

Von der Theorie in die Praxis - endophytische Bakterien

Herausforderungen für das
Versuchswesen

Rolf Allner

1. Grundlagen der biologischen Stickstofffixierung



Biologische Stickstofffixierung in Nicht-Leguminosen. Eine neue Idee?

- Die ersten Berichte über die Existenz von Bakterien im inneren Gewebe von nicht-symbiotischen Pflanzen stammen aus den 1870er Jahren und wurden von Smith im Jahr 1911 und Hollis im Jahr 1951 bestätigt.
- Seitdem haben zahlreiche wissenschaftliche Studien endophytische Gemeinschaften in einem breiten Spektrum von Pflanzenarten und in verschiedenen Pflanzenorganen beschrieben.
- **Ein klarer Nachweis für den signifikanten direkten Transfer von Stickstoff von endophytischen Bakterien zu Nicht-Leguminosen steht bisher aus.**
- In der wissenschaftlichen Literatur werden diese Bakterien daher als „Plant growth promoting bacteria“ (PGPB) zusammengefasst.

Quelle: Hallmann et al. „Plant Interactions with Endophytic Bacteria“

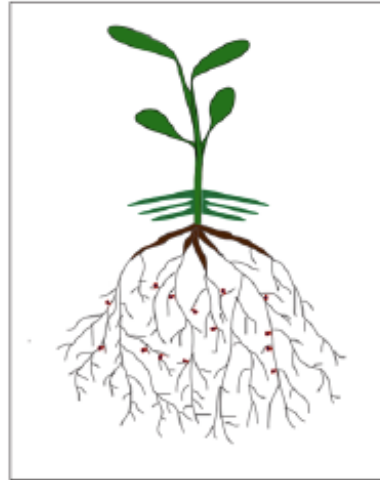
CAB International 2001. Biotic Interactions in Plant–Pathogen Associations

Definition

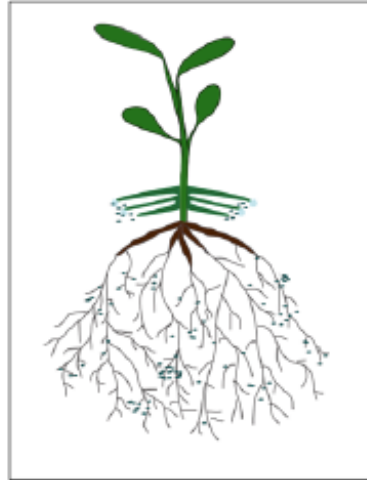
- **Endophytische (von gr. endo = innen; phyton = Pflanze)** Bakterien: beschreibt diejenigen Bakterien, welche die Pflanze im Inneren besiedeln, ohne der Pflanze substantiell zu schaden.
- Diese Definition schließt gezielt **phytopathogene** Bakterien des inneren Pflanzengewebes aus.
- **Diazotroph:** Bezeichnung für Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Luft-Stickstoff N₂ zu binden.

Symbiotic Nitrogen Fixation

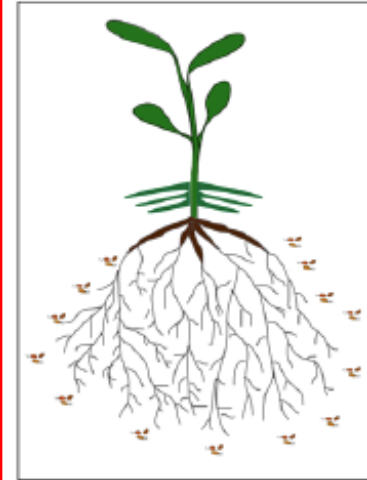
Root Nodule Symbiosis



Associative Nitrogen Fixation



Free-living Nitrogen Fixation



Example of microorganisms

Rhizobia and *Frankia*

Azospirillum
Azoarcus
Herbaspirillum
Cyanobacteria (*Anabaena* and *Nostoc*)

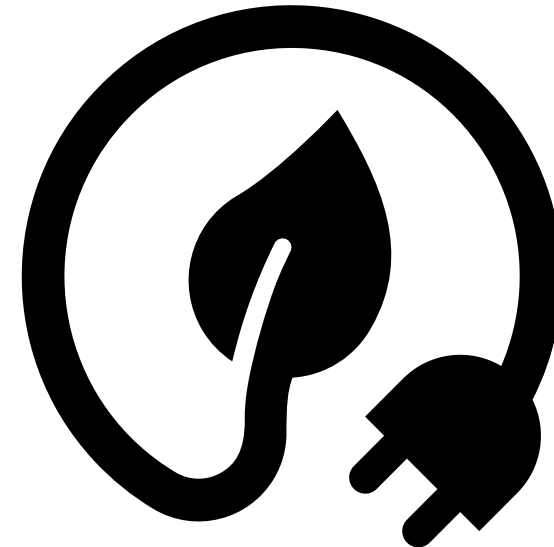
Autotrophs (photosynthesis)
Rhodobacter
Cyanobacteria

Heterotroph (plant exudates)
Klebsiella
Azotobacter

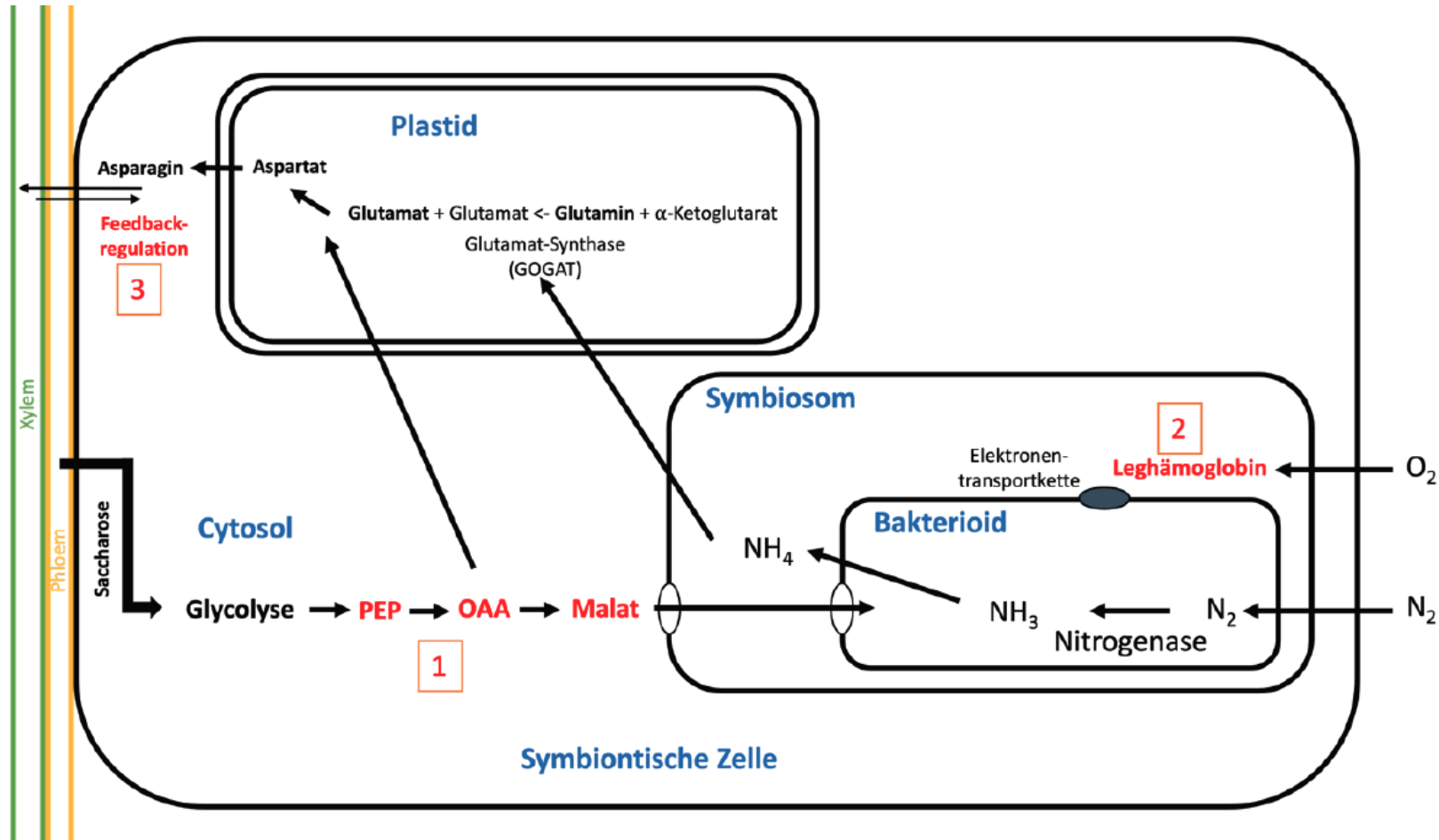
Energy source	+++	++	++	+
Oxygen protection	+++	++	+	+
Transfer of fixed nitrogen	+++	++	+	+
Estimates of nitrogen fixation rates (kg N ha ⁻¹ y ⁻¹)	50-465 (a)	2-170 (b)	1-80 (c)	1-10 (d)

Die biologische N_2 Fixierung ist energieaufwändig

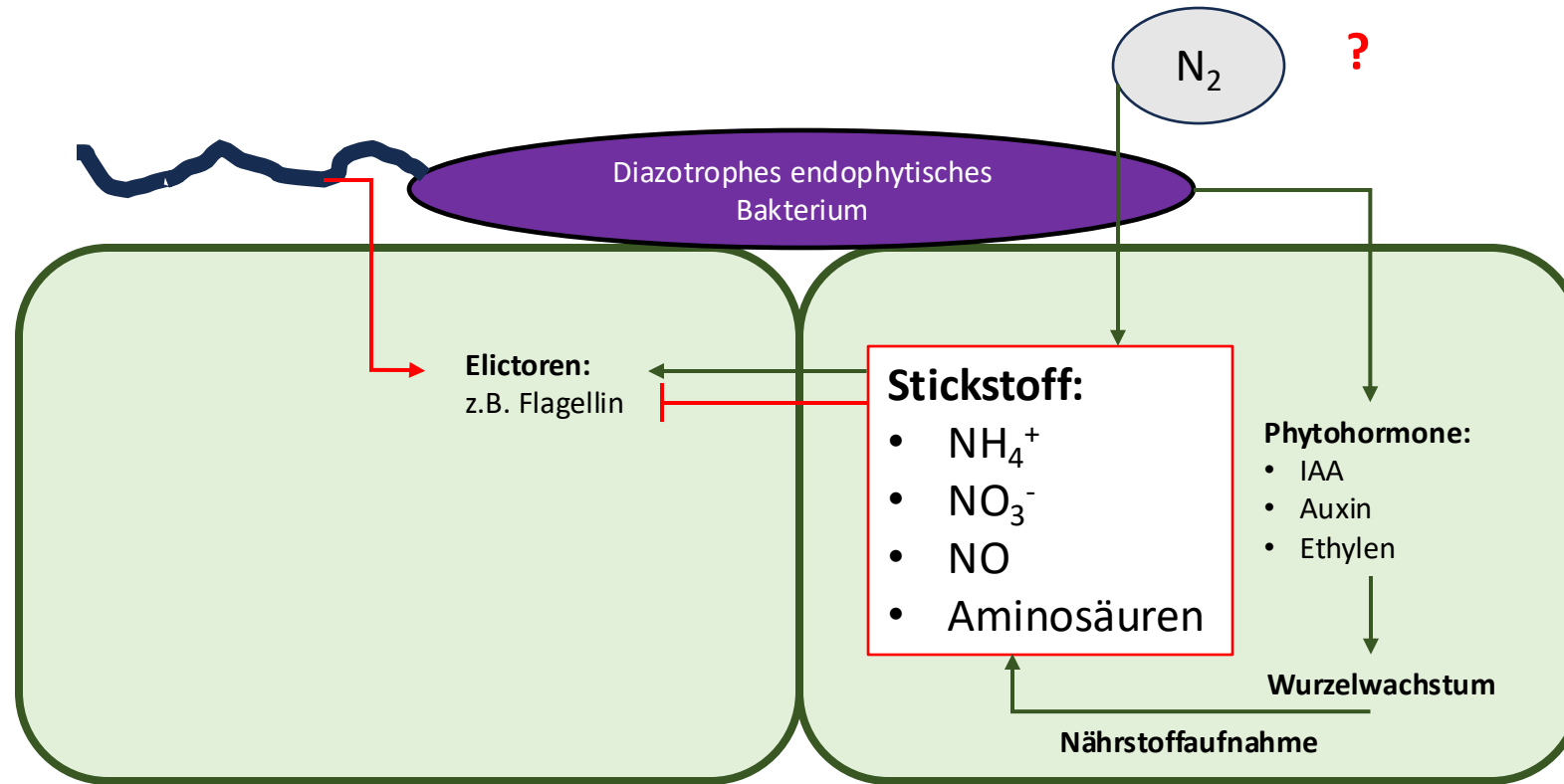
	ATP/mol N_2
<i>1. N_2-Fixierung</i>	
- Reduktionsäquivalente (4 NADH + H^+)	12
- ATP-Bereitstellung	16
	28
<i>2. Nitratreduktion</i>	
- Reduktionsäquivalente (4 NADH + H^+)	12
<i>3. Ammoniumassimilation</i>	
- Reduktionsäquivalente (2 NADH + H^+)	6
- ATP-Bereitstellung	2
	8



