

UNTERSUCHUNGEN EINER MYKOPHAGEN VAMPIRAMÖBE

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie
der Justus Liebig - Universität Giessen

vorgelegt von Diplom - Biologin Ursula Pakzad, geb. Berghäuser

2003

Prüfungskommission:

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Kunze
2. Gutachter und Themenstellung: Prof. Dr. E. Schlösser
3. Prüfer: Prof. Dr. V. Wolters

Datum der Prüfung: 15.05.2003

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1	EINLEITUNG	3
2	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Material	6
2.1.1	Bodenproben	6
2.1.2	Nährmedien	8
2.1.3	Organismen	11
2.1.4	Enzyme, Puffer, Lösung, Chemikalien, Primer und Sonden	13
2.2	Methoden	16
2.2.1	Isolierung	16
2.2.2	Kultur der Amöben	17
2.2.3	Fixierung und Einbettung	17
2.2.4	Lichtmikroskopie	18
2.2.5	Transelectronenmikroskopie	19
2.2.6	DNA - Isolierung aus Amöben	19
2.2.7	PCR mit 18S rDNA Sonden	20
2.2.8	Analyse der Amplifikate	21
2.2.9	Statistische Auswertung	21
3	ERGEBNISSE	22
3.1	Biologie der Vampiramöbe	22
3.1.1	Gestalt und Fortbewegung	22
3.1.2	Nahrungsaufnahme, Verdauung und Exzystierung	25
3.1.3	Bildung der sekundären Zysten	30
3.1.4	Zellkerne in Trophozoiten und Zysten	35
3.1.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	37
3.1.6	Lebenszyklus	39
3.2	Beutespektrum	43
3.2.1	Bakterien	43
3.2.2	Pilze	43
3.2.3	Algen	45
3.2.4	Nematoden	47

3.3	Beschreibung der Vampiramöbe	50
3.4	Vorkommen der Vampiramöben in Ackerböden	51
3.4.1	Geographische Verbreitung	51
3.4.2	Auswirkungen verschiedenen Ackerbausysteme	51
3.4.2.1	Vergleich Pflug und Direktsaat	52
3.4.2.2	Variante Acker - Grünland	54
3.4.2.3	Biologisch - dynamischer Landbau	55
3.5	Molekularbiologische Untersuchungen	57
3.5.1	DNA - Isolierung aus VA - Kulturen verschiedener Standorte	57
3.5.2	Identifizierung der VA - Isolate mit der 18S rDNA - Sonde	59
3.5.2.1	DNA - Isolate	59
3.5.2.2	Amöbenkulturen	61
4	DISKUSSION	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	SUMMARY	79
7	LITERATURVERZEICHNIS	81
8	ANHANG	85

1 EINLEITUNG

Wird ein Anbau von Winterweizen auf Dauerkultur umgestellt, dann kommt es in der Regel in den ersten Jahren nach der Umstellung zu einer erheblichen Anreicherung bodenbürtiger Krankheitserreger mit ausgeprägten Ertragsminderungen. Wird die Dauerkultur aber trotzdem weitergeführt, dann tritt meist ein Rückgang der zuvor vermehrten Erreger ein. Der Befall der Weizenpflanzen ist beträchtlich reduziert, die Ertragsminderungen sind gering oder kaum noch nachzuweisen. Dieser "decline - effect" ist typisch für *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, den Erreger der Schwarzbeinigkeit. Auch bei diesem Phänomen kommt es zu einer, allerdings zeitlich verschobenen Anreicherung von Bodenorganismen, die mit ihrer antagonistischen Wirkung phytopathogene Erreger bis unter die wirtschaftliche Schadensschwelle verringern können. Zu diesen Antagonisten zählen unter anderem verschiedene Arten von Bakterien, Pilzen, Protozoen und Arthropoden (COOK & BAKER 1983). Ihre Gesamtheit wird als "antiphytopathogenes Potential" bezeichnet (SCHLÖSSER 1997).

Wie sich im Boden lebende Amöben gegenüber Pilzen verhalten, versuchte HEAL (1963) mit 4 Arten von Amöben in Fütterungsversuchen zu klären. Da nur zwei der 16 angebotenen Pilzarten als Nahrung angenommen wurden, schloss er, dass Amöben bei der Zerstörung von Pilzen im Boden keine Rolle spielen würden. Diese Einschätzung änderte sich jedoch, als OLD (1977) eine große Bodenamöbe entdeckte, die sich nach Perforation der Konidienwand (Abb.1) vom Inhalt der Koniden von *Cochliobolus sativus* ernährte (OLD & PATRICK 1976).



Abb.1: Von "hessischer" Vampiramöbe perforierte Konidien von
Cochliobolus sativus (200x)

Mit einer speziellen Isolierungsmethode (OLD 1977) konnte innerhalb kurzer Zeit das Vorkommen mykophager Amöben in verschiedenen Gebieten der Erde nachgewiesen werden: England - OLD (1977), Kanada - ANDERSON & PATRICK (1978), U.S.A. - HOMMA et al. (1979), Australien - OLD & OROZ (1980), Japan - HOMMA & ISHII (1984). Alle hier genannten Autoren beziehen sich in der systematischen Zuordnung der mykophagen Amöben auf OLD (1978), der nach Fütterungsversuchen feststellte, dass die von ihm isolierte Amöbe außer Pilzen auch Blaualgen, Grünalgen, Diatomeen und Nematoden als Nahrung annahm und daher sowohl in der äußeren Gestalt als auch bezüglich des Nahrungsspektrums einer Amöbe glich, die CIENKOWSKY (1876) entdeckt hatte. Er beschrieb sie als ein farbloses protoplasmatisches Wesen, welches einer Vampyrella ähnelte und gab ihm den Namen *Arachnula impatiens*, da es mit energischen Bewegungen zitternd und schwankend mit seinen Pseudopodien nach verwertbarer Nahrung suchte. Gefunden hatte er diesen Organismus im Brackwasser des

Schwarzen Meeres in der Nähe von Odessa. DOBELL (1913) beschrieb ausführlich eine Amöbe, die im frischen Wasser vorkommt und sich von Bakterien, Blaualgen, Grünalgen und vor allem Diatomeen ernährt. Sie entspricht in wesentlichen Teilen der von CIENKOWSKY beschriebenen Amöbe. Er ordnete *A. impatiens* der Familie der Vampyrellidae zu, die eine Anzahl meist von Grünalgen lebenden Amöben umfasst. Eine erneute und eingehende Untersuchung von *A. impatiens* aus schottischer Gartenerde (OLD & DARBYSHIRE 1980) basiert ausdrücklich auf der systematischen Einordnung von DOBELL (1913). Mit vereinfachten Isolierungsmethoden gelang es CHARKRABORTY et al. (1983) fünf weitere mykophage Amöben aus Feldern mit Weizendauerkultur zu isolieren, von denen drei Formen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* parasitierten und an den Hyphen die typischen Löcher hervorriefen. Aus weiteren Untersuchungen von ALABOUVETTE et al. (1981) und CHAKRABORTY et al. (1983) geht hervor, dass mykophage Amöben offenbar verbreitet vorkommen und nach ihren Merkmalen zu unterschiedlichen Genera gehören. Grundlagen und ökologische Bedeutung bodenbürtiger Protozoen, einschließlich ihrer Wirkung auf phytopathogene Pilze, sind von FOISSNER (1994) eingehend referiert worden.

Auch in Hessen konnte aus dem Boden eines Feldes mit Weizendauerkultur eine mykophage Amöbe isoliert werden (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998a), die nachfolgend als Vampiramöbe (VA) bezeichnet wird. Nachdem es gelungen war, sie relativ problemlos zu kultivieren, wurde ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Pflanzenschutzmitteln geprüft (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998b). Die Verbreitung der VA und ihre Biologie waren weitgehend unbekannt und sind daher Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Dies erscheint auch deshalb angezeigt, weil es sich bei der VA offensichtlich nicht um *A. impatiens* handelt, denn sie ist nicht "impatiens", sondern verhält sich im Gegenteil äußerst träge.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 BODENPROBEN

Sie stammen alle von landwirtschaftlich genutzten Flächen. Zur Untersuchung über die Verbreitung der VA innerhalb Deutschlands wurden im Lauf des Jahres 1998 Proben von Feldern auf Rügen, um Kassel, Giessen, Rudolstadt, Halle, Meißen, Hanau und Groß-Gerau sowie aus dem Ausland aus der Schweiz (Schwarzenburg) und dem Iran (Rasht) untersucht. Pro Standort wurden jeweils ca. 500g Boden aus der oberen Schicht bis 15cm Tiefe, verteilt auf 10 Einzelproben, in zufälligen Abständen aus einer Fläche von 50 X 50 m entnommen. Die Einzelproben wurden vermischt und in Plastiktüten bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Im Herbst 1999 wurden zur Untersuchung über den Einfluss verschiedener Bodenbearbeitungsmethoden in Versuchsstationen der Universität Giessen, den ökologisch - landwirtschaftlichen Betrieben Friedeshausen (bei Giessen), Dottenfelder Hof (Bad Vilbel), Birkenhof (bei Siegen) und Gladbacher Hof in Aumenau im Taunus Bodenproben entnommen. Bei dem Vergleich Grünland - Ackerland wurde darauf geachtet, dass die Parzellen aneinander angrenzten. Auf den zu untersuchenden Flächen wurde jeweils eine Fläche von 9 X 30 m abgemessen. Diese wurde in 9 gleich große Areale unterteilt, aus welchen jeweils 3 Mischproben aus der oberen Bodenschicht bis 15 cm entnommen, in sterile Plastiktüten gefüllt und bis zur Bearbeitung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Die Bodenbeschaffenheit der einzelnen Standorte wurde vom Institut für Bodenkunde der Universität Giessen analysiert (Tab.1).

Tab.1 : Beschaffenheit der Bodenproben

Probennr	Standort	Bodenart	pH-Wert	Humusgehalt Ct%
	Fritzlar	schwach toniger Schluff	5,73	1,3
	Groß -Gerau	stark schluffiger Sand	5,82	0,5
	Halle	sandig/lehmiger Schluff	5,15	1,8
	Meißen	sandig/lehmiger Schluff	4,63	1,0
	Rasht/Iran	stark schluffiger Ton	5,99	1,4
	Rudolstadt	schluffiger Lehm	5,51	1,3
	Rügen	sandiger Schluff	4,14	2,0
	Schwarzenburg/Schweiz	mittel toniger Schluff	4,97	2,6
1-9	Rauischholzhausen	mittel toniger Schluff	5,92	1,2
10-18	Rauischholzhausen	schwach toniger Schluff	6,18	1,0
20-28	Friedeshausen	schwach toniger Schluff	6,11	1,2
30-38	Birkenhof/Siegen	schluffiger Lehm	5,97	3,3
40-48	Birkenhof/Siegen	schwach toniger Schluff	4,33	5,7
50-58	Aumenau/Taunus	mittel toniger Schluff	5,85	1,5
60-68	Dottenfelder Hof/BadVilbel	stark toniger Schluff	6,10	1,2
70-78	Hasselbach	schwach toniger Schluff	6,16	2,0
80-88	Hasselbach	mittel toniger Schluff	6,09	1,0
90-98	Giessen/Versuchsfeld	schluffiger Lehm	6,07	2,4
100-108	Giessen/Versuchsfeld	schluffiger Lehm	5,91	1,8
110-118	Werndorf/Taunus	mittel toniger Schluff	6,21	3,0
120-128	Werndorf/Taunus	schwach toniger Schluff	6,28	1,6
130-138	Ossenheim/Wetterau	stark toniger Schluff	6,36	1,5
140-148	Ossenheim/Wetterau	mittel toniger Schluff	6,26	2,3

Probennr.	Standort	Bodenart	pH-Wert	Humusgehalt Ct%
150-158	Staatsdomäne Hanau	schwach sandiger Lehm	5,88	1,0
160-168	Staatsdomäne Hanau	mittel sandiger Lehm	5,65	0,5
180-188	Reiskirchen	schluffiger Lehm	5,13	1,0
190-198	Rechtenbach	schwach toniger Schluff	4,72	2,5
200-208	Dutenhofen/Lahnaue	stark toniger Schluff	5,37	1,5
210-218	Dutenhofen/Lahnaue	mittel toniger Schluff	5,13	2,5
220-228	Rechtenbach	schwach toniger Schluff	5,25	1,3
230-238	Ehringshausen	schluffiger Lehm	5,48	1,7
240-248	Ehringshausen	stark toniger Schluff	5,40	2,4

2.1.2 NÄHRMEDIEN

Malz - Pepton - Agar :

20 g Malzextrakt Bouillon

2 g Pepton

14 g Agar

1000 ml entionisiertes Wasser

V₈ Gemüse - Agar:

20 g Agar

200 ml V8 Gemüsesaft

800 ml entionisiertes Wasser

Grundnährlösung für Algen

	Stammlösung	Gebrauchslösung
KNO ₃	1 M/l (101,1 g)	10 ml
NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O	4,5 x 10 ⁻¹ M/l (62,1 g)	10 ml
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,5 x 10 ⁻¹ M/l (8,9 g)	10 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 x 10 ⁻¹ M/l (24,65 g)	10 ml
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1 x 10 ⁻² M/l (1,47 g)	10 ml
FeSO ₄ x 7H ₂ O*	2,5 x 10 ⁻² M/l	1 ml
entionisiertes Wasser		948 ml

*wird als steriler Fe-Komplex mit EDTA nach dem Autoklavieren der Lösung zugegeben

Herstellung des Fe-EDTA-Komplexes:

In 80 ml entionisiertem Wasser werden 0,7g FeSO₄ x 7H₂O mit 0,93 g des Dinatriumsalzes von EDTA (Titriplex III von Merck) unter kurzem Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf Raumtemperatur auf 100 ml aufgefüllt. Nach 24 Stunden wird noch einmal im Dampfdrucktopf aufgeköcht.

Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung)

H ₃ BO ₃	1 x 10 ⁻³ M/l (61 mg)
MnSO ₄ x H ₂ O	1 x 10 ⁻³ M/l (169 mg)
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1 x 10 ⁻³ M/l (287 mg)
CuSO ₄ x 5H ₂ O	1 x 10 ⁻⁵ M/l (2,5 mg)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	1 x 10 ⁻⁵ M/l (12,5 mg)

Zu 999 ml der Gebrauchslösung wird 1 ml Spurenelementlösung gegeben. Die Lösung wird 20 min im Dampfdrucktopf gekocht und nach Zugabe des Fe-EDTA - Komplexes im Kühlschrank aufbewahrt.

Basalmedium für Grünalgen

	Stammlösung	Gebrauchslösung
KNO ₃	1,0%	20 ml
K ₂ HPO ₄	0,1%	20 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1%	20 ml
Erdextrakt		30 ml
Spurenelemente		5 ml
entionisiertes Wasser		905 ml

VA - Substrat:

Das Medium für die Vampiramoeben bestand zu 9 Teilen aus entionisiertem und 20 min im Dampfdrucktopf sterilisiertem Wasser und zu einem Teil aus 2%igem Bodenextrakt. Die Mischung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch erneut sterilisiert.

