

Bestimmung des Mykorrhiza-Infektionspotentials in Landwirtschaftsböden

Version 1.2 (2020)

Code der Referenzmethode	B-MIP		Mögliche Einsatzbereiche
Einsatzbereich	Düngeberatung	Ackerkulturen und Grasland	
		Gemüsebau (Freiland / Gewächshaus)	
		Weinbau, Obstbau, Beerenanbau, Gewürz- und Medizinalpflanzen	
	Standortcharakterisierung		x
	Schadstoffbeurteilung		
	Düngeruntersuchungen	Recyclingdünger	Kompost
			Gärgut fest
			Gärgut flüssig
			Klärschlamm
		Hofdünger	Mist
			Gülle
		Mineraldünger	
		Pflanzenkohle	
	Forschungsmethoden		
Analysenprogramm	Probennahme	B-M-PN	
	Probenaufbereitung	B-PAL	
	Aufschluss		
	Messung	B-MIP	

Konzentrations- / Messbereich	
Angabe der Ergebnisse	Häufigkeit von Hyphen, Vesikeln und Arbuskeln in %.
Zulassungskriterien für Labors	
Bemerkungen für äquivalente Methoden	
Internationale Standards	
Sicherheit / Umwelt	



1. Prinzip

Mykorrhizapilze sind aufgrund ihrer Bedeutung bei der pflanzlichen Nährstoffaufnahme wichtig für die Bodenfruchtbarkeit. Mit der vorliegenden Methode lässt sich die Aktivität der Mykorrhizapilze in einer Bodenprobe bestimmen. Samen einer Indikatorpflanze werden in feldfrische Bodenproben gesät. Nach einer Wachstumsdauer von 60 Tagen wird der Mykorrhizierungsgrad der Wurzeln der Indikatorpflanzen bestimmt.

2. Durchführung

Apparaturen und Geräte:

- (A) Erd-Sieb mit Maschenweite 5 mm
- (B) Wurzel-Sieb mit Maschenweite 2 mm
- (C) Lauchsaamen, *Allium porrum*, Sorte "Dubouchet Selma"
- (D) Kunststoff-Pflanztöpfe, rund, Höhe 6.5 cm, Durchmesser: oben 9 cm, unten 6 cm (z.B. Rundtöpfe Desch, 9 cm, Art.Nr. 35252A, GVZ-Bolltec AG, Zürich)
- (E) Klimakammer (Phytotron). Empfohlenen Bedingungen: Tag/Nacht: 16h/8h, Temperatur: 24/20°C, Lichtintensität: wenn möglich 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, mindestens 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.
- (F) Mikroskop mit 200- bis 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektive 20x, 40x)
- (G) Wasserbad (90°C)
- (H) Vortex Minishaker

Reagenzien:

- (1) Demineralisiertes Wasser (H_2O , Leitfähigkeit < 5 $\mu\text{S/cm}$)
- (2) Kaliumhydroxid 2.5%:
25 g Kaliumhydroxid (KOH , $M = 56.11 \text{ g/mol}$) in 1 l Wasser (1) auflösen
- (3) Salzsäure 1%:
22.71 ml Salzsäure rein (HCl 37%, $M = 36.46 \text{ g/mol}$) mit Wasser (1) auf 1 l auffüllen.
- (4) Trypanblau 0.05%:
0.5 g Trypanblau, 500 ml Glycerin, 50 ml 1 %-ige HCl (3) in 1000 ml-Messkolben geben und mit H_2O (1) bis zur Marke auffüllen.
- (5) saure Glycerinlösung:
500 ml Glycerin (Glycerin wasserfrei, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, $M = 92.1 \text{ g/mol}$), 50 ml 1 %ige HCl (3) in 1000 ml-Messkolben geben und mit H_2O (1) bis zur Marke auffüllen.
- (6) Alkohol 70%:
729 ml Alkohol 96% mit H_2O (1) auf 1 l auffüllen.

Arbeitsvorschrift:

Probenahme:

Die Probenahme und Probenaufbereitung richtet sich nach den Vorschriften RM-ERL-2 (2. Kapitel), B-M-PN und B-PAL, mit folgender Abweichung:

- Der Zeitraum von Entnahme bis zum Ansäen darf nicht länger als 5 Tage dauern (Lagerung bei 4°C).

