht, Größe und Insektenperforationen.
- Die ausgewählten Samen wurden danach den Behandlungsmethoden A-E unterzogen (Tab.3.1) oder nicht behandelt (Kontrolle). Nach der Samenquellung erfolgte eine weitere Selektion der keimfähigen Samen (nichtschwimmend, ca. 95 %) nach Donoso (1975).

Versuch	Behandlung der Samen vor der Aussaat zur Unterbrechung der Samenruhe		
	Quellung in 0,2 % Gibberelinsäure (Raumtemperatur)	Quellung in bidestilliertem Wasser (Raumtemperatur)	Stratifikation in autoklaviertem, angefeuchtetem Sand (4°C)
A	2 Tage	7 Tage	
B		7 Tage	
C	7 Tage		
D	2 Tage		
E		2 Tage	60 Tage

Tab. 3.1: Fünf Versuche (A - E) zur Unterbrechung der Samenruhe von *N. obliqua*.

- Für jede der Behandlungsmethoden sowie für die Kontrolle wurden drei Verfahren zur Sterilisierung der Samenoberfläche getestet:
 - a) Inkubation in 30 % Wasserstoffperoxid (3 min).
 - b) Inkubation in 0,1 % NaCl (10 min).
 - c) Inkubation in 100 % Ethanol (1 min) und anschließende Behandlung mit 5 % Penicilin-Streptomycin (60 min).

Danach wurden die Samen mit sterilisiertem Aq_{Bidest} sorgfältig gewaschen.

- Für jede Behandlung wurden 100 Samen in einem Lehm-Ton-Gemisch ausgesät (s.u.). Die Keimungsrate wurde in Prozent der eingesetzten Samen nach 30 Tagen ermittelt.
- Die Versuche zur Unterbrechung der Samenruhe sowie der Sterilisierung der Samenoberfläche wurden in drei parallelen Versuchen durchgeführt.

Die Samen wurden in einem autoklavierten Lehm-Ton-Gemisch (3:1) (50 min bei 120°C) ausgesät und die Aussaat mit einer Fungizidlösung (0,15 % Previcur) gewässert. Saatschalen wurden in einer Klimakammer unter kontrollierten Wachstumsbedingungen untergebracht: Luftfeuchtigkeit 80 %, Tag- / Nacht-Rhythmus 13 / 11 Stunden, Temperatur für die Keimung 25°C / 20°C und für weiteres Wachstum der Sämlinge 20°C / 15°C. Die Lichtstärke für die Keimung betrug 20 klux von 6 bis 19 Uhr und 36,36 klux von 12 bis 14 Uhr. Zum weiteren Wachstum drei Wochen alter Sämlinge (siehe auch Abb. 3.1.a) wurde die Lichtstärke auf 15,675 klux eingestellt.

Die Sämlinge wurden nach Bedarf gewässert und alle 14 Tage mit einer verdünnten „Knopschen“ Nährlösung (1:3) gedüngt (Ziegler 1998).

3.1.2 Ektomykorrhizapilze: Systematische Klassifizierung und Züchtung aus dem Freiland

3.1.2.1 Fruchtkörper- und Ektomykorrhizasammlung im Untersuchungsgebiet

Ektomykorrhizen aus dem Freiland können am einfachsten über den Fruchtkörper klassifiziert werden. Aus diesem Grund wurden Fruchtkörper zusammen mit einem Ausstich (Schaufel und scharfes Messer) des Waldbodens (20 × 20 cm Fläche, 15 cm Tiefe) gesammelt. Die Fruchtkörper wurden an der Stielbasis abgetrennt und in der Regel noch am Standort photographiert und makroskopisch beschrieben.

Um eine eindeutige Klassifizierung sicherzustellen, wurden Fruchtkörper in verschiedenen Stadien gesammelt.

3.1.2.2 Konservierung der Fruchtkörper

Zusätzlich zu den Beschreibungen der Bestimmungsmerkmale des frischen Materials wurden Fruchtkörper für weitere Untersuchungen durch Trocknung konserviert. Die Trocknung der Fruchtkörper erfolgte in einem Ofen (40°C). Größere Exemplare wurden zunächst sowohl längs als auch quer geschnitten und anschließend getrocknet.

3.1.2.3 Systematische Klassifizierung von Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten anhand von Fruchtkörpern

Die systematische Klassifizierung von Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten anhand der Fruchtkörper erfolgte mit Hilfe der Publikationen von Garrido (1988), Horak (1979a), Moser (1978), Singer (1986), Valenzuela (1993) und Gamundi & Horak (1993).

- Für die Gattungen *Austropaxillus* und *Paxillus* wurden insbesondere Publikationen von Singer & Digilio (1952), Valenzuela *et al.* (1992a) und Bresinsky *et al.* (1999) berücksichtigt.
- Für die Gattung *Descolea*: Singer (1951, 1969), Horak (1971), Valenzuela *et al.* (1992a).
- Für die Gattung *Boletus*: Horak (1977).
- Für die Gattung *Cortinarius*: Moser & Horak (1975).

Die chemischen Farbreaktionen wurden nach Moser (1978) und Meixner (1975) durchgeführt. Es erfolgten sowohl mikroskopische als auch makroskopische Untersuchungen von Basidiosporen, wobei sich die verschiedenen Charakteristiken insbesondere nach Pegler & Young (1971) richteten.

3.1.2.3.1 Makroskopische und chemische Untersuchungen des Frischmaterials

An frischem Material wurden sowohl makroskopische Beschreibungen, chemische Farbreaktionen als auch Sporenabdrücke durchgeführt.

- **Makroskopische Merkmale:** Hut, Lamellen, Stiel, Fleisch und allgemeine Kennzeichen.
- **Makrochemische Farbreaktionen:** Die einfachste Farbreaktion erfolgte mit Sauerstoff (Luft) durch Oxidationsprodukte. Hierfür ist erforderlich, den Fruchtkörper zu zerschneiden oder zu zerbrechen. Alle anderen Farbreaktionen erfolgen durch Zugabe von Reagenzien an Huthaut, an frischen Schnittflächen oder Stieloberflächen:
 - Verwendete Laugen: Kaliumhydroxid (KOH) 30-40 %, für Boletaceae nur 10 %.
 - Ammoniaklösung (NH₄OH) 25 %.

- Verwendete Säuren: Salzsäure (HCl) ca. 36-38 %, Schwefelsäure (H₂SO₄) 60-70 %, Salpetersäure (HNO₃) ca. 65 %.
- **Sporenabdrucke:** Um die Sporenabdrücke zu erhalten, wurde zunächst der Stiel quer an der Basis des Hutes abgeschnitten und anschließend der Hut mit der Lamellentrama nach unten auf weißes Papier gelegt. Die Farbe des Sporenpulvers wurden mit Hilfe von Farbtabelle (Moser 1978) identifiziert.

3.1.2.3.2 Mikroskopische Untersuchungen des konservierten Materials

Das konservierte Material (Trocknung, s. Kap. 3.1.2.2) wurde mikroskopisch und chemisch untersucht.

- **Mikroskopische Merkmale:** Zunächst erfolgte eine Rehydratation der Pilzstücke in L4- oder auch Clemencon's Lösung (0,72 g KOH, 0,76 NaCl, 16 ml Glycerin, 0,5 ml Invadin IFC (Ciba-Geigy), 84 ml Aq_{Bidest}). Anschließend wurden mikroskopische Merkmale in den Sporen, den Basidien, den Zystidien, der Hutdeckschicht und in der Lamellentrama bestimmt.
- **Chemische Farbreaktionen:** (Aufgeführt lediglich für die in dieser Arbeit weiter kultivierten Gattungen: *Austropaxillus*, *Paxillus*, *Descolea*, *Boletus* und *Xerocomus*)

Reagenzien:

- **Baumwollblau** (Anilinblau): 0,05 g Baumwollblau in 30 g Milchsäure gelöst, vor Gebrauch 24 Stunden stehen lassen, dann filtrieren.
- **Kaliumhydroxid** (KOH): 2-3 %.
- **L4C:** L4-Lösung mit Zusatz von 1 % Chlorazolschwarz (nach einem Tag filtrieren).
- **Melzer's Reagenz:** 0,5 g Jod, 1,5 g Kaliumjodid, 20 ml Wasser, 20 ml Chloralhydrat. Das Chloralhydrat am besten erst vor dem Gebrauch zusetzen.

Anwendungen:

- **Sporenwände:**
 - 1) Amyloid: Färbung mit Melzer's Reagenz, vor Gebrauch am Objektträger einen Tropfen Reagenz und einen Tropfen Chloralhydratlösung mischen, nach einigen Minuten Einwirkung absaugen und einen Tropfen konzentrierte Salzsäure zusetzen. Färbung graublau bis schwarzviolett.
 - 2) Dextrinoid: Behandlung wie Punkt 1. Färbung braun bis weinrot.

3) Cyanophil: Sporen in Baumwollblaulösung einige Stunden bis Tage einwirken lassen.

- **Ornamentation der Sporen:** Behandlung mit Baumwollblaulösung.
- **Hyphen-, Basidien- und Zystidienfärbungen:** L4C zur Kontrastfärbung, KOH, Melzer's Reagenz, Baumwollblaulösung.

3.1.2.4 Charakterisierung und Identifizierung der im Freiland gesammelten Ektomykorrhizen

In den folgenden Unterkapiteln werden die wichtigsten Merkmale zur Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen aufgeführt. Eingehende Beschreibungen von Methoden zur Probenpräparation sowie zur makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung von Ektomykorrhizen finden sich in Agerer (1986, 1987-1998, 1991, 1995) und Agerer & Rambold (1996).

3.1.2.4.1 Behandlung der Waldproben

Ausgestochene Waldbodenstücke (Kap. 3.1.2.1) wurden vollständig im Wasser untergetaucht, bis sie gesättigt waren. Danach erfolgte das Waschen und die Lokalisierung der Ektomykorrhizen. Zur Lokalisierung der Ektomykorrhizen wurde Feinwerkzeug benutzt.

Eindeutige Klassifizierungen von Ektomykorrhizen können nur für solche Fälle vorgenommen werden, in denen Rhizomorphe oder Hyphen direkt mit dem Stiel eines Fruchtkörpers verbunden sind. Um Bodenpartikel vorsichtig zu lösen und intakte Anschlüsse zwischen Stielbasis und Ektomykorrhizen aufdecken zu können, waren daher die Waldbodenstücke während des Waschens immer mit Wasser bedeckt.

3.1.2.4.2 Morphologische Untersuchungen der Ektomykorrhizen

Die morphologische Charakterisierung von frischen Ektomykorrhizen und Habitusfotographien erfolgten in entgastem Wasser mit Hilfe eines Binokulars vor schwarzem Hintergrund (Binokular: Stemi SV 11 Apot, ZEISS, Jena; Kamera: MC80, ZEISS, Jena; Lampen in Tageslichtqualität: Kaltlichtlampe KL 1500, Schott, Wiesbaden).

Die wichtigsten morphologischen Merkmale zur Charakterisierung von Ektomykorrhizen sind:

- Form, Größe und Farbe (hier werden Fotos der Proben mit Fotos aus Veröffentlichungen verglichen, z.B. Agerer (1997-1998)).
- Strukturelle Eigenschaften der Oberfläche (Vergrößerung bei 25-50 x).

- Strukturelle Eigenschaften der Rhizomorphen und der abziehenden Hyphen.

3.1.2.4.3 Anatomische Untersuchungen des Hyphenmantels und der abziehenden Elemente

Die Mantelpräparationen erfolgten unter Verwendung eines Binokulars (25-50 x, Kap. 3.1.2.3.5). Die Hyphenmanteloberflächen wurden von frischen Mykorrhizaspitzen in einem Wasserbad mit Hilfe von Feinpinzetten und Skalpell von dem Rindengewebe der Wurzel getrennt. Die so entfernten Präparate der Hyphenmanteloberfläche wurden danach in Milchsäure (90 %) auf einen Objektträger übertragen und mit einem Normarski-Interferenz-Kontrast Mikroskop untersucht.

- **Hyphenmantel:** Die wichtigsten Merkmale der anatomischen Charakterisierung unterschiedlicher Manteltypen sind die strukturellen Eigenschaften der Hyphenmanteloberfläche sowie die strukturellen Eigenschaften von Zellschichten in verschiedenen Ebenen des Hyphenmantels.
- **Abziehende Elemente:** Rhizomorphe, abziehende Hyphen und Zystidien bilden die abziehenden Elemente von Ektomykorrhizen.
 - Rhizomorphe lassen sich in verschiedene Unterklassen einteilen. Die wichtigsten Merkmale der Klassen sind: Die Existenz von Haupt- und Nebenhypfen, der Grad der Verflechtung, der Typ der Anastomosen, der Septen und der Schnallen.
 - Die wichtigsten Merkmale abziehender Hyphen sind ihre Farbe, die Rauheit der Oberfläche, Kristallbildung, der Typ der Anastomosen, der Septen und der Schnallen und die Existenz intrahyphaler Hyphen.
 - Zystidien lassen sich, wenn vorhanden, recht eindeutig anhand ihrer Morphologie klassifizieren (vergl. Abb. 4.13).

3.1.2.4.4 Chemische Untersuchungen

Reagenzien: **Melzer's Reagenz** (Kap. 3.1.2.3.2), **Sulfovanillin** (8 ml konz. Schwefelsäure zu 3 ml Wasser gießen und darin 1 g reines Vanillin lösen), **Kaliumhydroxid** (15 %), **Guajacol** (1 g Guaiak-Harz in 6 ml Äthanol), **Eisensulfat** (1 g Kristalle in 10 ml H₂O lösen, dazu einige Tropfen konz. H₂SO₄), Milchsäure (85 %), **Brillantkresylblau** (wässrige, gesättigte Lösung), **Toluidinblau** (1 %ige wässrige Lösung), **Formol** (35-40 %), **Baumwollblau** (Kap. 3.1.2.3.2), **Äthanol** (70 %) und **Kongorot** (wässrige Lösung des Farbstoffes).

Die Anfärbungen von Mantelsegmenten und abziehenden Elementen erfolgten direkt auf Objektträgern unter Verwendung von Lichtmikroskopie (400 x, Tageslichtqualität). Die Un-

tersuchungen ganzer Ektomykorrhizen wurde mit Hilfe von Binokularen durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien richteten sich weitgehend nach Agerer (1986, 1991).

3.1.2.4.5 Längsschnitte der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*

Zur Untersuchung der Längsschnitte der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln wurde ein bereits etabliertes Einbettungsverfahren verwendet (Spurr 1969, Kap. 8.1.1). Nach der Einbettung wurden Längsschnitte (5 µm) mit Hilfe eines Mikrotoms (LKB-2128, LKB, Schweden) erzeugt. Die Schnitte wurden auf Objektträger übertragen, mit ca. 20 µl Toluidinblau (0,05 % in 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 4,5, O'Brien *et al.* 1964) versetzt und einige Sekunden auf einer Heizplatte getrocknet. Die Untersuchungen erfolgten mit konventioneller Lichtmikroskopie und Photoausrüstung.

Zur Charakterisierung von Ektomykorrhizen haben Längsschnitte gegenüber Querschnitten verschiedene Vorteile. Sie enthalten von der sich ausbildenden, jungen Mykorrhizaspitze bis hin zur fertigen Mykorrhizabasis alle wichtigen Merkmale. Des Weiteren kann die Ausbildung des Hartigschen Netzes zuverlässig bestimmt werden, da Zellschichten im Querschnitt mehrschichtig erscheinen können.

Die wichtigsten Merkmale der anatomischen Charakterisierung von Längsschnitten der Ektomykorrhizen sind die Schichtdicke und die Organisation des Hyphenmantels, die Anzahl der Zellschichten des Hartigschen Netzes sowie die Form und die Größe der Rindzellen.

3.1.2.4.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Charakterisierung des Hyphenmantels, der Zystidien, der abziehenden Hyphen sowie der Rhizomorphen wurden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt (Leo 420, Leo (Leika/ZEISS), England, zur Präparation der Proben s. Kap. 8.1.2).

Ein entscheidender Vorteil der Rasterelektronenmikroskopie ist die genaue Information über die Form der Zystidien sowie der Identifizierung von sich ausbildenden Kristallstrukturen auf den Pilzhypen.

3.1.2.5 Isolierung und Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen aus Fruchtkörpern

Der Vorteil der Isolierung aus Vegetationskörpern besteht im Gegensatz zur Kultivierung aus Sklerotien, Mykorrhizen oder auch Myzelium darin, dass die Artbestimmung der Pilze unter Verwendung von Fruchtkörpern bedeutend einfacher und vor allem sicher ist.

Um Pilze in Kultur zu überführen, wurden zunächst die gesammelten und identifizierten Fruchtkörper mit trockenen Pinseln gereinigt. Der Pilzhut wurde anschließend unter sterilen Bedingungen aufgerissen und innere Gewebestücke aus der Fruchtkörpertrama (nahe am Hymenium) auf Nährmedium überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C in Dunkelheit.

Folgende Nährmedien wurden zur Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen verwendet:

- **Modifiziertes-Melin-Norkrans (MMN) -Nährmedium:** Nach Molina & Palmer (1982), (Kap. 8.2).
- **Erde-Nährmedium:** Hierzu wurden Gewebestücke zunächst in Petrischalen mit sterili-sierter Erde (20 g) überführt. Die Erde stammte aus dem Untersuchungsgebiet. Sie wurde zunächst luftgetrocknet, mit Wasser angefeuchtet und autoklaviert (50 min bei 120°C). Danach wurde die Erde mit einer Nährlösung durchtränkt (1 l Wasser, Glucose: 20 g, Ammoniumtartrat: 3 g, KH₂PO₄: 0.1 g, Thiamin: 50 µg/l, Biotin: 1 µg/l, pH = 5) und er-neut autoklaviert (20 min bei 120°C) (Reissbrodt & Friedler 1997).
- **Wurzelhomogenat-Nährmedium:** An Stelle von Erde aus dem Untersuchungsgebiet wurde zum Teil ebenfalls Wurzelhomogenat (20 g) verwendet. Dazu wurden Wurzeln von *N. obliqua* zunächst luftgetrocknet, in einem Mörser homogenisiert, angefeuchtet, autokla-viert (40 min bei 120°C) und wie oben beschrieben mit Nährlösung durchtränkt (Reiss-brodt & Friedler 1997).

Als Standard-Nährmedium diente MMN-Nährmedium. Die Verwendung von Erde-Nähr-medium oder Wurzelhomogenat-Nährmedium erfolgte lediglich während der ersten Etappe des Wachstums.

Nachdem sich ein deutliches Wachstum in den Kulturen zeigte, wurden diese anschlie-ßend in MMN-Nährmedium überführt und dort weiter kultiviert.

Die Überimpfung der Pilzkulturen in Petrischalen oder in 50 ml Kölbchen mit festem oder flüssigem MMN-Nährmedium geschah unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Kork-bohrers (Ø = 7 mm, alle 4 bis 6 Wochen). Es wurde immer junges Myzelium zur Überimp-fung gewählt.

3.1.2.6 Ausnahme: Isolierung von *Cenococcum geophilum* Fr. aus Ektomykorrhizen

Die systematische Stellung von *C. geophilum* konnte lange Zeit nicht eindeutig geklärt werden, da bis heute kein sexuelles Stadium gefunden wurde. *C. geophilum* wurde einerseits der künstlichen Gruppe der *Fungi imperfecti* zugeordnet (bzw. Deuteromyceten, Ingleby *et al.*

1990). Andererseits erfolgte eine Zuordnung zu den Elaphomycetaceae aufgrund von typischen Charakteristiken der Ascomyceten-Septenporen, der Manteloberfläche, der Hyphen sowie der Peridenschicht der Elaphomyces (Trappe 1971, Agerer 1995). Phylogenetische Analysen der Nukleotidsequenzen der „*nuclear small subunit*“ (ISS, LoBuglio *et al.* 1996) und der „*internal transcribed spacers*“ (ITS1 und ITS2, Shinohara *et al.* 1999) der ribosomalen RNA-Region lassen *C. geophilum* als eigenständige taxonomische Entität erscheinen.

An Stelle des Fruchtkörpers müssen daher Mykorrhizen, Sklerotien oder Myzelium von *C. geophilum* zur Pilzisolierung verwendet werden. In dieser Arbeit erfolgte die Isolierung mit Hilfe der Mykorrhizen von *C. geophilum* - *N. obliqua*.

Vor der Pilzisolierung von *C. geophilum* wurden systematische Studien der mit diesem Pilz gebildeten Ektomykorrhizen durchgeführt (u.a. nach Hatch 1934, Lihnell 1942, Chilvers 1968, Trappe 1971, Gronbach 1988, Uhl 1988, Berg 1989, Ingleby *et al.* 1990, Flores *et al.* 1997). Diese erfolgte nach einer modifizierten Prozedur von Garrido (1988), welche auf einer Reinigung der Mykorrhizastücke (Länge ca. 1 cm) mit autoklaviertem Wasser in einem Ultraschallgerät beruht (4°C für 10 min). Diese Prozedur wurde 1-5 mal wiederholt.

Danach erfolgte eine Oberflächensterilisation der Mykorrhizastücke mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (30 % für 30 s) und ein erneutes kurzes Waschen mit autoklaviertem Wasser. Abschließend wurden die Mykorrhizastücke auf sterile Petrischalen mit MMN-Medium übertragen und kultiviert (25°C und dunkel).

3.1.3 Inokulation von *N. obliqua*: Aufbau der Rhizotrone

Drei Monate alte Sämlinge (s. Kap. 3.1.1) von *N. obliqua* wurden zur Inokulation mit den Pilzpartnern in Rhizotrone überführt. Dazu entfernte man Sämlinge zunächst aus den Saatschalen, um die Wurzeln mit Wasser vorsichtig von Lehm-Ton-Partikeln zu befreien. Die Rhizotrone bestanden aus Plastikpetrischalen ($\varnothing = 145$ mm, Höhe = 20 mm), die mit einem Lehm-Ton:Perlitgemisch (1:3) gefüllt waren. Je eine Petrischale wurde in aufrechter Stellung mit je einem Sämling versehen (Abb. 3.1.b).

Die Durchtrittsstelle für die Bäumchen bildete eine geschmolzene Aussparung durch die Schmalseiten von Deckel und Boden der Petrischale. Eine Lage Aktivkohlepapier (Schleicher & Schuell) trennte die Wurzeln und das Substrat (Abb.3.1c), um das Wurzelsystem und deren Mykorrhizierung gut beobachten zu können (Abb.3.1d) und um die Ernte der mykorrhizierten Kurzwurzeln für die Experimente zu vereinfachen.

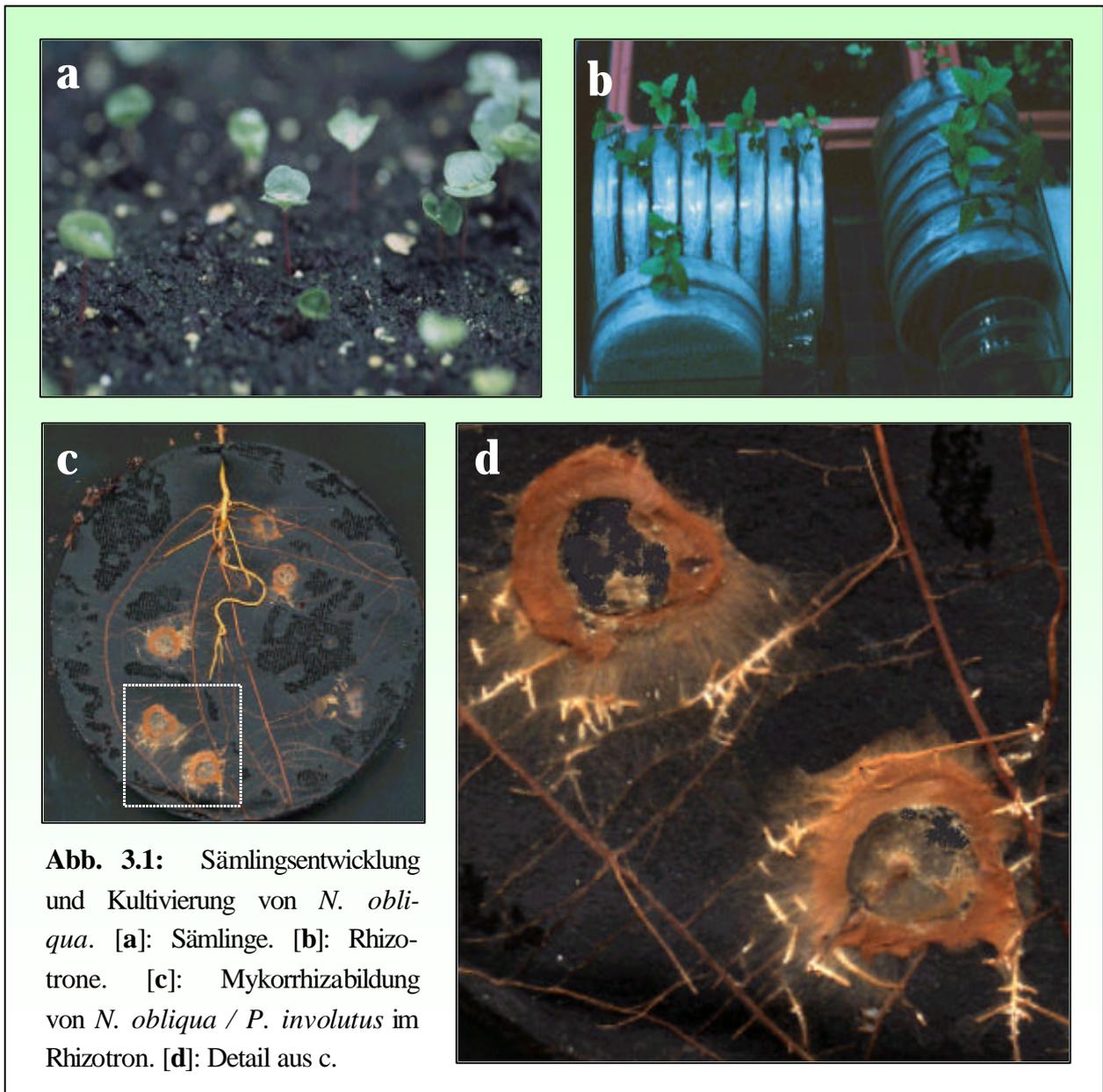


Abb. 3.1: Sämlingsentwicklung und Kultivierung von *N. obliqua*. [a]: Sämlinge. [b]: Rhizotrone. [c]: Mykorrhizabildung von *N. obliqua* / *P. involutus* im Rhizotron. [d]: Detail aus c.

Nach einer Woche Anpassungszeit für die Keimlinge in den Rhizotronen erfolgte die Inokulation von *N. obliqua* mit den Pilzpartnern. Die Beimpfungen der Wurzeln mit den Symbiosepartnern erfolgte mit Pilzinokulaten, jeweils eine Woche nach ihren Überimpfungen. Sechs Pilzinokulate pro Rhizotron wurden in der Nähe junger Kurzwurzeln angelegt (Abb. 3.1c).

Als Symbiosepartner wurden die von mir isolierten Pilze aus dem Untersuchungsgebiet und die im Labor bereits etablierte Kultur von *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (Basidiomycetes, Sclerodermatales) verwendet, deren ursprüngliches Isolat von I. Kottke, Universität Tübingen, stammt (s. Kap. 4.4-6).

3.2 Bodenuntersuchungen

3.2.1 Bodenanalysen im Untersuchungsgebiet Quita Calzón

Die Durchführung der Bodenanalysen im Untersuchungsgebiet von Quita Calzón geschah in folgenden Gebieten: Naturwald mit *N. obliqua*, Forst mit *P. radiata*, Forst mit *E. globulus*, Weide. Sie setzte sich zusammen aus der Beschreibung des Bodenprofils und aus Untersuchungen der chemischen und physikalischen Bodenparameter.

Für die Probenentnahme in allen Untersuchungsgebieten erfolgte eine Auswahl von vier repräsentativen Flächen von 10×10 m. Innerhalb jedes Quadrates erfolgte die Entnahme von sieben Bodenproben mit Hilfe eines Spatens (15×15 cm Fläche, 15 cm Tiefe). Für Mischbodenproben wurden luftgetrocknete Einzelproben vereinigt und durchgesiebt (Porengröße: 2 mm). Für einige bodenphysikalische Messungen erfolgten Entnahmen von sieben Proben für jeden Bodenhorizont mittels eines Stechzylinders (100 cm^3 Stechringe, Edelstahl).

3.2.1.1 Bodenprofil

Die Bodenprofile wurden zur Darstellung der Bodenhorizonte und ihrer Eigenarten beschrieben, gezeichnet und fotografiert. Die Beschreibung des Profils folgte den Kriterien von Schlatter *et al.* (1981), Steubing *et al.* (2000) und Schachtschabel *et al.* (1998).

Haupthorizonte sowie organische und mineralische Ausgangssubstanzen werden durch Großbuchstaben bezeichnet. Zugefügte Kleinbuchstaben (Merkmalssymbole) dienen dazu, wichtige Horizontmerkmale zu beschreiben.

Die Bodenfarbe wurde mit Hilfe von Farbtafeln gekennzeichnet (Munsell 1954). Die Bestimmung der Makrogefügeform erfolgte nach Schlichting *et al.* (1995).

3.2.1.2 Physikalische Bodenparameter

Gemessene physikalische Eigenschaften des Bodens waren die Feldwasserkapazität, die Körnung, die Dichte, die Lagerungsdichte und das Porenvolumen:

- **Feldwasserkapazität:** Bodenproben werden 1-2 Tage nach einer Regenperiode in einer Tiefe von 0-15 cm mit einem Stechzylinder (100 cm^3) entnommen. Die Proben werden zunächst gewogen, im Anschluß getrocknet (105°C) und erneut gewogen. Die Gewichts-differenz entspricht dem Gewicht des eingelagerten Wassers. Die Feldwasserkapazität wird nun als Gewichtsprozent bezogen auf das Gewicht der trockenen Bodenmasse angegeben (Steubing *et al.* 2000).

- **Körnung:** Kombiniertes Sieb- und Sedimentationsverfahren. Mechanische Auftrennung über Naßsiebung für den Korngrößenbereich ($> 63 \mu\text{m}$) und Sedimentation mittels Pipettenanalyse für den Korngrößenbereich ($< 63 \mu\text{m}$). Vorbehandlung der Bodenproben mit H_2O_2 (Humuszerstörung) und HCl (Carbonatzerstörung). Dispergierung mit $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Natriumpyrophosphat). Die Bestandteile des Bodens werden in Sand (2,00-0,063 mm), Schluff (0,063-0,002 mm) und Ton ($< 0,002 \text{ mm}$) fraktioniert. Die Angaben erfolgen in % (Schaller 1993, Felix-Henningsen & Broll 1992).
- **Dichte / Substanzdichte:** Die Substanzdichte [g/cm^3] entspricht dem Quotienten aus Substanzmasse [g] und dem Substanzvolumen [cm^3]. Als Substanzmasse wird die Bodenprobe (Lutro Feinboden) eingesetzt. Die Messung des Substanzvolumens erfolgt mit einer gut benetzenden Flüssigkeit (Pyknometer und Xylol nach Schaller 1993, Schlichting *et al.* 1995).
- **Lagerungsdichte:** Die Lagerungsdichte [g/cm^3] entspricht dem Quotienten aus Probenmasse [g] und dem Probenvolumen [cm^3]. Proben werden mit einem Stechzylinder (100 cm^3) entnommen. Die Proben werden getrocknet (105°C) und gewogen (Schlichting *et al.* 1995).
- **Porenvolumen:** Das Porenvolumen ergibt sich aus der Differenz von Gesamtvolumen und Substanzvolumen und wird in % des Gesamtvolumens ausgedrückt (Pyknometer und Xylol nach Schaller 1993, Schlichting *et al.* 1995).

3.2.1.3 Chemische Bodenparameter

Folgende chemischen Bodenanalysen wurden im Labor der Fakultät für Forstwissenschaften an der „Universidad Austral de Chile“ (Valdivia) durchgeführt:

<u>Bodenparameter</u>	<u>Methode</u>	<u>Verfahren</u>
pH	Elektrometrie	Boden : Wasser, (1:2) Boden : KCl (1N), (1:2)
C (Gesamt)	Spektral- photometrie	Nach Walkey-Black: Oxidation mit Kaliumdichromat-Schwefelsäure. (Nelson & Sommers 1982)
N (Gesamt)	Spektral- photometrie	Nach Kjeldahl: Aufschluss mit Salizyl- Schwefelsäure. (Steubing <i>et al.</i> 2000)

P (Verfügbar)	Spektral- photometrie	Nach Olsen: Extraktion mit Natrium- bicarbonat (NaHCO_3), 0,5 M, pH 8,5. (Steubing <i>et al.</i> 2000, Olsen & Sommers 1982, Sadzawka 1990)
Na, K, Ca, Mg, Al	Atomabsorptions- Spektrometrie	Extraktion mit Ammoniumacetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$), 1N, pH 4,8, 2 h schütteln. (Steubing <i>et al.</i> 2000, Thomas 1982)
Fe, Mn, Cu, Zn	Atomabsorptions- Spektrometrie	Extraktion mit Ammoniumacetat (1N) – DTPA ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$). pH 4,8 und 2 h schütteln. (Grez <i>et al.</i> 1990, Martens & Lindsay 1990)
S-Sulfat	Turbidimetrie	Extraktion mit Kalziumphosphat. (Steubing <i>et al.</i> 2000, Wada <i>et al.</i> 1994, Wall <i>et al.</i> 1980)
Al	Spektral- photometrie	Extraktion mit KCl, 1 M. (Steubing <i>et al.</i> 2000)
B	Spektral- photometrie	Extraktion mit CaCl_2 (0,5%) im kochenden Wasser, 5 min. (Bingham 1982, Mahler <i>et al.</i> 1984, Sadzawka 1990)

Tab. 3.2: Bodenparameter, Methoden und Verfahren der chemischen Bodenanalyse.

3.2.2 Adsorptionskapazität von Allophan

Um die Adsorptionskapazität von Allophan für Phosphat bei unterschiedlichen pH-Werten zu bestimmen, wurde ein colorimetrischer Phosphattest von Merck (1.14848.0001) verwendet. Durch die Bindung von Orthophosphat-Ionen an Molybdat-Ionen bildet dieser Phosphormolybdänblau, welches bei einer Wellenlänge von 700 nm verstärkt absorbiert.

- Allophan (X00011-3, Krantz, Bonn) wurde zunächst gesiebt (Porengröße 315 μm) und gemörsert (1400 Umdrehungen für 7 s in einer RS1-Steinmühle von Retsch).
- Das vorbehandelte Allophan wurde für 48 h in Aq_{dest} bei definierten pH-Werten (mit HCl und KOH auf pH = 3, 4, 5, 6 und 7 eingestellt) gelagert. Der pH-Wert wurde während dieser Zeit immer wieder nachjustiert, bis keine größeren Veränderungen mehr gemessen

werden konnten. Im Anschluß wurde die Lösung zentrifugiert (5 min bei 2000 g, Eppendorff 5415C) und das Allophan getrocknet (60°C für 3 h).

- Zur Bestimmung der Adsorptionskapazität wurden jeweils 0,5 g des Allophans in Erlenmeyerkölbchen mit 50 ml KH_2PO_4 (0,250 g / l) unter ständigem Rühren inkubiert. Die Phosphatlösungen waren zuvor mit HCl und KOH auf definierte pH-Werte (pH = 3, 4, 5, 6 und 7) eingestellt worden und der pH-Wert wurde während der Inkubationszeit verfolgt.
- Nach Inkubationszeiten von 10, 30, 60, 120 und 180 min erfolgte dann eine Zentrifugation (5 min bei 2000 g).
- Aus dem Überstand wurde jeweils 1 ml entnommen und mit dem oben angegebenen colorimetrischen Phosphattest von Merck nach Vorschrift analysiert.

3.3 Bestimmung der Phosphataseaktivität

Die Aktivität extrazellulärer und oberflächengebundener Phosphatasen in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln ist ein wichtiger Faktor für die Versorgung von Pflanzen mit Phosphor. Insbesondere in Böden, in welchen der Anteil an verfügbarem Phosphor gering ist, kommt den Aktivitäten der Phosphatase eine Schlüsselrolle zu (s. Kap. 2.3.4.2 und Kap. 2.4.2).

Die bislang am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung von Aktivitäten von extrazellulärer und oberflächengebundener Phosphatase in Mykorrhizapilzen basiert auf einer colorimetrischen Methode (Antibus *et al.* 1992, Tibbett *et al.* 1998), welche sich die Umwandlung von p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) in p-Nitrophenol-Phosphat (pNP+P) zu Nutze macht (s. Abb. 3.2). Dieses Messprinzip wird in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Aufgrund gravierender Nachteile dieser bislang etablierten Methode, insbesondere bei der Quantifizierung des oberflächengebundenen Anteils der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizapilzen (vergl. Kap. 2.4.3 und Kap. 5.3.2), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer methodischer Ansatz entwickelt. Dieser Ansatz beruht auf einer enzymgekoppelten Aktivierung des Fluorophors ELF-97 (Abb. 3.3) und setzt die bildverarbeitende Laser-Scanning-Mikroskopie zur Lokalisierung und Quantifizierung der phosphataseaktiven Zentren ein.

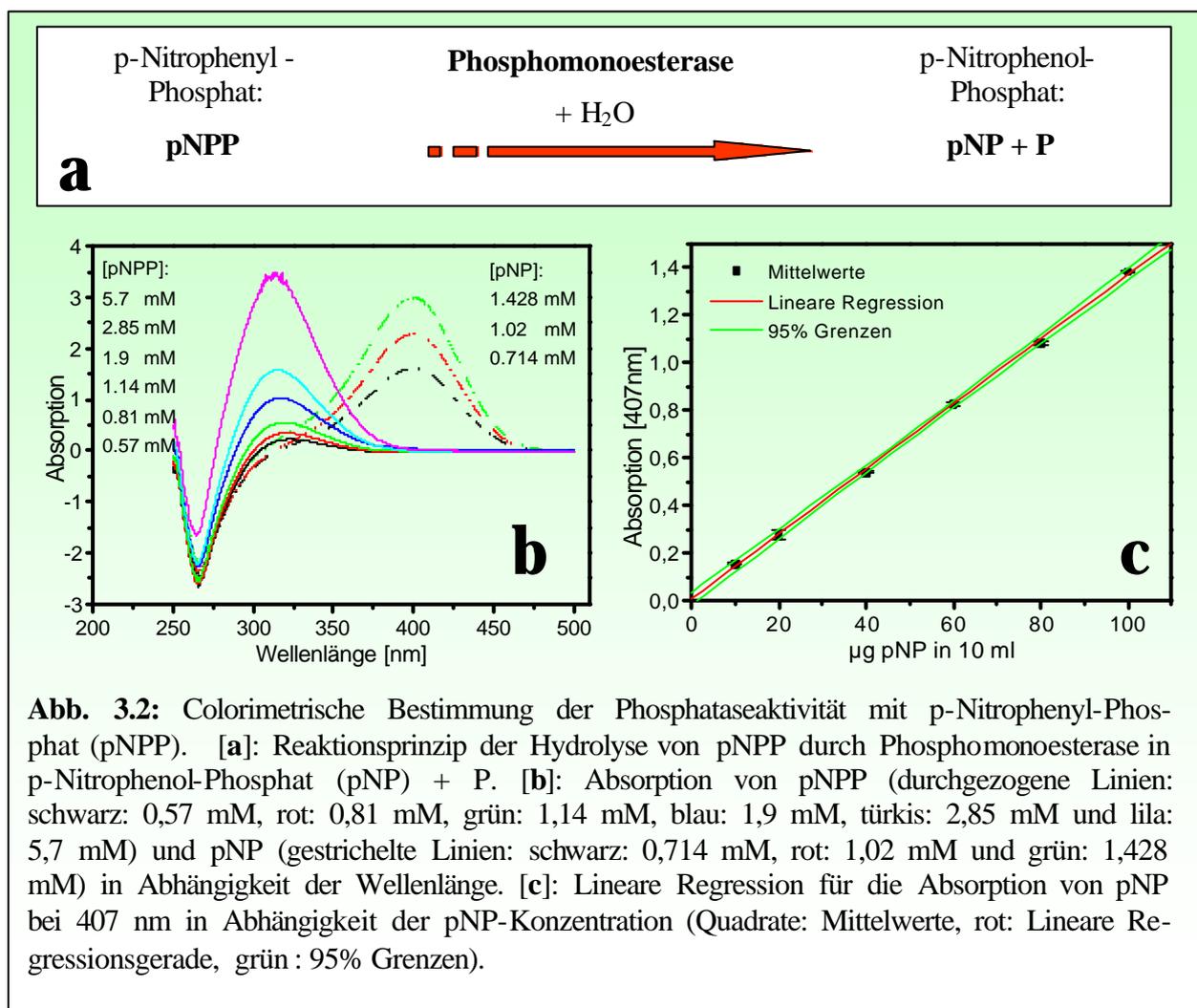
Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass deren Einsatz über die Lokalisierung und die Quantifizierung von oberflächengebundenen Phosphatasen in isolierten Ektomykorrhizapilzen hinausgeht und unter anderem die Möglichkeiten eröffnet, Phosphataseaktivitäten auch an ganzen Ektomykorrhizen unter *in vivo* - Bedingungen bestimmen zu können. Da es sich um die Entwicklung eines neuen methodischen Ansatzes handelt, zu deren Validierung

eine Reihe von Vorversuchen notwendig waren, wird deren Beschreibung in Kapitel 3.3.2 besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

3.3.1 Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen

Die colorimetrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) basiert auf einer Hydrolyse von pNPP durch Phosphomonoesterasen in p-Nitrophenol-Phosphat (pNP) + P (Abb. 3.2.a).

Das Maximum des Absorptionsspektrums des Spaltungsproduktes pNP ist im Verhältnis zu dem Absorptionsmaximum von pNPP (315 nm) um etwa 90 nm zu höheren Wellenlängen verschoben (s. Abb.3.2.b). Aufgrund dieser deutlichen Verschiebung sowie der ausgesprochenen Güte der linearen Regression für die Absorption von pNP bei 407 nm (s. Abb. 3.2.c)



wird eine eindeutige Zuordnung der Substanzkonzentrationen in Lösung anhand des Absorptionsgesetzes von Lambert und Beer ermöglicht: $I = I_0 \cdot 10^{-(e \cdot c \cdot s)}$ [Formel 3.1]

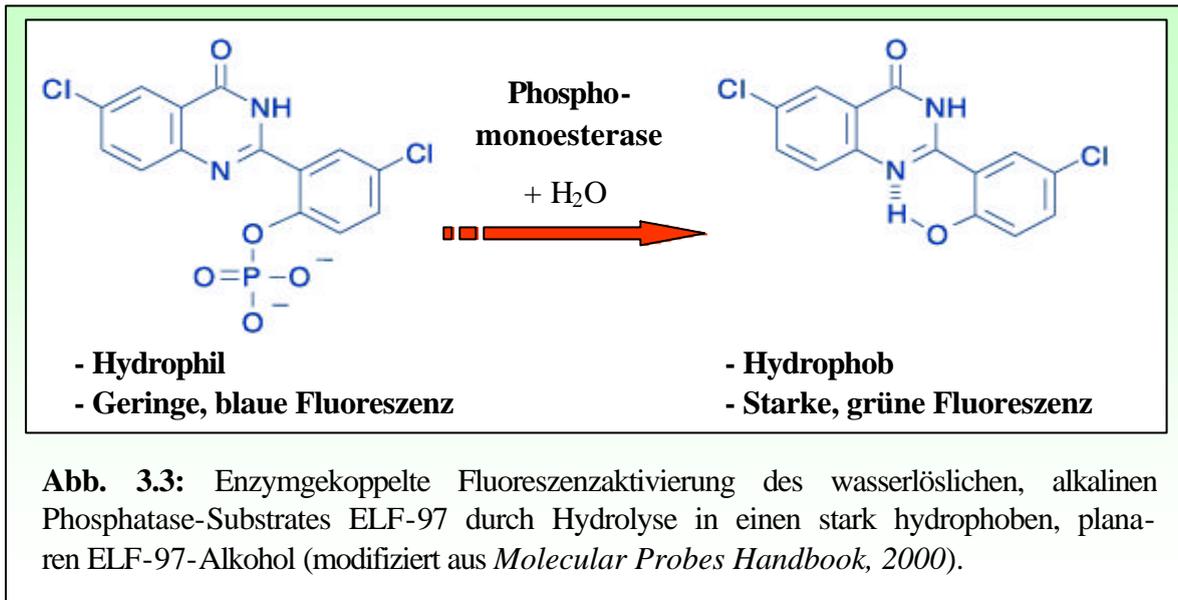
,**e**: Extinktionskoeffizient [$\mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1}$], **s**: Schichtdicke (Durchmesser der Quarzküvette = 1 cm), **c**: Konzentration von pNP [$\mu\text{g} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$], **I**: gemessene Lichtintensität mit Probe, **I₀**: gemessene Lichtintensität ohne Probe.

Die spektrometrische Bestimmung der Absorption von pNP erfolgte, nachdem eine definierte Menge homogenisierten Pilzmyzels (oberflächengebundener Anteil), respektive eine definierte Menge an flüssigem Pilznährmedium (extrazellulärer Anteil), zu einer Standardkonzentration eines pNPP-Substrates hinzugefügt und die Reaktion ($\text{pNPP} \rightarrow \text{pNP} + \text{P}$) mit Hilfe von NaOH zu definierten Zeiten gestoppt wurde (Kap. 8.4). Als Einheit zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Menge an umgesetztem pNP [μmol] pro Gewicht der eingesetzten Probenmenge [g] pro Stunde [h] in 10 ml Reaktionsvolumen berechnet und angegeben (s. Kap. 4.8.1).

Die Messungen des extrazellulären sowie des oberflächengebundenen Anteils der Phosphataseaktivität erfolgte bei unterschiedlichen pH-Werten ($3 \leq \text{pH} \leq 7$) an isolierten Mykobionten von *N. obliqua* (*A. boletinoides*, *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antarctica* und *C. geophilum*), die unter Variation des Phosphatgehalts der Nährmedien gezüchtet wurden (0-100 %, s. Kap. 8. 3-4 für Details). Eine Inkubationsdauer von 14 Tagen in den verschiedenen Nährmedien wurde nach Straker & Mitchell (1986) gewählt, die nach einer Anpassungsphase von ca. 7 Tagen maximale Phosphataseaktivitäten in Pilzisolaten nach 14 Tagen festgestellt hatten (s. Kap. 5.3.1.1). Zur Messungen des oberflächengebundenen Anteils der Phosphataseaktivität erfolgte vor der Inkubation mit pNPP eine Homogenisierung der geernteten Pilzhyphen (s. Kap. 8.4). Streng genommen wurde demnach der zytoplasmatische zusammen mit dem oberflächengebundenen Anteil der Phosphataseaktivität bestimmt. Nach McElhinney & Mitchell (1993) macht die zytoplasmatische Fraktion der Phosphataseaktivität von Ektomykorrhizapilzen allerdings weniger als 4 % des oberflächengebundenen Anteils aus und wird somit im folgenden vernachlässigt.

3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen mit Hilfe enzymgekoppelter Fluoreszenzaktivierung von ELF-97

Das alkaline Phosphatase-Substrat ELF-97 (ELF steht für Enzyme-Labeled Fluorescence, Molecular Probes, Göttingen) besitzt eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften, welche es



für die Bestimmung der Phosphataseaktivität in Zellen und Geweben interessant machen (z.B. Paragas *et al.* 1997, Huang *et al.* 1993). Als stark hydrophiles Substrat mit einem Monophosphatrest besitzt ELF-97 eine nur sehr schwache Fluoreszenzemission im blauen Wellenlängenbereich (Abb. 3.3).

Unter der Einwirkung von Phosphomonoesterasen wird der Monophosphatrest durch hydrolytische Reaktionen vom Substrat abgespalten. Der resultierende planare ELF-97-Alkohol zeichnet sich im Gegensatz zu dem Substrat durch stark hydrophobe Eigenschaften aus. Auf diese Weise entsteht ein Präzipitat, welches sich durch eine um ein Vielfaches erhöhte Quantenausbeute und einen ausgeprägten *Stokes-Shift* ausweist (das Emissionsmaximum liegt im gelb-grünlichen Wellenlängenbereich zwischen 500 und 600 nm). Insbesondere hervorzuheben ist die hohe Photostabilität des im UV-Bereich anzuregenden Fluorophors (Exzitationswellenlänge: $\lambda_{\text{MAX}} = 365 \text{ nm}$).

3.3.2.1 Vorversuche zur Validierung der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungen der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen

Da es sich bei den fluoreszenzmikroskopischen quantitativen Bestimmungen der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen um die Entwicklung einer neuen Methode handelt, waren zur Validierung folgende Voraussetzungen zu überprüfen:

1. Trennung des Fluoreszenzspektrums des aktivierten ELF-97 von der Autofluoreszenz der Ektomykorrhiza und der Ektomykorrhizapilze mit Hilfe von Filtern im Laser-Scanning-Mikroskop (Kap. 3.3.2.1.2).

2. Spezifität von ELF-97 bei der Lokalisierung der Phosphataseaktivität (Kap. 3.3.2.1.3).
3. Die Sättigungskinetik der enzymatischen Aktivierung von ELF-97 (Kap. 3.3.2.1.4).
4. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzintensität von ELF-97 sowie die Stabilisierung des pH-Wertes während der Fluoreszenzmessungen (Kap. 3.3.2.1.5).

Diese Punkte werden in den angegebenen Unterkapiteln im Rahmen von Vorversuchen überprüft und diskutiert. Zunächst wird in Kapitel 3.3.2.1.1 jedoch der Versuchsaufbau und die Präparation der Mykorrhizapilze für die folgenden Messungen beschrieben.

3.3.2.1.1 Versuchsaufbau und Probenpräparation für Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Analog zu den spektrometrischen Bestimmungen der Phosphataseaktivität (Kap. 3.3.1), wurden jeweils 3 parallele Reinkulturen von *A. boletinoides*, *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antartica* und *C. geophilum* 14 Tage in MMN-Flüssigmedium unter Variation des Phosphatangebotes (0 %, 30 %, 60 % und 100 %) kultiviert (Kap. 8.2 und Kap. 8.3).

Zur Messung wurde das gewachsene Pilzmyzel mit einer Pinzette entnommen, mit Pufferlösung gewaschen und junges Pilzmyzel von der Fläche $\approx 1 \text{ mm}^2$ mit einem Skalpell abgetrennt. Das abgetrennte Pilzmyzel wurde in 100 μl Eppendorff-Gefäße überführt. Danach wurden 5 μl einer ELF-97-Substratlösung mit definierten pH-Werten hinzupipettiert (pH = 3, 4, 5, 6 und 7, s. Kap. 8.5).

Nach einer definierten Inkubationszeit (s. auch Kap. 3.3.2.1.4) wurde das Pilzmyzel entnommen und auf einem extra angefertigten Objektträger (Abb. 3.4.a) erneut mit Pufferlösung gewaschen (in die verwendeten Glasobjektträger waren vorbereitend jeweils ca. 10 Einbuchtungen mit einem Radius von 1,5-2 mm und einer Tiefe von ca. 0,5 mm hineingeschliffen worden). Nach dem Waschen wurde das Pilzmyzel in eine der Einbuchtungen übertragen und ein Deckgläschen aufgebracht. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt (s. Skizze in Abb. 3.4.a). Auf diese Weise konnten die Proben über Stunden hinweg beobachtet werden, ohne dass sich die Fluoreszenzintensitäten veränderten oder sich die Probe aus dem Fokus herausbewegte.

3.3.2.1.2 Trennung der Spektren der Autofluoreszenz der Proben und der ELF-97-Fluoreszenzen

Abbildung 3.4.a zeigt exemplarisch den Strahlengang und die Filtereinstellungen am ZEISS-LSM-510 für eine Messung der ELF-97-Fluoreszenzintensität am Beispiel von *C. geophilum*. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmessungen zur Bestim-

mung der Phosphataseaktivität erfolgte die Exzitation mit einem UV-Argon-Laser bei 364 nm. Es wurden 3-Kanalbilder unter folgenden Bedingungen aufgezeichnet und farbskaliert (vergl. Abb. 3.4.a und Abb. 3.4.b, oben):

- **Roter Kanal:** Photodetektor (PD) 3, Fluoreszenzintensität des aktivierten ELF-97-Präzipitat im Wellenlängenbereich $\lambda = 560 - 615$ nm.
- **Grüner Kanal:** PD 2, Autofluoreszenz der Proben im Wellenlängenbereich $\lambda = 385 - 470$ nm.
- **Blauer Kanal:** Transmission bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 364$ nm.

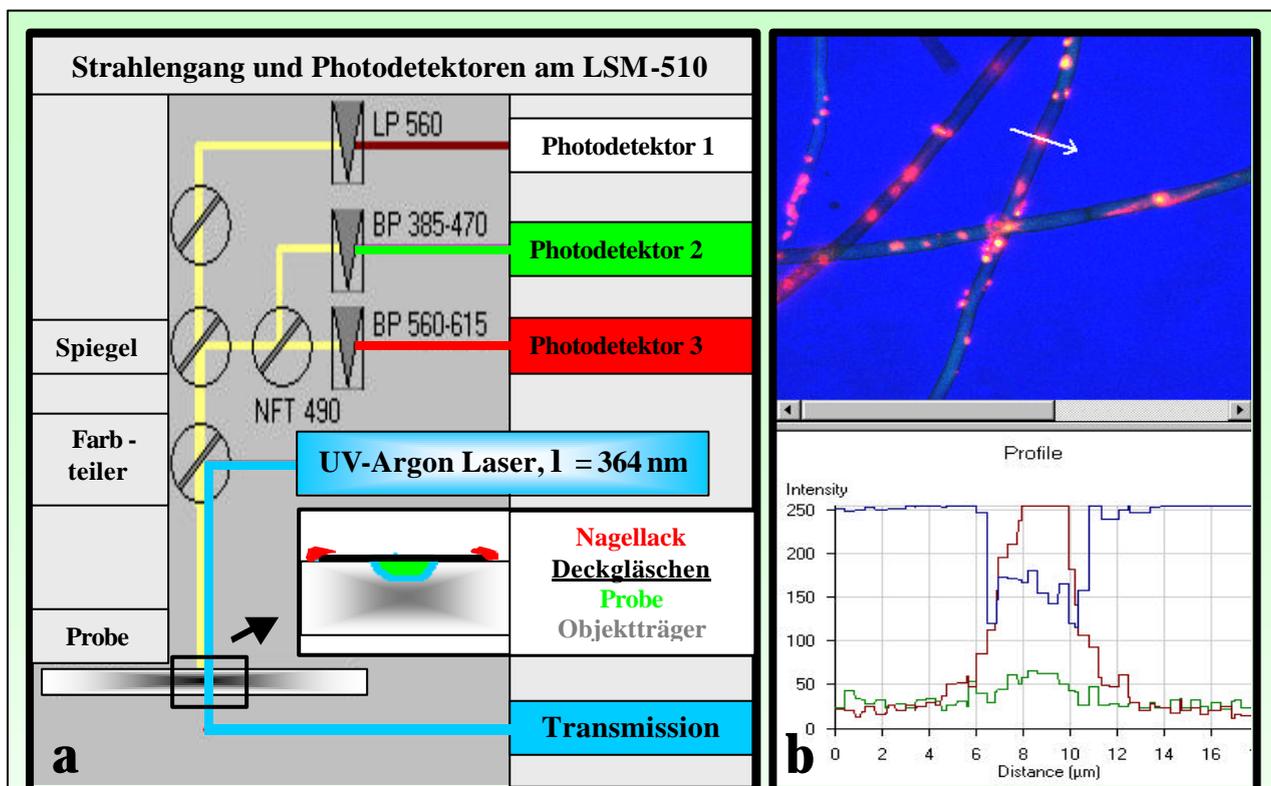


Abb. 3.4: Bestimmung der ELF-97-Fluoreszenzintensität mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie am Beispiel einiger Hyphen von *C. geophilum*.

[a]: Strahlengang, Probenpräparation und Filtereinstellung im ZEISS-LSM-510.

- Die Exzitation erfolgte mit einem UV-Argon-Laser bei 364 nm.
- Aufgenommen wurden: Transmission (blau), Fluoreszenzintensität des aktivierten ELF-97 im Wellenlängenbereich zwischen 560 und 615 nm (rot), Autofluoreszenz im Wellenlängenbereich zwischen 385 und 470 nm (grün).
- Detail der Probenpräparation auf einem angefertigten, mit Nagellack versiegelten Objektträger (s. Kap. 3.3.2.1.1).

[b]: **Oben:** Repräsentative 3-Kanalaufnahme einiger Hyphen von *C. geophilum* (Farbskalierung definiert in a, 63 x Ö-Immersion-Objektiv).

Unten: Intensitäten der drei Kanäle über einem Hyphenquerschnitt, entlang des weißen Pfeils (b, oben) über ein phosphataseaktives Zentrum (Farbskalierung definiert in a).

In Abbildung 3.4.b oben ist eine repräsentative 3-Kanalaufnahme von Hyphen von *C. geophilum* zu sehen. Wie gut zu erkennen ist, liegen oberflächengebundene Phosphatasen an Hyphen von *C. geophilum* in Form von gut definierten Zentren vor (siehe auch Detail in Abb. 3.5). Abbildung 3.4.b unten zeigt die Intensitäten der drei Detektor-Kanäle (Intensitätswerte zwischen 0 und 255) über einem Hyphenquerschnitt von *C. geophilum* mit einem phosphataseaktiven Zentrum entlang des weißen Pfeils (Länge = 17 μm , Abb. 3.4.b oben). Wie zu erkennen ist, zeigen die Intensitäten der Fluoreszenz von ELF-97 und der Autofluoreszenz ein Maximum, während die Transmissionsintensität ein Minimum über dem Hyphenquerschnitt aufweist. Zur Kontrolle möglicher Fluoreszenzüberlappungen in den Kanälen wurden Messungen an Hyphen in Abwesenheit von ELF-97-Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt.

- ***Der Fluoreszenzkanal des aktivierten ELF-97 (PD 3) zeigte unter diesen Bedingungen keine Bereiche mit signifikanten Intensitäten auf.***

3.3.2.1.3 Spezifität des ELF-97-Substrates bei der Lokalisierung der Phosphataseaktivität

Aufgrund seiner starken Hydrophilie und seiner Größe stellen hydrophobe Lipidmembranen von Zellen für das gelöste alkaline Phosphatase-Substrat ELF-97 eine kaum zu durchdringende Barriere dar (Abb. 3.3).

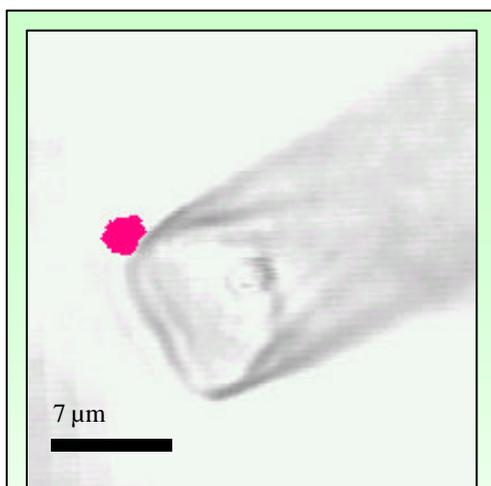


Abb. 3.5: Repräsentatives Detail der Lokalisierung des fluoreszenten ELF-97-Präzipitates (rot) an einem Querschnitt einer Hyphe von *C. geophilum*. Oberflächengebundene Phosphatasen liegen an Hyphen von *C. geophilum* in Form von gut definierten Zentren vor (vergl. Abb. 3.4).

Es muss davon ausgegangen werden, dass sich das von oberflächengebundenen Phosphatasen gesaltene, nun stark hydrophobe und fluoreszente ELF-97-Molekül in Zellwänden, Membranen oder in hydrophoben Proteintaschen nahe der Phosphatasen einlagert. Van Aarle *et al.* (2001) haben bereits die Eignung des Fluorophors ELF-97 für die Lokalisierung von oberflächengebundenen Phosphatasen in Endomykorrhizen bestätigt. In diesem Zusammenhang zeigte *Fast blue RR salt* (FB) identische Färbungsmuster in Endomykorrhizen wie das ELF-97-Präzipitat.

Abbildung 3.5 zeigt im Detail eine typische Lokalisierung des fluoreszenten ELF-97-Präzipitates (rot) eines phosphataseaktiven Zentrums an einem Querschnitt einer Hyphe von *C. geophilum*.

- Aufgrund von umfangreichen Beobachtungen dieser Art an allen in dieser Arbeit verwendeten Mykorrhizapilzen sowie der beschriebenen Moleküleigenschaften von ELF-97 (Abb. 3.3) kann generell von gut definierten, phosphataseaktiven Zentren an der äußeren Seite der Zellwände und der Zellmembran der Hyphen ausgegangen werden (vergl. Kap. 5.3.2.1).

3.3.2.1.4 Sättigungskinetik der enzymatischen Aktivierung von ELF-97

Ein entscheidender Aspekt bei der Verwendung von ELF-97-Substrat für quantitative Fluoreszenzmessungen ist die Beachtung der Sättigungskinetik der enzymatischen Aktivierung des Moleküls. Bei der Aktivierung von ELF-97 handelt es sich um eine einfache enzymatische Reaktion, welche den von Michaelis und Menten formulierten Gleichungen unterliegt. Sollen Messungen an verschiedenen Mykorrhizapilzen untereinander vergleichbar sein, müssen demnach die enzymatischen Reaktionen jeweils zur gleichen Zeit abgebrochen werden. Außerdem darf zu dieser Zeit die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nicht durch ein zur Neige gehendes Substratangebot beeinflusst werden.

Der Anstieg der Fluoreszenzintensität muss demnach noch im linearen Bereich der Sättigungskinetik liegen. In Abbildung 3.6 sind normierte Fluoreszenzintensitäten von ELF-97 in Abhängigkeit der Inkubationszeit für verschiedene Mykorrhizapilze dargestellt:

- Es zeigt sich, dass die Bedingung eines linearen Anstiegs der ELF-97-Fluoreszenzintensität nach 15 Minuten Inkubationszeit noch hinreichend erfüllt ist.

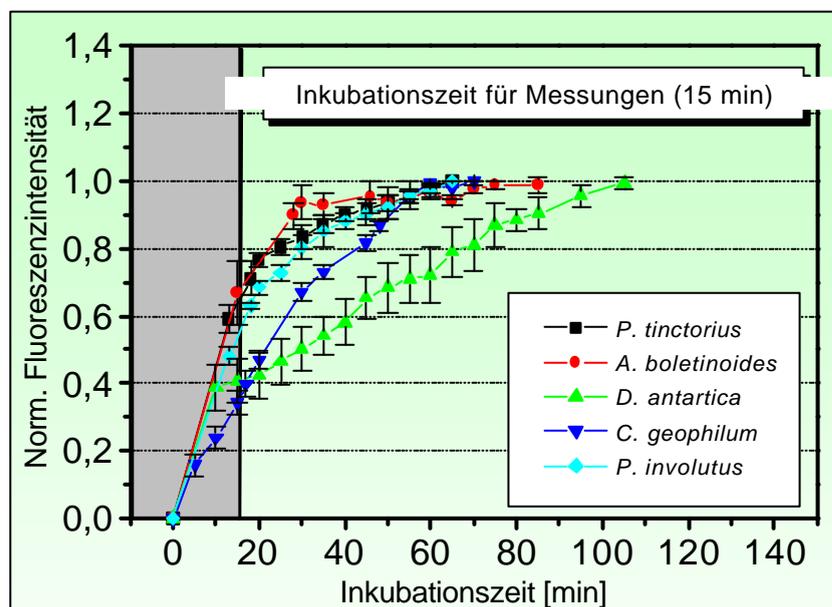
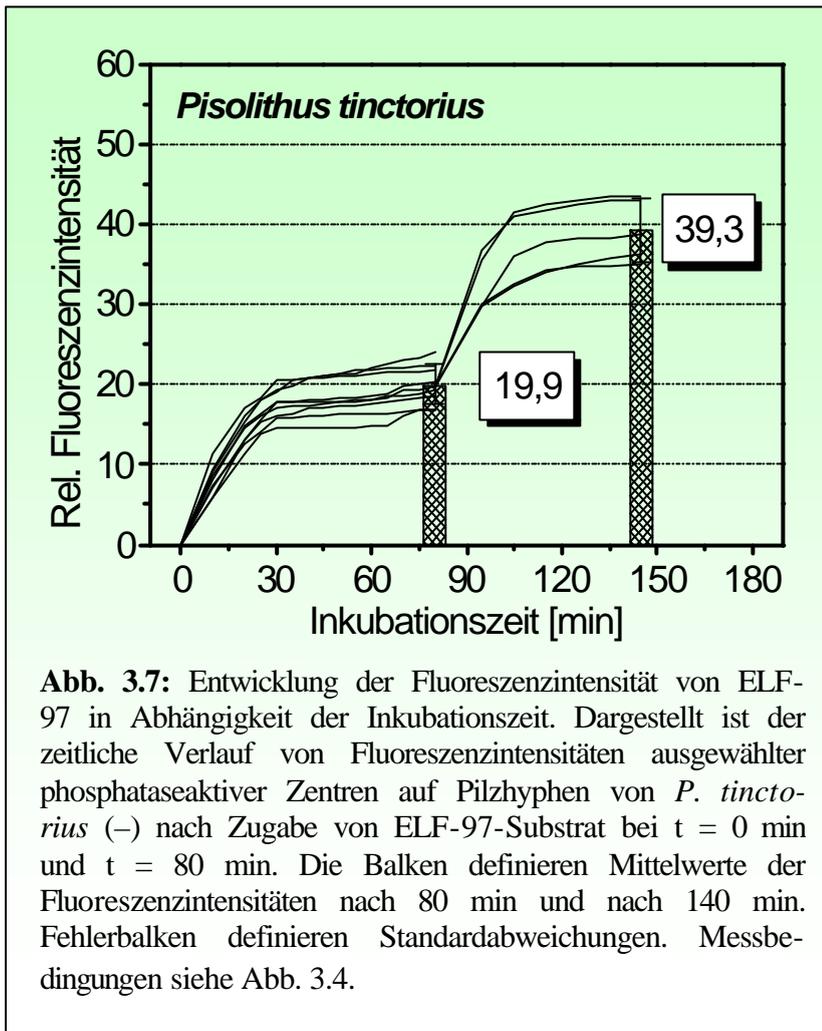


Abb. 3.6: Normierte Fluoreszenzintensität von ELF-97 in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von ca. 10 phosphataseaktiven Zentren für *P. tinctorius*, *A. boletinoides*, *D. antarctica*, *C. geophilum* und *P. involutus*. Die Fehlerbalken definieren Standardabweichungen. Messbedingungen siehe Abb. 3.4.



Eine weitere Voraussetzung ist, dass die Fluoreszenzintensitäten während dieser Inkubationszeit proportional zur Menge des umgewandelten ELF-97-Substrats ansteigen.

Abbildung 3.7 zeigt daher die Entwicklung der Intensitäten von ELF-97 in Abhängigkeit der Inkubationszeit über einen Zyklus von zwei aufeinanderfolgenden Inkubationen. Wie gut zu erkennen ist, erreichen die Sättigungswerte nach der zweiten Inkubation mit ELF-97-

Substrat den doppelten Wert der Sättigungswerte nach der ersten Inkubation. Dieses Verhalten beweist ...

- dass einerseits die Fluoreszenzintensitäten wirklich proportional zur Menge des umgewandelten ELF-97 Substrats ansteigen und ...
- dass andererseits das präzipitierende ELF-97 die Aktivität der oberflächengebundenen Phosphatasen unter diesen Bedingungen nicht weiter beeinflusst.

3.3.2.1.5 Kontrolle des pH-Wertes

Da im Rahmen dieser Arbeit die Phosphataseaktivitäten von Mykorrhizapilzen sowie mykorrhizierter und unmykorrhizierter Kurzwurzeln unter Variation des pH-Wertes untersucht wurden, mussten zunächst zwei Punkte sichergestellt werden:

1. Die Fluoreszenzintensität von ELF-97 wird nicht von pH-Werten beeinflusst.

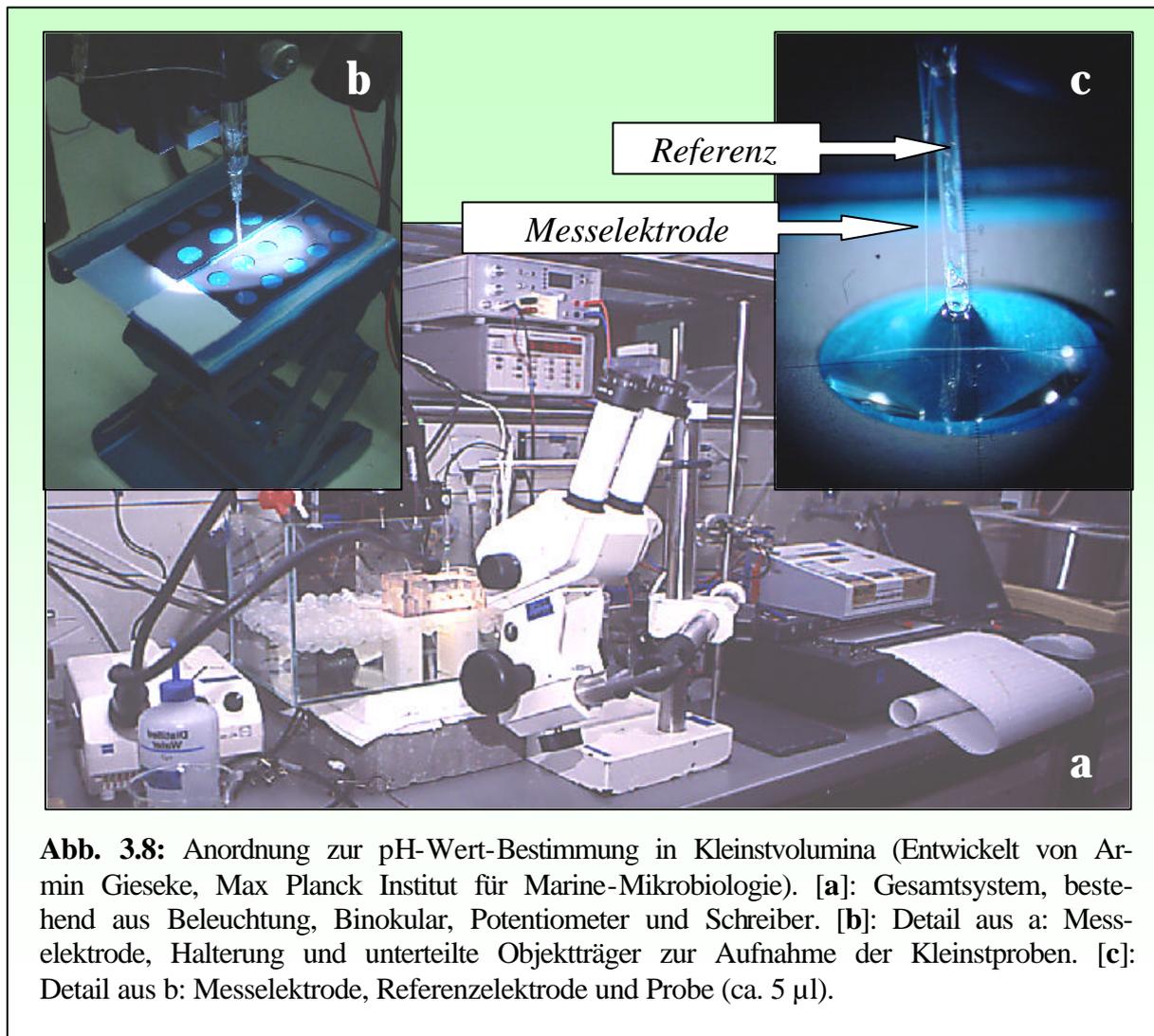


Abb. 3.8: Anordnung zur pH-Wert-Bestimmung in Kleinstvolumina (Entwickelt von Armin Gieseke, Max Planck Institut für Marine-Mikrobiologie). [a]: Gesamtsystem, bestehend aus Beleuchtung, Binokular, Potentiometer und Schreiber. [b]: Detail aus a: Messelektrode, Halterung und unterteilte Objektträger zur Aufnahme der Kleinstproben. [c]: Detail aus b: Messelektrode, Referenzelektrode und Probe (ca. 5 μ l).