Symbiontische Stickstofffixierung



Pflanzen – Bakterien Interaktion



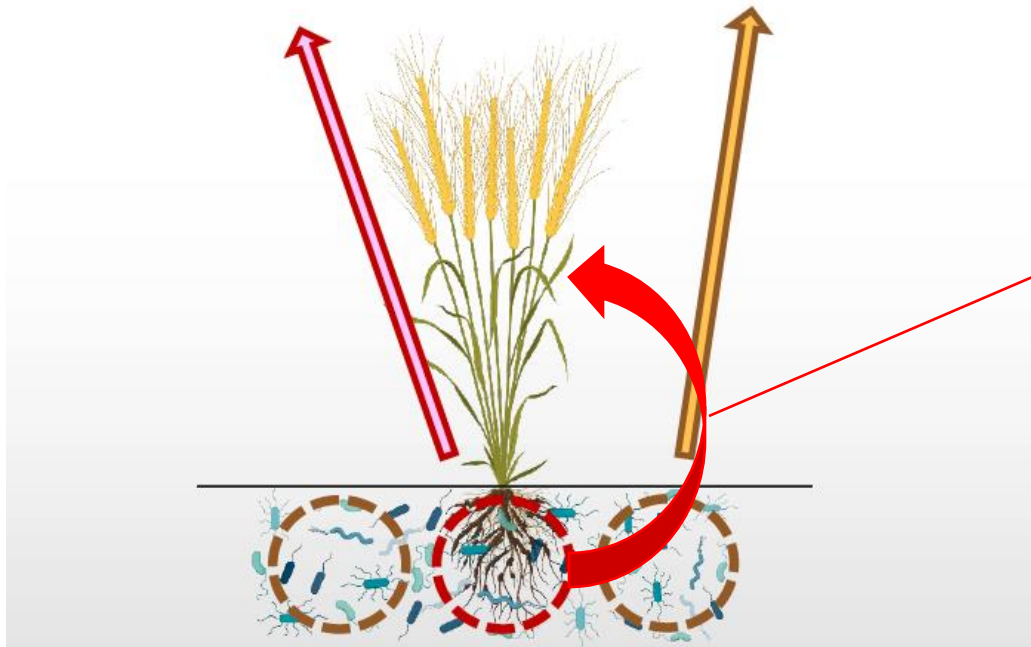
Bakteriengesellschaften in Ackerböden: Kooperation und Wettbewerb

Copiotrophs

- Energy rich C
- Limited N
- Rich in amino acids

Oligotrophs

- Limited C
- Dynamic N
- Few amino acids



Warum besiedeln Bakterien Pflanzen?

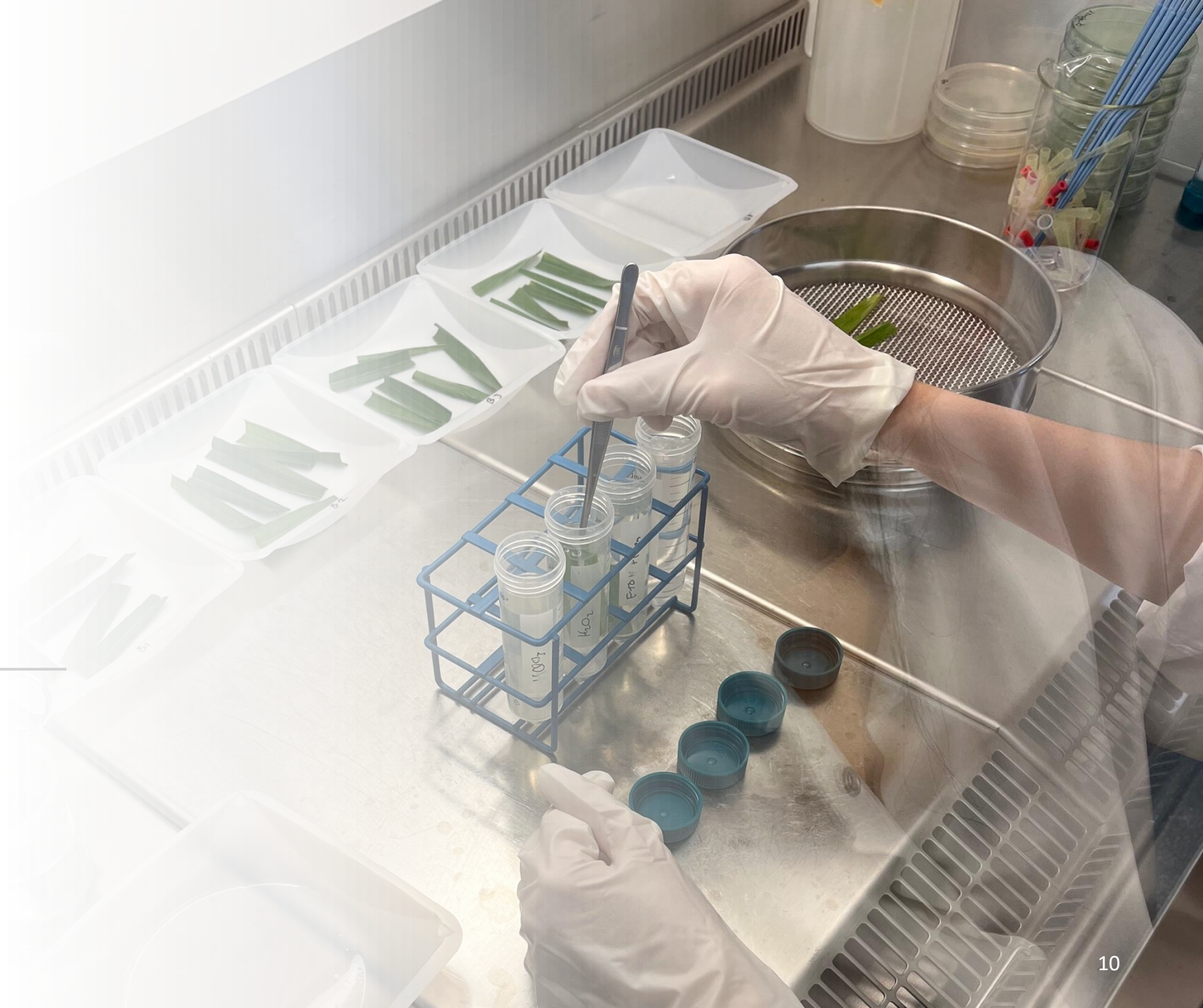
- Weniger Wettbewerb?
- Energiereiche Kohlenstoffe?

Welche Fähigkeiten braucht es dafür?

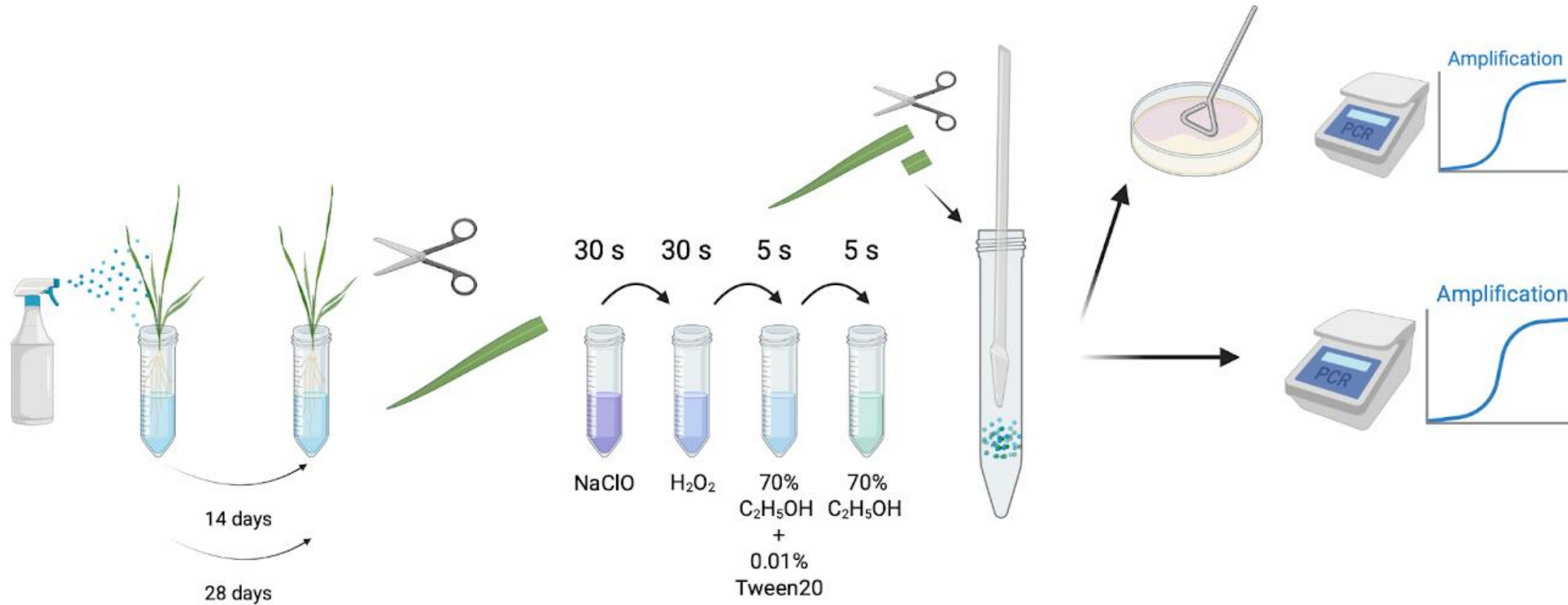
- Transportmechanismus
- Fähigkeit mit der Pflanze zu kommunizieren & interagieren
- Toleranz/Resistenz ggü. UV-Strahlung usw.