Zur Herstellung des Bodenextraktes wurden 1 kg Gartenerde (ohne chemische Dünger) mit 1 l Wasser eine Stunde im Dampfdrucktopf autoklaviert, danach wurde die Lösung abfiltriert und zentrifugiert, erneut sterilisiert und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Gebrauchslösung wurden 2 ml der Erdabkochung mit sterilem bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Auf Anregung von Dr. N. Hülsmann (FU - Berlin), wurden die Amöben später in dem käuflich erhältlichen Quellwasser der Marke Volvic gehalten.

2.1.3 ORGANISMEN

Zur Bestimmung des Nahrungsspektrums der VA wurden in Fütterungsversuchen verschiedene Organismen angeboten. Die angegebenen Konzentrationen geben Auskunft über die Mengen, die jeweils einer VA-Kultur in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 3cm zugegeben wurden.

Bakterien

Sie stammen aus der Sammlung des Phytopathologischen Instituts und wurden auf Malz - Pepton - Agar im Brutschrank im Dauerdunkel bei 25°C vermehrt.

Art	Konzentration
<i>Agrobacterium vitis</i>	88 x 10 ⁶ /ml
<i>Bacillus subtilis</i>	1006 x 10 ⁶ /ml
<i>Clavibacter michiganensis</i>	680 x 10 ⁶ /ml
<i>Erwinia carotovora</i>	794 x 10 ⁶ /ml
<i>Pseudomonas syringae</i>	720 x 10 ⁶ /ml

Pilze

Alle für die Versuche zum Nahrungsspektrum der VA verwendeten Pilze stammen aus der Sammlung des Phytopathologischen Instituts und wurden auf Petrischalen im Brutschrank im Dauerdunkel bei 25°C angezogen. Als Nährmedium dienten Malz - Pepton - Agar oder Gemüseagar.

Art	Konzentration
<i>Alternaria solani</i>	2,6 x 10 ³ Konidien, Hyphenabschnitte/ml
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	2,5 x 10 ³ Sporen/ml
<i>Cochliobolus sativus</i>	2,8 x 10 ³ Konidien/ml
<i>Corticium rolfsii</i>	Myzel
<i>Geotrichum candidum</i>	11 x 10 ³ Sporen/ml
<i>Pythium debaryanum</i>	Myzel
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	9,3 x 10 ³ Hyphenabschnitte/ml
<i>Rhizopus stolonifer</i>	30 x 10 ³ Sporen/ml
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Myzel

Hyphenteile oder Sporen sowie Konidien wurden mit VA - Substrat abgeschwemmt und in kleine Petrischalen von 3 cm Durchmesser gegeben.

Algen

Sie stammen aus der Sammlung des Botanischen Institutes der Universität Göttingen von Prof. Dr. U. Schlösser. Zur Vermehrung der Algen wurde eine Grundnährlösung für einzellige Grünalgen nach Vorschrift des Botanischen Institutes hergestellt. Alle Algen, außer *Klebsormidium flaccidum*, wurden in Petrischalen in dieser Grundnährlösung im Klimaschrank unter Beleuchtung bei 25° inkubiert. Diese Grünalge wurde in einer Basallösung nach Vorschrift des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen angesetzt. Nach 8 Wochen hatten sich die Algen soweit vermehrt, dass sie abzentrifugiert und mit VA - Substrat versetzt für die Ernährungsversuche eingesetzt werden konnten.

Art	Konzentration
<i>Chlamydomonas noctigama</i>	1008 x 10 ³ Zellen /ml
<i>Chlorococcum hypnosporum</i>	496 x 10 ³ Zellen /ml
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	16 x 10 ³ Zellen/ml
<i>Nostoc muscorum</i> (Blaualge)	64 x 10 ³ Zellfäden/ml
<i>Stichococcus bacillaris</i>	4992 x 10 ³ Zellen /ml
<i>Tetracystis vinatzeri</i>	83 x 10 ³ Zellen/ml
<i>Uronema confervicola</i>	105 x 10 ³ Zellen /ml

Nematoden

Die als Nahrungsquelle für VA getesteten Nematoden wurden im Institut für Phytopathologie der Universität Giessen gehalten. Für die Fütterungsversuche wurden sie gründlich mit VA - Substrat gewaschen und direkt in mit Amöben besetzte Petrischalen gegeben.

Art	Anzahl der Nematoden
<i>Aphelenchus avenae</i> (mycophag)	310/ml
<i>Panagrellus redivivus</i> (bakteriophag)	260/ml
<i>Pratylenchus penetrans</i> (phytophag)	--

2.1.4 ENZYME, PUFFER, LÖSUNGEN, CHEMIKALIEN, PRIMER UND SONDEN

Enzyme

Taq DNA-Polymerase, hitzestabile DNA - Polymerase aus dem Bakterium

Thermophilus aquaticus mit einem Temperaturoptimum von 72°C.

(Supra-Taq/Gene-Craft, Boehringer/Mannheim)

Proteinase K (Boehringer/Mannheim)

Primer und Sonden

Die Sequenzanalyse der 18S rRNA der VA wurde von Frau C. Wylezich im Zoologischen Institut der Universität Leipzig durchgeführt (Abb.2). Die Anfangs- bzw. Endabschnitte 18SF und 18SR dienten als Primer für die DNA-Sonden.

LOCUS	AMOEBE	1808 bp	DNA			23-JUN-1998
BASE COUNT	483A	359 C	469 G	497 T		
ORIGIN						
1	AACCTGGTTG	ATCCTGCCAG	TAGTCATATG	CTTGTCTCAA	AGATTAAGCC	ATGCAAGTCT
61	AAGTATAAGC	ATTTATACTG	TGAAACTGCG	GAAAGCTCAT	TATATCAGTT	ATAGTTTATT
121	TGATGGTAAC	CTACTACATG	GATAACCGTA	GTAATTCTAG	AGCTAATACA	TGCCCAGAAG
181	CGGTTTCGCA	AGGGACCGTG	GACTIONTAG	ATCAAGAGCC	AACCCTGCTT	GCAGGTCTAA
241	GCTGAATCAT	AGTAATTCG	CTAATCGCAT	GGTCTTGAC	CGGCGATGGG	TCATTCAAAT
301	TTCTGCCCTA	TCAGCTGTGA	TGTTAGTGTA	GTGGACTAAC	ATGGCATAAA	CGGGTGACGG
361	AGGATTAGGG	TCTGATTCCG	GAGAGGGAGC	CTGAGAAATG	GCTACCACTT	CCAAGGAAGG
421	CAGCAGGCGC	GTAATTACC	CAATCCCGAC	ACGGGGAGGT	AGTGACAAGA	AATAACAATA
481	CCGGATCCTT	TTAGATCTGG	TAATTGGAAT	GAGTACAACC	TAAACTCCTT	AACAAGGACC
541	AATTGGAGGG	CAAGTCTGGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	CAGCTCCAAT	AGCGTATATT
601	AAAGTTGTTG	CAGTTAAAAG	GCTCGTAGTC	GAACTTTTGG	TTCTTTAGTC	TTGTCCCGTT
661	CCTTTTTGGG	ACGTTGTGAC	GAGTCTTAGA	ACCTTCTTGG	TTGAGAGCGC	TTCTGCCCTT
721	TATTGGGTTG	GTTGCGTGCT	CTGCCTCTT	TACTGTGAGA	AAAACAAAGT	GCTCAAAGCA
781	GGCTTTACAG	CCTGAATGCG	TTAGCATGGA	ATAATAAGAT	AGGACTTTGT	TTCTATTTTG
841	TTGGCTCTGA	GGAACAAAGT	AATGATTGAT	AGGGATAGTT	GGGGGTGCTC	GTTTAAACG
901	GTCAGCGGTG	AAATGCATGG	ACCCGTTAAA	GACGAACTA	TGCGAAAGCA	TTCACCAAGG
961	ATATCTTCTT	TGATCAAGAA	CGAAAGTTGG	GGGATCGAAG	ACGATCAGAT	ACCCGCTAG
1021	TCTCAACCAT	AAACTATGCC	GACTIONGGAT	TGGCGGCAGT	TGATCATTGA	CCCCGTCAGC
1081	ACCTTATGAG	AAATCAAAGT	CTTTGGGTTT	TGGGGGGAGT	ATGGTCGCAA	GGCTGAAACT
1141	TAAAGGAATT	GACGGAAGGG	CACCACCAGG	AGTGGAGCCT	GCGGCTTAAT	TTGACTCAAC
1201	ACGGGAAAAC	TTACCAGGTC	CGGACATAGT	AAGGATTGAC	AGATTGAAGA	TCTTTCTTGA
1261	TTCTATGGGT	GGTGGTGCAT	GGCCGTTCTT	AGTTGGTGGA	GTGATTTGTC	TGGTTAATTC
1321	CGTTAACGAA	CGAGACCTCA	ACCTATTAAT	TATGTCTGAC	CAAGCTTCGG	CTTGGATGAG
1381	ACTTCTTAGA	GGTACTGTTG	GTGCTACAAG	CCGACGGAAG	TTTGAGGCAA	TAACAGGTCT
1441	GTGATGCCCT	TAGATGTTCT	GGGCCGCACG	CGCGCTACAC	TGATGCAAGC	ATCAAGTACT
1501	TCCTTGACTG	AAAAGTCAGG	GTAACCTTTT	GAAATTGCAT	CGTGATGGGG	TTTGACGATT
1561	GTAATTGTTC	GTCACTAACG	AGGAATTCCT	AGTAAGCGCG	GGTCATCAGC	CCGCACTGAT
1621	TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTCCTAC	CGATTGAATG	TTCCGGTGAA
1681	TCCTTCGGAC	CTATTCTAG	AGGTGGGGAA	ACTCACTTTT	AGAAGATTGG	GAAGTTGTGT
1741	AAACCTTAAC	ATTTAGAGGA	AGGAGAAGTC	GTAACAAGGT	TTCCGTAGGT	GAACCTGCCG
1801	AAGGATC					

Abb.2 : Sequenz der 18S rRNA der VA (Isolat Fritzlar-Werkel)

Sequenzen von Primern und Sonden hervorgehoben

Die Sonden vamp 630R und 1060F wurden nach Absprache mit Prof. Dr. M. Schlegel vom Zoologischen Institut der Universität Leipzig als hinreichend charakteristisch für eine Bestimmung der in Giessen isolierten VA ausgewählt. Die Synthese der Sonden und der Primer erfolgte durch die Firma MWG - BIOTECH AG in Ebersberg.

Sonde vamp 630 R: 5' - ACT AAA GAA CCA AAA GTT CG - 3'

Sonde vamp1060F: 5' - GGA TTG GCG GCA GTT GAT CA - 3'

Primer zu vamp 630R: 18SFOR: 5' - AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT -3'

Primer zu vamp1060F: 18SREV: 5'- TGA TCC TTC CGC AGG TTC ACC TAC - 3'

Puffer, Lösungen und Chemikalien

PBS (Phosphat-Buffer-Sörensen), pH

Ansatz für 100ml: Lösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ 20% (0,2g)

Lösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ 80% (0,96g)

10xTE - Puffer : 1 M Tris/HCl(pH 7,5), 0,5 M EDTA

10xTBE - Puffer : 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,025 M EDTA

Der pH-Wert wird mit Borsäure auf 8,3 eingestellt. Vor Gebrauch wird der Puffer autoklaviert.

Bleicitratlösung (0,5%) stets frisch ansetzen:

$1,33\text{g Pb}(\text{NO}_3)_2 + 1,76\text{g Na}_3\text{C}_6\text{H}_5=7 \times 2\text{H}_2\text{O} + 30 \text{ ml H}_2\text{O}$

1 min kräftig schütteln danach 30 min stehen lassen und ab und zu schütteln,

8 ml 1N NaOH zugeben und mit H_2O auf 50 ml auffüllen.

CTAB - Cetyltrimethylammoniumbromid

SEVAG - Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)

Höchst-Farbstoff 33258 : Bisbenzimid ($C_{25}H_{24}N_6 \times 3HCl \times 5 H_2O$)

2.2 METHODEN

2.2.1 ISOLIERUNG

Nach der von HOMMA et al. (1979) beschriebenen "Sandwich"-Methode wurden Konidien von *Cochliobolus sativus* als Beuteorganismen auf einen Milliporefilter mit einem Durchmesser von 1,3 cm und einer Porengröße von 1,2 µm gegeben und zwischen 2 Nucleoporefilter mit einem Durchmesser von 2,5 cm und einer Porengröße von 1,0 µm gelegt. Die Nucleoporefilter wurden am Rand mit Vakuumfett verschlossen. Pro Bodenprobe wurde eine Petrischale (10 cm) mit gut vermischtem und von Steinen und groben Teilen gereinigtem Boden befüllt und mit sterilem entionisiertem Wasser angefeuchtet. In jede Petrischale wurden 2 Sandwichfilter so eingebracht, dass sie völlig mit Erde bedeckt waren. Die Proben wurden in feuchten Kammern bei Zimmertemperatur 8 bis 12 Wochen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der innenliegende Milliporefilter mit den Konidien entfernt und mit sterilem Quellwasser (Volvic) aufgeschwemmt. Im Durchlicht am Umkehrmikroskop wurden perforierte Konidien, Zysten und aktive Amöben ausgezählt. Ausgewählte Fälle wurden fotodokumentiert. Waren in einer Probe Amöben vorhanden, so wurde versucht, sie in Kultur zu nehmen

2.2.2 KULTUR DER AMÖBEN

Die Kultur der Amöben erfolgte in Petrischalen aus Polystyrol, von 3 cm Durchmesser. Als Medium wurde anfangs steriles entionisiertes Wasser, versetzt mit 2%igem Bodenextrakt verwendet, später wurde auf das käuflich erhältlich Quellwasser Volvic umgestellt. Pro Ansatz wurden 250 µl Inokulum aus einer gut wachsenden Amöbenkolonie auf *Cochliobolus sativus* sowie 3 ml VA - Substrat genommen. Die jeweiligen Futterorganismen wurden direkt mit dem Amöbensubstrat von den Agarplatten abgeschwemmt und in den angegebenen Konzentrationen (siehe 2.1.3) in bereits mit Inokulum beimpfte (jeweils Kontrolle am Mikroskop), kleine Petrischalen von 3 cm Durchmesser gefüllt. Nach Versiegelung des Randes mit Parafilm wurden die Petrischalen dann 3 bis 4 Wochen bei Raumtemperatur unter Vermeidung von direktem Sonnenlicht aufgestellt.

2.2.3 FIXIERUNG UND EINBETTUNG

Die Fixierung von Zysten und Konidien erfolgte in 2,5%igem Glutaraldehyd in PBS für 2 Stunden. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe beginnend bei 50% dehydriert und in 100%igem Ethanol aufbewahrt.