2. Der pH-Wert im Untersuchungsvolumen darf sich durch die enzymatische Abspaltung des Phosphatrests von ELF-97 nicht bedeutend verändern.

Die erste Bedingung lässt sich recht einfach überprüfen. Nachdem sich gemäß Abbildungen 3.6 und 3.7 ein Sättigungswert der Fluoreszenzintensität der phosphataseaktiven Zentren auf Pilzhyphen von *P. tinctorius* eingestellt hatte, wurde der pH-Wert im Probenvolumen mit Hilfe von Puffern definiert verändert und die Intensitäten der phosphataseaktiven Zentren erneut gemessen:

- *Es konnten keine signifikanten Änderungen der Intensitäten der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes zwischen pH = 3 und pH = 7 festgestellt werden.*

Die Überprüfung der zweiten Bedingung erforderte hingegen spezialisierte Messungen. Wegen der hohen Kosten des Fluorophors ELF-97 und den schwierigen Messbedingungen am

Mikroskop wurden für Messungen der Phosphataseaktivitäten stets Kleinstvolumina (5 μl) verwendet. In Volumen dieser Größe stellt die Überwachung des pH-Wertes eine nicht triviale Aufgabe dar. Glücklicherweise wurde gerade im Max-Planck-Institut für Marine-Mikrobiologie (Bremen), eine Anordnung zur pH-Wert-Bestimmung in Kleinstvolumina von Armin Gieseke entwickelt (Abb. 3.8). Nach einer Inkubation von 15 min konnten keine Änderungen der pH-Werte detektiert werden, nach zwei Stunden Inkubationszeit lagen die Veränderungen der pH-Werte 4 bis 7 unter 6 %. Nur bei pH = 3 stieg der pH-Wert nach 2 Stunden um fast 40 % an.

- *Nach der für alle Messungen verwendeten Inkubationszeit von 15 min (vergl. Abb.3.6) waren keine signifikanten Veränderungen der pH-Werte unter den Inkubationsbedingungen festzustellen.*

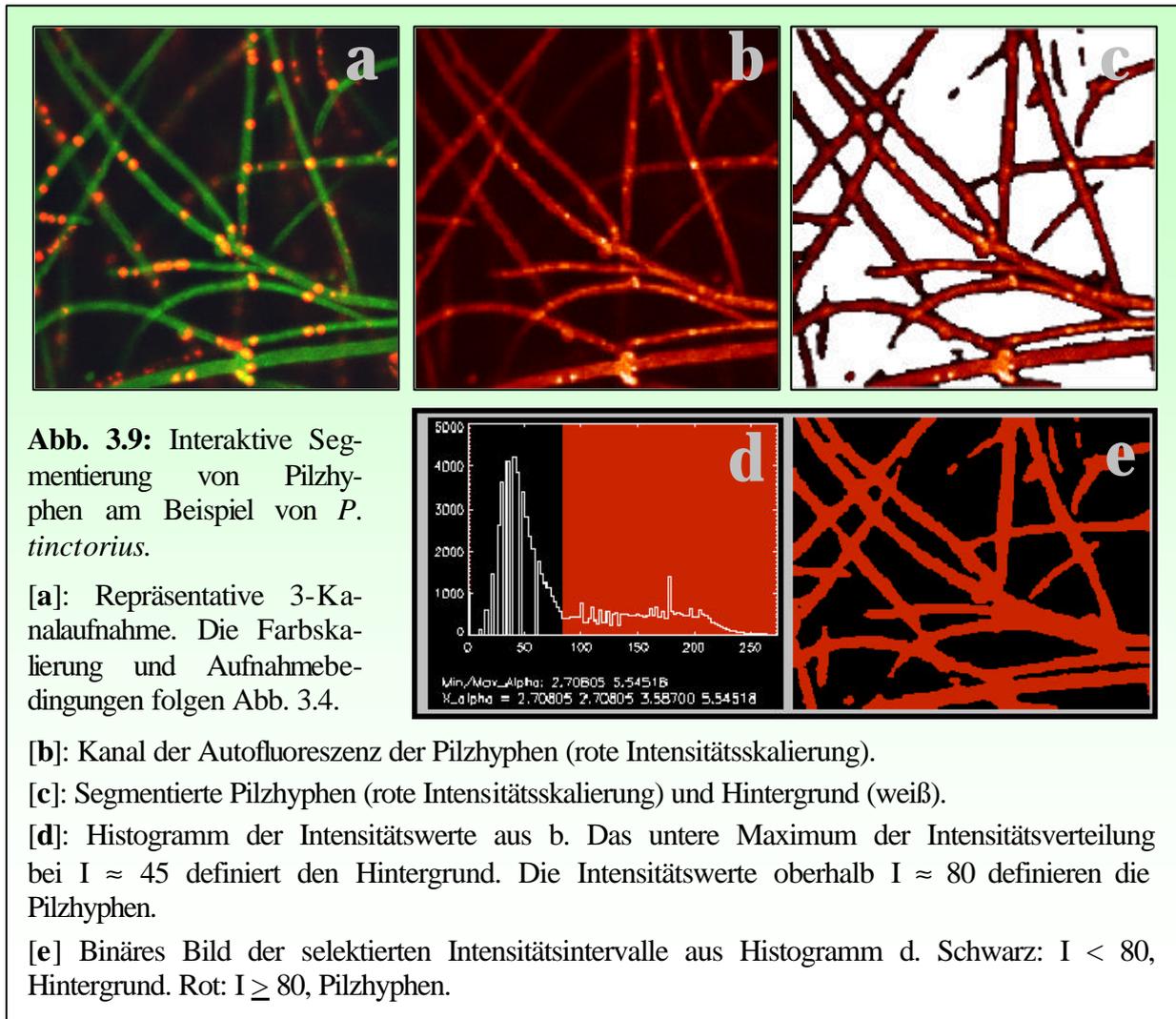
3.3.2.2 Definition der Messparameter zur Detektion der oberflächen- gebundenen Phosphataseaktivität von Pilzhypen

Nachdem durch die in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Vorversuche die Messbedingungen für quantitative Bestimmungen der Phosphataseaktivität klar definiert wurden, wird in diesem Kapitel das Konzept der verwendeten Bildverarbeitung vorgestellt. Außerdem werden die daraus resultierenden Messparameter zur Detektion der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Pilzhypen beschrieben.

Nach der Präparation von Proben für Messungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Kap. 3.3.2.1.1) wurden von jeder Probe ca. 10 3-Kanalbilder nach den in Abbildung 3.4 definierten Messbedingungen am ZEISS-LSM-510 (63 x Öl-Immersion-Objektiv) aufgenommen.

Abbildung 3.9 zeigt das Konzept der interaktiven Segmentierung von Pilzhypen am Beispiel von *P. tinctorius*. Es wurde ein Analyseprogramm verwendet, welches am Institut für experimentelle Physik der Universität Bremen in den letzten Jahren u.a. für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zellulärer Prozesse entwickelt worden ist (Cell_Calc 2000, Härtel 2000). Die Auswertung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Mykorrhizapilzen erfolgte durch folgende Schritte:

1. Zunächst wurde für jeden der untersuchten Mykorrhizapilze der mittlere Durchmesser (d [μm], $N \approx 20$) der Pilzhypen bestimmt (vergl. Abb. 3.4.b). Diese betragen für *A. boletioides* $d = 2,4 \mu\text{m}$, für *P. involutus* $d = 3,2 \mu\text{m}$, für *P. tinctorius* $d = 4,4 \mu\text{m}$, für *D. antarctica* $d = 3,2 \mu\text{m}$ und für *C. geophilum* $d = 4,4 \mu\text{m}$.
2. Pilzhypen wurden wie folgt segmentiert:



- Selektion des Bildkanals mit Intensitäten der Pilzhypen-Autofluoreszenz (Abb. 3.9.a grün, bzw. Abb. 3.9.b rot).
- Berechnung eines Histogramms der Intensitäten des Autofluoreszenzkanals (Abb. 3.9.d).
- Interaktive Definition eines Schwellwertes im Histogramm der Intensitäten des Autofluoreszenzkanals (Abb. 3.9.d): Das schwarze Intensitätsspektrum ($I < 80$) definiert den Hintergrund, das rote Intensitätsspektrum ($I \geq 80$) definiert die segmentierten Pilzhypen. In Abbildung 3.9.e sind die in Abbildung 3.9.d gewählten Intensitätsbereiche in der gewählten binären Farbkodierung zu sehen. Abbildung 3.9.c zeigt das endgültige Resultat der segmentierten autofluoreszierenden Pilzhypen (schwarz bis rot) vor dem Hintergrund (weiß).
- Aus Abbildung 3.9.e erfolgt die Berechnung der Fläche (**F**) der segmentierten Pilzhypen (Anzahl der segmentierten Pixel). Die Länge (**l**) der segmentierten Pilzhypen

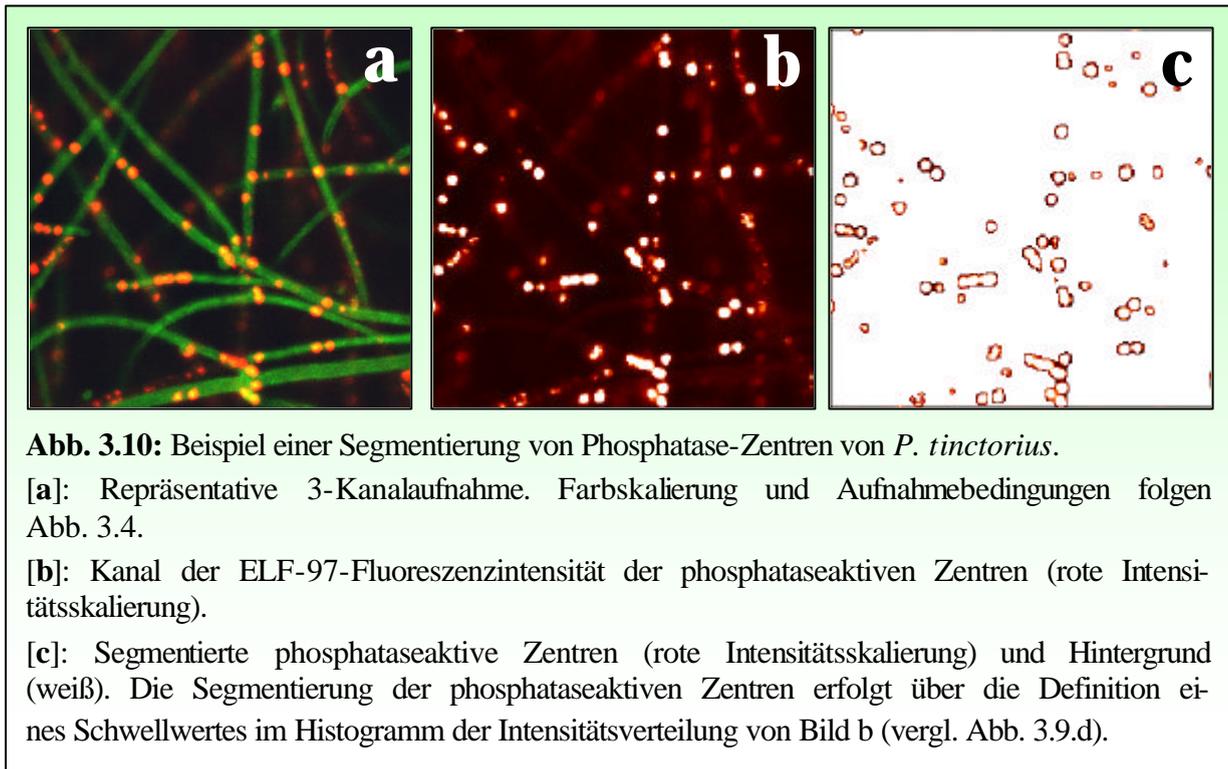


Abb. 3.10: Beispiel einer Segmentierung von Phosphatase-Zentren von *P. tinctorius*.

[a]: Repräsentative 3-Kanalaufnahme. Farbskalierung und Aufnahmebedingungen folgen Abb. 3.4.

[b]: Kanal der ELF-97-Fluoreszenzintensität der phosphataseaktiven Zentren (rote Intensitätsskalierung).

[c]: Segmentierte phosphataseaktive Zentren (rote Intensitätsskalierung) und Hintergrund (weiß). Die Segmentierung der phosphataseaktiven Zentren erfolgt über die Definition eines Schwellwertes im Histogramm der Intensitätsverteilung von Bild b (vergl. Abb. 3.9.d).

errechnet sich aus dem Quotienten der Fläche und des in Pixel umgerechneten Durchmessers der Pilzhyphen: $I = F / d$.

3. Die Segmentierung der Phosphatase-Zentren (Abb. 3.10) gestaltete sich nach dem gleichen Konzept wie die Segmentierung der Pilzhyphen (Abb. 3.9). An Stelle des Bildkanals der Intensitäten der Autofluoreszenz der Pilzhyphen wurde der Kanal der ELF-97-Fluoreszenzintensität der Phosphatase-Zentren (Abb. 3.10.a, Abb. 3.10.b rot) ausgewählt.
4. Die für die interaktive Segmentierung der Pilzhyphen und der Phosphatase-Zentren ausgewählten Schwellwerte wurden gespeichert. Sie wurden zur Auswertung aller aufgenommenen Proben im Anschluß automatisch verwendet.
5. Folgende Größen wurden aus den in Abbildung 3.9.c und Abbildung 3.10.c dargestellten segmentierten Pilzhyphen und Phosphatase-Zentren zur Auswertung verwendet:
 - Die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge.
 - Die Intensität der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge.
 - Die Größenverteilung der segmentierten Phosphatase-Zentren.

3.3.2.3 Messung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*

Die Messbedingungen für fluoreszenzmikroskopisch-quantitative Bestimmungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in isolierten Mykorrhizapilzen wurden zusam-

men mit dem Konzept der Bildverarbeitung und der daraus abgeleiteten Messparameter in den vorangestellten Kapiteln beschrieben (Kap. 3.3.2.1 und Kap. 3.3.2.2).

In diesem Kapitel erfolgt nun eine Erweiterung dieses Konzeptes auf Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*. Zunächst folgt eine Beschreibung des Versuchsaufbaus und der Probenpräparation (Kap. 3.3.2.3.1). In Kapitel 3.3.2.3.2 werden dann erneut die durch Bildverarbeitung abgeleiteten Parameter der Auswertung definiert und beschrieben.

3.3.2.3.1 Versuchsaufbau und Probenpräparation für Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln

Die Probenpräparationen aus mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln erfolgten aus 18 Wochen ‚jungen‘ Sämlingen von *N. obliqua*, die in Rhizotronen gehalten wurden (Kap. 3.1.3). Die mykorrhizierten Kurzwurzeln waren zu dieser Zeit 5 Wochen lang mit Mykorrhizapilzen inokuliert. Es wurden Mykorrhiza-Assoziationen zwischen *N. obliqua* und *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antarctica* und *C. geophilum* verwendet. Für jede Messung wurden insgesamt neun mykorrhizierte oder unmykorrhizierte Kurzwurzelstücke aus drei Rhizotronen verwendet.

5-7 mm lange mykorrhizierte und unmykorrhizierte Wurzelstücke wurden zunächst mit Pufferlösung gewaschen und die frischen Proben in 100 µl Eppendorff-Gefäße überführt. Danach wurden 15 µl der ELF-97-Substratlösung mit definierten pH-Werten hinzupipettiert (pH = 3, 4, 5, 6 und 7, s. Kap. 8.5). Nach einer definierten Inkubationszeit wurden die mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln mit einer Pinzette entnommen und erneut mit Pufferlösung gewaschen. Kurzwurzelspitzen der Länge 2-3 mm wurden danach abgeschnitten. Auch bei den Kurzwurzeln lag der Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 15 min noch im linearen Bereich der Sättigungskinetik (vergl. Abb. 3.6). Allerdings wurden in diesem Fall zur Überprüfung lediglich die Fluoreszenzintensitäten von Proben nach Inkubationszeiten von 10 min und 20 min verglichen. Die angefärbten Probensegmente wurden in 4 % Agar-Agar eingebettet. Sofort nach der Einbettung erfolgte die Anfertigung von Querschnitten mit Hilfe eines Vibratoms 1000 (Lancer Sherwood Medical Company, Dicke der Querschnitte: 30 µm). Von der Wurzelspitze ab gerechnet wurde jeweils der dritte oder vierte Querschnitt verwendet.

Die Querschnitte wurden wieder auf den bereits beschriebenen angefertigten Objektträger übertragen (vergl. Kap. 3.3.2.1.1). Um Verdunstungen zu vermeiden, wurden die aufgebracht-

ten Deckgläschen mit Nagellack versiegelt (s. Skizze in Abb. 3.4.a). Auf diese Weise konnten auch hier Querschnitte über Stunden hinweg beobachtet werden, ohne dass Veränderungen auftraten.

3.3.2.3.2 Definition der Messparameter zur Detektion der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln

Nachdem die Präparationen der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* für Messungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erfolgt waren (Kap. 3.3.2.3.1), wurde von jeder Probe zunächst der Gesamtquerschnitt (Zoom = 0,7, 40 x Öl-Immersion-Objektiv, Strahlengang und Filtereinstellung s. Abb. 3.4) und im Anschluß daran von jedem Querschnitt 4 bis 6 Detailaufnahmen des Hartigschen Netzes und des Hyphenmantels aufgenommen (Zoom = 2).

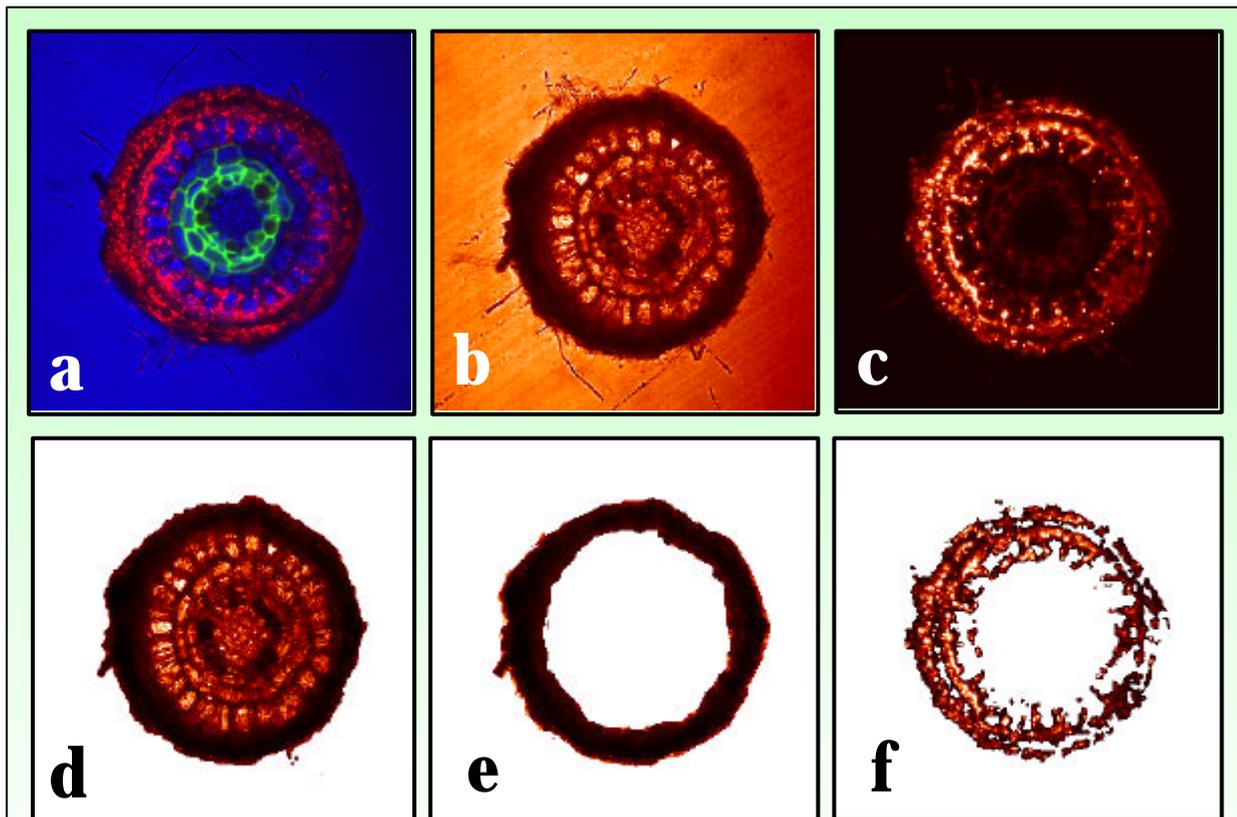


Abb. 3.11: Repräsentatives Beispiel einer interaktiven Segmentierung unterschiedlicher Sektionen sowie der Phosphatase-Enzymaktivität der Ektomykorrhiza *N. obliqua* und *P. tinctorius*. [a]: Originalbild, aufgenommen mit ZEISS-LSM-510. (512 x 512 Pixel, blau: Durchlichtkanal, grün: Autofluoreszenzkanal, rot: ELF-97-Fluoreszenzintensität / Phosphataseaktivität, s. Abb. 3.4) [b]: Durchlichtkanal, rote Farbskalierung. [c]: Phosphataseaktivität, rote Farbskalierung. [d]: Segmentierte Ektomykorrhizafläche aus b, rote Farbskalierung. [e]: Segmentierte Fläche des Hyphenmantel aus b, rote Farbskalierung. [f]: Segmentierte Phosphataseaktivität aus c, rote Farbskalierung.

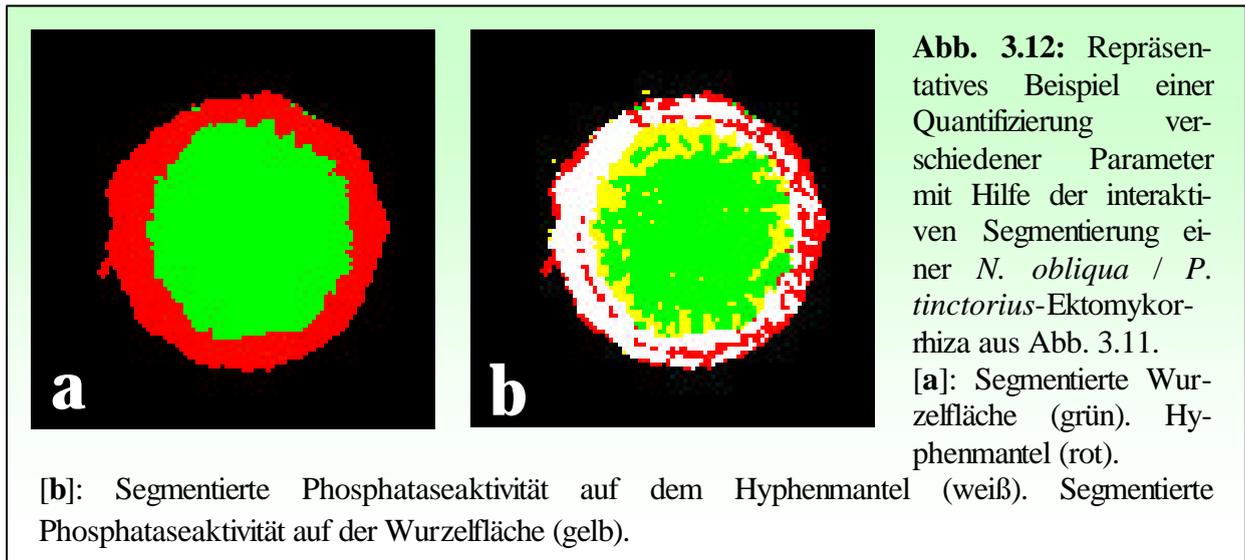
Abbildung 3.11 zeigt das Konzept der interaktiven Segmentierung von Gesamtquerschnitten am Beispiel einer Ektomykorrhiza-Assoziation von *N. obliqua* und *P. tinctorius*. Es wurde auch für diese Messungen das in Kapitel 3.3.2.2 vorgestellte Analyseprogramm verwendet (Härtel 2000).

Die Auswertung der Phosphataseaktivität in Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* erfolgte durch folgende Schritte:

1. Segmentierung der gesamten Mykorrhizafläche (Abb. 3.11.d) aus dem Durchlichtkanal (Abb. 3.11.b).
2. Segmentierung der Fläche des Hyphenmantels (Abb. 3.11.e) aus dem Durchlichtkanal (Abb. 3.11.b).
3. Segmentierung der Flächen, welche Phosphataseaktivität aufweisen (Abb. 3.11.f), aus dem ELF-97-Fluoreszenzkanal (Abb. 3.11.c).

Wie bereits für die Segmentierung der Mykorrhizapilzhyphen beschrieben (Abb. 3.9), erfolgten auch bei den Querschnitten die Segmentierungen durch interaktive Definition von Schwellwerten in Histogrammen der Intensitäten der angegebenen Kanäle. Es waren hier jedoch Zusatzschritte bei der Segmentierung der gesamten Mykorrhizafläche und der Fläche des Hyphenmantels notwendig. Bei den Zusatzschritten handelt es sich um sogenannte Dilations- und Erosionsoperationen (Härtel 2000). Erstere schließen offene Flächen (s. helle innere Wurzelzellen der Abb. 3.11.b), die Erosionsoperationen unterdrücken dünne Objekte (s. dunkles Hartigsches Netz und abziehende Hyphen in Abb. 3.11.b). Nach sukzessiver Anwendung dieser Operatoren wurde in fast allen Fällen eine sehr gute Segmentierung der Flächen erreicht.

4. Aus der gesamten segmentierten **Mykorrhizafläche** (A_{MF} , rote + grüne Fläche in Abb. 3.12.a) und der segmentierten **Fläche des Hyphenmantels** (A_{HM} , rote Fläche) wurde zunächst die **Fläche der Kurzwurzel** bzw. des **Hartigschen Netzes** (A_{KW} , grüne Fläche) von *N. obliqua* berechnet: $A_{KW} = A_{MF} - A_{HM}$.
5. Der **Pilzanteil der Mykorrhiza** in Kurzwurzeln wurde als Quotient aus der Fläche des Hyphenmantels und der Fläche der Wurzelzellen definiert und berechnet: **Pilzanteil der Mykorrhiza** = A_{HM} / A_{KW} .
6. Neben den segmentierten **Flächen von hoher Phosphataseaktivität** (A_{PA} , gelbe + weiße Fläche in Abb. 3.12.b) wurde zunächst die **gesamte Phosphataseaktivität** (I_{PA}) und die **mittlere Phosphataseaktivität** auf die Fläche bezogen (I_{PA}/A_{PA} [$I/\mu\text{m}^2$]), berechnet.



7. Die segmentierten **Flächen hoher Phosphataseaktivität** (A_{PA} , gelbe + weiße Fläche in Abb. 3.12.b) sowie die **gesamte Phosphataseaktivität** (I_{PA}) wurden in Anteile des **Hyphenmantels** ($I_{PA/HM}$ / $A_{PA/HM}$, weiße Fläche) und der **Fläche der Kurzwurzel / Hartigsches Netz** ($I_{PA/KW}$ / $A_{PA/KW}$, gelbe Fläche) aufgespalten. Daraus errechnete sich dann der prozentuale Anteil der Phosphataseaktivität auf dem Hyphenmantel der Ektomykorrhizen ($I_{PA/HM} / (I_{PA/HM} + I_{PA/KW}) \cdot 100$ [%]).
8. Auch von den Detailaufnahmen wurde die **Mykorrhizafläche**, die **Fläche des Hyphenmantels**, die **Fläche der Kurzwurzel** (bzw. des **Hartigschen Netzes**) und die **Flächen / Intensitäten hoher Phosphataseaktivitäten** sowie deren Anteile auf dem **Hyphenmantel** und der **Fläche der Kurzwurzel / Hartigsches Netz** segmentiert und analog zu den Aufnahmen der Gesamtektomykorrhiza berechnet.

4. ERGEBNISSE

4.1 Die Kultivierung von *N. obliqua*

Die Ergebnisse der Versuche zur Unterbrechung der Samenruhe und zur Sterilisierung der Samenoberflächen für die Kultivierungen von *N. obliqua* sind in Tabelle 4.1 dargestellt (Versuchsaufbau siehe Kap. 3.1.1). Erste Keimlinge konnten bereits 2 Wochen nach Aussaat beobachtet werden (s. Abb. 3.1.a).

	Keimungsrate [%]					
	A	B	C	D	E	Kontrolle
a	90 ± 4	18,3 ± 10,4	26,7 ± 6,1	8 ± 4	29,3 ± 2,3	3,7 ± 0,6
b	34,7 ± 12,8	2,7 ± 2,3	5,3 ± 2,3	0	6 ± 3	2,3 ± 1,2
c	30 ± 10	1,3 ± 2,3	6,7 ± 2,3	0,7 ± 0,6	4	2,7 ± 2,3

Tab. 4.1: Keimungsrate von *N. obliqua* in Abhängigkeit der Behandlung der Samen vor der Aussaat zur Unterbrechung der Samenruhe (A-E) und zur Sterilisierung der Samenoberflächen (a-c). **A:** Quellung in 0,2 % Gibberelinsäure (2 Tage) und in Aq_{Bidest} (7 Tage). **B:** Quellung in Aq_{Bidest} (7 Tage). **C:** Quellung in 0,2 % Gibberelinsäure (7 Tage). **D:** Quellung in 0,2 % Gibberelinsäure (2 Tage). **E:** Quellung in Aq_{Bidest} (2 Tage) und Stratifikation in autoklaviertem, angefeuchtetem Sand (60 Tage). **a:** Inkubation in 30 % Wasserstoffperoxid (3 min). **b:** Inkubation in 0,1 % NaCl (10 min). **c:** Inkubation in 100 % Ethanol (1 min) und anschließende Behandlung mit 5 % Penicilin-Streptomycin (60 min). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen [%] aus drei unabhängigen Experimenten (siehe Kap. 3.1.1).

Wie in Tabelle 4.1 klar zu erkennen ist, hat sowohl die Behandlung der Samen vor der Aussaat zur Unterbrechung der Samenruhe (Tab. 4.1: A-D) als auch die Behandlung zur Sterilisierung der Samenoberflächen (Tab. 4.1: a-c) großen Einfluss auf die Keimungsrate.

Eine Quellung der Samen in 0,2 % Gibberelinsäure für 2 Tage in Kombination mit einer Quellung in Aq_{Bidest} für 7 Tage (Methode A: vergl. Tab. 3.1) erwies sich mit großem Abstand als die erfolgreichste Methode zur Unterbrechung der Samenruhe (Keimungsrate 90 %). Unter den Verfahren zur Sterilisierung der Samenoberfläche war die Inkubation in 30 % Wasserstoffperoxid für 3 min den beiden anderen Verfahren überlegen. Deshalb ist diese Kombination der Behandlungen als Basis aller folgenden Kultivierungen von *N. obliqua* anzusehen.

4.2 Artenbestand der Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten im Untersuchungsgebiet

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Repräsentanten von spezifischen als auch Repräsentanten von unspezifischen Ektomykorrhizapartnern von *Nothofagus*-Arten untersucht. Zu den spezifischen Ektomykorrhizapilzen zählen jene, deren Fruchtkörper ausschließlich in Assoziation mit *Nothofagus*-Arten vorkommen. Unspezifische Ektomykorrhizapilze wurden hingegen mit exotischen Wirtspflanzen eingeführt und weisen sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. In den Naturwäldern von *N. obliqua* im Untersuchungsgebiet Quita Cal-

zón (Kap. 2.3) wurden zwischen Februar und Juni 1998 Fruchtkörper von Mykorrhizapilzen folgender Gattungen gefunden: *Amanita*, *Austropaxillus*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Descolea*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Paxillus*, *Russula*, *Tricholoma* und *Xerocomus* (s. Tab. 4.2).

Von allen gefundenen und in Tab. 4.2 aufgeführten Mykorrhizapilzen wurden lediglich die mit einem Stern (*, *) gekennzeichneten Arten erfolgreich isoliert und anschließend kultiviert. In forstwirtschaftlich genutzten Monokulturen von *P. radiata* wurden Fruchtkörper der Mykorrhizapilze folgender Gattungen gefunden: *Amanita*, *Lacca-*

Amanita aurantiovelata Schalwijk & Jensen
A. diemii Sing.
Austropaxillus boletinoides (Sing.) Brsky. & Jarosch *
A. statuum (Speg.) Brsky. & Jarosch *
Boletus chilensis Sing. *
B. loyita Horak *
B. loyo Phil. ex Speg. *
Cortinarius albocinctus Moser
C. austroacutus Moser
C. austrolimonius Moser & Horak
C. austrosalor Moser
C. flammuloides Moser & Horak
C. lebre Garrido
C. luteostriatula (Moser & Horak) Val. & Moreno
C. magellanicus Speg.
C. pachynemeus Moser
C. pugionipes Moser
Descolea antartica Sing. *
Inocybe fuscata Sing.
Laccaria laccata (Scop. ex Fr.) Berk. et Br.
Paxillus involutus (Batsch: Fr.) Sing. *
Russula nothofaginea Sing.
Tricholoma fusipes Horak
Xerocomus rubellus (Krbh.) Quél. *

Tab. 4.2: Zusammenstellung von Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten, deren Fruchtkörper in Waldgebieten von *N. obliqua* beobachtet wurden.

- Mykorrhizapilze, spezifisch für *Nothofagus* (**Fettgedruckt**).
- Erfolgreich kultivierte Mykorrhizapilze (*, *).
- Isolierte Mykorrhizapilze, die für physiologische Untersuchungen verwendet wurden (*).

Amanita gemmata (L. ex Fr.) Gill.
A. rubescens (Pers.: Fr.) S. F. Gray
Laccaria laccata (Scop. ex Fr.) Berk. et Br.
Lactarius deliciosus (L.: Fr.) S. F. Gray
Russula sardonia Fr. em. Rom.
Suillus luteus (L.: Fr.) S. F. Gray
Paxillus involutus (Batsch: Fr.) Sing. *
Xerocomus rubellus (Krbh.) Quél. *

Tab. 4.3: Zusammenstellung von Ektomykorrhizenbildenden Basidiomyceten, deren Fruchtkörper in Waldgebieten von *P. radiata* beobachtet wurden.

- Erfolgreich kultivierte Mykorrhizapilze (*,*).
- Isolierte Mykorrhizapilze, die für physiologische Untersuchungen verwendet wurden (*).

ria, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus*, *Paxillus* und *Xerocomus* (s. Tab. 4.3).

In forstwirtschaftlich genutzten Monokulturen von *E. globulus* wurden in der Region um Valdivia lediglich Fruchtkörper der Gattung *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Berk. et Br. und *Paxillus involutus* (Batsch: Fr.) Sing. gefunden.

4.2.1 Systematische Klassifizierung spezifischer Ektomykorrhizapartner von *Nothofagus*-Arten

Im Folgenden werden lediglich die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich isolierten spezifischen Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus*-Arten beschrieben. Es sind dies Repräsentanten der Gattungen *Austropaxillus* (Gymnopaxillaceae), *Descolea* (Bolbitaceae) und *Boletus* (Boletaceae). An dieser Stelle muß angemerkt werden, dass die systematische Klassifizierung der Paxillaceae in den letzten Jahren einigen Modifizierungen unterworfen war. *Paxillus boletinoides* und *Paxillus statuum* werden der Gattung *Austropaxillus* zugeordnet (Bresinsky et al. 1999). In dieser Arbeit werden Mykorrhizapilze der Gattung *Austropaxillus* bereits nicht mehr in die Familie der Paxillaceae, sondern in die Familie der Gymnopaxillaceae eingeordnet. Denn: Molekulare und chemische Analysen haben gezeigt, dass *Austropaxillus* klar von *Paxillus* s. str. und damit von der Familie der Paxillaceen s. str. abgegrenzt werden muß. *Austropaxillus* weist eine nahe verwandtschaftliche Stellung zu *Gymnopaxillus* auf (molekulare und morphologisch-anatomische Daten, noch unveröffentlicht, schriftliche Mitteilung von Margit Jarosch, Oktober 2000, Inst. für Botanik, Univ. Regensburg). Neben *Gymnopaxillus* wird demnach auch *Austropaxillus* in die neu zu etablierende Familie der Gymnopaxillaceae fam. nov. gestellt (Jarosch, Bresinsky und Trappe, Publikation in Vorbereitung).

4.2.1.1 Allgemeine Charakteristiken der Gattung *Austropaxillus* Bresinsky und Jarosch gen. nov.

Nach Bresinsky et al. (1999) werden als *Austropaxillus* nun jene Arten der Südhemisphäre bezeichnet, welche bislang unter den Bezeichnungen *Paxillus* und *Tapinella* liefen.

Die Gattung *Austropaxillus* ist anatomisch-morphologisch charakterisiert durch kontinuierlich vergabelte Lamellen des Hymenophors, relativ große Sporen ($> 7,8 \times 4,8 \mu\text{m}$) und große hyaline keulenförmige Basidien ($6-11 \times 40-70 \mu\text{m}$). Zystidien fehlen bei allen Arten der Gattung *Austropaxillus* mit Ausnahme von *A. chilensis*, welcher Cheilozystidien aufweist. Als chemische Charakterisierung kann festgestellt werden, dass die Pigmentmuster der nördlichen Mykorrhizen-bildenden Arten im Gegensatz zu den südlichen Arten Involutin als typisches Pigment zeigen. Die südlichen Mykorrhizen-bildenden Arten sind hingegen durch 2,4,5-Trihydroxyphenylglyoxylsäure charakterisiert (Garrido 1988).

A. boletinoides unterscheidet sich sehr einfach von *A. statuum* durch die Präsenz einer Cortina, durch elliptische Sporen und durch das Vorkommen von Schnallen.

4.2.1.1.1 *Austropaxillus boletinoides* (Sing.) Bresinsky et Jarosch, Plant biol. 1, 1999: 327-333

Basionym: *Paxillus boletinoides* Sing. et Digilio, Lilloa 25, 1951:431

Makroskopische Merkmale (vergl. Abb. 4.1.a-b): Fruchtkörper in Hut und Stiel gegliedert, fleischig. Hut 5 bis 10 cm breit, trocken, jung konvex, dann trichterförmig mit einer Einbuchtung im Zentrum, an den Rändern oft mit hängenden Resten des Velums. Die Einbuchtung im Zentrum ist häufig dunkelbraun, faserig-schuppig, im Hintergrund mit gelblichem Ton. Hutrand in jungen Stadien eingerollt. Lamellen herablaufend, zahlreich, engstehend, Hutrand in jungen Stadien eingerollt. Lamellen herablaufend, zahlreich, engstehend,

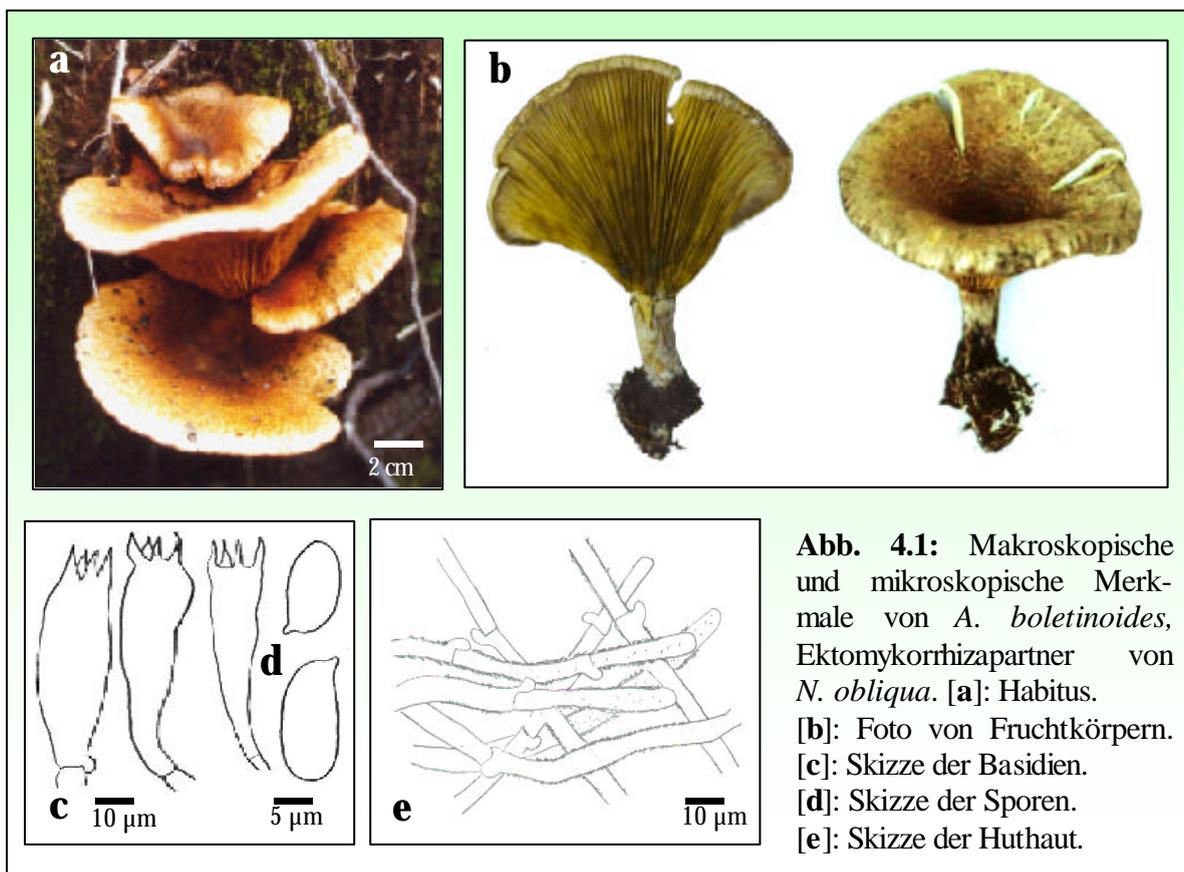


Abb. 4.1: Makroskopische und mikroskopische Merkmale von *A. boletinoides*, Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua*. [a]: Habitus. [b]: Foto von Fruchtkörpern. [c]: Skizze der Basidien. [d]: Skizze der Sporen. [e]: Skizze der Huthaut.

jede Lamelle ein- bis mehrfach gegabelt, im jungen Zustand tongelb, dann rostbräunlich. Lamellen von Hutfleisch leicht ablösbar. Stiel 4-6,5 × 0,5-1 cm, zylindrisch, gegen die Basis gespitzt, trocken, zentral, manchmal leicht exzentrisch, gerieft-faserig, gelbbraun bis kastanienbraun, oberhalb des Velums weiß bis blass gelblich. Stielbasis dunkel. Velum hinterlässt Zone am Stiel, erst weißlich, später kastanienbraun. Fleisch weißlich, nach dem Aufschneiden rosabräunlich. Fleisch mit KOH gelb-rotbraun, violett, Lamellen rotbraun. Sporenpulver rostbraun (D7).

Mikroskopische Merkmale (Abb. 4.1.c-e): Zystidien fehlend. Basidien 40-60 × 6-12 µm, keulenförmig, viersporig. Sporen 9-12 × 5-7 µm, elliptisch, gelblich, glatt, ohne Keimporus, nicht amyloid aber cyanophil und dextrinoid. Huthauthyphen (6-12 µm breit) trichodermisch eingeordnet, zylindrisch, bräunlich pigmentiert, bräunlich inkrustiert, zum Teil mit Oleiferen. Schnallen vorhanden. Lamellentrama bilateral divergierend.

4.2.1.1.2 *Austropaxillus statuum* (Speg.) Bresinsky et Jarosch, Plant biol. 1, 1999: 332. Basionym: *Paxillus statuum* (Speg.) Horak, Darwiniana 14, 1967:262

Makroskopische Merkmale (Abb. 4.2.a): Fruchtkörper in Hut und Stiel gegliedert. Hut 2 bis 5 cm breit, jung konvex, mit leichter Vertiefung in der Mitte, dann abgeflacht-vertieft bis trichterförmig, etwas schmierig, hellbraun, gelb bis strohgelb, nach dem Aufschneiden

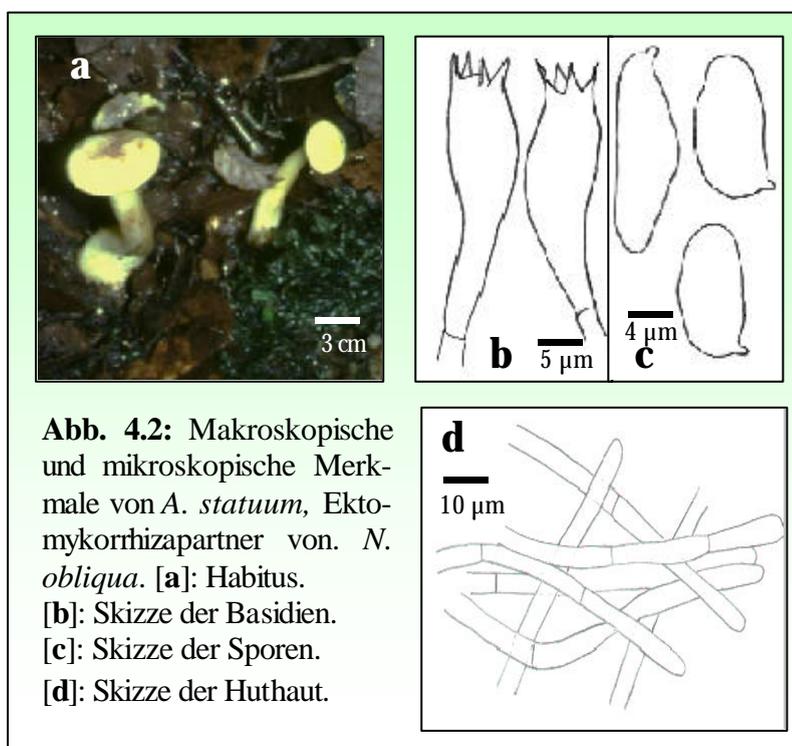


Abb. 4.2: Makroskopische und mikroskopische Merkmale von *A. statuum*, Ekto-mykorrhizapartner von *N. obliqua*. [a]: Habitus. [b]: Skizze der Basidien. [c]: Skizze der Sporen. [d]: Skizze der Huthaut.

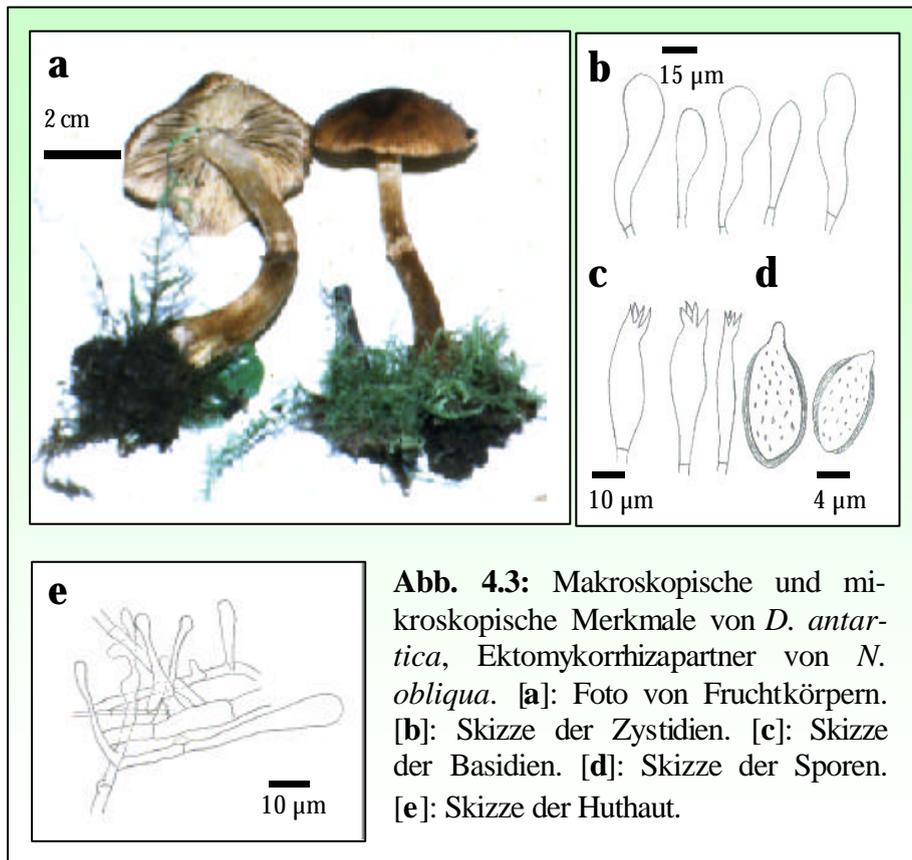
olivbräunlich verfärbend, Oberfläche mit Schuppen bedeckt. Lamellen herablaufend, gebogen, dicht, gegen den Hutrand wiederholt 2-3-fach gegabelt, im jungen Zustand hell gelblich-bräunlich, später lebhaft gelblicher, bei Berührung dunkelbraun fleckend. Lamellen von Hutfleisch leicht ablösbar. Stiel 3-6,5 × 0,5-1,5 cm, zylindrisch, gegen die Basis gespitzt, zentral, glatt,

gelblich, bei Berührung dunkel rötlichbraun fleckend. Huthaut mit KOH kastanienbraun, Fleisch dunkel rotbraun. Sporenpulver rostbraun (D7).

Mikroskopische Merkmale (Abb. 4.2.b-d): Zystidien fehlend. Basidien $40-65 \times 7-10 \mu\text{m}$, keulenförmig, viersporig. Sporen $10-20 \times 5-7 \mu\text{m}$, spindelförmig, gelblich, ockerbräunlich, glatt, ohne Keimporus, nicht amyloid aber cyanophil und dextrinoid. Huthauthyphen ($6-15 \mu\text{m}$ breit) trichodermisch eingeordnet, zylindrisch, bräunlich pigmentiert, bräunlich inkrustiert, mit eingestreuten Oleiferen. Schnallen fehlend. Lamellentrama bilateral divergierend.

4.2.1.2 Allgemeine Charakteristiken der Familie Bolbitaceae Sing.

Fruchtkörper in Hut und Stiel gegliedert. Hymenophor meist deutlich lamellenförmig, Lamellentrama regulär. Stiel zum Teil mit partialem Velum, oft mit Ring. Dermatozystidien zum Teil vorhanden. Mit Caulo- und Cheilo-, seltener mit Pleurozystidien. Sporen glatt, selten leicht ornamentiert, mit meist deutlichem Keimporus. Sporenpulver rostocker, rostbraun bis tabak- oder umbrabraun. Huthaut hymeniform aus rundlichen bis blasen- oder birnenförmigen Zellen bestehend. Die Gattung *Descolea* Sing. unterscheidet sich von anderen Gattungen der Familie Bolbitaceae Sing. durch seinen Stiel mit einem Ring (Abb. 4.3.a) und ein partiales Velum. Die Sporen sind zitronenförmig, warzig und ohne Keimporus (Abb. 4.3.d).



4.2.1.2.1 *Descolea antarctica* Sing., Lilloa 23, 1951:257

Makroskopische Merkmale (Abb. 4.3.a): Hut 1 bis 5 cm breit, kastanienbraun, gegen den gerieften Rand heller, konvex, wenn alt abgeflacht-gebuckelt, schmierig, wenn jung mit weißen bis ockerlichen Resten des Velums. Hymenophor deutlich lamellenförmig. Lamellen ausgebuchtet, zunächst blass, später blassocker. Stiel $2-6 \times 0,3-0,6 \text{ cm}$, mit Ring, gelblich,

zylindrisch bis gegen die Basis verdickt. Stielbasis hohl und rotbräunlich. Ring nach oben abziehbar, gerieft. Fleisch mit KOH rotbraun. Sporenpulver rostbraun (D7, B9).

Mikroskopische Merkmale (Abb. 4.3.b-e): Cheilozystidien $25-50 \times 5-9 \mu\text{m}$, hyalin, keulig bis spindelförmig, mit dünnen Wänden. Basidien $30-38 \times 10-13 \mu\text{m}$, keulenförmig, hyalin, viersporig. Sporen $10-14 \times 6-8 \mu\text{m}$, dextrinoid, rostbraun, zitronenförmig, warzig und ohne Keimporus. Huthaut aus keuligen bis rundlichen Zellen ($10-30 \times 4-14 \mu\text{m}$), inkrustiert mit rotbräunlichem Pigment. Schnallen vorhanden. Lamellentrama regulär.

4.2.1.3 Allgemeine Charakteristiken der Familie Boletaceae Chevalier

Die Fruchtkörper der Familie Boletaceae Chevalier sind fleischig, in Hut und Stiel gegliedert, meist epigäisch, selten hypogäisch. Oberfläche glatt bis filzig oder schuppig. Mit oder ohne partiales Velum. Hymenophor röhrig oder lamellig, relativ leicht vom Hut trennbar, außer bei secotialen Formen. Trama weichfleischig, monomitisch. Poren weiß, gelb, olivlich, rosa, zimmtrot. Fleisch weiß, gelb, graulich, verletzt bisweilen blauend, grünend oder rötend. Sporen elliptisch bis spindelig, glatt, ohne Keimporus, nicht amyloid aber cyanophil. Sporenpulver hell bis dunkel oliv, zimtfarben, rosa.

Die Gattung *Boletus* Dill. ex Fr. präsentiert einen meist dickbauchigen Stiel mit feinflockiger oder netziger Oberfläche. Hut trocken oder feucht, fein filzig oder kahl. Hymenophor mit kleinen Poren, zu langen Tuben geordnet. Sporen spindelig. Sporenpulver oliv bis olivbraun. Röhrentrama bilateral.

B. loyo und *B. chilensis* können durch einfache, allgemeine Kennzeichen voneinander unterschieden werden. Die wichtigsten Merkmalsunterschiede sind durch die Form, das Muster und die Farbe des Stiels sowie durch die Form der Poren des Hymenium gegeben (s. Kap. 4.2.1.3.1-2).

4.2.1.3.1 *Boletus loyo* Phil. ex Speg., An. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires 23, 1912: 9

Makroskopische Merkmale (Abb. 4.4.a-b): Hut 5-35 cm breit, jung halbkugelig, dann konvex, glatt, wenn alt felderig, rötlich, bräunlich bis purpur. Rand überstehend, gelb, später weinrot. Fleisch sehr gut entwickelt, gelb bis zitronengelb, bei Berührung schwach blauend. Poren 0,1 cm breit und 0,6-1,5 cm lang, rund, gelb, bei Berührung leicht blauend. Stiel 8-20 \times 4-10 cm, keulig bis bauchig, kräftig, Spitze gelb, gegen die Basis weinrot, wachshaltig (*pruinosis*), ohne Karomusterung. Fleisch gelb. Fleisch und Poren mit KOH orangefarben. Sporenpulverfarbe olivbraun, ocker (C12).

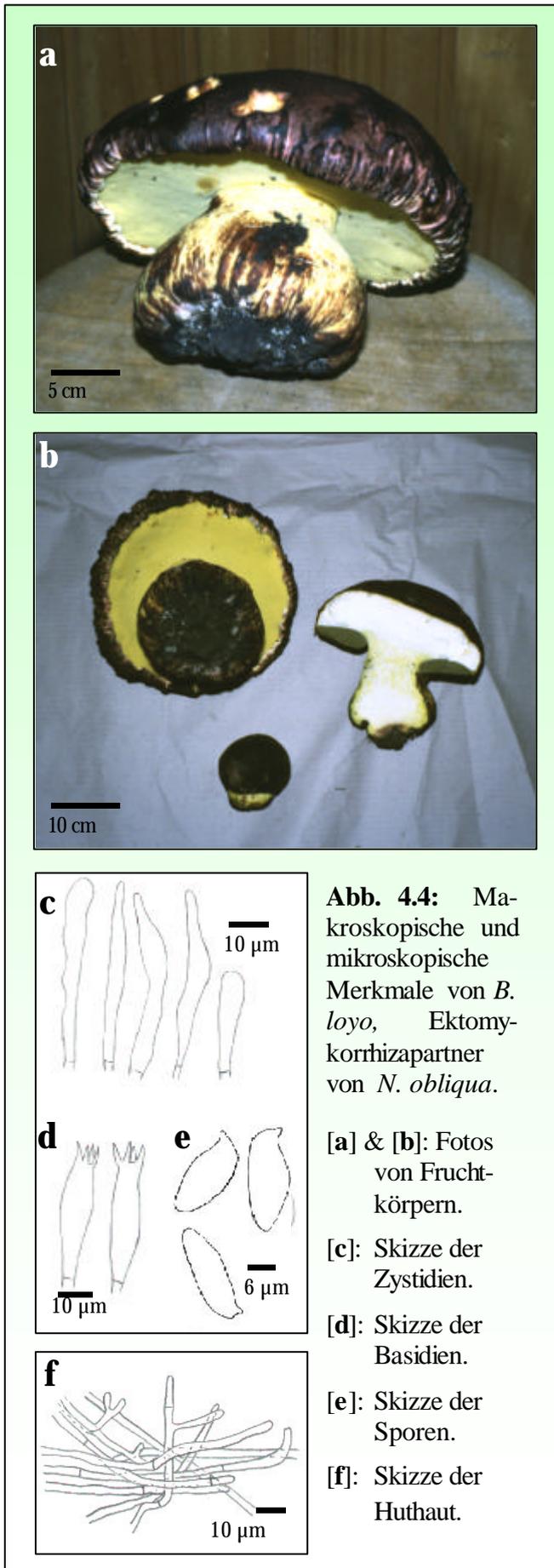


Abb. 4.4: Makroskopische und mikroskopische Merkmale von *B. loyo*, Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua*.

[a] & [b]: Fotos von Fruchtkörpern.

[c]: Skizze der Zystidien.

[d]: Skizze der Basidien.

[e]: Skizze der Sporen.

[f]: Skizze der Huthaut.

Mikroskopische Merkmale

(Abb. 4.4.c-f): Zystidien $35-55 \times 5-11 \mu\text{m}$, spindelig, mit KOH gelbbraun oder hyalin. Basidien $30-40 \times 8-10 \mu\text{m}$, viersporig, hyalin, keulig, dünnwandig. Sporen $10-14,5 \times 4-5 \mu\text{m}$, mit supraapikulärer Depression, gelblich. Huthauthyphen ($4-7 \mu\text{m}$ breit) radiär eingeordnet, zylindrisch, leicht gelatinös, im Plasma mit KOH braungelb, inkrustiert. Schnallen fehlend.

4.2.1.3.2 *Boletus chilensis* Sing. **Biología 41, 1967: 69**

Makroskopische Merkmale

(Abb. 4.5.a): Hut 8-14 cm breit, konvex bis flachkonvex mit einer geringen Einbuchtung im Zentrum, braungelblich, Fleisch gelb, bei Berührung leicht blauend. Poren 0,15 cm breit und 0,8-1,5 cm lang, polygonal, gelblich bis rotbraun, bei Berührung blauend. Stiel $4-11 \times 2-4,5 \text{ cm}$, konisch nach unten zusammenlaufend, weinrot, an der Spitze ockergelb, Mitte des Stiels nach oben mit Karomusterung, Fleisch gelblich, Stielkern karminrot, bei Berührung blauend. Huthaut mit KOH unveränderlich. Sporenpulverfarbe oliv-bräunlich (C12).

Mikroskopische Merkmale

(Abb. 4.5.b-c): Zystidien $25-55 \times 5-8 \mu\text{m}$, zylindrisch, spindelförmig, mit KOH gelblich, inkrustiert (Form: s.

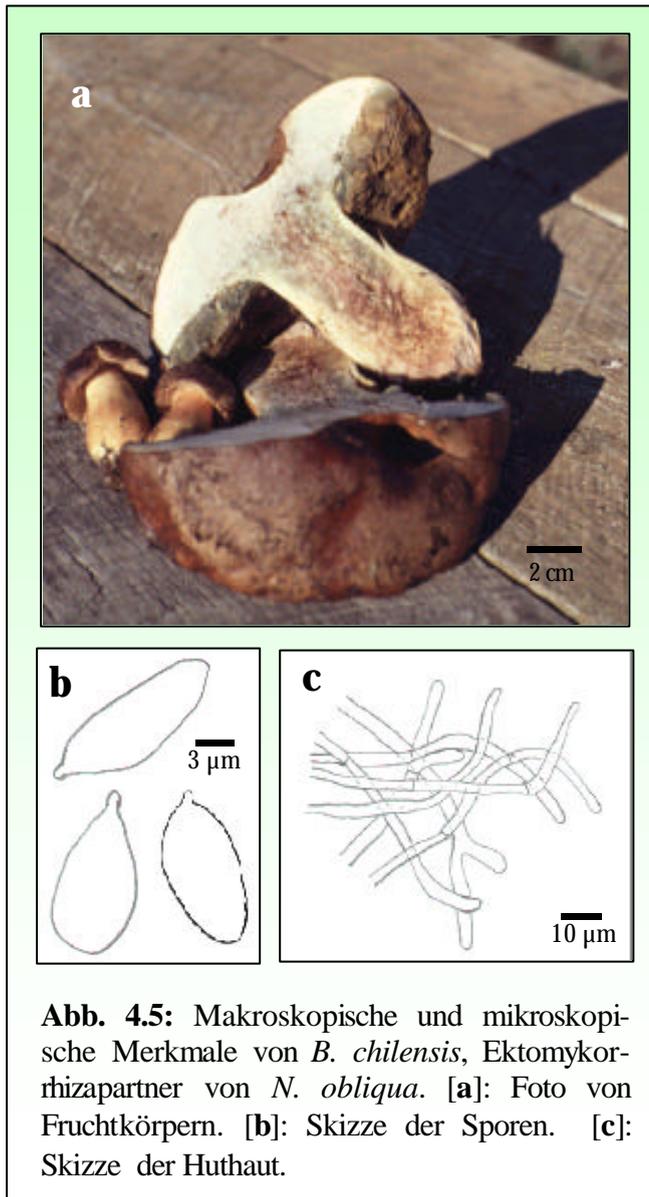


Abb. 4.4.c). Basidien $30-40 \times 7-10 \mu\text{m}$, viersporig, hyalin, keulig (Form: s. Abb. 4.4.d). Sporen $8-12 \times 3,5-4 \mu\text{m}$, bräunlich. Huthauthyphen ($3-6 \mu\text{m}$ breit) radiär eingeordnet, zylindrisch, mit KOH braun, inkrustiert. Schnallen fehlend.

4.2.2 Systematische Klassifizierung unspezifischer Ektomykorrhizapartner von *Nothofagus*-Arten

Unter den im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich isolierten unspezifischen Mykorrhizapilzen von *Nothofagus*-Arten (s. Kap. 4.2) befinden sich Repräsentanten der Gattungen *Paxillus* (Paxillaceae) und *Xerocomus* (Boletaceae). Die Mykorrhizapilze *Paxillus involutus* und *Xerocomus rubellus* sind beide weit in der Nordhemisphäre verbreitet. In der Südhemisphäre gehören sie zu den

eingeführten Arten (Garrido 1988, Valenzuela *et al.* 1998). Eine wichtige Charakteristik der Gattung *Paxillus* Fr. s. str. ist, dass die Lamellen zwar wiederholt, nicht aber kontinuierlich vergabelt sind. Die Gattung *Paxillus* zeichnet sich weiter durch Sporen der Größe $7-9 \mu\text{m}$ aus. Diese sind elliptisch bis elliptisch-fusoid geformt.

Die Basidien sind keulen- oder kopfförmig. Pleurozystidien und Caulozystidien sind vorhanden. Normale Schnallen kommen häufig vor, Medaillonschnallen fehlen hingegen. *Paxillus* weist Involutin als typisches Pigment auf (Bresinsky *et al.* 1999). Die Gattung *Xerocomus* Quél. ist innerhalb der Familie der Boletaceae hauptsächlich durch ihren dünnen Stiel charakterisiert. Der Stiel ist selten knollig, niemals weist er Karomusterung auf. Der Hut ist trocken, samtig-filzig, das Hymenium gelb, grüngelb. Die Poren sind relativ weit und verwinkelt. Schnallen sind nicht vorhanden. Das Röhrentrama ist bilateral divergierend.

4.2.2.1 *Paxillus involutus* (Batsch: Fr.) Fr. Epicr. 317 (1838)

Makroskopische Merkmale (Abb. 4.6.a): Fruchtkörper in Hut und Stiel gegliedert. Hut 4-10 cm breit, halbkugelig, später niedergedrückt, fein filzig, im Alter faserig, hellbraun bis ockerbraun, wenn feucht schmierig, lange eingerollt, durch die Lamellen etwas gefurcht. Fleisch braunockerlich, bräunlich, schwammartig, gut entwickelt, bei Verletzungen braunfleckig. Lamellen herablaufend, 2-3 fach gegabelt, ockerlich. Druckstellen dunkelrotbraun fleckig, vom Hut und Fleisch leicht abtrennbar.

Stiel zylindrisch, kurz, gegen die Basis verjüngt, glatt, trocken, zentral oder exzentrisch, gelbbraun, bei Berührung braun. Huthaut mit KOH dunkelbraun. Sporenpulverfarbe ockerbraun (D7).

Mikroskopische Merkmale (Abb. 4.6.b-e): Pleurozystidien und Caulozystidien $40-80 \times$

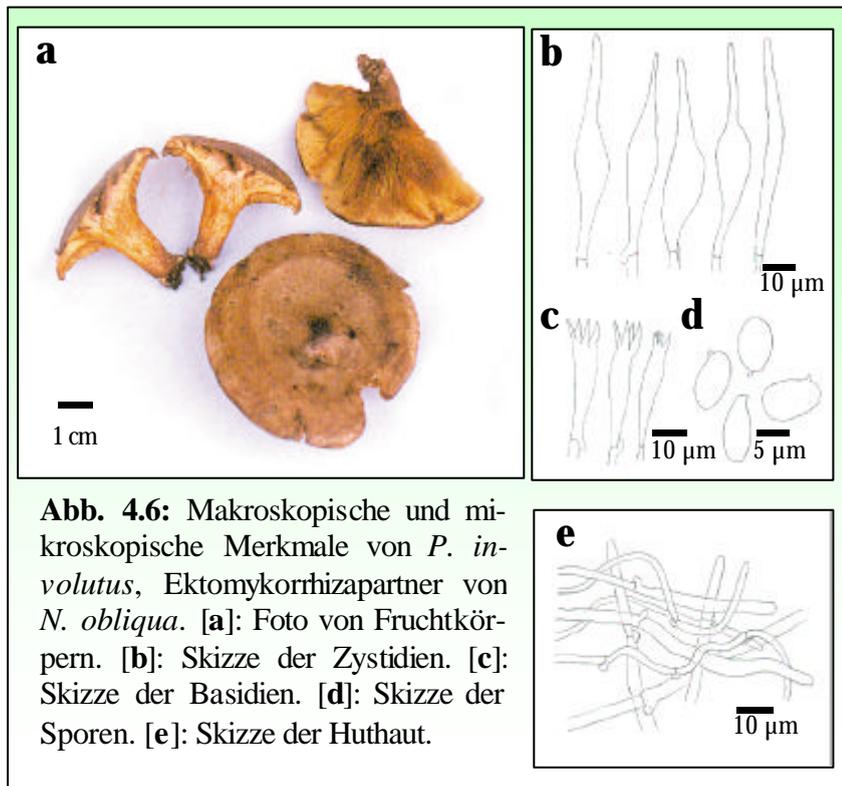


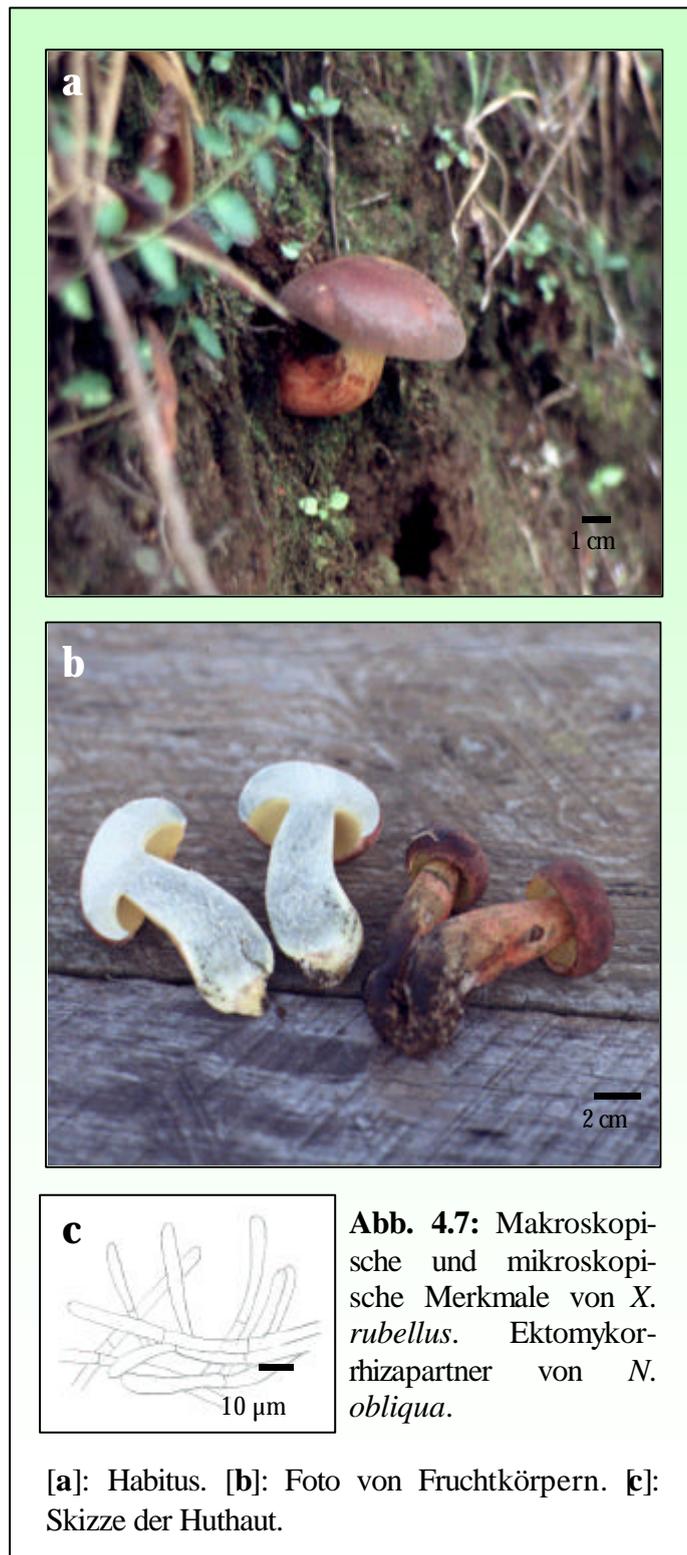
Abb. 4.6: Makroskopische und mikroskopische Merkmale von *P. involutus*, Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua*. [a]: Foto von Fruchtkörpern. [b]: Skizze der Zystidien. [c]: Skizze der Basidien. [d]: Skizze der Sporen. [e]: Skizze der Huthaut.