Quelle: **Christoph C. Tebbe**
Thünen Institute of Biodiversity, Braunschweig

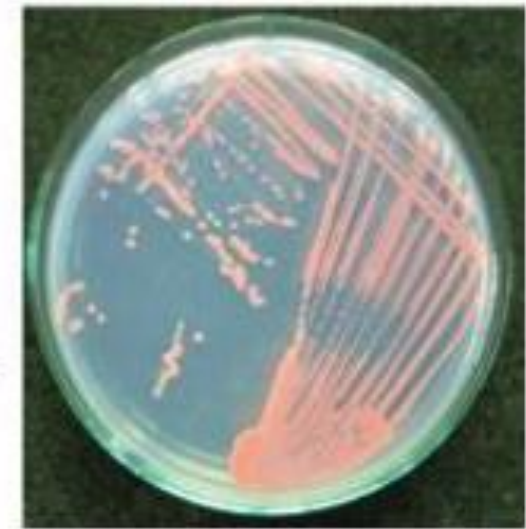
2. Nachweis- methoden



Nachweisverfahren der endophytischen Besiedlung



Selektivnährmedien



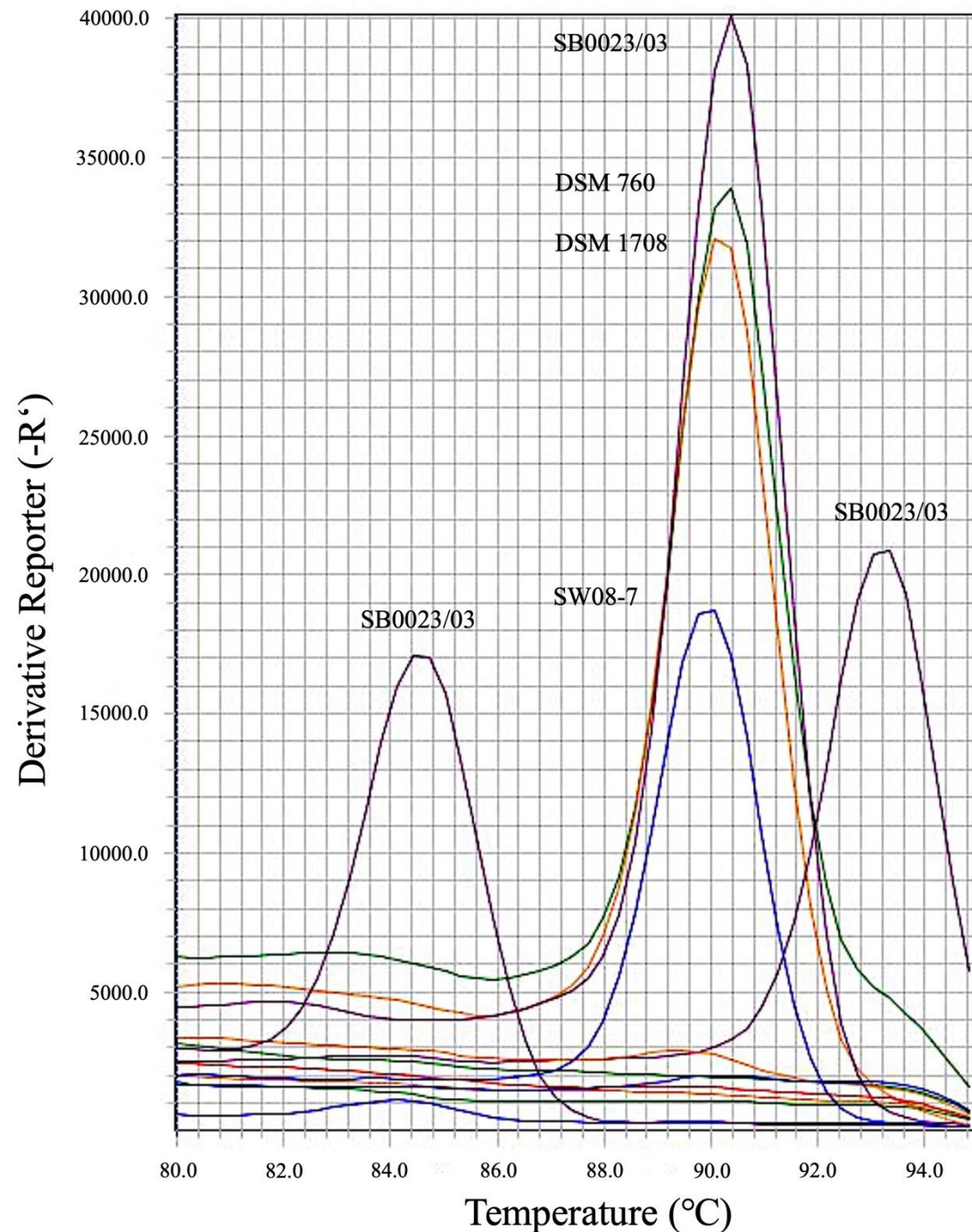
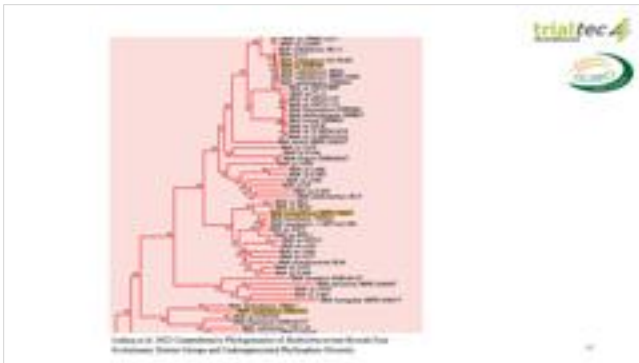
Molekular- biologische Methoden

DSM 760: M. radiotolerans

DSM 1708: M. mesophilicum

SW08-7: M. dankookense

SB0023/03: M. symbioticum





3. Testung im Feld



Was wirkt wann und wie?

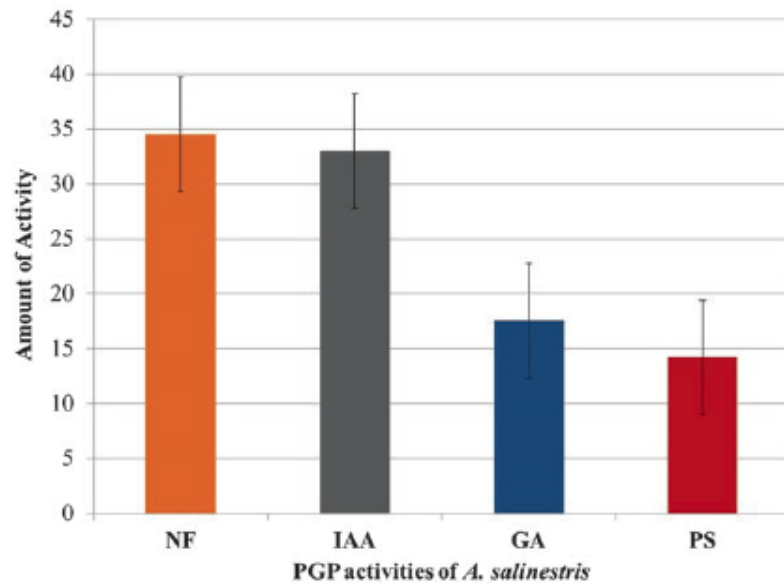
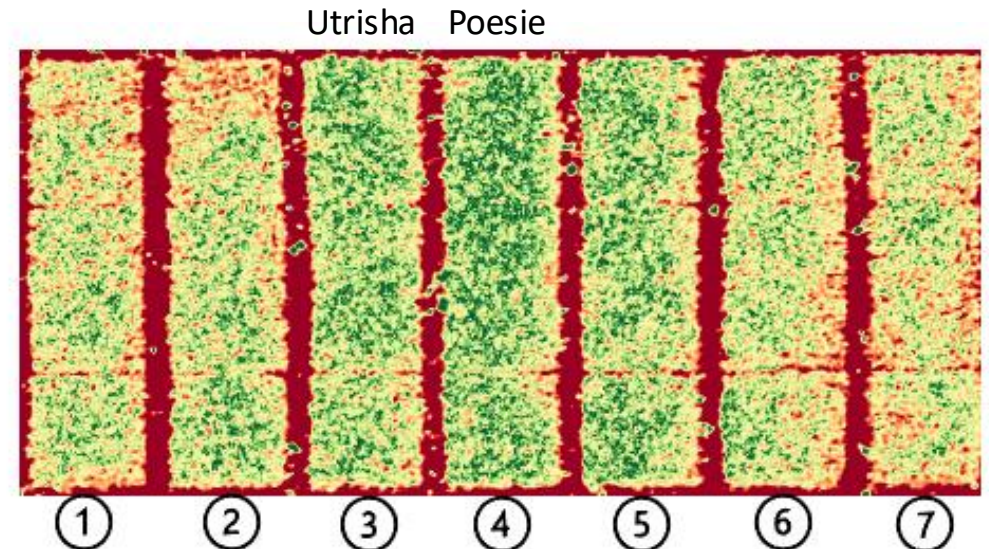


Fig. 2.2 Nitrogen fixation, NF ($\mu\text{g Nm/L/day}$); indole acetic acid, IAA ($\mu\text{g/mL}$); gibberellic acid, GA ($\mu\text{g/25 mL}$); and P-solubilization, PS (mm) activity of *A. salinestris* under in vitro conditions

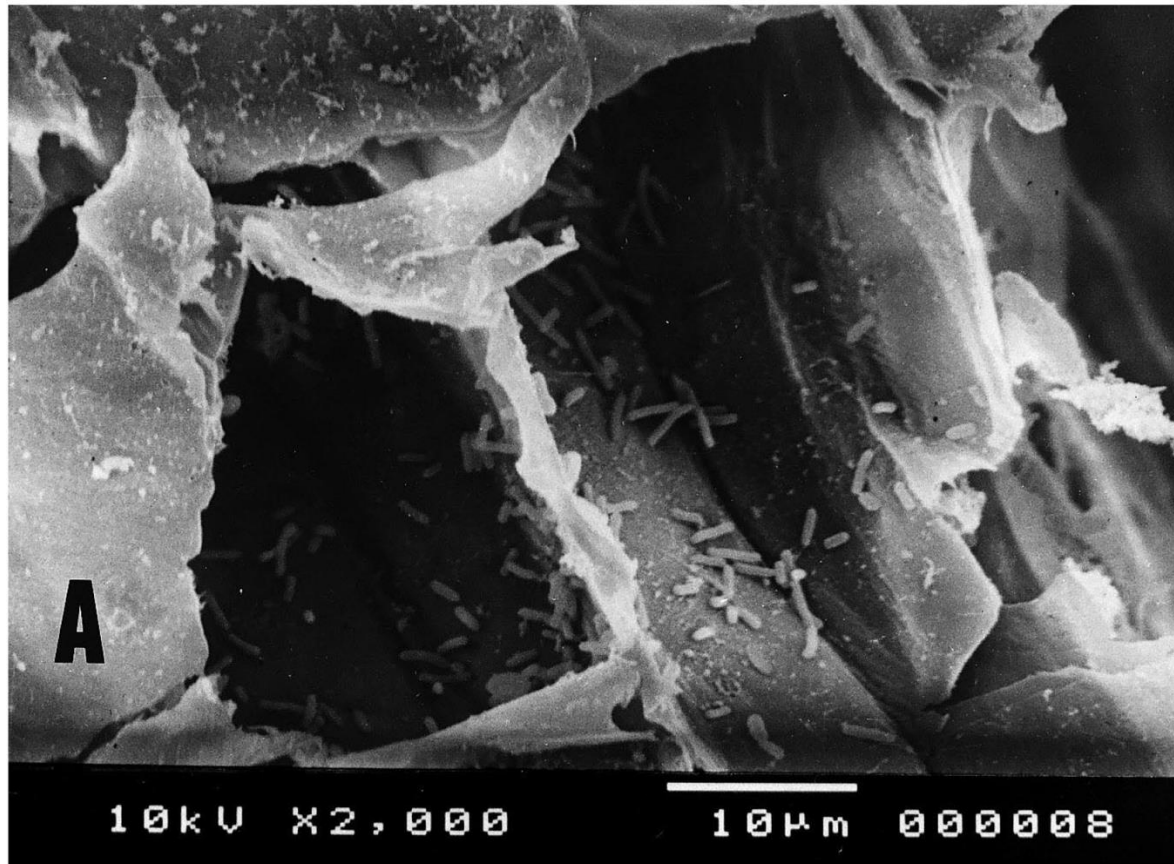
G. Chennappa et al. 2018 „Azotobacter salinestris: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria“



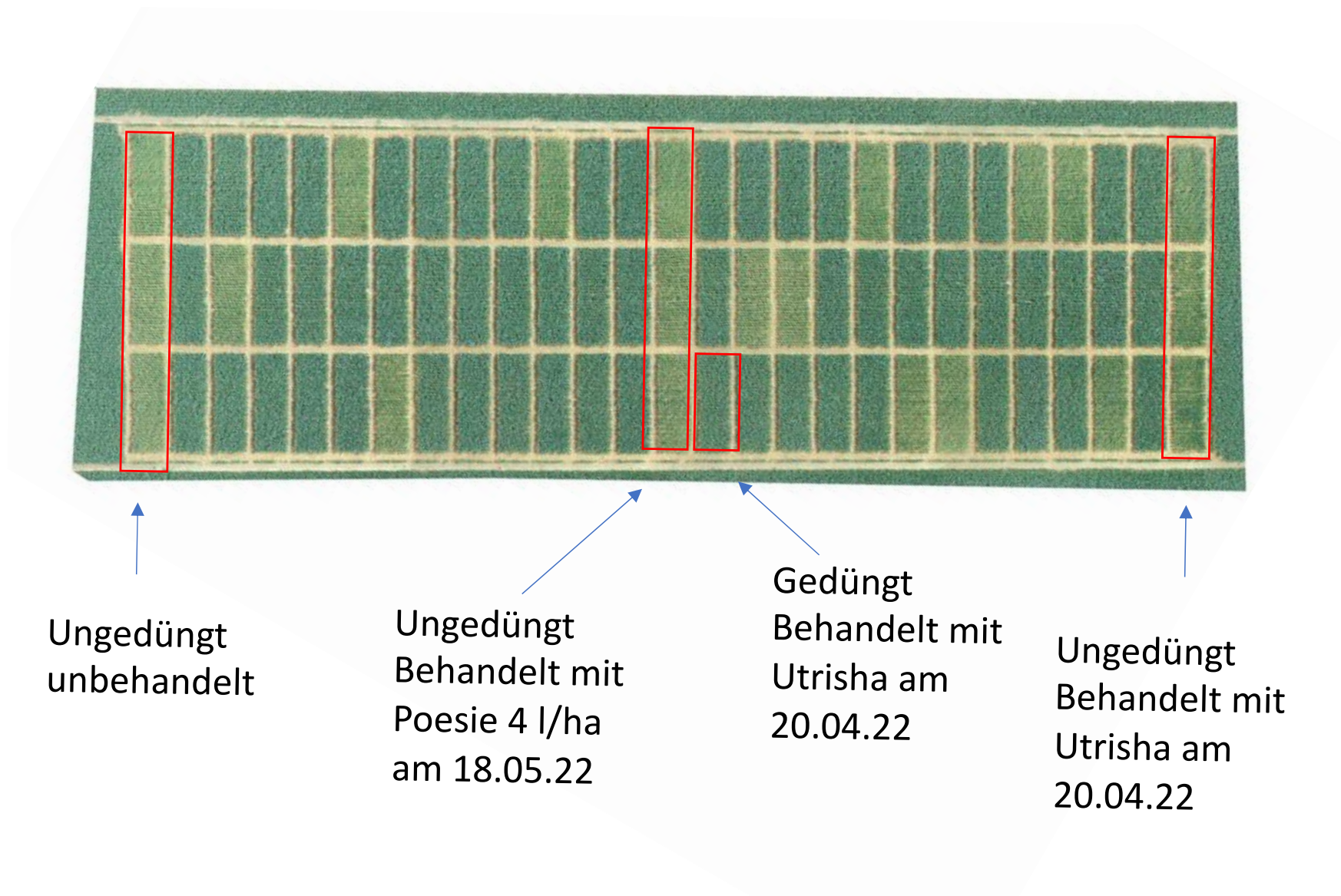
Quelle: Bachelorarbeit L. Horlacher TH Bingen 2022