Biotest:

- Die Bodenmischproben (entnommen gemäss B-M-PN, aufbereitet gemäss B-PAL) werden gesiebt (Maschenweite 5mm (A)) und gründlich durchgemischt. Nach jedem Boden muss das Sieb und das Auffanggefäss gewaschen und mit Alkohol (6) abgesprüht werden, um

Kontaminationen möglichst zu vermeiden. Die gesiebte Erde wird in saubere Töpfe (D) eingefüllt. Pro Boden werden 10 Wiederholungen angelegt.

- Samen der Indikatorpflanze (C) werden 14-16 Std. in Petrischalen in H₂O (1) vorgequollen. 15 Samen werden abgezählt und direkt in die Töpfe gesät und mit 5 mm Vermiculit zugedeckt. Die Töpfe werden mit Untertellern (Petrischalendeckel) in eine Klimakammer (E) gestellt. Während der Keimungsphase wird die Erdoberfläche mit einer Spritzflasche feucht gehalten und mit einem Petrischalendeckel vor Austrocknung geschützt.
- Bewässert wird mit H₂O (1): Die Unterteller werden mit einer Spritzflasche 2-3 mal pro Woche nach Bedarf gefüllt. Nach 30 Minuten werden die Unterteller erneut aufgefüllt, um dem unterschiedlichen Wasserbedarf der einzelnen Pflanzen Rechnung zu tragen. Die Erde darf nicht austrocknen, aber auch nicht vernässen. Nach 2-3 Wochen ausdünnen auf 4 Pflanzen pro Topf.
- Alle Fremdpflanzen in den Töpfen müssen laufend entfernt werden: ausreissen der Pflanzen mit den Wurzeln, mit Hilfe einer Pinzette, die zwischen der Behandlung der einzelnen Böden mit Alkohol (6) gereinigt werden muss.
- Die Pflanzen werden 60 Tage nach der Aussaat geerntet. Die ganzen Pflanzen werden ausgegraben und die Wurzeln unter fliessendem Trinkwasser über einem 2 mm Sieb (B) sorgfältig gewaschen. Dann werden die Wurzeln vom Spross getrennt, in 1.5 cm lange Stücke zerschnitten und in einer Wanne mit Wasser aufgeschwemmt.

Färbung der Wurzeln:

- Pro Topf werden fünfzig 1.5 cm lange Wurzelstücke zufällig entnommen und mit einer modifizierten Methode nach Phillips and Hayman (1970) eingefärbt (falls die Wurzelstücke nicht sofort gefärbt werden können, müssen sie bis zur Färbung in 50%igem Alkohol aufbewahrt werden):
- Aufhellen der Wurzeln: Zuerst werden die Wurzelstücke in ein dickwandiges Reagenzröhrchen (Höhe 9.5 cm, Durchmesser 1.4 cm) gefüllt und mit KOH (2) überschichtet. Anschliessend werden die Röhrchen kurz auf einen Vortex-Schüttler (H) geschüttelt. Sodann werden die Röhrchen 15 Min. in einem Ständer in ein Wasserbad (G) mit 90°C gestellt.
- Spülen: Die KOH wird dekantiert, während man die Wurzeln mit einem Spatel im Röhrchen zurückbehält. Jedes Röhrchen wird mit Trinkwasser aufgefüllt, und das Wasser wird nach kurzem Schütteln abgeleert.
- Ansäuern der Wurzeln: Anschliessend werden die aufgehellten, gespülten Wurzeln mit HCl (3) überschichtet, die Röhrchen werden auf dem Vortex geschüttelt, und anschliessend wird die Säure abdekantiert.
- Färben der Mykorrhizastrukturen: Die angesäuerten Wurzeln werden mit 0.05%iger Trypanblau-Lösung (4) überschichtet und 30 Min. in ein Wasserbad (G) mit 90°C gestellt.
- Wurzelstrukturen entfärben: Um den Kontrast zu verstärken, wird die Färbelösung anschliessend abdekantiert, und die Wurzelstücke werden mit saurer Glycerinlösung (5) überschichtet und bis zur Auszählung darin gelagert (mindestens 1 Tag, bis maximal 1 Jahr möglich).