$9-16 \mu\text{m}$, spindelkeulig, hyalin. Basidien $25-40 \times 6-8 \mu\text{m}$, keulig, viersporig, hyalin. Sporen $7-9 \times 5-6 \mu\text{m}$, glatt, ohne Keimporus, elliptisch, ockerbraun bis gelblich. Huthaut aus zylindrischen, $3-8 \mu\text{m}$ breiten, hyalinen oder rotbräunlichen (KOH), zum Teil inkrustierten Hyphen bestehend. Schnallen vorhanden. Lamellentrama bilateral.

4.2.2.2 *Xerocomus rubellus* (Krbh.) Quél.

C. R. Ass. FranV. Avanc. Sc. 20, 620 (1896)

Makroskopische Merkmale (Abb. 4.7.a-b): Hut 3-5 cm breit, trocken, samtig-filzig, jung halbkugelig, lebhaft kirsch- oder blutrot, dann konvex, blass mattrosa. Fruchtkörper beim Aufschneiden blauend.



Poren 0,5-1 cm lang, verwindelt, gelblich, dann grüngelb. Stiel 4-10 × 0,7-1,5 cm, zylindrisch bis sehr leicht keulig, meist rötlich gefasert.

Huthaut und Poren mit KOH braunfarben. Huthaut und Stiel mit H₂SO₄ intensiv rot. Sporenpulverfarbe braun, dunkel oliv (ca. C12).

Mikroskopische Merkmale (Abb. 4.7.c): Zystidien 30-65 × 7,5-12 µm, spindelig, hyalin (Form: s. Abb. 4.4.c).

Basidien 30-35 × 7-10 µm, viersporig, hyalin, keulig (Form: s. Abb. 4.4.d). Sporen 8-12,5 × 4-7 µm, spindelförmig, gelblich (Form: s. Abb. 4.5.b).

Huthauthyphen (4-9 µm breit) trichodermisch angeordnet, zylindrisch, hyalin, Zellwände inkrustiert, mit KOH rot-braunfarben. Schnallen fehlend.

4.3 Charakterisierung und Identifizierung der Ektomykorrhizen von *N. obliqua* mit *B. loyo*, *D. antartica* und *A. boletinoides*

Nach der systematischen Klassifizierung der Fruchtkörper folgt nun die Charakterisierung und Identifizierung der Ektomykorrhizen. Wie bereits in Kapitel 3.1.2.4.1 erwähnt, können eindeutige systematische Klassifizierungen von Ektomykorrhizen nur für Fälle vorgenommen werden, in denen Rhizomorphe oder Hyphen direkt mit dem Stiel eines Fruchtkörpers verbunden sind. Eine direkte Verbindung der Ektomykorrhizen zu Fruchtkörpern konnten

für *Boletus loyo*, *Descolea antartica* und *Austropaxillus boletinoides* nachgewiesen werden. Für Ektomykorrhizen mit *B. loyo* und *A. boletinoides* sind in diesem Zusammenhang bislang noch keine Charakterisierungen und Identifizierungen veröffentlicht worden.

4.3.1 Boletaceae

4.3.1.1 *Boletus loyo*

Habitus (Abb. 4.8): Verzweigung monopodial-pyramidal. Mykorrhiza dicht verzweigt. Hauptachse und Seitenäste fast gerade, leicht keulig, Spitzen abgerundet. Länge des Verzweigungssystems 1,6-15 mm. Länge der unverzweigten Seitenenden bis 1 mm. Durchmesser der Achsen 0,2-0,4 mm. Durchmesser der Seitenenden 0,1-0,3 mm.

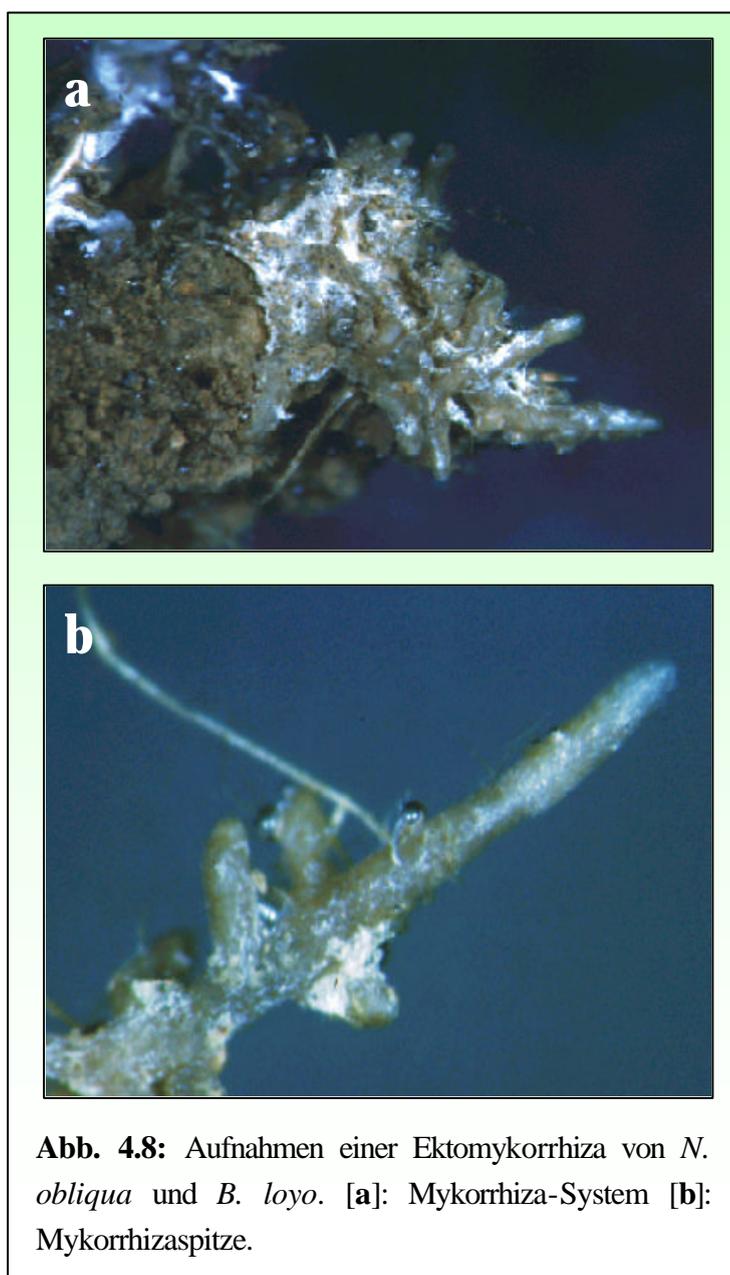
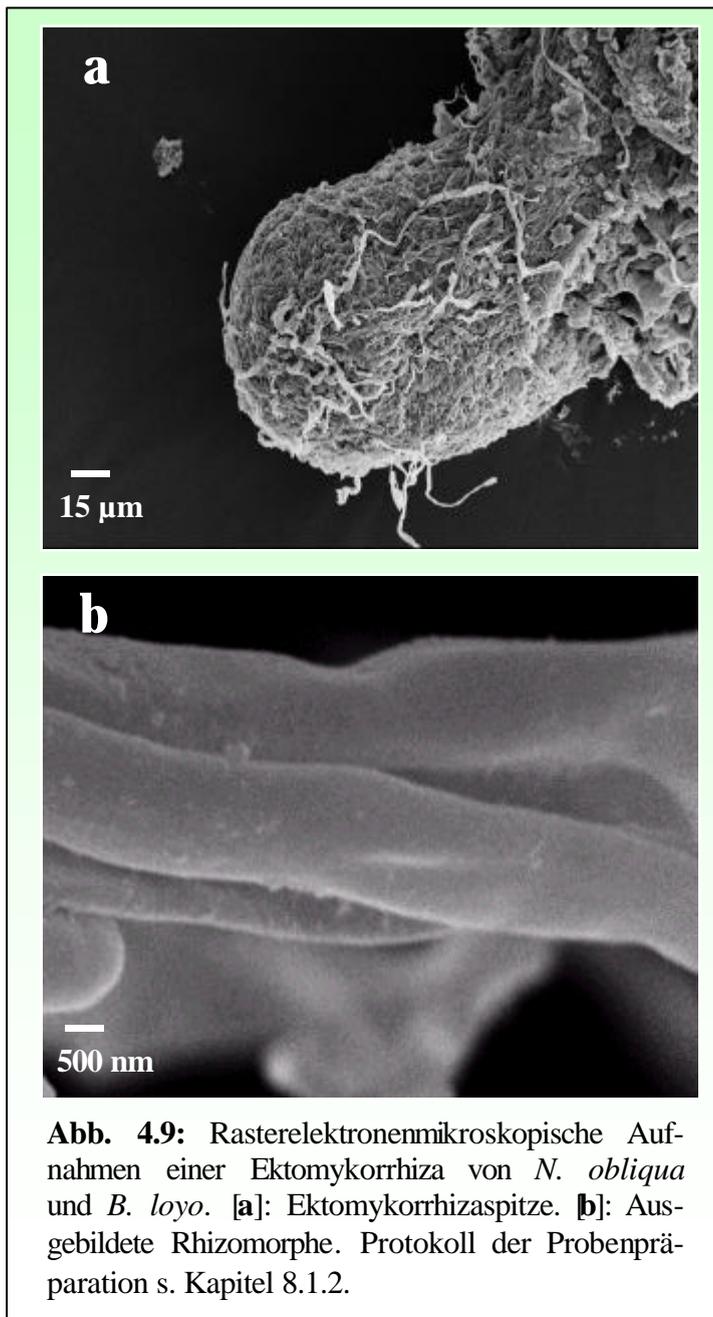


Abb. 4.8: Aufnahmen einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *B. loyo*. [a]: Mykorrhiza-System [b]: Mykorrhizaspitze.



Mykorrhiza glatt, weißlich bis hell ockergelblich, stellenweise silbrig glänzend. Hyphenmantel kompakt. Rhizomorphen zahlreich, abziehend von definierten Stellen, glatt, rund, verzweigt. Abziehende Hyphen nicht gefunden.

Mikroskopische Merkmale:

Mantel dicht plectenchymatisch, Typ A (s. Abb. 8.1.I), Hyphen ineinander verflochten, sehr kompakt, glatt (Abb. 4.9.a), gabelig verzweigt. Anastomosen meist ohne Septum (Abb. 8.1.II). Hyphen ohne Schnallen und einfache Septen. Hyphenwände hyalin. Durchmesser der Hyphen 0,8-2 µm (Abb. 4.9.b).

An der Oberseite des Mantels weisen Mantelhyphen zum Teil blasenartig vergrößerte, seitliche Abzweigungen auf.

Auf Manteloberseite einzeln lie-

gende Mantelhyphen. Tieferliegende Mantelschichten und Mantelinnenseiten wie Oberfläche, Plectenchym und dicht.

Rhizomorphen hochspezialisiert, Typ F (Abb. 8.1.III), sehr geordnete Struktur (auch bei Verzweigungen), selten verzweigt, gebündelt, aus parallel verlaufenden Hyphen (Abb. 4.9.b), Durchmesser 3-10 µm, glatt, rund, kurz septiert. Durchmesser der Zentralhyphen 1-3 µm.

Anatomie im Längsschnitt (Abb. 4.10): Manteldicke 4-15 µm, ca. 5-10 Zelllagen, alle plectenchymatisch. Zellen rundlich bis tangential oval, Größe der Zellen tangential 2-8 µm, radial 1-5 µm. Wurzelhaubenderivate im innersten Mantelbereich schmal langgezogen. Manteloberfläche nicht scharf begrenzt, oft auf Manteloberseite einzeln liegende Mantelhyphen.

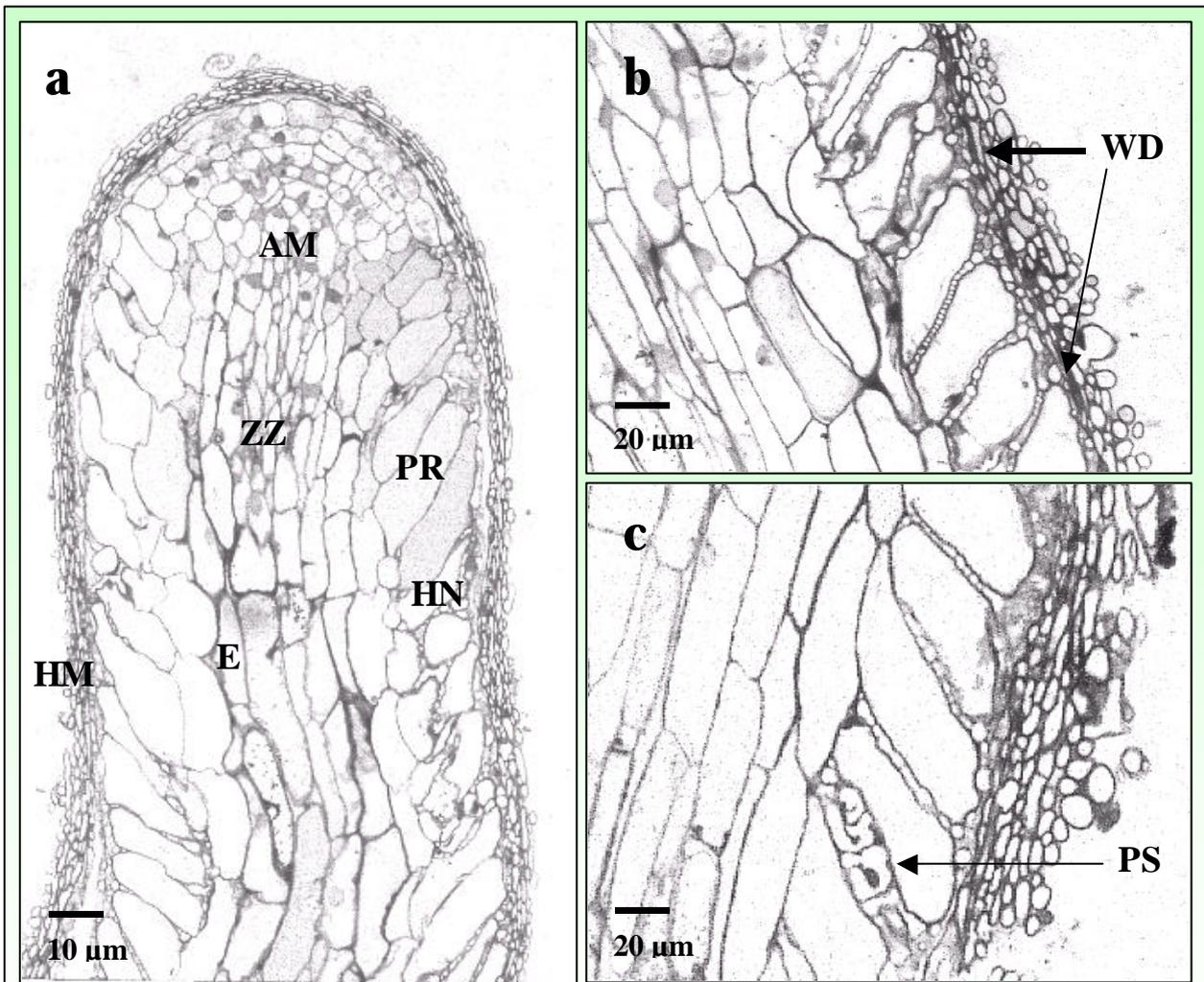


Abb. 4.10: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Längsschnitts einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *B. loyo*. [a]: Apikalmeristem (AM), Endodermis (E), Hyphenmantel (HM), Hartigsches Netz (HN), Primäre Rinde (PR), Zentralzylinder (ZZ). [b]: Detail aus a mit Wurzelhaubenderivaten (WD). [c]: Detail aus a mit Palmetti-Strukturen (PS). Protokoll der Einbettung s. Kapitel 8.1.1.

Mantelaußenschicht manchmal mit blasig vergrößerten Hyphen. Epidermiszellen strahlenförmig in Richtung Spitze verlängert. Siehe hier insbesondere zum Vergleich die unmykorrhizierte Kurzwurzel in Abbildung 8.2. Größe tangential 2-13 µm, radial 4-35 µm. Paraperidermales Hartigsches Netz. Hauptform der Hyphenzellen um Epidermiszellen rund bis leicht oval. Eine Hyphenreihe um Epidermiszellen. Anzahl der Reihen der Rindenzellen 1-2. Einzelne Hyphe um Rindenzellen ca. 1 µm Durchmesser. Mit Palmetti-Strukturen.

Farbreaktionen mit verschiedenen Reagenzien: KOH färbt die Hyphen braun. Toluidinblau und Brillantkresylblau färben die Wände und das Zytoplasma der Mantelhyphen violettblau. Mit Kongorot wurden die Wände der Mantelhyphen rötlich.

4.3.2 Bolbitaceae

4.3.2.1 *Descolea antarctica*

Habitus (Abb. 4.11): Verzweigung monopodial-pyramidal oder unverzweigt. Hauptachse und Seitenäste gerade oder gebogen. Länge des Verzweigungssystems 1-7 mm. Länge der unverzweigten Seitenenden bis 3 mm. Durchmesser der Achsen 0,15-0,3 mm. Durchmesser der Seitenenden 0,1-0,2 mm. Mykorrhiza hell ockerbräunlich. Spitzen abgerundet. Oberfläche der Mykorrhiza glatt bis stachelig. Rhizomorphen fehlend. Abziehende Hyphen selten vorhanden.

Mikroskopische Merkmale: Manteloberfläche locker oder dichter plectenchymatisch, Typ D (Abb. 8.1.I), mit zahlreichen kopfförmigen Zystidien (Abb. 4.12.a-d). Hyphenwände hyalin, glatt. Durchmesser der Hyphen 2-6 μm . Septen einfach oder mit Schnallen (Abb. 4.12.d). Abziehende Hyphen selten vorhanden, locker in der Mykorrhizaoberfläche verteilt, nicht verzweigt, ohne Anastomosen, mit Schnallen. Intrahyphale Hyphen nicht vorhanden. Die mittlere Mantelschicht ist etwas dichter als die äußere, ansonsten keine Unterschiede zur Manteloberfläche.

Die Hyphen sind in der Nähe des Hartigschen Netzes kürzer septiert. Die kopfförmigen Zystidien sind vom Typ M (Abb. 4.13.a-b), dünn, kegelförmig mit einer dicken kugelförmigen Spitze. Manchmal einfach septiert. Zystidien befinden sich an der Spitze terminaler Hyphen oder weniger häufig seitlich am interkalaren Bereich

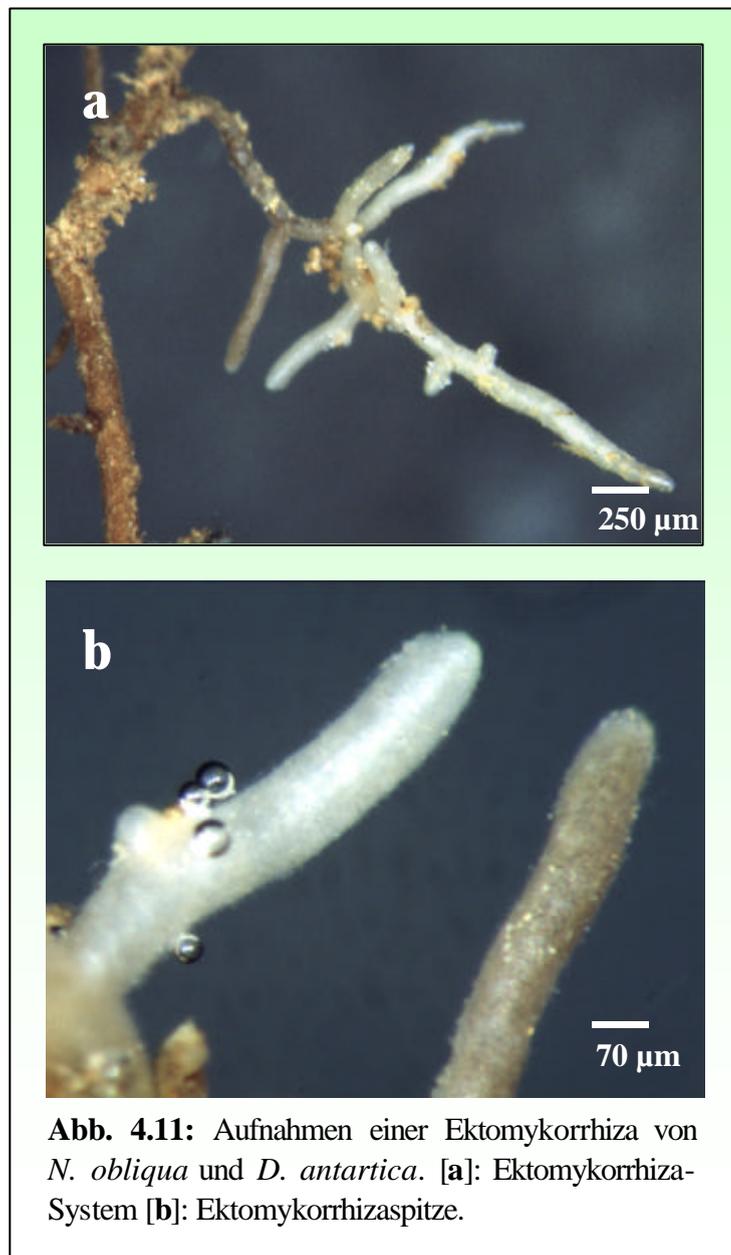


Abb. 4.11: Aufnahmen einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *D. antarctica*. [a]: Ektomykorrhiza-System [b]: Ektomykorrhizaspitze.

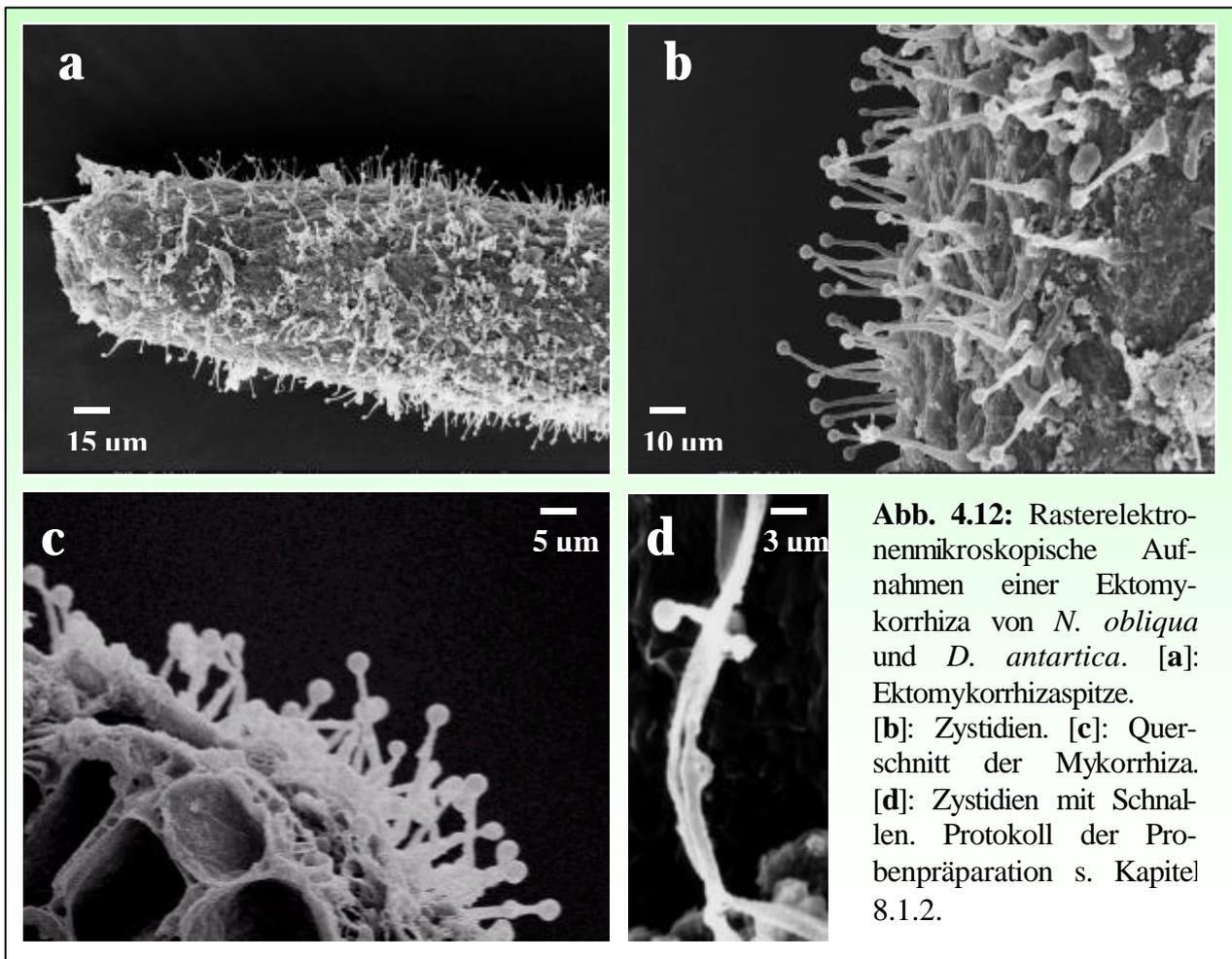


Abb. 4.12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *D. antarctica*. [a]: Ektomykorrhizaspitze. [b]: Zystidien. [c]: Querschnitt der Mykorrhiza. [d]: Zystidien mit Schnallen. Protokoll der Probenpräparation s. Kapitel 8.1.2.

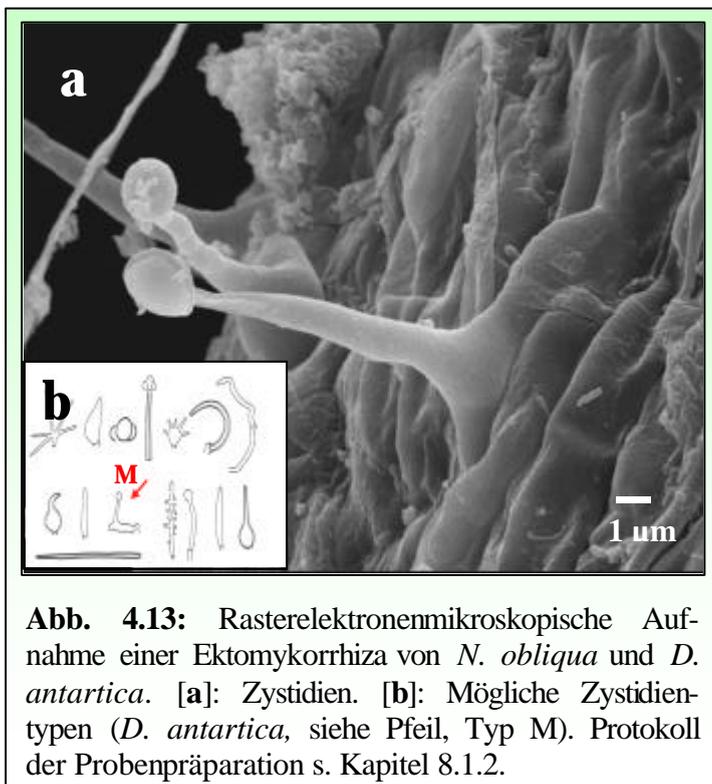
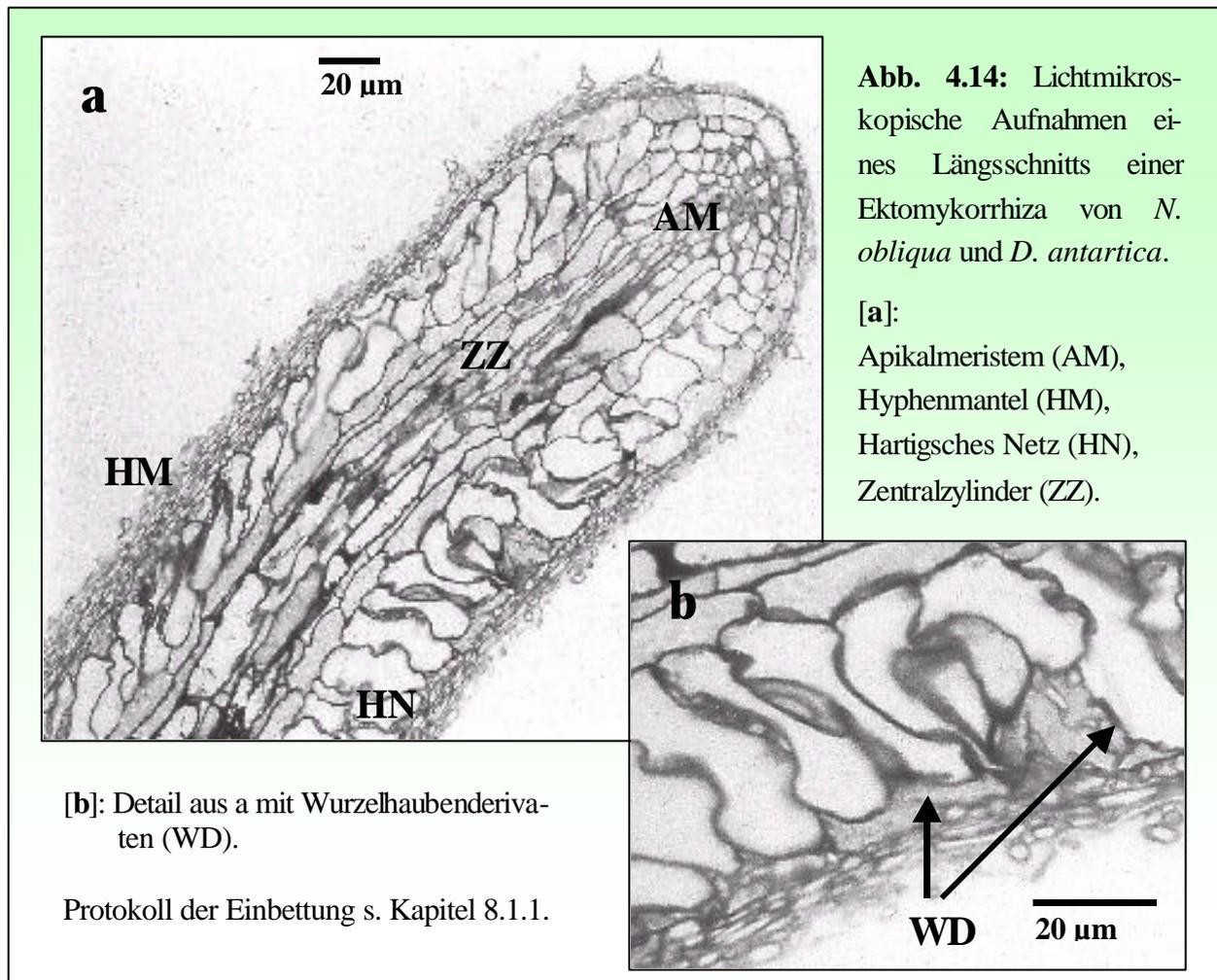


Abb. 4.13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *D. antarctica*. [a]: Zystidien. [b]: Mögliche Zystidientypen (*D. antarctica*, siehe Pfeil, Typ M). Protokoll der Probenpräparation s. Kapitel 8.1.2.

der Hyphen der Manteloberfläche. Länge der Hyphen mit Zystidien: 15-40 µm. Durchmesser der Köpfe 2-5 µm.

Anatomie im Längsschnitt (Abb. 4.14): Manteldicke 10-25 µm, ca. 5-10 Zelllagen, alle plectenchymatisch. Zellen rundlich bis tangential oval, Größe der Zellen tangential 2-15 µm, radial 1-4 µm. Wurzelhaubenderivate im innersten Mantelbereich schmal langgezogen. Keine Tannin-Zellen. Mantelhyphen homogen angeordnet.



Epidermiszellen strahlenförmig in Richtung Spitze verlängert (vergl. erneut unmykorrhizierte Kurzwurzel in Abb. 8.2.). Größe tangential 10-30 µm, radial 20-50 µm. Paraepidermales Hartigsches Netz.

Hauptform der Hyphenzellen um Epidermiszellen rund bis leicht oval. Einzelne Hyphen um Epidermiszellen ca. 1 µm Durchmesser (Abb. 4.12.c). Anzahl der Rindenzellenreihen 1-3. Mit Palmetti-Strukturen.

Farbreaktionen mit verschiedenen Reagenzien: Mit Eisensulfat wurden Wände und Zytoplasma der Mantelhyphen schwach grün gefärbt, die Zystidien zeigten hingegen keine Färbung. Mit Sulfovanillin wurde der Mantel leicht rosa.

4.3.3 Gymnopaxillaceae

4.3.3.1 *Austropaxillus boletinoides*

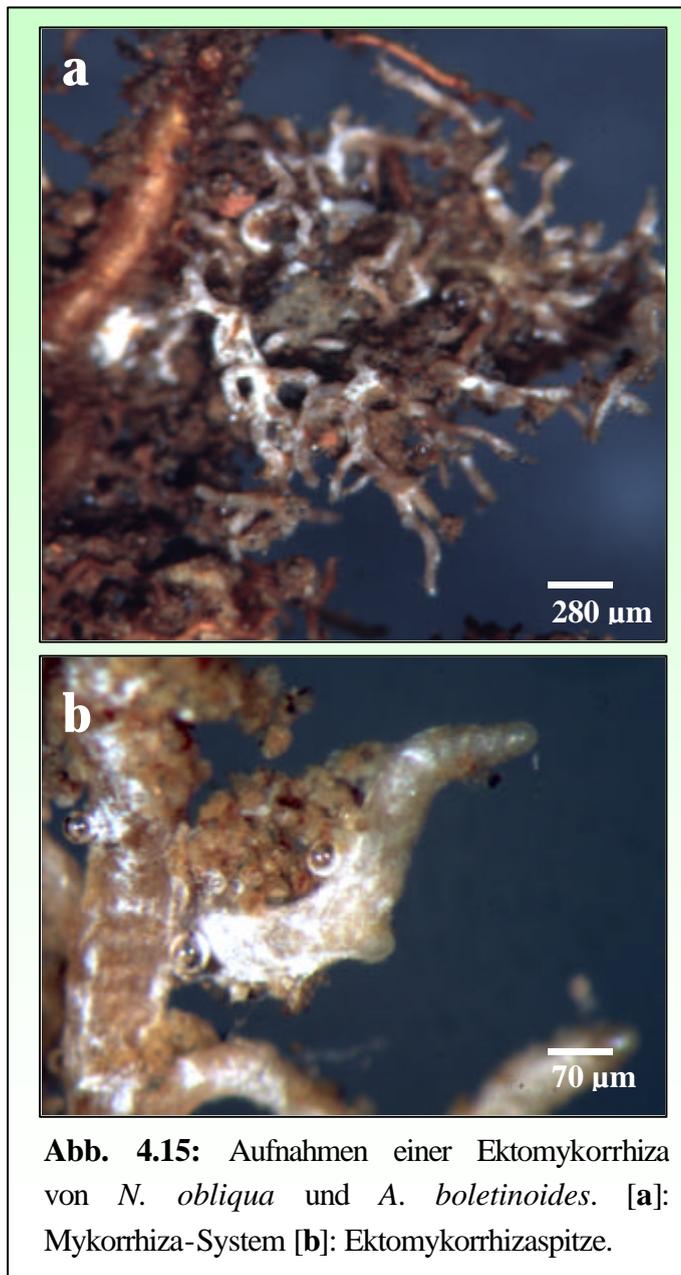


Abb. 4.15: Aufnahmen einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *A. boletinoides*. [a]: Mykorrhiza-System [b]: Ektomykorrhizaspitze.

Habitus (Abb. 4.15): Verzweigung undeutlich monopodial. Hauptachse und Seitenäste etwas geschlängelt, Spitzen abgerundet. Länge des Verzweigungssystems 1,8-14 mm. Länge der unverzweigten Seitenenden bis 1 mm. Durchmesser der Achsen 0,3-0,4 mm. Durchmesser der Seitenenden 0,1-0,3 mm. Mykorrhiza glatt, schmutzigweiß, matt, stellenweise silbrig glänzend. Hyphenmantel grob netzig.

Rhizomorphen zahlreich, abziehend von definierten Stellen, rund, verzweigt, mit angehängten Sklerotien. Wenige abziehende Hyphen. Sklerotien rund bis oval, gelblichweiß, glänzend.

Mikroskopische Merkmale: Mantel locker oder dichter plectenchymatisch, Typ B (Abb. 8.1.I). Hyphen ohne Ausrichtung verlaufend (Abb. 4.16.a-b), glatt, oft mit warzenförmigen Wandauflagerungen

(Abb. 4.16.c), gabelig verzweigt, hyalin bis ockerbräunlich, cyanophil, dünnwandig, Septen einfach, schnallenlos. Anastomosen meist ohne Septum (Abb. 8.1.II).

Durchmesser der Hyphen 3-6 µm. Übergang von Mantelhyphen in abziehende Hyphen kontinuierlich, Wände hyalin, unverdickt, oft mit feinen kristalloiden und warzenartigen Auflagerungen, Hyphendurchmesser 3-6 µm. Abziehende Hyphen gabelig verzweigt. Intra-hyphale Hyphen vorhanden.

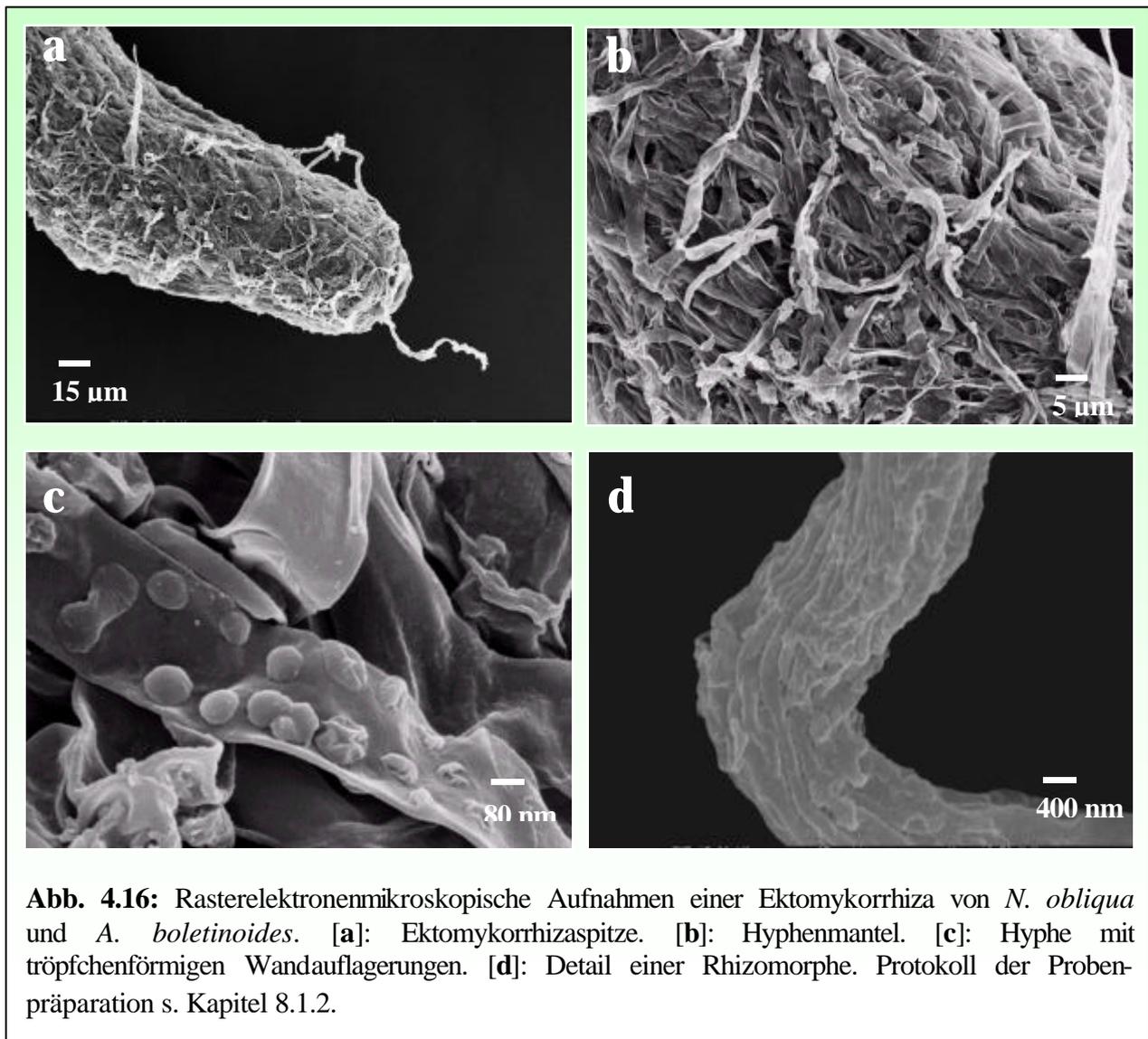


Abb. 4.16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *A. boletinoides*. [a]: Ektomykorrhizaspitze. [b]: Hyphenmantel. [c]: Hyphe mit tröpfchenförmigen Wandauflagerungen. [d]: Detail einer Rhizomorphe. Protokoll der Probenpräparation s. Kapitel 8.1.2.

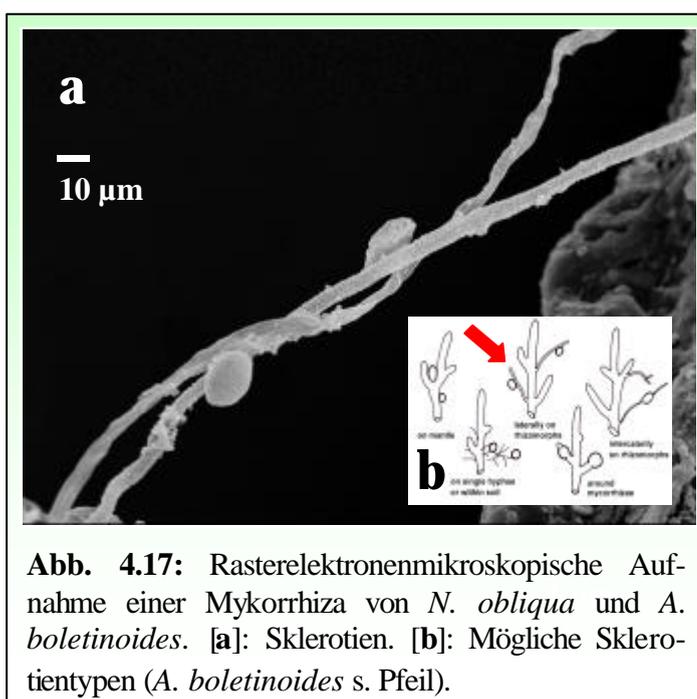


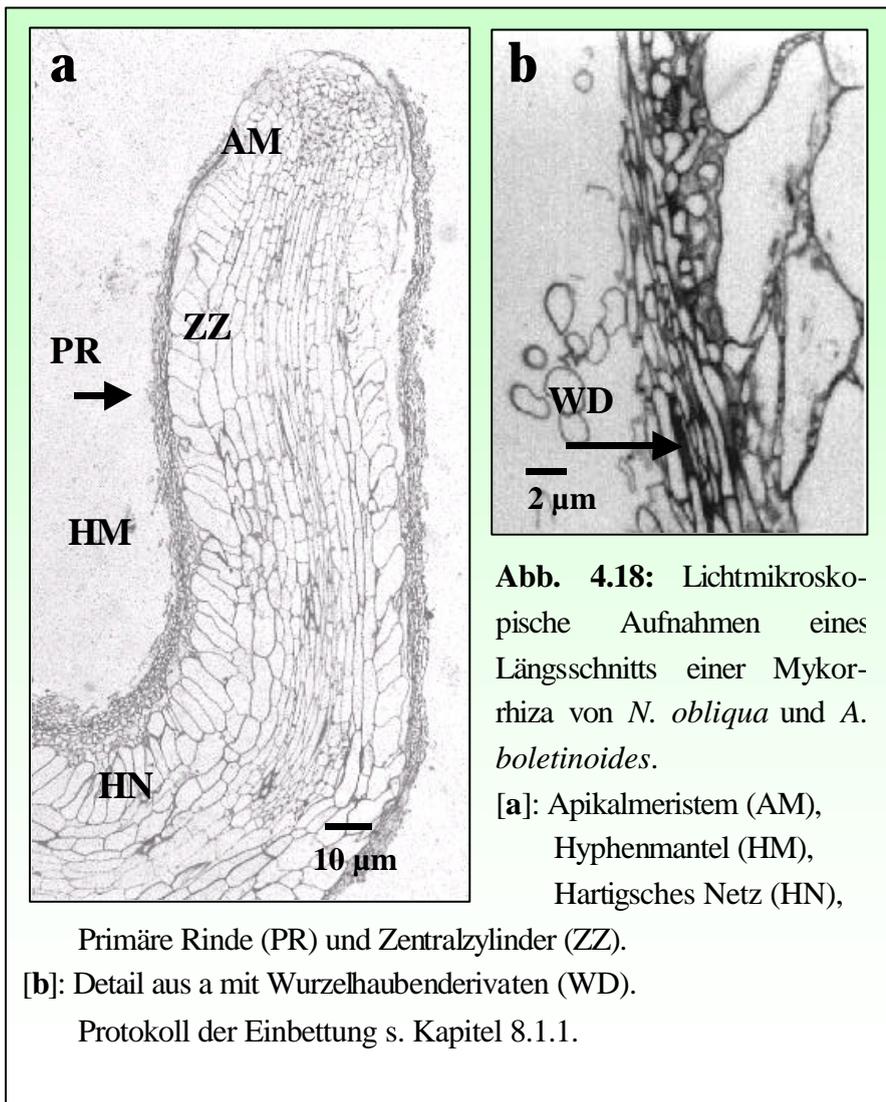
Abb. 4.17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Mykorrhiza von *N. obliqua* und *A. boletinoides*. [a]: Sklerotien. [b]: Mögliche Sklerotientypen (*A. boletinoides* s. Pfeil).

Die innere und mittlere Mantelschicht sind wie die äußere Mantelschicht plectenchymatisch, aber etwas dichter. Rhizomorphen Typ A und F (Abb. 8.1.III), glatt, rund, Durchmesser 3-50 µm (Abb. 4.16.d). Eine bis mehrere Zentralhyphen in der Mitte oder am Rand, hyalin oder bräunlich pigmentiert, Durchmesser 1,5-5 µm.

Sklerotien im Schnitt pseudoparenchymatisch. Nicht immer vor-

handen. Größe 0,1-0,5 mm. Wie in Abbildung 4.17 gut zu erkennen ist, hängen die Sklerotien direkt an Rhizomorphen. Von der Größe her erreichen diese jedoch nicht den Durchschnitt ausgewachsener Sklerotien. Es handelt sich daher um junge Sklerotien. Zellen in der Mitte des Sklerotiums sind größer als am Rand. Wände hyalin, unverdickt.

Anatomie im Längsschnitt (Abb. 4.18): Manteldicke 2-15 μm , ca. 5-15 Zelllagen, alle plectenchymatisch. Zellen rundlich bis tangential oval, Größe der Zellen tangential 2-7 μm , radial 1-4 μm . Wurzelhaubenderivate im innersten Mantelbereich schmal langgezogen.



Die Epidermiszellen strahlenförmig in Richtung Spitze verlängert (vergl. Abb. 8.2). Größe tangential 3-9 μm , radial 7-30 μm . Paraepermales Hartig'sches Netz.

Hauptform der Hyphenzellen um Epidermiszellen rund bis leicht oval. Einzelne Hyphen um Epidermiszellen ca. 1 μm Durchmesser.

Anzahl der Rindenzellenreihen 1-3. Mit Palmetti-Strukturen.

Farbreaktionen mit verschiedenen Reagenzien: Mit KOH wurden die Hyphenwände des Mantels kastanienbraun. Mit Formol wurden die Hyphenwände des Mantels leicht grünlich.

4.4 Wachstumsverhalten des Fruchtkörpermyzels in Reinkultur

***Austropaxillus boletinoides*:** Das isolierte Fruchtkörpermyzel entwickelte auf MMN-Agar-nährmedium nach 6-7 Tagen langsam ein kräftiges weißes Myzel. Nach längerer Inkubationszeit veränderte sich die Farbe über hellere Gelbtöne (14 Tage) zu einem gelblichen Braun (4 Wochen). Die Hyphen wiesen teilweise eine rauhe Wandstruktur und Schnallen auf. Die Ausbreitung der Kultur erfolgte kompakt, konzentrisch um das Fruchtkörperstückchen. Der Farbwechsel der Isolate setzte sich vom Inneren der Kultur nach außen fort. Die Kultur bildete zunächst einen äußeren weißen Rand aus, der nach 2-3 Monaten verschwand. Der Durchmesser der gelbbraunen Hyphen (ältere, innere Hyphen) lag bei 3-5 μm . Nach 4 bis 5 Überimpfungen steigerte sich die Wachstumsgeschwindigkeit radial auf 3-4 cm pro Monat.

***Austropaxillus statuum*:** Das isolierte Fruchtkörpermyzel wurde auf MMN-Agarnährmedium zunächst von kräftig wachsenden, weißen Hyphen überwuchert (8 Tage). Danach erfolgte eine konzentrische Ausbreitung der Hyphen um die Pilzstückchen. Das Myzel lag auf dem Agar auf und es war kein Luftmyzel vorhanden. Von den Pilzstückchen nach außen trat nach etwa 25 Tagen ein Farbwechsel des Isolats zu hellbraunen Tönen auf. Auf dem Rand konnte nach drei Monaten noch ein heller Ring beobachtet werden. Der Durchmesser der Hyphen betrug 3-7 μm . Stellenweise waren die braunen Hyphen mit warzenartigen Strukturen besetzt. Schnallen waren nicht vorhanden. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Myzels auf MMN-Agarnährmedium war sehr langsam (1 cm pro Monat). Daher wurde das isolierte Fruchtkörpermyzel zunächst in Erde-Nährmedium (s. Kap. 3.1.2.5) gehalten, was die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant erhöhte (5 cm pro Monat). Nach 4 Monaten erfolgte dann schließlich eine Überimpfung auf MMN-Agarnährmedium, in welchem dann die Wachstumsgeschwindigkeit des Erde-Nährmediums erreicht wurde.

***Descolea antarctica*:** Das isolierte Fruchtkörpermyzel bildete nach 7-8 Tagen auf MMN-Agarnährmedium feine Hyphen aus. Diese waren zunächst hyalin und später weiß. Das Myzel wuchs konzentrisch. Der leichte Farbwechsel erfolgte vom Inneren der Kultur nach außen. Der Durchmesser der Hyphen betrug 2-6 μm . Schnallen wurden ausgebildet. Die Wachstumsgeschwindigkeit auf MMN-Agarnährmedium betrug 3,5-6,8 cm pro Monat.

***Boletus loyo*:** Das isolierte Fruchtkörpermyzel von *B. loyo* bildete nach 3 Wochen Kulturzeit auf MMN-Agarnährmedium (2 Wochen auf Wurzelhomogenat-Nährmedium oder Erde-Nährmedium, s. Kap. 3.1.2.5) zahlreiche feine weiße Hyphen aus. Nach 5 bis 8 Tagen wurden diese kräftiger und nahmen eine goldgelbe Farbe an. Das Wachstum des Myzels erfolgte

konzentrisch. Der Hyphendurchmesser betrug 4-8 μm . Die Hyphen zeigten glatte Wände. Es bildeten sich keine Schnallen aus. Auf MMN-Agarnährmedium war lediglich ein langsames Wachstum zu beobachten (0,15 cm in 14 Tagen). Auf Wurzelhomogenat-Nährmedium oder Erde-Nährmedium (s. Kap. 3.1.2.5) war die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant erhöht (3-4 / 2,4-3 cm pro Monat). Nach mehrmaligem Überimpfen und anschließendem Übertragen auf MMN-Agarnährmedium beschleunigte sich das Wachstum des Isolats auf eine Wachstumsgeschwindigkeit von 3-5 cm pro Monat.

Boletus chilensis: Auf MMN-Agarnährmedium zeigte das isolierte Fruchtkörpermyzel praktisch keine Entwicklung. Das Fruchtkörpermyzel auf Wurzelhomogenat-Nährmedium (s. Kap. 3.1.2.5) entwickelte sich nach 10 Tagen und erreichte eine Wachstumsgeschwindigkeit von 3-4 cm pro Monat. Auffallend war, wie bei *B. loyo*, die weißliche Färbung der jungen Hyphen, die sich später hin zu gelblichen Tönen veränderten. Das Wachstum des Myzels erfolgte konzentrisch. Der Hyphendurchmesser betrug 3-7 μm . Die Hyphenwände waren glatt. Es bildeten sich keine Schnallen aus. Nach 5 Monaten wiederholter Überimpfung auf Wurzelhomogenat-Nährmedium (einmal pro Monat) wurde das Myzel auf MMN-Agarnährmedium überführt. Am Anfang zeigte sich ein noch langsames Wachstum. Nach erneuten Überimpfungen stellte sich jedoch eine Wachstumsgeschwindigkeit von 3-5 cm pro Monat ein.

Paxillus involutus: Nach einer Kulturdauer von 9 Tagen konnte bei Gewebestückchen auf MMN-Agarnährmedium ein Hyphenwachstum festgestellt werden. Die jüngeren Hyphen wiesen eine weiße Farbe auf, die nach 20 Tagen gelb bis gelbbraun wurde. Das Isolat zeigte deutlich septierte Hyphen mit Schnallen und auf den Hyphenwänden teilweise tröpfchenartige Auflagerungen. Das Wachstum des Myzels erfolgte konzentrisch. Der Hyphendurchmesser betrug 3-5,5 μm . Die Wachstumsgeschwindigkeit erreichte 4-7 cm pro Monat.

Xerocomus rubellus: Das isolierte Fruchtkörpermyzel von *X. rubellus* bildete auf MMN-Agarnährmedium zwar erste Hyphen, zeigte aber kein signifikantes Wachstum. Auf Wurzelhomogenat-Nährmedium (s. Kap. 3.1.2.5) bildeten sich zahlreiche feine Hyphen aus. Diese waren zunächst schwach rosa und teilweise silbrig glänzend, danach wurden sie kräftiger und gelb. Die Hyphen hatten einfache Septen, die Wände waren glatt. Der Hyphendurchmesser betrug 5-7 μm . Das Wachstum des Myzels erfolgte konzentrisch. Das Pilzmyzel schied dicke, braune, flüssige Tropfen aus. Es bildeten sich keine Schnallen. Nach 6 Monaten wurde das Myzel auf MMN-Agarnährmedium übertragen. Es stellte sich eine relativ langsame Wachstumsgeschwindigkeit von 2-4 cm pro Monat ein.

4.5 Isolierung von *Cenococcum geophilum* und Wachstumsverhalten in Reinkultur

Wie bereits erwähnt, wird *C. geophilum* den *Fungi imperfecti* zugeordnet und bildet somit eine Ausnahme unter den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mykorrhizapilzen (Kap. 3.1.2.6). Eine eindeutige Klassifizierung von *C. geophilum* muß daher über die Ekto-mykorrhiza und Charakteristiken der Reinkultur erfolgen.

Im Habitus hebt sich *C. geophilum* von den anderen dunkelbraunen bis schwarzen Mykorrhiza-Arten ab. Die Mykorrhiza weist immer einen kohlschwarzen Hyphenmantel auf, während andere Mykorrhiza-Arten braun bis schwarzbraun sind. Im jungen Stadium sind die Spitzen der Mykorrhizen von grauer Farbe. Die abziehenden Hyphen von *C. geophilum* weisen stark verdickte Zellwände auf und stehen starr vom Hyphenmantel ab (Abb. 4.19). Im Gegensatz dazu werden die anderen Mykorrhiza-Arten locker-wollig von den abziehenden Hyphen umhüllt.

Die besondere Manteloberflächenstruktur ermöglicht eine eindeutige Bestimmung von *C. geophilum*. Die Hyphenzellen des plectenchymatischen Mantels ordnen sich in einem regelmäßigen Muster eines Sterns an: von einer Zentralzelle laufen die Mantelzellen strahlenförmig auseinander, Typ G (Abb. 8.1.I). Die Zellwände der nebeneinanderliegenden Hyphen sind verschmolzen, Anastomosen ohne Septum

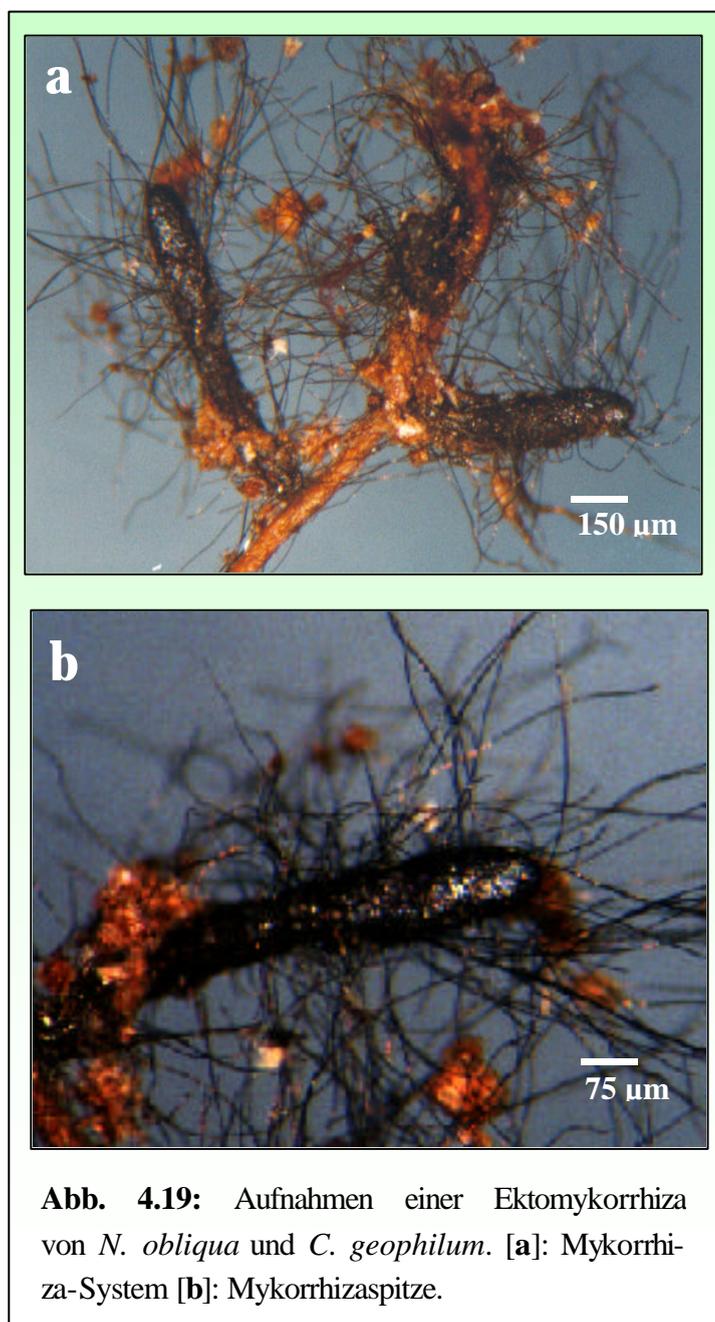


Abb. 4.19: Aufnahmen einer Ekto-mykorrhiza von *N. obliqua* und *C. geophilum*. [a]: Mykorrhiza-System [b]: Mykorrhizaspitze.

(Abb. 8.1.II), Intrahyphale Hyphen vorhanden. Die Mykorrhiza ist meist unverzweigt, manchmal aber auch unregelmäßig verzweigt. Die Form der unverzweigten Enden ist keulenartig. Die Enden sind stumpf abgerundet. Die Manteloberfläche ist samtig glänzend. Rindenzellen nicht durchscheinend (Abb. 4.19.a-b). Ältere Mykorrhizen sind teilweise matt mit leicht bröckeligem Mantel.

Sklerotien sind überwiegend kugelig, aber auch zylindrisch oder oval. Sie haben eine tiefschwarze, glatte, glänzende Oberfläche, teilweise mit abstehenden Hyphen. Die Sklerotien haben einen schwarzen, pudrigen Inhalt.

Mykorrhizastückchen des Mantels konnten erfolgreich abgetrennt werden. Sie wurden nach 4 Tagen auf MMN-Agarnährmedium mit feinen weißen Hyphen überwuchert und wuchsen schließlich konzentrisch aus. Nach etwa einem Monat nahmen die Hyphen von innen nach außen eine rotbraune Farbe an, um sich anschließend schwarz zu färben. Nach zwei Monaten wies die Pilzkolonie noch einen weißlichen Rand mit einigen bräunlichen Hyphen auf.

Das Myzel drang während des Wachstums in den Agar ein und wuchs dicht aneinander gelagert. Das Luftmyzel entwickelte sich sehr schwach, aber kompakt. Innerhalb der Pilzkolonie konnten neben schwarzen Hyphen (ältere Hyphen, 2,5-7 μm Durchmesser) immer auch hyaline Hyphen (junge Hyphen, 1-2 μm Durchmesser) gefunden werden. Die Hyphen waren septiert und schnallenlos. Sie wiesen Konidien und manchmal Chlamydosporen auf. Es stellte sich eine Wachstumsgeschwindigkeit von 2-2,5 cm pro Monat ein.

4.6 Inokulation von *N. obliqua* – Auswahl der Ektomykorrhizapilze

Versuche zur Synthese von Ektomykorrhizen an Sämlingen von *Nothofagus* in Rhizotronen (s. Kap. 3.1.3) erfolgten mit den in den Kapiteln 4.2, 4.4-5 beschriebenen selbstisolierten Pilzarten sowie mit der im Labor etablierten Kultur von *Pisolithus tinctorius* (Kap. 3.1.3).

Bei den für *Nothofagus* spezifischen Ektomykorrhizapilzen zeigten sich bei *Descolea antartica* bereits in weniger als einem Monat Erfolge. Bei *Austropaxillus statuum* waren hingegen erst nach drei Monaten Ansätze zur Mykorrhizabildung zu erkennen. Bei *Austropaxillus boletinoides* dauerte es sechs, bei *Boletus loyo* sieben Monate, bevor eine Mykorrhizabildung erfolgte. Mehrere Inokulierungsversuche mit *Boletus chilensis* scheiterten.

Mit den unspezifischen Mykorrhizapilzen waren Inokulationsversuche mit allen vier Mykobionten erfolgreich. Während sich bei *Paxillus involutus* und *Pisolithus tinctorius*

bereits nach zwei bis drei Wochen Ansätze zur Mykorrhizabildung zeigten, dauerte es bei *Cenococcum geophilum* mindestens einen Monat. *Xerocomus rubellus* zeigte erst nach etwa 6 Monaten erste Ansätze der Mykorrhizierung.

Um für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen weitergehenden Untersuchungen von *N. obliqua* Ektomykorrhizen genügend Versuchsmaterial in vertretbarer Zeit zur Verfügung zu haben, wurden Impfungen an Sämlingen von *N. obliqua* auf folgende Mykorrhizapilze beschränkt:

- *D. antarctica* als Repräsentant für einen *Nothofagus*-spezifischen Ektomykorrhizapilz.
- *P. involutus*, *P. tinctorius* und *C. geophilum* als Repräsentanten für unspezifische Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus*.

Die synthetisierten Ektomykorrhizen waren von natürlich wachsenden Ektomykorrhizen weder im Habitus noch mikroskopisch zu unterscheiden. Nur Mykorrhizen von *A. boletinoides* waren zunächst viel heller als die im Freiland gefundenen. Erst nach einigen Wochen erhielten die Ektomykorrhizen ihre in der Natur typische, schmutzig-weiße bis leicht gelbbraune Färbung.

Für alle weitergehenden Experimente, welche ganze Mykorrhizen zum Gegenstand hatten, wurden Ektomykorrhizen stets 5 Wochen nach ihrer Inokulation verwendet (Kap. 4.8.4). In Experimenten, in welchen hingegen lediglich Ektomykorrhizapilze in Reinkulturen untersucht wurden, waren *A. boletinoides*, *D. antarctica*, *P. involutus*, *P. tinctorius* und *C. geophilum* Gegenstand der Messungen.

4.7 Bodenuntersuchungen

4.7.1 Bodenprofil

Naturwald (*N. obliqua*): Der oberste Haupthorizont des Bodenprofils des Naturwaldes von *N. obliqua* besteht bis zu einer Tiefe von ca. 4,5 cm aus organischem Material (Ol, Of und Oh, s. Abb. 4.20):

- **Ol:** 2 cm tief. Organisches Ausgangsmaterial (weitgehend unzersetzte Pflanzensubstanz an der Bodenoberfläche mit deutlichen erkennbaren Strukturen).
- **Of:** 2 cm tief. Grobhumushorizont (Humus mit noch erkennbaren Strukturen).
- **Oh:** 0,5 cm tief. Feinhumushorizont (reiner Humus), schwarz bis dunkelbraun (7,5YR3/2).

Der mineralische Horizont bis zu einer Tiefe von 56,5 cm setzt sich wie folgt zusammen:

- **Ah:** 8 cm tief. Gemischter Horizont aus Humus und Mineralien. Dunkelbraun (7,5YR3/3).
- **Aeh:** 10 cm tief. Hellbrauner Horizont (7,5YR3/6) mit Zeichen von Auswaschungen, welche Tonmineralien, Fe, Al und organische Substanzen aus der verbleibenden Schluff- und Sandschicht herausgelöst haben.
- **Bv:** 17 cm tief. Rotbrauner Horizont (5YR5/6). Stellenweise schwach steinig.
- **Bv/II Bv:** 17 cm tief. Rotbrauner Horizont (5YR5/6). Mit zunehmendem Steingehalt.

Die Wurzeltiefe von *N. obliqua* betrug etwa 50 cm. Bis zu einer Tiefe von ca. 15 cm waren mykorrhizierte Wurzelspitzen und Myzelium vorzufinden. Der Boden war homogen und wies eine deutliche Krümelgefügeform an der Oberfläche auf. Mit zunehmender Tiefe waren Subpolyedergefügeformen und schließlich Polyedergefügeformen anzutreffen.