Für die Untersuchung am TEM wurden die mit Glutaraldehyd fixierten Proben 2 x 10 min in PBS gewaschen und in 1% wässrigem OsO₄ für 1 h im Dunkeln nachfixiert. Die Proben wurden 3 x in entionisiertem Wasser gewaschen und über Nacht stehen gelassen. Danach erfolgte eine Kontrastierung mit 2% wässrigem Uranylacetat bei 60°C für 3 Stunden im Trockenschrank. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 100%) wurden die Proben für jeweils 10 min dehydriert. Danach wurden die Proben für jeweils 15 min in 100% Ethanol und in Propylenoxid gegeben. Die so vorbereitete Infiltration und die Einbettung in Epon wurde mit einem Gemisch von 1:1 Propylenoxid-

Epon für 1 Stunde begonnen und mit einem Gemisch 1 : 2 über Nacht fortgeführt. Danach wurden die Proben in Blöckchen für 6 Stunden in reinem Epon gehalten. Die Einbettung erfolgte in Beem - Kapseln in reinem Epon, das bei 60°C für 48 Stunden im Trockenschrank polymerisierte.

Die Blöckchen wurden gespitzt und geschliffen. Die Ultradünnschnitte wurden an einem Ultra - Mikrotom der Firma Leitz mit einem Diamantmesser angefertigt. Diese wurden mit beschichteten Grids aufgenommen und zur Nachkontrastierung für 60 min auf einen Tropfen Bleicitrat (0,5%) gelegt, in entionisiertem Wasser gewaschen und im TEM untersucht.

2.2.4 LICHTMIKROSKOPIE

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden im Durchlicht mit einem inversen Olympus Mikroskop (IM) durchgeführt. Die Auszählungen und Beobachtungen erfolgten direkt in den Petrischalen. Für eine Fotodokumentation wurden die Kulturen in speziellen Objektträgern für Lebendbeobachtungen (MICRO-LIFE) herangezogen. Die Fluoreszenzbilder sowie die Bewegungssequenzen wurden unter freundlicher Mithilfe von Herrn Dr. Olaf Heller in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) der Universität Giessen mit einem Olympus IMT2 Mikroskop aufgenommen und digitalisiert. Die Interferenzaufnahmen erfolgten am Zeiss - Mikroskop (Axioplan) und im Zoologischen Institut der Universität Giessen am inversen Leitz - Mikroskop. Die Dias wurden mit einer Olympus OM-2 MC 100 Spot Kamera, und einer Leitz - Kamera aufgenommen. Als Film wurde Ektachrom 64T von Kodak verwendet. Die Dias wurden im Rechenzentrum der Universität Giessen digitalisiert.

2.2.5 TRANSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Alle TEM - Aufnahmen wurden in der ehemaligen Abteilung für Zoologie des Fachbereichs Biologie der Universität Siegen bei Herrn Prof. U. Berthold an einem Zeiss EM 9 S-2 durchgeführt. Die Aufnahmen wurden im dortigen Labor selbst entwickelt.

2.2.6 DNA-ISOLIERUNG AUS AMÖBEN

Amöbenzysten wurden frisch oder fixiert mit einem Gummischieber vom Boden der Petrieschalen abgelöst, das Substrat abzentrifugiert und dekantiert. Das Pellet wurde im Eppendorfgefäß auf Eis mit einem Stöpsel zerrieben. Die DNA - Extraktion erfolgte nach der von MÖLLER et al. (1992) beschriebenen Methode zur Isolierung der DNA aus Pilzmaterial.

Das fein zerriebene Pellet wurde in 250 µl TES aufgenommen, mit 15µl Proteinase K versetzt und im Wasserbad auf einer Schüttelplatte 30 min bei 60° inkubiert. Die Extraktion erfolgte nach Erhöhung der Salzkonzentration durch Zugabe von 70µl 5M NaCl und von 32,5 µl 10%iger CTAB sowie einer Inkubation für 10 min im Wasserbad bei 65°C. Nun wurden 350 µl SEVAG dazugegeben und die Probe vorsichtig mit der Pipette gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach 10 min. Zentrifugation bei 4°C und 14000 Upm wurde der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, vorsichtig mit 112,5 µl 5M NH₄ Ac gemischt und für mindestens 30 min auf Eis gestellt. Bei 4°C und 14000 Upm wurde erneut 3 min zentrifugiert. Zum Ausfällen der DNA wurde der Überstand in ein frisches Gefäß dekantiert, mit 510 µl Isopropanol versetzt und sofort 5 min bei 14 000 Upm zentrifugiert. War keine DNA als Pellet zu sehen, wurde das Gefäß auf Eis gestellt und nochmals 15 bis 30 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend 2x mit kaltem 70%igem

Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 50 µl TE - Puffer aufgenommen. Die Menge der extrahierten DNA wurde anschließend photometrisch bei 260 und 280nm bestimmt. Um festzustellen, ob es sich hierbei um die gewünschte, hochmolekulare DNA handelt, wurde ein kleiner Teil der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch untersucht. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -18 °C tiefgefroren.

2.2.7 PCR MIT 18SrDNA - SONDEN

Die 25 µl Reaktionsvolumen pro PCR - Gefäß hatten folgende Zusammensetzung:

2,5 µl Sonde vamp 630R	oder	2,5 µl Sonde vamp 1060F
und 2,5 µl Primer 18SF		und 2,5 µl Primer 18SR

dazu wurden jeweils

0,1 µl Taq - Polymerase

2,5 µl 0,2 mM dNTP

2,5 µl 10x TBE

0,75 µl 50 mM MgCl₂

13,15 µl steriles entionisiertes Wasser

1,0 µl DNA der Probe in sterilem Wasser pipettiert.

Nach Zugabe der Proben - DNA wurde das Reaktionsgemisch in einer Zentrifuge (Heraeus Sepatech) leicht nach unten geschleudert und die Gefäße in einen Thermocycler (Primus/MWG Biotech) gestellt.

Für die Sonde vamp 630R und den Primer 18SF lag die Schmelztemperatur bei 95°C für 5 min und Abkühlen auf 47°C. Der 35 fache Zyklus umfasste:

- Denaturierung der DNA bei 92°C für 45 sec,
- Anlagerungsphase bei der Abkühlung auf 47°C für 1min
- Synthesephase bei 72°C für 2 min

Für die Sonde 1060F und den Primer 18SR wurde die DNA in 3 min bei 95°C aufgeschmolzen und dann auf 53°C abgekühlt. In ebenfalls 35 Zyklen erfolgte

- Denaturierung der DNA bei 92° in 45sec
- Anlagerungsphase bei der Abkühlung auf 53°C für 1 min
- Synthesephase der DNA bei 72°C für 2 min.

Nach der Abkühlung im Thermocycler auf 4°C wurden die PCR - Produkte bei 5°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.8 ANALYSE DER AMPLIFIKATE

Die Produkte der Amplifikation wurden mittels Elektrophorese in einem mit 0,025 µl/ml Ethidiumbromid versetzten 2%igem Agarosegel charakterisiert. Dazu wurden 5µl aus den PCR - Gefäßen abpipetiert und aufgehoben, die 20µl Probe wurden mit jeweils 4µl Farbmaler versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Als Größenstandard wurden 10µl des 1Kb⁺ DNA LadderTM (Life-Technologies) verwendet und alles für ca. 2 h in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 100V getrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar und fotodokumentiert.

2.2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 9.5 nach KÖHLER et al. (1995).

3 ERGEBNISSE

3.1 BIOLOGIE DER VAMPIRAMÖBE

3.1.1 GESTALT UND FORTBEWEGUNG

Während der Untersuchungen am Umkehrmikroskop konnten vier unterschiedliche Stadien der VA festgehalten werden: Trophozoite, Schwärmer, Verdauungszysten und sekundäre Zysten.

Trophozoite dienen der Fortbewegung und der Nahrungsaufnahme. Ihre Gestalt besteht aus einem Plasmaklumpen, der sich nach allen Seiten ausdehnt und in spitz zulaufenden Filopodien mündet (Abb.3). Größere Exemplare wirken nicht mehr kompakt, denn ihr Plasma verteilt sich eher netzartig. Die kleinsten Trophozoite messen ca. $10\mu\text{m}$, Fusionsplasmodien können eine Ausdehnung von mehreren mm erreichen (Abb.4).

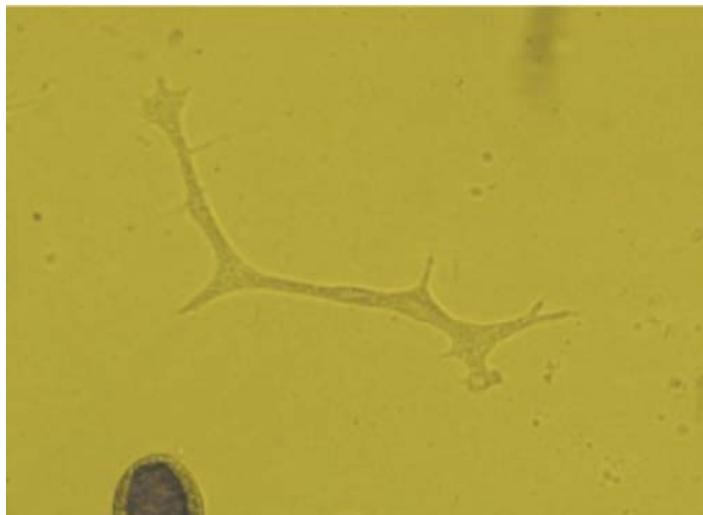


Abb.3: Kleiner Trophozoit (400x)

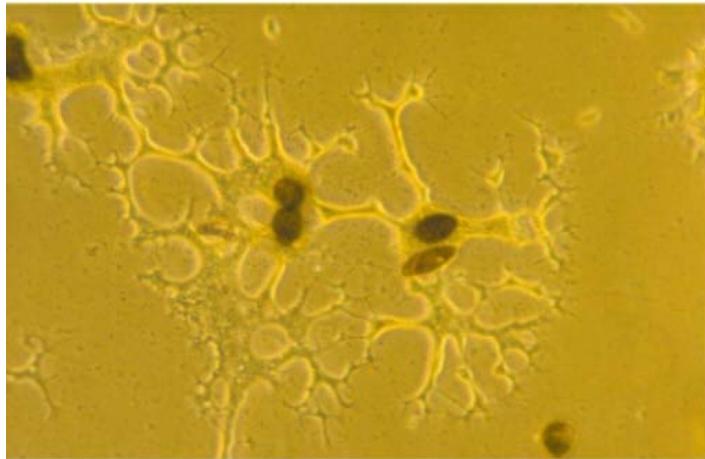


Abb.4 : Fusionsplasmodium (Phasenkontrast 200x)

VA hat granuliertes Endoplasma und einen feinen, nur sehr schmalen Saum von hyalinem Ektoplasma (Abb.5), das in dünnen Fäden ausläuft und wie ein durchsichtiger Schleier den Organismus umgibt.

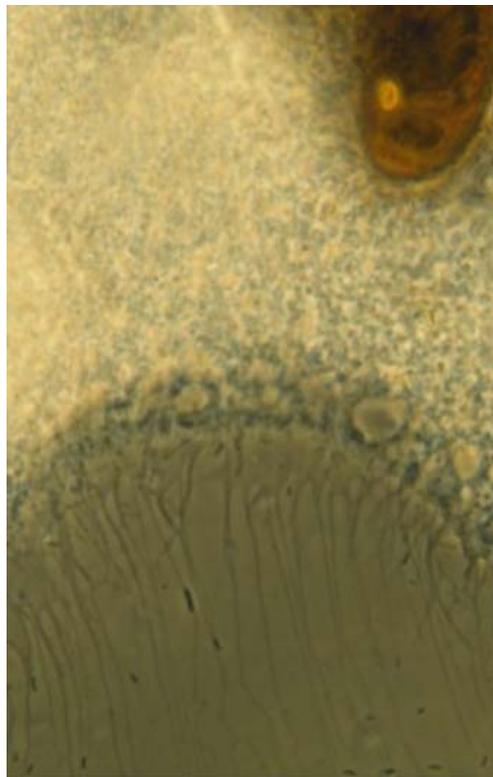


Abb.5 : Ektoplasma mit feinen Fäden (1000x)

Beim Kriechen über das Substrat schiebt die Amöbe das Ektoplasma wie tastende Fühler nach vorne, dabei kleben die feinen Fäden am Substrat fest. Der Körper gleitet weiter vorwärts, während das Endoplasma in Richtung der Fortbewegung fließt, werden gleichzeitig immer neue Ektoplasmafäden nach vorne ausgestreckt und im Substrat verankert. Am hinteren Ende lösen sich die Fäden nur sehr schlecht von der Oberfläche, so dass es nicht selten zu einer Umkehrung der Fortbewegungsrichtung kommt. Ein Teil der Fäden wird von der Amöbe abgestoßen und bleibt auf dem Substrat kleben. Diese bilden nach einiger Zeit eine Schleimschicht am Boden der Petrischalen oder schwimmen als kleine Netze in der Nährlösung. Kleine Trophozoite können sich auf diese Weise schnell fortbewegen, größere Plasmodien wirken sehr langsam und schwerfällig, da das Plasma oft hin und her fließt und nicht vorhersehbar ist, in welche Richtung es eigentlich gehen soll (Abb.6).



Abb.6: Bewegungsstudie einer Trophozoite von VA mit Zeitraffertechnik

Bewegungsstudien, die mit Hilfe der Zeitraffertechnik zusammengestellt wurden, zeigen deutlich, dass die Amöbe offensichtlich versucht große Flächen nach Futter abzutasten, indem sie sich immer wieder kreisförmig öffnet und zusammenschließt.

In gut wachsenden Kolonien konnten gelegentlich an der Oberfläche schwimmende Schwärmer beobachtet werden. Sie waren völlig abgerundet und benutzten ihre filiformen Pseudopodien des Ektoplasmas als Ruder. Auf diese Weise konnte sie schnell über das gesamte Areal schweben und sich entfernt von der Nahrungskonkurrenz niederlassen. Am Boden der Petrischale nahm der Schwärmer sofort wieder die Gestalt eines Trophozoiten an. Der Ursprung der Schwärmer konnte nicht ermittelt werden.

3.1.2 NAHRUNGS-AUFNAHME , VERDAUUNG UND EXZYSTIERUNG

Findet VA einen Beuteorganismus, so dauert es sehr lange bis sie ihn völlig umschließen und parasitieren kann. Je nach Größenverhältnis der VA zu ihrer Beute kann sie diese völlig umschließen, so daß es aussieht als hinge ein Schleimklumpen an dem Organismus. Ist die Beute wesentlich kleiner, wird sie einfach aufgenommen wie bei *Saccharomyces cerevisiae*. Die Pilze liegen dann in dem gesamten Plasmodium verteilt vor. Kleinere Trophozoite umfließen Konidien von *Cochliobolus sativus* völlig, während größere Plasmodien sich mehrere Konidien gleichzeitig einverleiben können. Es dauert mehrere Stunden bis die Konidienwände ringförmig perforiert sind, wobei gleichzeitig mehrere Stellen durchbohrt werden. Der Inhalt der Konidie tritt aus und wird vom Endoplasma in Form von kleinen Nahrungsvakuolen aufgenommen. Kleinere Trophozoite kriechen oft in die Konidien hinein, um dort ihre Verdauungszyste zu bilden. Größere Amöben können mehrere Beuteorganismen befallen, bevor

sie Verdauungszysten bilden. Innerhalb eines großen Plasmodiums werden in der Regel mehrere gleich große eiförmige Verdauungszysten gebildet, deren durchschnittliche Größe ca. 50 x 35 µm beträgt. Sie enthalten zu Beginn der Verdauungsphase oft mehrere Nahrungsvakuolen (Abb.7).