Einfluss der N-Düngung

L.E. Fuentes-Ramírez et al. / FEMS Microbiology Ecology 29 (1999) 117–128



Die Besiedlung von Zuckerrohr durch *Acetobacter diazotrophicus* wird durch hohe N-Düngung gehemmt

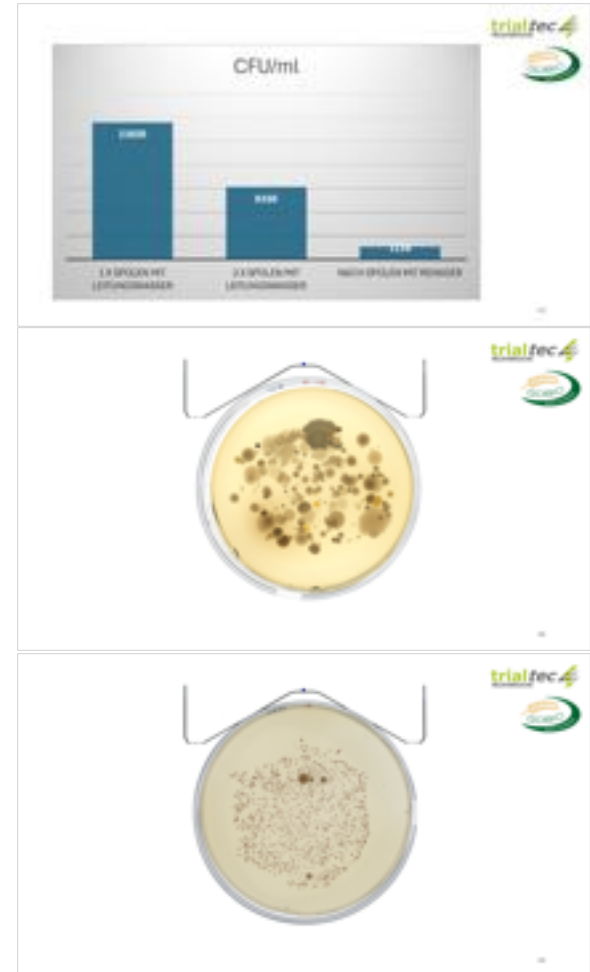
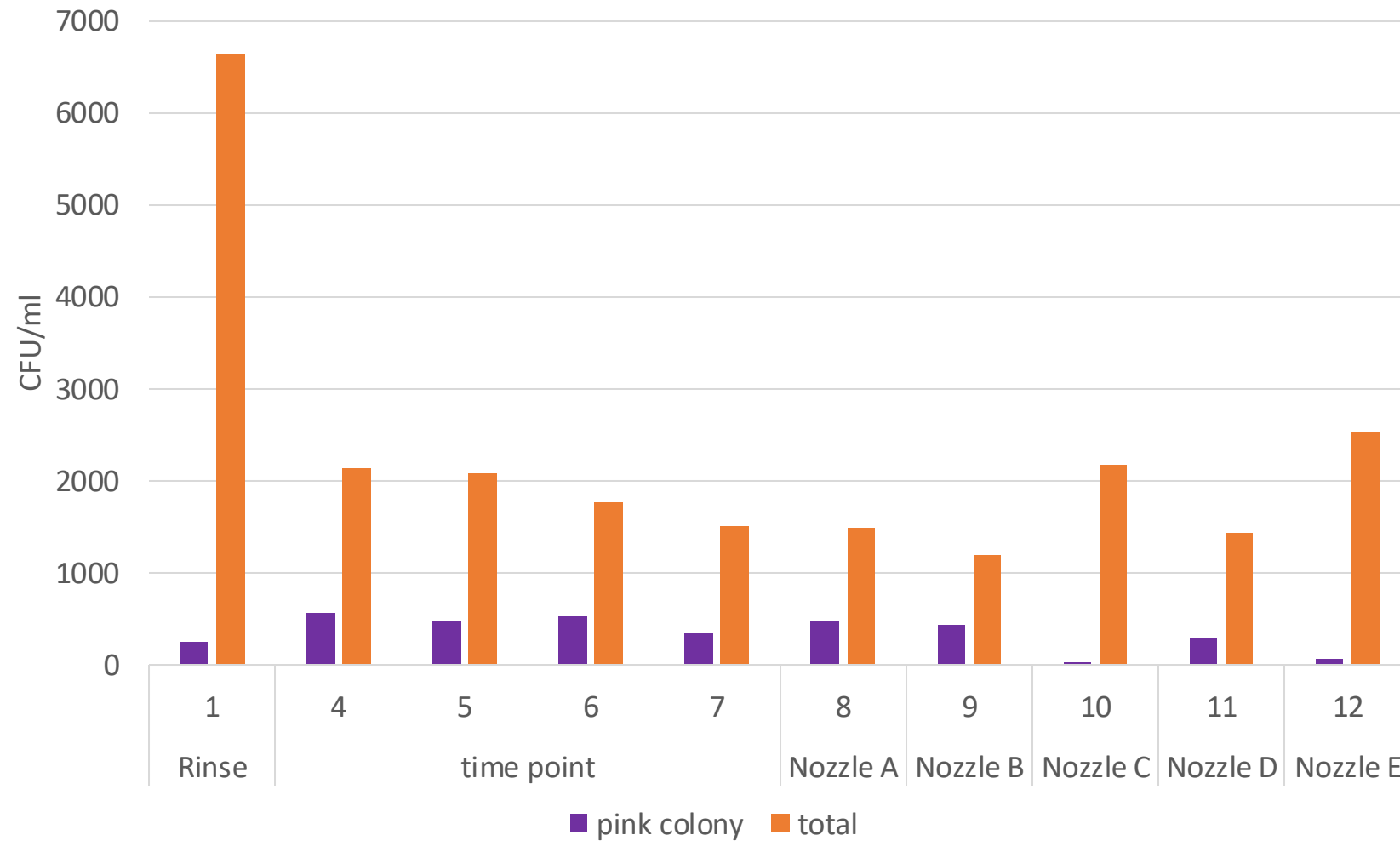




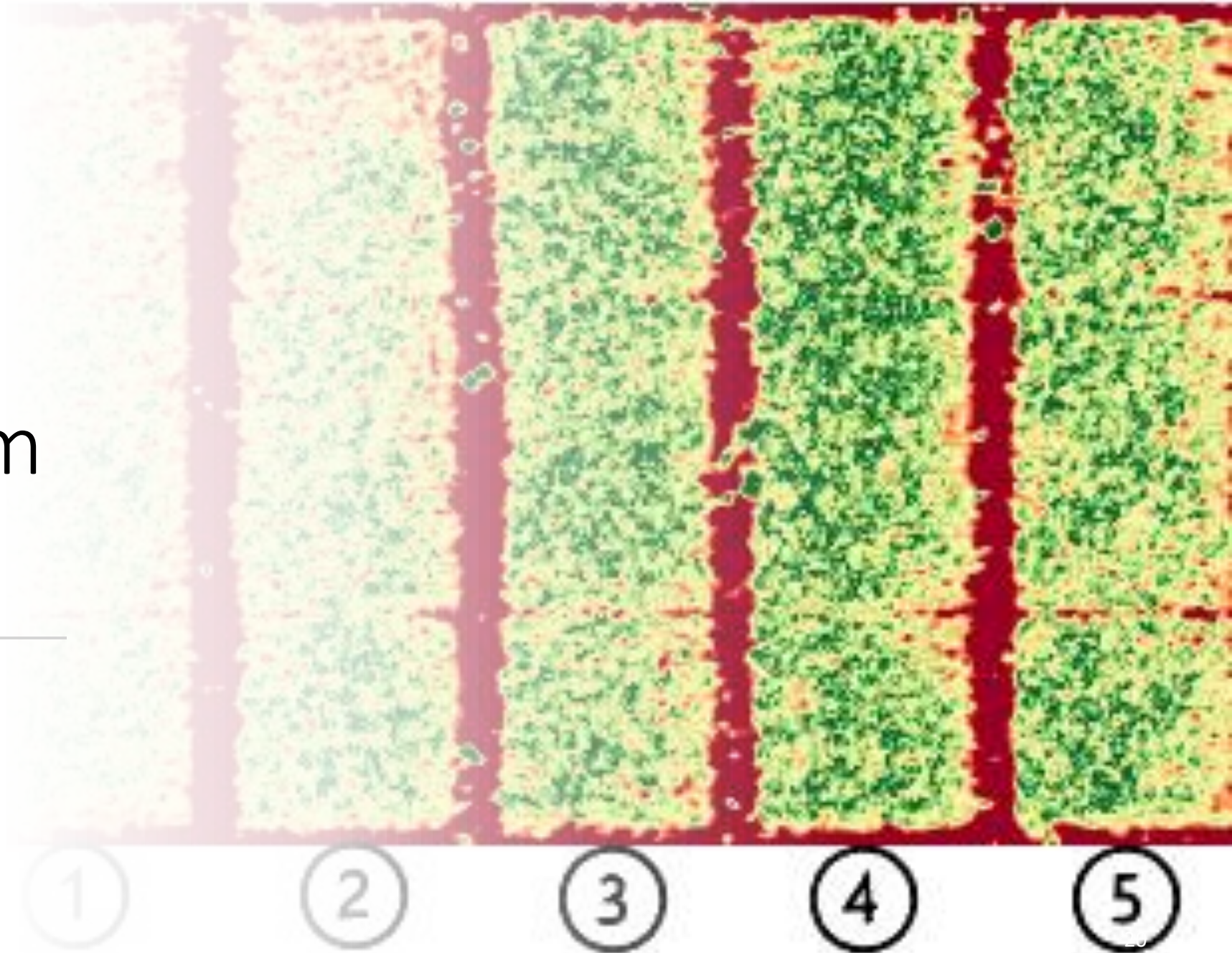
4. Einfluss der Feldversuchstechnik?