Aufforstungswald (*P. radiata*): Der organische Horizont des Bodenprofils des Aufforstungswaldes von *P. radiata*

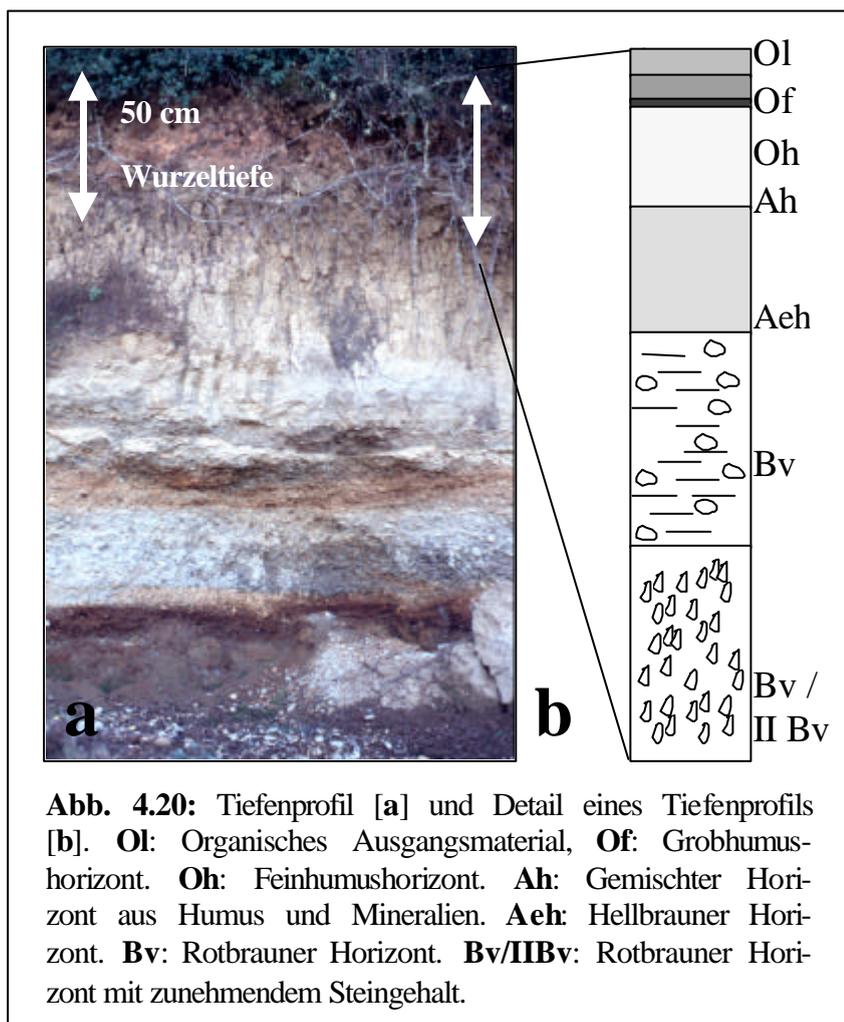


Abb. 4.20: Tiefenprofil [a] und Detail eines Tiefenprofils [b]. **Ol:** Organisches Ausgangsmaterial, **Of:** Grobhumushorizont. **Oh:** Feinhumushorizont. **Ah:** Gemischter Horizont aus Humus und Mineralien. **Aeh:** Hellbrauner Horizont. **Bv:** Rotbrauner Horizont. **Bv/II Bv:** Rotbrauner Horizont mit zunehmendem Steingehalt.

waldes von *P. radiata* unterscheidet sich vom organischen Horizont des Bodenprofils des Naturwaldes von *N. obliqua* lediglich in der Dicke der Horizonte: Ol = 1-1,5 cm, Of = 2,5 cm und Oh = 1,5 cm.

Der mineralische Horizont des Bodenprofils des Aufforstungswaldes von *P. radiata* unterscheidet sich nur in den folgenden, oberen Horizonten: Ah = 7 cm, Aeh = 12,5 cm.

Aufforstungswald (*E. globulus*): Die Horizonte des Bodenprofils des Aufforstungswaldes von *E. globulus* unterscheiden sich von den organischen Horizonten des Bodenprofils des Naturwaldes von *N. obliqua* in folgenden Punkten: Ol = 0,5 cm, Of = 2,5 cm, Oh = 2 cm, Ah = 6 cm und Aeh = 12 cm.

Weide: Die Weide wies sich durch einen gut entwickelten Ah-Horizont = 30 cm aus.

4.7.2 Physikalische Bodenparameter

Die Wasserkapazität betrug im Naturwald von *N. obliqua* 55 %, im Aufforstungswald von *P. radiata* 49 %, im Aufforstungswald von *E. globulus* 40 % und auf der Weide 37 %. Alle weiteren physikalischen Bodenparameter sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt.

	Tiefe (cm)	Körnung (%)			Dichte (g/cm ³)	Lagerungs - dichte (g/cm ³)	Porenvo - lumen (%)
		Sand	Schluff	Ton			
Naturwald <i>N. obliqua</i>	0-22	23,4	48,2	28,4	1,91	0,95	50
	22-50	14,5	45,5	40,0	2,23	1,15	48
Forst <i>P. radiata</i>	0-24	14,4	48,0	37,6	2,25	1,18	47
	24-50	10,3	45,7	44,0	2,92	1,57	46
Forst <i>E. globulus</i>	0-23	25,9	48,9	25,20	1,86	0,97	48
	23-50	15,0	43,8	41,20	2,15	1,19	45
Weide	0-30	22,2	52,0	25,8	1,97	0,99	50
	30-50	13,1	42,0	44,9	2,5	1,28	49

Tab. 4.4: Physikalische Bodenparameter (Körnung, Dichte, Lagerungsdichte und Porenvolumen) der vier Untersuchungsgebiete (*N. obliqua*, *P. radiata*, *E. globulus* und Weide) in Abhängigkeit der Bodentiefe.

4.7.3 Chemische Bodenparameter

Die chemischen Bodenparameter des Naturwaldes von *N. obliqua*, des Aufforstungswaldes von *P. radiata*, des Aufforstungswaldes von *E. globulus* und der Weide sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Bodenanalyse	Wald (Naturwald) <i>N. obliqua</i>	Wald (Forst) <i>P. radiata</i>	Wald (Forst) <i>E. globulus</i>	Weide (Kühe)
pH H ₂ O	5,60	5,66	5,32	5,25
pH KCl	4,55	4,49	4,72	4,50
C _(total) [%]	9	5,10	6,30	9,10
N _(total) [%]	0,55	0,34	0,56	0,74
C/N	16,4	15,0	11,4	12,3
P (Olsen) [ppm]	2,6	3,8	3,6	20,0
Al [ppm]	1831	1001	1328	845
Na [ppm]	40	28	34	30
K [ppm]	54	103	50	294
Ca [ppm]	185	462	52	833
Mg [ppm]	57	90	24	186
Fe [ppm]	125	116	102	215
Mn [ppm]	10,5	18,9	18,0	39,9
Cu [ppm]	5,6	3,7	4,2	4,2
Zn [ppm]	1	0,5	1,5	3,3
B (CaCl ₂) [ppm]	0,7	0,5	0,2	1,0
S (CaPO ₄) [ppm]	37	26	41	7
Al-KCl [ppm]	77	58	16	67

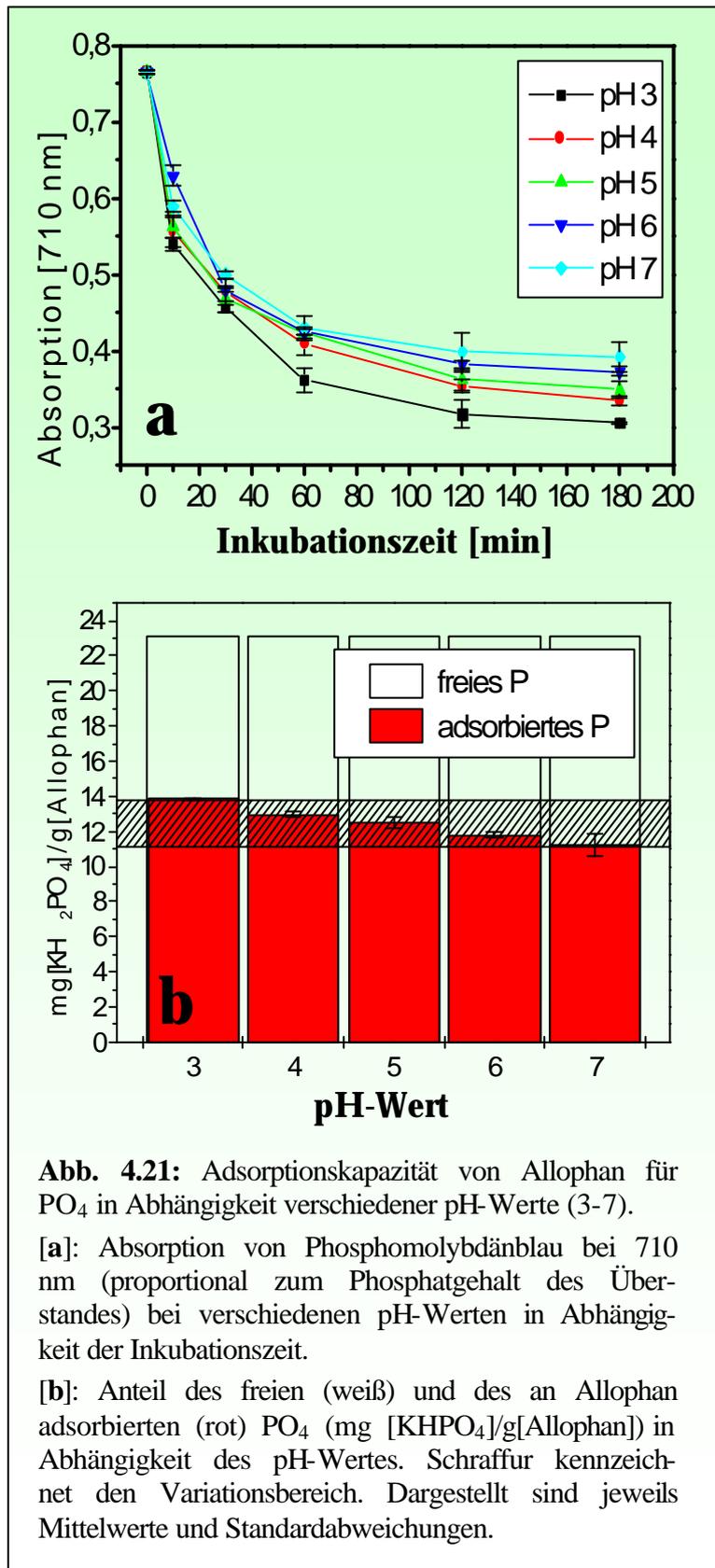
Tab. 4.5: Ergebnis der chemischen Bodenanalysen aus Proben von Naturwäldern von *N. obliqua*, Forst von *P. radiata*, Forst von *E. globulus* sowie Weiden.

4.7.4 Adsorptionskapazität von Allophan

In diesem Kapitel wird der pH-Wert-abhängigen Kinetik der Phosphatadsorption an Allophanen Beachtung geschenkt.

Aufgrund ihrer sehr hohen Ionen-Austausch-Kapazität adsorbieren Allophane mit Hilfe von Al oder Fe^{III} lösliche Phosphate und wandeln sie in einer Katalysatorreaktion in für Pflanzen unzugängliche Variscit- oder Strengitminerale um (vergl. Kap. 2.3.4.2).

Abbildung 4.21.a zeigt das Verhalten der Absorption von Phosphormolybdänblau bei 710 nm, welche sich proportional zum Anteil des Phosphats in Lösung verhält (s. Kap. 3.2.2).



Wie gut zu erkennen ist, erreicht die Adsorptionskinetik recht schnell ihre Sättigung. Bereits nach etwa 30 min sind über 60 % des zu adsorbierenden Phosphats aus der Lösung verschwunden (auf den e^{-1} ten Anteil reduziert).

Wie in Abbildung 4.21.a bereits qualitativ zu erkennen ist, definiert der pH-Wert der Umgebung die Kapazität der Phosphatadsorption. Bei pH 3 ist der Anteil des verbleibenden Phosphats in der Lösung deutlich geringer als bei den pH-Werten 4, 5, 6 und 7. Die quantitative Auswertung in Abb. 4.21.b unterstützt diese Beobachtung und zeigt eine sukzessive Steigerung der Adsorptionskapazität mit sinkendem pH-Wert an.

Innerhalb der pH-Werte 3-7 variiert die Adsorptionskapazität um 3 mg eingesetzten KH_2PO_4 für jedes Gramm Allophan.

4.8 Bestimmung der Phosphataseaktivität

Die Aktivität extrazellulärer und oberflächengebundener Phosphatasen in Reinkulturen der Mykorrhizapilze *A. boletinoides*, *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antartica* und *C. geophilum* wurde im Rahmen dieser Arbeit in Abhängigkeit des pH-Wertes (pH = 3-7) sowie des Phosphatangebotes des Nährmediums bestimmt (0-100 %) (s. Kap. 8.3). Des Weiteren erfolgten Messungen an einem System, an welchem mit den bislang vorhandenen Methoden keine Bestimmungen der Phosphataseaktivitäten möglich waren: An mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*.

In Kapitel 4.8.1 werden die Ergebnisse der absorptionsspektrometrischen Bestimmung der extrazellulären und der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Mykorrhizapilzen mit Hilfe von pNPP gezeigt (s. Kap. 3.3.1).

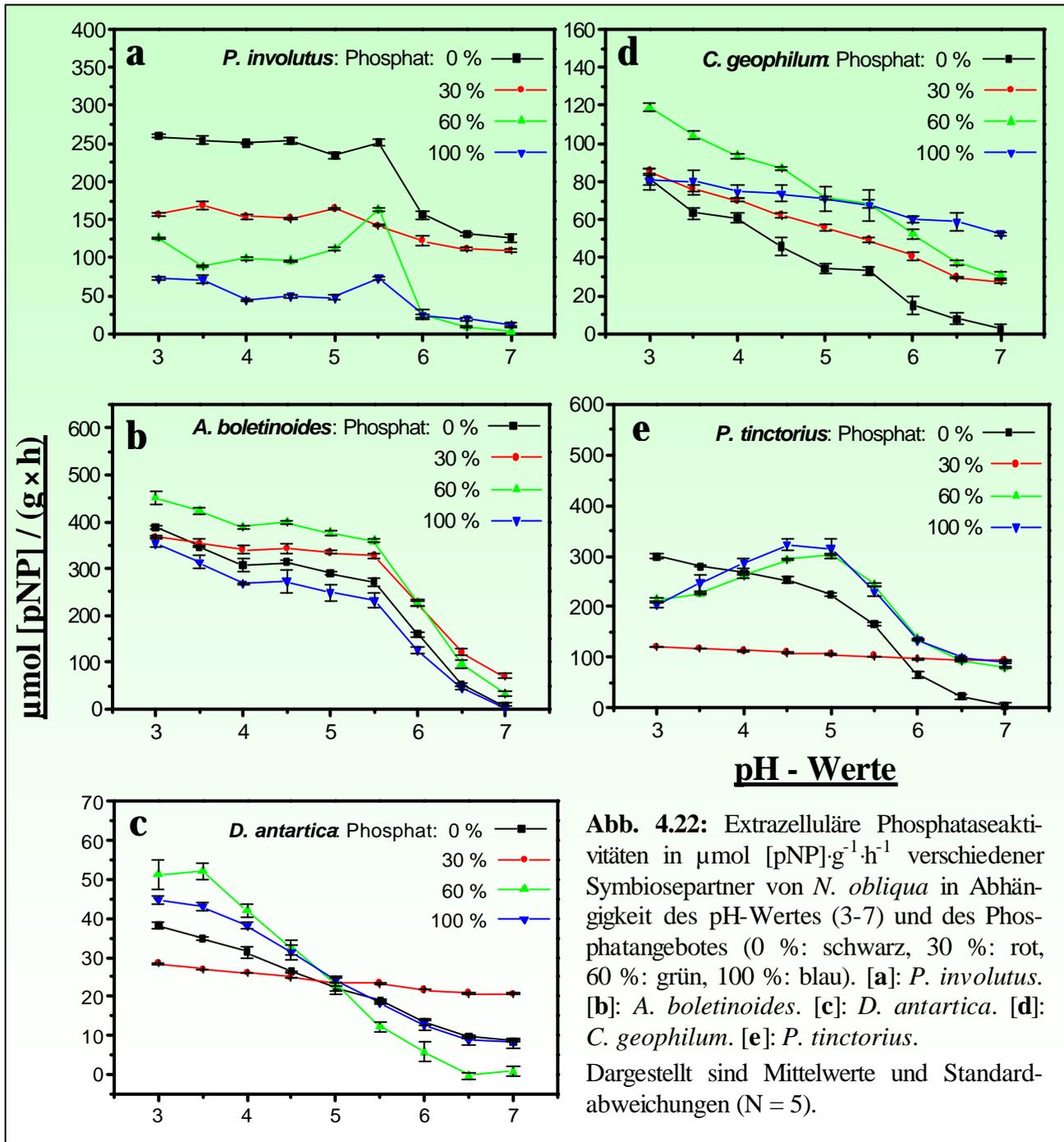
Im folgenden Kapitel 4.8.2 erfolgt ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten fluoreszenzmikroskopischen Methode zur Quantifizierung von oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten und den Ergebnissen der pNPP-Methode. Dieser Vergleich dient zur abschließenden Überprüfung und Klärung der Frage, ob die neue, mikroskopische Methode verlässlich zur Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten eingesetzt werden kann.

In Kapitel 4.8.3 werden Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Methode vorgestellt, welche neben der Phosphataseaktivität auch die Struktur der phosphataseaktiven Zentren berücksichtigt.

Kapitel 4.8.4 widmet sich dann den Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Phosphataseaktivitäten an Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua in vivo*.

4.8.1 Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von pNPP

Die Ergebnisse der absorptionsspektrometrischen Bestimmung der Aktivität der extrazellulären Phosphatasen von fünf Mykorrhizapilzen von *N. obliqua* mit Hilfe von pNPP (s. Kap. 3.3.1) sind in Abbildung 4.22 dargestellt, wobei die Maßstäbe für die Aktivitäten unterschiedlich sind.



Absolute maximale extrazelluläre Phosphataseaktivitäten zwischen 350 und 450 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ werden von *A. boletinoides* bei $\text{pH} = 3$ erreicht (Abb. 4.22.b). *P. tinctorius* (Abb. 4.22.e) zeigt eine maximale Phosphataseaktivität von etwa 300 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei einem Phosphatangebot von 60 % bzw. 100 % und pH-Werten zwischen 4,5 und 5. *P. involutus* erreicht eine maximale Phosphataseaktivität von 250 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei $\text{pH} = 3$ und geringem Phosphatangebot (Abb. 4.22.a). *C. geophilum* (Abb. 4.22.d) und *D. antarctica* (Abb. 4.22.c) weisen bei $\text{pH} = 3$ und einem Phosphatangebot von 60 % ihre Maxima von 120 bzw.

50 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ auf. Alle Mykorrhizapilze zeigen tendenziell eine mit steigendem pH-Wert abfallende extrazelluläre Phosphataseaktivität (Abb. 4.22.a-d). Lediglich *P. tinctorius* (Abb. 4.22.e) zeigt bei einem Phosphatangebot von 60 % bzw. 100 % ein deutliches Maximum zwischen den pH-Werten 4,5 und 5. Der Ansatz eines Maximums ist auch bei *P. involutus* bei pH-Werten um 5,5 zu sehen (Abb. 4.22.a).

In Abhängigkeit des Phosphatangebotes ergibt sich mit Ausnahme von *P. involutus* (Abb. 4.22.a) kein geschlossenes Bild. *P. involutus* erhöht die Aktivität extrazellulärer Phosphatasen bei sinkendem Phosphatangebot um den Faktor 5. *A. boletinoides* (Abb. 4.22.b) weist hingegen die geringsten relativen Änderungen der extrazellulären Phosphataseaktivitäten in Abhängigkeit des Phosphatangebotes auf.

Die Ergebnisse der Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten sind in Abbildung 4.23 zu sehen. Alle Mykorrhizapilze zeigen eine hohe Variabilität der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten gegenüber variierendem Phosphatangebot (Kap. 8.3) und in Abhängigkeit der pH-Bedingungen der Messungen.

Die Reihenfolge der absoluten maximalen oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten spiegelt nicht die Reihenfolge der Aktivitäten extrazellulärer Phosphatasen wider (vergl. Abb. 4.22 und 4.23). Die mit großem Abstand (Faktor 4) höchsten oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten werden mit beinahe 400 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei *P. tinctorius* unter den Bedingungen pH = 4 und bei pH = 6 bis 6,5 und einem Phosphatangebot von 60 % erreicht (Abb. 4.23.e). *P. involutus* und *A. boletinoides* (Abb. 4.23.a und b) folgen in dieser Hierarchie mit Werten um die 100 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei einem Phosphatangebot von 30 % und pH-Werten von 4,5 bzw. 5. *D. antarctica* (Abb. 4.23.c) erreicht bei pH = 4,5 und einem Phosphatangebot von 60 % ein Maximum von ca. 70 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Das Schlusslicht bei den oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten bildet *C. geophilum* (Abb. 4.23.d) mit ca. 12 $\mu\text{mol [pNP]}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei pH = 5 und einem Phosphatangebot von 60 %.

Auch der Verlauf der Werte der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten in Abhängigkeit des pH-Wertes ist nicht mit dem Verlauf der Werte extrazellulärer Phosphatasen zu vergleichen (vergl. Abb. 4.22 und 4.23). In extremen Bereichen des pH-Wertes (3 und 7) zeigen oberflächengebundene Phosphatasen der Mykorrhizapilze (mit Ausnahme von *A. boletinoides*) eher geringe Aktivitäten. Ansonsten sind ein Maximum (*P. involutus*, *C. geophilum*, *D. antarctica*) oder auch zwei Maxima zu erkennen (*A. boletinoides*, *P. tinctorius*).

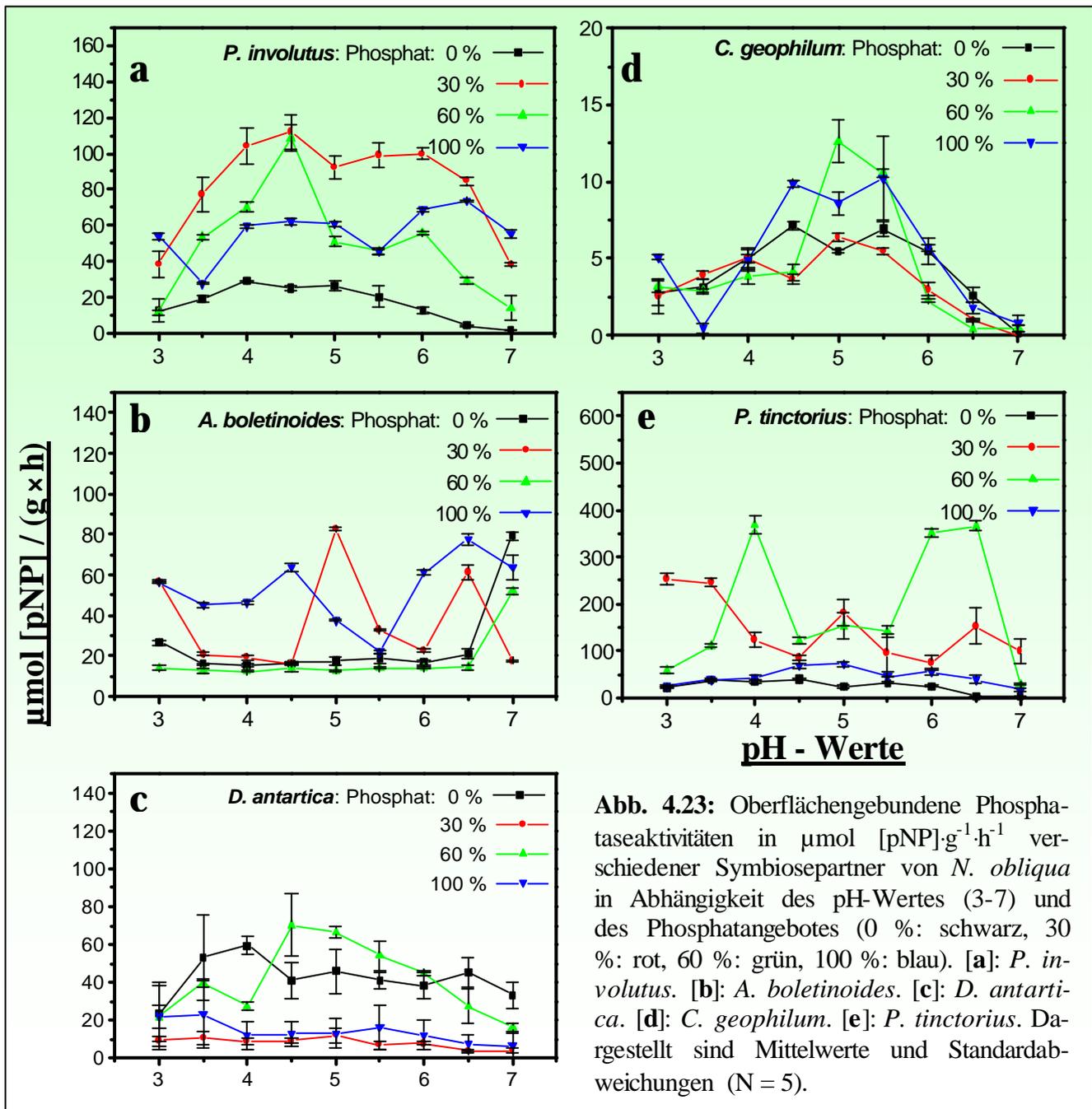
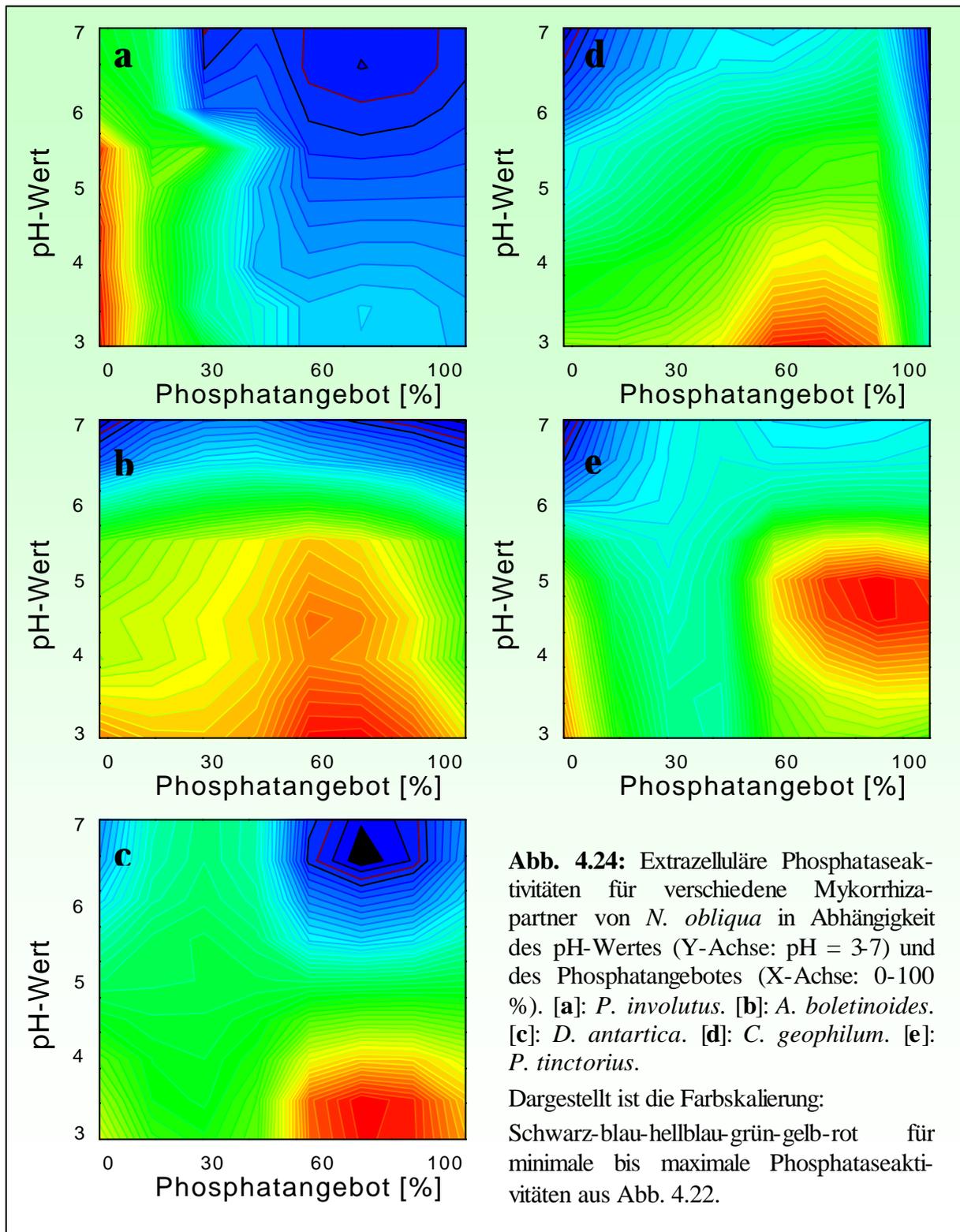


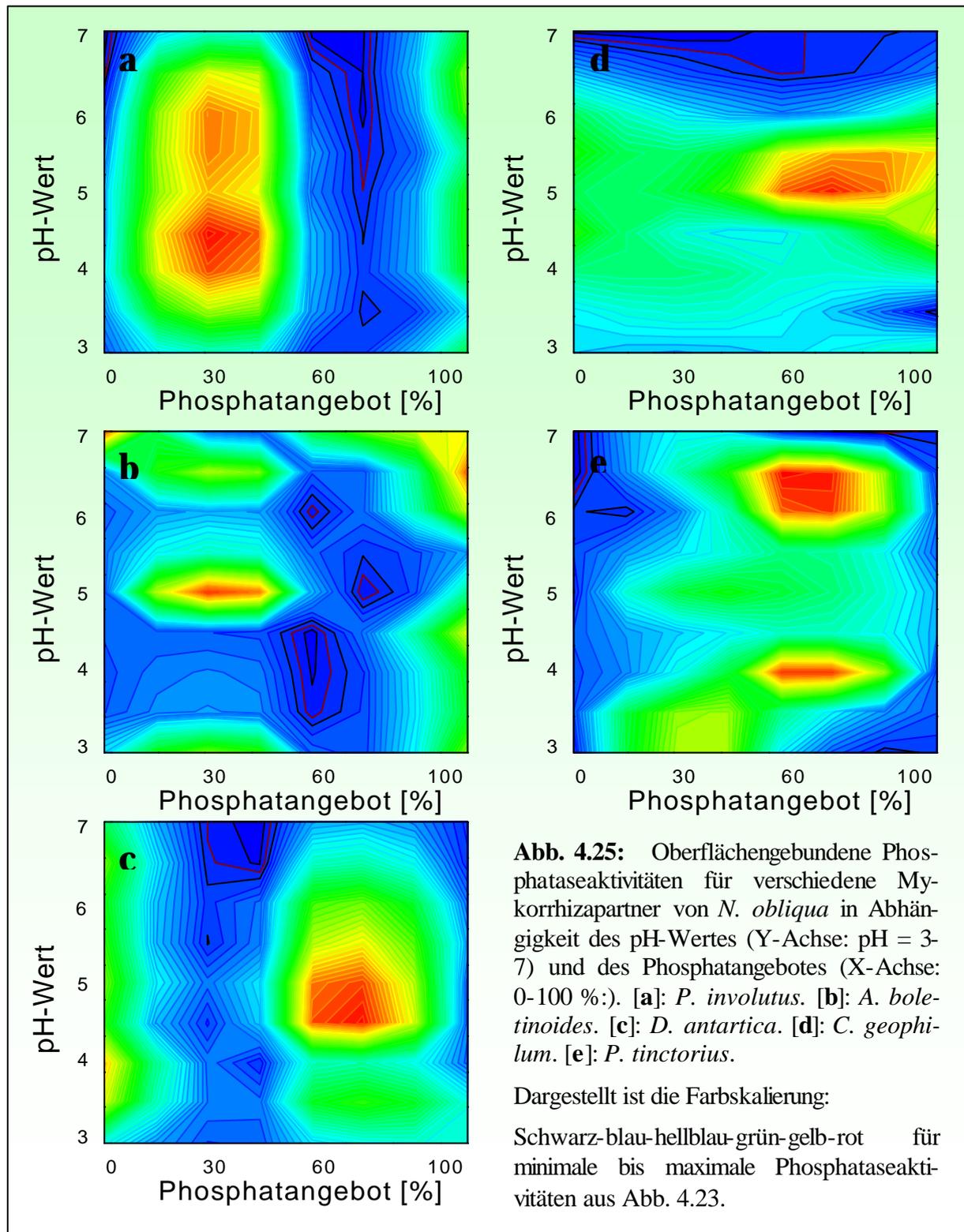
Abb. 4.23: Oberflächengebundene Phosphataseaktivitäten in $\mu\text{mol [pNP]} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ verschiedener Symbiosepartner von *N. obliqua* in Abhängigkeit des pH-Wertes (3-7) und des Phosphatangebotes (0 %: schwarz, 30 %: rot, 60 %: grün, 100 %: blau). [a]: *P. involutus*. [b]: *A. boletinoides*. [c]: *D. antarctica*. [d]: *C. geophilum*. [e]: *P. tinctorius*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (N = 5).

In Abhängigkeit des Phosphatangebotes ergibt sich für die oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten keine in der Tendenz zu unterstreichende Entwicklung. Diese Beobachtung stimmt mit den extrazellulären Phosphataseaktivitäten überein (vergl. Abb. 4.22 und 4.23).

Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Messgrößen, welche von mehreren Parametern abhängen, können sehr anschaulich mit Hilfe von bivariaten, farbcodierten Graphiken dargestellt werden (s. Abb. 4.24 und Abb. 4.25). In Abbildung 4.24 wird noch einmal deutlich, dass außer *P. involutus* (Abb. 4.24.a) keiner der Mykobionten ein stetiges Verhalten der extrazellulären Phosphataseaktivität in Abhängigkeit des Phosphatangebotes zeigt. Diese



Mykobionten zeigen bei geringen pH-Werten ein Maximum bei einem Phosphatangebot zwischen 60 und 100 %. Ansonsten sinkt die Aktivität aller Mykobionten mit steigendem pH-Wert. Nur bei *A. boletinoides* und *P. tinctorius* sind Anzeichen eines Maximums bei pH-Werten zwischen 4 und 5 zu erkennen.



Im Gegensatz zu Abbildung 4.24 sind die Muster der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten (Abb. 4.25) generell feiner strukturiert. Deutlich zu erkennen sind die ausgeprägten Maxima bei definierten pH-Werten und Phosphatbedingungen für alle Mykorrhizapilze. Auch bei den oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten sind die Muster untereinander zwar vom Charakter her ähnlich, in ihrer speziellen Ausprägung jedoch unterschiedlich.

4.8.2 Methodenvergleich der spektrometrischen und der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen

Nachdem in Kapitel 4.8.1 die Ergebnisse der absorptionsspektrometrischen Bestimmung der extrazellulären und der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von pNPP gezeigt wurden, erfolgt in diesem Kapitel ein direkter Vergleich der Quantifizierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten zwischen der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten fluoreszenzmikroskopischen Methode mit Hilfe des Fluorophors ELF-97 (s. Kap. 3.3.2) und der pNPP-Methode.

Dieser Vergleich soll zur abschließenden Klärung der Frage dienen, ob die neue, mikroskopische Methode verlässlich zur Quantifizierung von Phosphataseaktivitäten, insbesondere in ganzen Mykorrhizen (s. Kap. 4.8.4), eingesetzt werden kann. Die in den Abbildungen 4.26 bis 4.30 dieses Kapitels verwendeten Farbintervalle (schwarz-blau-hellblau-grün-gelb-rot) skalieren jeweils die gemessenen minimalen und maximalen Phosphataseaktivitäten der Pilzhyphen (vergl. Abb. 4.25 und Originaldaten in Abb. 8.3-7).

Abbildung 4.26 zeigt den direkten Vergleich der Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten an Hyphen von *P. involutus* in Abhängigkeit des pH-Wertes (pH =

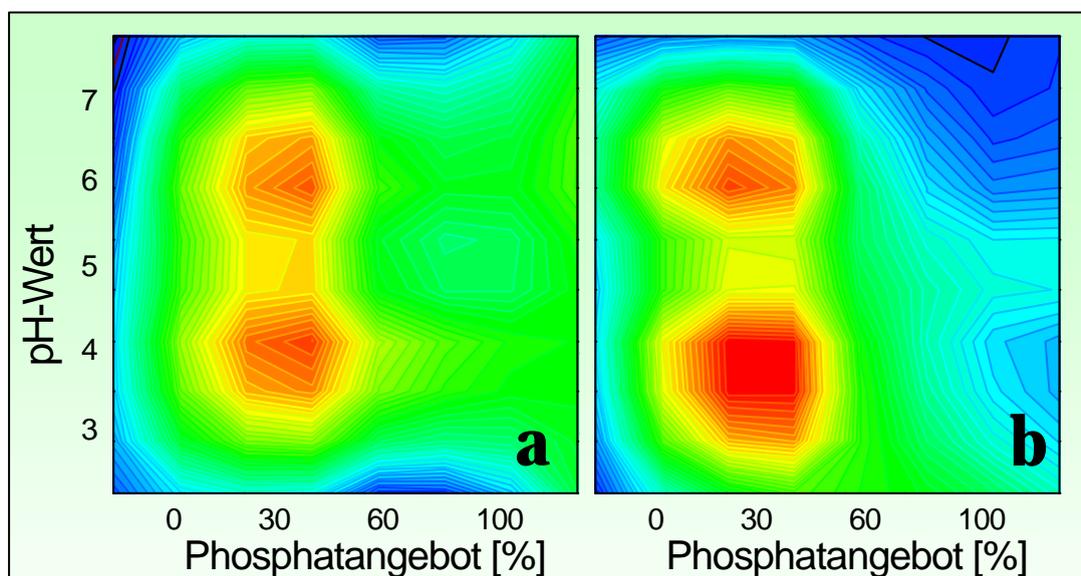


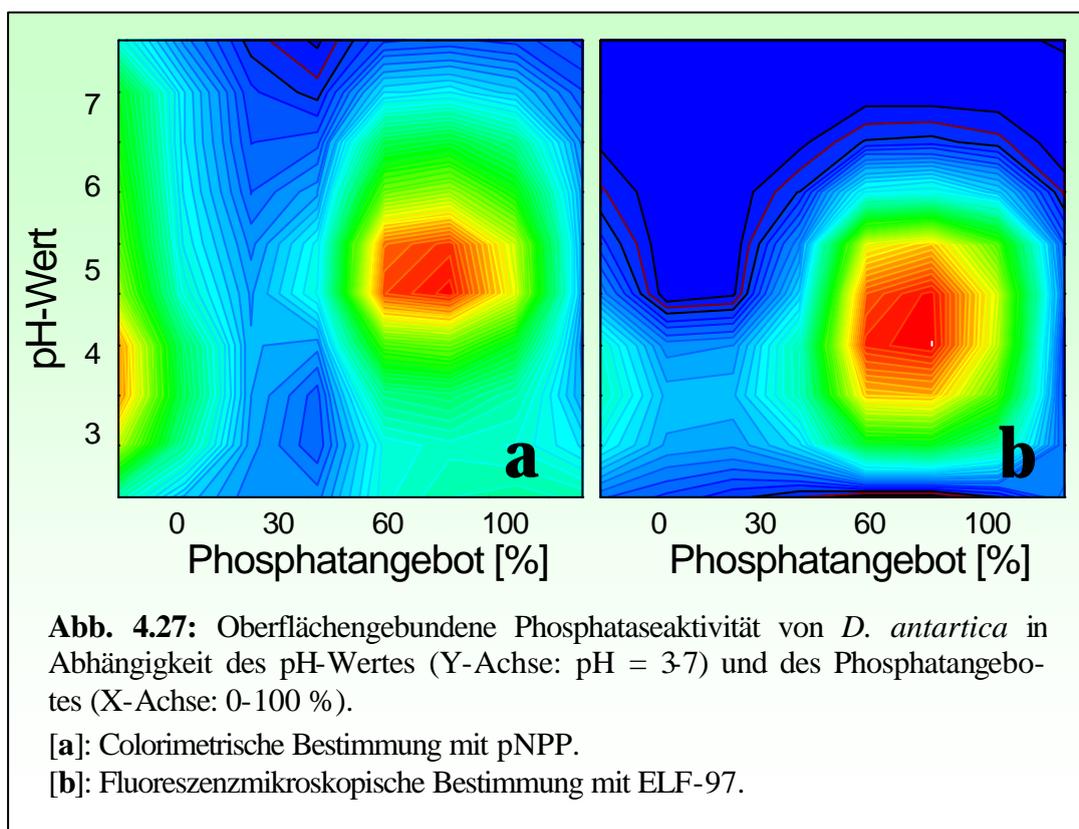
Abb. 4.26: Oberflächengebundene Phosphataseaktivität von *P. involutus* in Abhängigkeit des pH-Wertes (Y-Achse: pH = 3-7) und des Phosphatangebotes (X-Achse: 0-100 %).

[a]: Colorimetrische Bestimmung mit pNPP.

[b]: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung mit ELF-97.

3-7) und des Phosphatangebotes (0-100 %). Die Ergebnisse der colorimetrischen Bestimmung oberflächengebundener Phosphataseaktivitäten mit pNPP (Abb. 4.26.a) gleichen in ihrer Struktur den Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Methode mit ELF-97 (Abb. 4.26.b). Die Übergänge zwischen minimalen und maximalen Phosphataseaktivitäten der Pilzhypen sind bei der fluoreszenzmikroskopischen Methode generell etwas schärfer ausgeprägt. Vor allem das doppelte Maximum bei einem Phosphatangebot von 30 %, welches bereits in Abbildung 4.26.a angedeutet ist, wird in Abbildung 4.26.b auf eindeutige Weise bestätigt. In Abbildung 4.26.b ist allerdings das Maximum bei pH = 4 in seiner Ausbreitung bis pH = 3 erweitert.

Für *D. antarctica* (Abb. 4.27) fällt die Beschreibung des Vergleichs der Ergebnisse beider Methoden ähnlich aus wie für *P. involutus*. Der generelle Aspekt beider Abbildungen ist sehr ähnlich. Wie schon in Abbildung 4.26 sind die Übergänge zwischen minimalen und maximalen Phosphataseaktivitäten bei der fluoreszenzmikroskopischen Methode schärfer ausgeprägt, wodurch das isoliert auftretende Maximum bei *D. antarctica* (Phosphatangebot zwischen 60 und 100 %) in Abbildung 4.27.b deutlicher definiert ist als in Abbildung 4.27.a. Das Maximum bei pH = 5 (Abb. 4.27.a) der pNPP-Methode ist in seiner Ausbreitung im Falle der ELF-97-Methode (Abb. 4.27.b) bis pH = 4 erweitert.

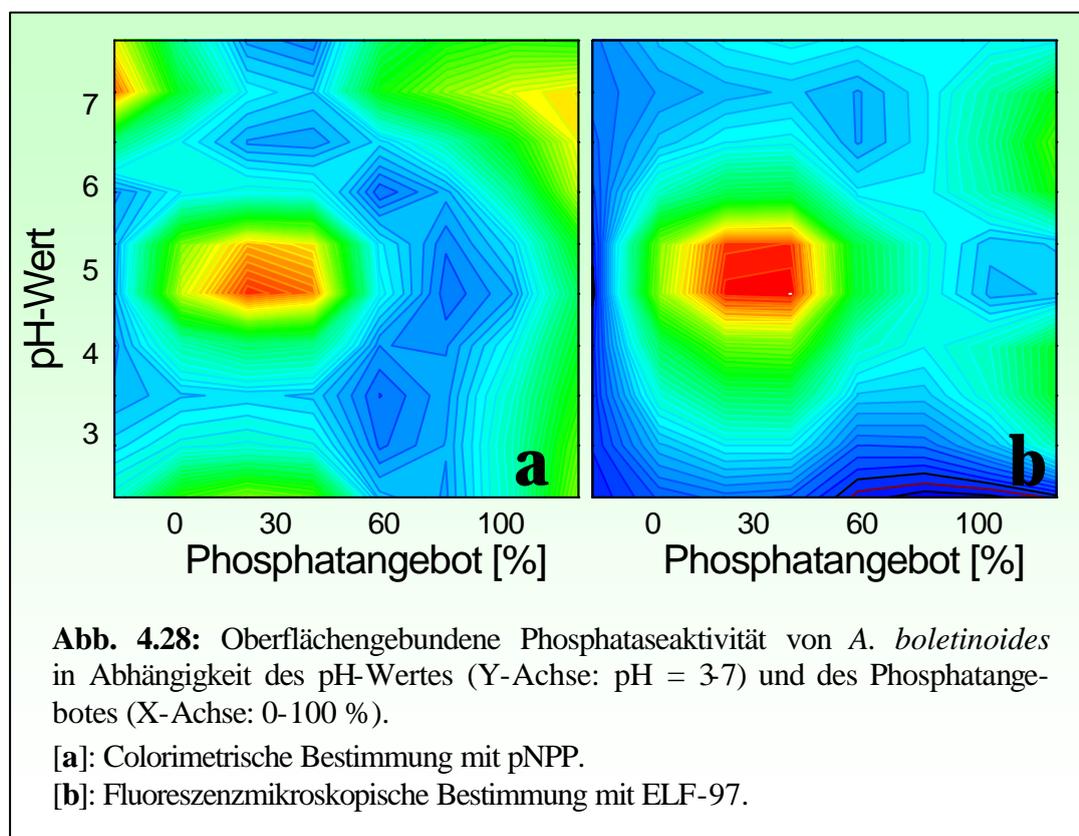


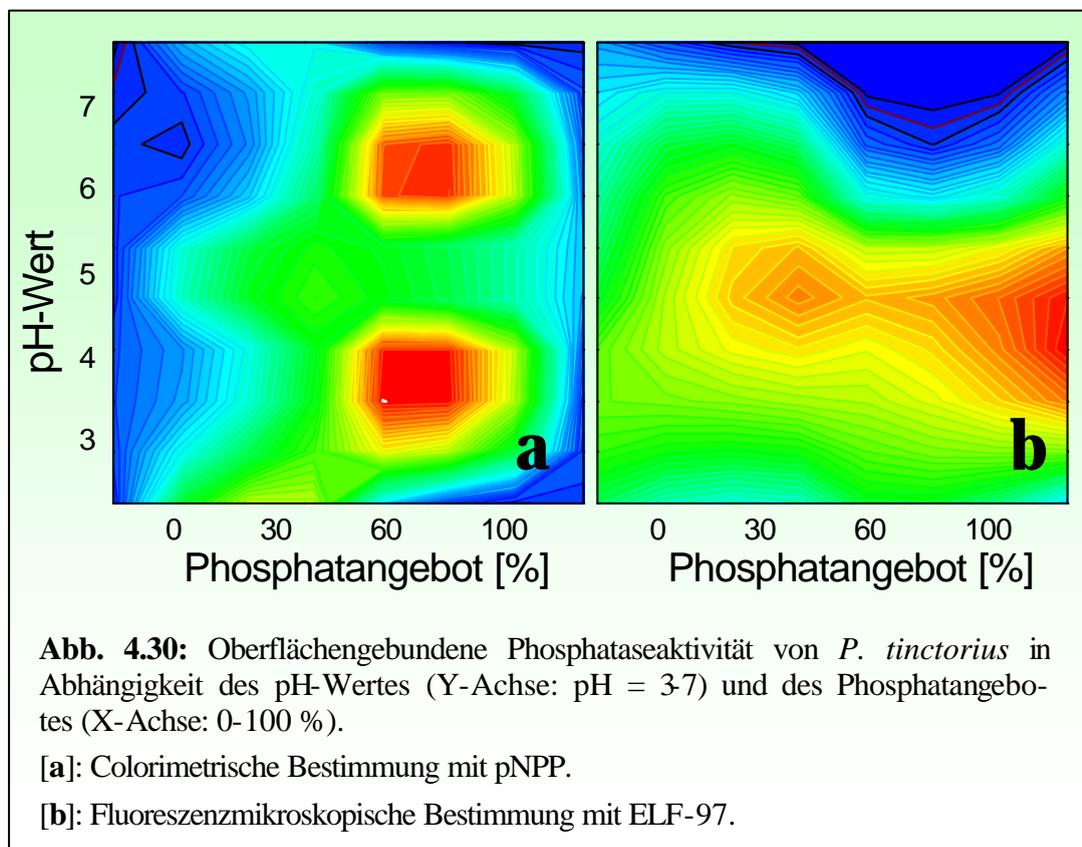
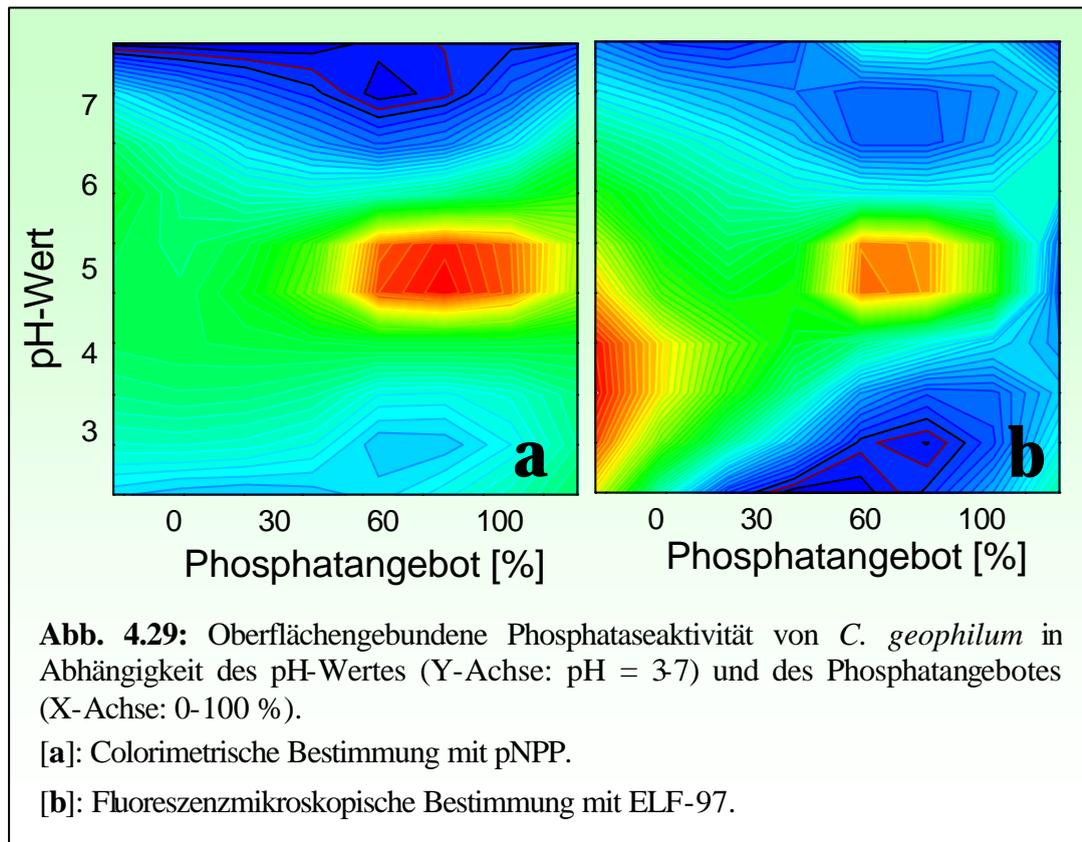
Eine nahezu identische Struktur weisen die Bestimmungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten in Abbildung 4.28 für *A. boletinoides* auf. Das einzige isolierte Maximum bei einem Phosphatangebot von 30 % und einem pH-Wert von 5 ist bei beiden Methoden von einem ausgeprägten Minimum umgeben.

Wie schon in den beiden vorangegangenen Abbildungen ist das Maximum für die fluoreszenzmikroskopische Methode (Abb. 4.28.b) deutlicher ausgeprägt als für die pNPP-Methode (Abb. 4.28.a).

Die Bestimmungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten bei *C. geophilum* (Abb.4.29) sind wiederum in ihrem Charakter sehr ähnlich. Mit beiden Methoden zeigt sich ein isoliertes Maximum bei pH = 5 und einem Phosphatangebot von etwa 60 %. Diesmal ist, anders als in den vorhergehenden Vergleichen, das Maximum der pNPP-Methode etwas deutlicher ausgeprägt.

Es umschließt ein Phosphatangebot von 60 bis 100 % (Abb. 4.29.a), während das Maximum bei der ELF-97-Methode klar auf 60 % begrenzt ist (Abb. 4.29.b). Ein zweites Maximum, welches in der Abbildung 4.29.b bei pH = 3 bis 4 und einem Phosphatangebot von 0 % zu erkennen ist, wurde mit der pNPP-Methode nicht reproduziert.





Im Gegensatz zu den bislang besprochenen Ergebnissen des Methodenvergleichs zur Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität weisen die Abbildungen 4.30.a und 4.30.b wesentliche Unterschiede in ihrer Struktur auf. Das deutlich ausgeprägte doppelte Maximum der Enzymaktivitäten bei einem Phosphatangebot von 60 % und den pH-Werten 3,5 und 6,5 der pNPP-Methode (Abb. 4.30.a) konnte hier von der ELF-97-Methode (Abb. 4.30.b) nicht annähernd reproduziert werden. Insgesamt weist das Muster der ELF-97-Methode (Abb. 4.30.b) ein im Vergleich zu den vorangehenden Abbildungen eher untypisches Verhalten auf. Das Maximum ist hier nur schwach ausgeprägt und erstreckt sich über weite Bereiche des Phosphatangebotes.

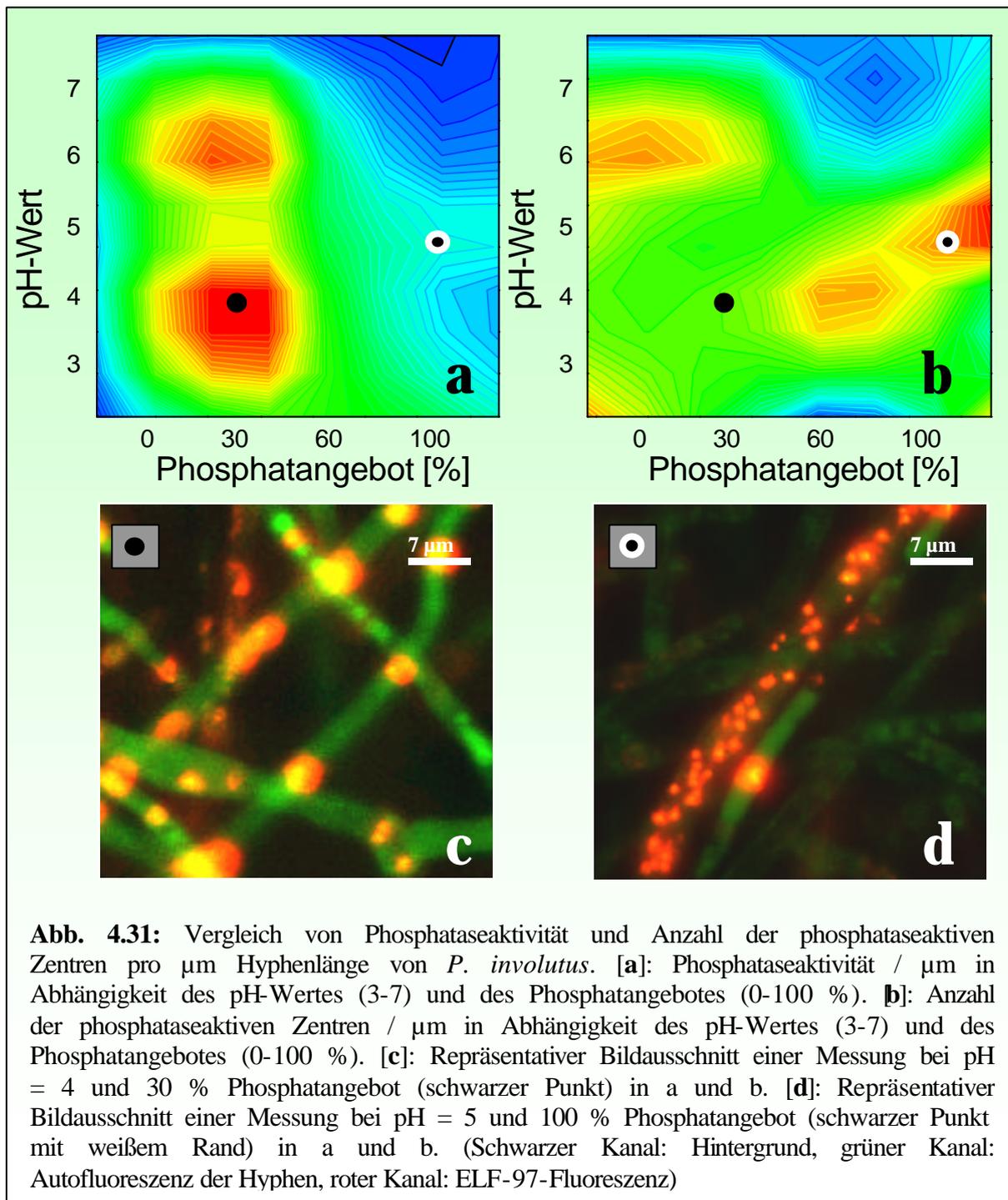
4.8.3 Strukturelle Untersuchungen der oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren von Mykorrhizapilzen mit Hilfe von ELF-97

Mit Ausnahme von *P. tinctorius* zeigt der direkte Vergleich der Quantifizierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten in Kapitel 4.8.2 große Übereinstimmungen zwischen der pNPP-Methode und der fluoreszenzmikroskopischen Methode mit Hilfe des Fluorophors ELF-97.

Die fluoreszenzmikroskopische Methode eignet sich nicht nur zur Bestimmung integraler Fluoreszenzintensitäten in Proben, sondern lässt darüber hinaus Aussagen betreffend der Struktur der vermessenen fluoreszenten Objekte zu (s. Kap. 3.3.2.2). In diesem Kapitel werden Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Methode vorgestellt, in denen die integrale Phosphataseaktivität ($[\text{Intensität}] / [\text{Hyphenlänge, } \mu\text{m}]$) in Zusammenhang mit einer strukturellen Information ($[\text{Anzahl der phosphataseaktiven Zentren}] / [\text{Hyphenlänge, } \mu\text{m}]$) gebracht wird.

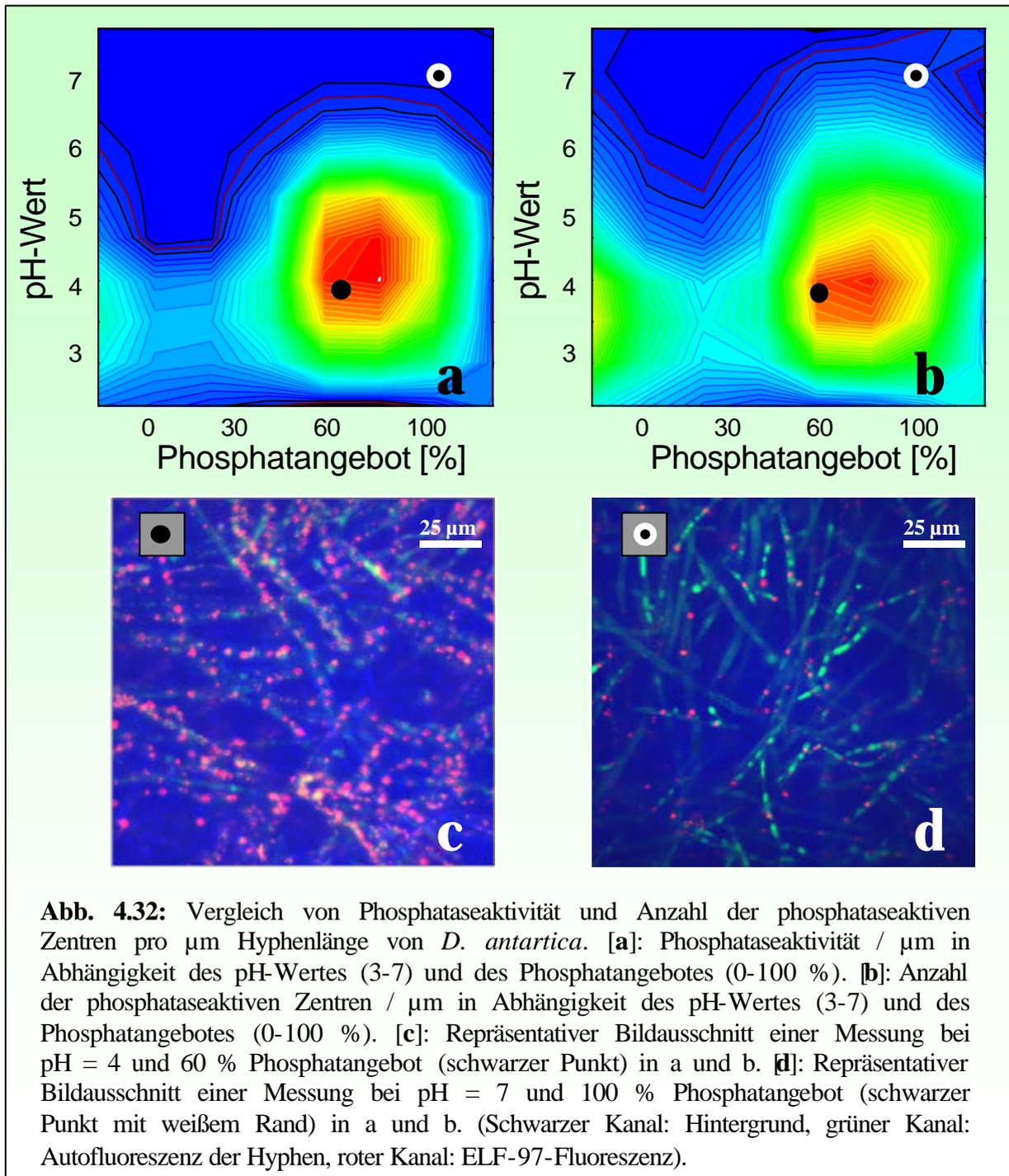
Zur Darstellung dienen, wie in den vorangehenden Kapiteln, wieder bivariate Abbildungen, welche die Farbintervalle (schwarz-blau-hellblau-grün-gelb-rot) für den Bereich der jeweils minimalen und maximalen Werte verwenden. Anhand repräsentativer Bildausschnitte werden die unterschiedlichen strukturellen Reaktionen auf veränderte Wachstumsbedingungen dokumentiert.

Abbildung 4.31 zeigt zu Beginn den Vergleich von Phosphataseaktivität und der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren für *P. involutus*. Wie zu erkennen ist, weist das Muster im Fall der Phosphataseaktivität (Abb. 4.31.a) deutliche Unterschiede zum Muster der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren auf (Abb. 4.31.b). Unterschiedliche Bedingungen beeinflus-



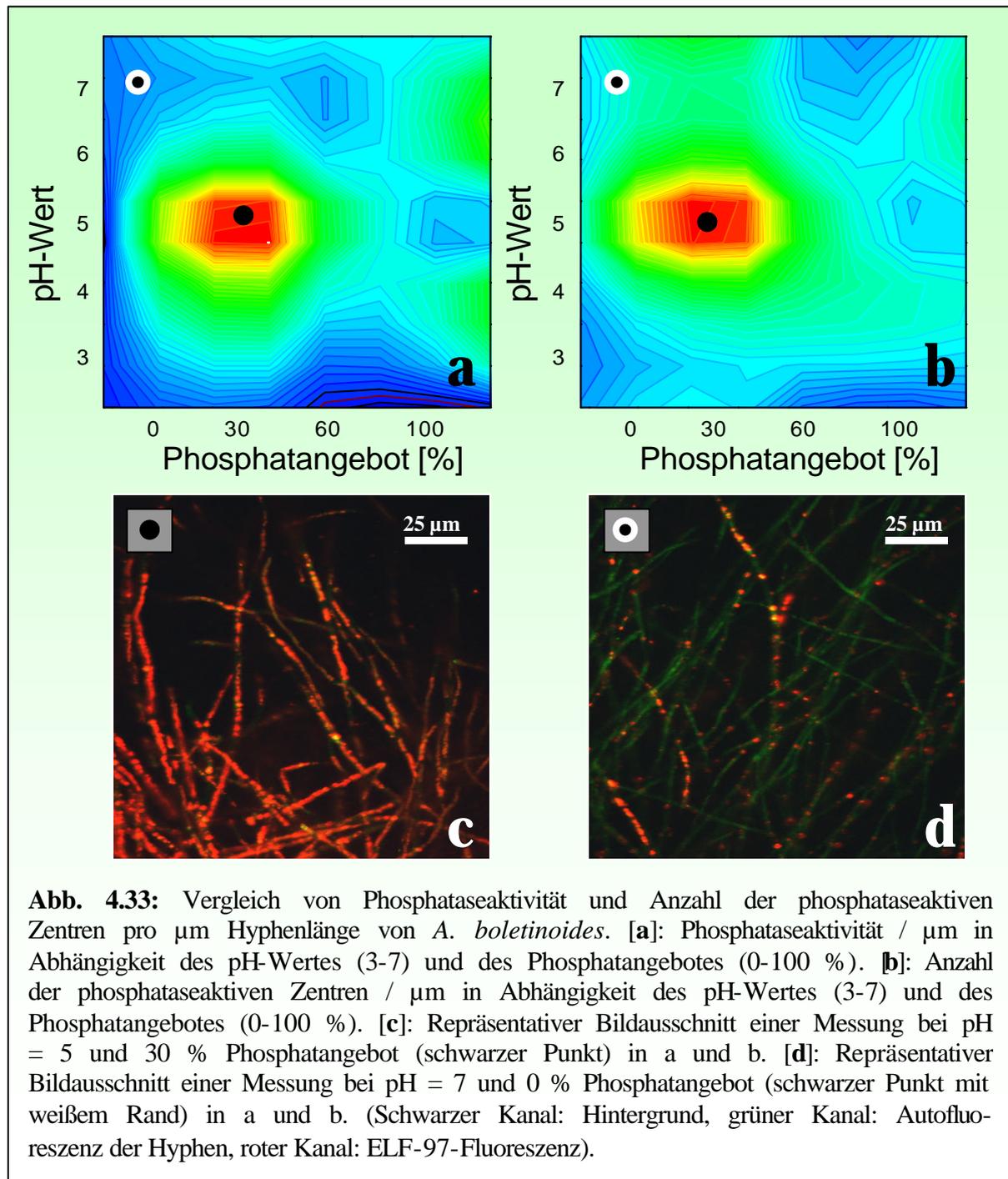
sen demnach nicht nur die Aktivität der phosphataseaktiven Zentren, sondern ebenfalls deren Struktur. Dieses Phänomen wird anhand der Bildausschnitte (Abb. 4.31.c und d) verdeutlicht.

Die phosphataseaktiven Zentren bei einem Phosphatangebot von 30 % und pH = 4 (Abb. 4.31.c) sind größer und von höherer Aktivität als bei einem Phosphatangebot von 100 % und pH = 5 (Abb. 4.31.d). Allerdings ist die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge bei *P. involutus* unter den Bedingungen Phosphatangebot = 100 % und pH = 5



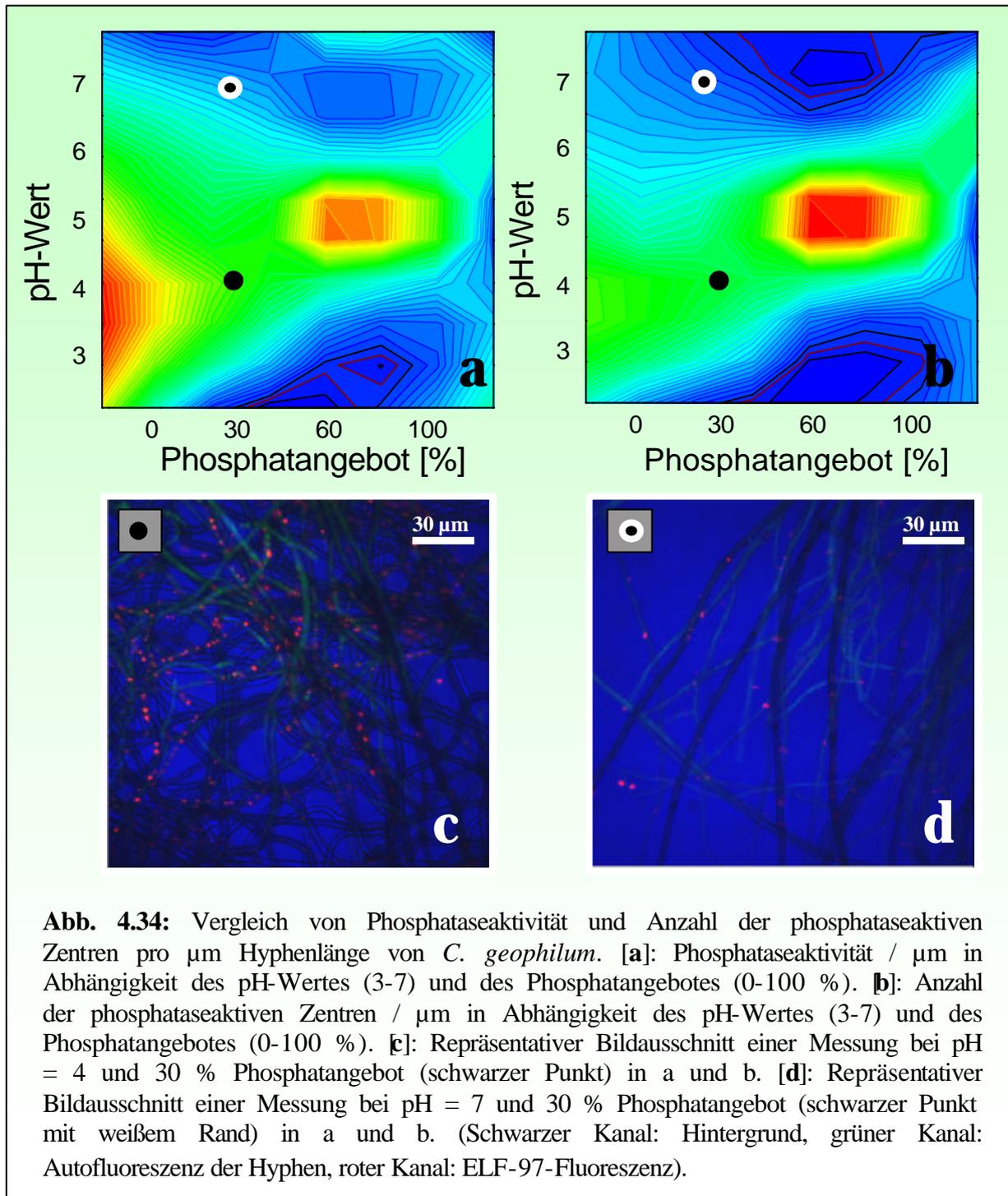
(Abb. 4.31.d) viel höher als unter den Bedingungen Phosphatangebot = 30 % und pH = 4 (Abb. 4.31.c).