Abb.7 : Verdauungszyste mit einer Konidie von *Cochliobolus sativus* und mehreren Nahrungsvakuolen (630x)

Die anfänglich gleichmäßig im Plasma verteilten Nahrungsvakuolen fließen zusammen und bilden so nach und nach eine zentrale Verdauungsvakuole. Mit fortschreitender Verdauung wird die Vakuole immer kleiner bis sie nach ca. zwei Tagen nur noch unverdauliche Reste enthält.

Nach einer Ruhephase von unterschiedlicher Dauer schlüpft die VA aus der Zyste, indem sie an mehreren Stellen gleichzeitig die Wand der Verdauungszyste perforiert (Abb. 8).



Abb.8 : Perforationen in der leeren Hülle einer Verdauungszyste (1000x)

Da die Amöbe nach allen Seiten gleichzeitig aus der Zyste austritt (Abb. 9), sich aber meistens zuvor innerhalb der Zyste nicht geteilt hat, dauert die Exzystierung je nach Größe der VA bis zu 2 Stunden. Während dieser Zeit fließt das Endoplasma aus der Zyste und vereinigt sich außerhalb der Zyste wieder. Dadurch entsteht ein Zug nach allen Seiten. Das Plasma fließt oft wieder in die Zystenhülle zurück, um dann durch eine andere Öffnung zu schlüpfen. Nach einigem Hin und Her vereinigt sich das Plasma außerhalb der Zyste und das so gebildete Plasmodium begibt sich wieder auf Nahrungssuche. Zurück bleibt die leere Zystenhülle mit unverdauten Resten in der Nahrungsvakuole als Defäkation.



Abb. 9 : Exzystierung: Austritt des Endoplasmas an mehreren Stellen einer Verdauungszyste (400x)

Der Ablauf von Nahrungsaufnahme, Bildung von Verdauungszysten, Stadien während der Verdauung und Exzystierung konnte mittels der oben schon für die Fortbewegungsstudien genutzten Zeitraffertechnik festgehalten werden. Bei einem relativ kleinen Trophozoiten (Abb.10) dauerte der Befall der Konidien von *Cochliobolus sativus* ca. 40 h, die anschließende Verdauung bis zur Exzystierung 8 Tage. Dabei war zu beobachten, wie sich die innere Struktur der Verdauungszyste fortlaufend veränderte, bis schließlich das Endoplasma an zwei Stellen aus der Zyste austrat. Die zwei ausgeschlüpften Plasmodien flossen aber nicht wieder zusammen, wie sonst in den meisten Fällen zu beobachten war.

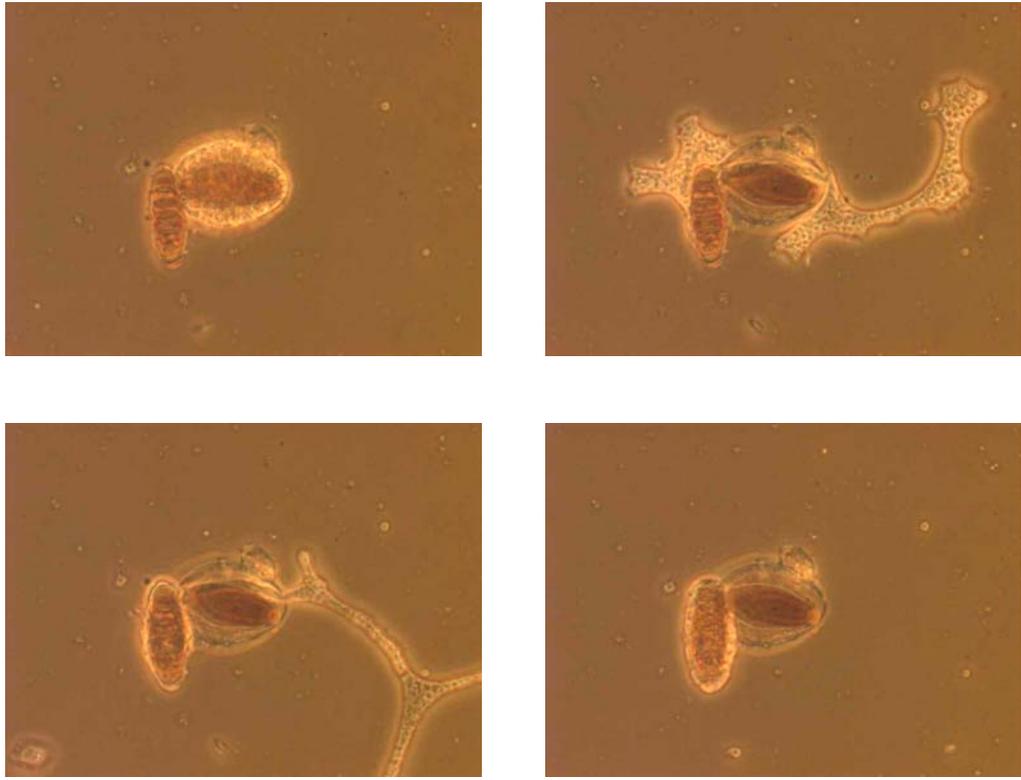


Abb. 10 : Zeitrafferstudie der Exzystierung einer Verdauungszyste

- 1) eine Konidie von *Cochliobolus sativus* in einer Verdauungszyste, zweite Konidie außen anliegend
- 2) Exzystierung mit Ausfluss des Endoplasmas nach zwei Seiten, zweite Konidie wird umfasst
- 3) Eine geschlüpfte Amöbe löst sich ab, die zweite Amöbe hat sich vollständig um die zweite Konidie gelegt
- 4) Zurückgebliebene Zystenhülle mit entleerter Konidie, zweite Konidie in einer Verdauungszyste

3.1.3 BILDUNG DER SEKUNDÄREN ZYSTEN

Wenn die Beuteorganismen nach ca. 3 bis 4 Wochen Kulturdauer verbraucht sind, entstehen in älteren Kulturen regelmäßig Zysten, die sich teilen. Dabei fließt ein Teil des Plasmas in eine zweite Zyste aus und es entstehen sanduhrartige (Abb.11) oder rucksackartige Formen.



Abb.11: Zysten in Teilung (200x)

Findet die Bildung neuer Zysten innerhalb der ersten Zystenhülle statt, so entstehen oft mehrere Tochterzysten, aus denen zu unterschiedlichen Zeiten die Amöben ausschlüpfen (Abb.12).



Abb.12 : Zyste mit 2 Tochterzysten, von denen eine ihren Inhalt entlassen hat.
(630x)

Bleiben die VA - Kulturen weiterhin ohne Futterorganismen, so sind nach 3 bis 4 Monaten weitere Veränderungen an den Zysten zu beobachten. Ein Teil entwickelt in der Mitte um eine Vakuole einen auffallend stark lichtbrechenden Kranz, der nach einiger Zeit wieder verschwindet. Es erfolgt eine Teilung des Plasmas innerhalb der Zysten, in einen kleineren sehr fein gekörnten Anteil und eine größere grobkörnige Plasmafraktion (Abb.13).

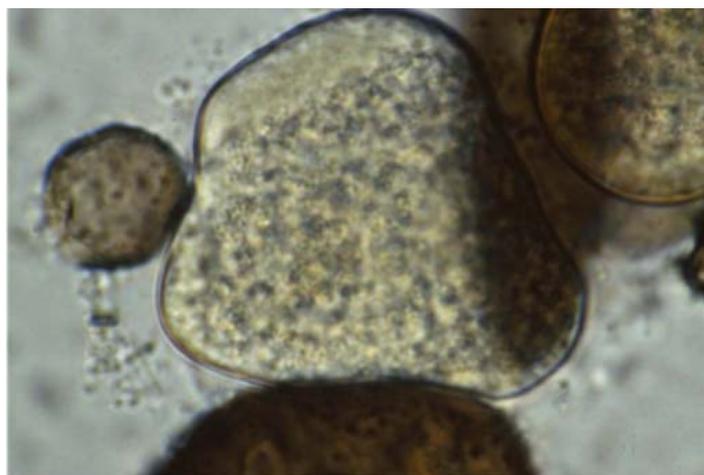


Abb.13 : Zyste mit grobkörnigem und feinkörnigen Plasma (1000x)

In einigen Fällen konnte beobachtet werden, dass der feinkörnige Plasmaanteil eine Blase aus bildete und aus der Zyste ausgestoßen wurde. Ihr Inhalt wurde sofort freigesetzt und bestand aus sehr kleinen beweglichen mit zwei heterokonten Geißeln versehenen Organismen. Dieser Vorgang verlief immer unerwartet und so schnell, dass eine Fotodokumentation nicht möglich war. Die austretenden Organismen konnten zwar fotografiert werden, sie waren aber so klein, dass auch bei der größtmöglichen Vergrößerung auf den Bildern nichts zu erkennen war.

Der verbliebene (grobkörnige) Teil schlüpfte als Amöbe aus der Zyste. Bei fortwährendem Nahrungsmangel bildete die Amöbe wiederum eine Zyste aus. Dabei wurde innerhalb der 1.Zystenhülle eine zweite kleinere Hülle abgesondert. Es konnte beobachtet werden, dass die Amöbe aus der Zyste schlüpfte und außerhalb nach Nahrung suchte, um dann wieder in die alte Zystenhülle zurückzukehren und eine neue kleinere Hülle zu bilden. Grund für die Bildung der sekundären Hüllen scheint die Abnahme des Plasmas während längerer Hungerperioden zu sein. Der Organismus wird zu klein für die alte Hülle, denn bevor er die Zyste verläßt, ist das Plasma in der Zyste mit leeren Blasen versehen. Auf diese Weise können mehrere Zystenhüllen wie Ringe ineinander liegen (Abb.14). Die darin gebildeten Zysten werden immer kleiner und melanisieren. So findet man nach mehreren Monaten nur noch stark gedunkelte kleine Zysten vor.



Abb.14: Sekundäre Zysten mit Ringen und melanisierter Zystenwand (400x)

Eine besondere Zystenbildung konnte bei den Isolaten aus Rügen beobachtet werden. Bei ihnen entstanden nach einiger Zeit in Kultur sehr große Zysten (Abb.15), deren Umrisse sich über mehrere 100 μm erstreckten. Eine Bildung von Verdauungsvakuolen konnte hier nicht beobachtet werden. In den Zysten erschienen vielmehr Vesikel (Abb.16), die mit kleinen sich unabhängig voneinander bewegendem stäbchenförmigen Organismen mit 2 heterokonten Geißeln angefüllt waren. Diese Bläschen durchwanderten die gesamte Zyste und wurden intakt ausgestoßen. Im äußeren Medium platzten die Bläschen auf und gaben ihren Inhalt frei, der sich verteilte. Auch mit der größtmöglichen Vergrößerung(1000x) war der Inhalt nur undeutlich zu erkennen, so daß hier über seine genaue Beschaffenheit keine weiteren Angaben möglich sind. Nach ca. 2 Tagen verdichtete sich das übrige VA - Plasma in den großen Zysten und nachdem offenbar in der Zyste eine Plasmateilung stattgefunden hatte, verließen mehrere Trophozoite an verschiedenen Stellen die großen Zysten (Abb.17). In den Zystenwänden blieb unstrukturiertes Material zurück.

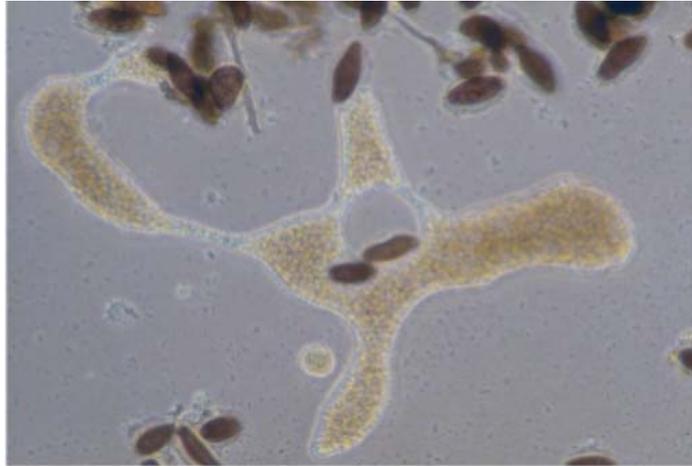


Abb.15 : Große Zysten der Isolate aus Rügen (200x)

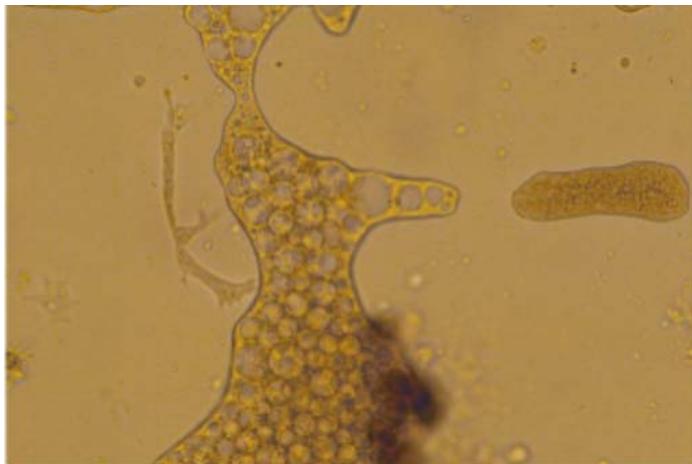


Abb.16 : Große Zysten mit zahlreichen Vesikeln (400x)

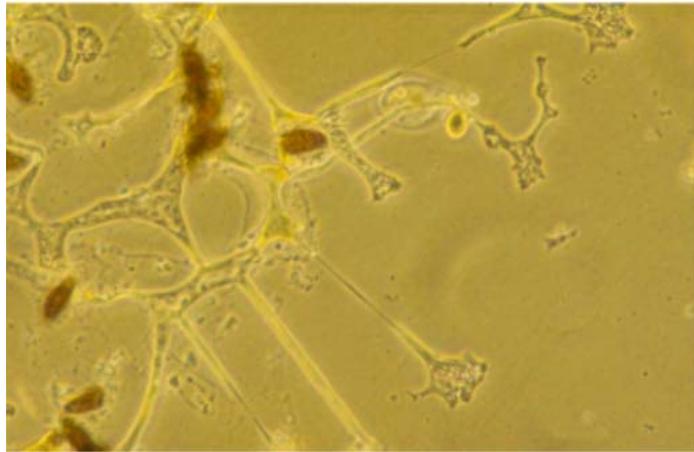


Abb.17 : Aus den großen Zysten schlüpfen zahlreiche kleine Amöben (200x)

3.1.4 ZELLKERNE IN TROPHOZOITEN UND ZYSTEN

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Höchst 3 gelang eine Anfärbung der Kerne im lebenden Organismus. Zur Darstellung des Farbstoffes mußte allerdings UV-Licht eingesetzt werden, was zu einem schnellen Absterben von VA führte. Durch sofortiges Fotografieren gelang es die Trophozoite in lebendiger ausgebreiteter Form aufzunehmen (Abb.18). So war zu beobachten, daß die Form der lebenden Kerne spindelförmig und elastisch ist. Die Kerne gleiten im Plasma mit und schwimmen elegant durch alle Verengungen des Amöbenkörpers, indem sie sich in die Länge ziehen. Nur so ist es möglich, daß die Amöbe auch durch Öffnungen eindringen kann, die eigentlich kleiner sind als die im Mikroskop bemessene Größe ihrer Kerne, die nach Angaben von RÖPSDORF (1992) bei durchschnittlich 2,5 bis 3,5µm Länge und 1 bis 1,5µm Breite liegt.