Parzellenspritze



5. Natürliche Ausbreitung im Bestand?







Germany

Leipzig

Saxony

Jena

Gera

Thuringia

Hesse

Dusseldorf

Cologne

Bonn

Gießen

Koblenz

Frankfurt

Hof

Luxembourg

Luxembourg

Würzburg

Mannheim

Nuremberg

Saarland

Saarbrücken

Bavaria-Regensburg

Grand Est

Stuttgart

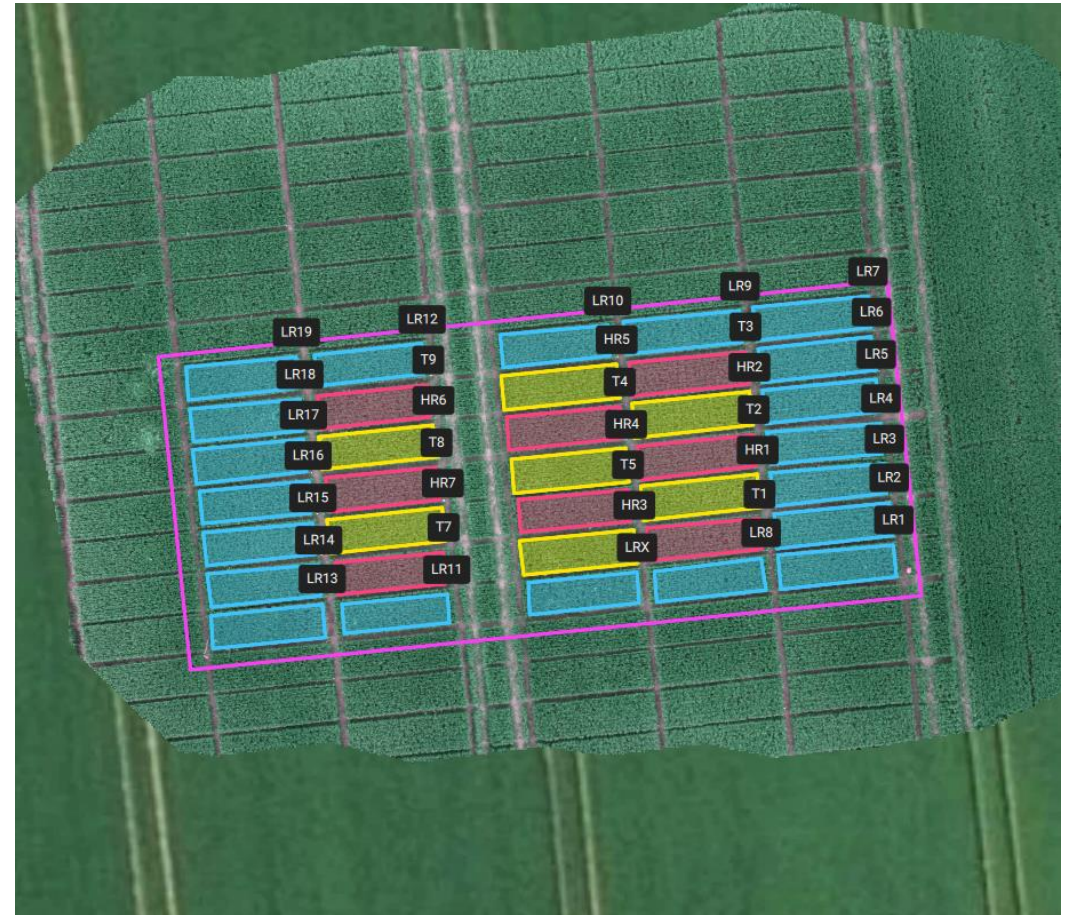
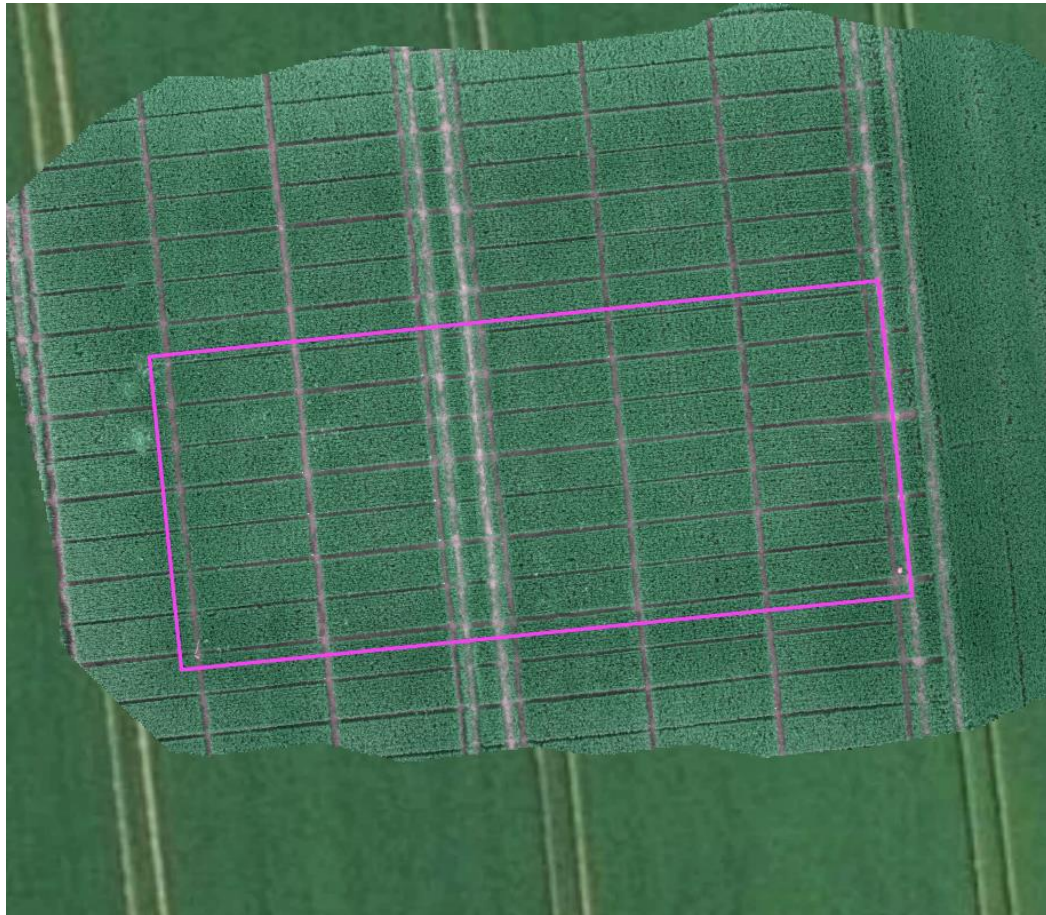
Ingolstadt

Baden-Württemberg

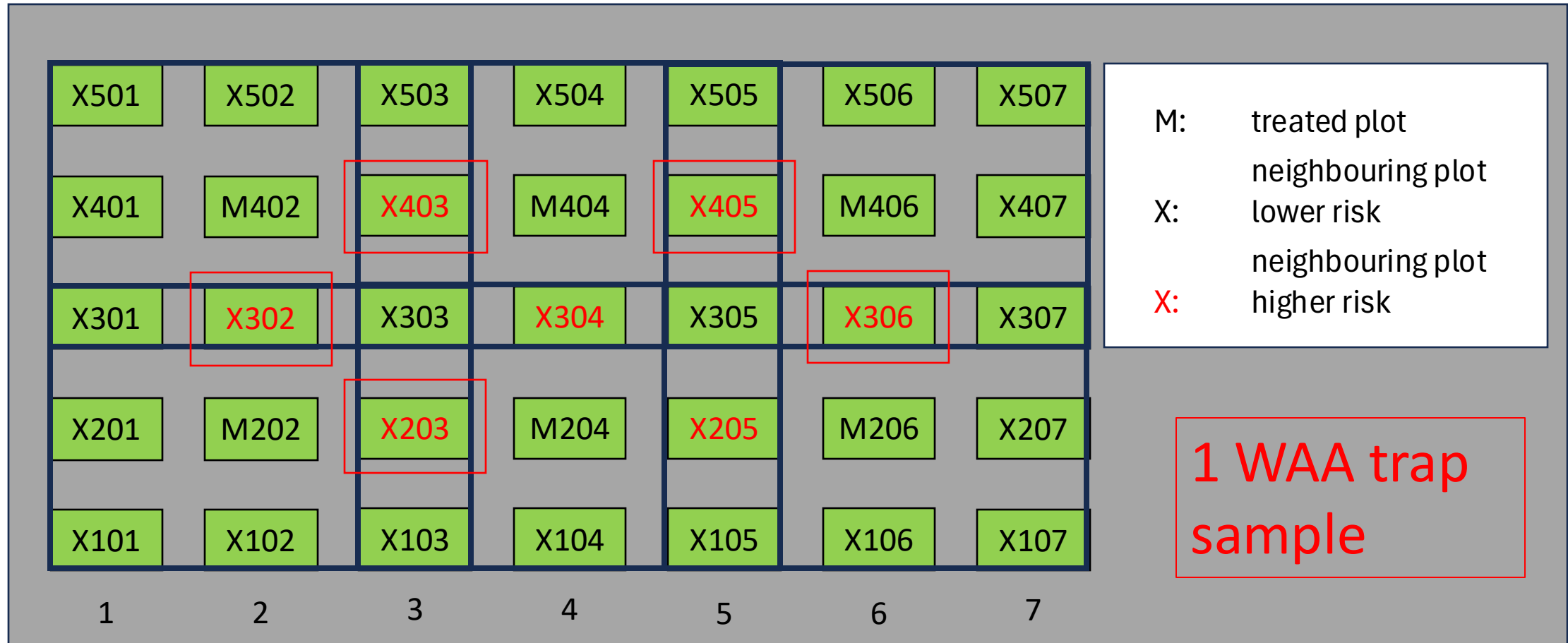
Ulm

Passau

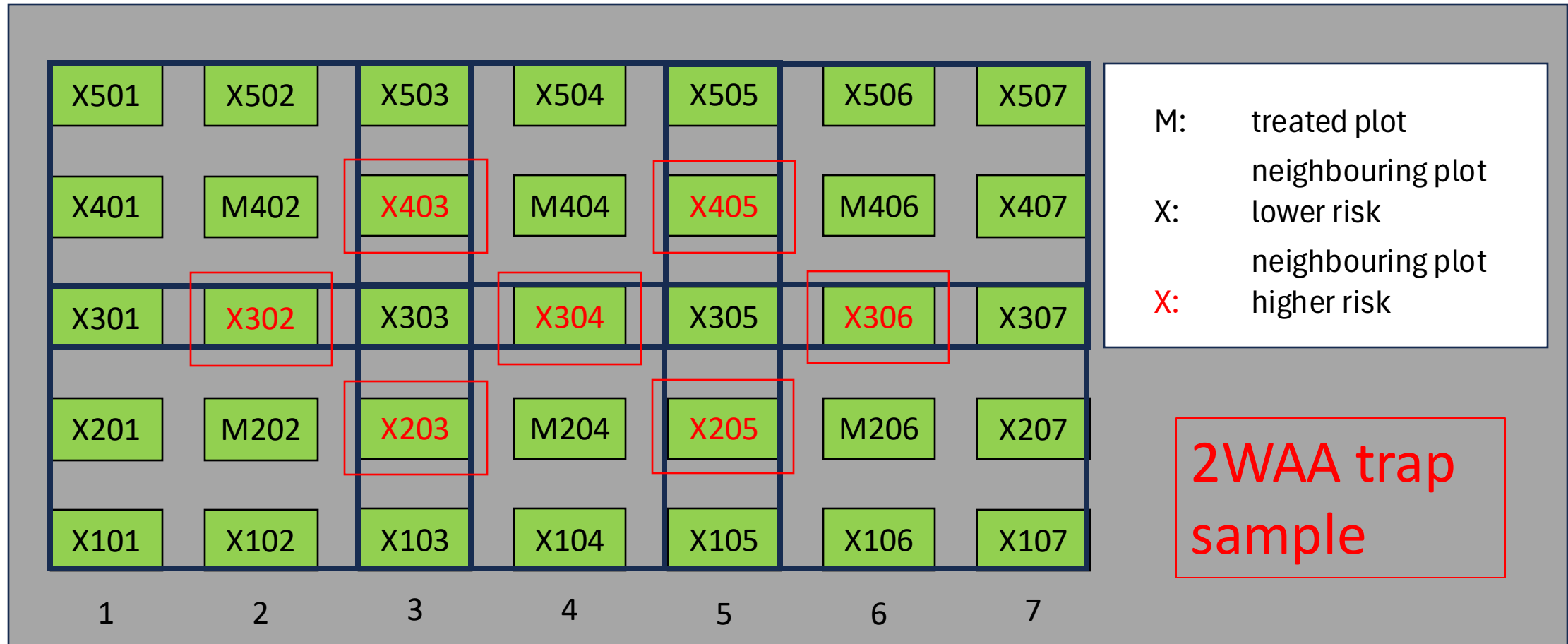
Feldversuch im Winterweizen



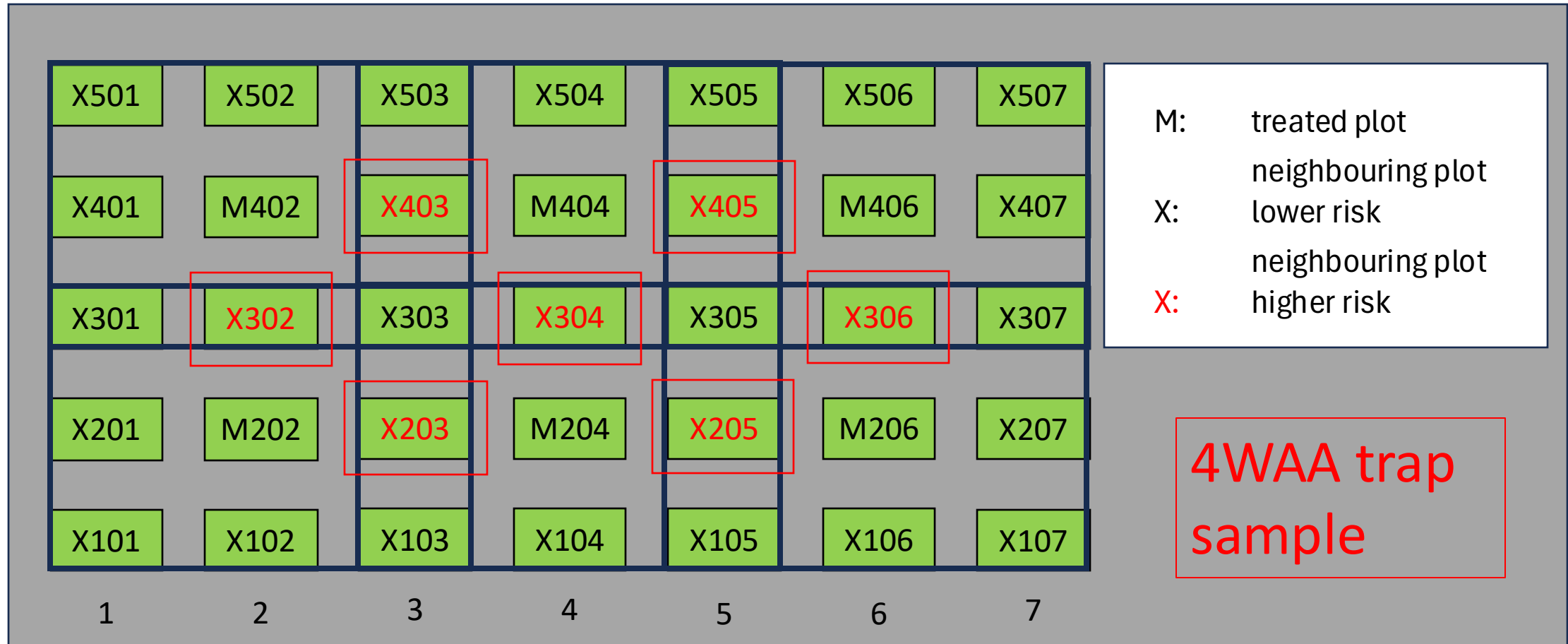
Feldversuch zur natürlichen Ausbreitung von *M. symbioticum*