Anders ist das Verhalten bei *D. antartica* (Abb. 4.32). Hier ist das Muster, das durch die Phosphataseaktivität definiert wird (Abb. 4.32.a), praktisch identisch mit dem Muster, welches durch die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge geprägt wird (Abb. 4.32.b). Die Übergänge zwischen Minima und Maxima sind allerdings in Abbildung



4.32.a etwas deutlicher definiert als in Abbildung 4.32.b. Wie auch in Abbildung 4.32.c im Vergleich zu Abbildung 4.32.d zu erkennen ist, reagiert *D. antartica* demnach sowohl mit einer Variation der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren als auch mit einer Variation der Phosphataseaktivität bzw. der Größe der Zentren auf veränderte Messbedingungen.

Bei *A. boletinoides* (Abb. 4.33) herrschen ähnliche Bedingungen wie bei *D. antartica* (Abb. 4.32). Auch hier sind die Muster der Phosphataseaktivität (Abb. 4.33.a) nahezu identisch mit denen der phosphataseaktiven Zentren (Abb. 4.33.b). Auch *A. boletinoides*



reagiert parallel mit der Variation der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren und der Variation der Phosphataseaktivität bzw. der Größe der Zentren auf veränderte Messbedingungen.

Für *C. geophilum* (Abb. 4.34) ist das Verhalten ein wenig anders als für *A. boletinoides* (Abb. 4.33) bzw. *D. antartica* (Abb. 4.32). Zwar sind auch hier die Muster der Phosphataseaktivität (Abb. 4.34.a) nahezu identisch mit denen der phosphataseaktiven Zentren (Abb. 4.34.b), jedoch sind die Übergänge in Abbildung 4.32.b etwas deutlicher definiert als in

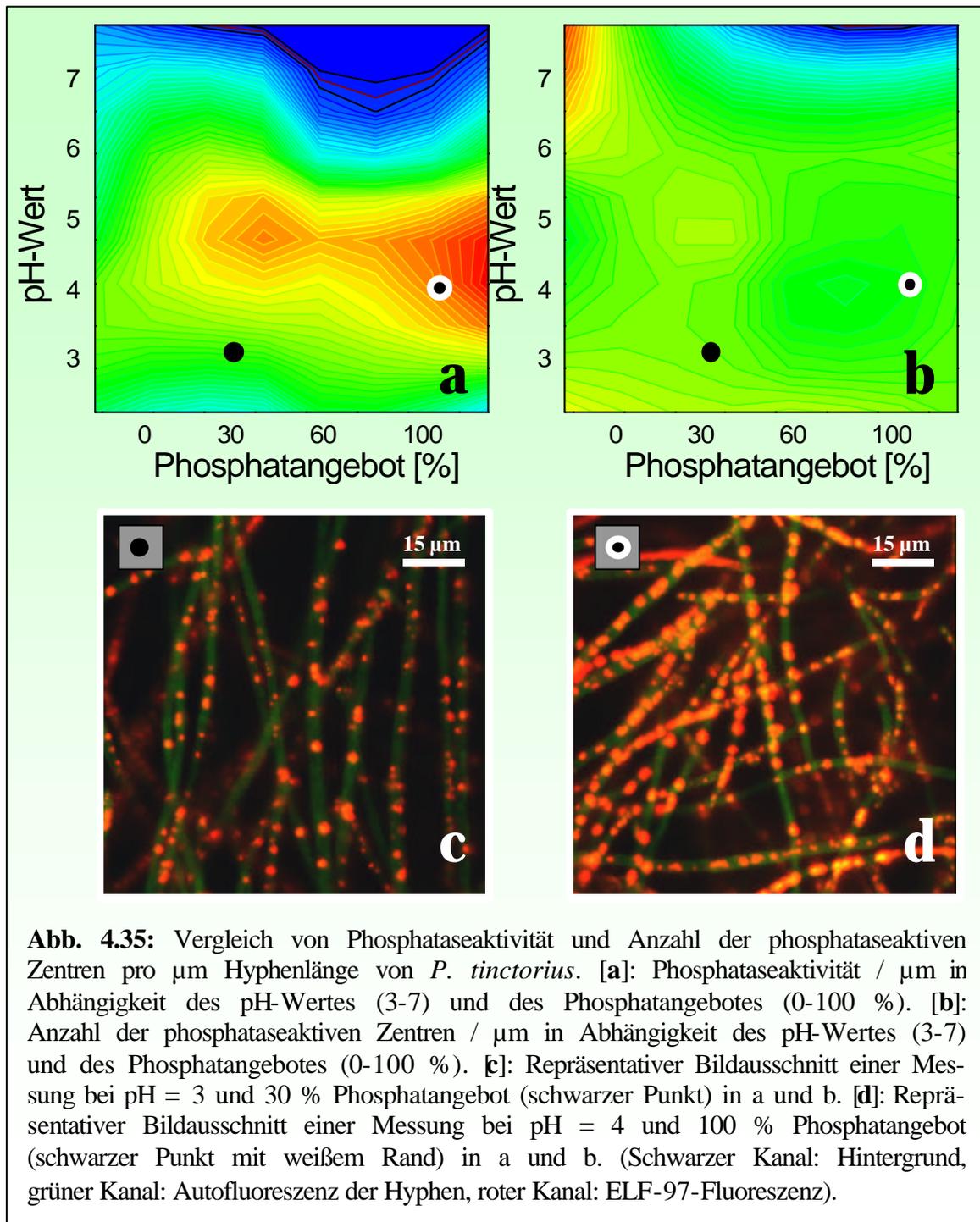


Abbildung 4.32.a. Wie auch in den Abbildungen 4.34.a und 4.34.b zu sehen ist, ändert sich die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in stärkerem Maße als die Intensität (bzw. Größe) der einzelnen Zentren.

P. tinctorius (Abb. 4.35) zeigt ein besonderes Verhalten. Das Muster der Phosphataseaktivität (Abb. 4.35.a) ist grundverschieden vom Muster der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren (Abb. 4.35.b). Die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge ist

über den gesamten Messbereich praktisch konstant. *P. tinctorius* verändert also die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren kaum, wohl aber deutlich die Intensität (respektive die Größe der einzelnen Zentren, vergl. Abb. 4.35.a und Abb. 4.35.b). Der leichte Abfall in der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge bei $\text{pH} = 4$ und 100 % Phosphatangebot (schwarzer Punkt mit weißem Rand) gegenüber $\text{pH} = 3$ und 30 % Phosphatangebot (schwarzer Punkt) ist dadurch zu erklären, dass die sich ausbreitenden, phosphataseaktiven Zentren eine größere Überlappungswahrscheinlichkeit besitzen. Sie werden daher in der automatisierten Auswertung häufiger zu größeren Zentren zusammengefasst und auch zusammen ausgezählt.

4.8.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*

Nachdem in den Kapiteln 4.8.2-3 Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Methode zur Bestimmung oberflächengebundener Phosphataseaktivitäten sowie der Struktur der phosphataseaktiven Zentren in Pilzhyphen präsentiert wurden, beschreibt Kapitel 4.8.4 die Ergebnisse

der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Phosphataseaktivitäten an ganzen Querschnitten von mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* (s. Kap. 3.3.2.3.2).

Abbildung 4.36 zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmung für *N. obliqua*-Ektomykorrhizen mit *P. tinctorius*, *P. involutus*, *C. geophilum* und *D. antartica*. *P. tinctorius* und *P. involutus* zeigen einen deutlich höheren Pilzanteil an der Mykorrhiza als *C. geophilum* und *D. antartica*. Bei *P. tinctorius* und *P. involutus* ist die Fläche des Hyphenmantels im Querschnitt praktisch identisch mit der Fläche

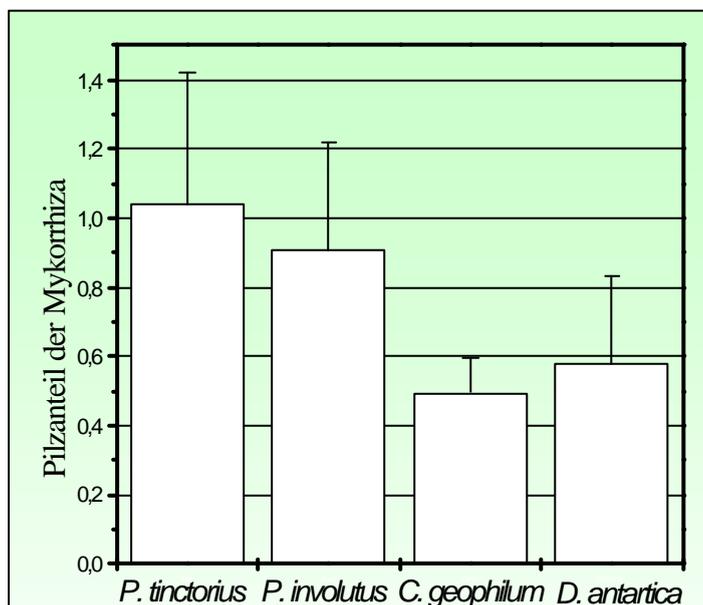


Abb. 4.36: Pilzanteil der Mykorrhiza (Quotient aus der Fläche des Hyphenmantels zur Fläche der Wurzelzellen, s. Kap. 3.3.2.3.2) von *N. obliqua* mit *P. tinctorius*, *P. involutus*, *C. geophilum* und *D. antartica*. Dargestellt sind Mittelwerte. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

der Kurzwurzel. Die Flächen der Hyphenmäntel von *C. geophilum* und *D. antarctica* nehmen immerhin noch etwa die Hälfte der Flächen der Kurzwurzeln ein.

Abbildung 4.37 zeigt mit Hilfe der Bildverarbeitung abgeleitete Parameter (Kap. 3.3.2.3. 2), die im Zusammenhang mit Phosphataseaktivitäten in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* stehen. In Abbildung 4.37.a ist die Intensität der ELF-97-Fluoreszenz bezogen auf die gesamte Ektomykorrhizafläche bzw. Wurzelfläche von *N. obliqua* zu sehen. *P. tinctorius* zeigt die mit Abstand höchste Phosphataseaktivität pro Ge-

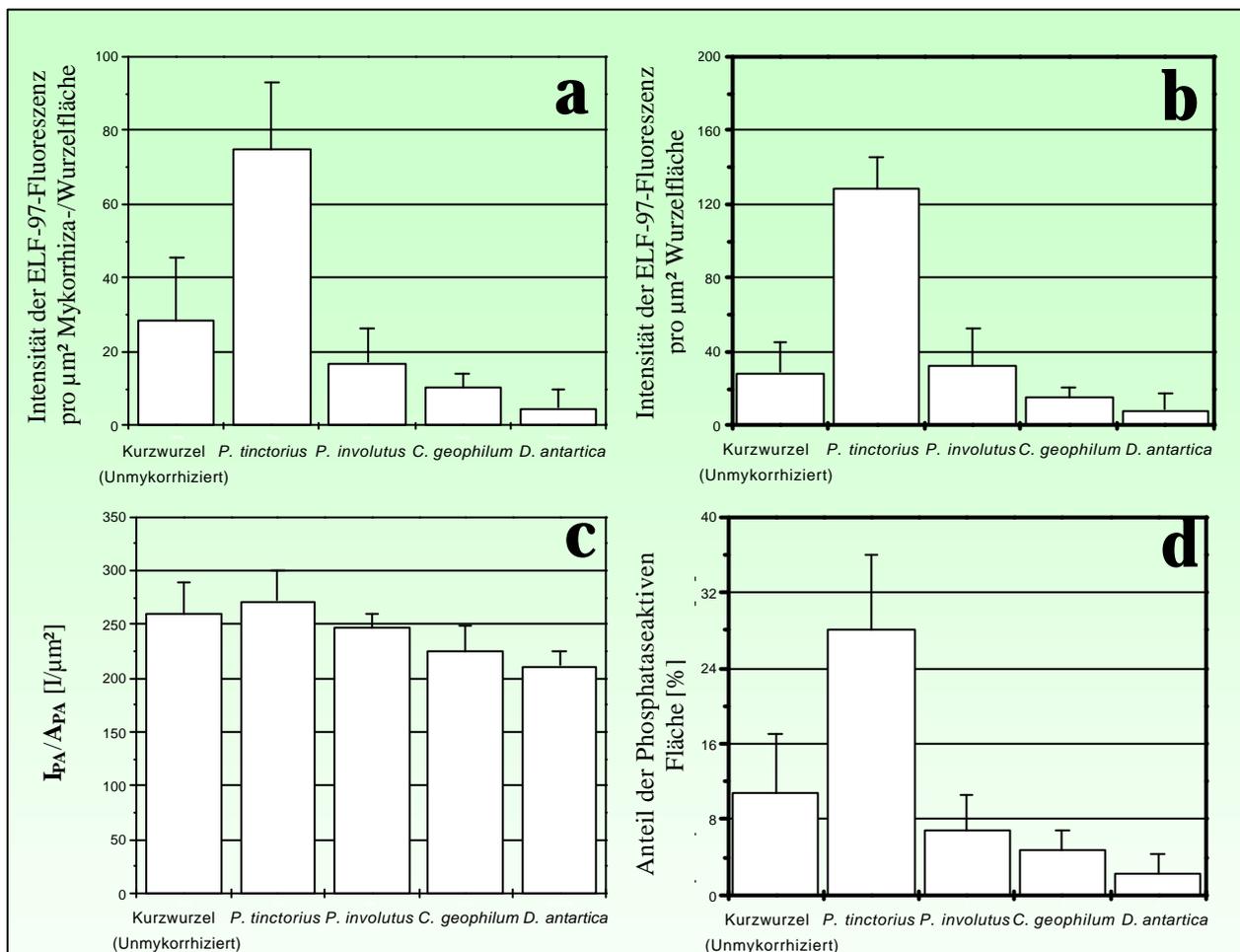


Abb. 4.37: Phosphataseaktivitäten in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* (pH = 5). Zur Definition der Parameter siehe auch Kapitel 3.3.2.3.2.

[a]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz pro μm^2 (Mykorrhiza- / Wurzelfläche).

[b]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz pro μm^2 (Kurzwurzel / Hartigsches Netz).

[c]: Mittlere Intensität der der ELF-97-Fluoreszenz pro μm^2 phosphataseaktiver Fläche.

[d]: Anteil der phosphataseaktiven Fläche in Prozent.

Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

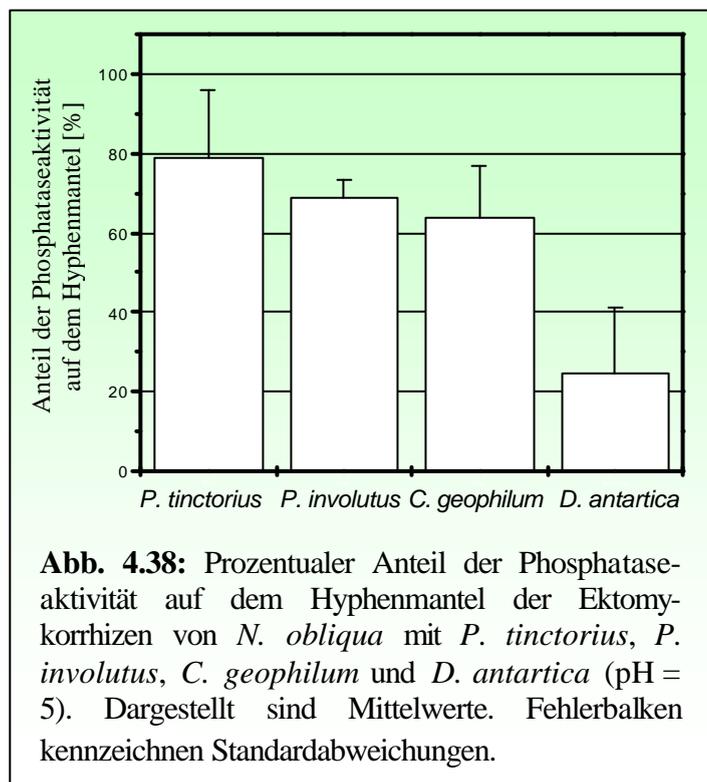
samtfläche. Überraschenderweise ist die Phosphataseaktivität pro Gesamtfläche der unmykorrhizierten Kurzwurzel von *N. obliqua* deutlich größer als die Phosphataseaktivität der Ektomykorrhizen mit *P. involutus*, *C. geophilum* und *D. antartica*. Während die Ektomykorrhiza mit *P. involutus* immerhin noch etwa 50 % des Wertes der unmykorrhizierten Kurzwurzel aufweist, sind es bei *C. geophilum* nur etwa 30 % und bei *D. antartica* bereits weniger als 20 %.

Betrachtet man die Intensität der ELF-97-Fluoreszenz, bezogen auf die Fläche der Kurzwurzel bzw. des Hartigschen Netzes in Abbildung 4.37.b, so können keine Veränderungen bezüglich der Dominanz der *P. tinctorius*-Ektomykorrhiza festgestellt werden. Allerdings ist die Phosphataseaktivität pro Fläche der unmykorrhizierten Kurzwurzelzellen nun nicht mehr höher, sondern eher geringer als jene der *P. involutus*-Ektomykorrhiza. *C. geophilum* und *D. antartica* zeigen in Abbildung 4.37.b hingegen nur geringe Veränderungen bezüglich der unmykorrhizierten Kurzwurzel im Vergleich zu Abbildung 4.37.a.

Ein Vergleich der Abbildungen 4.37.c und 4.37.d macht deutlich, dass die Unterschiede in den Intensitäten der ELF-97-Fluoreszenz bezogen auf die gesamte Ektomykorrhizafläche (Abb. 4.37.a), nur in einem sehr geringen Maße auf Veränderungen der relativen ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bezüglich der Fläche der phosphataseaktiven Zentren (Abb. 4.37.c) zurückzuführen sind. Der Anteil der Fläche der phosphataseaktiven Zentren im Bezug auf die gesamte Mykorrhiza- / Wurzelfläche (Abb. 4.37.d) entspricht hingegen dem Verhalten des Parameters aus Abbildung 4.37.a in eindeutiger Weise.

Die Fläche der phosphataseaktiven Zentren definiert demnach die Phosphataseaktivität der gesamten Ektomykorrhizen und der Kurzwurzeln.

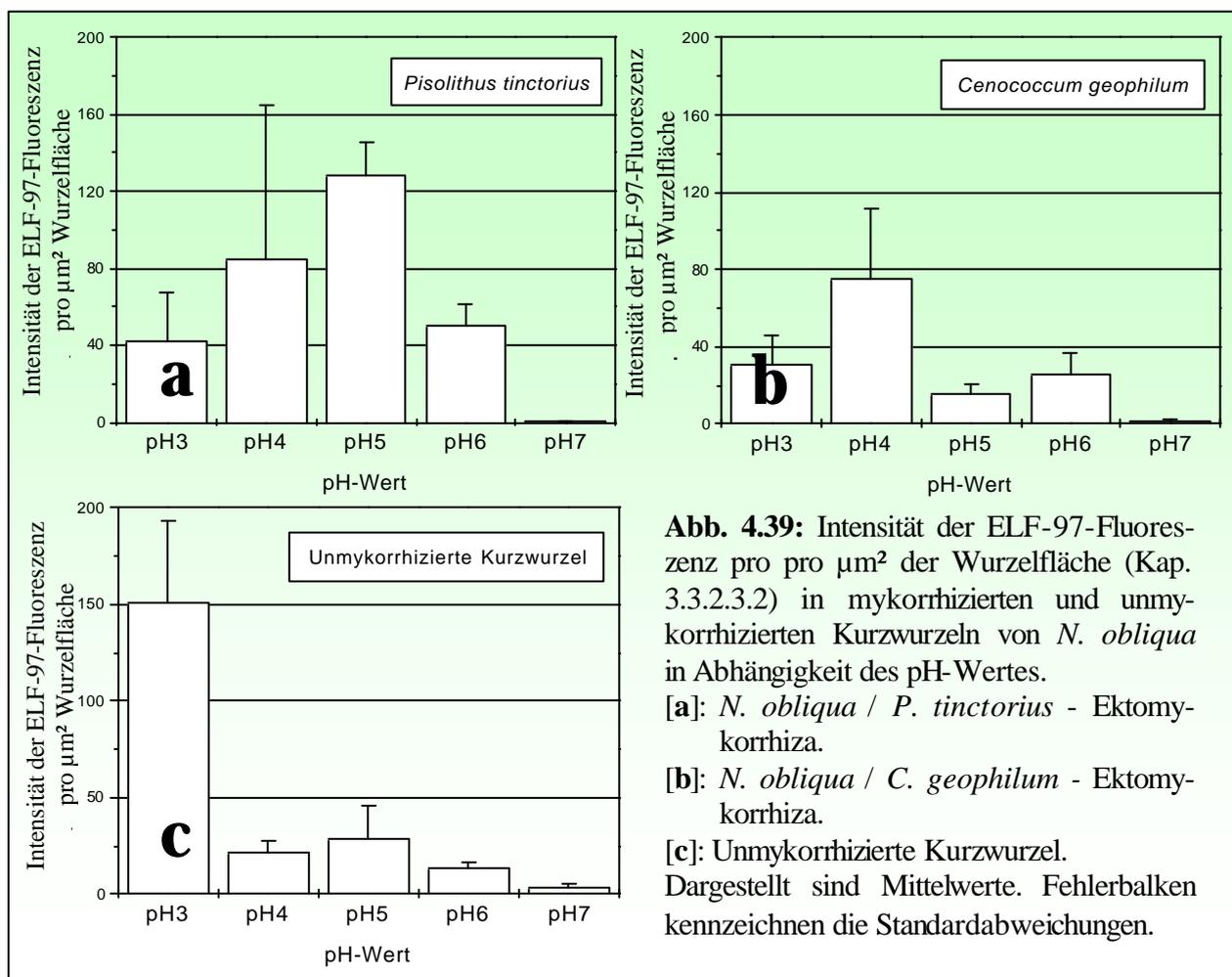
Eine weitere wichtige Information ist in Abbildung 4.38 enthalten. Der prozentuale Anteil der Phosphataseaktivität auf dem Hyphenmantel der *N. obliqua*-Ekto-



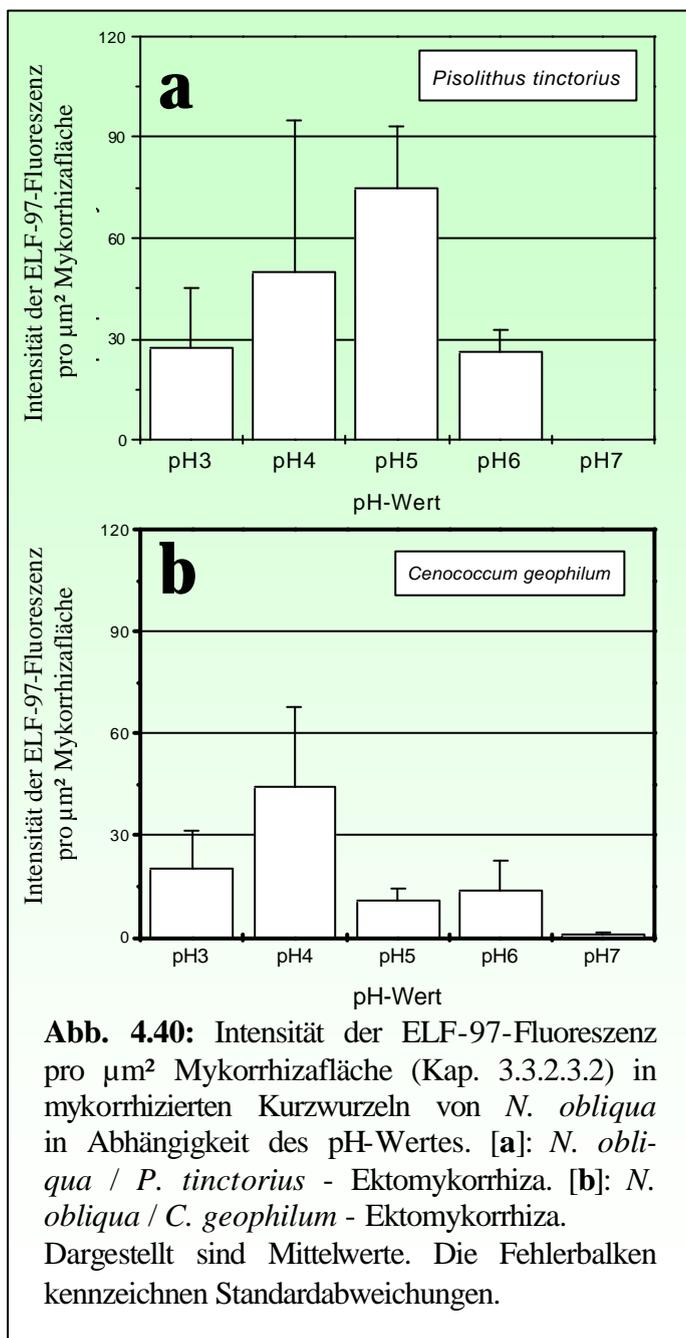
mykorrhizen ist für *P. tinctorius* etwa 80 %, für *P. involutus* etwa 70 % und für *C. geophilum* etwa 63 %. Das bedeutet, dass für diese Ektomykorrhizen eine deutliche Verlagerung der Phosphataseaktivität von den Wurzelzellen auf den Hyphenmantel erfolgt.

Auch für den Fall, dass die resultierende Phosphataseaktivität der mykorrhizierten Wurzel geringer ist als die der unmykorrhizierten Wurzel (*P. involutus* und *C. geophilum*, Abb. 4.37.a), ist die verbleibende Phosphataseaktivität eher auf den Hyphenmantel lokalisiert. Anders ist dies im Fall von *D. antarctica*. Hier findet keine Verlagerung der Phosphataseaktivität von den Wurzelzellen auf den Hyphenmantel statt, denn der Anteil der Phosphataseaktivität auf dem Hyphenmantel beträgt lediglich ca. 25 % der ohnehin geringen, gesamten Phosphataseaktivität der Ektomykorrhiza (vergl. Abb. 4.37.a).

Alle bislang vorgestellten Ergebnisse dieses Kapitels beruhen auf Messungen, die bei pH = 5 durchgeführt wurden. Im Folgenden richtet sich die Aufmerksamkeit auf die Variation des pH-Wertes (pH = 3 bis 7) und der daraus resultierenden Veränderungen in der Phosphataseaktivität.



Schon ein erster Blick auf Abbildung 4.39 und Abbildung 4.40 lässt erkennen, dass der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Phosphataseaktivität der Mykorrhizen von *P. tinctorius* (Abb. 4.39.a / Abb. 4.40.a) und *C. geophilum* (Abb. 4.39.b / Abb. 4.40.b), aber auch der unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* besitzt (Abb. 4.39.c). Die Intensitäten der ELF-97-Fluoreszenz pro μm^2 der Wurzelfläche / Hartigsches Netz (Abb. 4.39) und pro μm^2 der Ektomykorrhizafläche (Abb. 4.40) weisen deutliche Minima und Maxima auf. Am auffälligsten ist das Maximum der ELF-97-Fluoreszenz der unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* bei $\text{pH} = 3$ (Abb. 4.39.c). Sie ist um den Faktor 6 größer als die ELF-97-



Fluoreszenz unter Feldbedingungen ($\text{pH} \approx 5$, vergl. Kap. 4.7.3). Die Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *P. tinctorius* bildet ihr Maximum etwa bei $\text{pH} = 5$ aus (Abb. 4.39.a / Abb. 4.40.a).

Die Ektomykorrhiza von *N. obliqua* und *C. geophilum* zeichnet sich in diesen Messungen durch 2 Maxima aus. Ein deutliches Maximum bei $\text{pH} = 4$ und ein Nebenmaximum bei $\text{pH} = 6$ (Abb. 4.39.b und Abb. 4.40.b).

Bei $\text{pH} = 7$ zeigen alle Ektomykorrhizen und auch die unmykorrhizierte Kurzwurzel praktisch keine ELF-97-Fluoreszenzen.

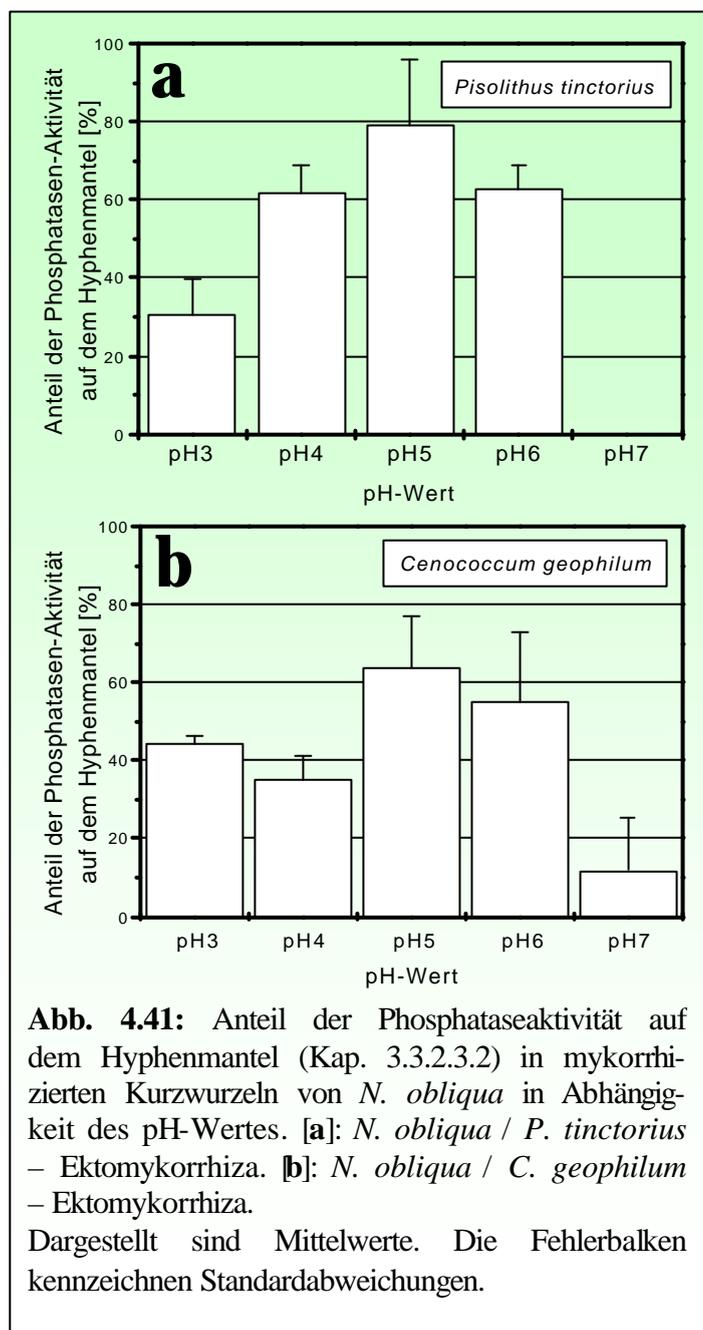
Auch der prozentuale Anteil der Phosphataseaktivität auf dem Hyphenmantel in Ektomykorrhizen zwischen *N. obliqua* und *P. tinctorius* (Abb. 4.41.a) und zwischen *N. obliqua* und *C. geophilum* (Abb. 4.41.b) verändert sich deutlich in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Bei *P. tinctorius* (Abb. 4.41.a) spiegelt die Form der Abhängigkeit in etwa das Verhalten in Abbildung 4.40.a wider. Das bedeutet, dass die Verlagerung der Phosphataseaktivität auf den Hyphenmantel der Ektomykorrhiza mit dem Anstieg der Phosphataseaktivität der gesamten Ektomykorrhiza in Zusammenhang steht.

Etwas anders ist die Situation bei *C. geophilum* (Abb. 4.41.b). Hier scheint keine Korrelation zwischen der Verlagerung der Phosphataseaktivität auf den Hyphenmantel der Ektomykorrhiza und dem Anstieg der Phosphataseaktivität der gesamten Ektomykorrhiza zu bestehen (vergl. Abb. 4.40.b mit Abb. 4.41.b).

Allerdings sind die Variationen innerhalb der Verlagerungen der Phosphataseaktivität zwischen Wurzelfläche / Hartiges Netz und Hyphenmantel auch nicht so ausgeprägt wie bei *P. tinctorius*.

Zum Abschluß diesen Kapitels soll noch ein Blick auf die mittlere Intensität der ELF-97-Fluoreszenz pro μm^2 phosphataseaktiver Fläche erfolgen (Abb. 4.42). *P. tinctorius* (Abb. 4.42.a) verändert seine ELF-97-Fluoreszenzdichte in etwa der gleichen Form, wie es bereits in den Abbildungen 4.39.a, 4.40.a und 4.41.a zu sehen war. Da die Variation der ELF-97-Fluoreszenzdichte in Abbildung 4.42.a nicht den Variationen der übrigen Parameter entspricht, ist es letztendlich eine Kombination von Effekten, die zu den beobachteten Variationen der Phosphataseaktivität in Abhängig-



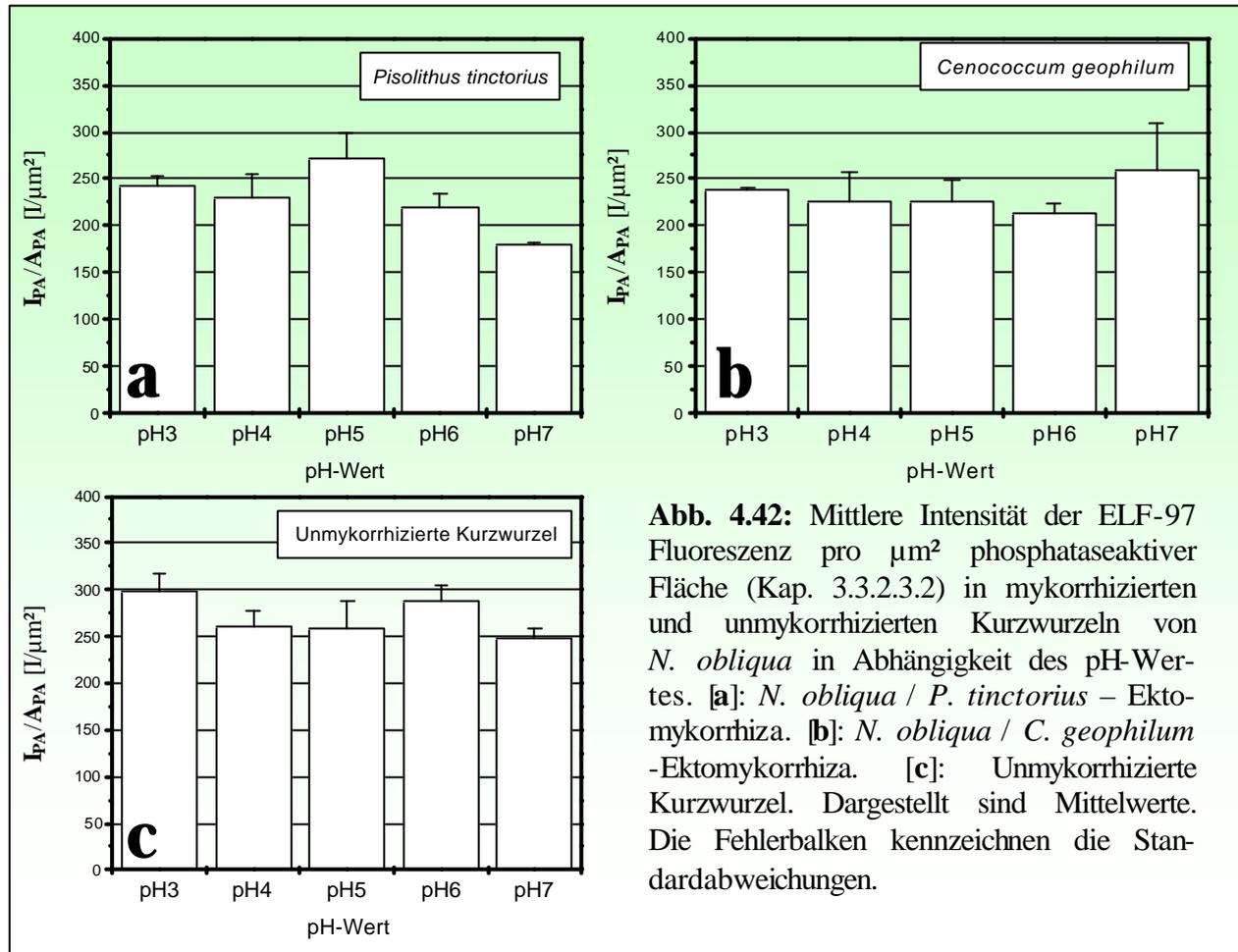


Abb. 4.42: Mittlere Intensität der ELF-97 Fluoreszenz pro μm^2 phosphataseaktiver Fläche (Kap. 3.3.2.3.2) in mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* in Abhängigkeit des pH-Wertes. [a]: *N. obliqua* / *P. tinctorius* – Ektomykorrhiza. [b]: *N. obliqua* / *C. geophilum* -Ektomykorrhiza. [c]: Unmykorrhizierte Kurzwurzel. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen.

keit des pH-Wertes führen. Die Steigerung der Phosphataseaktivität (Abb. 4.39.a) geht demnach mit einer Verlagerung der Phosphataseaktivität auf den Hyphenmantel der Ektomykorrhiza (Abb. 4.41.a), mit einer Intensivierung der phosphataseaktiven Zentren (Abb. 4.42.a) und mit einer Vergrößerung der phosphataseaktiven Fläche einher.

Die Variation der ELF-97-Fluoreszenzdichte von *C. geophilum* und der unmykorrhizierten Kurzwurzel (Abb. 4.42.b und Abb. 4.42.c) fallen im Vergleich zu Abbildung 4.42.a geringer aus. Sie spiegeln auch in keiner Weise das Verhalten in den bislang gezeigten Abbildungen wider. Bei *C. geophilum* und der unmykorrhizierten Kurzwurzel sind demnach die Steigerungen der Phosphataseaktivitäten aus Abbildung 4.39 besonders durch eine Vergrößerung der phosphataseaktiven Zentren und nicht durch eine Steigerung der ELF-97-Fluoreszenzdichte zu begründen.

5. DISKUSSION

5.1 Auswahl der Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua* für weitergehende physiologische Untersuchungen

Basidiomyceten bilden die dominierende Gruppe unter den Ektomykorrhizapartnern von *Nothofagus*, gefolgt von Ascomyceten und Zygomyceten. In den folgenden Unterkapiteln werden die Kriterien für die Auswahl der mit *N. obliqua* Ektomykorrhizen-bildenden Basidiomyceten (*A. boletinoides*, *D. antarctica*, *P. involutus* und *P. tinctorius*) und *Fungi imperfecti* (*C. geophilum*) für die im Weiteren beschriebenen physiologischen Untersuchungen diskutiert.

Dabei wird zunächst auf den festgestellten Artenbestand in den Untersuchungsgebieten eingegangen und der Erfolg der Isolierung und Kultivierung in Reinkultur kommentiert (Kap. 5.1.1). Auch morphologisch-anatomische Kriterien der *N. obliqua*-Ektomykorrhizen werden in diesem Zusammenhang in Kap. 5.1.2 diskutiert. Kapitel 5.1.3 widmet sich schließlich den Ergebnissen der Inokulation von *N. obliqua* mit den ausgewählten Pilzpartnern.

5.1.1 Ektotrophe Mykorrhizapilze: Artenbestand in den Untersuchungsgebieten und Pilzisolierung in Reinkultur

Um mit Hilfe physiologischer Untersuchungen die Bedeutung der Ektomykorrhiza für *Nothofagus*-Wälder besser einschätzen zu können, müssen die am häufigsten verbreiteten Arten zunächst in Kultur überführt werden. Die Mehrheit der Ektomykorrhizen-bildenden Waldpilze ist aber nicht oder nur schwierig auf künstlichen Medien kultivierbar, da sie komplexe Nährstoffansprüche aufweisen (Molina & Palmer 1982). Auch die Isolation des Pilzmyzels von im Freiland gesammelten Mykorrhizen ist häufig kaum möglich.

In diesem Unterkapitel wird insbesondere auf die vom Februar bis Juni 1998 gefundenen Gattungen in den Untersuchungsgebieten mit Beständen von *Nothofago-Perseetum linguae*, *P. radiata* und *E. globulus* eingegangen. Besondere Beachtung finden dabei die erfolgreich isolierten Arten. Weitere Kriterien zur Auswahl der Ektomykorrhizapilze waren ihre Häufigkeit und ihre Spezifität für *Nothofagus*. Da für die Region, in denen die Untersuchungsgebiete lokalisiert sind, die Synökologie von Ektomykorrhizapilzen noch nicht abschließend beschrieben ist (Kap. 2.2.2), wird die Relevanz der gefundenen Exemplare vor dem Hintergrund der bislang verfügbaren Literatur abgeschätzt.

5.1.1.1 Spezifische Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus*

Für Isolierungen und weitergehende physiologische Untersuchungen fiel die Auswahl auf Vertreter der Familien der Bolbitaceae, der Boletaceae sowie der Gymnopaxillaceae. Darüber hinaus wurden im Untersuchungsgebiet Arten der Familie der Amanitaceae, der Cortinariaceae, der Russulaceae und der Tricholomataceae gefunden (s. Tab. 4.2).

Bolbitaceae:

Descolea ist eine typische Gattung aus der Familie der Bolbitaceae, welche auf das ehemalige Gondwana zurückgeht. In Südamerika sind darunter allerdings nur zwei Arten bekannt: *D. antartica* und *D. pallida* (Garrido 1988). Im untersuchten *N. obliqua*-Wald trat *D. antartica* sehr häufig auf. Diese Beobachtung stimmt mit Singer (1969), Horak (1971) und Garrido (1988) überein, die *D. antartica* als typischen Vertreter in *Nothofagus*-Wäldern zitieren. *D. antartica* bildet ebenfalls Ektomykorrhizen mit *N. antartica*, *N. dombeyi*, *N. pumillio* und *N. alpina* (Garrido 1988). *D. antartica* wurde für weitergehende physiologische Untersuchungen aufgrund seiner hohen Adaptationsfähigkeit an verschiedenste geographische, klimatische und edaphische Bedingungen (Palfner 1997) ausgewählt. Die Isolierung und Kultivierung von *D. antartica* in Reinkultur erfolgte wahrscheinlich auch deshalb ohne größere Schwierigkeiten. Die Wachstumsraten waren im Vergleich zu den übrigen gezüchteten Mykorrhizapilzen hoch (Kap. 4.4).

Boletaceae:

Zu den spezifischen Ektomykorrhizapilzen von *Nothofagus* aus der Familie der Boletaceae gehören Vertreter von insgesamt 7 einheimischen Arten der Gattungen *Boletus*. Fruchtkörper der folgenden 5 Arten wurden ausschließlich in *Nothofagus*-Wäldern der Region nahe Valdivias nachgewiesen (Horak 1977): *Boletus chilensis*, *Boletus loyita*, *Boletus loyo*, *Boletus putidus* und *Gastroboletus valdivianus*. Im Untersuchungsgebiet traten lediglich *Boletus chilensis*, *Boletus loyita* und *Boletus loyo* auf (Tab.4.2). *B. chilensis* und *B. loyita* bildeten Ektomykorrhizen mit *N. dombeyi* und *N. obliqua* (Valenzuela 1993), *B. loyo* dagegen mit *N. alpina*, *N. dombeyi*, *N. obliqua*, *N. procera* und *N. glauca* (Garrido 1988, Donoso 1997, Valenzuela *et al.* 1992b). Für weitergehende Experimente wurden *B. chilensis* und *B. loyo* ausgewählt, weil sie die häufigsten Vertreter im Untersuchungsgebiet waren. *B. chilensis* und *B. loyo* konnten erfolgreich isoliert und kultiviert werden. Allerdings war die Isolierung im Falle von *D. antartica* noch schwieriger. Beide Pilze benötigten zunächst eine Adaptationsphase in speziellen Nährmedien (Kap. 4.4). Nach den Adaptationsphasen waren die Wachstumsraten jedoch

ebenfalls hoch. *B. loyo* kommt darüber hinaus noch eine besondere ökonomische Bedeutung zu, da er als Speisepilz über die Wachstumsregion hinaus hohe Beachtung findet.

Gymnopaxillaceae:

Im Untersuchungsgebiet traten aus der Familie der Gymnopaxillaceae zwei Vertreter der Gattung *Austropaxillus* auf (Details der neuen Taxonomie s. Kap. 4.2.1). Garrido beschrieb 1988 *Austropaxillus statuum* und *Austropaxillus boletinoides* als spezifische Ektomykorrhizapartner von *Nothofagus*-Arten in Chile und Argentinien. *A. statuum* ist ein in südamerikanischen *Nothofagus*-Wäldern häufig anzutreffender Pilz. Er stellt mit einiger Wahrscheinlichkeit einen Vertreter der ursprünglichen Flora Gondwanas dar (Spegazzini 1922, Singer 1964, Singer & Moser 1965, Horak 1967, 1979a, 1979b). *A. statuum* bildet zusammen mit fast allen *Nothofagus*-Arten Mykorrhizen (Valenzuela 1993, eigene Beobachtungen), darunter mit *N. pumilio*, *N. antarctica*, *N. dombeyi*, *N. nitida*, *N. glauca* und *N. obliqua*. *A. boletinoides* ist ebenfalls ein sehr häufig anzutreffender Pilz in *Nothofagus*-Wäldern Südamerikas. Fruchtkörper können in Wäldern von *N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida*, *N. obliqua*, *N. pumilio*, *N. glauca* und *N. alpina* beobachtet werden (Singer 1964, Horak 1979a, Garrido 1985).

Aufgrund dieser weitreichenden Verbreitung innerhalb der *Nothofagus*-Arten wurden beide Arten im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Außerdem zeichnen sich Gymnopaxillaceen im Gegensatz zu Boletaceen durch eine erhöhte Resistenz aus. So werden sie auch in Gebieten häufig angetroffen, die intensiver menschlicher Nutzung unterliegen (Garrido 1988). Isolierung und Kultivierung konnten im Falle von *A. boletinoides* letztendlich erfolgreich durchgeführt werden. *A. statuum* benötigte, wie die Boletaceen, zunächst Adaptationsphasen in speziellen Nährmedien (Kap. 4.4). Die Wachstumsraten von *A. statuum* waren nach der Adaptationsphase dann jedoch etwas höher als bei *A. boletinoides*.

Amanitaceae:

Für *Nothofagus* spezifische Ektomykorrhizapilze aus der Familie der Amanitaceae werden von einigen Arten der Gattung *Amanita* vertreten (vergl. Kap. 5.1.1.2). Arten dieser Gattung treten sowohl im Süden Chiles und Argentinien als auch in Neuseeland auf. Die Gattung *Amanita* ist sehr artenarm. In Südamerika sind nur 7 einheimische, für *Nothofagus* spezifische Arten bekannt, darunter *A. austroolivacea*, *A. pseudospreta*, *A. umbrinella*, *A. ushuaiensis*, *A. merxmuelleri*, *A. diemii* und *A. aurantiovelata* (Garrido 1988). *A. diemii* ist die häufigste Art dieser Gattung, die im Untersuchungsgebiet gefunden wurde. Diese Beobachtung stimmt mit den Arbeiten von Valenzuela (1993) überein, welche sich auf die gesamte Region

um Valdivia bezogen. *A. diemii* tritt in *Nothofagus*-Wäldern Chiles und Argentiniens auf, zusammen mit *N. alpina*, *N. antartica*, *N. dombeyi*, *N. glauca* und *N. obliqua*. Hingegen ist *A. aurantiovelata* bislang nur für Chile beschrieben worden, wo er mit *N. dombeyi* und *N. obliqua* auftritt (Garrido & Bresinsky 1985, Valenzuela *et al.* 1992a). Trotz intensiver Versuche, u.a. mit verschiedenen Adaptationsphasen, konnten *A. diemii* und *A. aurantiovelata* letztlich nicht erfolgreich isoliert werden. Es wurden entweder ausbleibendes Wachstum oder aber Kontaminationen festgestellt.

Cortinariaceae:

Arten der Gattung *Cortinarius* aus der Familie der Cortinariaceae gehören zu den am häufigsten auftretenden, für *Nothofagus* spezifischen Ektomykorrhizapilzen. Die häufigsten *Cortinarius*-Arten der *N. obliqua*-Wälder von Quita Calzón bilden *C. albocinctus* und *C. austrosalor*, die in der Zeit der Untersuchung gerade Fruchtkörper bildeten. Beide Arten wurden für *N. obliqua*-Wälder in Chile und Argentinien zitiert (Moser & Horak 1975, Horak 1979a, Lazo 1984). Allerdings fanden Valenzuela & Moreno (1997) in der Region um Valdivia Exemplare von *C. albocinctus* in *N. dombeyi*-Wäldern und Exemplare von *C. austrosalor* in *N. pumillo*-Wäldern. *C. magellanicus* kommt in *Nothofagus*-Wäldern Südamerikas von Mittelchile bis Feuerland sehr häufig vor (Garrido 1988, Horak 1979a). Sie ist die einzige Art der Gattung *Cortinarius*, die sowohl in den *Nothofagus*-Wäldern Australasien als auch in Südamerika auftritt (Horak 1983). Neben den Arten der Gattung *Cortinarius* ist ebenfalls eine Art der Gattung *Inocybe* vertreten. *I. fuscata* wurde für Chile erstmals 1993 von Valenzuela in Wäldern von *N. obliqua*, *N. dombeyi* und *N. pumilio* beschrieben. Vorher war nur bekannt, dass *I. fuscata* in *Nothofagus*-Wäldern Argentiniens anzutreffen war. Leider ist es nicht gelungen, einen Vertreter der *Cortinarius*- oder der *Inocybe*-Arten erfolgreich zu isolieren. Es wurden bei den vielfältigen Versuchen fast immer Kontaminationen festgestellt. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass es sehr schwierig ist, Stücke der wenig kompakten Fruchtkörper dieser Pilze ohne verbleibende Kontaminationen in die Nährmedien zu transferieren.

Russulaceae:

Die Gattung *Russula* ist im Untersuchungsgebiet mit *N. obliqua* lediglich durch eine einheimische Art, *R. fuegiana*, vertreten. *R. fuegiana* wächst zusammen mit *N. pumillio*, *N. antartica*, *N. dombeyi* und *N. betuloides*. Diese Art ist ein typischer Pilz der *Nothofagus*-Wälder der X. Region Chiles und wird von Horak (1979a) auch für *Nothofagus*-Wälder in Argentinien zitiert. Isolierungsversuche von *R. fuegiana* scheiterten am ausbleibenden Wachstum.

Tricholomataceae:

Innerhalb der Familie der Tricholomataceae wurden in *N. obliqua*-Wäldern Vertreter von *Tricholoma fusipes* gefunden. Diese Art ist sehr häufig in der Region um Valdivia und bildet Fruchtkörper in Wäldern von *N. dombeyi*, *N. obliqua*, *N. nitida*, *N. pumilio* und *N. betuloides*. Ihre geographische Verteilung umfasst Chile und Argentinien (Horak 1979a, Garrido 1985, 1988). Isolierungsversuche mit dieser Art scheiterten ebenfalls am ausbleibenden Wachstum.

5.1.1.2 Nicht spezifische Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus* und ihre Assoziationen mit *P. radiata* und *E. globulus*

Im Untersuchungsgebiet von *N. obliqua* wurde jeweils eine Art aus der Familie der Boletaceae (*X. rubellus*), der Paxillaceae (*P. involutus*) und der Tricholomataceae (*L. laccata*) gefunden (s. Tab. 4.2). Das Untersuchungsgebiet mit Pflanzungen von *P. radiata* wies ebenfalls diese drei Arten auf (vergl. Tab. 4.3), während im Untersuchungsgebiet mit Pflanzungen von *E. globulus* lediglich die beiden Arten aus der Familie der Paxillaceae und der Tricholomataceae vorkamen (Kap. 4.2). Darüber hinaus fanden sich unter *P. radiata* Vertreter zweier weiterer Familien, der Amanitaceae und der Russulaceae. Alle unter *P. radiata*-Pflanzungen gefundenen Mykorrhizapilze werden bereits routinemäßig in forstwirtschaftlichen Baumschulen Chiles zur Mykorrhizierung von Setzlingen benutzt (Garrido 1986). Für Isolierung und weitergehende physiologische Untersuchungen wurden Arten der Familie der Boletaceae und der Paxillaceae ausgewählt. Aus der Familie der Sclerodermataceae ist *Pisolithus tinctorius* bereits als etablierte Laborkultur verfügbar (s. Kap. 3.1.3) und wurde ausschließlich als solche verwendet, da er in der Zeit der Untersuchung in keinem der drei untersuchten Gebiete Fruchtkörper ausbildete (s.u.). Aus der Klasse der Ascomyceten wurde *C. geophilum* ausgewählt, nachdem sich seine Präsenz in allen drei Untersuchungsgebieten bestätigte.

Boletaceae:

Zu den nicht spezifischen Ektomykorrhizapilzen von *Nothofagus* aus der Familie der Boletaceae gehört ein Vertreter der Gattung *Boletus* (*B. edulis*, Garrido 1986) sowie ein Vertreter der Gattung *Xerocomus* (*X. rubellus*). Fruchtkörper von *X. rubellus* wurden in den Untersuchungsgebieten von *N. obliqua* und *P. radiata* bevorzugt in Randgebieten der Wälder sowie an Wegrändern gefunden. Die Gattung *Xerocomus* durch *X. rubellus*, *X. chrysenteron* und *X. spadiceus* ist in *P. radiata*-Pflanzungen ganz Chiles anzutreffen (Valenzuela 1993, Valenzuela *et al.* 1998, eigene Beobachtungen, vergl. Tab. 4.3). In Europa bildet *X. rubellus* Fruchtkörper nicht nur in Laub- und Mischwäldern, sondern auch in Park- und Gartenanlagen (Breitenbach & Kränzlin 1991). *X. rubellus* wird außerdem in Wäldern von *N. dombeyi* ange-

troffen. Dies stimmt mit eigenen Beobachtungen überein. Valenzuela *et al.* (1998) haben beobachtet, dass *X. rubellus* in der Lage ist, einheimische Arten zu verdrängen. *X. rubellus* konnte erfolgreich isoliert werden. Allerdings war zunächst spezielles Wurzelhomogenat-Nährmedium erforderlich. *X. rubellus* zeigte nur relativ langsames Wachstum.

Verschiedene Vertreter der Gattungen *Suillus*, darunter *S. granulatus*, *S. grevillei*, *S. tomentosus* und *S. luteus*, wurden in Pflanzungen von *Pinus*-Arten gefunden (Valenzuela 1993). *S. luteus* wuchs darüber hinaus im *P. radiata*-Untersuchungsgebiet. Ausführliche Untersuchungen von *S. luteus* existieren von Garrido (1981a, 1986, 1988), Garrido *et al.* (1983) und Peredo *et al.* (1983). Garrido (1988) führte Laborversuche zur Mykorrhizierung von *N. alpina* / *S. luteus* durch. Er fand unter anderem heraus, dass *S. luteus* in der Lage ist, Sämlinge von *N. alpina* zu töten. Durch diese Beobachtung erklärt er die Abwesenheit von Jungpflanzen von *N. alpina* in solchen Beständen, die sich in der Nähe von *P. radiata*-Pflanzungen befinden und in welchen Fruchtkörper von *S. luteus* anzutreffen sind. Wegen dieser schädlichen Eigenschaften wurde erst gar nicht versucht, *S. luteus* in Kultur zu überführen.

Paxillaceae:

Paxillus involutus ist ein in der Welt weit verbreiteter, nicht spezifischer Mykorrhizapilz, der sowohl mit Koniferen als auch mit Laubbäumen Ektomykorrhizen bildet. Wie *X. rubellus* (s.o.) ist *P. involutus* auch in Park- und Gartenanlagen anzutreffen und wurde bevorzugt an Wegrändern und in Wald-Randgebieten gefunden (Trappe 1962, Molina & Trappe 1982, Duddridge 1987). *P. involutus* ist wahrscheinlich in Verbindung mit eingeführten *P. radiata*-Pflanzungen in Chile angesiedelt worden (Valenzuela 1993, Valenzuela *et al.* 1998). Er kommt an vielen Standorten vor, das sind neben *N. obliqua*, *P. radiata* und *E. globulus* auch *N. dombeyi*, *N. alpina*, *Betula pendula*, *Populus nigra* und *Quercus robur* (Garrido 1988, Godoy & Palfner 1997, eigene Beobachtungen). *P. involutus* ist ein fakultativer Ektomykorrhizapilz (Harley & Smith 1983, Erland & Söderström 1991), welcher bevorzugt in gemäßigten Zonen anzutreffen ist (Hahn 1996). Er wird im Vergleich zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pilzen recht häufig für Experimente in Laboratorien eingesetzt (allein zwischen 1988 und 1997 erschienen mehr als 270 Veröffentlichungen, Wallander & Söderström 1999). Die Isolierung dieses Pilzes konnte auch ohne Komplikationen und ohne Zwischenstufen durchgeführt werden.

Fungi imperfecti:

Innerhalb der Klasse der Ascomyceten ist *Cenococcum geophilum* (s. Kap. 3.1.2.6) ein nicht spezifischer Ektomykorrhizapilz für *Nothofagus* (Garrido 1988). *C. geophilum* stellt die

im Freiland meistverbreitete und am einfachsten zu bestimmende Mykorrhiza dar. Molina & Trappe (1982) geben etwa 200 Pflanzenarten als potentielle Partner dieses Pilzes an. Innerhalb der *Nothofagus*-Arten bildet *C. geophilum* Ektomykorrhizen mit *N. alessandrii*, *N. alpina*, *N. dombeyi*, *N. glauca*, *N. leoni*, *N. obliqua* und *N. pumilio* (Trappe 1962). Bei der Kolonisierung neuer Böden, unter anderem nach Kahlschlag oder nach vulkanischem Ascheregen, gehört *C. geophilum* zu einem der am schnellsten besiedelnden Ektomykorrhizapilze (Trappe 1962). *C. geophilum* konnte ohne große Schwierigkeiten direkt auf MMN-Nährmedium isoliert werden.

Amanitaceae:

Nicht spezifische Ektomykorrhizapilze der Gattung *Amanita* waren im Untersuchungsgebiet von *P. radiata* durch *A. gemmata* und *A. rubescens* vertreten (Tab. 4.3). Beide Arten sind höchstwahrscheinlich nach Chile eingeführt worden. In Chile kommt *A. gemmata* auch unter *E. globulus* vor (Garrido 1986). *A. rubescens* wurde von Valenzuela *et al.* (1998) auch in *Nothofagus*-Wäldern festgestellt, die entweder anthropisch interveniert sind oder sich in der Nähe von *P. radiata*-Pflanzungen befinden. Dabei können diese einheimische Mykorrhizapilze verdrängen, wie z.B. Arten der Gattung *Cortinarius*. Eine Isolierung dieser beiden Arten fand nicht statt, da sie im untersuchten *N. obliqua*-Gebiet nicht angetroffen wurden.

Russulaceae:

Die Ordnung Russulales wird in Südamerika durch 2 Gattungen vertreten: Zum einen die eingeführte Gattung *Lactarius*, zum anderen die Gattung *Russula*, welche neben einheimischen Arten auch Arten wie *R. sardonica* enthält, die mit *Pinus*-Arten nach Chile eingeführt worden sind und unter Pflanzungen von *P. radiata*, *P. pinaster* und *P. contorta* beobachtet wurden (Garrido 1982, 1986). *L. deliciosus* und *R. sardonica* wurden im Untersuchungsgebiet von *P. radiata* angetroffen. Beide Arten kamen auf Flächen mit *N. obliqua* nicht vor und konnten deshalb auch nicht isoliert werden. Innerhalb der *Nothofagus*-Wälder Südamerikas konnte bisher keine *Lactarius*-Art nachgewiesen werden (Garrido 1988).

Tricholomataceae:

Innerhalb der Familie der Tricholomataceae wurden Exemplare von *Laccaria laccata* in *N. obliqua*-, *N. betuloides*- und *N. antartica*-Wäldern sowie in Pflanzungen von *P. radiata* und *E. globulus* gefunden (Valenzuela 1993). In der Region um Valdivia ist diese Art sehr häufig. Garrido sammelte *L. laccata* auch in *P. patula*- und *P. pinaster*-Pflanzungen und führte bei mehreren Gelegenheiten Untersuchungen an etablierten Kulturen durch (1981a, 1981b,

1986). Mit den im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Exemplaren von *L. laccata* konnte wegen ausbleibendem Wachstum keine erfolgreiche Isolierung durchgeführt werden.

Sclerodermataceae:

In der Zeit der Untersuchung wurde in keinem der drei untersuchten Gebiete Fruchtkörper von *Pisolithus tinctorius* beobachtet. HacsKaylo (1971) und Moser (1967) zitieren diese Art jedoch in Verbindung mit *Nothofagus*-Arten. *P. tinctorius* weist eine sehr breite Verteilung auf. Experimentell wurden Mykorrhizierungen mit mehr als 50 Pflanzenarten nachgewiesen (Trappe 1962, Marx 1977, Molina & Trappe 1982). *P. tinctorius* bildet Fruchtkörper in sehr verschiedenen Böden, auch unter sehr schlechten Wachstumsbedingungen (z.B. in stark erodierten Böden). Garrido (1988) schlägt *P. tinctorius* daher für Aufforstungsprogramme in Gebieten mit starker Erosion vor (besonders in Mittelchile). Dies macht den Pilz für weitergehende Untersuchungen besonders interessant. Da diese Pilzart bereits als etablierte Labor-Kultur vorlag, konnte in diesem Fall auch auf eine Isolierung aus Fruchtkörpern anderer Waldgebiete verzichtet werden.

5.1.2 Morphologisch-anatomische Kriterien der *N. obliqua*-Ektomykorrhizen zur Auswahl der Mykobionten für weitergehende physiologische Untersuchungen

Die Auswahl der Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua* für weitergehende physiologische Untersuchungen wurde auch nach morphologisch-anatomischen Kriterien von im Freiland wachsenden Ektomykorrhiza-Assoziationen getroffen. Dabei kam auch der Aspekt möglichst unterschiedlich strukturierter Ektomykorrhiza-Assoziationen zur Geltung. Eindeutige morphologische und anatomische Beschreibungen der Ektomykorrhizen müssen insbesondere in Verbindung mit den Ergebnissen der physiologischen Experimente berücksichtigt werden, da sie als Grundlage und Bezugspunkt für abschließende Gesamtinterpretationen nötig sind.

Unter den ausgewählten spezifischen Mykobionten von *N. obliqua* werden im Folgenden die Ektomykorrhiza-Assoziationen mit *B. loyo*, *D. antarctica* und *A. boletinoides* beschrieben. Da die morphologisch-anatomischen Merkmale innerhalb einer Gattung sehr ähnlich sind, konzentrieren sich die Beschreibungen für *Austropaxillus* und *Boletus* auf je einen Vertreter. Die Beschreibung erfolgt dabei sehr detailliert, da sie nicht nur hinsichtlich der abschließenden anatomisch-physiologischen Diskussion eine wichtige Rolle spielt (Kap. 5.3.2.2-3), sondern darüber hinaus auch eine Aussage darüber getroffen werden soll, ob die morphologisch-anatomischen Merkmale hinreichende Kriterien zur eindeutigen Bestimmung des Pilzpartners zulassen.

Die drei in dieser Arbeit beschriebenen Ektomykorrhiza-Arten zeichneten sich durch regelmäßiges und häufiges Vorkommen in dem Untersuchungsgebiet mit *N. obliqua* aus. Durch viele konstante und charakteristische Merkmale ist jede der beschriebenen Arten eindeutig von anderen *Nothofagus*-Ektomykorrhizen abgrenzbar.

Die Ektomykorrhiza-Assoziationen zwischen *N. obliqua* / *B. loyo* und *A. boletinoides* werden in dieser Arbeit zum ersten Mal morphologisch-anatomisch beschrieben. Dadurch wird die Existenz dieser beiden Ektomykorrhiza-Assoziationen direkt bewiesen und das rudimentäre Wissen über Mykobionten von *Nothofagus*, welches bislang nur 7 veröffentlichte Arten umfasst, erweitert (s. Kap. 2.2.2). Beschreibungen von *D. antartica* existierten in diesem Zusammenhang bislang lediglich mit *N. alpina* (Palfner 1997). Sie werden im Folgenden auf *N. obliqua* als Makrosymbiont erweitert. Morphologisch-anatomische Beschreibungen der unspezifischen Ektomykorrhizen zwischen *Nothofagus* und *P. involutus* / *C. geophilum* existieren bereits (Godoy & Palfner 1997, Flores *et al.* 1997) und müssen daher an dieser Stelle nicht erneut in allen Details erfolgen.

Verzweigungsart:

Die Verzweigungsart einer Ektomykorrhiza ist in Kombination mit Wuchsform und Farbe ein deutliches und leicht bestimmbares Merkmal, um im Freiland zu einem schnellen Überblick zu gelangen. Ektomykorrhizen zwischen *N. obliqua* mit *B. loyo*, *D. antartica* und *A. boletinoides* besitzen monopodiale Verzweigungen (s. Kap. 4.3). Bis auf wenige Ausnahmen werden die Grundtypen von Verzweigungen meist vollständig durch die Wirtsbäume bestimmt (Agerer 1991, 1995). In wenigen Fällen definiert allerdings der Mykosymbiont die Verzweigungsform. Bei der Ektomykorrhiza zwischen *N. obliqua* und *C. geophilum* zeigen sich in diesem Zusammenhang einzelne bis unverzweigte Erscheinungsformen, welche für *Cenococcum*-Arten typisch sind. Palfner & Godoy (1996b) fanden bei der Ektomykorrhiza zwischen *N. pumilio* und *R. fuegiana* die für Russulaceen typische Verzweigungsform monopodial-pyramidal bis monopodial-pinnate. Auch zwischen einzelnen Arten der gleichen Pflanzengattung weisen die Verzweigungsmuster keine oder nur wenige Variationen auf (Zak 1973). Selbst bei verschiedenen Bodentypen und pH-Bedingungen konnten kaum Unterschiede in der Verzweigungsart bei natürlich gewachsenen Mykorrhizen der gleichen Art festgestellt werden (Bergemann 1955, Zak 1973, Gronbach 1988, Berg 1989). Allerdings kann in einigen Fällen das Alter von Mykorrhizen einen Einfluss auf die Verzweigungsform ausüben (Agerer 1995). Ein allgemeines Konzept über die typischen Verzweigungsformen von *Notho-*

fagus-Mykorrhizen lässt sich wegen des unzureichenden veröffentlichten Materials noch nicht ableiten.

Wuchsform:

Die Wuchsform der *N. obliqua* / *B. loyo* Ektomykorrhiza ist sehr stark verzweigt, so dass die Hauptachse kaum sichtbar ist, Hauptachse und Seitenäste sind gerade. Die Ektomykorrhiza von *A. boletinoides* ist ebenfalls sehr stark verzweigt, die Hauptachse und die Seitenäste sind nicht gerade oder gebogen, sondern etwas geschlängelt. Die *N. obliqua* / *D. antartica* Ektomykorrhiza hingegen ist wenig verzweigt und weist eine deutlich sichtbare gerade bis gebogene Hauptachse auf. Die Beobachtung, dass die Verzweigungsart bei den drei angesprochenen Ektomykorrhizen vom gleichen Typ ist (monopodial und von der Wirtspflanze bestimmt, s.o.), die Wuchsform allerdings stark variiert, lässt darauf schließen, dass bei diesem Merkmal der Mykobiont den entscheidenden morphologischen Einfluss ausübt.

Farbe:

Frank (1887), Boullard (1965) und Trappe (1967) sahen die Farbe der Mykorrhiza als sehr variables Merkmal an, welches auch durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Eindrücke unterstützt wird. Zak (1969) und Dominik (1969) dagegen bezeichnen die Farbe als eines der wichtigsten Merkmale und benutzen die Färbung in ihren Bestimmungsschlüsseln gar zur Klassifikation von Mykorrhizen. Die Farbe von *N. obliqua* / *B. loyo* und *A. boletinoides* Ektomykorrhizen ist weißlich, wobei *B. loyo* eine ockergelbliche und *A. boletinoides* eine schmutzig-weiße Farbrichtung zeigten. Bei weißlichen Ektomykorrhizen muss bei der Farbbestimmung insbesondere darauf geachtet werden, dass Lufteinschlüsse des Hyphenmantels erhalten bleiben, da sonst die durchscheinenden, bräunlichen Farben der Zellen der Wurzelrinde die Bestimmung verfälschen können. Auch die Alterung hat einen Einfluss auf den Farbton einer Ektomykorrhiza. Die Farbtöne werden mit zunehmendem Alter dunkler.

Die synthetisierten Ektomykorrhizen von *N. obliqua* / *B. loyo* und *N. obliqua* / *A. boletinoides* zeigten in den Rhizotronen im jungen Stadium weißliche Farben. Sie nahmen aber im Alter Brauntöne an. Die junge, intakte Ektomykorrhiza von *N. obliqua* / *D. antartica* wies in den Rhizotronen einen hell-ockerbräunlichen Farbton auf, wobei im Alter fleckenweise braune Töne entstanden. Die Hyphenmantel- und Hyphenfarbe der synthetisierten *N. obliqua* / *C. geophilum* Ektomykorrhiza wurden mit der Alterung dunkler, was für die Arten, deren Pigmente in den Zellwänden eingelagert sind, bekannt ist. Diese gleiche Beobachtung wurde für *C. geophilum* mit vielen anderen Wirtspflanzen mehrmals beschrieben (u.a. Uhl 1988, Berg 1989, Flores *et al.* 1997, s. Literatur Kap. 3.1.2.6).

Struktur des Hyphenmantels:

In ihrer differenzierten Gestaltung liefert die Struktur des Hyphenmantels sehr gute Kriterien zur Unterscheidung verschiedener Mykorrhiza-Arten. Dies wurde schon früh von Gibelli (1883), Frank (1887) und Chilvers (1968) bemerkt. Reinhard Agerer begann 1986 mit der genaueren Differenzierung der Mantelstruktur, die er in drei Schichten einteilte: Die Manteloberflächenstruktur, tieferliegende Schichten und Mantelinnenflächenstruktur. Agerer (1991, 1995) definiert insgesamt 16 verschiedene Manteltypen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mykorrhizen wiesen alle eine plectenchymatische Mantelstruktur auf. Allerdings konnten bei allen Vertretern eine definierte Anordnung mit besonderen Eigenschaften der Mantelhyphen festgestellt werden.