Bestimmung der Infektionsrate:

- Die Bestimmung der Infektionsrate wird mit einem Mikroskop (F) nach der Gitternetz-Methode durchgeführt (nach McGonigle et al., 1990):
- Von den 50 gefärbten Wurzelstücken werden 20 in saurer Glycerinlösung (5), senkrecht zur Längsachse des Objektträgers auf einem Objektträger ausgelegt, und mit einem grossen Deckglas (40 x 22 mm) zugedeckt und leicht gepresst. Keine verzweigten Wurzelstücke verwenden!
- bei 200-facher Vergrösserung wird der Objektträger, parallel zu seiner Längsachse, 2.5 mal durchquert. Das ergibt total 50 Intersektionen, d.h. im Gesichtsfeld wird 50 mal eine Wurzel sichtbar.
- Erscheint eine Wurzel im Gesichtsfeld, wird sie zuerst an der vertikalen Achse der Skala des Okulars orthogonal ausgerichtet, dann wird abgeklärt, ob die horizontale Achse der Skala Hyphen, Arbuskeln oder Vesikeln schneidet. Dabei muss die Wurzel in ihrem vollen Durchmesser "durchfokussiert" werden.

- Insgesamt ergibt das 50 Ja/Nein-Entscheide für die Kriterien Hyphen, Vesikeln, Arbuskeln. Daraus resultiert eine prozentuale Angabe der Häufigkeit für jedes der 3 Kriterien. Nachfolgend ein Beispiel einer Auswertungstabelle:

Wurzelstelle Nr.	Hyphen ja/nein	Arbuskeln ja/nein	Vesikeln ja/nein
1	+	+	+
2	+		
3	+	+	+
...			
...			
...			
49	+		+
50		+	
Häufigkeit	z.B. 80%	z.B. 70%	z.B. 20%

3. Berechnung

keine

4. Resultatangabe

Häufigkeit von Hyphen, Vesikeln und Arbuskeln in %.

5. Bemerkungen

- Die Resultate lassen sich noch nicht absolut beurteilen, dafür sind Erfahrungswerte notwendig, die zur Zeit noch fehlen. Die Methode eignet sich deshalb vorerst für vergleichende Untersuchungen verschiedener Böden bzw. Belastungen oder für Zeitreihenuntersuchungen.
- Vorgängig zur Berechnung von Unterschieden zwischen Probeflächen mittels einfacher Varianzanalyse (ANOVA) müssen die Rohdaten (%-Werte) einer ArcSin-Wurzel-Prozent-Transformation unterzogen werden (zur Homogenisierung der Varianz). Die Formel lautet:

$$\arcsin \sqrt{\% \text{Wert} / 100}.$$
- Falls vom Aufwand her möglich, ist eine gewichtsabhängige Bewässerung zu empfehlen: Dazu werden die Töpfe vorgängig einzeln wassergesättigt gewogen. 2 – 3 mal pro Woche wird jeder Topf auf der Waage bis zu dem ermittelten Gewicht mit Wasser ergänzt.
- Es ist zu empfehlen, zusätzlich das Trockengewicht von Spross und Wurzeln pro Topf und pro Pflanze zu erheben. Dazu muss bei der Ernte die Anzahl Pflanzen pro Topf ermittelt werden. Spross und Wurzeln werden getrennt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (105°C) und gewogen. Das Gewicht der entnommenen 50 Wurzelstücke kann folgenderweise kompensiert werden: je Topf wird von den 5 Wurzelstücken und von den Restwurzeln je das Frischgewicht bestimmt (nach vorgängigem Abtupfen des Wassers mit Kleenex-Papiertüchlein). Von den Restwurzeln wird der Quotient Trockengewicht/Frischgewicht bestimmt. Das Frischgewicht der eingefärbten Wurzeln wird mit diesem Quotient multipliziert und der erhaltene Wert zum Trockengewicht der Restwurzeln hinzugezählt.
- Bei Dauerbeobachtungen über mehrere Jahre sollte ein exakter phänologischer Zeitpunkt für die Probenahme definiert werden (siehe B-M-PN).

6. Literatur

McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L. and Swan J.A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.

Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-160.

7. Historie

Version	Art der Änderung	neu	bisher
Version 1 (2001)	Erstellung Methode		
Version 1.1 (2003)	Überarbeitung Methode	Französische Übersetzung	
Version 1.2 (2020)	Editorisch	Elektronische Veröffentlichung mit geändertem Layout	

Impressum

Herausgeber	Agroscope Reckenholzstrasse 191 8046 Zürich www.agroscope.ch/referenzmethoden
Auskünfte	Diane Bürge
Copyright	© Agroscope 2020