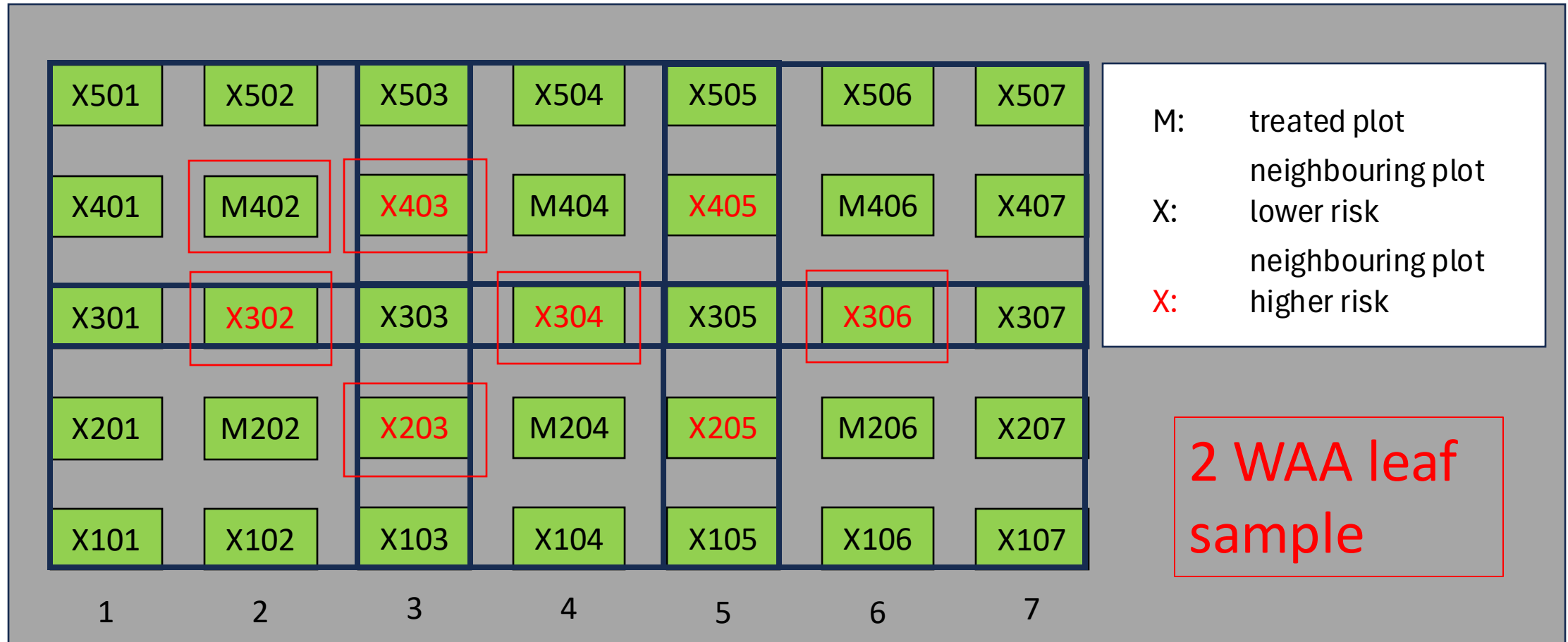
Feldversuch zur natürlichen Ausbreitung von *M. symbioticum*



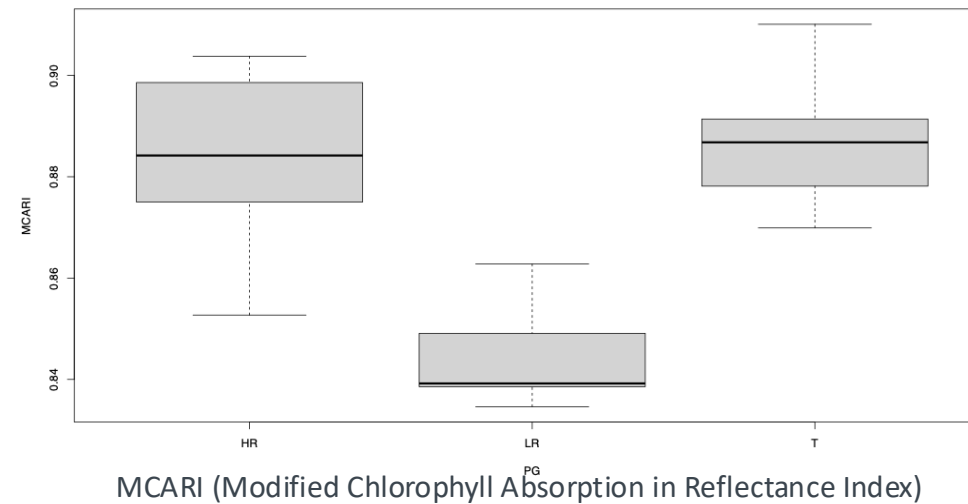
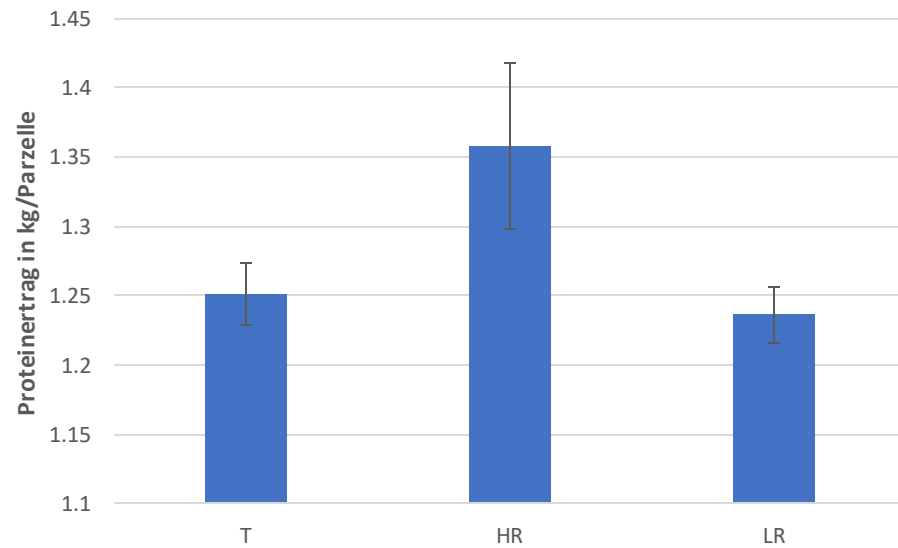
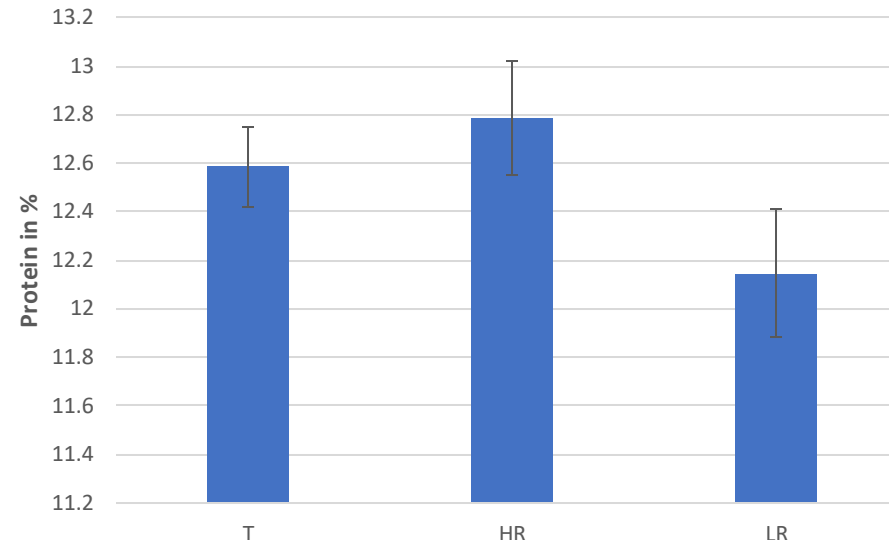
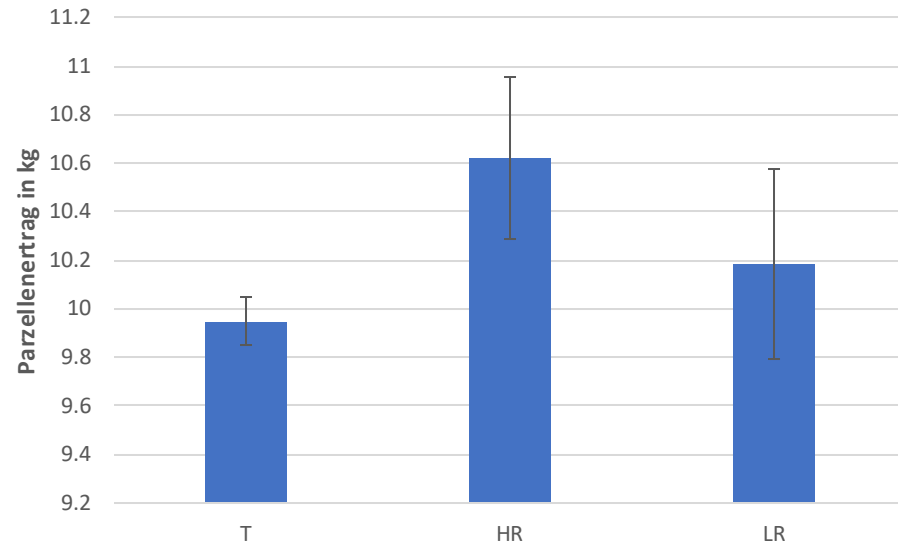
Feldversuch zur natürlichen Ausbreitung von *M. symbioticum*



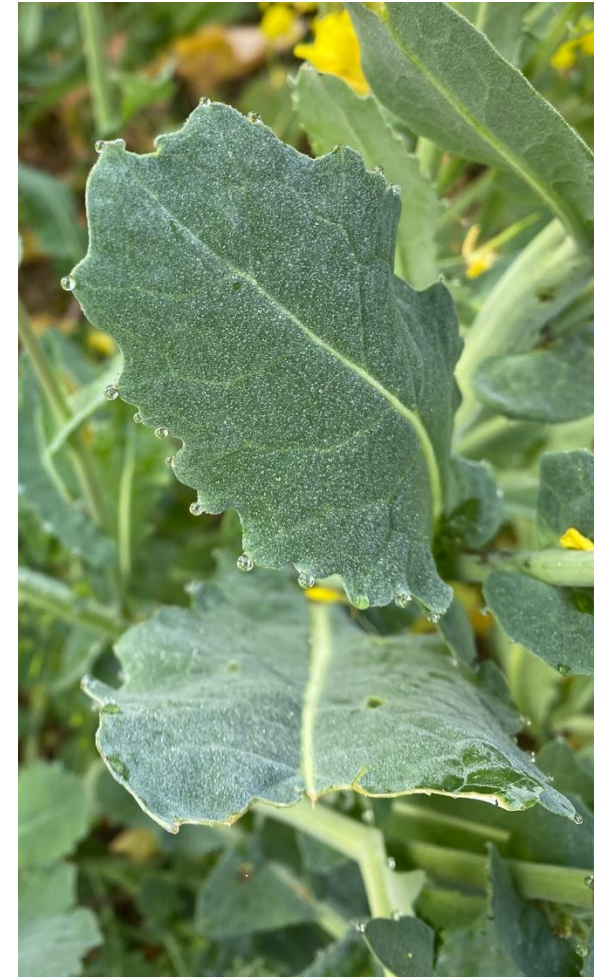
Feldversuch zur natürlichen Ausbreitung von *M. symbioticum*



Ertragsdaten



Guttationstropfen als Übertragungsweg?