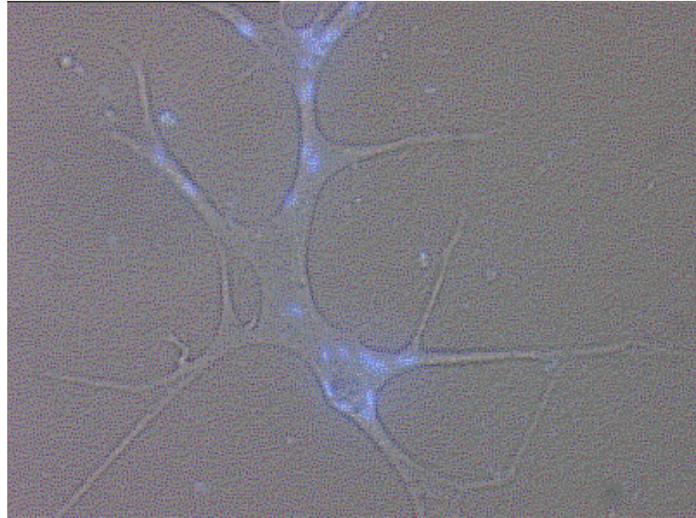


Abb.18 : Darstellung der Zellkerne im Trophozoiten mit Höchst 3 (200x)

In den Zysten findet offenbar eine Vermehrung der Zellkerne statt. Einige der Zysten zeigten deutlich abgerundete und aufgeblähte Kerne. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hier um Kerne während der Mitose handelt, wie auch von RÖPSDORF(1992) beschrieben, der die Kernteilungen während des Zystenstadiums untersuchte. In vielen Zysten lagen die Kerne paarweise zusammen (Abb.19), was auf eine kurz vorher abgeschlossene Teilung hindeuten könnte. Ihre Form war dann wieder deutlich kleiner und oval bis spindelförmig und damit mit den Kernen in den Trophozoiten identisch. In einzelnen Zysten wurden nach der Teilung bis zu 50 Kerne gezählt.

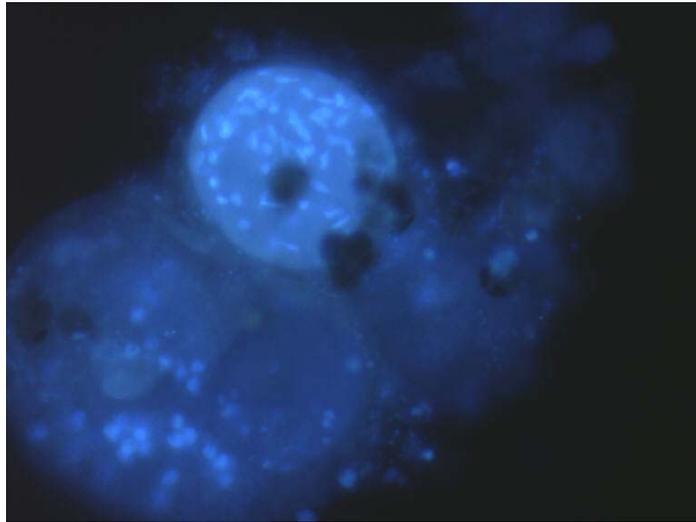


Abb.19: Darstellung der Kerne in den Zysten mit Höchst 3 (400x)

Eine Anfärbung der sekundären Zysten, deren Plasma sich in feinkörnig und grobkörnig unterteilen ließ, führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass nur im grobkörnigen Teil fluoreszierende Kerne zu sehen waren, während im feinkörnigen Teil nur sehr feine Streifen fluoreszierten.

3.1.5 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Querschnitte durch eine Verdauungszyste von VA zeigen zahlreiche Mitochondrien und Vakuolen. In den Mitochondrien(M) sind die vesikulären Cristae deutlich zu erkennen. Die Abb. 20a zeigt in der Mitte deutlich erkennbar einen Golgi - Apparat(G), an dem abgehende Vesikel zu sehen sind. Zahlreich vorhandene Vakuolen, deren Membran sich deutlich abzeichnet, liegen gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Hierbei handelt es sich größtenteils um Nahrungsvakuolen(NV), deren unstrukturierter Inhalt angeschnitten ist. Elektronendicht ist der Inhalt der Vakuolen(EV), die mit der Plasmamembran in Verbindung stehen und sich zum Teil über diese

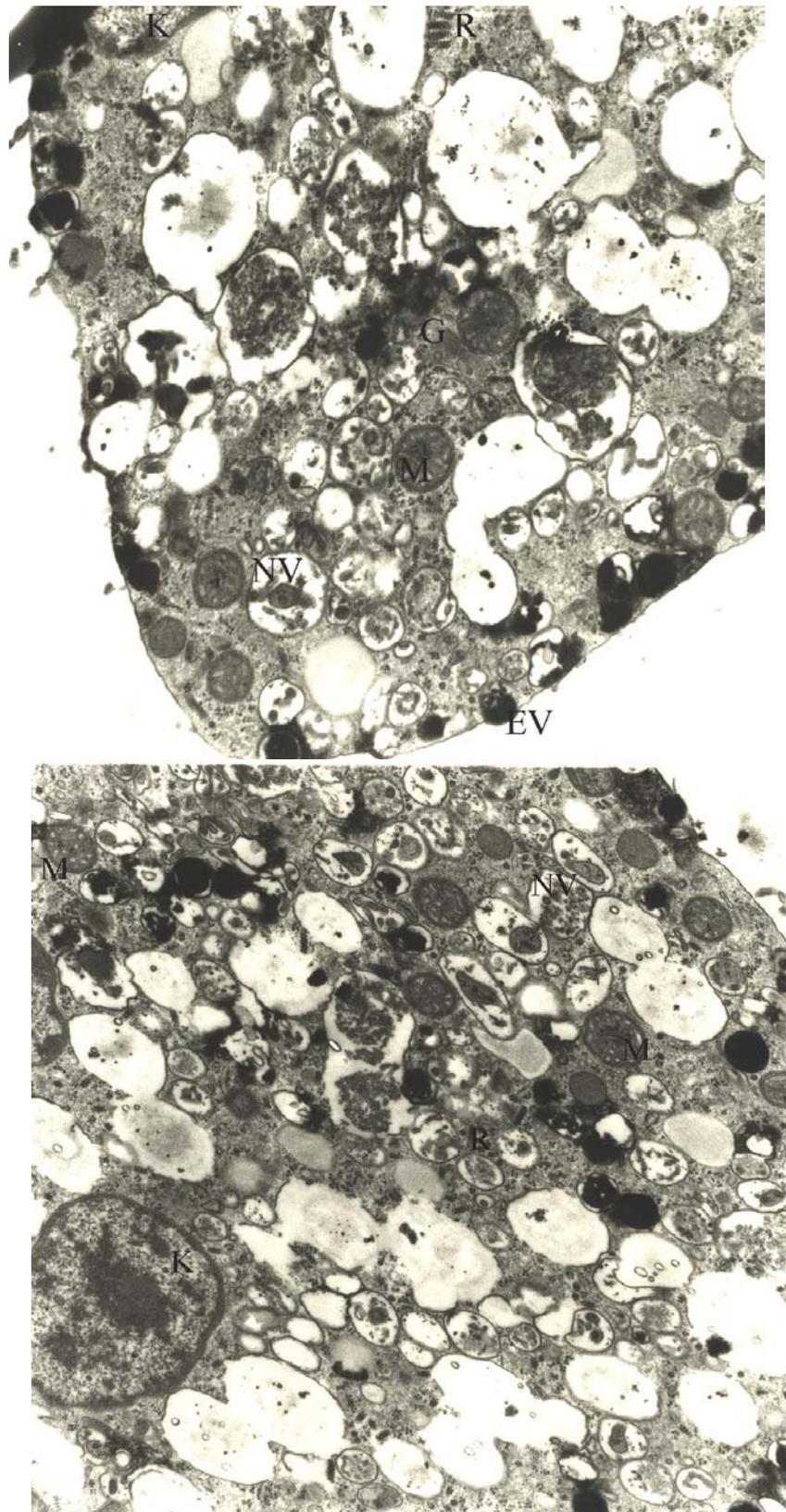


Abb.20 a und b: Querschnitt durch Verdauungszysten von VA (9600x)

hinauswölben. Mit Ribosomen(R) besetzte Stränge von Endoplasmatischem Retikulum liegen wie kurze Spiralen in der Zelle verteilt. Abb.20a zeigt den Anschnitt eines Kernes(K) im oberen Bereich, jedoch besser zu erkennen ist der abgerundete Kern in Abb.20b im unteren Bereich des Bildes. Ein zweiter Kern wurde hier am linken Bildrand angeschnitten, innerhalb der Kerne ist die Trennung von Chromatin und Heterochromatin deutlich sichtbar.

3.1.6 LEBENSZYKLUS

Nach den vorstehend beschriebenen Beobachtungen kann ein Lebenszyklus der VA konzipiert werden, der in zwei Kreisen dargestellt wird.

Der Erste (Abb.21) betrifft die Ernährung und asexuelle Fortpflanzung bei reichlichem Nahrungsangebot. Dabei kommt es zu folgenden Abläufen. Ein Trophozoit (1, Abb.3) trifft bei seinen Suchbewegungen auf eine Beute, hier eine Konidie von *Cochliobolus sativus* (2, Abb.10). Er umschließt die Konidie, rundet seinen Körper ab indem er die Filopodien einzieht und beginnt mit der Perforation der Konidienwand. Nach der Aufnahme des Zellinhaltes, bildet VA eine Verdauungszyste (3, Abb.7). Aufgrund des Nahrungsangebotes kommt es zu einer Vermehrung des Zytoplasmas der VA. Mit dem Abschluss der Verdauung und nach der Mitose entstehen durch Teilung mehrere Zysten aus einer Verdauungszyste (4, Abb.11). Bei fortwährendem gutem Nahrungsangebot, exzystieren ein bis zwei mehrkernige Trophozoite (5, Abb.9) und beginnen wieder mit der Nahrungssuche. Bei reichlichem Nahrungsangebot werden von den zahlreichen Fusionplasmodien sehr kleine runde Schwärmer (6) abgeschnürt. Mit Hilfe ihrer filiformen Pseudopodien können sie sehr gut schwimmen und dienen somit der Vermehrung und Verbreitung (s. 3.1.1). Entsprechend ihrer Funktionen können die Schwärmer als Stadien einer asexuellen Fortpflanzung angesehen werden. Setzen sich diese auf dem Substrat fest, nehmen sie augenblicklich die Formen kleiner Trophozoite an.

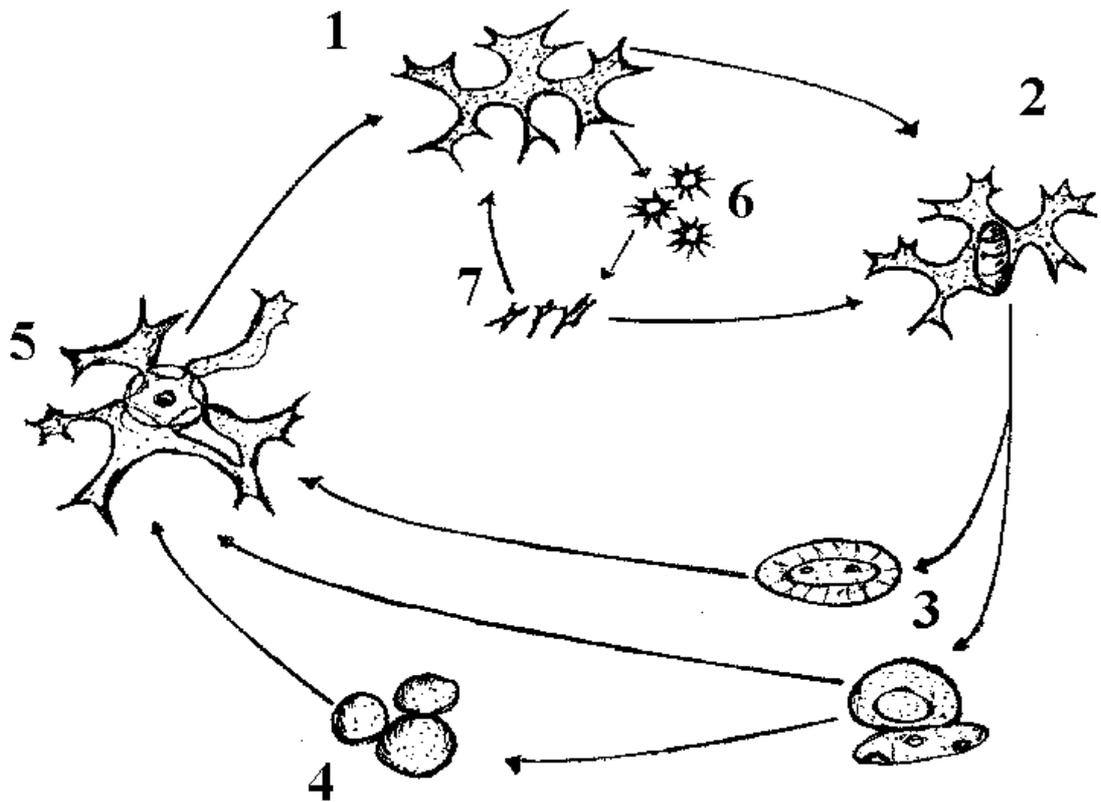


Abb.21 : Ernährung und asexuelle Fortpflanzung der VA bei ausreichendem Nahrungsangebot

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1) Trophozoit | 5) Exzystierung |
| 2) Nahrungsaufnahme | 6) Schwärmer |
| 3) Verdauungszyste | 7) kleine Trophozoite |
| 4) Teilung der Zysten | |

Der zweite Kreis beschreibt die Entwicklung und das Verhalten der VA bei ausgeprägtem Nahrungsmangel (Abb.22). Nachdem ein Trophozoit eine Verdauungszyste (1, Abb.7) gebildet hat, entsteht eine sekundäre Zyste (2, Abb.12). Hält der Nahrungsmangel weiterhin an so wird das Endoplasma immer weniger und melanisiert. Bei dieser Reduktion (s.3.1.3) entstehen mehrere Zellwände (3, Abb.14). Wenn ausreichend Wasser vorhanden ist, können VA auf diese Weise mehrere Monate ohne Nahrung überdauern. Bessern sich die Verhältnisse, dann erfolgt eine Exzystierung (4, Abb.9) der Trophozoite (5, Abb.3).