Die Mantelhyphen der Ektomykorrhiza zwischen *N. obliqua* und *B. loyo* waren geschlängelt und bildeten Ringmuster (schematische Darstellung des Typs A, Abb. 8.1.I). Die Hyphen der *N. obliqua* / *D. antarctica* Ektomykorrhiza bildeten ein Netz mit zahlreichen Zystidien (Typ D) und jene von *N. obliqua* / *A. boletinoides* waren irregulär benetzt, ohne Muster zu bilden (Typ B). Eine Besonderheit dieser Ektomykorrhiza waren die warzenartigen Einlagerungen, die einige Hyphen der Manteloberfläche ausbildeten. Die Ektomykorrhiza mit *C. geophilum* zeigte die für sie typische „G“-Organisation (vergl. Kap. 4.5). Die Mantelschichten sind in ihrer Abfolge und Ausbildung innerhalb einer Art konstant. Allerdings variiert die Anzahl der Schichten innerhalb einer Mykorrhiza-Art sehr stark.

Die Mantelinnenseite war in allen untersuchten Ektomykorrhiza-Arten dichter als deren Außenseite. Die anatomischen Merkmale der Mantelinnenseite waren nicht sehr differenziert ausgeprägt. Die Mantelinnenseite kann aber für ähnliche Ektomykorrhizen in Zusammenhang mit anderen strukturellen Eigenschaften von Bedeutung sein. Die Hyphen der meisten Mykorrhiza-Arten sind mehr oder weniger stark verzweigt und über Anastomosen miteinander verbunden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Ektomykorrhiza-Assotiationen wurden einfache Anastomosen mit oder ohne Septum unterschieden. Es existieren aber auch Anastomosen mit Kontaktschnallen. Agerer (1987) wies darauf hin, dass eine Verbindung der Hyphen über Kontaktschnallen für viele Arten der Gattungen *Dermocybe*, *Cortinarius* und *Hebeloma* charakteristisch zu sein scheint. Die Existenz von Schnallen ist demnach ein wichtiges Merkmal bei der Differenzierung.

Abziehende Hyphen, Rhizomorphen und Zystidien:

Auftreten, Häufigkeit und Form abziehender Hyphen, Rhizomorphen und Zystidien bieten gute Bestimmungsmerkmale für einige Ektomykorrhizen. Abziehende Elemente, die

von der gleichen Pilzgattung oder ihr verwandten Pilzarten gebildet werden, sind sehr ähnlich (Gronbach 1988). So bildete die Mykorrhiza von *B. loyo* keine abziehenden Hyphen, aber zahlreiche runde Rhizomorphen. In Bezug auf die Ektomykorrhiza *Picea abies* / *B. edulis* stellten Agerer & Gronbach (1990) ähnliche Charakteristiken fest. Bei *A. boletinoides* waren die abziehenden Hyphen wenig vertreten, die Rhizomorphen dagegen zahlreich. Die Mykorrhiza von *C. geophilum* hatte einzelne, starr abstehende Hyphen und keine Rhizomorphen. *D. antarctica* zeigte weder abziehende Hyphen noch Rhizomorphen. Hier stellen die Zystidien ein wertvolles Merkmal dar. Bougher & Malajczuk (1985) beschreiben ähnliche Zystidien für die australische Art *Descolea maculata*. Über Sinn und Zweck der Zystidien bei Ektomykorrhizen gibt es keine abschließenden Untersuchungen. Eine Funktion als Konidie, Wasser- und Mineralspeicher oder aber als Giftspeicher zur Abwehr wird vermutet (Palfner 1997). Für die Zystidien der Buchenektkomykorrhiza von *Russula illota* wird eine Schutzfunktion gegen Fraß durch Boden-Kleintiere angenommen (Agerer *et al.* 1986).

Ein weiteres Merkmal ist das Auftreten von Wandauflagerungen bzw. -einlagerungen der abziehenden Hyphen. Bei der Ektomykorrhiza zwischen *N. obliqua* / *A. boletinoides* erschienen oft kristalloide bis warzige Auflagerungen (allerdings nicht nur auf den abziehenden Hyphen, s.o.). Diese Zellwandstrukturen können manchmal im jungen oder im älteren Stadium der Mykorrhiza auftreten (Gronbach 1988). Warzige Auflagerungen waren auch an älteren Hyphen von *C. geophilum* anzutreffen.

Auch die Verzweigungen der abziehenden Hyphen und deren Verbindungen können in der Diagnose von Bedeutung sein. Bei *A. boletinoides* waren die abziehenden Hyphen gabelig verzweigt. Bei *N. obliqua* / *C. geophilum* wurde in dieser Arbeit keine Verzweigung der abziehenden Hyphen beobachtet. Flores *et al.* (1997) fanden eine gabelige Verzweigung für die abziehenden Hyphen der *N. alessandrii* / *C. geophilum*-Ektomykorrhiza.

Intrahyphale Hyphen der abziehenden Hyphen traten bei *A. boletinoides* und *C. geophilum* auf. Nach Buller (1933) wachsen intrahyphale Hyphen bei Verletzung der Hyphenzellen. Chan & Stephen (1967) beobachteten die Bildung von intrahyphalen Hyphen als ein Alterungsphänomen. Lowry & Sussman (1966) und Calonge (1968) erklärten das Wachstum der intrahyphalen Hyphen als eine Möglichkeit für den Pilz, sich zu erneuern. Gronbach (1988) und Berg (1989) attribuierten die Fähigkeit zur Bildung solcher Hyphen als genetisch festgelegt, unabhängig von äußeren Einflüssen.

Bei *A. boletinoides* wurden im Rahmen dieser Arbeit intrahyphale Hyphen in allen Proben in reduzierter Form gefunden. Bei *C. geophilum* wurde die Präsenz dieser Hyphen zusam-

men mit verschiedenen Wirtspflanzen und unterschiedlichen Bodenbedingungen festgestellt (z.B. Agerer & Gronbach 1988, Flores *et al.* 1997).

Die Organisation der Rhizomorphen ist ebenfalls ein wichtiges Beschreibungsmerkmal für Ektomykorrhizen (Abb. 8.1.III). Die *N. obliqua* / *B. loyo*-Ektomykorrhiza zeigte typische, hochdifferenzierte Rhizomorphen aus dichten, parallel verlaufenden Hyphen, welche großlumige zentrale Hyphen einschlossen (Typ F, Agerer 1995). Die beschriebene *N. obliqua* / *A. boletinoides* Ektomykorrhiza bildete auch Rhizomorphen des Typs F. Zusätzlich wurden Rhizomorphen des Typs A gefunden (jüngere Rhizomorphen), die aus Bündelungen parallel verlaufender, gleichgestalteter Hyphen bestanden.

Ein gemeinsames Merkmal der hochdifferenzierten Rhizomorphen beider Ektomykorrhiza-Arten ist die teilweise Auflösung der Quersepten der Zentralhyphen. Treu (1990) vermutet, dass es sich bei diesem Phänomen um ein gemeinsames Merkmal aller Boletales-Mykorrhizen handeln könnte, da Gronbach (1988) an *P. involutus* und *B. edulis* sowie Uhl (1988) an *Suillus collinitus* und Brand (1989) an *Xerocomus chrysenteron* das gleiche Phänomen fanden. Nach Cairney (1990) und Cairney *et al.* (1991) zeigen Rhizomorphen große strukturelle Ähnlichkeiten innerhalb einer Gattung auf und können daher auch als Kriterium zur Taxonomie verwendet werden.

Über die genaue Funktion von Rhizomorphen, insbesondere der hochdifferenzierten, ist noch nicht viel bekannt. Sie können auf höchst unterschiedliche Weise strukturiert sein (Agerer 1991). Von Agerer (1992) werden Rhizomorphen hauptsächlich in ihrer Funktion als Kontaktorgane zwischen Hyphenmantel und Substrat beschrieben. Nach Finlay & Read (1986) und Kammerbauer *et al.* (1989) transportieren Rhizomorphen Wasser und Nährstoffe. Skinner & Bowen (1974) und Brownlee *et al.* (1983) beschreiben die Fähigkeit, Phosphat vom Boden über das symbiotische Interface zur Wurzel zu transportieren.

Längsschnitte:

Die folgenden Beschreibungen von Längsschnitten der mykorrhizierten Kurzwurzeln komplementieren die bislang dargestellten anatomisch-morphologischen Charakteristiken der Ektomykorrhizen. Merkmale, wie Manteldicke, die Gestaltung der Rindenzellen und die Ausprägung des Hartigsches Netzes, welche in Zusammenhang mit Quer- oder Längsschnitten mykorrhizierter Kurzwurzeln abgeleitet werden können, verändern sich im Laufe der ontogenetischen Entwicklung. Aus diesem Grund ist es nötig, mit turgeszentem, fertig ausgebildetem Material zu arbeiten, wenn keine detaillierten ontogenetischen Studien vorliegen.

Die Manteldicke von Ektomykorrhizen ist kein sehr verlässliches Merkmal für systematische Klassifizierungen, da die Variationen bereits innerhalb einer Pilzart sehr groß sein können. Pseudoparenchymatische Mäntel weisen hingegen eher ähnliche Werte auf (Gronbach 1988, Uhl 1988). Die Manteldicke bei der Ektomykorrhiza *N. obliqua* / *B. loyo* betrug 4-15 µm, bei *N. obliqua* / *A. boletinoides* 2-15 µm und bei *N. obliqua* / *D. antartica* 10-25 µm.

In den genannten Ektomykorrhizen waren in den innersten Mantelschichten Wurzelhaubenderivate in Form von dunklen, schmalen, langgezogenen Streifen zu sehen (Abb. 4.10.b, 4.14.b und 4.18.b). Wurzelhaubenderivate bestehen vorwiegend aus pektinartigen Stoffen mit geringem Tanninanteil (Brand & Agerer, 1986). Palfner berichtete im Falle der Ektomykorrhiza von *N. alpina* / *D. antartica* bereits in seiner Veröffentlichung aus dem Jahre 1997 von diesen Strukturen.

Die Anzahl der Rindenzellschichten erwies sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ektomykorrhiza-Assoziationen nicht als ein zur Charakterisierung geeignetes Merkmal. Im allgemeinen waren 1-2, höchstens aber 3 Rindenzellschichten anzutreffen. Diese Beobachtungen widersprechen Berg (1989), der auf eine durch die Pilzarten definierte Vermehrung der Rindenzellen verwies.

Größe und Form der Epidermis- und/oder Rindenzellen können eine Aussage über die beteiligte Baumart machen. Insbesondere radiale, starke Verlängerungen der äußeren Wurzelzellen waren 1950 an Buchenmykorrhizen von Clowes und 1968 an Eucalyptusmykorrhizen von Chilvers beschrieben worden. Uhl (1988) stellte fest, dass die Quotienten von tangentialen und radialen Durchmessern der äußeren Wurzelzellen im Längsschnitt bei Fichten deutlich größer als 1 sind, bei Kiefern um 1 schwanken (kreisförmige Zellen) und bei Laubhölzern deutlich unter 1 liegen. Uhl berichtet allerdings von einigen Ausnahmen. Die in dieser Arbeit untersuchten Mykobionten von *N. obliqua* stimmen jedoch mit dieser Regel überein. Die äußeren Wurzelzellen besaßen Quotienten weit unter 1: Für *B. loyo* [0,5; 0,37], *D. antartica* [0,5; 0,6] und *A. boletinoides* [0,43; 0,3]. Angegeben sind für jeden Mykobionten die minimalen und maximalen Quotienten von tangentialen und radialen Durchmessern der äußeren Epidermiszellen im Längsschnitt. Aussagen über die beteiligte Pilzart lassen sich anhand der Längen-Breiten-Korrelation nicht treffen.

Das Hartigsche Netz war in allen untersuchten Ektomykorrhiza-Assoziationen mit *Nothofagus* paraepidermal (Abb. 4.10, 4.14 und 4.18). Das ist eine besondere Charakteristik von nur wenigen Baumgattungen. *Nothofagus* hat in diesem Zusammenhang eine Gemeinsamkeit mit der Gattung *Alnus* (Godbout & Fortin 1983, Treu 1990). Diese Feststellung basiert auf allen

bislang beschriebenen Ektomykorrhizen von *Nothofagus* (Palfner & Godoy 1996a und 1996b, Godoy & Palfner 1997 sowie den eigenen Beschreibungen in Kapitel 4.3).

Ebenfalls ein Merkmal aller untersuchten Mykorrhiza-Arten mit *Nothofagus* war das Auftreten von Palmetti-Strukturen (s. Abb. 4.10.c). Diese Strukturen vergrößern die Kontaktfläche zwischen beiden Symbiosepartnern, wodurch wahrscheinlich der Stoffaustausch zwischen ihnen erleichtert wird.

Chemische Farbreaktionen:

Auf die Bedeutung chemischer Reaktionen zur Identifizierung von Mykorrhizen wurde bereits mehrfach hingewiesen (Trappe 1967, Zak 1973, Agerer 1986). Allerdings haben sie als taxonomische Hilfen weit weniger Bedeutung bei Ektomykorrhizen als bei Fruchtkörpern. Nur einige wenige Chemikalien sind in diesem Zusammenhang nennenswert (s. Agerer 1991). Vorerst können chemische Farbreaktionen wegen der fehlenden breiten Anwendung nicht generell zur Unterstützung berücksichtigt werden. Sie sollten möglichst bei jeder Ektomykorrhiza-Charakterisierung getestet werden. Im Kontext der nur spärlich existierenden Literatur konnten lediglich übereinstimmende Farbreaktionen der Ektomykorrhiza von *N. obliqua* / *D. antartica* (Kap. 4.3.2) mit denen von *N. alpina* / *D. antartica* (Palfner 1997) festgestellt werden. Die Farbreaktionen von *B. loyo* und *A. boletinoides* sind in Kapitel 4.3 zum ersten Mal überhaupt dokumentiert.

5.1.3 Inokulationsversuche von *N. obliqua* unter besonderer Beachtung der Mykobionten in ihrer Funktion als „early-“, „multi-“ und „late-stage“-fungi

Fast alle in Reinkultur isolierten spezifischen und nicht spezifischen Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus* waren in der Lage, mit *N. obliqua* eine Mykorrhizierung einzugehen (s. Kap. 4.6). *P. involutus* und *P. tinctorius* gingen mit *N. obliqua* bereits zwei bis drei Wochen nach der Inokulation eine Gemeinschaft ein, während zusammen mit *D. antartica* und *C. geophilum* eine Ektomykorrhizabildung nach einen Monat nachgewiesen werden konnte. Im Falle von *A. statuum* erfolgte eine Mykorrhizierung erst nach drei Monaten. Noch länger dauerte es, bis *A. boletinoides*, *X. rubellus* oder *B. loyo* Ektomykorrhizen bildeten. Erstere benötigten sechs, *B. loyo* benötigte sieben Monate. Eine Mykorrhizierung mit *B. chilensis* gelang nicht. Es kam lediglich zu einer dunkelbraunen Verfärbung der Wurzeln sowie zur Ausbildung einer starken Abwehrschicht aus Tannin in den Rindenzellen.

Ein Grund für die verschiedenen Zeiträume der Ektomykorrhizabildung (oder gar deren Ausbleiben) liegt wahrscheinlich darin, dass Bäume im Verlauf ihrer Altersentwicklung un-

terschiedliche Ektomykorrhiza-Partner bevorzugen bzw. benötigen (Mason *et al.* 1987, Termoshuizen 1991). So sind bekanntlich im Sämlings- und frühen Wachstumsstadium teilweise andere Pilztypen für die Bildung von Ektomykorrhizen erforderlich (sog. *early-stage-fungi*) als bei älteren Bäumen (sog. *late-stage-fungi*). Mykobionten, welche in allen Wachstumsphasen Ektomykorrhizen ausbilden können, werden in diesem Zusammenhang auch als *multi-stage-fungi* bezeichnet. Hierbei sollte im Auge behalten werden, dass sich diese Einteilung auf Waldgebiete im ökologischen Gleichgewicht bezieht und dass sog. Pionier-Pilze, die ebenfalls mit jungen Pflanzen Ektomykorrhizen ausbilden, eine weitere Klasse darstellen.

Innerhalb von Pilz-Gattungen können sowohl *early-* als auch *late-stage-fungi* existieren. So werden *Boletus*-Arten von Olivier *et al.* (1997) generell als *late-stage-fungi* beschrieben. Rao *et al.* (1997) hingegen charakterisieren *B. luteus* in Symbiose mit *Pinus kesiya* als früh kolonisierenden Pilz. Aus der Beobachtung, dass eine Ektomykorrhiza zwar zusammen mit einem älteren Baum beobachtet wurde, dann aber das isolierte Pilzmyzel in Kultur mit einem Sämling keine Mykorrhiza ausbildete, wird zum Teil als hinreichendes Kriterium für die Einteilung eines Pilzes als *late-stage-fungi* angesehen (Fox 1986). Jeffries (1999) regen jedoch an, für eine solche Einteilung ebenfalls die Bodenbedingungen der Pflanzungen in Betracht zu ziehen, da diese über die Bildung, bzw. Nichtbildung von Mykorrhizen entscheiden können.

Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass *B. chilensis* als ein *late-stage-fungi* klassifiziert werden kann, da bei bis zu 10 Monaten alten Sämlingen noch keine Ektomykorrhizenbildung nachgewiesen werden konnte (s.o. und Kap. 4.6). Bei *A. boletinoides*, *X. rubellus* und *B. loyo* handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls eher um *late-stage-fungi*. Obwohl zuletzt zwar Mykorrhizenbildungen mit *N. obliqua* beobachtet wurden, fielen diese im quantitativen Vergleich mit *P. involutus*, *P. tinctorius*, *D. antarctica*, *C. geophilum* und *A. statuum* kaum ins Gewicht. Bei *D. antarctica* und *C. geophilum* handelt es sich demzufolge in jedem Fall um *multi-stage-fungi*, da die Ektomykorrhizen mit ausgewachsenen *N. obliqua* in dieser Arbeit beschrieben wurden (s. Kap. 4.3). *P. involutus*, *P. tinctorius* und *A. statuum* können aufgrund ihres Auftretens in *Nothofagus*-Wäldern (Garrido 1988) ebenfalls unter den *multi-stage-fungi* vermutet werden. Es muss jedoch, insbesondere bei den Einteilungen der *late-stage-fungi*, darauf hingewiesen werden, dass keine unterschiedlichen Bodenbedingungen berücksichtigt wurden. Die Sämlinge von *N. obliqua* wurden alle unter den gleichen Bedingungen gezogen (s. Kap. 3.1.3).

In einer zeitlich definierten Verschiebung des Mykobiontenpektrums im Wachstumsverlauf „gesunder“ Exemplare von *N. obliqua* kann auch ein Problem bei großflächigen Anpflan-

zungen von Monokulturen mit Setzlingen gleichen Alters liegen. Das breite Mykobionten-Spektrum eines Waldsystems im ökologischen Gleichgewicht kann unter solchen Bedingungen nicht entstehen. Als Folge dessen können dann Ektomykorrhizen u. U. nicht zu dem Zeitpunkt gebildet werden, wenn sie benötigt werden. Kranabetter (1999) schlägt in diesem Zusammenhang vor, ältere Bäume in Abholzungsgebieten als eine Art Mykobionten-Reservat (*refuge trees*) zu erhalten, da im näheren Einzugsgebiet der Rhizosphäre solcher Reservat-Bäume ein signifikant verbreitetes Ektomykorrhiza-Spektrum in Verbindung mit neu angepflanzten Setzlingen festgestellt wurde. Rao *et al.* hatten bereits 1997 bei *Pinus kesiya* einen zum Alter der Bäume proportionalen "Diversitäts-Index" an Mykobionten festgestellt.

5.2 Bodenbedingungen im Untersuchungsgebiet von Quita Calzón

Wie bereits im vorangehenden Kapitel angedeutet wurde, sind die lokalen Bodenparameter eines der Kriterien, die das gesamte Mykorrhizaspektrum eines Waldgebietes entscheidend beeinflussen können. In der Region um die Untersuchungsgebiete von Quita Calzón weisen die Böden einige Besonderheiten auf, die sie in Hinsicht auf eine Diskussion des Mykorrhizaspektrums und insbesondere in Hinsicht auf die später zu diskutierende Kapazität einiger Mykobionten, schwer zugängliche Phosphatreservoirs für den Pflanzenpartner zu erschließen, besonders interessant machen.

Im Folgenden werden daher zunächst die bestimmten chemischen (Kap. 5.2.1) und physikalischen (Kap. 5.2.2) Bodenparameter diskutiert, bevor abschließend eine integrale Einschätzung der Bodenparameter vorgenommen wird (Kap. 5.2.3).

5.2.1 Die Relevanz chemischer Bodenparameter

Für die Beurteilung der chemischen Bodenparameter sind zunächst einige Überlegungen zur Methodik wichtig. Obwohl die verwendeten Chemikalien zur Bodenanalyse in ihrer Zusammensetzung standardisiert sind, ist dies bei anderen Parametern, die eine wichtige Rolle bei den Messungen spielen, nicht immer der Fall: Dies können die Temperatur der Extraktion, die Form der Gefäße, die Dauer und die Art des Schüttelns, das Verhältnis Boden zu Lösung, der Grad der Feinkörnigkeit des Bodens und noch weitere Größen sein. Aus diesem Grund ist der Vergleich von analytischen Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien nicht immer möglich.

Es wurden daher in der vorliegenden Arbeit Richtwerte benutzt, die alle von dem Labor aufgestellt wurden, in dem auch die Messungen der Bodenproben aus den Untersuchungsgebieten erfolgten. Die Richtwerte der Bodenparameter des Laboratoriums „Laboratorio de

Nutrición y Suelos Forestales“ der *Universidad Austral de Chile* sind in Tabelle 5.1 und 5.2 angegeben und müssen bei der Interpretation der in Tabelle 4.5 aufgeführten Analysenwerte der eigenen Bodenproben berücksichtigt werden.

	pH H ₂ O	pH KCl	C _(total) [%]	N _(total) [%]	C/N	P Olsen [ppm]
Sehr niedrig	< 5,0	< 4,0	< 0,6	< 0,08	< 10	< 3
Niedrig	5,1-5,5	4,1-5,0	0,6-1,5	0,08-0,15	10-20	3-5
Mittel	5,6-6,0	5,1-5,8	1,6-5,0	0,16-0,35	21-30	6-8
Hoch	6,1-7,3	5,9-7,0	5,1-10,0	0,36-0,65	31-40	9-12
Sehr hoch	> 7,3	> 7,0	> 10,0	> 0,65	> 40	> 12

Tab. 5.1: Richtwerte chemischer Bodenparameter für Böden der X. Region Chiles. Fakultät für Forstwissenschaften, „*Universidad Austral de Chile*“.

Für alle Bodenproben aus den 4 Untersuchungsgebieten gilt:

- Wie in Tabelle 4.5 zu sehen ist, sind die mit KCl bestimmten **pH-Werte** (Gesamtacidität) geringer als die mit H₂O bestimmten pH-Werte (die aktuelle Acidität). Dies weist auf einen Überschuss negativ geladener Ionen im Boden hin. Beide pH-Werte können nach Tabelle 5.1 als niedrig eingestuft werden. Niedrige pH-Werte deuten auf verstärkte zersetzende Aktivitäten in Böden hin. Vor allem begünstigen sie stark das Wachstum von Pilzen und weniger das Wachstum von Bakterien (Zunino *et al.* 1982).
- Tab. 4.5 zeigt einen hohen Gehalt an **Gesamtkohlenstoff** (vergl. Tab. 5.1). Dieser kann dadurch erklärt werden, dass durch den hohen Gehalt an Allophan in der Region (s. Kap. 2.3.4.2) Humuspartikel sehr stark adsorbiert werden und stabile Komplexe geformt werden. Je stärker diese sehr oberflächenaktiven Tonminerale vertreten sind, umso humoser sind die betroffenen Böden (Aguilera *et al.* 1997). Auch bei Verwitterung bleiben Humusteilchen an den mit Hilfe von Allophan entstehenden Strengiten und Varsciten haften (Zunino & Borie 1985).
- Der Quotient **C/N** ist ein Indikator für die Kompostierungsrate. Der gemessene Wert von 16 wird nach Tabelle 5.1 als gering eingestuft. Geringere Quotienten sind ein Hinweis auf verstärkte Kompostierung. Die Tatsache, dass der Quotient niedrig ist, obwohl der

	Al	Na	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	B	S	Al
	Ammoniumacetat - DTPA									CaCl ₂	Ca (P O ₄)	KCl
	[ppm]											
Sehr niedrig	< 250	< 50	< 40	< 50	< 30	< 15	< 5	< 1	< 0,1	< 0,2	< 4	<10
Niedrig	250-500	50-120	40-80	50-200	30-60	15-30	5-15	1-2,5	0,1-0,5	0,2-0,5	4-8	10-25
Mittel	501-1000	121-240	81-160	201-500	61-120	31-80	16-30	2,6-6,0	0,6-2,5	0,6-1,0	9-12	26-50
Hoch	1001-2000	241-360	161-300	501-1000	121-240	81-150	31-80	6,1-12	2,6-5,0	1,1-2,0	13-20	51-100
Sehr hoch	> 2000	> 360	>300	>1000	>240	>150	>80	>12	>5,0	> 2,0	> 20	> 100

Tab. 5.2: Richtwerte chemischer Bodenparameter für Böden der X. Region Chiles. Fakultät für Forstwissenschaften, „*Universidad Austral de Chile*“.

Kohlenstoffgehalt hoch ist, deutet noch verstärkt auf eine schnelle Kompostierung hin (Donoso 1997).

- Der **Stickstoffgehalt** ist demzufolge ebenfalls hoch. Die angedeutete große Zersetzungskapazität der Pilze und deren Biomasse im Boden bedingt die Fixierung des Stickstoffs in organischer Form.

Bodenproben der Untersuchungsflächen mit *N. obliqua*, *P. radiata* und *E. globulus*:

- Die gemessenen Werte für **Fe** und **Al** sind relativ hoch (vergl. Tab. 4.5 und Tab. 5.2). Diese hohen Werte der Extraktion von Al und Fe bedeuten günstige Bedingungen für die Bildung und Akkumulation von Allophan. Böden mit mehr als 20 % Aluminium enthalten unter bestimmten Voraussetzungen größere Mengen an Allophan (Grez 1977). Al-Kationen erniedrigen den pH-Wert in Böden, andere Kationen hingegen fördern eher die Alkanität.
- Die Menge an verfügbarem **Phosphat** ist auffallend gering (vergl. Tab. 4.5 und Tab. 5.1). Der Grund dafür ist, dass allophanhaltige Bodenpartikel aufgrund ihrer besonderen Oberflächenstruktur zunächst schnell große Mengen an Phosphat adsorbieren. In nachfolgenden, langsamen Prozessen werden dann schwer lösliche Aluminium-Phosphat-Komplexe abgegeben. Auf diese Weise entstehen ständig neue reaktionsaktive Oberflächen, die eine fortlaufende P-Reduktion zur Folge haben (vergl. Kap. 2.3.4.2 und Parfitt 1989). Bei hohen Bodenkonzentrationen an organischem Material, Fe und Al findet dieser Prozess

noch verstärkt statt (Borie & Zunino 1983). Auch die festgestellten sauren Bodenbedingungen beschleunigen diesen Prozess, da die an der Reaktion beteiligten Fe- und Al-Moleküle bei niedrigen pH-Werten vermehrt zur Verfügung stehen (Donoso 1997).

- Die gemessenen **Schwefel**-Werte sind hoch, obwohl die Disponibilität von S eher durch alkalische pH-Werte gefördert wird. Hier wird der vulkanische Einfluss bemerkbar, als dessen Konsequenz betroffene Böden hohe Schwefelkonzentrationen aufweisen.
- Die Konzentrationen der Bodenkomponenten **Cu**, **Zn** und **B** entsprechen mittleren Werten (vergl. Tab. 4.5 und Tab. 5.2).
- Die Konzentrationen der Kationen folgen einem zu erwartenden Verlauf: **Ca** > **Mg** > **K** > **Na** > **Mn**. Die Werte von Na, K, Ca, Mg und Mn scheinen in den Untersuchungsgebieten zunächst auffällig niedrig. In Gebieten mit hohem Niederschlag und eher niedrigem pH sind allerdings auch geringe Konzentrationen zu erwarten. Hohe Niederschläge machen sich vor allem durch Basenauswaschung im Bodenhorizont Aeh bemerkbar (vergl. Kap. 4.7.1, Abb. 4.20). In Gebieten, in denen aufgrund klimatischer Bedingungen tiefere Temperaturen herrschen, kommt es in diesem Zusammenhang auch zu Podsolierungen (Donoso 1997).

Die Bodenbestandteile Fe und Mn sind im Bodenhorizont B für den beobachteten rotbraunen Aspekt verantwortlich. Wegen der guten Drainageeigenschaften werden diese Metalle verstärkt oxidiert (vergl. Kap. 4.7.1). Im Bodenhorizont B befinden sich akkumulierte Salze, Tonminerale und weitere Stoffe, die aus Auswaschungen höherer Bodenschichten stammen.

Die Bodenparameter der *Pinus*- und *Eucalyptus*-Anpflanzungen weisen zum Teil signifikante Abweichungen definierter Bodenparameter im Vergleich zu dem mit *Nothofagus* bewachsenen Gelände auf. Teilweise liegen diese höher (z.B. Ca oder K, s. Tab. 4.5), teilweise niedriger (z.B. Na oder Fe) als in dem ursprünglichen Waldgebiet. Der Grund dafür sind individuelle Düngungsmaßnahmen der Waldbesitzer, die keine allgemeine Düngungsstrategie erkennen lassen.

Bodenproben aus der Untersuchungsfläche des Weidelandes:

Die X. Region Chiles unterliegt ausgeprägter Nutzung durch Weidewirtschaft. Aus ihr stammen 67 % der Milchproduktion des Landes und 34 % der gesamten Fleischproduktion. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten hohen Konzentrationen der Nährelemente (mit Ausnahme von Na, vergl. Tab. 4.5 und Tab. 5.1-2) ergeben sich als Konsequenz der Anwen-

dung basenreicher Phosphatdünger. Durch übertriebene Düngung der Nutzflächen kommt es teilweise zu eutrophischen Zuständen der lokalen Gewässer (Oyarzún *et al.* 1997).

Allerdings kann der durch Allophanadsorption abgesenkte natürliche P-Gehalt dieser Böden nur mittels häufiger und reichlicher Ergänzungsdüngung überwunden werden. Eine völlige Absättigung der P-Fixierungskapazität kann aber nicht erreicht werden, da in den sehr verwitterungsaktiven Böden laufend neue adsorptionsfähige Elemente entstehen (s. Kap. 2.3.4.2). Für eine landwirtschaftliche Nutzung sind diese Böden nicht geeignet; die geringe P-Verfügbarkeit beeinträchtigt nicht nur die Ertragsmengen, sondern auch die Qualität der pflanzlichen Produkte. Für die Weidenutzung sind diese Böden sehr wohl geeignet, da Weidepflanzen gewöhnlich ein gutes Aufschließungsvermögen für schwerlösliche Phosphate besitzen. Die P-Gehalte des Weidefutters sind eher niedrig, aber gelten für die Versorgung der Tiere als ausreichend (Weinberger 1971).

5.2.2 Die Relevanz physikalischer Bodenparameter

Die Ergebnisse der chemischen Extraktionsanalysen aus Kapitel 5.2.1 bieten einen ersten Hinweis auf den allgemeinen Verwitterungs- oder Entwicklungszustand der untersuchten Böden. Die geringen Werte für Na, Ca und Mg sowie die überdurchschnittlich hohen Extraktionsraten für Fe und Al zusammen mit den gemessenen pH-Werten (4,5-5,7) deuten bereits auf einen Boden im mittleren Verwitterungszustand hin (Grez 1977). Der Boden des Untersuchungsgebietes besteht aus feinkörniger Asche, deren Korngrößenfraktionierung sich überwiegend aus Schluff, einem ebenfalls hohen Anteil an Ton und einem geringeren Anteil an Sand zusammensetzt (s. Tab. 4.4). Auch diese Korngrößenfraktionierung weist auf einen bereits recht intensiv verwitterten Boden hin. Die Bodenverwitterung nimmt erwartungsgemäß mit der Tiefe zu. Die Böden sind in den oberen 23-30 cm reicher an Schluff als in den tieferen Zonen. In den unteren 22-50 cm besitzen sie einen höheren Gehalt an Ton. Die Böden sind insgesamt arm an Grobsand (*N. obliqua*-Wald 23 %, s. Tab. 4.4).

Lagerungsdichte:

Eine direkte Konsequenz hat die Bodenverwitterung auf die Lagerungsdichte der Böden. Lagerungsdichten von Waldböden liegen allgemein zwischen 0,6 und 1,9 g/cm³. In Bodenhorizonten mit hohen Anteilen an organischem Material können sie aber auch bis zu 0,2 g/cm³ betragen. In den Untersuchungsgebieten bewegten sich die gemessenen Werte zwischen 0,95 und 1,19 g/cm³ in einer Tiefe von bis zu 30 cm (Tab. 4.4). Von Donoso (1997) werden für chilenische Waldböden Werte um 0,9 g/cm³ angegeben. Lagerungsdichten nehmen gemeinhin mit der Tiefe zu. Die gemessenen Werte in einer Tiefe von ca. 22-50 cm liegen zwischen 1,15

und $1,57 \text{ g/cm}^3$. Die Lagerungsdichte ist ein guter Indikator für viele wichtige Bodencharakteristiken, wie z.B. die Porosität, die Belüftung und die Fähigkeit zur Infiltration. Die gemessenen Werte lassen auf gute Belüftungseigenschaften und gutes Wasseraufnahmevermögen schließen.

Porenvolumen:

Das Porenvolumen von Waldböden schwankt allgemein zwischen 30 und 65 %, wobei Böden mit feinen und mittleren Körnungen poröser sind als Böden mit grober Körnung. Das Porenvolumen in den ersten Bodenschichten der Untersuchungsgebiete (0-30 cm) variiert zwischen 47 und 50 % (s. Tab. 4.4), wobei das Untersuchungsgebiet mit *N. obliqua* die höchste Porosität aufweist. Die Abnahme der Porosität in den Pflanzungen mit *P. radiata* und *E. globulus* kommt wahrscheinlich durch anthropogene Einflüsse und geringerem Eintrag an organischem Material zustande. Die Porosität von über 50 % der Weidefläche lässt sich durch die in diesen Flächen eingebrachte Düngung erklären (hoher organischer Anteil, s. Tab. 4.5). Dieser Faktor scheint stärker zu sein als der durch die Belastungen mit Huftieren induzierte gegenseitige Effekt. Allgemein nehmen Porositäten von etwa 25 cm an mit steigender Tiefe ab.

Wasserkapazität:

Wasserkapazitäten von Waldböden schwanken zwischen 5 und 40 %. Die untersuchten Böden zeigen in ihrem Verwitterungszustand einen sehr ausgeglichenen Wasserhaushalt (vergl. Kap. 4.7.2). Faktoren, welche die Wasserkapazität beeinflussen, sind die Körnung, die Gefügeform, der Anteil an organischem Material und der Grundwasserspiegel. Die Wasserkapazität ist in Böden mit grober Körnung allgemein niedrig. Eintrag an organischem Material hingegen steigert die Wasserkapazität.

5.2.3 Abschließende Diskussion der Bodenparameter

Aufgrund der vorgenommenen chemisch-physikalischen Untersuchungen der Bodenbedingungen in den Untersuchungsgebieten lassen sich die Böden als Andosole mittlerer bis älterer Entwicklungsstufe klassifizieren (vergl. Kap. 2.3.4.1).

Andosole mittlerer Entwicklungsstufe zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Gesamtkohlenstoff aus (vergl. Tab. 4.5 mit Tab. 5.1), welcher jedoch geringer ist als bei jungen Andosolen (12-16 % C). In ihnen ist im Allgemeinen eine hohe biologische Aktivität vorhanden (Veit & Garleff 1997), welche mit dem bestimmten, niedrigen C/N-Quotienten (hohe Kompostierungsraten, s. Kap. 5.2.1) übereinstimmt. Auch die bestimmten pH-Werte (Tab.

4.5) deuten auf diesen Bodentyp hin. Sie werden zwischen 4,5 und 5,8 angegeben (Mella & Kühne 1985, Sadzawka & Carrasco 1985).

Des Weiteren zeichnen sich Andosole mittlerer Entwicklungsstufe durch die festgestellten geringen Dichten, hohe Porositäten, hohe Wasserkapazitäten, einen hohen Anteil an Schluff und einen Ton-Anteil von bis zu 40 % aus (Armesto *et al.* 1997). Die Tonfraktionen von Andosolen mittleren Alters enthalten charakteristische Minerale, deren Hauptkomponenten aus Allophan und Imogolit bestehen (s. Kap. 2.3.4.2). Die Anteile der Minerale hängen vom Alter und der Entwicklungsstufe der entsprechenden Böden ab. Allophane zeichnen sich durch sehr spezielle physikalisch-chemische Eigenschaften aus. Besonders hervorzuheben ist die hohe Kationen-Austauschkapazität, die geringe Basensättigung und eine erhöhte Fähigkeit zur P-Fixierung.

Andosole mit längeren Entwicklungszeiten weisen einen höheren Verwitterungsgrad, einen hohen Anteil an Ton (bis zu 80 %) und damit eine höhere Dichte auf. Der Anteil an organischem Material ist in ihnen relativ gering und die Kationen-Austauschkapazität nimmt ab (Veit & Garleff 1997).

Die festgestellten, allgemein günstigen physikalischen Eigenschaften der Böden in den Untersuchungsgebieten (s. Kap. 5.2.2) und eine lange klimatische Vegetationsperiode sind positive Grundvoraussetzungen für überdurchschnittliche Zuwachsraten. Die Daten aus den Bodenuntersuchungen weisen zwei besonders ausgeprägte Merkmale auf. Die Werte von Phosphor und Natrium liegen in allen Waldgebieten in sehr geringen Konzentrationen vor. Natriummangel spielt in der Natur keine Rolle. Der Mangel an Phosphat ist allerdings oft ein stark limitierender Faktor beim Wachstum von Pflanzen. Die Verfügbarkeit wird wahrscheinlich entscheidend durch den Allophangehalt in der Tonfraktion herabgesetzt (s. Kap. 2.3.4.2). Wie schnell und effizient Allophan in der Lage ist, Phosphate aus Lösungen zu fixieren, zeigen auch die durchgeführten Experimente zur pH-Wert-abhängigen P-Adsorption (Kap. 4.7.4, Abb. 4.21). Bereits nach 2 h waren ca. 50 % des in Lösung befindlichen P-Anteils durch Allophan gebunden worden.

Die in den folgenden Kapiteln diskutierten physiologischen Untersuchungen mit den in Kapitel 5.1 beschriebenen isolierten Ektomykorrhizapartnern von *N. obliqua* konzentrieren sich daher auf die Fähigkeit dieser Mykorrhizapilze und mit ihnen mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln, einen besonderen Beitrag zur Phosphatversorgung von *N. obliqua* zu leisten.

Es ergeben sich aus den vorliegenden Bodenuntersuchungen allerdings auch noch andere wichtige Aspekte (z.B. die niedrige Basensättigung und die Al-Toxizität), die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter verfolgt, bzw. diskutiert werden können. Ebenso wenig ist eine genaue quantitative Berechnung und eine weitergehende Interpretation der spezifischen Dynamik in den untersuchten Böden mit den hier vorliegenden Informationen möglich. Um sie zu erreichen, müssten die Ablagerungsmechanismen, die Durchmischung des Materials aus neuen Eruptionen, die Mineralogie und Körngrößenverteilung der einzelnen Bodenfaktionen eingehender untersucht werden.

5.3 Bestimmung der Phosphataseaktivität

Bevor in Kapitel 5.4 die Bedeutung der untersuchten Mykorrhiza-Arten für Waldgebiete von *Nothofago-Perseetum linguae* abschließend diskutiert wird, erfolgt im vorliegenden Kapitel zunächst die Bewertung der durchgeführten Messungen zur Bestimmung der Phosphataseaktivität. Diese beziehen sich in Kapitel 5.3.1 zunächst auf die spektrometrisch analysierten extrazellulären und oberflächengebundenen Fraktionen der untersuchten Pilzhyphen mit Hilfe von pNPP. Besondere Aufmerksamkeit wird allerdings dem neuentwickelten fluoreszenzmikroskopischen Ansatz zur Quantifizierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von Pilzhyphen sowie der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* mit Hilfe von ELF-97 in Kap. 5.3.2 gewidmet sein.

5.3.1 Spektrometrische Bestimmung der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes und des Phosphatangebotes

Spektrometrische Bestimmungen der extrazellulären und der oberflächengebundenen Fraktionen der Phosphataseaktivität mit Hilfe des P-Substrates pNPP stellen die bislang etablierteste Methode dar, um zu einer Einschätzung der Bedeutung von Mykorrhizen bei der Erschließung verschiedener Phosphatquellen in Böden zu gelangen (Kap. 2.4.1-3). Durch die Vielzahl der Messungen, die bis heute mit dieser vor gut 30 Jahren entwickelten Methode durchgeführt worden sind, konnten bereits differenzierte Kenntnisse über die Aktivitäten von Phosphat-spaltenden Enzymen gewonnen werden. Von einer abschließenden Bewertung des Systems Mykorrhiza für die Phosphatversorgung unter verschiedenen biotischen und abiotischen Bodenbedingungen ist man jedoch nach wie vor recht weit entfernt. Siehe hierzu insbesondere die kürzlich erschienene Publikation von Joner & Johansen (2000), in der u.a. eine Bilanz aus ca. 50 Veröffentlichungen der letzten 25 Jahren gezogen wird.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse lassen auf ein recht anpassungsfähiges enzymatisches System schließen. Aktivitäten der unterschiedlichen Pilz-Phosphatasen können in Abhängigkeit des pH-Wertes Maxima und Nebenmaxima aufweisen (Barett & Lewis 1973, Antibus *et al.* 1986). Die Ausprägung und die absolute Größe dieser Maxima sind außerdem von weiteren externen Faktoren, wie dem Angebot an verfügbarem Phosphat während der Wachstumsphasen der isolierten Mykorrhizapilze und von der Messtemperatur abhängig (Antibus *et al.* 1986, 1992, Joner & Johansen 2000). Es ist daher nicht verwunderlich, dass das Spektrum identifizierter P-aktiver Enzyme auch innerhalb einer Pilzart stark vom Fundort und vom betrachteten Makrobionten abhängt (Ho 1989). Will man demnach eine Aussage über die Relevanz einer Pilzart für eine bestimmte Region unter der Berücksichtigung eines bestimmten Makrobionten machen, so sind Experimente mit an diesem Standort gewonnenen Pilz-Isolaten unabdinglich. Erkenntnisse, die aus anderen Gebieten stammen, können in diesem Zusammenhang nicht direkt extrapoliert werden.

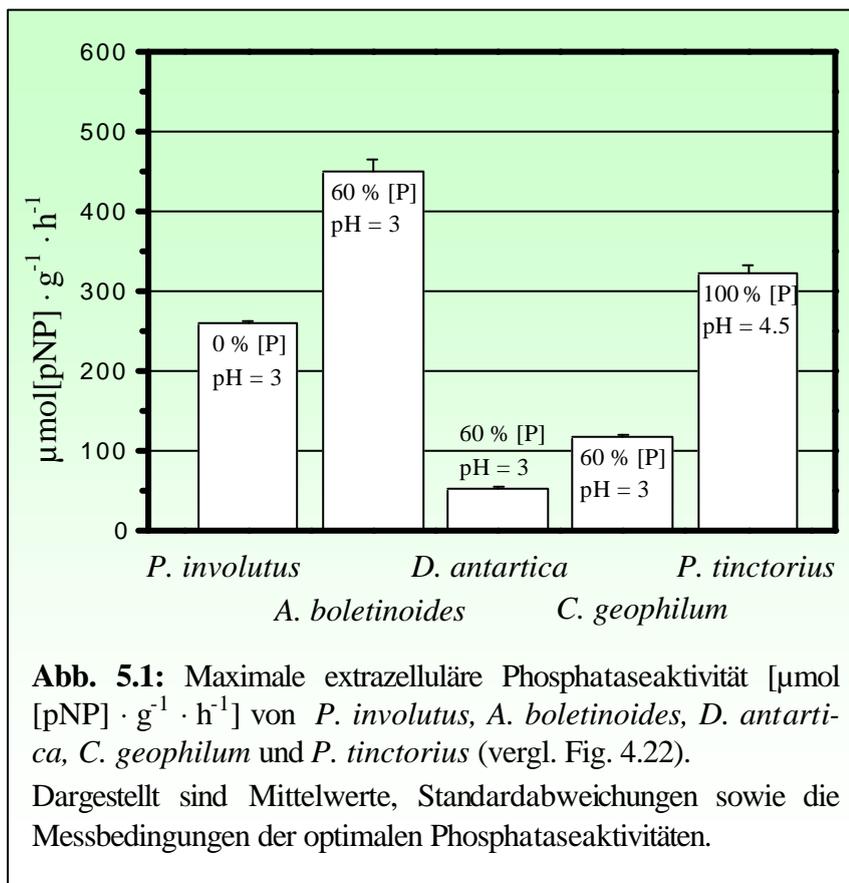
5.3.1.1 Extrazelluläre Phosphataseaktivität

Die absorptionsspektrometrisch bestimmten Aktivitäten der extrazellulären Phosphatasen der aus dem Untersuchungsgebiet stammenden isolierten Mykorrhizapilze *A. boletinoides*, *P. involutus*, *D. antartica* und *C. geophilum* zeigen in Abhängigkeit steigender pH-Werte generell sinkende Phosphataseaktivitäten (PA). Eine Ausnahme bildet *P. tinctorius*, welcher sich, zumindest bei höheren Phosphatkonzentrationen der Wachstumsmedien durch pH-Optima bei pH = 4,5-5 auszeichnet (s. Abb. 4. 22.e und 4.24.e). Hier ist hervorzuheben, dass *P. tinctorius* als einziger untersuchter Mykorrhizapilz nicht aus dem Untersuchungsgebiet, sondern aus einem in vielen Laboren etablierten Isolat stammt (s. Kap. 3.1.3). Nach Casida (1959) sind hohe extrazelluläre PA bei niedrigen pH-Werten besonders häufig bei saprophytischen Bodenpilzen anzutreffen. Ein pH-Optimum bei pH = 4,5-5 zeichnet nach Antibus *et al.* (1986, 1992) acht Ektomykorrhizapilze aus (in Nordamerika isoliert), unter ihnen auch *P. involutus*.

In Abhängigkeit des Phosphatangebotes der Nährmedien zeigen die extrazellulären PA von *A. boletinoides*, *P. tinctorius*, *D. antartica* und *C. geophilum* generell recht heterogene Verläufe (s. Abb. 4.22 und 4.24). Einzig bei *P. involutus* ist eine stetige Zunahme der PA mit sinkendem Phosphatangebot bei praktisch allen pH-Werten zu erkennen. Eine mit sinkendem Phosphatangebot wachsende PA ist 1980 von Calleja *et al.* in vier Ektomykorrhizapilzen nachgewiesen worden. Auch Tibbett *et al.* (1998) berichten von diesem Verhalten bei dem Basidiomyceten *Hebeloma polare*. Auf der anderen Seite widersprechen diesem Verhalten Straker & Mitchell (1986), die in Endomykorrhizapilzen gerade den gegenteiligen Effekt be-

obachteten. Auch McElhinney & Mitchell (1993) finden ein Gegenargument für die häufig zu lesende These, Pilze reagierten mit einer erhöhten extrazellulären Phosphataseproduktion auf Mangelbedingungen dieses Nährelementes und führen an, dass eine erhöhte extrazelluläre Phosphataseproduktion und damit Phosphatverfügbarkeit ja auch konkurrierenden Mikroorganismen zugute käme und es daher eher „sinnvoller“ wäre, die an die Pilzhyphen gebundene PA zu verstärken (vergl. Kap. 5.3.2.2). Es bedarf an dieser Stelle demnach noch eines größeren experimentellen Fundus, um zu einer wirklichkeitsnahen Einschätzung zu gelangen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen einfachen Interpretationsansatz an dieser Stelle nicht zu.

Die maximale extrazelluläre Phosphataseaktivität der untersuchten Mykorrhizapilze ist zur besseren Übersicht noch einmal in Abbildung 5.1 zusammengefasst. Ebenfalls enthalten sind Angaben zu den Mess- (pH) bzw. Kulturbedingungen (Phosphatangebot im Nährmedium in Prozent), unter denen diese Maxima zustande kamen. Die Maxima an freigesetztem pNP [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] schwanken insgesamt zwischen 50 μmol (*D. antartica*) und 450 μmol (*A. boletinoides*). Tibbett *et al.* (1998) haben in diesem Zusammenhang bei *H. polare* extrazelluläre PA



zwischen 93 und 1785 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gemessen. Ho & Zak (1979) geben bei 6 untersuchten Isolaten Werte zwischen 16 und 578 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. Jøner & Johansen (2000) referenzieren extrazelluläre PA zwischen 90 und 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Allerdings bezogen sich die Messungen von Jøner & Johansen (2000) auf

die von VA-Mykorrhizapilzen innerhalb 1 h abgegebenen Phosphatasen und nicht (wie in dieser Arbeit, jener von Ho & Zak (1979) oder von Tibbett *et al.* (1998)) auf Messungen der PA

in den Wachstumsmedien der Pilze. Ob nach 1 h Inkubationszeit bereits von einer Sättigung der extrazellulären Phosphatasekonzentration ausgegangen werden kann, ist natürlich primär vom verwendeten Inkubationsvolumen abhängig, welches Joner & Johansen (2000) leider versäumen anzugeben.

In den in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsmedien ist nach 14 Tagen von einem stationären Gleichgewicht bezüglich der extrazellulären Phosphatasekonzentration auszugehen. Von Straker & Mitchell (1986) liegen in diesem Zusammenhang Untersuchungen vor, in denen sie in 4 isolierten Mykorrhizapilzen die Kinetik verschiedener P-aktiver Enzymfraktionen in Abhängigkeit der Wachstumsdauer in Flüssigmedien bestimmten. Nach einer „Adaptationsphase“ von ca. 7 Tagen steigen die PA an, erreichen nach etwa 14 Tagen ihre maximalen Aktivitäten und fallen dann mehrheitlich wieder ab (lediglich bei einem Isolat steigt die extrazelluläre PA bis nach 20 Tagen an, bevor auch sie zurückgeht).

Als vorläufiges Resultat der Bestimmungen der extrazellulären Phosphatasen bleibt folgendes festzuhalten (vergl. Abb. 5.1):

- 1. Die extrazellulären Phosphataseaktivitäten der untersuchten Mykorrhizapilze liegen in einem mit Werten aus der Literatur vergleichbaren Aktivitätsbereich. Die maximalen Aktivitäten befinden sich allesamt im sauren Milieu.**
 - Sie variieren zwischen den verschiedenen Pilzarten um eine Größenordnung.
 - Sie variieren in Abhängigkeit der pH-Werte ebenfalls um eine Größenordnung.
 - Sie variieren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes bis zu einem Faktor 5.
- 2. In Abhängigkeit des Phosphatangebotes der Nährmedien zeigt lediglich *P. involutus* eine stetige Zunahme der extrazellulären PA mit sinkendem Phosphatangebot.**
- 3. Mit steigenden pH-Werten zeigen mit Ausnahme von *P. tinctorius* alle Mykorrhizapilze eine stetige Abnahme der extrazellulären PA.**

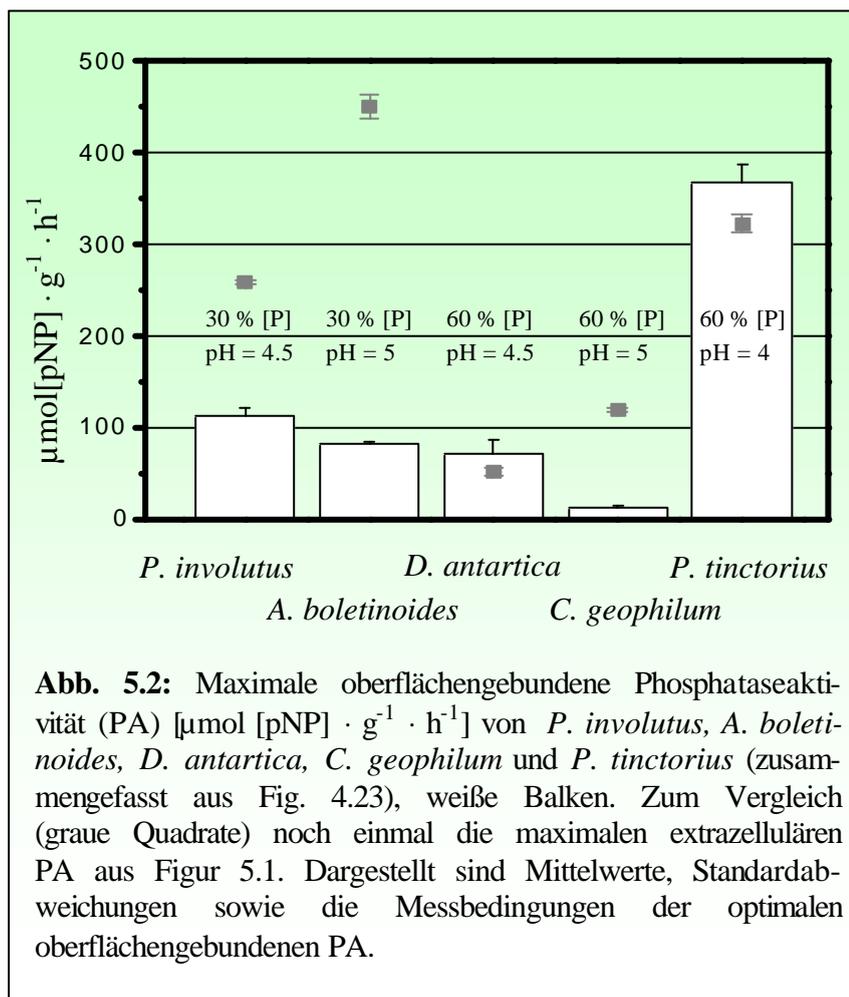
5.3.1.2 Oberflächengebundene Phosphataseaktivität

Die Aktivitäten der oberflächengebundenen Phosphatasen der untersuchten Mykorrhizapilze zeigen in Abhängigkeit des pH-Wertes zwei zu unterscheidende Verläufe. *C. geophilum* und *D. antartica* weisen ein Aktivitätsmaximum bei pH-Werten zwischen 4,5 bis 5 auf (vergl. Abb. 4.23 und 4.25). Die andere Gruppe wird von *A. boletinoides*, *P. tinctorius* und *P. involutus* gebildet, welche über zwei Aktivitätsmaxima verfügen. Allerdings sind die Maxima bei *A. boletinoides* und *P. tinctorius* gut voneinander getrennt, wobei im Fall von *P. involutus* auch von einem Plateau hoher Aktivitäten zwischen pH = 4 und 6 ausgegangen werden kann.

Als Funktion des pH-Wertes weisen die gemessenen PA typische Verläufe oberflächengebundener PA auf (vergl. Antibus *et al.* 1986, 1992). Antibus *et al.* (1986) fanden bei drei von vier in Alaska und Maryland (USA) gewonnenen Isolaten von *C. geophilum* ebenfalls pH-Optima zwischen 4.5 und 5. Lediglich eines der aus Alaska stammenden Isolate glich in seinem Verhalten eher jenem der extrazellulären Fraktion des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Isolats (vergl. Fig. 4.22.d).

Hinsichtlich der Abhängigkeit der oberflächengebundenen PA vom Phosphatangebot des Nährmediums kann festgestellt werden, dass keiner der untersuchten Mykorrhizapilze eine stetige, vom Phosphatangebot abhängige Aktivitätsveränderung zeigt (vergl. Abb. 4.22-25). Es wiederholen sich hierzu die Beobachtungen der extrazellulären PA (Kap. 5.3.1.1). Vergleicht man allgemein die Verläufe der Aktivitäten der oberflächengebundenen und der extrazellulären PA in Abhängigkeit der pH-Werte und des Phosphatangebotes (vergl. Abb. 4.22 und 4.23), so sind diese für alle untersuchten Mykorrhizapilze unterschiedlich.

Sie scheinen sich demnach in ihrem Wirkungsspektrum eher zu ergänzen und zielen mit



großer Wahrscheinlichkeit auf unterschiedliche P-Reservoirs (vergl. Kap. 5.4).

Wie schon im Falle der extrazellulären PA in Abbildung 5.1, sind in Abbildung 5.2 noch einmal die maximalen oberflächengebundenen PA zusammengefasst, wobei diese wieder die Angaben zu Mess- bzw. Kulturbedingungen enthalten, unter denen diese

Maxima zustande kamen. Die Maxima der oberflächengebundenen PA schwanken zwischen 10 (*C. geophilum*) und fast 400 μmol (*P. tinctorius*) $[\text{pNP}] \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Von Tibbett *et al.* (1998) werden oberflächengebundene PA von *H. polare* zwischen 232 und 563 μmol $[\text{pNP}] \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ angegeben, wobei die Autoren, wie schon im Falle der extrazellulären PA, von einem zum Phosphatangebot im Wachstumsmedium inversen Effekt berichten. Zwar ist dieser stetige Verlauf bei den hier untersuchten Mykorrhizapilzen nicht zu erkennen, starke Schwankungen zwischen den PA bei unterschiedlichen Phosphatangeboten sind allerdings auszumachen und können, wie im Falle von *P. involutus* (pH = 4,5, Abb. 4.23.a) oder *P. tinctorius* (pH = 4, Abb. 4.23.e), sogar über den Faktor 5 hinausgehen.

Vergleicht man in Abbildung 5.2 die maximalen oberflächengebundenen PA (weiße Balken) noch einmal direkt mit jenen der extrazellulären PA (graue Punkte), so wird deutlich, dass für *D. antarctica* und *P. tinctorius* die maximalen extrazellulären PA leicht unter den maximalen oberflächengebundenen PA liegen. Für *P. involutus*, *A. boletinoides* und *C. geophilum* hingegen erreichen die extrazellulären PA bis zu 5fach höhere Werte. Auch Straker & Mitchell (1986) beobachteten nach Pilzart differenzierte Aktivitätsmaxima mit wechselseitigen Schwankungen von Faktoren um 5.

Als vorläufiges Resultat bleibt zusammenfassend festzuhalten (vergl. Abb. 5.2):

1. **Die oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten der untersuchten Mykorrhizapilze liegen in einem mit extrazellulären Phosphatasen vergleichbaren Aktivitätsbereich.**
 - Sie variieren zwischen den verschiedenen Pilzarten um bis zu einer Größenordnung.
 - Sie variieren in Abhängigkeit der pH-Werte ebenfalls um fast eine Größenordnung.
 - Sie variieren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes in etwa um den Faktor 5.
2. **In Abhängigkeit des Phosphatangebotes der Nährmedien zeigt sich kein stetiger Effekt der PA. Die Maxima liegen alle bei mittlerem Phosphatangebot (30-60 %).**
3. **In Abhängigkeit des pH-Wertes zeigen sich ein bis zwei ausgeprägte Maxima.**

5.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität

Lange Zeit wurden bei der Einschätzung der Relevanz quantitativer Phosphataseaktivitäten an Isolaten von Pilzhyphen morphologische Aspekte der Hyphen bzw. der betroffenen Mykorrhiza-Assoziationen völlig vernachlässigt (z.B. noch Antibus *et al.* 1992). Für eine abschließende Bewertung der Relevanz von quantitativen Messungen zur PA an Pilzhyphen (meist mit Hilfe von pNPP, s. Kap. 5.3.1) ist es aber ebenfalls wichtig, morphologische

Aspekte der untersuchten Hyphen zu berücksichtigen (vergl. Kap. 2.4.2). Erst in den letzten Jahren scheinen diese morphologischen Aspekte verstärkt Aufmerksamkeit auf sich zu ziehen (Lynch 1995, Smith & Read 1997). Diese Ansätze berücksichtigen z.B. das Pilzmyzel im erweiterten Bodenraum um die Mykorrhiza (Schachtmann *et al.* 1998). Sie betreffen auch ergänzende Quantifizierungen von Wurzellängen mit Hilfe bildverarbeitender Methoden (Antibus *et al.* 1997) oder sie richten sich direkt auf die Visualisierung phosphataseaktiver Zentren an Pilzhyphen mit Hilfe der konventionellen Durchlichtmikroskopie (Tisserant *et al.* 1993) sowie der Fluoreszenzmikroskopie (van Aarle *et al.* 2001).

Bis heute existiert keine Untersuchungsmethode, die es erlaubt, die oberflächengebundene Phosphataseaktivität an Pilzhyphen oder ganzen Mykorrhiza-Assoziationen in einer Kombination aus qualitativer und quantitativer Analyse zu verfolgen (Kap. 2.4.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Entwicklung eines neuartigen methodischen Ansatzes zur qualitativ-quantitativen Bestimmung der oberflächengebundenen PA von Pilzhyphen und in ganzen Ektomykorrhizen relativ viel Aufmerksamkeit gewidmet (s. Kap. 3.3.2). Dieser Ansatz soll nun zunächst unter methodischen Gesichtspunkten diskutiert werden (Kap. 5.3.2.1), bevor auf inhaltliche Ergebnisse der Messungen der oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren von Mykorrhizapilzen eingegangen werden wird (Kap. 5.3.2.2).

5.3.2.1 Validierung der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der Phosphataseaktivität in Ektomykorrhizen und Ektomykorrhizapilzen

Die nötigen Ergebnisse für eine gesicherte Validierung der entwickelten konfokal-fluoreszenzmikroskopischen Methode zur qualitativ-quantitativen Bestimmung extrazellulärer PA wurden bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ dieser Arbeit (Kap. 3.3.2.1) zusammengefasst. Sie werden hier nur kurz kommentiert.

Die wichtigste Grundlage für eine verlässliche Analyse der Aktivität von Phosphatase-Zentren ist zunächst die Trennung des Fluoreszenzspektrums der aktivierten Fluoreszenzsonde ELF-97 von der Autofluoreszenz der Ektomykorrhiza und der Ektomykorrhizapilze. Diese ist in Kapitel 3.3.2.1.2 eindeutig belegt und bedarf keines weiteren Kommentars. Auch die Ergebnisse zur Sättigungskinetik der enzymatischen Aktivierung von ELF-97 (Kap. 3.3.2.1.4) an den phosphataseaktiven Zentren der Pilzhyphen sind unmissverständlich und benötigen keine Diskussion. Ebenfalls eindeutig sind die Ergebnisse zur Stabilität der Fluoreszenzintensität der aktivierten ELF-97-Sonde unter Variation des pH-Wertes von 3 bis 7 (s. Kap. 3.3.2.1.5). Hier zeichnet sich das fluoreszente ELF-97-Molekül innerhalb des getesteten pH-Intervalls durch eine stabile Quantenausbeute aus (vergl. Kap. 2.4.4). Die im Rahmen dieser Ar-

beit detektierten unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten bei variierenden pH-Werten, können demnach verlässlich auf eine pH-Wert-abhängige Veränderung der enzymatischen Aktivitäten zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen von van Aarle *et al.* (2001) ergänzt, die eine Auflösung fluoreszierender ELF-97-Präzipitat-Zentren erst ab einem pH-Wert von über 8,5 feststellten.

Wichtige, grundlegende Fragen stellen sich nun im folgenden Zusammenhang:

- Welche der Phosphatase-Fractionen der Proben werden von den diffundierenden, hydrophilen ELF-97-Substraten zunächst erreicht ?
- Wo genau lagern sich die fluoreszenzaktivierten, nun stark hydrophoben ELF-97-Moleküle nach ihrer Spaltung als definierte Zentren an ?

Die Veröffentlichung von van Aarle *et al.* (2001) ist die einzige bislang erschienene Publikation überhaupt, welche die ELF-97-Fluoreszenz im Zusammenhang mit der Phosphataseaktivität an Pilzhyphen (Saprophyten und VA-Mykorrhizapilzen) zum Gegenstand hat. In dieser Untersuchung wird der ELF-97-Fluoreszenz eine weitaus größere Sensitivität zur Detektion phosphataseaktiver Zentren zugesprochen als der zu Zwecken der Visualisierung bislang verwendeten Methode (der durchlichtmikroskopischen Analyse, beruhend auf *Fast Blue* RR-Salz-Anfärbung, Tisserant *et al.* 1993). Bei der Detektion alkaliner PA sprechen die Autoren der ELF-97-Fluoreszenz gar größere Empfindlichkeit zu als der spektrometrischen pNPP-Methode. Van Aarle *et al.* (2001) gehen nach der enzymatischen P-Spaltung von der Bildung fluoreszierender ELF-97-Präzipitat-Zentren aus, können diese aber aufgrund unzureichender optischer Möglichkeiten der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht eindeutig lokalisieren und regen daher konfokal-mikroskopische Untersuchungen an, ähnlich wie sie im Rahmen dieser Arbeit präsentiert werden.

Zum einen bestätigen die Autoren die eigenen Beobachtungen hinsichtlich der Lokalisation der ELF-97-Präzipitat-Zentren an der Peripherie der vermessenen Pilzhyphen (vergl. Kap. 3.3.2.1.3 und Abb. 3.5). Sie meinen aber, darüber hinaus Agglomerationen fluoreszenzaktiver ELF-97-Moleküle innerhalb der von ihnen untersuchten Pilzhyphen (in den Vakuolen) erkannt zu haben. Dies kann nach den Erfahrungen mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie an keinem der untersuchten EM-Pilzhyphen bei keiner der verwendeten pH-Messbedingungen (3-7) bestätigt werden. Allerdings ist es in diesem Zusammenhang durchaus möglich, dass die Lokalisation der ELF-97-Anfärbung vom Typ der verwendeten Präparate oder auch von der Präparationsmethode abhängt (persönliche Mitteilung I. van Aarle, 2001). Aufgrund seiner Größe und seiner starken Hydrophilie ist die ungespaltene ELF-97-Sonde

nicht dazu prädestiniert, hydrophobe Barrieren, wie sie Lipidmembranen im Allgemeinen darstellen, zu durchdringen (s. Abb. 3.3). Daher ist eine schnelle Verteilung des Substrates in den verschiedenen Zellorganellen der Pilzhyphen eher nicht zu erwarten.

McElhinney & Mitchell untersuchten 1993 Phosphatase-Fractionen von 4 EM-Isolaten mit Hilfe von pNPP. Sie unterschieden extrazelluläre, zytoplasmatische, an die Membran gebundene und an die Zellwand gebundene PA (letztere unterteilten sie weiter in fest und locker an die Zellwand gebundene Fraktionen). Sie stellten bei allen 4 Isolaten, darunter auch *P. involutus*, zytoplasmatische PA von unter 4 % fest (bezogen auf an die Membran gebundene und an die Zellwand gebundene PA). Anhand dieser Ergebnisse ließe sich erklären, warum bei den eigenen LSM-Messungen keine intrazellulären ELF-97-Fluoreszenzzentren detektiert wurden, selbst wenn der Farbstoff wider Erwarten in zytoplasmatische Organellen eindringen könnte. Gemessen am Gesamtanteil der membrangebundenen und der an die Zellwände gebundenen phosphataseaktiven Enzyme, entfallen lediglich zwischen 8 und 21 % auf die membrangebundene Fraktion; der überwiegende Anteil von bis zu über 90 % stammt nach McElhinney & Mitchell (1993) aus der an Hyphenwände gebundenen Enzym-Fraktion. Dexheimer *et al.* und Gianinazzi-Pearson *et al.* hatten bereits 1986 an Zellwänden von Mykorrhiza-Pilzhyphen gebundene Phosphataseaktivität mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Studien lokalisiert.

Nach den vorgenommenen LSM-Untersuchungen der Struktur der ELF-97-Fluoreszenzzentren an den untersuchten Pilzhyphen lassen sich folgende Modelle zur Entstehung dieser Zentren formulieren:

- 1. Die ELF-97-Moleküle werden an lokalisierten phosphataseaktiven Bereichen hoher Enzymaktivität gespalten, die sich entweder auf der Membran oder den Zellwänden befinden und kristallisieren im Anschluss daran in unmittelbarer Nähe dieser Bereiche zu den beobachtbaren Fluoreszenzzentren aus (s. Abb. 3.5 und Abb. 4.31-35).***
- 2. Es ist auch denkbar, dass sich die phosphataseaktiven Proteine homogen auf der Zellwand und der Membran verteilen und die ELF-97-Moleküle dann auch überall dort gespalten werden. Nur die abschließende Kristallisation könnte dann an definierten, hydrophoben Kristallisationszentren, vielleicht an Hydrophobinen auf der Zellwand (Wessels 1994), stattfinden.***

Für das zweite Modell spricht der einfache Gedanke, dass eine homogenere Verteilung phosphataseaktiver Enzyme auf der Zellwand wegen der größeren Kontaktfläche zum Substrat einen Vorteil bei der Nährstoffaufnahme hätte. Wahrscheinlicher ist jedoch das erste Mo-

dell. Auch hier ist die direkte Nähe zum Substrat gegeben, wenn auch nicht hinsichtlich der Kontaktfläche optimiert. Es liegen hierzu unterstützend die oben genannten Hinweise der elektronenmikroskopischen Untersuchungen vor.

Unabhängig davon, welches Modell letztendlich die Entstehung der fluoreszierenden ELF-97-Zentren wahrheitsgemäß beschreibt, zeigen die vergleichenden Messungen mit der pNPP-Methode bei 4 von insgesamt 5 Isolaten übereinstimmende Aktivitätsmuster für die oberflächengebundene PA in Abhängigkeit des Phosphatangebotes und der pH-Werte (s. Kap. 4.8.2). Warum einzig bei *P. tinctorius* keine Korrelation zwischen den beiden Messmethoden zustande kam, ist unklar. Unter Umständen ist dies dadurch zu erklären, dass die fluoreszenzmikroskopischen Messungen ca. 3-4 Monate nach den absorptionsspektrometrischen Versuchen durchgeführt worden sind und es bei den verwendeten Isolaten von *P. tinctorius* zu einer unbemerkten Unregelmäßigkeit gekommen ist. Weder bei der pNPP-Methode noch bei der mikroskopischen Methode sind jedenfalls Auffälligkeiten bemerkt worden.