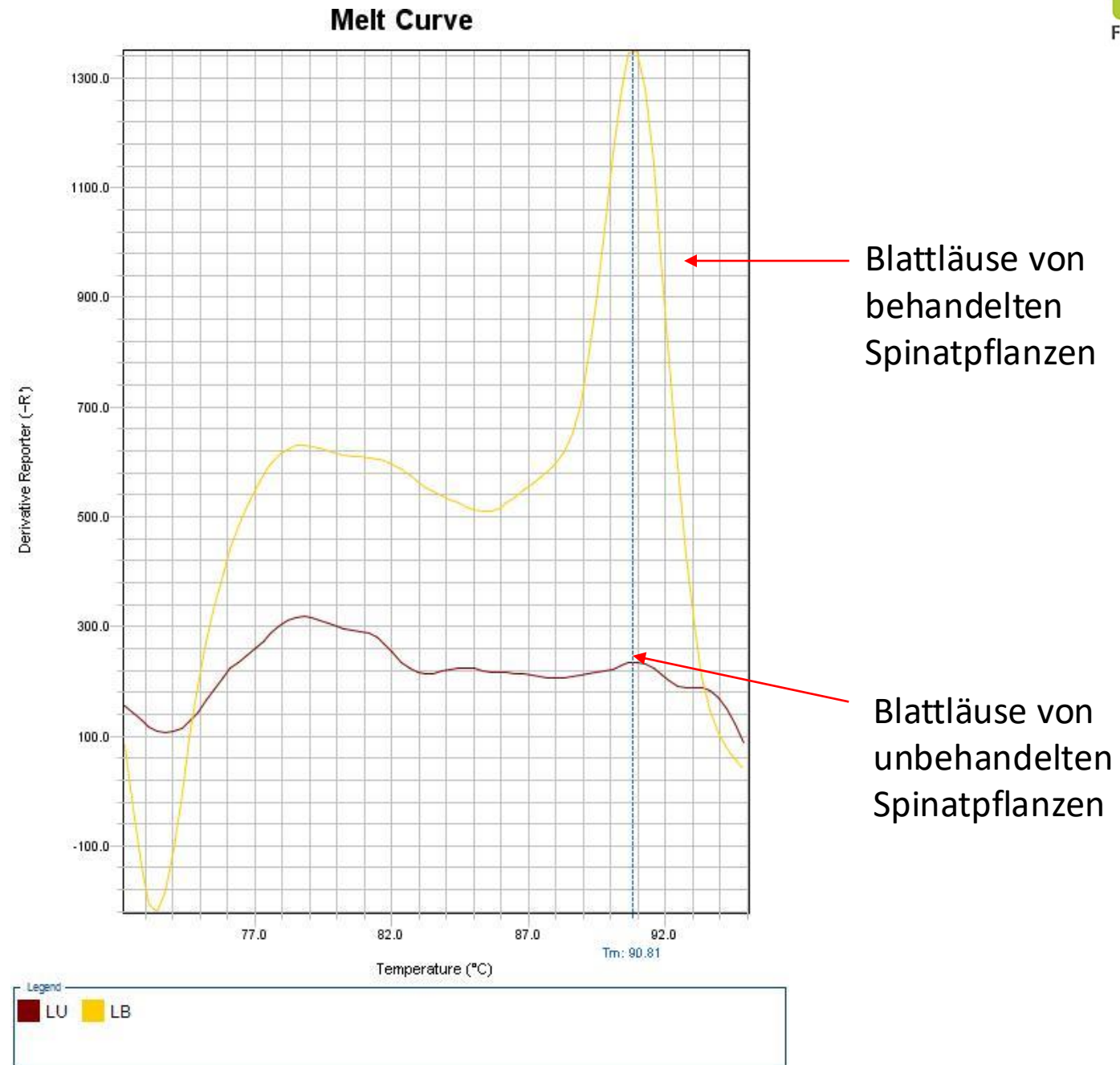




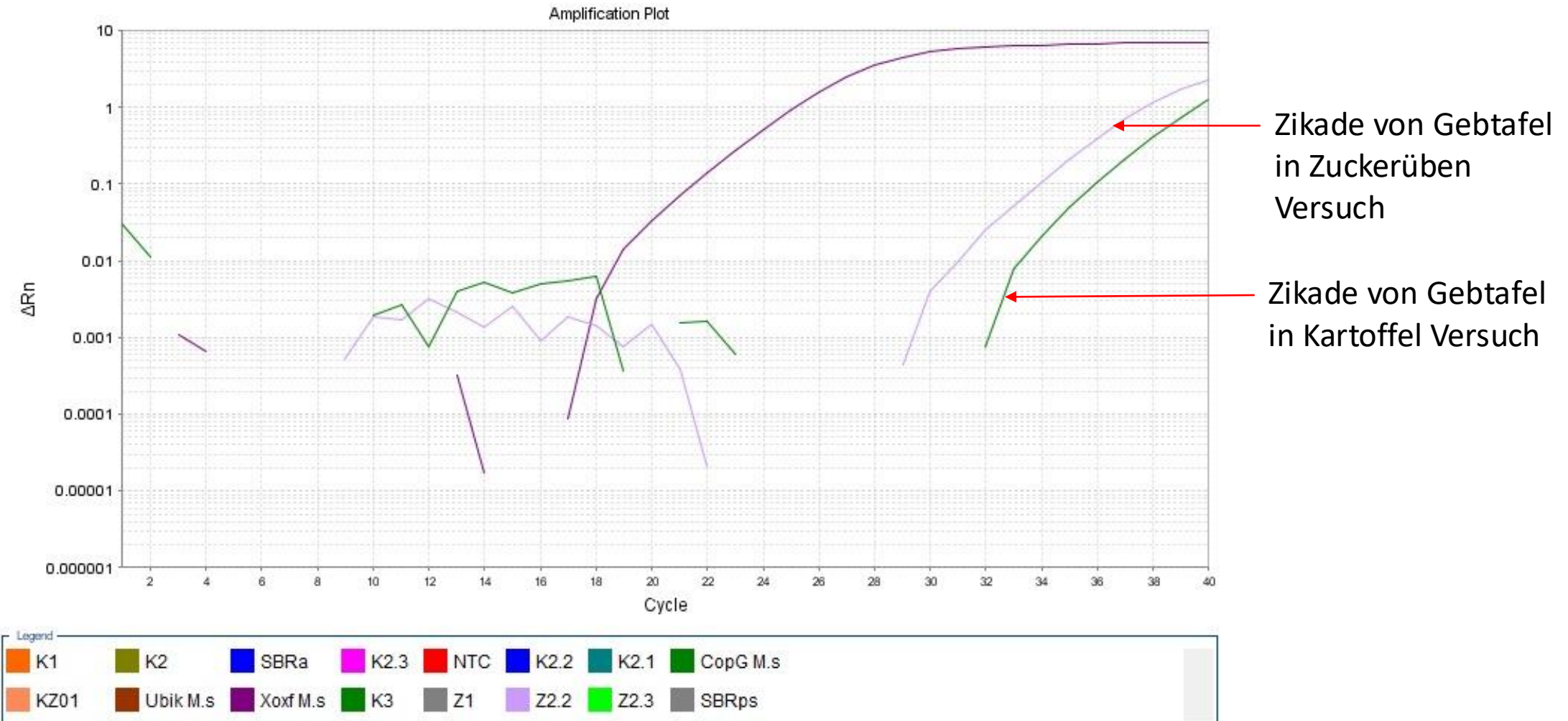
Insekten als Vektoren?



Insekten als Vektoren?



Ergebnisse vom Feldmonitoring *M.symbioticum*





Klimakammer Versuch

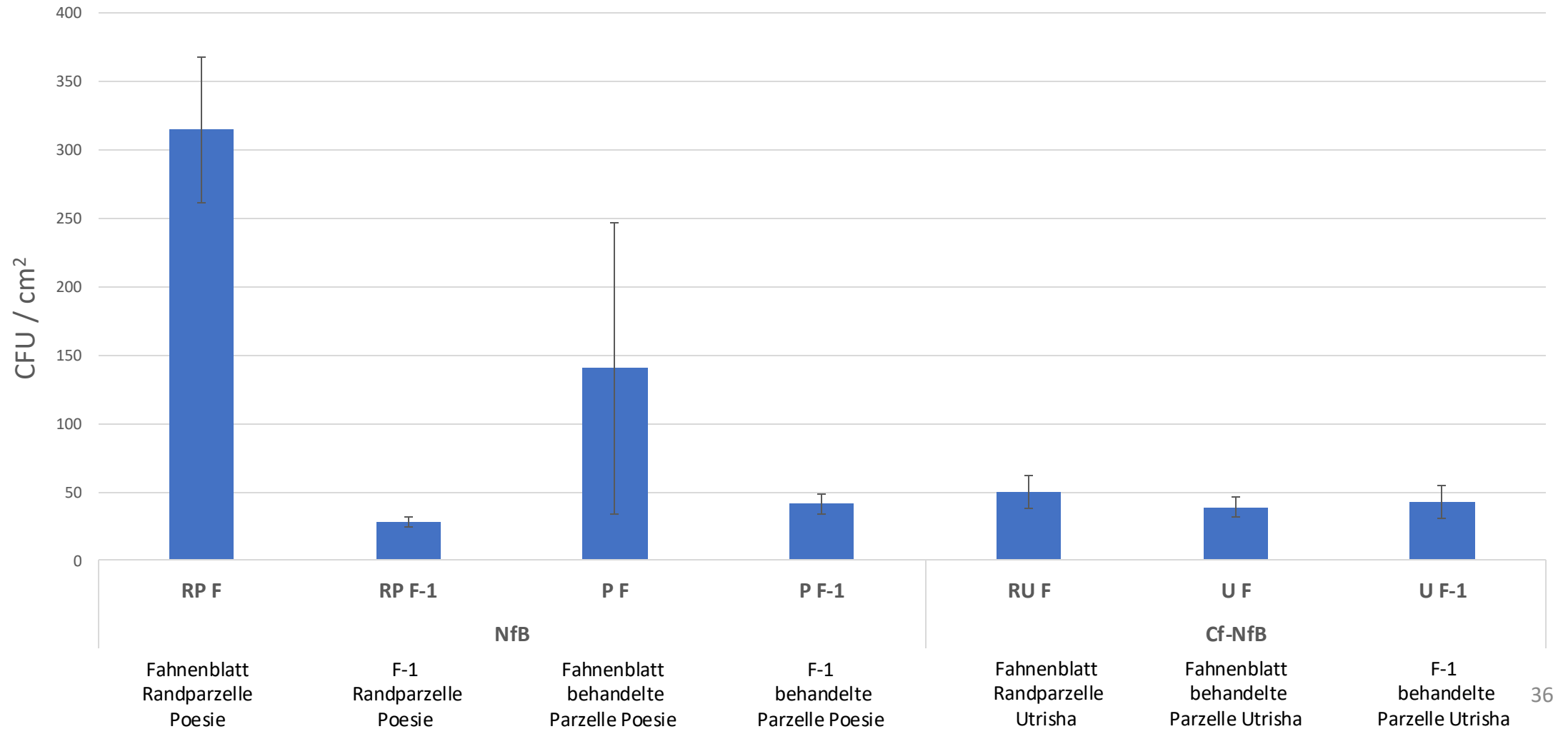
M. symbioticum in Biofilm





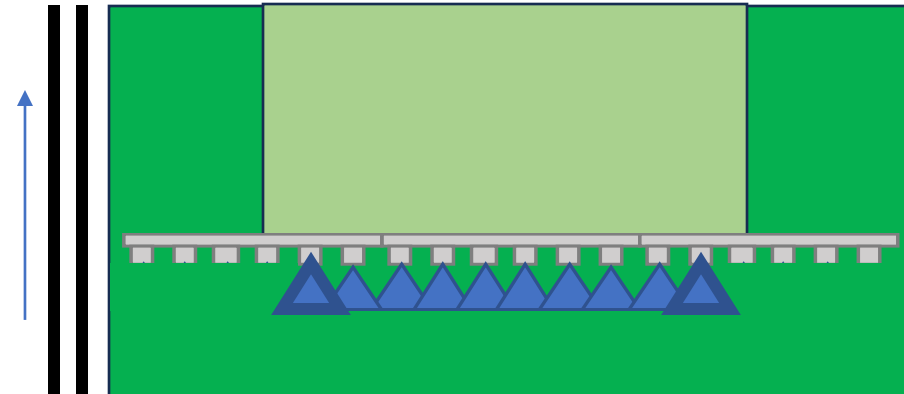
6. Angepasstes Versuchsdesign?

Helfen Rand- oder Trennparzellen?