Daneben gibt es noch eine andere Form der Entwicklung, bei der sich das Endoplasma in eine grobkörnige und eine feinkörnige Fraktion aufteilt (6, Abb.13). Aus Ersterer entstehen nach Exzystierung wieder Plasmodien (5, Abb.3). Bei Letzterer werden in einer ausgestülpten Blase (s. 3.1.3) heterokont begeißelte Organismen gebildet (7), deren weiteres Schicksal nicht verfolgt werden konnte.

Während der Kultur der Vampiramoeben erwiesen sich einige Isolate als äußerst widerstandsfähig und wachstumsfreudig. Mit genügend Beuteorganismen versorgt, vermehrten sie sich innerhalb von 3 bis 4 Wochen tausendfach. Bei genügend Wasser hielten sich die Zysten über Jahre in den mit Parafilm verschlossenen Petrischalen. Trockneten diese jedoch aus, so konnten sie in keinem Fall wieder reanimiert werden. Auch ein Versuch die Zysten mit Boden versetzt langsam austrocknen zu lassen, führte in keinem Fall zu einer Wiederbelebung der VA. Ebenso tödlich erscheint das Einfrieren. Werden die Zysten in wässriger Lösung direktem Frost bis -10°C ausgesetzt, so zeigen sie nach dem Auftauen Auflösungserscheinungen. Offenbar verfügt VA nicht über Organe wie z.B. Dauerzysten, die anderen Amöben das Überleben unter widrigen Bedingungen sichern.

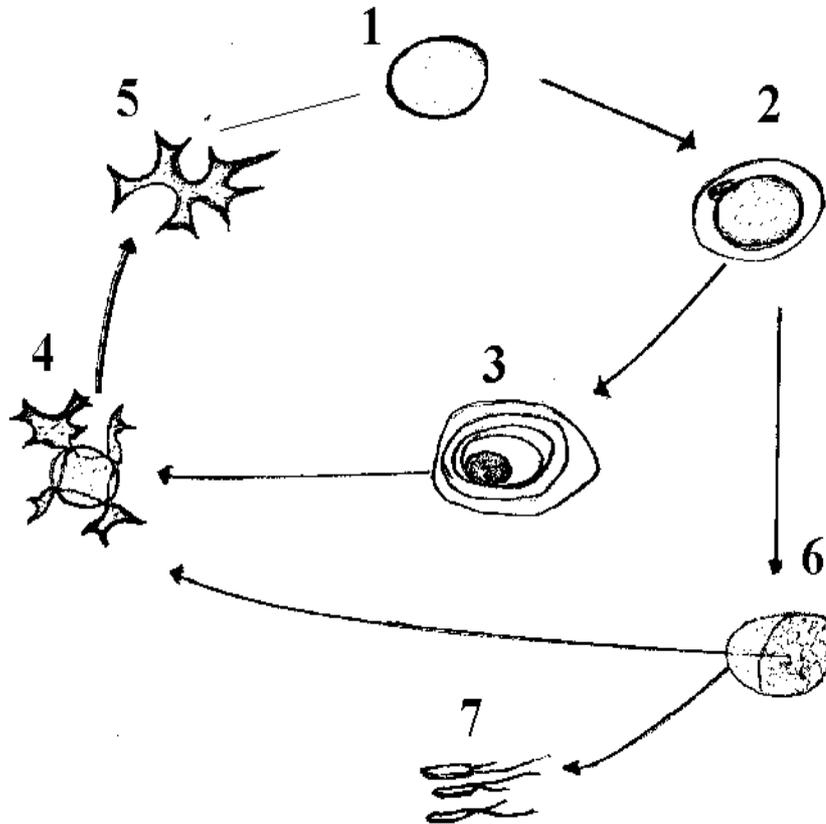


Abb.22 : Entwicklung und Verhalten der VA bei ausgeprägtem Nahrungsmangel

- 1) Verdauungszyste
- 2) Sekundäre Zyste
- 3) mehrwandige verkleinerte Zyste
- 4) Exzystierung
- 5) Trophozoit
- 6) Teilung des Zytoplasmas in eine grobkörnige und eine feinkörnige Fraktion
- 7) heterokont begeißelte Organismen

3.2 BEUTESPEKTRUM

Bodenbürtige Organismen unterschiedlicher Arten wurden VA als Beute angeboten. Ihre Eignung als Nahrungsgrundlage wurde anhand der Anzahl von Verdauungszysten nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturdauer ermittelt.

3.2.1 BAKTERIEN

In allen Petrischalen, in denen VA Bakterien als alleinige Nahrung angeboten wurden, konnten die Amöben sich nicht vermehren. Bei den wöchentlichen Kontrollen konnten zwar vereinzelt Trophozoite festgestellt werden, jedoch waren bei allen 5 Bakterienarten *Agrobacterium vitis*, *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia carotovora* sowie *Pseudomonas syringae* nach 21 Tagen keine Verdauungszysten mehr vorhanden. Bakterien sind zwar immer auf den Amöben vorhanden und werden offenbar auch aufgenommen, können aber offensichtlich nicht über längere Zeit als alleinige Nahrungsgrundlage dienen.

3.2.2 PILZE

VA konnte nicht alle angebotenen Pilzarten als Nahrungsquelle nutzen. Hervorragend geeignet erwiesen sich *Botryotinia fuckeliana* sowie *Rhizopus stolonifer*. In beiden Ansätzen bildete VA Fusionsplasmodien von mehreren mm Größe, wie sie auch in Kulturen mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) beobachtet werden konnten (Abb.23).

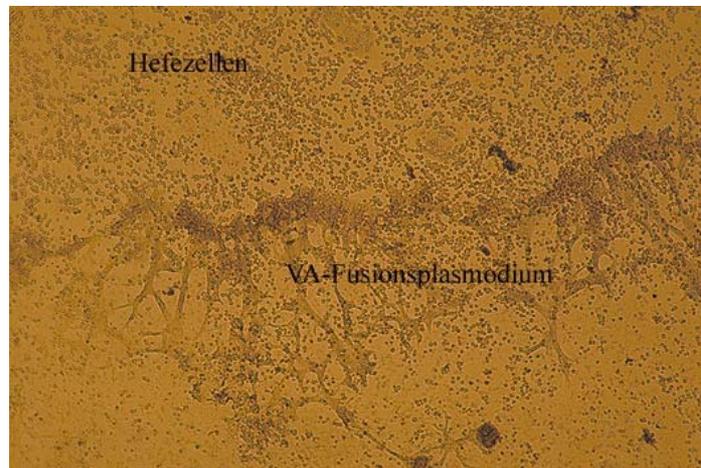


Abb. 23: Fusionplasmodium der VA mit *Saccharomyces cerevisiae* als Futter
(100x)

Die außergewöhnlich starke Vermehrung in diesen Proben führte dazu, dass schon nach 21 Tagen alle Pilze ausgesaugt waren und durch Nahrungsmangel die Anzahl der Zysten abnahm. Gutes Wachstum erfolgte auch in den Proben mit *Geotrichum candidum*. Für *Alternaria solanum* und *Thanatephorus cucumeris* konnte ebenfalls ein Befall durch VA beobachtet werden. Alle weiteren Pilze konnten von VA nicht oder nur in geringem Masse verwertet werden. Die Unterschiede bei den Vermehrungsraten der Zysten erwiesen sich als signifikant, was bedeutet, dass die Amöbe in ihrem Wachstum jeweils stark von dem Vorhandensein spezieller Pilzarten abhängig ist (Abb.24). Die weichen und leicht zu durchdringenden Sporen von *Botryotina fuckeliana* und *Rhizopus stolonifer* scheinen eine schnell erschließbare Nahrungsquelle zu sein, während stärkere und melanisierte Zellwände etwas mehr Zeit in Anspruch nehmen, aber ebenso gute Nahrungsgrundlagen darstellen, wie z.B. die Konidien von *Cochliobolus sativus*.

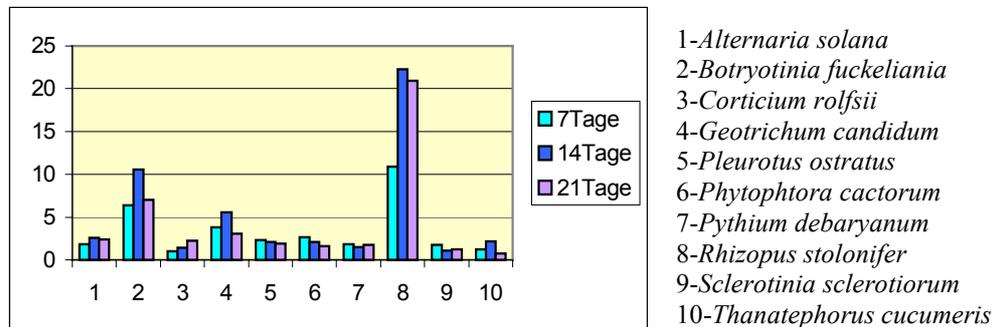


Abb.24 : Anzahl von Verdauungszysten der VA mit verschiedenen Pilzen als Nahrungsgrundlage nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturdauer

3.2.4 ALGEN

VA kann sich auch von Algen ernähren. Dabei perforierte sie die Zellwand und leerte den Inhalt aus oder kroch in die Algen und bildete dort Verdauungszysten. Leere Zellwände blieben als Nahrungsreste zurück. Während der Nahrungsaufnahme nahm der gesamte Trophozoit zunächst eine grüne Farbe an (Abb.25), später konzentrierten sich die aufgenommenen Chloroplasten in der zentralen Verdauungsvakuole, die mit fortschreitender Verdauung immer kleiner wurde und ihre grüne Farbe verlor und nun dunkelbraun erschien (Abb.26).

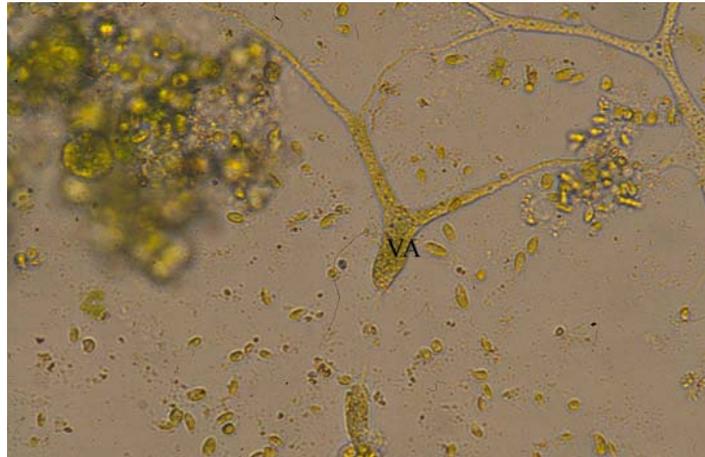


Abb.25 : VA mit Algen (*Tetracystis vinatzeri*) als Nahrungsquelle (200x)

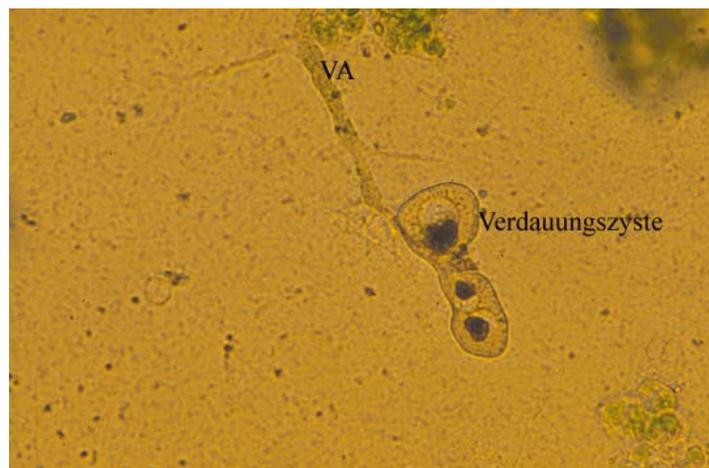


Abb.26 : Verdauungszysten der VA nach Aufnahme von Algen (*Tetracystis vinatzeri*) (200x)

Beim Vergleich der unterschiedlichen Algenpezies zeigte sich, dass es auch hier anscheinend signifikant verschiedene Präferenzen für bestimmte Spezies auf Seiten der VA gibt (Abb.27). Während *Bumilleriopsis filiformis*, *Uronema confervicola* und *Tetracystis vinatzeri* durchaus zur Vermehrung der VA beitragen, konnte in den anderen Proben kaum Wachstum nachgewiesen

werden. Beobachtet wurde eine Parasitierung bei *Klebsormidium flaccidum* und *Nostoc muscorum*.

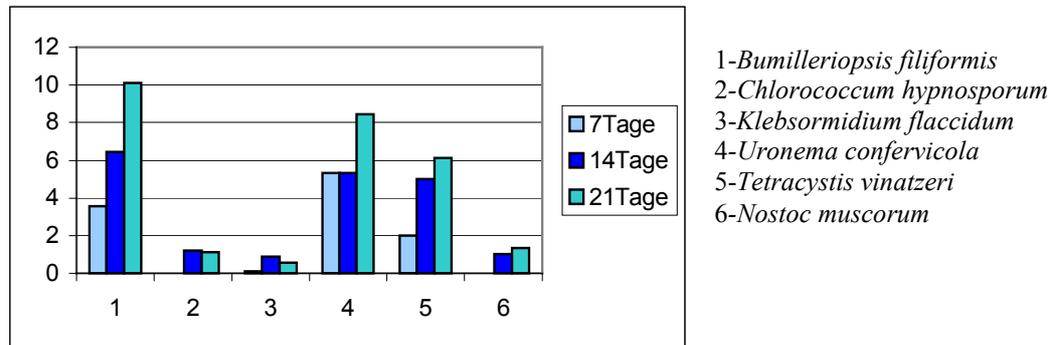


Abb.27 : Anzahl von Verdauungszysten der VA mit verschiedenen Algen als Nahrungsgrundlage nach 7, 14 und 21 Tagen Kulturdauer

3.2.4 NEMATODEN

In allen 3 Varianten konnte ein Befall der Nematoden durch VA festgestellt werden. Die Amöben setzten sich auf den Nematoden fest und fixierten diese mit dünnen Klebefäden am Boden der Petrischale (Abb.28). Eine noch so heftige Gegenwehr konnte sie nicht mehr aus den Fängen der VA befreien. Es dauerte circa 2 Stunden bis VA über die Darmöffnung in die Nematoden eindringen und deren Inhalt aussaugten (Abb.29). In der leeren Kutikula der Nematoden bildeten VA mehrere Verdauungszysten. Eine Penetration der Kutikula konnte nicht beobachtet werden.