Durch die Güte der Übereinstimmungen bei den übrigen 4 Pilzisolaten kann jedoch die Verwendbarkeit der entwickelten bildverarbeitenden fluoreszenzmikroskopischen Methode als hinreichend abgesichert gelten, sodass im nächsten Abschnitt auf die strukturellen Untersuchungen der oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren der Mykorrhizapilze eingegangen werden kann.

5.3.2.2 Quantitativ-strukturelle Überlegungen zur oberflächengebundenen Phosphataseaktivität auf den Hyphen der Pilzisolate

Um die beiden in Kapitel 4.8.3 dargestellten Maße zur Charakterisierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität an Pilzhyphen zu erhalten (die integrale Phosphataseaktivität pro μm Hyphenlänge und die Anzahl der phosphataseaktiven Zentren pro μm Hyphenlänge), war zunächst ein kleiner Trick nötig. Von der relativ einfach zu segmentierenden Gesamtfläche der aufgenommenen Pilzhyphen (s. Abb. 3.9) lässt sich auf die Gesamtlänge der Pilzhyphen schließen, indem die ermittelte Gesamtfläche durch den vorher ermittelten mittleren Durchmesser des jeweiligen Pilzhyphentyps geteilt wird. Dieses Verfahren ist ebenfalls von Antibus *et al.* (1997) zur Bestimmung von Gesamtlängen gesammelter Wurzeln angewendet worden.

Aus dem direkten Vergleich der beiden Maße zur Charakterisierung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität für jede der Isolate lassen sich zunächst zwei grobe Verhaltensmuster erkennen:

- Die farbkodierten Histogramme sind für *D. antartica* (Abb. 4.32), *A. boletinoides* (Abb. 4.33) und *C. geophilum* (Abb. 4.34) nahezu identisch.
- Für *P. involutus* (Abb. 4.31) und *P. tinctorius* (Abb. 4.35) hingegen unterscheiden sich die farbkodierten Histogramme wesentlich voneinander.

Da über Fragestellungen zur quantitativ-strukturellen Adaptationsfähigkeiten hinsichtlich der Phosphataseaktivitäten von Pilzhyphen als Reaktion auf variierende pH-Werte und veränderte P-Angebote bislang keine differenzierten Untersuchungen existieren, müssen die Ergebnisse zunächst für sich diskutiert werden.

***D. antartica*, *A. boletinoides* und *C. geophilum* :**

Für diese Gruppe gilt: durch die gegebenen Randbedingungen (Phosphatversorgung und pH-Werte) wird nicht nur die Gesamtaktivität der Phosphatase auf den Pilzhyphen integral verändert, sondern parallel dazu die Anzahl der PA-Zentren pro μm Hyphenlänge.

Bei *C. geophilum* verändert sich die Anzahl der Zentren in annähernd gleichem Maße wie die Gesamtaktivität (Abb. 4.34.a-b und Abb. 8.7.a-d). Das heisst, hier werden Veränderungen der Gesamtaktivität ausschließlich durch Veränderungen in der Anzahl der Zentren hervorgerufen; die Intensitäten der einzelnen Zentren verändern sich kaum.

Bei *D. antartica* und *A. boletinoides* fallen die Übergänge der Gesamtaktivitäten etwas stärker aus als die Veränderungen in der Anzahl der Zentren. Demnach verändern sich bei ihnen auch die Aktivitäten innerhalb der einzelnen Zentren. Dies wird auch anhand der ausgewählten Bildausschnitte deutlich, welche die Situationen aus zwei extremen Aktivitätsbereichen exemplarisch repräsentieren (Abb. 4.32.c-d und Abb. 4.33.c-d).

- ***Bei allen drei Isolaten werden die Veränderungen der Gesamtaktivität der Phosphatasen primär oder vollständig durch eine Veränderung in der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren auf den Hyphenoberflächen hervorgerufen.***

Dabei ist hervorzuheben, dass es keinen Unterschied macht, ob man die Entwicklung der Aktivitäten in Abhängigkeit der Phosphatversorgung während des Pilzwachstums oder der pH-Werte während der Messungen verfolgt. Dies ist insofern überraschend, da die Isolate im Fall unterschiedlicher P-Versorgung innerhalb von 14 Tagen genügend Zeit zur Adaptation haben (Straker & Mitchell 1986). Hingegen kann das Pilzmyzel höchstwahrscheinlich nicht aktiv durch Umstrukturierung auf die variierenden pH-Bedingungen der Puffers während der kurzen Inkubationszeiten reagieren (ca. 15 min für ELF-97 und 1-2 h für pNPP, s. Kap. 4.8.2). Nach den vorliegenden Messungen muss davon ausgegangen werden, dass die Isolate

auf bestimmte Phosphatangebote der Umgebung explizit durch eine Veränderung der Anzahl an Phosphatasezentren eines Typs reagieren, welche erst bei einem definiertem pH-Wert ihre optimale Aktivität entfalten (bei *A. boletinoides* und *C. geophilum* pH = 5, bei *D. antartica* pH = 4-5). Somit kann folgendes festgehalten werden:

- ***Gesteuert durch das P-Angebot variieren die drei Isolate selektiv die Expression eines Enzymtyps (bzw. die Anzahl der entsprechenden Zentren). Jedes der Isolate weist sich demnach durch eine eigene, pH-Wert-spezifische Reaktionsfähigkeit aus. Es findet keine unselektive Expression aller verfügbarer Phosphatasen statt.***

***P. involutus* und *P. tinctorius*:**

Im Unterschied zu den Isolaten von *D. antartica*, *A. boletinoides* und *C. geophilum* verändern *P. involutus* und *P. tinctorius* die Gesamtaktivität der Phosphatase auf den Pilzhyphen nicht parallel zur Anzahl der PA-Zentren pro μm Hyphenlänge (Abb. 4.31 und Abb. 4.35). Während bei *P. involutus* die Anzahl der PA-Zentren pro μm Hyphenlänge in keinem erkennbaren Zusammenhang zur Gesamtaktivität der Phosphatase auf den Pilzhyphen stehen, bleibt bei *P. tinctorius* diese Größe über weite Bereiche der gegebenen Randbedingungen praktisch konstant. Für *P. tinctorius* bleibt daher festzuhalten:

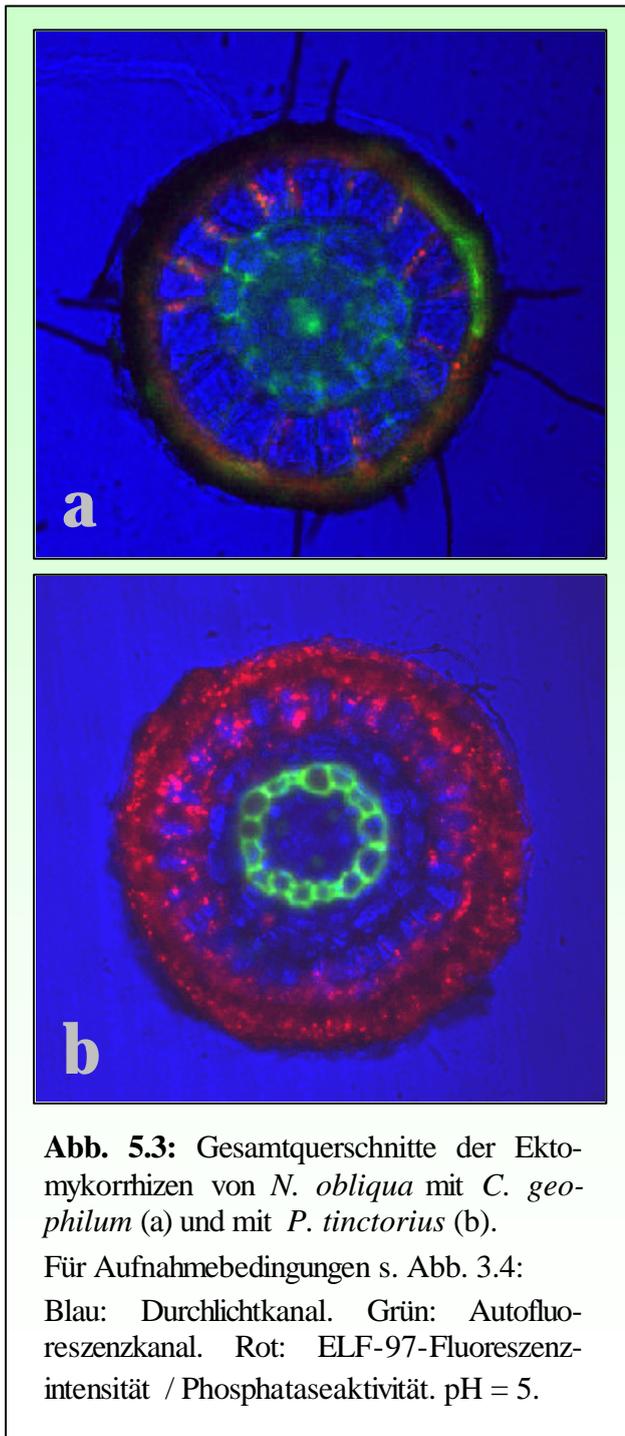
- ***Eine Anpassung an unterschiedliche Umgebungsbedingungen erfolgt in überwiegenderem Maße durch eine Veränderung der Phosphataseaktivitäten innerhalb einer gleichbleibenden Zahl bestehender PA-Zentren (s. Abb. 4.35.c-d).***

Diese Zentren sind demnach von den oben genannten Isolaten grundlegend zu unterscheiden. Sie beinhalten nicht nur Enzyme die auf einen pH-Wert spezialisiert sind, sondern ein auf mehrere pH-Werte spezialisiertes Enzymspektrum.

Die Adaptationfähigkeit der Pilzhyphen von *P. involutus* (s. Abb. 3.31) beinhaltet anscheinend beide beobachteten Strategien. Bei einem Phosphatangebot von 30 % verändern die Pilzhyphen sehr stark die Gesamtaktivitäten (klare Maxima bei pH = 4 und 6), wobei die Anzahl der PA-Zentren pro μm Hyphenlänge, insbesondere bei pH = 4, konstant bleibt. Hier spiegelt sich das Verhalten von *P. tinctorius* wider. Bei einem Phosphatangebot von 60 oder 100 % hingegen sind größere Veränderungen in der Anzahl der PA-Zentren als bei den Gesamtaktivitäten festzustellen. Es finden also hier primär starke strukturelle Anpassungen in der Anzahl der PA-Zentren auf den Zellwänden der Pilzhyphen statt, ohne dass sich die integralen Aktivitäten nennenswert verändern.

- *Die Anpassung bei P. involutus findet sowohl durch eine Veränderung der Phosphataseaktivitäten innerhalb bestehender phosphataseaktiver Zentren auf den Hyphenoberflächen statt, als auch durch eine Veränderung in der Anzahl der PA-Zentren.*

5.3.2.3 Quantitativ-strukturelle Überlegungen zu oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln



Die Messungen der oberflächengebundenen phosphataseaktiven Zentren an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* bilden in dieser Arbeit den Abschluss der morphologisch-physiologischen Untersuchungen. Sinn dieser Messungen war es, mit Hilfe bildverarbeitender Methoden einen Zusammenhang zwischen der mit ELF-97 quantifizierten Phosphataseaktivität und den abgeleiteten morphologischen Parametern der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln herzustellen (s. Kap. 3.3.2.3).

Wachstumssteigerungen von mykorrhizierten Versuchspflanzen aufgrund einer erhöhten Aufnahme an P sind in vielen Arbeiten belegt (s. Überblick in Chambers & Cairney 1999). Es existieren jedoch hierzu auch Gegenbeispiele (Walker *et al.* 1989). Als Argument für die vermehrte P-Aufnahme wird häufig die gesteigerte Kontaktfläche der Mykorrhiza zum Substrat im Vergleich zu unmykorrhizierten Kurzwurzeln angegeben (Harley & Smith 1983, Rousseau *et al.* 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der flächenbezogene Anteil der Pilze an mykorrhizierten Kurzwurzelquerschnitten von *N. obliqua* bestimmt. Die Flächen der Pilzhyphen vergrößern die Wurzelfläche um 50-60 % für *C. geophilum* und *D. antartica* und um 90-100 % für *P. involutus* und *P. tinctorius* (vergl. Abb. 4.36 und Abb. 5.3). Die errechnete Phosphataseaktivität pro μm^2 Mykorrhizafläche ergab für *P. tinctorius* den mit großem Abstand höchsten Wert (Abb. 4.37. a). *P. involutus*, *C. geophilum* und *D. antartica* kamen in dieser Reihenfolge auf lediglich 10 bis 25 % des für *P. tinctorius* erreichten Wertes. Die Aufzucht der Sämlinge erfolgte bei diesem Versuch in Substrat bei pH = 5,5 und die ELF-97-Inkubation bei pH = 5, um möglichst den pH-Bodenbedingungen des Untersuchungsgebietes zu entsprechen (vergl. Tab. 4.5). Abbildungen 4.36 und 4.37 belegen:

- ***Der Anteil der Pilze an der Gesamtfläche der Mykorrhizen steht in keinem direkten Zusammenhang zur Phosphataseaktivität pro μm^2 Mykorrhizafläche.***
- ***Bezogen auf die unmykorrhizierte Kurzwurzel ist *P. tinctorius* der einzige Mykobiont, der zu einer Steigerung der Phosphataseaktivität bezogen auf die gesamte Mykorrhizafläche beiträgt. *P. involutus*, *C. geophilum* und *D. antartica* bewirken hier sogar einen gegenteiligen Effekt.***

Bezieht man die gemessenen Phosphataseaktivitäten auf die Kurzwurzelfläche (Abb. 4.37.b), so ändert sich die Bilanz bezüglich der unmykorrhizierten Kurzwurzeln nur im Falle von *P. involutus*. Die Ektomykorrhiza-Assoziationen von *N. obliqua* mit *C. geophilum* und *D. antartica* bleiben weiterhin deutlich hinter den unmykorrhizierten Kurzwurzeln zurück. Die Aussage, Mykorrhizen bewirkten generell eine Verstärkung der Phosphataseaktivitäten gegenüber unmykorrhizierten Kurzwurzeln, muss für *N. obliqua* klar verneint werden. Auch im Wurzelsystem von *Pinus* hatte Cummings (1996) mit *P. involutus* keine Steigerung sondern einen Rückgang der integralen PA feststellen können.

Vergleicht man die maximalen oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten in reinen Pilzkulturen (Kap. 5.3.1.2) mit jenen in ganzen Mykorrhizaquerschnitten, so lassen sich Übereinstimmungen hinsichtlich der relativen Aktivitäten der Mykobionten untereinander feststellen. Lediglich *C. geophilum* und *D. antartica* haben bei diesem Vergleich ihre Reihenfolge vertauscht. Oberflächengebundene Phosphatasen sind bei EM-Pilzen zu einem überwiegenden Anteil mit den Zellwänden assoziiert (vergl. Kap. 5.3.2.1). Einer Veränderung der Zellwände kommt in diesem Zusammenhang sicherlich eine entscheidende Rolle zu. Wessels (1994) berichtet über eine große Fähigkeit der Zellwände zur strukturellen Morphogenese und stark veränderten Proteinexpression während der Mykorrhiza-Bildung von *P. tinctorius* mit

Eucalyptus. So wird beispielsweise die Expression von strukturbildenden „Mannoproteinen“ während der Mykorrhizierung unterdrückt, Zellwand-gebundene Adhäsionsproteine (die „Hydrophobine“) werden verstärkt exprimiert (Tagu & Martin 1996, Martin *et al.* 1999) und definierte Polypeptide (die mykorrhiza-spezifischen „Ektomykorrhizine“) werden überhaupt erst während einer Mykorrhizierung synthetisiert (Burgess *et al.* 1995). Über die in den Zellwänden eingebundenen Phosphatasen ist in diesem Zusammenhang kaum etwas bekannt. Aus den Beobachtungen kann geschlossen werden:

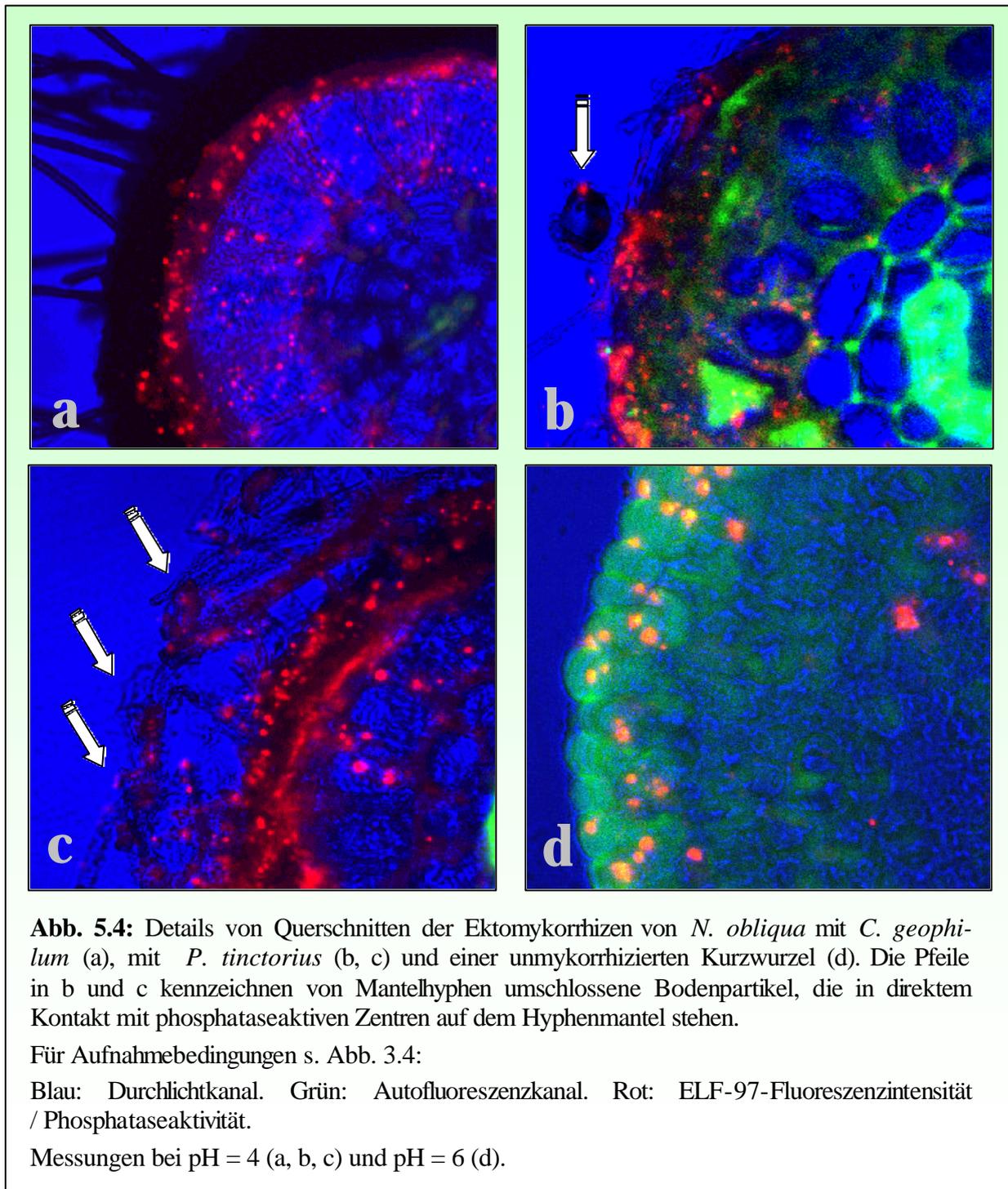
- ***Zellwand-gebundene Phosphatasen erfahren bei P. involutus und P. tinctorius keine tiefgreifenden Veränderungen als Folge der Mykorrhizierung. Bei C. geophilum und D. antarctica hingegen existiert sehr wohl ein Hinweis auf eine veränderte Expression der Phosphatasen.***

Auch ein Vergleich der pH-Wert-abhängigen Messungen der oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten in reinen Pilzkulturen von *C. geophilum* und *P. tinctorius* (Abb. 4.29.b und Abb. 3.30.b) mit denen in ganzen Mykorrhizaquerschnitten (Abb. 4.39.a-b) deuten auf eine Veränderung der Expression der Phosphatasen bei *C. geophilum* hin. Bei den Mykorrhizaschnitten mit *C. geophilum* ist ein ausgeprägtes Maximum bei pH = 4 und ein kleines Nebenmaximum bei pH = 6 zu erkennen (Abb. 4.39.b); in reinen Pilzkulturen war lediglich ein Maximum bei pH = 5 vorhanden (Abb. 4.29.b). Hingegen weist der Verlauf der Aktivitäten von pH= 3-7 bei *P. tinctorius* in beiden Fällen ein Maximum um pH = 4.5 auf und die Werte fallen zu beiden Seiten hin ab (Abb. 4.30.b und Abb. 4.39.a).

Von hohem Interesse sind ebenfalls nähere strukturelle Betrachtungen der Verteilung der Phosphatasen. Wie bereits in Kapitel 4.8.4 zusammenfassend festgestellt wurde, ist bei allen Mykorrhizen der Anteil der phosphataseaktiven Flächen (Anzahl der PA-Zentren) der entscheidende Faktor für die gemessenen Gesamtaktivitäten bei konstantem pH-Wert (vergl. Abb. 4.37.a, d). Die Fluoreszenzdichten ändern sich nur wenig (Abb. 4.37.c). Dies kann auch für die pH-Wert-abhängigen Messungen bei *P. tinctorius* und *C. geophilum* sowie für die unmykorrhizierte Kurzwurzel von *N. obliqua* bestätigt werden (Abb. 4.42.a-c)

- ***Unterschiedliche Gesamtaktivitäten der Phosphatasen kommen bei allen untersuchten Mykorrhizen und auch bei der unmykorrhizierten Kurzwurzel von N. obliqua primär durch Änderungen der phosphataseaktiven Flächen zu Stande.***

Nur für *P. tinctorius* sind parallel zu den Entwicklungen der Gesamtintensitäten Veränderungen der Intensitätsdichten festzustellen, wenn auch in abgeschwächter Form (vergl. Abb. 4.39.a mit Abb. 4.42 a). Hier wiederholt sich die besondere Stellung von *P. tinctorius* für die



Messungen oberflächengebundener Phosphatasen an reinen Pilzisolaten (vergl. Kap. 5.3.2.2 und Abb. 4.35). Die Hyphen von *P. tinctorius* reagierten als einzige primär durch Intensitätsänderungen bestehender Zentren auf veränderte Versuchsbedingungen.

Verlagerungen der PA-Zentren von den Wurzelzellen (Abb. 5.4.d) auf den Hyphenmantel wurden für *P. involutus*, *P. tinctorius* und *C. geophilum* festgestellt (Abb. 4.38 und Abb. 5.4.a-c). Eine Verlagerung der PA-Zentren findet demnach mit *P. involutus* und *C. geophilum*

selbst für solche Mykorrhizen statt, die bei pH = 5 gar nicht zur integralen Steigerung der Phosphataseaktivitäten gegenüber der unmykorrhizierten Kurzwurzel beitragen. Nun muss auch hier noch einmal genauer differenziert werden.

Wie das repräsentative Detailbild der unmykorrhizierten Kurzwurzel zeigt, sind die PA-Zentren zwar an den Zellen der Rhizodermis angelagert, scheinen aber nicht primär auf die Kontaktfläche zum Substrat hin ausgerichtet zu sein (Abb. 5.4.d).

Bei der Ektomykorrhiza von *N. obliqua* mit *C. geophilum* (Abb. 5.4.a) sind die PA-Zentren verstärkt nahe der Kontaktfläche zwischen Pilzhyphen und Wurzelzellen angelagert. Die sehr zahlreichen, abziehenden Hyphen dieser Ektomykorrhiza (Abb. 4.19, Abb. 5.3.a und Abb. 5.4.a) zeichnen sich bei allen Versuchen durch eine völlige Abwesenheit von PA-Zentren aus. Diese Beobachtung zeigt auf sehr eindeutige Weise, dass nicht jede morphologische Steigerung der Kontaktfläche zwischen Mykorrhiza und Substrat mit einer verstärkten Nutzung verfügbarer Nährstoffe gleichzusetzen ist (vergl. Lynch 1995, Kap. 2.4.1-2). Diese Aussage sollte viel eher für jeden Nährstoff und auch für den jeweiligen Nährstoff-spezifischen Aufnahmemechanismus separat überprüft und diskutiert werden.

Im Gegensatz zu *C. geophilum* sind bei der Ektomykorrhiza zwischen *N. obliqua* und *P. tinctorius* (Abb. 5.3.b und Abb. 5.4.b-c) die PA-Zentren über den gesamten Hyphenmantel verteilt oder bevorzugt an der Kontaktflächen der Hyphen zum Substrat angelagert. Die äußeren Mantelhyphen umschließen sogar einzelne Substratbestandteile und bringen sie damit in einen direkten Kontakt zu den phosphataseaktiven Zentren (s. Pfeile in Abb. 5.4.b-c).

5.4 Die Bedeutung der Ektomykorrhizen für *Nothofago-Perseetum linguae*

Die in Kapitel 5.3 diskutierten Ergebnisse zu extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten der untersuchten Mykobionten, Mykorrhizen und der unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* machen zunächst einmal deutlich, wie differenziert selbst solche funktionalen Zusammenhänge beschrieben werden müssen, die in Laborversuchen unter kontrollierten Bedingungen beobachtet werden. Hierbei schlagen zunächst die seit langem beobachteten differenziellen physiologischen Fähigkeiten der Pilzpartner zu Buche (Agerer *et al.* 1986). Darüber hinaus sind bei jeder Art neben den spezifischen Makrosymbionten auch noch die speziellen, vom Fundort abhängigen Boden- und Klima-Bedingungen zu berücksichtigen sowie das Alter der Mykorrhizen und das Wachstumsstadium des Makrosymbionten (Antibus *et al.* 1986). Vor allem haben die hier durchgeführten Experimente aufgezeigt, in welchem Maße schon geringfügige Änderungen der pH-Werte oder der

P-Versorgung während des Wachstums einen bestimmenden Einfluß auf Anzahl und Aktivität der Phosphatase-Zentren der Pilzhypen ausüben. Kieliszewska-Rokicka fand bereits 1992 heraus, dass auch die N-Versorgung einen Einfluß auf die Phosphataseaktivitäten hat. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass die ^{32}P -Aufnahme durch Ektomykorrhizen von *P. involutus* im Vergleich mit anderen Ektomykorrhizen zum Teil als vorteilhaft (Cairney & Smith 1993) aber auch als nachteilig beschrieben wird (Dighton *et al.* 1993).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass isolierte Laboruntersuchungen die Komplexität natürlicher Wirkungsketten nicht angemessen beschreiben können. Doch sind aus der Komplexität des Gesamtzusammenhangs herausgelöste partielle Untersuchungen der einzige Weg, zunächst isolierte Funktionsweisen aufzuklären um sich später komplexeren Systemen zu widmen.

Bevor im Anschluss eine Bewertung der ausgewählten Mykobionten von *N. obliqua* erfolgt, muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass von den über 600 möglichen Mykorrhizapartnern von *Nothofagus*-Arten bislang lediglich 9 Arten für *N. obliqua* morphologisch-anatomisch in ihrem natürlichen Habitat beschrieben worden sind (s. Kap. 2.2.2). Von diesen wurden 2 (*B. loyo* und *A. boletinoides*) erstmals im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Dies macht noch einmal deutlich, aus welchem reduzierten Blickwinkel es derzeit möglich ist, aussagekräftige Beurteilungen zu treffen.

Unter den ausgewählten Mykobionten für die rein quantitativen Bestimmungen der Phosphataseaktivitäten (Kap. 5.1), waren die beiden spezifischen Ektomykorrhizapartner von *N. obliqua* (*D. antartica* und *A. boletinoides*) in keiner Weise von den unspezifischen Isolaten (*C. geophilum*, *P. involutus* und *P. tinctorius*) zu unterscheiden (Kap. 5.3.1.1-2). Aus den detaillierteren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten zwar unterschiedliche Strategien hinsichtlich der Adaptationseigenschaften der Inokulate unter variierenden P-Wachstumsbedingungen festgestellt werden (Kap. 5.3.2.2), doch stand diese Unterteilung in keinem Zusammenhang mit der Spezifität der Mykobionten.

- ***Die Spezifität der untersuchten Mykobionten steht somit in keinem erkennbaren Zusammenhang mit der Aktivität Phosphat spaltender Enzyme der Pilzhypen.***

Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl der Mykobionten war die Mantelorganisation der Mykorrhizen. Zwar waren die Hyphenmäntel aller ausgewählten Mykorrhizen von ihrem Grundtyp her plectenchymatisch, sie differierten jedoch recht stark hinsichtlich der Hyphenstrukturen (Kap. 5.1.2). Über die Rolle der vielfach speziell gestalteten Manteloberfläche als

Abschluß zum umgebenden Boden hin ist insbesondere hinsichtlich der Aktivität oberflächen-gebundener Phosphat-spaltender Enzyme sehr wenig bekannt (van Aarle *et al.* 2001).

Die Ektomykorrhizen von *N. obliqua* mit *P. involutus*, *A. boletinoides* und *P. tinctorius* besitzen einen aus gleichartigen Hyphen aufgebauten Pilzmantel, der an der Oberfläche locker- und in tieferliegenden Mantelschichten dichter plectenchymatisch aufgebaut ist. Abziehende Hyphen und Rhizomorphen treten auf (Typ B, s. Abb. 8.1, Kap. 4.3.3 und Kap. 5.1.2). Die Mantelorganisation bei der *N. obliqua* / *D. antartica*-Ektomykorrhiza ist vom Typ D. Zystidien ragen aus der Manteloberfläche hervor, die Mantelhyphen sind netzartig angeordnet und bilden keine Rhizomorphen aus (s. Abb. 8.1, Kap. 4.3.2 und Kap. 5.1.2). Die Mantelhyphen der Ektomykorrhiza von *N. obliqua* mit *C. geophilum* sind sternförmig angeordnet und bilden teils stachelig abziehende Hyphen aus (Typ G, s. Abb. 8.1, Kap. 4.5 und Kap. 5.1.2).

Die Mantelorganisation des Typs B, getestet an den Mykorrhiza-Assoziationen von *N. obliqua* mit *P. involutus* und *P. tinctorius*, scheint am effektivsten bezüglich der Phosphataseaktivität zu sein (Abb. 4.37.b). Die lockere hyphige aufgebaute Manteloberfläche stellt enge Beziehungen zum umgebenden Boden her (s. Abb. 5.4.b-c). Bei beiden Ektomykorrhizen wird die Wurzelfläche von *N. obliqua* durch eine Mykorrhizierung um 90-100 % vergrößert (s. Abb. 4.36). Hingegen wurden bei den Mykorrhizen von *N. obliqua* mit *D. antartica* und *C. geophilum*, die eine geringe Phosphataseaktivität aufwiesen und deren Manteloberfläche dichter aufgebaut ist als bei *P. involutus* und *P. tinctorius*, die Wurzelfläche nur um 50-60 % gesteigert. Wenn der Kontaktoberfläche des Hyphenmantels zum Substrat wirklich eine entscheidende Rolle für die Effizienz der Phosphatase-aktiven Zentren zukommt, dann ist eine Steigerung der Mantelfläche speziell für diese Pilze sinnvoll.

- ***Die Mantelorganisation des Typs B (P. involutus und P. tinctorius) scheint für die Aktivität Phosphat-spaltender Enzyme vorteilhafter zu sein als die Organisationen des Typs D (D. antartica) und G (C. geophilum). Auch hinsichtlich der Adaptationsstrategien wiesen die Mykobionten des Manteltyps B Besonderheiten auf, da sie zu einer Steigerung der Intensität einzelner PA-Zentren fähig waren (Kap.5.3.2.2).***

An dieser Stelle soll noch angemerkt werden, dass an den Rhizomorphen von *P. involutus* verstärkt auftretende Phosphataseaktivitäten beobachtet wurden. Eine mögliche Bedeutung der abziehenden Elemente im Zusammenhang mit der Phosphataseaktivität bei den *N. obliqua* / *C. geophilum* und *D. antartica*-Ektomykorrhizen konnte hingegen nicht beobachtet werden (z.B. Abb. 5.3.a und Abb. 5.4.a). Abbildung 5.5 einer entstehenden Ekto-

mykorrhiza zwischen *N. obliqua* mit *P. involutus* macht in diesem Zusammenhang deutlich, dass die Konzentration auf dem Hyphenmantel allein lediglich als ein Hinweis zur Einschätzung der Rolle eines Mykobionten hinsichtlich der Effizienz der PA-Zentren gewertet werden kann. In Zukunft sollten mit der entwickelten Fluoreszenzmethode auch die Rhizomorphen in ihrer ontogenetischen Vielfalt und andere abziehende Elemente in Untersuchungen einbezogen werden. Damit wäre ihre Funktion für das Gesamtsystem besser einzuschätzen.

Was lässt sich zusammenfassend aus den gesammelten Ergebnissen zur Phosphataseaktivität der untersuchten Mykobionten, der Mykorrhizen und der unmykorrhizierten Kurzwurzel von *N. obliqua* für die Wiederaufforstung und den Erhalt von *Nothofago-Perseetum linguae* ableiten?

Festgehalten werden müssen vor allem die sehr spezifischen Adaptationsfähigkeiten der untersuchten Mykobionten in Abhängigkeit von Variationen der Phosphatversorgung während des Wachstums und der pH-Werte während der Versuche. Diese ausgeprägte Sensibilität war in ihrem Ausmaß und in den strukturellen Veränderungen der PA-Zentren überraschend. Aufgrund dieser Erfahrung können die festgestellten hohen Aktivitäten der Phosphatasen des Mykobionten *P. tinctorius* und seiner Mykorrhiza mit *N. obliqua* nicht direkt und ohne Vorbehalt auf das natürliche System übertragen werden. Denn: Geringfügige Veränderungen anderer Bodenparameter könnten unter Umständen ebenfalls große Veränderungen der PA-Zentren induzieren. Oder: Mykorrhizen, die in einem älteren Wachstumsstadium von *N. obliqua* gebildet werden, weichen in ihrer Funktion von denen jüngerer Exemplare von *N. obliqua* ab. Hier bekäme die Differenzierung der Mykobionten in *early-*, *multi-* oder *late-stage-fungi* ein größeres Gewicht (vergl. Kap. 5.1.3). Andererseits ist die Beobachtung der ausgeprägten Flexibilität in der Anzahl und der Aktivität der PA-Zentren bereits ein unmiß-

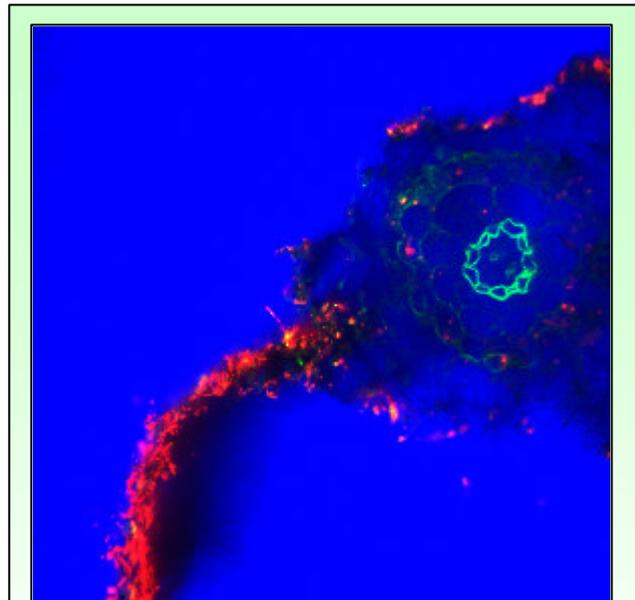


Abb. 5.5: Gesamtquerschnitt einer entstehenden Ektomykorrhiza von *N. obliqua* mit *P. involutus*.

Aufnahmebedingungen s. Abb. 3.4:

Blau: Durchlichtkanal. Grün: Autofluoreszenzkanal. Rot: ELF-97-Fluoreszenzintensität / Phosphataseaktivität. pH = 5.

verständlicher Hinweis darauf, dass dieser Funktionalität eine große Bedeutung für das Überleben von Mykobiont und Makrobiont zukommen muss.

An dieser Stelle wäre es von hohem Interesse, mit Hilfe der neu entwickelten fluoreszenzmikroskopischen Methode zur quantitativ-qualitativen Bestimmung phosphataseaktiver Zentren, Messungen über eine längere Vegetationsperiode an frisch im Untersuchungsgebiet gesammelten Ektomykorrhizen durchzuführen. Da die ELF-97-Anfärbung verlässlich an lebendem Versuchsmaterial durchgeführt werden kann und keine Gefahr besteht, dass Präparationsartefakte (wie sie durch chemische Einbettungsverfahren durchaus hervorgerufen werden können) die Aussagekraft der Messungen verfälschen, läge hierin eine gute Möglichkeit, das natürliche System angemessen zu verstehen.

Schon die Diskussion zur Expression der diversen Phosphatasefraktionen macht deutlich, dass Empfehlungen hinsichtlich ausgewählter Mykobionten nicht ohne Einschränkungen ausgesprochen werden können. Nimmt man in die Diskussion noch weitere Strategien von Mykobionten zur Phosphatgewinnung in P-verarmten Böden hinzu, wie die Fähigkeit zur Produktion Chelat-bildender Substanzen, welche auch anorganische Eisen-, Aluminium- oder Calcium-Phosphatverbindungen auflösen können (Heinrich *et al.* 1988, Lapeyrie *et al.* 1991), so wird eine Bewertung nicht einfacher. Hier sollte allerdings kurz Erwähnung finden, dass gerade *P. tinctorius* Aluminium-Phosphatverbindungen auflösen kann und dadurch die Phosphataufnahme von *Pinus rigida* verstärkt (Cummings & Weinstein 1990). Aluminium-Phosphate werden gerade in Verbindung mit Allophanen verstärkt gebildet (vergl. Kap. 2.3.4.2), was *P. tinctorius* in seiner möglichen hohen Bedeutung für *Nothofago-Perseetum linguae* noch einmal besonders hervorhebt.

Da auch in näherer Zukunft ein umfassendes Verständnis der komplexen Prozesse der Rhizosphäre von *Nothofago-Perseetum linguae* nicht erwartet werden kann, muss bis auf weiteres die einzig sichere Strategie zur Wiederaufforstung und Erhaltung nachwachsender Bestände von *N. obliqua* darin bestehen, dem Makrobionten ein möglichst großes Spektrum eventuell benötigter Mykorrhizapartner zur Verfügung zu stellen. Dazu muss natürlich zunächst größeres Wissen über die 621 möglichen Mykorrhizapartnern von *N. obliqua* gesammelt werden.

Eines der größten Probleme bei einer Inokulation vor Ort besteht darin, eine ausreichende Menge an Inokulat zu erhalten. Da es nicht immer möglich ist, Reinkulturen der Mykosymbionten zu bekommen, müssen sie oft mit Hilfe von Wirtspflanzen reproduziert werden. Die Reinkulturen des Myzels der Arten *A. boletinoides*, *A. statuum*, *D. antartica*, *B. loyo*, *B.*

chilensis, *P. involutus*, *X. rubellus* und *C. geophilum* konnten im Rahmen dieser Arbeit auf MMN-Nährmedien gezüchtet werden (s. Kap. 4.4 und Kap. 5.1.1). Alle diese Arten, mit Ausnahme von *B. chilensis* bildeten in kontrollierten Inokulationsversuchen Ektomykorrhizen mit Sämlingen von *N. obliqua* (Kap. 4.6). Dieses Ergebnis bestätigt die Möglichkeit der gezielten Pilzinokulation vor Ort für *N. obliqua*. Hierzu existierten bislang lediglich Daten über Inokulationsversuche zwischen *N. obliqua* / *A. statuum* und *P. tinctorius* (Garrido 1988). Im Gegensatz zu Garrido zeigte die Kombination *N. obliqua* / *P. tinctorius* in den Inokulationsexperimenten dieser Arbeit jedoch eine positive Mykorrhizierung (Kap. 4.6). Carcamo (2000) wies bei der Analyse von Mykorrhizierungen in Gewächshäusern zwischen *N. obliqua*, *N. alpina* / *P. tinctorius*, *L. laccata* nach, dass diese Symbionten zusammen die besten Ergebnisse erzielen. Es ist somit die Diversität und die ökologische Rolle der Ektomykorrhizapilze in den Untersuchungsgebieten bewiesen. Ebenso die Möglichkeit, in Laboratorien eine kontrollierte Inokulation von *N. obliqua* mit einheimischen und eingeführten reinen Isolaten durchzuführen.

Die aufwendige Isolierung, Züchtung und Inokulation der Pilzpartner von *N. obliqua* zum Zwecke erfolgreicher Wiederaufforstungen und nachhaltiger Forstwirtschaft könnte in Zukunft dadurch vermieden werden, dass für den Fall weiter wirtschaftlicher Nutzung der verbleibenden Waldgebiete von *Nothofago-Perseetum linguae* zumindest von völligem Kahlschlag größerer Regionen abgesehen wird. Verbleibende Inseln der ursprünglichen Waldkomposition mit Vertretern von *N. obliqua* aller Wachstumsstufen könnten als Reservoir des natürlichen Mykosymbiontenspektrums dienen (vergl. Kap. 5.1.3, Kranabetter 1999). Die Rückbesiedelung der freien Flächen mit den Mykosymbionten wäre auf diese Weise sichergestellt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Forschungsgegenstand dieser Arbeit bilden die gemäßigten immerfeuchten Urwälder der *Nothofago-Perseetum linguae* Südchiles. Die wenigen noch verbleibenden Bestände sind aufgrund nicht regulierter Weide-, Land- und Forstwirtschaft akut gefährdet. Für eine erfolgreiche Wiederaufforstung oder zur Etablierung nachhaltiger Forstwirtschaft ist es Voraussetzung, dass nachwachsenden nativen Baumarten ihre natürlichen Pilzpartner zur Verfügung stehen. Mit diesen Mykobionten bilden die Wurzeln der Bäume symbiotische Funktionseinheiten, die für beide Partner überlebenswichtig sind. Welche Mykobionten ein Baum benötigt, hängt von Randbedingungen wie Klima, Bodenbeschaffenheit sowie dem Wachstumsstadium des Baumes ab. Das Mykobiontenspektrum der *Nothofago-Perseetum linguae* ist noch größtenteils unbestimmt. Bislang sind nur 7 Arten morphologisch-anatomisch charakterisiert.

Grundlegendes Ziel dieser Arbeit war es, in diesem unzureichend charakterisierten Waldsystem zunächst den Artenbestand spezifischer und unspezifischer Ektomykorrhizapilze von *Nothofagus obliqua* zu charakterisieren und mit Hilfe ausgewählter Mykobionten sowie mit mykorrhizierten und unmykorrhizierten Sämlingen von *N. obliqua* weiterführende physiologische Untersuchungen durchzuführen. Diese Untersuchungen waren abgestimmt auf die spezifischen Bodenbedingungen des Untersuchungsgebietes. Diese Böden, gebildet aus rezenten Aschen vulkanischen Ursprungs, wiesen nach chemisch-physikalischen Analysen Besonderheiten in Bezug auf ein reduziertes Phosphatangebot auf. Die physiologischen Untersuchungen konzentrierten sich infolgedessen auf Aktivitäten extrazellulärer und an Oberflächen von Pilzhyphen gebundene Phosphatasen. Der Phosphataseaktivität kommt eine Schlüsselrolle bei der Versorgung des Pflanzenpartners bei reduziertem Angebot an verfügbarem Phosphat zu.

Wichtigste Ergebnisse zum Artenbestand spezifischer und unspezifischer Ektomykorrhizapilze im Untersuchungsgebiet mit *Nothofago-Perseetum linguae*:

Die Ektomykorrhiza-Assoziationen von *N. obliqua* mit *Boletus loyo*, *Austropaxillus boletinoides* und *Descolea antartica* wurden aus ihrer natürlichen Umgebung entnommen und morphologisch-anatomisch charakterisiert. Eine Charakterisierung von *B. loyo* und *A. boletinoides* erfolgt in dieser Arbeit zum ersten Mal, wodurch nunmehr insgesamt 9 Ektomykorrhiza-Assoziationen von *Nothofagus* morphologisch-anatomisch determiniert sind. Die Beschreibung der Ektomykorrhiza von *N. alpina* und *D. antartica* (Palfner 1997) wurde auf *N. obliqua* erweitert.

Wichtigste Ergebnisse zur Isolierung, Züchtung und Inokulation spezifischer und un-spezifischer Ektomykorrhizapilze von *N. obliqua*:

Um weiterführende physiologische Untersuchungen mit ausgewählten Mykobionten sowie mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* durchführen zu können, mussten diese Systeme zunächst unter Laborbedingungen als sterile Isolate gewonnen und routinemäßig gezüchtet werden. Es gelang, gesammelte Fruchtkörper taxonomisch zu bestimmen, Reinkulturen des Myzels der Arten *A. boletinoides*, *A. statuum*, *D. antartica*, *B. loyo*, *B. chilensis*, *P. involutus* und *X. rubellus* zu isolieren und auf MMN-Nährmedien zu züchten. *C. geophilum* wurde direkt von Mantelhyphen der Ektomykorrhiza mit *N. obliqua* isoliert. In kontrollierten Inokulationsversuchen bildeten alle Arten Ektomykorrhizen mit Sämlingen von *N. obliqua* aus, mit Ausnahme von *B. chilensis*. Es konnte somit eine Einschätzung der Mykobionten in *early*-, *multi*- oder *late-stage-fungi* erfolgen.

Wichtigste Ergebnisse zur Bestimmung extrazellulärer und an Oberflächen von Pilzhypen gebundener Phosphataseaktivitäten in ausgewählten Mykobionten sowie mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aktivitäten der Phosphatasen unter verschiedenen Randbedingungen untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Entwicklung einer neuen Methode zur Quantifizierung oberflächengebundenen Phosphataseaktivitäten an Pilzhypen sowie an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* mit Hilfe des Fluorophors ELF-97 und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie gewidmet. Diese konnte zunächst mit Hilfe einer etablierten spektrometrischen Methode (pNPP) zur Bestimmung der Phosphataseaktivität validiert werden. Sie ermöglichte im Anschluss eine Kombination quantitativ-qualitativer Einblicke in die Organisation oberflächengebundener Phosphatasen unter variablen Versuchsbedingungen.

Folgendes Modell wurde zur Funktionsweise der phosphataseaktiven (PA-) Zentren der Pilzhypen aufgestellt: ELF-97-Moleküle werden an lokalisierten PA-Bereichen gespalten, die sich auf der Membran und den Zellwänden befinden. Sie kristallisieren im Anschluss daran in unmittelbarer Nähe zu quantifizierbaren Fluoreszenzzentren aus.

Zu Fragestellungen der quantitativ-strukturellen Adaptationsfähigkeiten der Phosphataseaktivitäten von Pilzhypen als Reaktion auf variierende pH-Werte (3-7) und veränderte P-Angebote während ihres Wachstums konnte für *D. antartica*, *A. boletinoides* und *C. geophilum* festgestellt werden, dass die Veränderungen der Gesamtaktivität der Phosphatasen primär oder vollständig durch eine Veränderung in der Anzahl der phosphataseaktiven Zentren auf

den Hyphenoberflächen hervorgerufen werden. Jedes der Isolate wies sich durch eine eigene, pH-Wert-spezifische Reaktionsfähigkeit aus. Es fand wahrscheinlich eine selektive Expression verfügbarer Phosphatasen statt. Für *P. tinctorius* erfolgte eine Anpassung an unterschiedliche Bedingungen überwiegend durch eine Veränderung der Aktivitäten innerhalb einer gleichbleibenden Anzahl bestehender PA-Zentren. Die Anpassung bei *P. involutus* findet schließlich sowohl durch eine Veränderung der Phosphataseaktivitäten innerhalb bestehender PA-Zentren auf den Hyphenoberflächen statt, als auch durch eine Veränderung der Anzahl der PA-Zentren.

An mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* konnte festgestellt werden, dass der Anteil der Pilze an der Gesamtfläche der Mykorrhizen in keinem direkten Zusammenhang zur Phosphataseaktivität pro μm^2 Mykorrhizafläche steht. *P. tinctorius* trägt als einziger Mykobiont zu einer Steigerung der Phosphataseaktivität bei. Unterschiedliche Gesamtaktivitäten der Phosphatasen kommen bei allen untersuchten Mykorrhizen und auch bei der unmykorrhizierten Kurzwurzel von *N. obliqua* primär durch Änderungen der phosphataseaktiven Flächen zu Stande.

Eine Einordnung der Pilze, ausgehend von der Aktivität ihrer Phosphatasen, nach spezifischen und unspezifischen Mykobionten von *N. obliqua* konnte nicht getroffen werden. Allerdings scheint die Mantelorganisation von *P. involutus* und *P. tinctorius* vom Typ her für die Aktivität Phosphat-spaltender Enzyme vorteilhafter zu sein als die Organisationstypen von *D. antarctica* und *C. geophilum*. Auch hinsichtlich der Adaptationsstrategien wiesen erstere Besonderheiten auf, da sie zu einer Steigerung der Intensität einzelner PA-Zentren fähig waren. Wegen der hohen Phosphataseaktivitäten im isolierten Myzel, der Ektomykorrhiza mit *N. obliqua* und wegen seiner Fähigkeiten, Phosphat auch aus anorganischen Phosphatquellen zu lösen, scheint *P. tinctorius* im Hinblick auf die Bodenbedingungen des Untersuchungsgebietes am besten geeignet, die P-Verarmung auszugleichen.

Die gewonnenen Ergebnisse überraschten insbesondere hinsichtlich der differenzierten Aussagen zur Adaptationsfähigkeit der Mykobionten. Die morphologisch-physiologischen Untersuchungen an Mykorrhizen belegten, dass beide Faktoren gemeinsam und für jeden Mykorrhizotyp getrennt betrachtet werden müssen, um zu verlässlichen Bewertungen der Funktionalität zu gelangen. Die entwickelte fluoreszenzmikroskopische Methode bietet die besten Voraussetzungen, zukünftig durch Untersuchungen an frischen, direkt aus den Natur entnommenen Mykorrhizen, Erkenntnisse über Struktur und Aktivitäten der Phosphatasen zu erhalten und deren Beschreibung in ihrem natürlichen Habitat gerechter zu werden.

7. LITERATUR

- Agerer, R. 1986. Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26: 473-492.
- Agerer, R. 1987. Studies on ectomycorrhizae V. Mycorrhizae formed by *Dermocybe cinnamomea* and *Dermocybe sanguinea* on spruce. *Nova Hedwigia*. 44(1-2): 69-89.
- Agerer, R. 1987-1998. Colour atlas of ectomycorrhizae. 1st-11th delivery. Einhorn. Schwäbisch. Gmünd.
- Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris JR, Read DJ & Varma AK (eds.). *Techniques for the study of mycorrhiza*. *Methods Microbiology* 23: 25-73.
- Agerer, R. 1992. Ectomycorrhizal Rhizomorphs: organs of contact. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH & Alexander IJ (eds.). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB. Wallingford.
- Agerer, R. 1995. Anatomical characteristics of ectomycorrhizae: an attempt towards a natural classification. In: Varma AK & Hock B (eds.). *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Agerer, R., Brand, F. & E. Gronbach. 1986. Die exakte Kenntnis der Ektomykorrhizen als Voraussetzung für Feinwurzeluntersuchungen im Zusammenhang mit dem Waldsterben. *AFZ*. 20: 497-503, 509.
- Agerer, R. & E. Gronbach. 1988. *Cenococcum geophilum*. In: Agerer R (ed.). *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Plate 11. Einhorn Verlag. Schwäbisch Gmünd.
- Agerer, R. & E. Gronbach. 1990. *Boletus edulis*. In: Agerer R (ed.). *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Plate 36. Einhorn Verlag. Schwäbisch Gmünd.
- Agerer, R. & G. Rambold. 1996. DEEMY a DELTA-based information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. Section Mycology. Institute for Systematic Botany. University of München. Germany.
- Aguilera, S.M., Borie, G., Peirano, P. & G. Galindo. 1997. Organic matter in volcanic soils in Chile: chemical and biochemical characterization. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28(11-12): 899-912.
- Alaback, P.B. 1991. Comparison of temperate rainforests of the Americas along analogous climatic gradients. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 64: 399-412.
- Alexander, I.J. & K. Hardy. 1981. Surface phosphatase activity of Sitka spruce mycorrhizas from a serpentine site. *Soil Biology and Biochemistry*. 13: 301-305.
- Antibus, R.K., Kroehler, C.J. & A.E. Linkins. 1986. The effects of external pH, temperature, and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 64: 2383-2387.
- Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L. & A.E. Linkins. 1992. Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 70: 794-801.
- Antibus, R.K., Bower, D. & J. Dighton. 1997. Root surface phosphatase activities and uptake of ³²P-labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. *Mycorrhiza*. 7: 39-46.
- Armesto, J.J., León Lobos, P. & M. Kalin Arroyo. 1997. Los bosques templados del sur de Chile y Argentina: una isla biogeográfica. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M (eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Armesto, J., Rozzi, R., Smith-Ramírez, C. & M.K. Arroyo. 1998. Conservation targets in South American temperate forest. *Science*. 282: 1271-1272.
- Arroyo K.M., Cavieres, L., Peñazola, A., Riveros, M. & A.M. Faggi. 1997. Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de

- sudamérica. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M (eds.). Ecología de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Axelrod, D.I. 1992. What is an equable climate?. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 91: 1-12.
- Bartlett, E.M. & D.H. Lewis. 1973. Surface phosphatase activity of mycorrhizal roots of beech. *Soil Biology and Biochemistry*. 5: 249-257.
- Berg, B. 1989. Charakterisierung und Vergleich von Ektomykorrhizen gekalkter Fichtenbestände. Dissertation. Universität München. Germany.
- Bergemann, J. 1955. Die Mykorrhiza-Ausbildung einiger Koniferen-Arten in verschiedenen Böden. *Zeitschr. f. Weltforstw.* 18: 184-202.
- Berkeley, M. 1841. On an edible fungus from Tierra del Fuego and allied chilean species. *Trans. Linn. Soc. London*. 19: 37-43.
- Berkeley, M. 1842. Notice of same fungi collected by Darwin in South America and the islands of the Pacific. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 9: 443-448.
- Berkeley, M. 1847. Fungi. In: Hooker JD. *Fl. Antarc.* 447-454.
- Berkeley, M. 1877. Enumeration of fungi collected during the expedition of H. M. S. Challenger 1874-1875. *J. Linn. Soc. Bot.* 16: 38-54.
- Bertero, C. 1828. Variedades. *Ciencias Naturales, Botánica. Mercurio chileno*. 4: 194-195.
- Bertero, C. 1829. Botánica, lista de plantas que han sido observadas en Chile por el Dr. Bertero en 1828. *Mercurio chileno*. 12: 551-564; 13: 593-616; 16: 735-749.
- Besoain, E. 1969. Untersuchungen von Böden aus Pyroklastiten (Asche und Tuffe) Chiles, Japans, Deutschlands und Italiens. Dissertation. Universität Bonn. Germany.
- Besoain, E. 1974. Consideraciones generales sobre la formación de minerales secundarios en los andosoles. Esquema de una secuencia de meteorización de las cenizas volcánicas. *Anales Edafol. Agrobiol.* 33: 343-357.
- Bingham, F.T. 1982. Boron. *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties- Agronomy Monograph Nr. 9 (2nd Edition)*. ASA-SSSA.
- Bodansky, A. 1933. Phosphatase studies. II. Determination of serum phosphatase. Factors influencing the accuracy of the determination. *J. Biol. Chem.* 101: 93-104.
- Bommer, E. & M. Rousseau. 1900. Note préliminaire sur les champignons récoltés par l'Expedition antarctique belge. *Bull. Acad. Roy. Sci. Belgique, Cl. Sci.* 8: 640-646.
- Borie, F. & H. Zunino. 1983. Organic matter-phosphorus associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. *Soil Biol. Biochem.* 15 : 599-603.
- Bougher, N.L. & N. Malajczuk. 1985. A new species of *Descolea* (Agaricales) from Western Australia, and aspects of its ectomycorrhizal status. *Aust. J. Bot.* 33: 619-627.
- Boullard, B. 1965. Considération sur la systematique des mycorrhizes ectotrophique. *Bul. Soc. Bot. Fr.* 112(5): 272.
- Bowen, G.D. & C. Theodorou. 1967. Studies on phosphate uptake by mycorrhizas. 14th IUFRO Congress, Munich. 5 : 116-138.
- Brand, F. 1989. Studies on ectomycorrhizae XXI. Beech ectomycorrhizae and rhizomorphs of *Xerocomus chrysenteron* (Boletales). *Nova Hedwigia*. 48(3-4): 469-483.
- Brand, F. & R. Agerer. 1986. Studien an Ektomykorrhizen VIII. Die Mykorrhizen von *Lactarius subdulcis*, *Lactarius vellereus* und *Laccaria amethystina* an Buche. *Z. Mykol.* 52(2): 287-320.
- Breitenbach, J. & E. Kränzlin. 1991. Champignons de Suisse, contribution á la connaissance de la flore fongique de Suisse. Edition Mykologia Lucerne.
- Bresadola, G. 1900. Hymenomyces fuegiani a cell. viris P. Dusén et O. Nordenskjöld lecti. *Öfvers. Förh. Kongl. Svenska Vetensk. Akad.* 57(2): 311-316.

- Bresinsky, A., Jarosch, M., Fischer, M., Schönberger, I. & B. Wittmann-Bresensky. 1999. Phylogenetic relationships within *Paxillus* s. l. (Basidiomycetes, Boletales): Separation of southern hemisphere genus. *Plant Biol.* 1: 327-333.
- Brownlee, C., Duddridge, J.A., Malibari, A. & D.J. Read. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil.* 71: 433-443.
- Buller, A.H.R. 1933. *Researches on fungi* V. Chapter II. The translocation of protoplasm through the septate mycelium of certain Pyrenomycetes, Discomycetes and Hymenomycetes. Longmanns. Green & Co. London. Toronto.
- Burgess, T., Pascal, L., Malajczuk, N. & F. Martin. 1995. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiotic-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. *Planta.* 195: 408-417.
- Cairney, J.W.G. 1990. Internal structure of mycelial cords of *Agaricus carminescens* from Heron Island, Great Barrier Reef. *Mycol. Res.* 94: 117-119.
- Cairney, J.W.G., Jennings, D.H. & R. Agerer. 1991. The nomenclature of fungal multihyphal aggregates. *Cryptogam. Bot.* 2-3: 246-251.
- Cairney, J.W.G. & S.E. Smith. 1993. Efflux of phosphate from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: general characteristics and the influence of intracellular phosphorus concentration. *Mycol. Res.* 97: 1261-1266.
- Calleja, M., Mousain, D., Lecouvreux, B. & J. D'Auzac. 1980. Influence de la carence phosphatée sur les activités phosphatases acides de trois champignons mycorrhiziens. *Hebeloma edurum* Metrod., *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) O. Kuntze et *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. *Physiologie Végétale.* 18: 489-504.
- Calonge, F.D. 1968. Origin and development of intrahyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. *Mycologia.* 60: 932-942.
- Carcamo, C.A. 2000. Reforestación con *Nothofagus obliqua* y *N. alpina* en el sur de Chile. Tesis de profesorado. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- Casida, L.E. 1959. Phosphatase activity in some common soil fungi. *Soil Science.* 87: 305-310.
- Carrillo, R., Godoy, R. & H. Peredo. 1992. Simbiosis micorrícica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile. *Bosque.* 13(2): 57-67.
- Chambers, S.M. & J.W.G. Cairney. 1999. *Pisolithus*. In: Cairney JWG & Chambers SM (eds.). *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile.* Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Chan, C. & R.C. Stephen. 1967. Intrahyphal hyphae in the genus *Linderia*. *Can. J. Bot.* 45: 1995-1998.
- Chilvers, G.A. 1968. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Aust. J. Bot.* 16: 49-70.
- Clowes, J.A.L. 1950. Root apical meristems of *Fagus sylvatica*. *New Phytol.* 49(2): 248-268.
- Cromack, K., Sollins, P., Granstein, W.C., Speidel, K., Todd, A.W., Spycher, G., Ching, Y.-Li & R.L. Todd. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biology and Biochemistry.* 11: 463-468.
- Cumming, J.R. 1996. Phosphate-limitation physiology in ectomycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings. *Tree Physiol.* 16: 977-983.
- Cumming, J.R. & L.H. Weinstein. 1990. Aluminium-mycorrhizal interactions in the Physiology of pitch pine seedlings. *Plant and Soil.* 125: 7-18.
- Cunill, P. 1970. Factores de la destrucción del paisaje chileno: recolección, caza y tala coloniales. Número especial informaciones geográficas. Santiago. Chile.
- Dexheimer, J., Aubert-Dufrense, M.P., Gérard, J., Letacon, F. & D. Mousain. 1986. Étude de la localisation ultrastructurale des activités phosphatasiques acides dans deux types d'ectomycorrhizes: *Pinus Nigra / nigricans / Hebeloma crustuliniforme et Pinus pinaster / Pisolithus tinctorius*. *Bulletin de la Société Botanique Française.* 133 : 343-352.

- Di Castri, F. & E.R. Hajek. 1976. Bioclimatología de Chile. Vicerrectoría Académica. Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.
- Dighton, J., Poskitt, J.M. & T.K. Brown. 1993. P influx into ectomycorrhizal and saprotrophic fungal hyphae in relation to P supply. *Mycol. Res.* 97: 355-358.
- Dominik, T. 1969. Key to ectotrophic mycorrhizae. *Folia Forest. Polon. Ser. A* 15: 309-328.
- Donoso, C. 1975. Aspectos de la fenología y germinación de las especies de *Nothofagus* de la zona mesomórfica. *Bol. Técn. Nr. 34.* Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago. Chile.
- Donoso, C. 1983. Modificaciones del paisaje chileno a lo largo de la historia. Simposio desarrollo y perspectivas de las disciplinas forestales en la Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- Donoso, C. 1995. Bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Donoso, C. 1996. Ecology of *Nothofagus* forest in central Chile. In: Veblen TT, Hill RS & Read J (eds.). *The ecology and biography of Nothofagus forest.* Yale University Press. New Haven, London. UK.
- Donoso, C. 1997. Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Donoso, C. & J. Atienza. 1983. Hibridación natural entre especies de *Nothofagus* siempreverdes en Chile. *Bosque.* 5(1): 21-34.
- Donoso, C., González, M., Escobar, B., Basso, I. & L. Otero. 1999. Viverización y plantación de Raulí, Roble y Coigüe en Chile. In: Donoso C & Lara A (eds.). *Silvicultura de los bosques nativos de Chile.* Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Donoso, C. & L.R. Landrum. 1979. *Nothofagus leoni* Espinosa, a natural hybrid between *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. and *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *New Zealand Journal of Botany.* 1(17): 353-360.
- Donoso, C. & A. Lara. 1997. Utilización de los bosques nativos en Chile: pasado, presente y futuro. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M(eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile.* Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Donoso, C., Morales, J. & M. Romero. 1990. Hibridación natural entre Roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y Raulí (*N. alpina* (Poepp. y Endl.) Oerst.) en bosques del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural.* 63: 49-60.
- Donoso, J. 1981a. Contribution a la connaissance des Agaricales lignicoles du Chili. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 97: 23-31.
- Donoso, J. 1981b. *Hohenbuehelia* s. Schulz.: définition et affinités taxinomiques. *Criptogamie Micologie.* 2: 151-162.
- Duddridge, J.A. 1987. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations. In: Pegg GF, Ayres PG (eds.). *Fungal infection of plants.* Cambridge University Press. Cambridge. UK.
- Ehrendorfer, F. 1998. Evolution und Systematik. In: Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F & Bresinsky A (Hrsg.). *Strasburger. Lehrbuch der Botanik.* 34. Auflage. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. Germany
- Erland, S. & B. Söderström. 1991. Effects of liming on ectomycorrhizal fungi infecting *Pinus sylvestris* L. III. Saprophytic growth and host plant infection at different pH values by some ectomycorrhizal fungi in unsterile humus. *New Phytol.* 117: 405-411.
- Espinosa, M. 1926. Enumeración de hongos chilenos. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 30: 297.
- Espinosa, M. 1937. Contribución al conocimiento de los hongos chilenos. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat.* 16: 88-110.
- Falandysz, J. & A. Chwir. 1997. The concentrations and bioconcentration factors of mercury in mushrooms from the Mierzeja Wislana sand-bar, northern Poland. *Sci. Total Environ.* 203 : 221-228.
- FAO-UNESCO. 1971. Soil map of the world-1 : 5.000.000, South America. IV. UNESCO. Paris. France.

- FAO-UNESCO. 1988. Soil map of the world, revised legend. 60. UNESCO. Roma. Italy.
- Fassbender, H.W. 1975. Química de suelos. IICA. Turrialba. Costa Rica.
- Felix-Henningsen, P. & P. Broll. 1992. Bodenkundliches Laborpraktikum. 2. Auflage. Landschaftsökologie. Institut für Geographie. Westfälische Wilhelms Universität Münster. Germany.
- Finlay, R.D. & D.J. Read. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytol.* 103: 157-165.
- Flores, R., Godoy, R. & G. Palfner. 1997. Morphology and anatomy of the ectomycorrhiza *Cenococcum geophilum* Fr. on *Nothofagus alessandrii* Esp. *Gayana Bot.* 54(2): 157-162.
- Fox, F.M. 1986. Groupings of ectomycorrhizal fungi of birch and pine, based on establishment of mycorrhizas on seedlings from spores in unsterile soils. *Transactions of the British Mycological Society.* 87: 371-380.
- Frank, B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 3: 128-145.
- Frank, B. 1887. Über neue Mykorrhiza-Formen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 5: 395-408.
- Freiberg, H.M. 1985. Vegetationskundliche Untersuchungen an südchilenischen Vulkanen. *Bonner Geographische Abhandlungen.* Heft 70.
- Gamundi, I.J. & E. Horak. 1993. Hongos de los bosques Andino-Patagónicos. Guía para el reconocimiento de las especies mas comunes y atractivas. Vazquez Mazzini (eds.). Buenos Aires. Argentina.
- Garrido, N. 1981a. Contribución al conocimiento de los Agaricales (Mycota-Basidiomycetes) en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en la Octava Región de Chile. Tesis Depto. Botánica, Universidad de Concepción. Chile.
- Garrido, N. 1981b. Hongos micorrícicos asociados a plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en predios de Forestal Mininco S.A. Superintendencia Técnica, Forestal Mininco S. A. Chile.
- Garrido, N. 1982. Russulaceae en plantaciones introducidas en Chile. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 21: 7-16.
- Garrido, N. 1985. Index Agaricalium Chilensium. *Bibliotheca Mycol.* 99: 1-339.
- Garrido, N. 1986. Survey of ectomycorrhizal fungi associated with exotic forest trees in Chile. *Nova Hedwigia.* 43: 423-442.
- Garrido, N. 1988. Agaricales *s. l.* und ihre Mykorrhizen in den *Nothofagus*-Wäldern Mittelchiles. *Bibliotheca Mycologica.* Band 120. J. Cramer. Berlin, Stuttgart. Germany.
- Garrido, N. & A. Bresinsky. 1985. *Amanita merxmuelleri* (Agaricales), eine neue Art aus *Nothofagus*-Wäldern Chiles. *Bot. Jahrb. Syst.* 107: 521-540.
- Garrido, N., Marticorena, C. & E. Oehrens. 1983. Ecological aspects and crop of *Suillus luteus* (Fungi, Boletaceae) in *Pinus radiata* forest in the Region del Bio-Bio, Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepción.* 54: 89-101.
- Gianinazzi-Pearson, V., Bonfante-Fasolo, P. & J. Dexheimer. 1986. Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoid endomycorrhizal fungi. *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions (NATO, ASI series, vol. 4)* (ed. B. Lugtenberg). Springer. Berlin. Germany.
- Gianinazzi-Pearson, V. & S. Gianinazzi. 1995. Proteins and protein activities in endomycorrhizal symbioses. In: Varma AK & Hock B (eds.). *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology.* Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Gibelli, G. 1883. Nuovi studii sulla malattia del castagno detta dell' inchiostro. *Mem. Accad. Sci. Ist. Bologna.* 4: 287- 314.
- Godbout, C. & J. Fortin. 1983. Morphological features of synthesized ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *Alnus rugosa*. *New Phytol.* 94: 249-262.