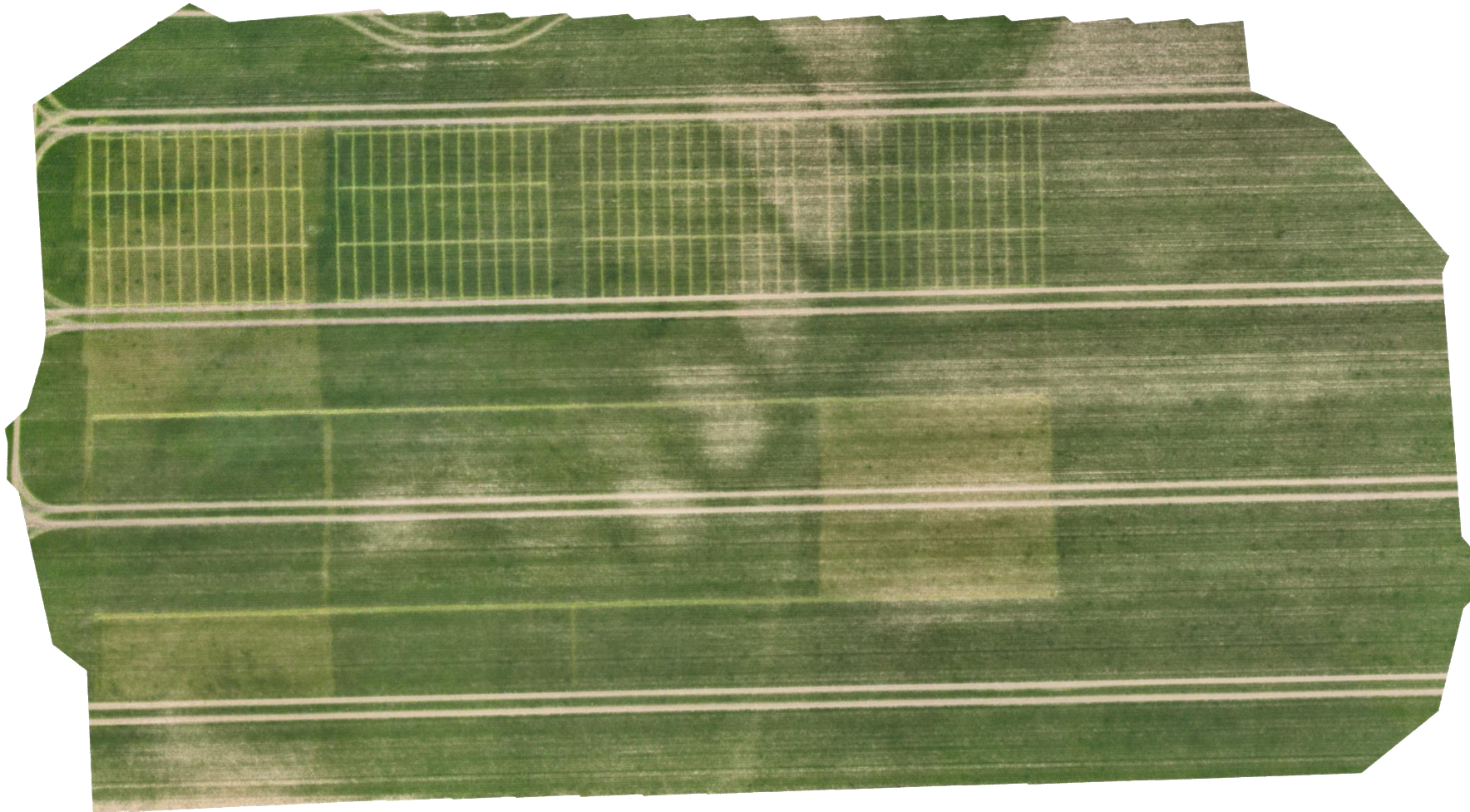


On-farm vs. Exaktversuch

- Applikation im on-Farm Versuch nur im Kern der Großparzelle
- Äußere Teilbreiten und Fahrgasse werden ausgeschaltet



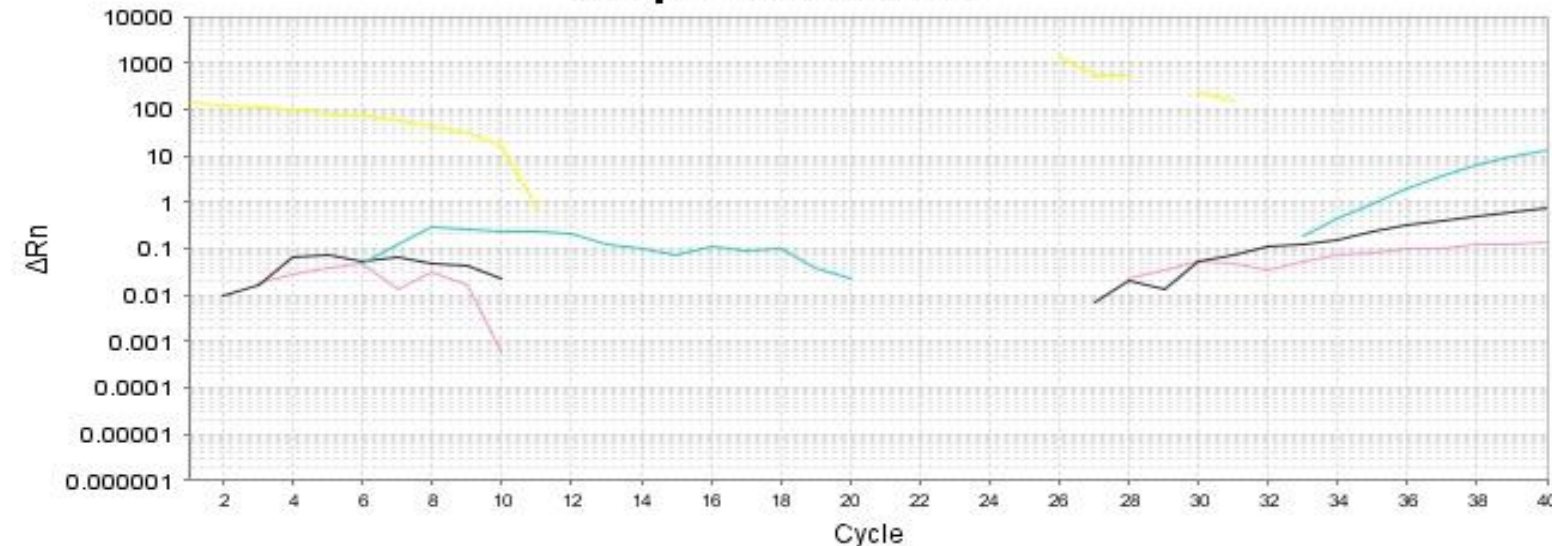
On-farm vs. Exaktversuch



On-Farm Versuch Omya

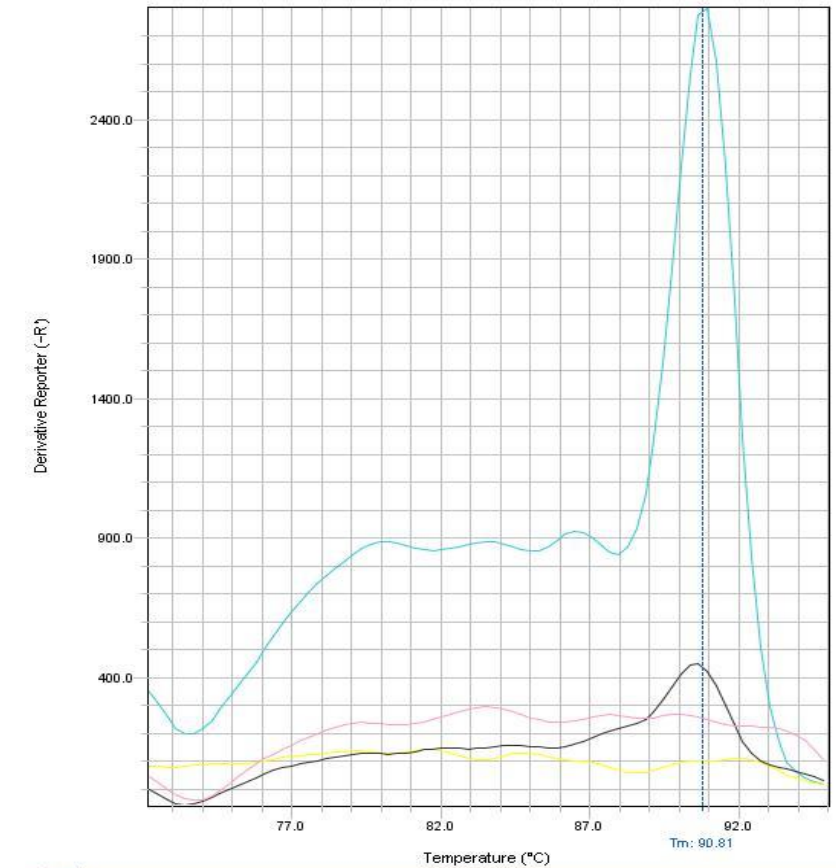
- V1 Mais behandelt
- V2 Mais Kontrolle
- P1 Apfel behandelt
- P2 Apfel Kontrolle

Amplification Plot



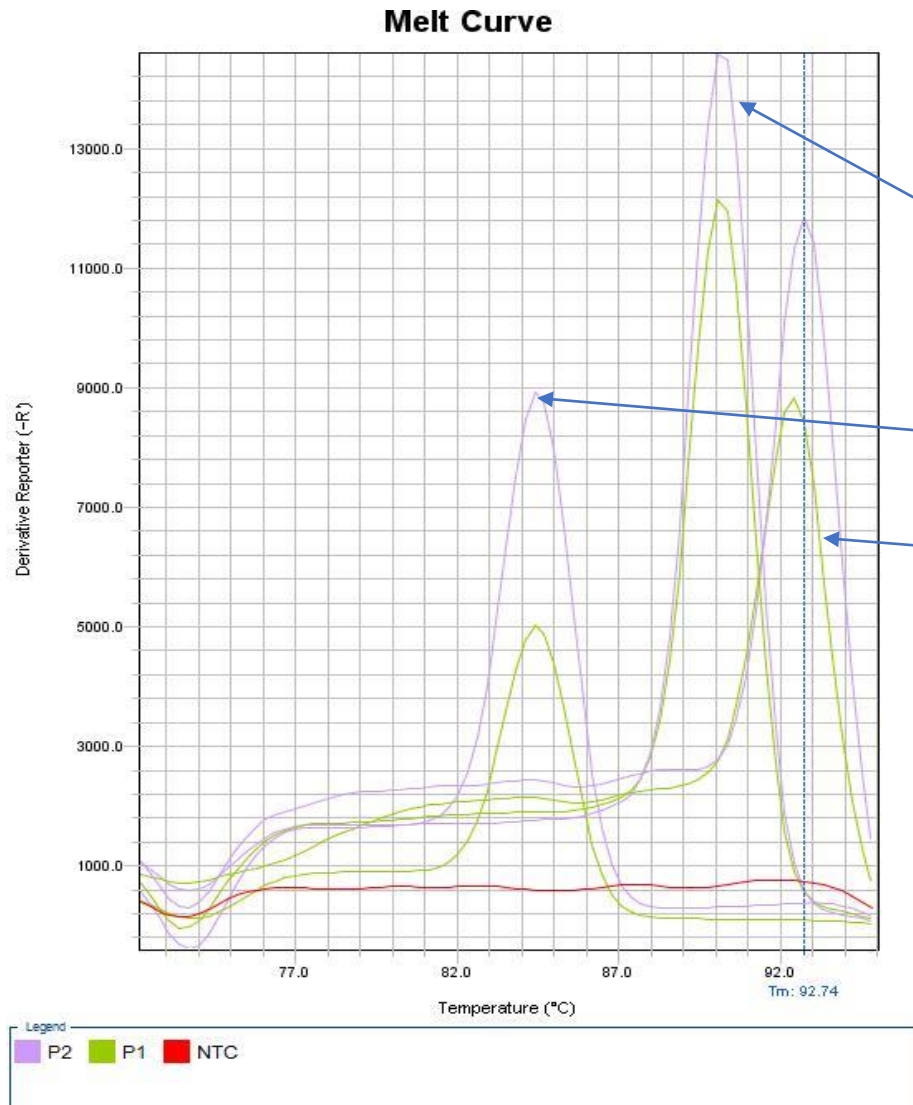
Legend
■ V2 ■ V1 ■ P1 ■ P2

Melt Curve



Legend
■ V2 ■ V1 ■ P2 ■ P1

Spezifische Primer *M.symbioticum*



2 Kolonien aus behandelten Apfelblättern

Primer1 U - 90.05

Primer2 S - 84.33

Primer3 S - 92.74

Fazit

- Die Welt der endophytischen Bakterien ist komplex aber bietet viele Chancen.
- Die Anwendung von Bakterien erfordert ein Umdenken, nicht nur seitens der Landwirte sondern auch für das Versuchswesen. Es handelt sich um lebendige Organismen, die mit der Umwelt interagieren.
- Das klassische Versuchsdesign mit randomisierten Kleinparzellen ist für die Testung von *M. symbioticum* ungeeignet, da nicht sichergestellt werden kann, dass Kontrollen “unbehandelt” sind.



Leducq et al. 2022 Comprehensive Phylogenomics of *Methylobacterium* Reveals Four Evolutionary Distinct Groups and Underappreciated Phyllosphere Diversity

CFU/ml