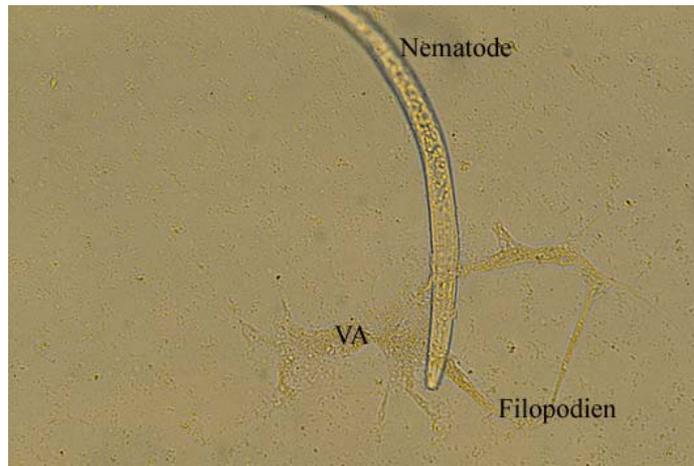


Abb.28 : VA hat eine Nematode (*Aphelenchus avenae*) am Boden der Petrischale fixiert. (200x)

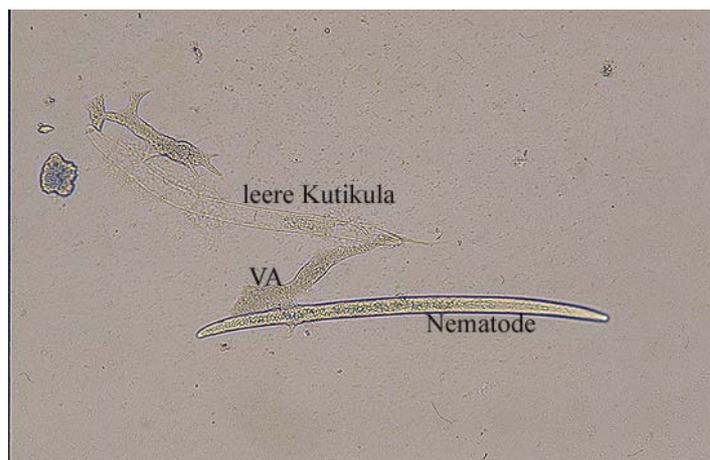


Abb.29 : VA hat eine Nematode (*Aphelenchus avenae*) entleert und eine zweite gefangen (200x)

Auch hier konnten signifikant unterschiedliche Vermehrungsraten festgestellt werden (Abb30). Kleine phytophage Nematoden der Art *Aphelenchus avenae* können zu einer sprunghaften Vermehrung von VA beitragen. Offenbar bestehen jedoch noch ungeklärte Wechselbeziehungen zwischen VA und den hier angebotenen Nematoden, da sich die Amöben in keiner Probe lange halten

konnten und auch in der 3. Variante, trotz guter Vermehrung rasch wieder zurückgingen.

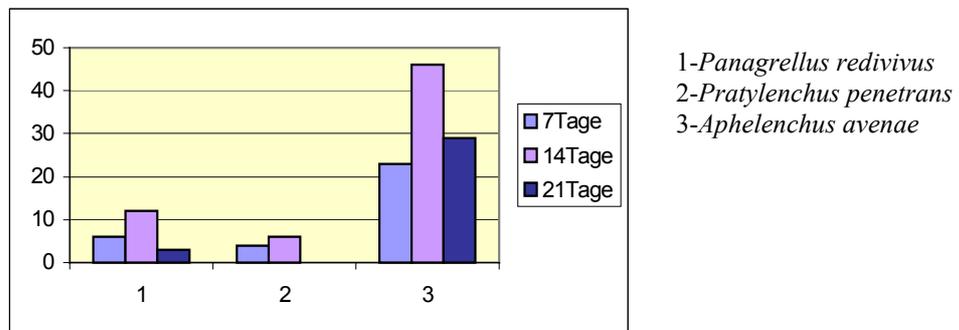


Abb.30 : Vermehrungsrate der VA mit verschiedenen Nematoden als Futterquelle

3.3 BESCHREIBUNG DER VAMPIRAMÖBE

Aufgrund der vorstehenden Untersuchungen kann die VA mit folgenden Merkmalen zusammenfassend charakterisiert werden: Größe von 10 μm bis zu einem Netzwerk von mehreren mm mit langen verästelten granuloplasmatischen Strängen, an deren Enden sowie auch an Verzweigungen sich strahlende Lappen ausbreiten. Die Fortbewegung erfolgt langsam, träge und kriechend, dabei haften die Filopodien stark an dem Substrat und an kleineren Organismen. Das farblose Zytoplasma enthält mehrere kleine spindelförmige Kerne von etwa 2 μm Länge mit einem zentralen Nukleolus. Synchrone Kernteilung erfolgt innerhalb der Verdauungszyste, Zellteilung erfolgt selten oder nie. Die Ultrastruktur der Zelle zeigt Mitochondrien mit vesikulären Cristae, spiralenförmige Ribosomenaggregate sowie zahlreiche in der Nähe der Plasmamembran liegende elektronendichte Vesikel. Die eiförmigen Verdauungszysten mit dünner Zellwand sind durchschnittlich 50 x 35 μm groß und enthalten anfangs mehrere Nahrungsvakuolen, die anschließend zu einer großen Vakuole zusammenfließen. Große Plasmodien bilden mehrere aneinander liegende Verdauungszysten. In starken Wachstumsphasen werden von den Plasmodien kleine 'Schwärmer' abgeschnürt. Bei der Exzystierung tritt das Zytoplasma an bis zu mehr als 10 Perforationen der Zystenwand gleichzeitig aus und vereinigt sich oft außerhalb der Zyste wieder. Nach der Defäkation der Überreste der Nahrungsvakuole bildet VA bei Nahrungsmangel sekundäre Zysten, die sich oft weiter teilen. Es werden keine Dauerzysten gebildet, aber nach einiger Zeit entstehen unterschiedlich strukturierte Zysten, wobei aus einigen dieser Zysten eine simultane Freisetzung von kleinsten heterokont begeißelten Organismen erfolgt.

Als Futterorganismen dienen einige Arten von Algen, Nematoden und Pilzen, letztere werden durch Annulieren der Zellwand verwertet. Bakterien sind keine alleinige Nahrungsquelle. Die Amöbe ist in Agrarböden weit verbreitet.

3.4 VORKOMMEN DER VAMPIRAMÖBEN IN ACKERBÖDEN

3.4.1 GEOGRAPHISCHE VERBREITUNG

Aus allen Proben, die im Frühjahr 1998 von unterschiedlichen Standorten in Deutschland, der Schweiz und dem Iran aus Ackerböden entnommen wurden, gelang es VA zu isolieren und zu kultivieren. Im Einzelnen konnten zwischen den Isolaten leichte morphologische Unterschiede festgestellt werden. Allen gemeinsam war die Perforierung der Konidien von *Cochliobolus sativus* zur Nahrungsaufnahme, die Bildung von Verdauungszysten und sekundären Zysten. Die VA aus den Böden um Schwarzenburg, Groß - Gerau, Halle, Rügen und dem Nord-Iran waren besonders groß und vital, während die Isolate aus Fritzlar, Biedenkopf, Meißen und Rudolstadt eher von zarter Gestalt waren. Die Isolate aus den Boddennböden um Rügen entwickelten nach einiger Zeit sehr große Zysten, aus denen nach einer Ruhephase mehrere Amöben ausschlüpfen, was in dieser Form bei keinem der anderen Isolate beobachtet werden konnte. Man kann daher aufgrund dieser Ergebnisse sagen, dass VA in landwirtschaftlich genutzten Böden überall in Deutschland und den angrenzenden Ländern bis hin in den Nord - Iran verbreitet sind.

3.4.2 Auswirkung verschiedener Ackerbausysteme

Hier sollte geprüft werden, ob und wie sich verschiedene ackerbauliche Maßnahmen auf das Vorkommen der VA auswirken. Dazu wurden pro

Standort jeweils 9 Bodenproben gezogen (Tab.1) und diese getrennt auf die vorhandenen Populationen der VA untersucht. Als Maß diente die Anzahl perforierter Konidien des Pilzes *Cochliobolus sativus*. Dabei wurde unterschieden zwischen nicht befallen, vereinzelt befallen, mehr als 25% bzw. mehr als 50% der Konidien perforiert. In den nachfolgenden Diagrammen ist jeweils die Anzahl der positiv getesteten von den insgesamt neun Proben eines jeden Standortes angegeben und deren Zuordnung zu den vier Befallsklassen.

3.4.2.1 Vergleich Pflug und Direktsaat

Hier standen Daueranbauparzellen von Winterweizen zur Verfügung, bei denen die Aussaat entweder nach konventioneller Bodenbearbeitung (Pflug) oder ohne Bodenbearbeitung direkt in die Erde (Direktsaat) erfolgte. Mit dieser vergleichenden Untersuchung sollte festgestellt werden, ob sich die VA bei Direktsaat ohne Pflügen in dem “ungestörten“ Boden besser entwickeln kann.

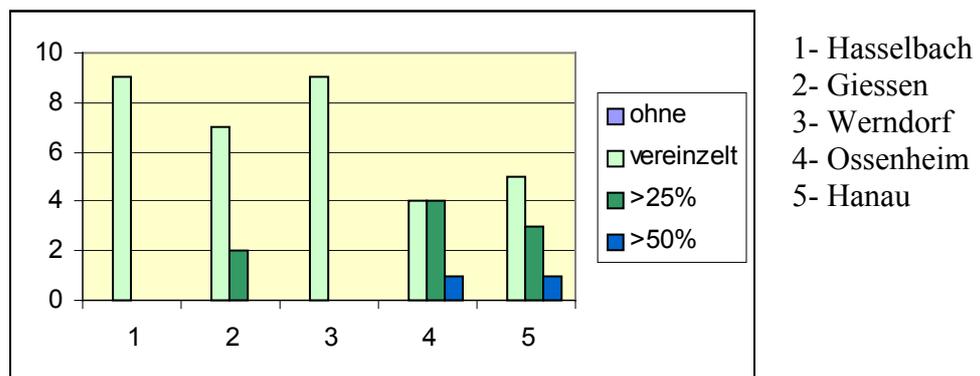


Abb.31 : Anzahl der Proben mit befallenen Konidien von *Cochliobolus sativus* der Variante **Pflug**

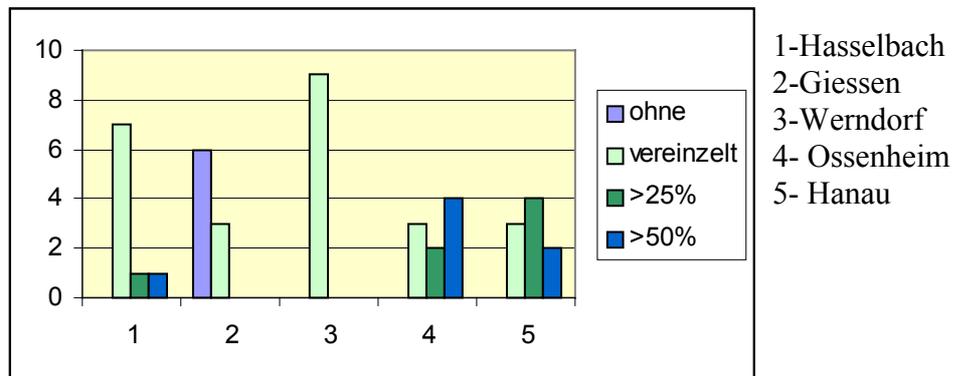


Abb.32 : Anzahl der Proben mit befallenen Konidien von *Cochliobolus sativus* der Variante **Direktsaat**

Bei der Variante Pflug war das Vorkommen der VA an den Standorten Hasselbach und Werndorf sehr gering (Abb.31). Zwar wurden in allen Proben vereinzelt perforierte Konidien von *C. sativus* gefunden, der Befall war aber deutlich geringer als an den anderen drei Standorten. Aus den Bodenproben der Standorte 1, 2, 4 und 5 konnten die VA isoliert und in Kultur genommen werden.

Bei der Variante Direktsaat war deutlich zu erkennen, dass VA in vier der fünf Böden in signifikant ($p < 0,05$) stärkerem Umfang vorhanden waren (Abb.32). Die VA konnten in jedem Fall isoliert und in Kultur genommen werden. In den Proben der Standorte Werndorf konnten keine VA nachgewiesen werden, obwohl vereinzelt perforierte Konidien vorhanden waren. Aus den Proben der beiden Varianten Pflug und Direktsaat wurde mit dem Isolierungssystem kein Aufwuchs erhalten, VA konnten daher für diesen Standort nicht in Kultur genommen werden.

3.4.2.2 Variante Acker - Grünland

Hier sollte geprüft werden, ob die Populationen der VA in Ackerböden und unter Grünland verschieden sind. Dazu wurden Flächen ausgewählt, die entweder direkt aneinander grenzten, oder nur durch einen Feldweg getrennt waren.

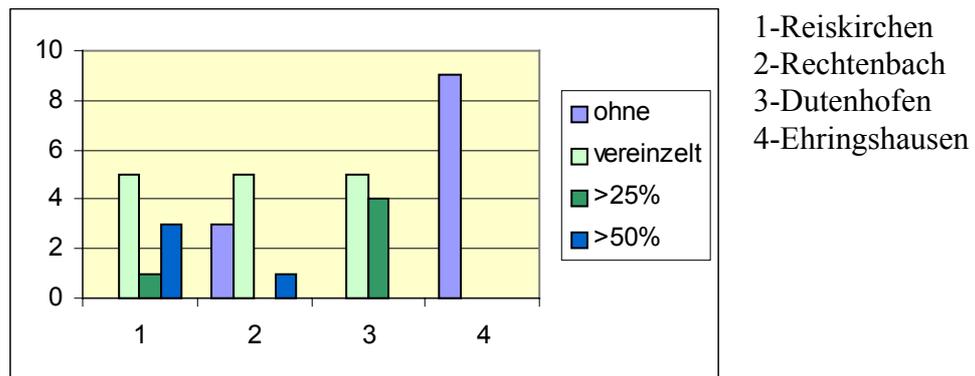


Abb.33 : Anzahl der Proben mit befallenen Konidien von *Cochliobolus sativus* der Variante **Acker**

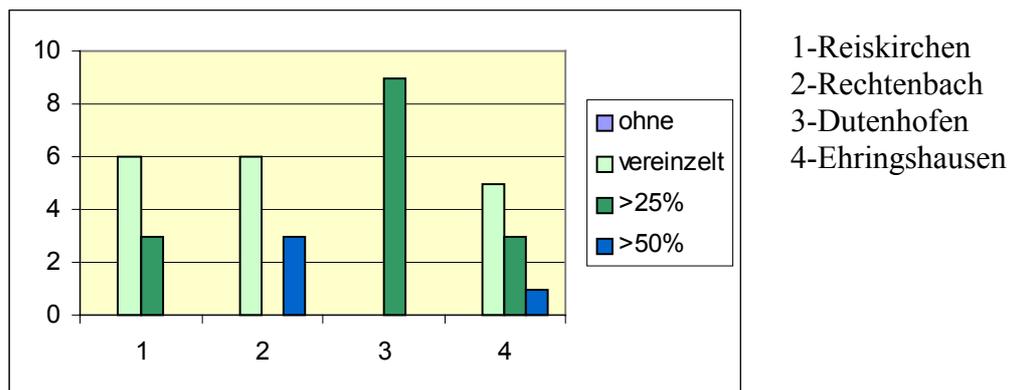


Abb.34 : Anzahl der Proben mit befallenen Konidien von *Cochliobolus sativus* der Variante **Grünland**

Beim Vergleich der beiden Varianten ist deutlich zu erkennen, dass die Populationen der VA im Boden unter Grünland signifikant ($p < 0.05$) höher waren (Abb.33 und 34). Am Standort Ehringshausen waren die VA in allen neun Proben des Ackerbodens nicht nachzuweisen, während im unmittelbar angrenzenden Grünland bei vier der neun Proben VA in beträchtlichem Masse vorhanden war. Nur am Standort Reiskirchen waren die VA Populationen der beiden Varianten annähernd gleich.