- Godeas, A.M., Arambarri, A. & I.J. Gamundi. 1993a. Micosociología en los bosques de *Nothofagus* de Tierra del Fuego I. Diversidad, abundancia y fenología. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Matemáticas. 45: 291-302.
- Godeas, A.M., Arambarri, A. & I.J. Gamundi. 1993b. Micosociología en los bosques de *Nothofagus* de Tierra del Fuego II. Importancia relativa de las distintas especies de macromicetes. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Matemáticas. 45: 303-311.
- Godeas, A.M., Arambarri, A. & I.J. Gamundi. 1993c. Micosociología en los bosques de *Nothofagus* de Tierra del Fuego III. Análisis de las comunidades de macromicetes. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Matemáticas. 45: 313-318.
- Godoy, R. & G. Palfner. 1997. Ectomicorrizas en *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst. y *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. del sur de Chile. Bol. Micol. 12(1-2): 55-61.
- Grez, R. 1977. Nöhrelementhaushalt und Genese von Böden aus vulkanischen Aschen in Südchile. Institut für Bodenkunde und Waldernährungslehre der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Hrg.). Freiburger Bodenkundliche Abhandlungen. Freiburg im Breisgau. Germany.
- Grez, R., Piel, L. & R. Añazco. 1990. Algunas consideraciones en torno a los métodos de extracción de suelos utilizados para el diagnóstico nutricional. Actas VI Congreso Nacional de Ciencias del suelo. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile.
- Gronbach, E. 1988. Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilität in sauer beregneten Flächen. Bibl. Mycol. Band 125.
- HacsKaylo, E. 1971. The role of mycorrhizal associations in the evolutions of the higher Basidiomycetes. In: Peterson R (ed.). Evolution in the higher Basidiomycetes. An International Symposium. University Tennessee Press. Knoxville. USA.
- Hahn, C. 1996. Studies in the genus *Paxillus*. I. *Paxillus gymnopus*. A new *Paxillus* from the Pacific rainforests of Columbia. Z. Mykol. 62: 43-60.
- Hariot, P. 1889. Champignons. Mission Scientifique du Cap Horn. 5. Botanique. 173-200.
- Harley, J.L. & S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London. UK.
- Harrison, A.F. 1983. Soil organic phosphorus - A review of world literature. CAB International. Wallingford. UK.
- Härtel, S. 2000. Strukturen, Kinetik und Dynamik nekrobiologischer Prozesse im Fokus bildverarbeitender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Dissertation. Universität Bremen. Germany.
- Hatch, A.B. 1934. A jet-black Mycelium forming ectotrophic mycorrhizas. Sven. Bot. Tidskr. 28: 369-383.
- Hayano, K. 1987. Characterization of a phosphodiesterase component in a forest soil extract. Biol. Fertil Soils. 3: 159-164.
- Heinrich, P.A., Mulligan, D.R. & J.W. Patrick. 1988. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. Plant Soil. 109: 147-149.
- Ho, I. 1989. Acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nitrate reductase activity of selected ectomycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 67: 750-753.
- Ho, I. & B. Zak. 1979. Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 57: 1203-1205.
- Holford, I.C.R. 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. Aust. J. Soil. Res. 35: 227-239.
- Horak, E. 1967. Fungi Austroamericani. IV. Revisión de los hongos superiores de Tierra del Fuego o Patagonia en el Herbario de C. Spegazzini en La Plata. Darwiniana. 14(2-3): 355-376.
- Horak, E. 1971. Studies on the genus *Descolea* Sing. Persoonia. 6(2): 231-248.
- Horak, E. 1977. New and Rare Boletes from Chile. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 18(1-2): 97-109.

- Horak, E. 1979a. Fungi, Basidiomycetes. Agaricales y Gasteromycetes secotioides. In: Guarrera SA, Gamundi de Amos I & Rabinovich de Halperin D (eds.). Flora criptogámica de Tierra del Fuego. Tomo 11(6): 1524. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Buenos Aires. Argentina.
- Horak, E. 1979b. Paxilloid Agaricales in Australasia. *Sydowia*. 32 : 154-166.
- Horak, E. 1983. Mycogeography in the South Pacific Region : Agaricales, Boletales. *Austral. J. Bot. suppl. ser. 10* : 1-41.
- Huang, Z., You W., Haugland, R.P., Paragas, V.B., Olson, N.A., & R.P. Haugland. 1993. A novel fluorogenic substrate for detecting alkaline phosphatase activity in situ. *J. Histochem. Cytochem.* 41(2): 313-317.
- Huber, A. 1975. Beitrag zur Klimatologie und Klimaökologie von Chile. Dissertation. Universität München. Germany.
- Ingleby, K., Mason, P.A., Last, F.T. & L.V. Fleming. 1990. Identification of ectomycorrhizas. HMSO. London. UK.
- Jeffries, P. 1999. *Scleroderma*. In: Cairney JWG & Chambers SM (eds.). Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile. Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Joner, E.J. & A. Johansen. 2000. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104(1): 81-86.
- Kammerbauer, H., Agerer, R. & H.J. Sandermann. 1989. Studies on ectomycorrhiza XXII. Mycorrhizal rhizomorphs of *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* in association with Norway spruce (*Picea abies*): formation *in vitro* and translocation of phosphate. *Trees*. 3: 78-84.
- Kay, H.D. 1930. Plasma phosphatase. I. Method of determining some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 89 : 235-247.
- Kieliszewska-Rokicka, B. 1992. Acid phosphatase activity in mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings in relation to nitrogen and phosphorus nutrition. *Acta Soc. Bot. Pol.* 61: 253-264.
- Kranabetter, J.M. 1999. The effect of refuge trees on a paper birch ectomycorrhiza community. *Can. J. Bot. -Rev. Can. Bot.* 77(10) : 1523-1528.
- Lakowicz, J.R. 1983. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press. New York.
- Lapeyrie, F., Ranger, J. & D. Vairelles. 1991. Phosphate-solubilising activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Can. J. Bot.* 69: 342-346.
- Laugénie, C.A., Colmet-Daage, F., Besoain, E. & M. Delaune. 1975. Notes sur les limons volcaniques des glaciers chiliens meridionaux. *Buletin de la Asociación de Géographie Française.* 426: 187-193.
- Lazo, W. 1982, 1983, 1984. Introducción al estudio de los hongos superiores I., II., III. *Bol. Micol.* 1: 19-30; 1: 77-119; 2: 27-66.
- Lihnell, D. 1942. *Cenococcum graniforme* als Mykorrhizabildner von Waldbäumen. *Symb. Bot. Ups.* 5: 1-19.
- Lindsay, W.L., Vlek, P.L.G. & S.H. Chien. 1989. Phosphate minerals. In: Dixon JB & Weed SB (eds.). Minerals in soil environment. 2^d Edition-SSSA Monograph no. Published by SSSA. Madison, Wisconsin.
- LoBuglio, K.F., Berbee, M.L. & J.W. Taylor. 1996. Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among the ascomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 6(2): 287-294.
- Lowry, R.J. & A.S. Sussmann. 1966. Intrahyphal hyphae in Clock mutants of *Neurospora*. *Mycologia.* 58: 541-548.
- Lynch, J. 1995. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109: 7-13.
- Mahler, R.L., Naylor, D.V. & M.K. Fredrickson. 1984. Hot water extraction of Boron from soils using sealed plastic pouches. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15: 479-492.

- Malajczuk, N., Molina, R. & J. Trappe. 1982. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity, and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytol.* 91: 467-482.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego. CA.
- Martens, D.C. & W.L. Lindsay. 1990. Testing Soils for Cu, Fe, Mn and Zn. *Soil Testing and Plant Analysis*. 3 rd Ed. Westerman RL (ed.). USA.
- Martin, F., Laurent, P., de Carvalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P. & D. Tagu. 1999. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* 27: 161-174.
- Marx, D.H. 1977. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Microbiol.* 23: 217-223.
- Mason, P.A., Last, F.T., Wilson, J., Deacon, J.W., Fleming, L.V. & F.M. Fox. 1987. Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi. In: Pegg GF & Ayres PG (eds.). *Fungal infection of plant*. Cambridge University Press. Cambridge.
- McElhinney, C. & D.T. Mitchell. 1993. Phosphatase activity of four ectomycorrhizal fungi found in a Sitka spruce-Japanese larch plantation in Ireland. *Mycol. Res.* 97(6): 725-732.
- Meixner, A. 1975. Chemische Farbreaktionen von Pilzen. A.R. Gantner. KG. Strauß und Cramer GmbH. Germany.
- Mella, A. & A. Kühne. 1985. Mapa de ubicación de los suelos derivados de materiales volcánicos, 1 : 1.000.000. In: Tosso J (ed.). *Suelos volcánicos de Chile. Mapas geológicos y carta de suelos*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Santiago. Chile.
- Melville, R. 1973. Continental drift, mesozpic continents and the migrations of the angiosperms. *Natura*. 2211: 116-120.
- Molina, R. & J.G. Palmer. 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenck NC (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopathological Society. St. Paul.
- Molina, R. & J. Trappe. 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *For. Sci.* 28: 1223-1228.
- Montagne, C. 1853. Hongos. In: Gay C. *Historia física y política de Chile. Botánica*. 7: 328-515. (in atlas Criptogamia).
- Mooney, H.A. 1977. Convergent evolution in Chile and California Mediterranean climate ecosystems. Dowden Hutchinson & Ross. Stroudsburg, Pennsylvania. USA.
- Mooney, H.A., Dunn, E.L., Shropshire, F. & L. Song JR. 1972. Land use history of California and Chile as related to the structure of the sclerophyll scrub vegetations. *Madroño*. 21: 305-319.
- Moreno, R.H. 1974. Airplane flight over active volcanoes of Central-South Chile. *Guide Book-Excursion D-3. International Symposium on Volcanology. IAVCEI*. Santiago. Chile.
- Moser, M. 1967. Die ektotrophe Ernährungsweise an der Waldgrenze. *Mitt. Forstl. Bundesversuchsanstalt. Mariabrunn. Wien.* 75: 357-380.
- Moser, M. 1978. Die Röhrlinge und Blätterpilze: Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales. *Kleine Kryptogamenflora*. 4. Auflage. Band IIb/2. Gustav Fischer. Stuttgart, New York.
- Moser, M. & E. Horak. 1975. *Cortinarius* Fr. und nahe verwandte Gattungen in Südamerika. *Beih. Nova Hedwigia*. 52: 1-628.
- Munsell. 1954. *Soil Color Charts*. Baltimore.
- Nelson, D.W. & L.E Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *Methods of Soil Analysis*. Page AL (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. USA.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & M.E. McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue. *Protoplasma*. 59: 367-373.
- Olivier, J.M., Guinberteau, J. & J. Rondet. 1997. Vers l'inoculation contrôlée des Cèpes et Bolets comestibles. In: *Rev. For. Fr.*, XLIX.

- Olsen, S.R. & L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. methods of soil analysis. Page AL (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. USA.
- Oyarzún, C., Campos, H. & A. Huber. 1997. Exportación de nutrientes en microcuencas con distinto uso del suelo en el Sur de Chile (Lago Rupanco, X. Region). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70: 507-519.
- Palfner, G. 1996. *Thaxterogaster albocanus* Horak & Moser + *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. In: Agerer R (ed.). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Plate 110. Descriptions of Ectomycorrhizae 1: 155-160.
- Palfner, G. 1997. *Descolea antarctica* Singer + *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. In: Agerer R (ed.). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Plate 116. Descriptions of Ectomycorrhizae 2: 7-12.
- Palfner, G. & R. Godoy. 1996a. *Nothofagirhiza vinicolor* + *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. In: Agerer R (ed.). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Plate 98. Descriptions of Ectomycorrhizae 1: 65-70.
- Palfner, G. & R. Godoy. 1996b. *Russula fuegiana* Singer + *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. In: Agerer R (ed.). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Plate 106. Descriptions of Ectomycorrhizae 1: 131-136.
- Paragas, V.B., Zang, Y.Z., Haugland, R.P. & V.L. Singer. 1997. The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. *J. Histochem. Cytochem.* 45(3): 345-357.
- Parfitt, R.L. 1989. Phosphate reactions with natural allophane, ferrihydrite and goethite. *J. Soil Sci.* 40: 359-369.
- Pegler, D.N. & T.W.K. Young. 1971. Basidiospore morphology in the Agaricales. *Nova Hedwigia*. Heft 35.
- Peredo, H., Oliva, M. & A. Huber. 1983. Environmental factors determining the distribution of *Suillus luteus* fructifications in *Pinus radiata* grazing forest plantations. *Plant and Soil.* 71: 367-370.
- Philippi, R. 1869. Elementos de botánica. Santiago IX, 571 págs.
- Ramirez, C., San Martin, J., Hauenstein, E. & D. Contreras. 1989. Estudio fitosociológico de la vegetación de Rucamanque (Cautín, Chile). *Studia Botanica.* 8: 91-115.
- Rao, C.S., Sharma, G.D. & A.K. Shukla. 1997. Distribution of ectomycorrhizal fungi in pure stands of different age groups of *Pinus kesiya*. *Can. J. Microbiol.* 43(1): 85-91.
- Reissbrodt, R. & H. Friedler. 1997. Sterilisations- und Nährbodentechnik. In: Dunger W & Fiedler H J (Hrsg.). Methoden der Bodenbiologie. 2. Auflage. Gustav Fischer. Stuttgart. Germany.
- Richardson, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota.* 50-62.
- Richter, G. 1998. Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels. 6. Auflage. Georg Thime. Stuttgart, New York.
- Romell, L. 1926. Basidiomycetes from Juan Fernandez, collected by C. Skottsberg. In: Skottsberg K (ed.). The natural history of Juan Fernandez and Easter Island. 2 : 465-471.
- Rousseau, J.V., Reid, C.P. & R.J. English. 1992. Relationship between biomass of the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and phosphorus uptake in loblolly pine seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 24(2) : 183-184.
- Rovira, A. 1984. Geografía de los suelos. Geografía de Chile. V. Instituto Geográfico Militar. Santiago. Chile.
- Rundel, P.W. 1981. The matorral zone of central Chile. In: DiCasta F, Goodall DW & Spech RL (eds.). Ecosystems of the world 11. Mediterranean type shrublands. Elsevier. Scientific. Publ. Amsterdam. Netherlands.
- Sadzawka, A. 1990. Métodos de análisis de suelos. INIA. Estación experimental La Platina Serie La Platina Nr. 16. Santiago. Chile.
- Sadzawka, A. & M.A. Carrasco. 1985. Química de los suelos volcánicos. In: Tosso J (ed.). Suelos volcánicos de Chile. Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA). Santiago. Chile.

- Saelzer, F. 1977. La protección legal de los recursos naturales renovables de Chile. Una mirada retrospectiva. Universidad Austral de Chile. Charlas y Conferencias Nr.5: 61-87.
- Sakr, R. & B. Meyer. 1970. Mineral-Verwitterung und –Umwandlung in typischen sauren Lockerbraunerden in einigen Mittelgebirgen Hessens. Göttinger Bodenkundliche Berichte. 14: 1-47.
- San Martin, C. & C. Ramirez. 1987. Fitosociología de los *Nothofagus* de la zona mesomórfica chilena. Bosque. 8(2): 121-125.
- San Martin, C., Ramirez, C., Figueroa, H. & N. Ojeda. 1991. Synecological study of the roble-laurel-lingue forest in south-central Chile. Bosque. 12(2): 11-27.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J. & S.M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol. 116: 447-453.
- Schachtschabel, P., Blume, H.-P., Brümmer, G., Hartge, K.H. & U. Schwertmann. 1998. Lehrbuch der Bodenkunde. 14. Auflage. Ferdinand Enke. Stuttgart. Germany.
- Schaller, K. 1993. Praktikum zur Bodenkunde und Pflanzenernährung. 7. Auflage. Geisenheim. Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim (Hrsg.). Geisenheimer Berichte. Band 2. Germany.
- Scheffer, F. & P. Schachtschabel. 1998. Lehrbuch der Bodenkunde. 14. Auflage. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart. Germany.
- Schlatter, J.E. 1999. Investigaciones sobre suelos forestales en el centro y sur de Chile. 14° Congreso Latinoamericano de la Ciencia del suelo. Pucón-Temuco. Chile. 8-12 Noviembre. Chile.
- Schlatter, J.E., Grez, R. & V. Gerding. 1981. Manual para el reconocimiento de suelos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Valdivia. Chile.
- Schlichting, E., Blume, H.P. & K. Stahr. 1995. Bodenkundliches Praktikum. 2. Auflage. Verl. Blackwell Wiss. Berlin, Oxford (u.a.).
- Shinohara, M.L., LoBuglio, K. & S.O. Rogers. 1999. Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. Curr. Genet. 35: 527-535.
- Singer, R. 1951. *Descolea antarctica*, género y especie nuevos de Tierra del Fuego (New genera of fungi V). Lilloa. 23: 255-258.
- Singer, R. 1964. Areal und Ökologie des Ektotrophs in Südamerika. Zschr. Pilzk. 30: 8-14.
- Singer, R. 1968. Nuevos hongos descubiertos en Chile. Biológica (Santiago). 49: 69-71.
- Singer, R. 1969. Mycoflora Australis. Beih. Nova Hedwigia. 29: 1-406.
- Singer, R. 1971. Forest mycology and communities in South America II. Mycorrhiza sociology and fungus succession in the *Nothofagus dombeyi-Austrocedrus chilensis* wood of Patagonia. In: Hacskeylo R (ed.). Mycorrhizae. USDA Forest Serv., Misc. Publ. 1189: 204-215.
- Singer, R. 1973. Diagnoses fungorum agaricalium III. Beih. Sydowia 7: 1-106.
- Singer, R. 1978a. Note on the bolete taxonomy II. Persoonia. 9(4): 421-438.
- Singer, R. 1978b. Origins of the deficiency of Amazonian soils – a new approach. Acta Amazonica. 8: 315-316.
- Singer, R. 1984. The role of fungi in the Amazonian forest and in the reforestation. In: Sioli H (ed.). The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Netherlands.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4. Auflage. Koenigstein : Koeltz Scientif. Books.
- Singer, R. & I. Araujo. 1979. Litter decomposition and ectomycorrhiza in amazonian forest. 1. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosolterrafirme rain forest and white podzol campinarana. Acta Amazonica. 9: 25-41.
- Singer, R., Araujo, I. & M. Ivory. 1983. The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowland, especially Central Amazonia. (Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonia forest 2.). Beih. Nova Hedwigia. 77: 1-352.

- Singer, R. & A.P.L. Digilio. 1952. Pródromo de la Flora Agaricina Argentina. Lilloa. 25: 5-463.
- Singer, R. & J. Morello. 1960. Ectotrophic forest trees mycorrhizae and forest communities. Ecology. 41(3): 549-551.
- Singer, R. & M. Moser. 1965. Forest mycology and forest communities in South America. Mycopathol. Mycol. Appl. 26(2-3): 130-191.
- Skinner, M.F. & G.D. Bowen. 1974. The uptake and translocation of phosphate by mycelial strands of pine mycorrhizas. Soil Biol. Biochem. 6: 53-56.
- Smith, S.E. & D.J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Second Edition. Academic Press. London. UK.
- Soto, D. & H. Campos. 1997. Oligotrophic lakes in the temperate rain forest of southern Chile. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M (eds.). Ecología de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Spegazzini, C. 1910. Fungi chilensis (ramillete de hongos chilenos) 205 págs. Ilust. Librería Nac. B. Aires. Buenos Aires. Argentina.
- Spegazzini, C. 1921. Mycetes chilensis. Bol. Acad. Nac. Ciencias. 25: 1-124.
- Spegazzini, C. 1922. Cryptogamae nonnullae fuegianae. Anales Soc. Ci. Argent. 94: 59-85.
- Spegazzini, C. 1917-1925. Sobre algunos hongos chilenos. Rev. Chil. Hist. Nat. 21: 79-81; 21: 117-126; 22: 54-62; 29: 58-64.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Steubing, L., Godoy, R. & M. Alberdi. 2000 Métodos de ecología vegetal. Editorial Universitaria. Chile. (in press).
- Straker, C.J. & D.T. Mitchell. 1986. The activity and characterization of acid phosphatases in endomycorrhizal fungi of the Ericaceae. New Phytol. 104: 243-256.
- Stone, E.L. 1950. Some effects of mycorrhizae on the phosphorus nutrition of Monterey pine seedlings. Proceedings of the Soil Science Society of America. 14: 340-345.
- Tabatabai, M.A. & J.M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 301-307.
- Tagu, M. & F. Martin. 1996. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomykorrhiza development. New Phytol. 133: 73-85.
- Termoshuizen, A.J. 1991. Succession of mycorrhizal fungi in stands of *Pinus sylvestris* in the Netherlands. Journal of Vegetation Science. 2: 255-264.
- Theodorou, C. 1968. Inositol phosphate in needles of *Pinus radiata* D. Don and the phytase activity of mycorrhizal fungi. Proceedings of the 9th International Congress of Soil Science. 3: 483-493.
- Thomas, G.W. 1982. Exchangeable cations methods of soil analysis. Page AL (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. USA.
- Thomazini, L. 1974. Mycorrhiza in plants of the Cerrado. Plant and Soil. 41: 707-711.
- Tibbett, M., Chambers, S. M. & J. W. G. Cairney. 1998. Methods for determining extracellular and surface-bound phosphatase activities in ectomykorrhizal fungi. In: Varma. Mycorrhiza manual. Chapter 14. Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & A. Gollotte. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. Mycol. Res. 97: 245-250.
- Tomaselli, R. 1981. The longitudinal zoning of vegetation in the southern sector of the Andes. Studi Trentini di Scienze Naturali Acta Biologica. 58: 471-484.
- Trappe, J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev. 28: 538-606.
- Trappe, J. 1967. Principles of classifying ectotrophic mycorrhizae for identification of fungal symbionts. Proc. Int. Forest Res. 24: 46-59.

- Trappe, J.M. 1971. Mycorrhiza-forming Ascomycetes. In: HacsKaylo E (ed.). Mycorrhizae. Washington. USA.
- Treu, R. 1990. Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen aus dem Nationalpark Berchtesgaden. *Bibl. Mycol.* Band 134.
- Uhl, M. 1988. Identifizierung und Charakterisierung von Ektomykorrhizen an *Pinus silvestris* und Ektomykorrhizen aus der Gattung *Tricholoma*. Dissertation. Universität München. Germany.
- USDA Soil Survey Staff. 1975. Soil Taxonomy, Agriculture Handbook. 436: 1-754.
- Valenzuela, E. 1993. Estudio sistemático, corológico y ecológico de los agaricales *sensu lato* de los bosques autóctonos de la región de Los Lagos en Chile. Trabajo de doctorado. Departamento de Biología Vegetal. Sección Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Alcalá de Henares. España.
- Valenzuela, E. & G. Moreno. 1997. Sporal ornamentation (MEB) and taxonomy of some strains of *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycetes) in native forest of X. Región-Chile. *Bol. Micol.* 12(1-2): 107-118.
- Valenzuela, E., Moreno, G., Garnica, S. & C. Ramirez. 1998. Micosociología en bosques nativos de *Nothofagus* y plantaciones de *Pinus radiata* en la X. Región de Chile: diversidad y rol ecológico. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 133-146.
- Valenzuela, E., Moreno, G. & J. Grinbergs. 1992a. Agaricales *sensu lato* de Chile I. *Boletín Sociedad Micológica de Madrid.* 17: 81-93.
- Valenzuela, E., Moreno, G. & J. Grinbergs. 1992b. Algunas Boletaceae que fructifican en el sur de Chile. *Bol. Micol.* 7(1-2): 1-5.
- Van Aarle, I., Olsson, P.A. & B. Söderström. 2001. Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia.* 93(1): 17-24.
- Veblen, T.T. 1985. Stand dynamics in Chilean *Nothofagus* forest. In: Pickett ST & White PS (eds.). *The ecology of natural disturbance and patch dynamics.* Academic Press. New York. USA.
- Veblen, T.T. & D.H. Ashton. 1978. Catastrophic influences on the vegetation of the Valdivian Andes. *Vegetatio:* 36: 149-167.
- Veblen, T.T., Kitzberger, T., Burns, B.R. & A.J. Rebertus. 1997. Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del sur de Chile y Argentina. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M (eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile.* Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Veit, H. & K. Garleff. 1997. Evolution of the Quaternary Landscape and soils in South-Central Chile. In: Armesto JJ, Villagrán C & Arroyo Kalin M (eds.). *Ecología de los bosques nativos de Chile.* Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Wada, S.I., Kakuto, Y., Itoi, R. & T. Jai. 1994. Evaluation of calcium dihydrogen phosphate solution as an extractant for inorganic sulfate applied to soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25(11/12): 1947-1955.
- Walker, R.F., West, D.C., McLaughlin, S.B. & C.C. Amundsen. 1989. Growth, xylem pressure potential, and nutrient absorption of loblolly pine on a reclaimed surface mine as affected by an induced *Pisolithus tinctorius* infection. *For. Sci.* 35: 569-581.
- Wall, L.L., Gehrke, C.W. & J. Suzuki. 1980. An automated turbidimetric method for total sulfur in plant tissue and sulfur in soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 11: 1087-1103.
- Wallander, H. & B. Söderström. 1999. *Paxillus*. In: Cairney JWG & Chambers SM (eds.). *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile.* Springer. Berlin, Heidelberg. Germany.
- Weinberger, P. 1971. Charakteristische Eigenschaften und die Fruchtbarkeit südchilenischer Graslandböden auf vulkanischen Aschen. *Der Tropenlandwirt.* April 1971.
- Wessels, J.G.H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology.* 42: 413-437.

- Wilhelm, E.J. 1968. Fire ecology of the Valdivian Rain Forest. Proceeding 8th Conference of Tall Timbers Fire Ecology.
- Woolhouse, H.W. 1969. Differences in the properties of the acid phosphatases of plant roots and their significance in the evolution of edaphic ecotypes. In: Rorison ICH (ed.). Ecological aspects of the mineral nutrition of plants. Blackwell, Oxford.
- Wright, J. 1988. Interrelaciones entre macromycetes (fungi) y *Nothofagus*. Acad. Nac. Cs. Exactas. Fis. y Nat. Monografía 4: 135-152. Agaricales 2(6): 1-524. Buenos Aires. Argentina.
- Zak, B. 1969. Characterization and classification of mycorrhizae of Douglas fir I. *Pseudotsuga menziesii* + *Poria terrestris* (blue and orange staining strains). Can. J. Bot. 47: 1833-1840.
- Zak, B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. In: Marks GC & Kozlowski TT (eds.). Ectomycorrhizae-their ecology and physiology. Academ. Press. New York, London.
- Ziegler, H. 1998. Physiology. In: Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F & Bresinsky A (Hrsg.). Strasburger. Lehrbuch der Botanik. 34. Auflage. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. Germany.
- Zunino, H. & F. Borie. 1985. Materia orgánica y procesos biológicos en suelos alofánicos. In: J Tosso (ed.). Suelos volcánicos de Chile. INIA. Santiago. Chile.
- Zunino, H., Borie, F., Aguilera, M., Peirano, P., Caiozzi, M. & J. Martin. 1982. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. I. Ecología microbiana y su relación con las propiedades físico-químicas de ellos. Agricultura Técnica. 42(1): 67-72.

8. ANHANG

8.1 Anatomisch-morphologische Untersuchungen an mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua*

8.1.1 Einbettungsverfahren der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* für die Lichtmikroskopie

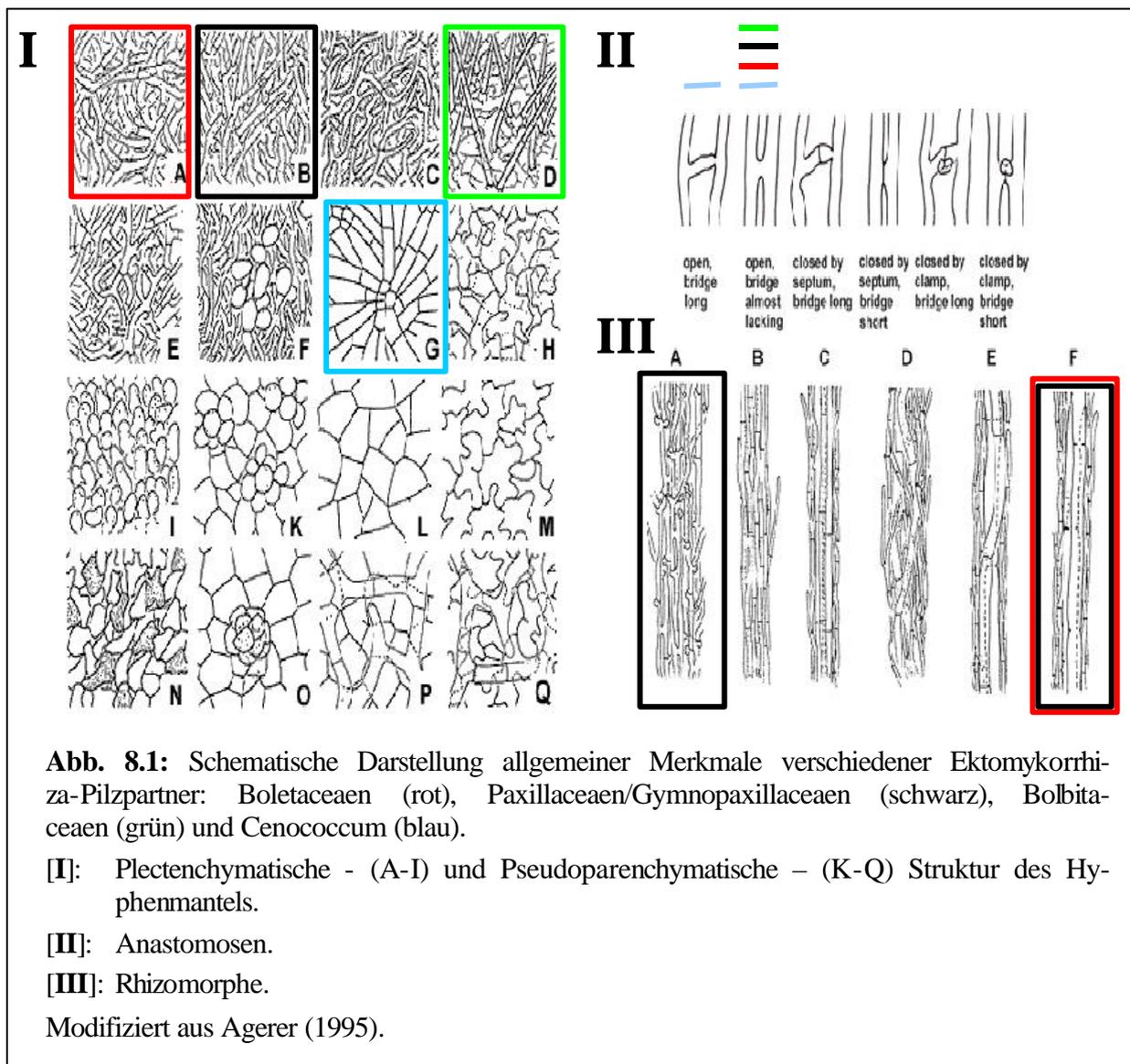
1. Ausgewählte 2-3 mm kleine mykorrhizierte und unmykorrhizierte Kurzwurzeln von *N. obliqua* wurden über 10-12 h in 3 % Glutaraldehyd, 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH = 7) fixiert.
2. Nach wiederholtem Waschen der Wurzelproben (5 x jeweils 15 min) mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH = 7) begann ihre Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Acetonreihe (15 %, 30 %, 50 %, 70%, 90 % und 2 x 100 %, für jeweils 10 min).
3. Die Infiltration der Wurzelproben mit Kunststoff erfolgte nach Spurr (1969) durch eine aufsteigende Kunststoffkonzentration in Aceton (Spurr-Aceton im Verhältnis 1:4, 1:2, 4:1, für jeweils 8 h). Die Infiltration in 100 % Spurr wurde über 2 Tage mit regelmäßigem Wechsel des Kunststoffes durchgeführt. Eine vollständige Infiltration ist durch ein Absinken der Probe zu erkennen.
4. Die Wurzelproben wurden in Gelatine-Kapseln ausgerichtet und bei 70°C im Ofen für 12-15 h auspolymerisiert.

8.1.2 Präparation der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln von *N. obliqua* für rasterelektronenmikroskopische Betrachtungen

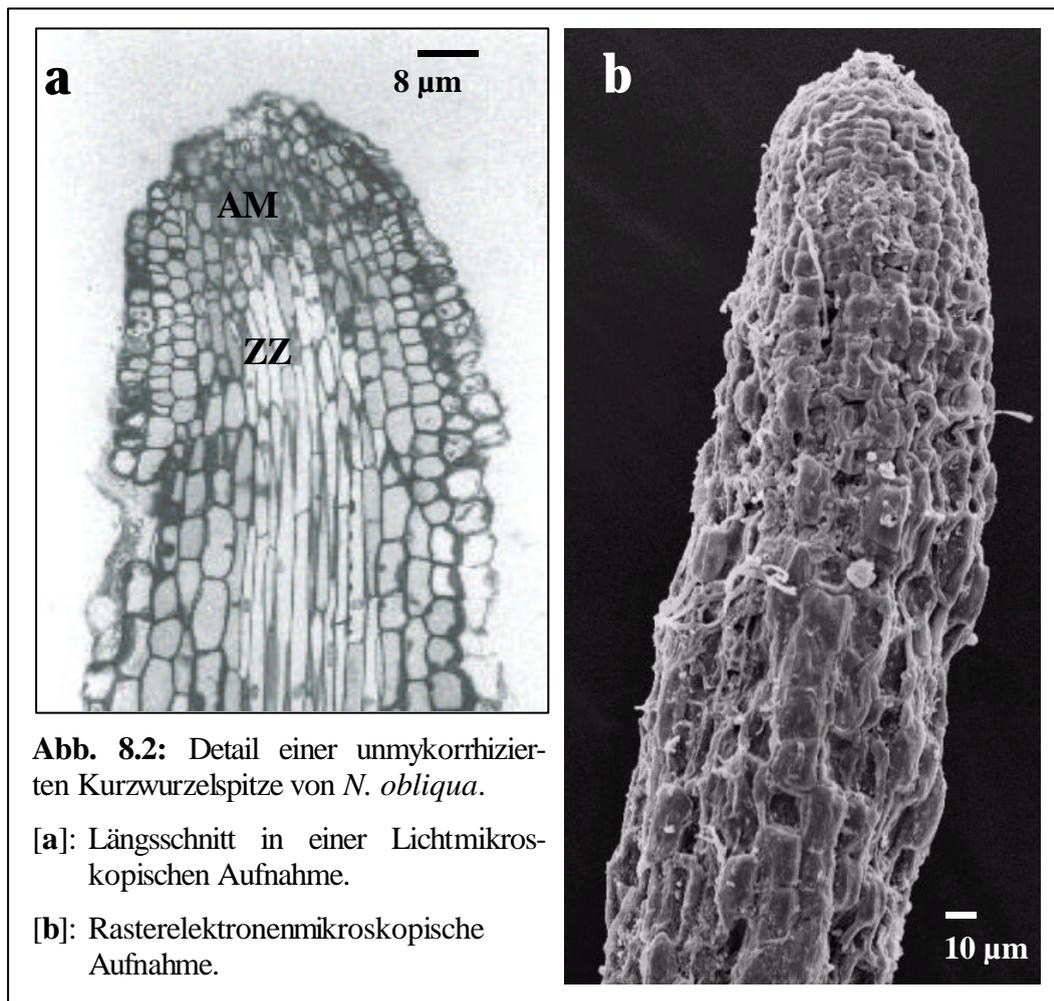
1. Ausgewählte 2-3 mm kleine mykorrhizierte und unmykorrhizierte Kurzwurzeln wurden über 10-12 h in 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7 fixiert.
2. Nach wiederholtem Waschen der Wurzelproben (5 x jeweils 15 min) mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH = 7) begann die Entwässerung der Wurzelproben in aufsteigender Acetonreihe (15 %, 30 %, 50 %, 70%, 90 % und 2 x 100 %, für jeweils 10 min).
3. Unter Anwendung einer 'Kritischer-Punkt-Trocknung' wurde das Aceton gegen Kohlendioxid ausgetauscht.

4. Die Wurzelproben wurden auf Aluminium-Probentellern ausgerichtet, auf deren Oberflächen beidseitig klebende Leit-Tabs (Plano, Marburg) aufgebracht waren.
5. Im Anschluß wurden die Proben mit Gold bedampft und im Rasterelektronenmikroskop (Leo 420, Leo, Leika/Zeiss) beobachtet.

8.1.3 Merkmalstafel zur Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen



8.1.4 Aufnahmen einer unmykorrhizierten Kurzwurzelspitze von *N. obliqua*.



8.2 Zusammensetzung des von Marx modifizierten Melin-Norkrans (MMN) -Nährmediums zur Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen

Die Zusammensetzung des von Marx modifizierten Melin-Norkrans (MMN) -Nährmedium nach Molina & Palmer (1982) ist in Tab. 8.1. dargestellt. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH = 5 eingestellt.

Für Festkulturen wurde zusätzlich 20 g / l Agar-Agar verwendet. Die mit (*) gekennzeichneten Punkte in Tab. 8.1 markieren Änderungen des Rezeptes von Molina & Palmer (1982), wie sie in der Arbeitsgruppe „Physiologische Pflanzenanatomie“ der Universität Bremen vorgenommen werden.

Nährstoffe	MMN [g / l]
* Malz-Extrakt	5
d-Glucose	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ " 7H ₂ O	0,15
CaCl ₂	0,05
* Fe-EDTA	0,022
NaCl ₂	0,025
Thiamine HCl	1 x 10 ⁻⁴

Tab. 8.1: Zusammensetzung des von Marx modifizierten Melin-Norkrans (MMN) - Nährmedium (Molina & Palmer 1982).

8.3 Zusammensetzung des MMN-Nährmediums zur Kultivierung von Ektomykorrhizapilzen unter Variation des Phosphatangebotes

Messungen der extrazellulären und der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität erfolgten mit Mykorrhizapilzen, die zuvor mit variierendem Phosphatangebot kultiviert worden waren. Verwendet wurden Pilzisolat von *Austropaxillus boletinoides*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Descolea antarctica* und *Cenococcum geophilum*, welche zuvor in MMN-Agar-Nährmedium erfolgreich isoliert und kultiviert wurden (Kap. 3.1.2.5).

Die Überimpfung der Festkulturen in Flüssigkulturen mit unterschiedlichem Phosphatangebot erfolgte mit jungem Myzelium der Kulturen. Mit Hilfe eines Korkbohrers ($\varnothing = 7$ mm) wurde 4 mal junges Myzelium ausgestochen. Mit einem Skalpell wurde das junge Myzelium von Agarresten getrennt und das isolierte Myzel in 50 ml-Kölbchen mit MMN-Flüssigmedium überführt. Um Wachstumsbedingungen bei unterschiedlichem Phosphatangebot im MMN-Flüssigmedium zu erhalten, wurden die Standardansätze des MMN-Nährmedium (Kap. 8.3) wie folgt verändert:

- **100 % Phosphatangebot:** keine Änderungen.
- **60 % Phosphatangebot:** (NH₄)₂HPO₄: 0,15 g/l, KH₂PO₄ :0,3 g/l, NH₄NO₃ :0,061 g/l, KOH: 0,056 g/l.
- **30 % Phosphatangebot:** (NH₄)₂HPO₄: 0,075 g/l, KH₂PO₄ :0,15 g/l, NH₄NO₃ :0,11 g/l, KOH: 0,098 g/l.
- **0 % Phosphatangebot:** NH₄NO₃ :0,151 g/l, KOH: 0,14 g/l.

Die weitere Kultivierung erfolgte bei 25°C, dunkel, als Standkultur.

8.4 Spektrometrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität mit Hilfe von pNPP

Die colorimetrische Bestimmung der extrazellulären und oberflächengebundenen Phosphataseaktivität in Mykorrhizapilzen basiert auf der Hydrolyse von p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) durch Phosphatasen in p-Nitrophenol-Phosphat (pNP) + P (vergl. Kap. 3.3.1). Die Präparationen erfolgten nach Tibbett *et al.* (1998) und Antibus *et al.* (1992):

Präparation der Stammlösung (250 ml):

<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>	3,025 g
<i>Maleic acid</i>	2,90 g
<i>Citric acid</i>	3,5 g
<i>Boric acid</i>	1,57 g
1M NaOH	122 ml

Mit Aq_{Bidest} bis 250 ml auffüllen. Die Stammlösung wurde bei Dunkelheit und 4°C gelagert und innerhalb von 2 Monaten verbraucht.

Präparation der Pufferlösung mit variierenden pH-Werten:

Um die gewünschten pH-Werte (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) zu erhalten, wurden 250 ml Stammlösung mit 0,1 M HCl und Aq_{Bidest} eingestellt und bis 1000 ml aufgefüllt.

Präparation der Eichlösung zur Kalibrierung:

1. 1 g / l p-Nitrophenol-Phosphat (pNP, SIGMA, 104-8) in 1:1 Pufferlösung und 1M NaOH lösen.
2. Für die Eichkurve wird aus dieser Lösung eine Verdünnungsreihe 100, 80, 60, 40, 20, und 10 µg pNP / 10 ml in Pufferlösung (1 M NaOH) vorbereitet.
3. Die Messung der pNP- Eichlösung erfolgte im Maximum der Absorption bei 407 nm mit einem Shimadzu UVPCV 3.0 Spektrophotometer (vergl. Abb. 3.2.c).
4. Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression (vergl. Abb. 3.2.c).

Präparation der pNPP-Substratlösung:

2,134 g para-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP, Merck 1.06850.0025) wurde in jeweils 50 ml Pufferlösung des gewünschten pH-Wertes (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) gelöst. Da pNPP lichtempfindlich ist, wurde der Kontakt des Substrates mit Licht bei allen Präparationsschritten weitestgehend vermieden. Die pNPP-Substratlösung wurde dunkel, bei 4°C gelagert und innerhalb von 2 Wochen verbraucht.

Präparation zur Messung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität:

1. Pilzkulturen wurden 14 Tage unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert (0 %, 30 %, 60 % und 100 % Phosphatangebot, s. Kap. 8.3). Die Pilzkulturen wurden steril vakuumfiltriert und junges Pilzmyzel mit einem Skalpell abgetrennt.
2. Das abgetrennte Myzel wurde in einem sterilen Zentrifugationsröhrchen zu 1,333 ml Pufferlösung (pH = 3; 3,5, 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) gegeben. Diese Präparation wurde anschließend für 10 s homogenisiert (Janke & Kunkel, ULTRA-TURRAX, 10 N, Thyristor Regler, TR 50).
3. Danach erfolgte eine Zentrifugation (2000 g, 10 min und 4°C, Minifuge RF, Heraeus-Sepatech). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1,666 ml Pufferlösung (pH = 3; 3,5, 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) resuspendiert.
4. Die Resuspensionslösung wurde in ein Eppendorff-Gefäß übertragen und 0,333 ml pNPP-Substratlösung hinzugefügt.
5. Die Inkubation erfolgte je nach Aktivität der Phosphatase zwischen 1h und 2h bei 25°C in Dunkelheit.
6. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation (10 min bei 2000 g, Eppendorff 5415C). Danach wurde 1 ml Überstand mit 1,333 ml 1 M NaOH vermischt. NaOH stoppt die enzymatische Reaktion.
7. Die Reaktionslösung wurde im Maximum der pNP-Absorption (407 nm) mit einem Spektrophotometer analysiert (vergl. Abb. 3.2.c).
8. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Eichkurve (s. Abb. 3.2.c).
9. Zur Bestimmung des Trockengewichtes des eingesetzten Pilzmyzels: Pellet des Pilzmyzels (s. Punkt. 6) mit Aq_{Bidest} resuspendieren und durch vorher gewogenes Filterpapier (Schleicher & Schuell, OE 66 ST, 0,2 µm Ø = 47 mm) filtrieren, bei 70°C trocknen (12 h) und anschließend wiegen.

Präparation zur Messung der extrazellulären Phosphataseaktivität:

1. Pilzkulturen wurden 14 Tage unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gezüchtet (Kap. 8.4). Die Pilzkulturen wurden steril vakuumfiltriert.
2. 0,333 ml des gefilterten Mediums wurde in ein steriles Zentrifugationsröhrchen zu 1,333 ml Pufferlösung (pH = 3; 3,5, 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7) pipettiert.

3. 0,333 ml pNPP-Substratlösung wurde hinzugefügt und je nach Aktivität der extrazellulären Phosphatase zwischen 1h und 2h bei 25°C inkubiert.
4. Nach der Inkubationszeit wurde 1,333 ml 1 M NaOH hinzugefügt, welches die enzymatische Reaktion stoppt.
5. Die Reaktionslösung wurde im Maximum der pNP-Absorption bei 407 nm mit einem Spektrophotometer analysiert (vergl. Abb. 3.2.c).
6. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Eichkurve (s. Abb. 3.2.c).

8.5 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität mit Hilfe von ELF-97

Präparation der ELF-97-Phosphatasesubstratlösung:

Als Pufferlösung wurde ein einfacher Citrat-Phosphat-Puffer verwendet und auf die pH-Werte 3, 4, 5, 6 und 7 eingestellt.

In ELF-97-Phosphatasesubstratlösung (Molecular Probes, E-6588, Konzentration: 5 mM in sterilgefiltertem Wasser) wurde zunächst der pH-Wert bestimmt (pH = 10).

Mit Hilfe der Citrat-Phosphat-Pufferlösungen wurden kurz vor jeder Inkubation der Mykorrhizapilze Puffer und ELF-97-Phosphatasesubstratlösung im Verhältnis 2 : 10 vermischt. Die Inkubation der Pilzhypen erfolgte mit 5 µl dieser Substratmischung.

Für die Anfärbung der mykorrhizierten und unmykorrhizierten Kurzwurzeln wurden die Puffer und die ELF-97-Phosphatasesubstratlösung ebenfalls im Verhältnis 2 : 10 vermischt. Die Inkubation der Kurzwurzeln erfolgte jedoch mit 15 µl dieser Substratmischung.

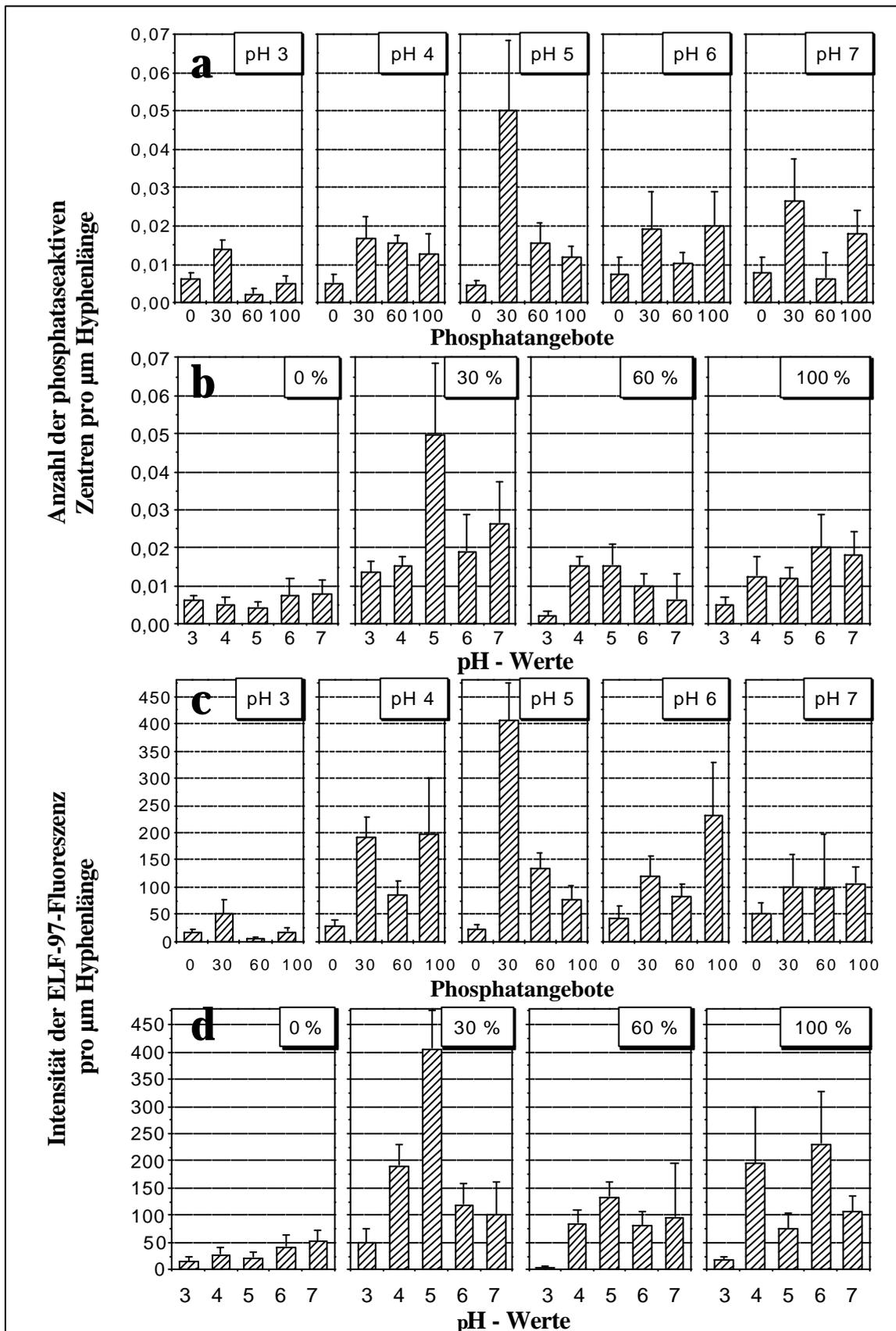


Abb. 8.3: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von *A. boletinoides* [a]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [b]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes. [c]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [d]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

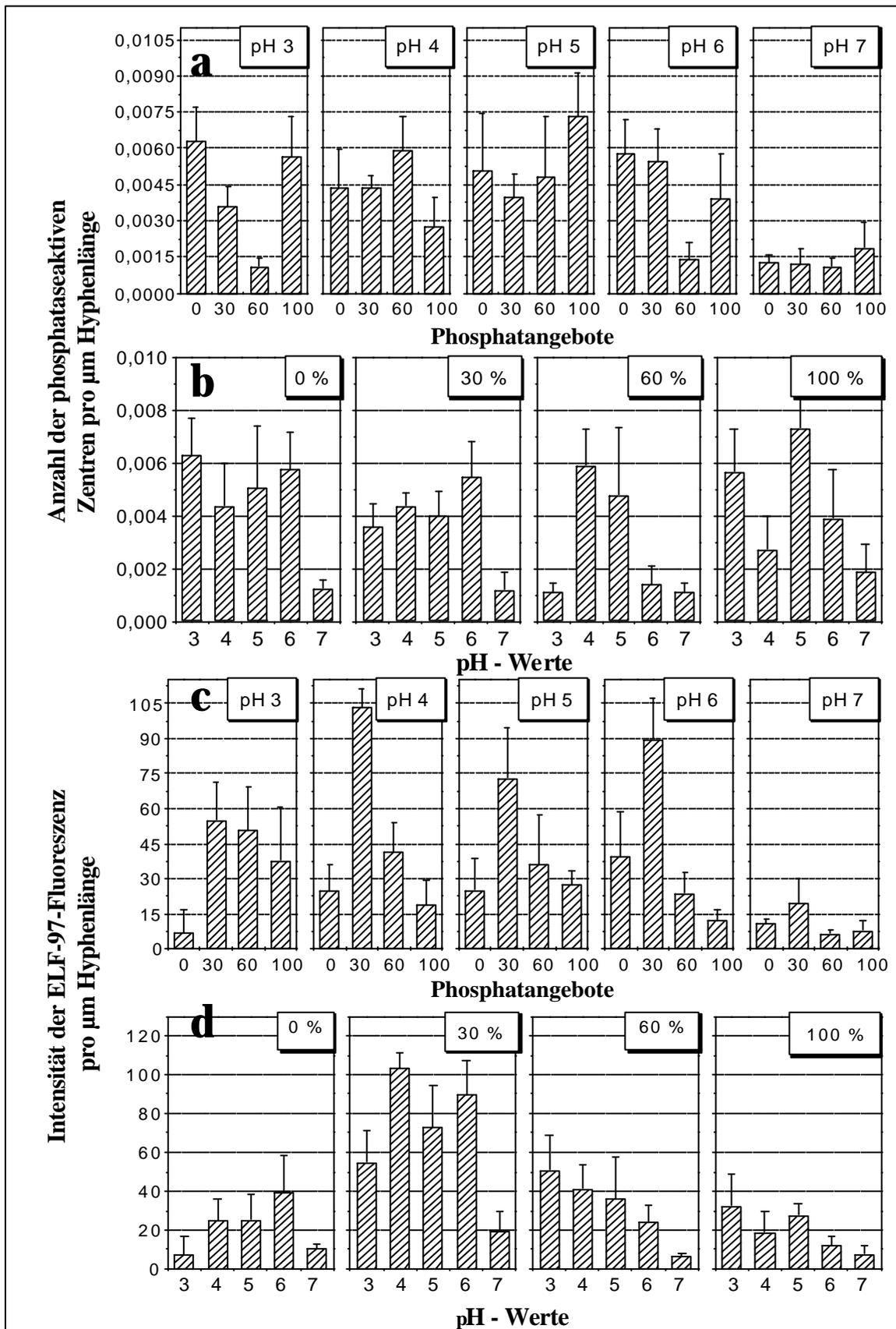


Abb. 8.4: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von *P. involutus* [a]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [b]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes. [c]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [d]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

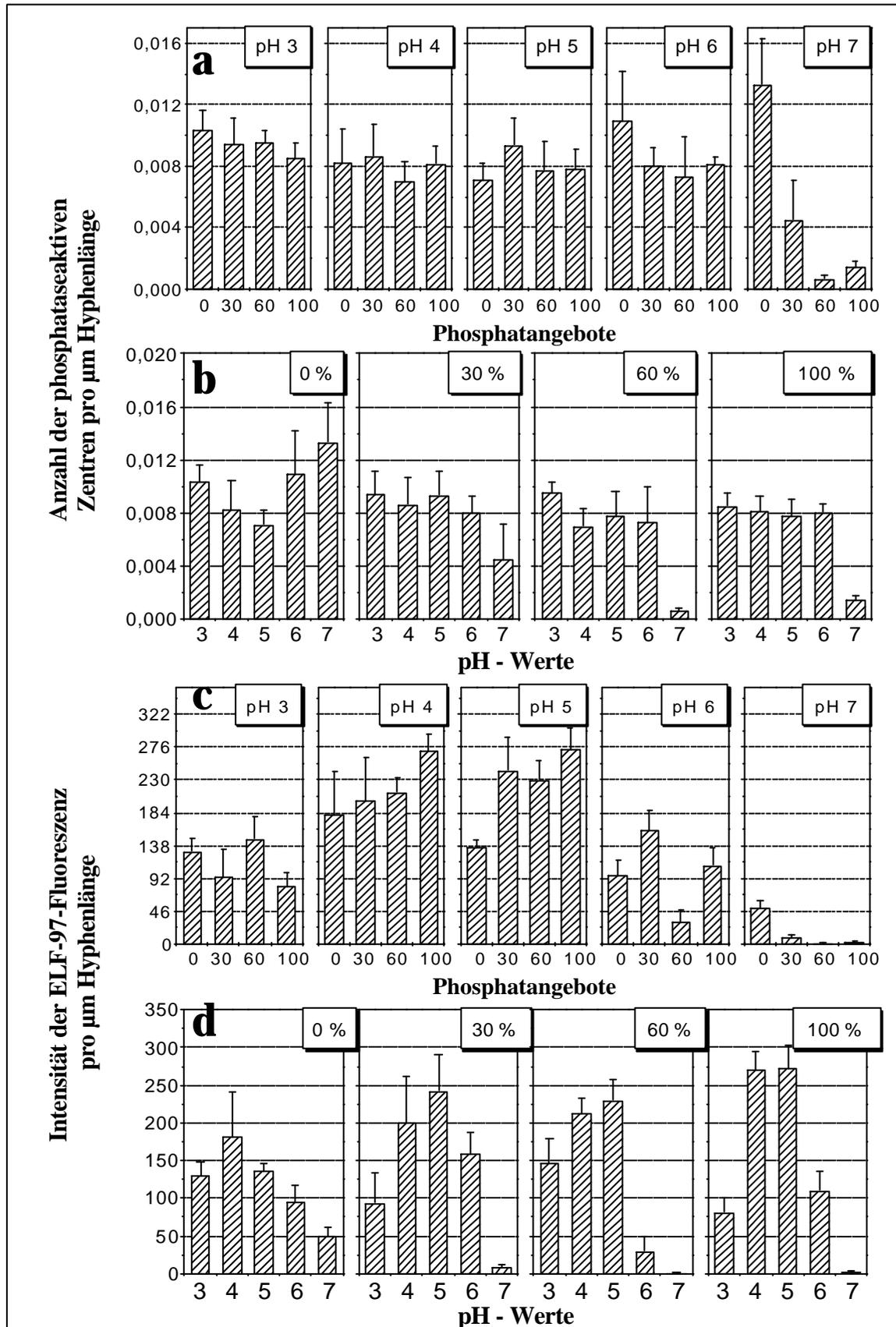


Abb. 8.5: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von *P. tinctorius* [a]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [b]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes. [c]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [d]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

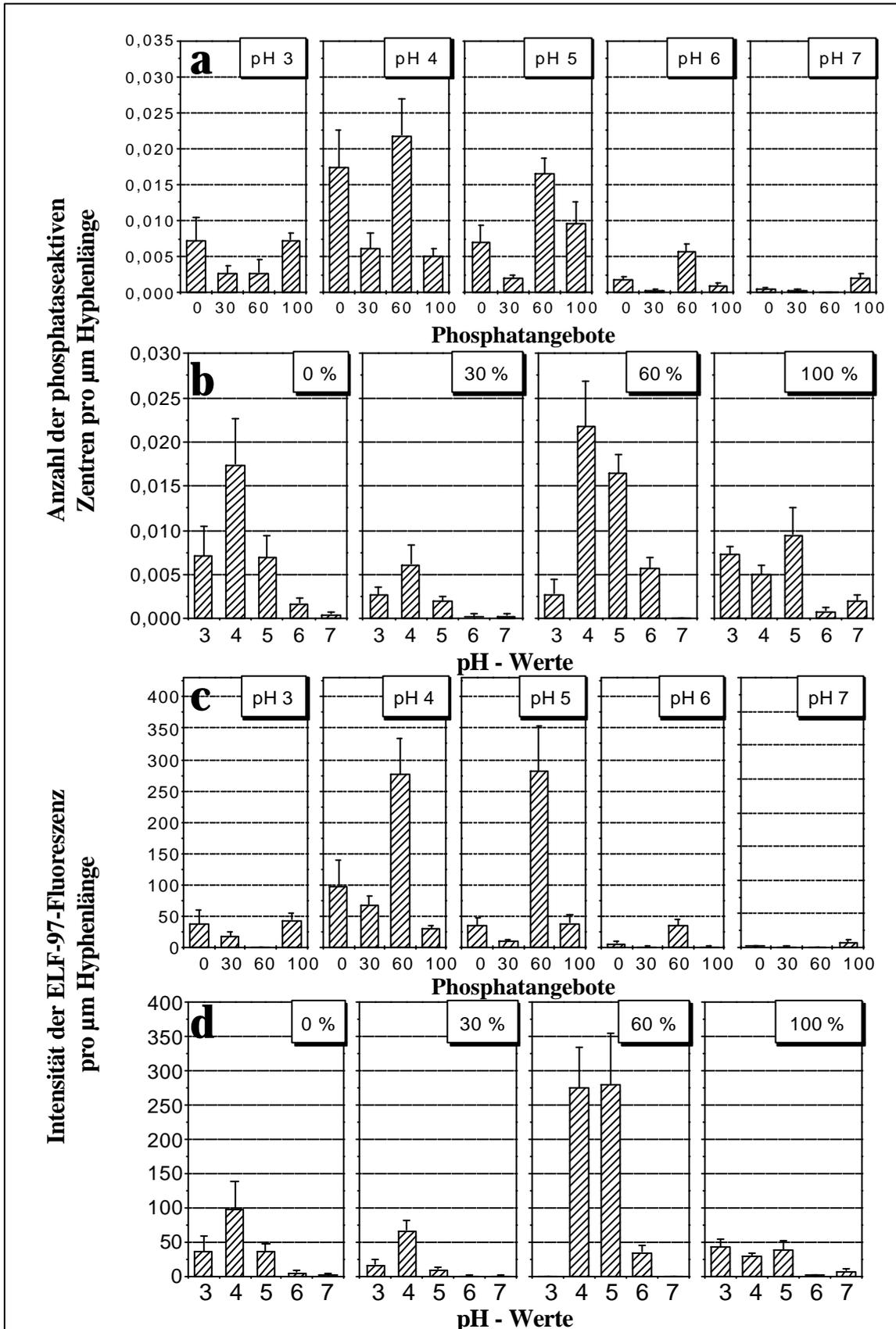


Abb. 8.6: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von *D. antarctica* [a]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [b]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes. [c]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [d]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

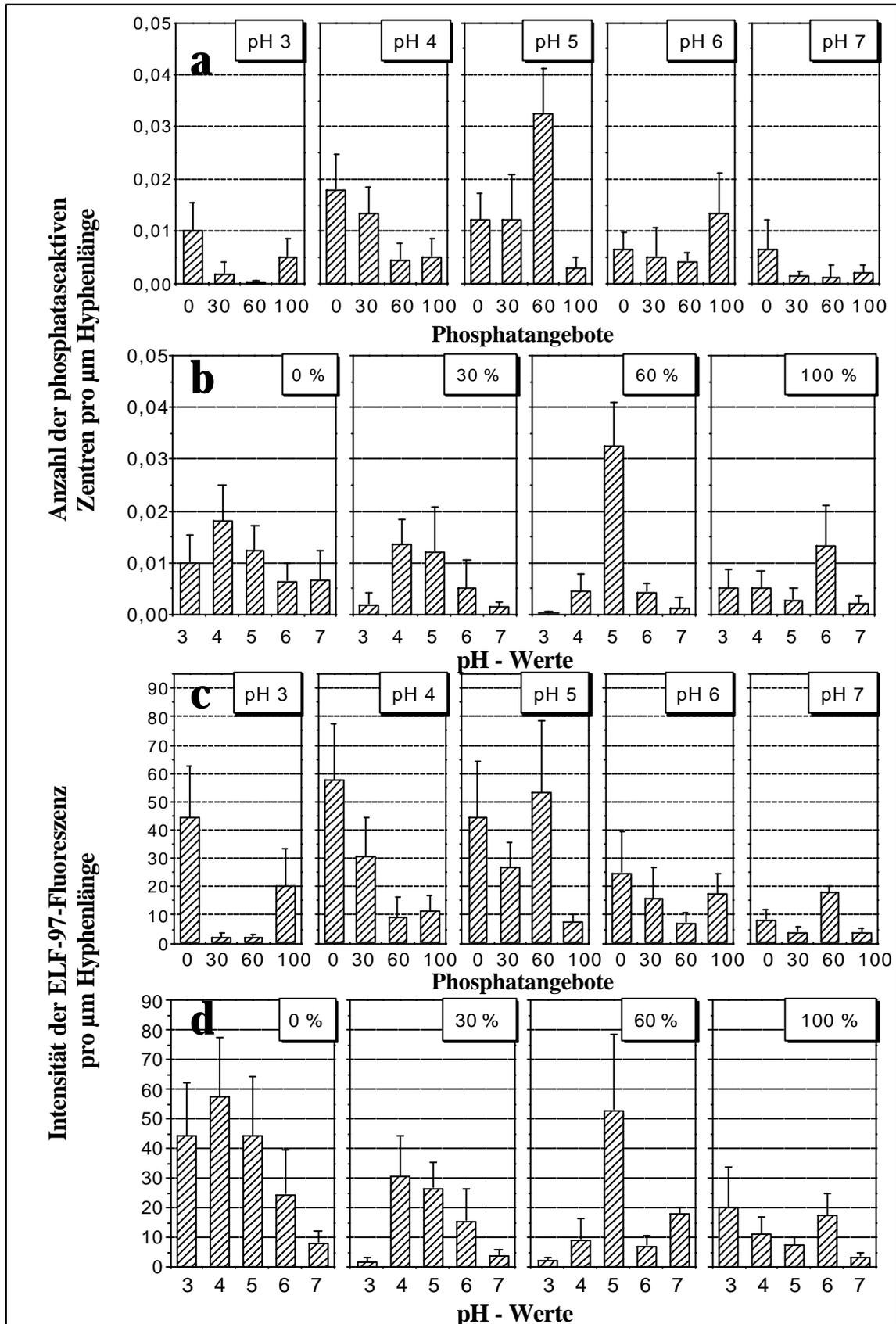


Abb. 8.7: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der oberflächengebundenen Phosphataseaktivität von *C. geophilum* [a]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [b]: Anzahl der phosphataseaktiven Zentren in Abhängigkeit des pH-Wertes. [c]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des Phosphatangebotes. [d]: Intensität der ELF-97-Fluoreszenz in Abhängigkeit des pH-Wertes. Dargestellt sind Mittelwerte. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen der Messwerte.

9. DANKSAGUNG

Das Entstehen der vorliegenden Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die tatkräftige Mithilfe, die ich von vielen Seiten erfahren habe. Deshalb sei allen, die mich während der Zeit meiner Promotion hilfreich und freundschaftlich unterstützt und begleitet haben, herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heyser danke ich für die Betreuung, den Einsatz für Sach- und Personalmittel, Freiraum und Vertrauen bei der Durchführung der Arbeit. Desweiteren für die offenen Worte, seine Diskussionsbereitschaft, Ratschläge und die Unterstützung in einem wichtigen Lebensabschnitt. Ich habe immer verständnisvolles Entgegenkommen empfangen.

Herrn Prof. Dr. Lieberei danke ich für seine freundliche Bereitschaft zur Übernahme des zweiten Gutachtens zu dieser Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Roberto Godoy des Botanischen Institutes der Universidad Austral de Chile, Valdivia. Seine Unterstützung auf fachlicher wie menschlicher Ebene waren für mich von hoher Bedeutung. Desweiteren waren sein Vertrauen, seine Gastfreundlichkeit und seine Motivation von großem Wert. Ich danke ihm für die Überlassung des Arbeitsplatzes, seinen Einsatz für Sachmittel, seine Einführung und aktive Hilfe bei der Feldarbeit und die Knüpfung vieler Kontakte. Ohne sein stetiges Engagement wäre die Arbeit in der vorliegenden Form nicht entstanden.

Dr. Heike Bücking hat mich insbesondere am Anfang meiner Arbeit mit Geduld und Expertise in die Welt der Mykorrhizen eingeführt. Von ihr lernte ich grundlegende Einbettungstechniken, sie stellte mir ihre Literatur zur Verfügung und stand mit ihrem Sachverstand für aufmerksames und kritisches Korrekturlesen meiner beantragten Projekte zur Verfügung. Dafür möchte ich ihr herzlich danken.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt Helga Wehrkamp für die freundliche technische Hilfe in den Laboren. Auch die gemeinsame Betreuung der Praktika zur Pflanzenphysiologie werden mir immer in bester Erinnerung bleiben. Frau Anke Toltz danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und für die Unterstützung bei Elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Auch Simone Sikora danke ich für ihre Aufmerksamkeiten. Bei Antje Mathews und Ruth Krumrey-Rosch möchte ich mich für vielerlei Freundlichkeiten, insbesondere für die effiziente und schnelle Hilfe bei organisatorischen Problemen bedanken. Myrna Landim de

Souza danke ich für die Unterstützung bei einigen der aufwendigen Messungen zur Bestimmung der Phosphataseaktivitäten mit Hilfe von pNPP. Auch allen anderen Mitgliedern der AG Prof. Heyser und vielen ungenannten Mitgliedern des UFT: Besten Dank aus ganzem Herzen.

Herr Prof. Dr. Horst Diehl und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe aus der Biophysik, Bremen, möchte ich für ihre Hilfe und die freundliche Unterstützungen danken. Herrn Prof. Dr. Rudolf Amann am Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie Bremen hat mir den Zugang zum Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Jakob Pernthaler für seine geduldige Einarbeitung. Von Dr. Armin Gieseke wurde das pH-Meter entwickelt, welches für Messungen der pH-Werte in Kleinstvolumina wertvolle Dienst leistete. Ihm möchte ich für die Hilfestellungen bei der Durchführung von Messungen danken.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fischer möchte ich mich für die Möglichkeiten bedanken, die Laborausstattung zu verschiedenen Gelegenheiten mitzubeneutzen.

Im Biogarten der Universität Bremen war mir Herr Werner Vogel und vor allem Frau Angelika Trambacz von großer Hilfe bei den Versuchen zur Anzucht von *N. antartica* und der Zubereitung sowie Analyse von Pflanzensubstrat. Vielen Dank.

Meinen besonderer Dank gilt desweiteren vielen Mitgliedern der Universidad Austral de Chile: En este espacio quiero agradecer al Instituto de Botánica en general, en todo momento sentí colaboración para mi trabajo. Especialmente a Mónica Barrientos agradezco su hospitalidad, su colaboración en el cultivo de *Nothofagus*, su compañía y ayuda en la toma de muestras en terreno. Mi agradecimiento también para Lorena Flores Toro, en especial por acompañarme al renoval de *N. obliqua* en Paillaco y por brindarme sus valiosos conocimientos sobre la estructura fitosociológica de dicha comunidad forestal.

Del Instituto de Microbiología quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Eduardo Valenzuela por su disposición de ayuda tanto en terreno como en el laboratorio. Sus conocimientos y experiencias así como su interés por la Micología fueron de gran valor y de inspiración para mi trabajo.

Del Instituto de Histología agradezco a Ricardo Silva por su labor con el microscopio electrónico de barrido. Especialmente por su entusiasmo en el trabajo de las muestras así como por su forma abierta de ser, dispuesto a ayudar en todo lo que se lo necesite. ¡Muchas gracias!. Agradezco también a Claudio Lizama por su amabilidad y trabajo en la elaboración

de los cortes para microscopía óptica, así como a Inés Siegmund por las importantes instrucciones para la toma de fotografías en el microscopio óptico.

Del Instituto de Inmunología quiero agradecer al Prof. Dr. Hugo Folch, a Gisela Eller y a Miguel Barria por sus innumerables socorros y préstamos de instalaciones en mi trabajo con nitrógeno líquido, así como en general por las grandes ayudas que me brindaron en las distintas etapas de mi trabajo.

Para mis amigos y profesionales del Instituto de Física Prof. Dr. Flavio Ojeda, A.T. Marisa Guarda, Prof. Carmen Maldonado y Prof. Lilian Villanueva siento un agradecimiento muy especial. ¡Muchas gracias de corazón y por sobretodo por ponerle esencia tanto a mi trabajo como a mi existencia!. Mis agradecimientos también a Don Jorge por su atención y salvación técnica con la bomba de vacío.

Für die Ausdauer des sicherlich anstrengenden, mehrfachen, gewissenhaften Korrekturlesens dieser Arbeit und vieler Formulierungsvorschläge möchte ich mich besonders herzlich bei Elisabeth Härtel bedanken.

Familie Nottrott gilt mein tiefer Dank für die Unterstützung während meines gesamten Biologiestudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Ohne Sie wäre auch diese Dissertation nicht entstanden.

A mis padres, Ana María Marote de Alvarez y Enrique C. Alvarez, les dedico este trabajo. Para ellos, mi agradecimiento infinito.

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Stipendium der Universität Bremen unterstützt.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich

- die Arbeit ohne unerlaubte, fremde Hilfe angefertigt habe,
- keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe
und
- die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bremen, den 1. Mai 2001