3.4.2.3 Biologisch - dynamischer Landbau

Ist in Böden von Betrieben mit biologisch – dynamischer Wirtschaftsweise die Dichte der VA höher als in konventionell bearbeiteten Böden? Bei der Analyse waren nur in einer von neun Proben des Standortes Birkenhof keine VA nachzuweisen (Abb.35). Bei den anderen vier Standorten war eine hohe Dichte der VA erkennbar, mit einem Befall von 25 % der Konidien oder mehr.

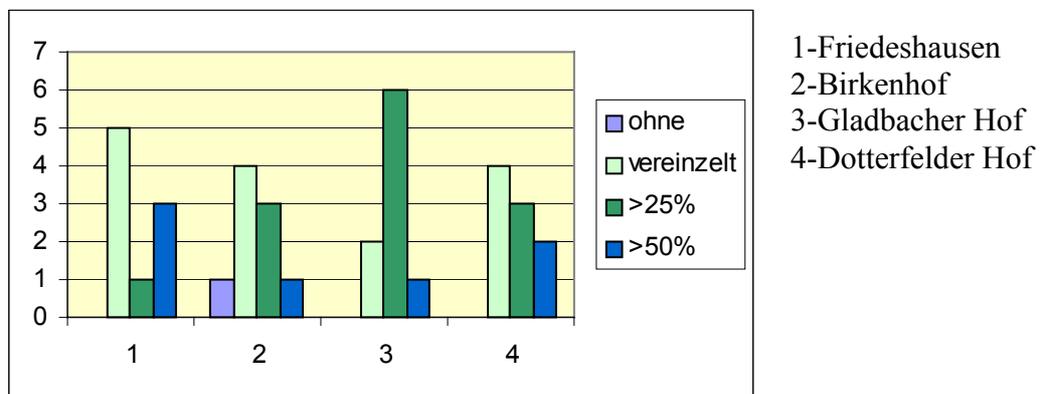


Abb.35 : Anzahl der Proben mit befallenen Konidien von *Cochliobolus sativus* der Variante biologisch-dynamischer Landbau

Bei über der Hälfte der Proben, wie auch bei allen anderen Varianten ist auch hier das Befallsmuster für die analysierten Flächen sehr unterschiedlich. Stark befallene Proben und solche ohne oder mit nur schwachem Befall kommen nebeneinander vor und spiegeln die uneinheitliche Verteilung der VA selbst auf einer eng begrenzten Fläche von nur 27 m² wider.

3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.5.1 DNA - ISOLIERUNG AUS VA - KULTUREN VERSCHIEDENER STANDORTE

Die molekularbiologischen Untersuchungen umfassen die Isolierung der DNA von Vampiramöben und die Anwendung von zwei aus der DNA eines VA - Isolates (Fritzlar-Werkel) erstellten 18SrDNA Sonden in einer PCR - Reaktion. Durch diese spezifischen Sonden sollte festgestellt werden, ob die VA - Isolate der unterschiedlichen Standorte zu verwandten Arten gehören. Mit dieser Methode (SCHLEGEL 1994) werden phylogenetische Stammbäume erstellt und Verwandtschaftsbeziehungen der Protozoen untereinander neu definiert. Hier sollte geklärt werden, ob die Amöben der unterschiedlichen Standorte auf diese Weise zu identifizieren sind.

Die hier angewandte Isolationsmethode dient auch zur Isolierung von Pilz - und Pflanzen - DNA. Durch mehrmaliges Überimpfen einzelner Verdauungs - zysten wurde sichergestellt, daß keine weiteren Protozoen in den Kulturen vorhanden waren.

Die massenhafte Aufzucht der VA erfolgte auf *Saccheromyces cerevisiae* in jeweils 3 Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm. Nachdem diese vollständig mit mehreren tausend VA - Zysten bewachsen waren, wurden sie jeweils mit 80%igem Ethanol fixiert.

Die DNA - Isolierung nach der Methode von MÖLLER et al. (1992) ergab für die Probe aus Fritzlär - Werkel eine DNA Menge von 1,56 µg. Eine Überprüfung mittels Elektrophorese im Agarosegel ergab einen hohen Anteil an hochmolekularer und damit genomische DNA. Dieses Isolat war somit zur Herstellung der 18SrDNA-Sonden geeignet. Die DNA wurde in tiefgefrorenem Zustand zum Zoologischen Institut der Uni - Leipzig geschickt. Dort wurde die 18SrRNA der VA sequenziert (siehe 2.1.4). Aus ihren End - bzw. Anfangssequenzen wurden die beiden Sonden vamp 630R und vamp1060F hergestellt.

Die DNA aus den VA - Kulturen der Standorte Groß-Gerau, Schwarzenburg und Rügen wurde in ähnlicher Weise isoliert. Auch hier wurde pro Isolat mittels Elektrophorese in einem Agarosegel sichergestellt, daß es sich jeweils um hochmolekulare DNA handelte. Von der DNA - Probe aus Groß - Gerau wurde ebenfalls eine Sequenzierung der 18SrRNA durch das Labor der Uni - Leipzig vorgenommen. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit denen der Probe aus Fritzlär - Werkel ergab insgesamt nur ganz geringe Abweichungen innerhalb der gesamten Sequenz von 1808bp. Eine Insertion an Position 72 (AT) und drei Substitutionen an den Positionen 66, 670 und 1492 (SCHLEGEL, persönliche Mitteilung). Dadurch war gewährleistet, dass die Sonden, die auf der Sequenz der 18SrRNA des Isolates aus Fritzlär - Werkel basierten auch die entsprechenden Sequenzen auf der DNA des Isolates aus Groß - Gerau erkennen konnten. Die DNA wurde in Eppendorfgefäßen bei - 20° tiefgefroren und so für die PCR - Anwendungen aufbewahrt.

Da die VA - Kulturen als Standard mit *Cochliobolus sativus* als Futterorganismus gehalten worden waren, wurde nach der vorstehend erwähnten Methode auch die DNA dieses Pilzes isoliert und später in der PCR zur Abgrenzung verwendet.

3.5.2 IDENTIFIZIERUNG DER VA - ISOLATE MIT DEN 18SrDNA - SONDEN

Die Sequenz der ssurDNA ist in weiten Bereichen stark konserviert und kann deshalb zur phylogenetischen Zuordnung von Organismen herangezogen werden. Die beiden Sonden vamp 630R und vamp 1060F bestehen sowohl aus hoch konservierten Bereichen der 18SrDNA Sequenzen, um eine Anlagerung der Sonde sicherzustellen, als auch aus Bereichen, in denen der Code wesentliche Unterschiede zu vergleichbaren Gattungen aufweist. Wie weit sich jetzt die Arten innerhalb einer Familie abgrenzen, konnte hier nicht aufgeklärt werden, da kein entsprechendes Material für vergleichende Untersuchungen vorhanden war.

3.5.2.1 DNA - Isolate

Die Anwendung der Sonden vamp 630R und vamp 1060F auf die DNA - Extraktionen des Standortes Groß - Genau ergab die erwartete Übereinstimmung mit den Vorgaben (Abb.36).

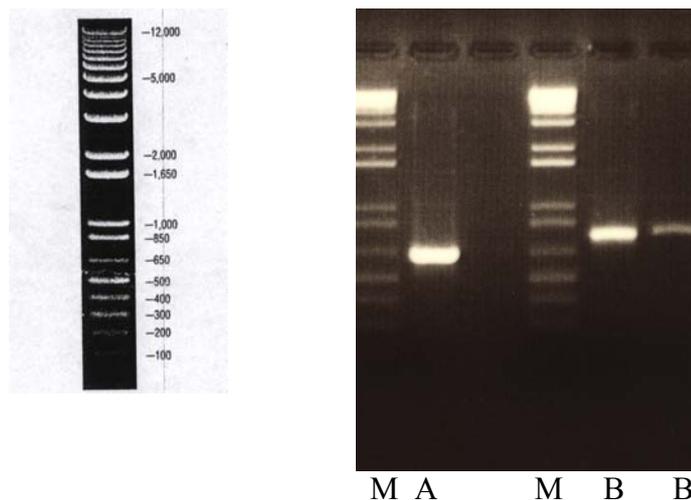


Abb.36 : Banden der PCR - Produkte mit den Sonden vamp630(A) und 1060F(B). Zum Vergleich: Marker(M) 1Kb Plus DNA Ladder)

Das PCR - Produkt der Sonde vamp630(A) hatte eine Lauflänge von etwa 650bp und die Bande des PCR - Produktes der Sonde 1060F markierte den Wert von etwa 750bp. Weitere Banden traten nicht auf. Damit konnte die DNA des Standortes Groß - Gerau (G) als Kontrolle bei den weiteren Untersuchungen verwendet werden.

Die PCR - Produkte der Sonde 1060F mit DNA aus Zysten der Standorte Schwarzenburg (S) und Rügen (R) ergaben eindeutige Banden in der Höhe der Lauflänge von etwa 750 bp. Der Marker ist in den Abb.37 und 38 nur sehr schwach zu erkennen, im Agarosegel selbst war es hingegen noch möglich, die einzelnen Banden zu identifizieren und eine Zuordnung vorzunehmen.

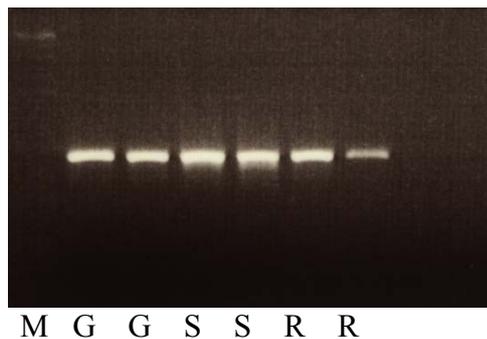


Abb. 37: Banden der PCR - Produkte mit der Sonde vamp1060F

Auch die DNA - Banden, der PCR - Produkte der Sonde vamp630R waren bei ca. 650bp deutlich ausgebildet (Abb.38). Rügen und Schwarzenburg konnten in diesem Versuch als VA - Standorte ausgewiesen werden, Groß - Gerau wurde schon vorher (Abb.36) als Standort bestätigt.

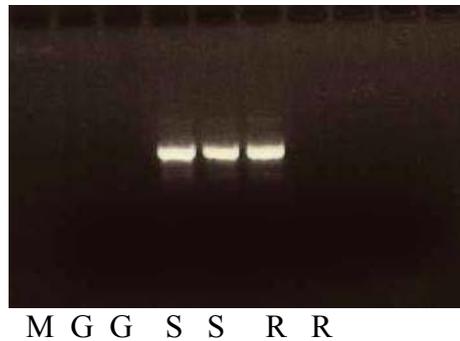


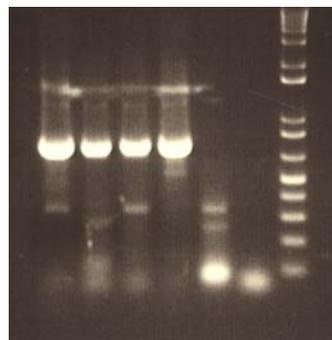
Abb.38: Banden der PCR - Produkte der Sonde vamp630R

Somit kann davon ausgegangen werden, daß die VA - Isolate der Standorte Fritzlär - Werkel, Groß - Gerau, Schwarzenburg und Rügen in Bezug auf die Sequenz der 18SrRNA, eine weitgehende Übereinstimmung aufweisen.

3.5.2.2 Amöbenkulturen

Da die Isolierung der DNA aus Amöben eine zeitaufwendige Aufzucht von mehreren tausend Amöben voraussetzte, sollte hier versucht werden, die 18SrDNA - Sonden direkt mit einer Suspension aus den Amöbenkulturen in einer PCR anzusetzen. Dazu wurden die VA - Zysten aus der Kultur mit einer Pipette aufgenommen, die Zysten durch zentrifugieren aufkonzentriert und anschließend mit einem speziellen Mörser in Eppendorff - Gefäßen zerrieben. Um den Abbau der DNA so gering wie möglich zu halten, mußte zügig und ständig auf Eis gearbeitet werden. Der PCR - Ansatz wurde leicht abgeändert, da hier mehr DNA- Suspension (10µl) eingesetzt wurde, wobei sich der Anteil des Wassers um den Betrag von 9µl minderte. Der Probeansatz mit den bisher untersuchten Standorten Groß - Gerau, Schwarzenburg und Rügen zeigte, dass die Sonden auch direkt in den frischen Amöbensuspensionen eingesetzt werden konnten.

Um abzuklären, ob Einfrieren bei -20°C diese PCR - Ergebnisse beeinträchtigt, wurden Amöben des Standortes Rügen eingefroren, anschließend zerrieben und im PCR - Ansatz mit der Sonde vamp1060F getestet. Gleichzeitig wurden frische Zysten der Standorte Rügen, Rasht (Iran), Rauischholzhausen und Hanau untersucht. Die Abb. 39 zeigt, dass ein Einfrieren der Zysten den Verlauf der PCR nicht beeinflusst, da alle 3 Banden des Standortes Rügen (R) gut ausgebildet sind, wobei für die erste Bande im Ansatz isolierte DNA verwendet wurde, während die Banden 2 und 3 im Ansatz eingefrorene bzw. frische Zysten enthielten. Der gleichzeitig neu untersuchte Standort Rasht (I) mit zahlreichen wachstumsfreudigen Amöben konnte hier eindeutig nachgewiesen werden, hingegen entwickelten sich für die Standorte Rauischholzhausen (Ra) und Hanau (H) keine PCR - Produkte. Die an anderer Stelle auftretenden DNA - Banden, liegen im Bereich unter 400 und 100 bp, während die 4 stark ausgeprägten Banden (Rügen, Iran) dem Bereich zwischen 650 und 850 bp zuzuordnen sind, in welchem das PCR - Produkt der Sonde 1060F zu erwarten war.



R R R I Ra H M

Abb. 39 : Banden der PCR Produkte der Sonde vamp1060F mit den Amöbensuspensionen der Standorte Rügen (Zysten eingefroren bei -20°), Iran, Rauischholzhausen und Hanau

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden pro Standort möglichst viele Zysten angezogen, abgesammelt und eingefroren, um sie später in einer PCR zu untersuchen. Nicht für alle Standorte konnten auf diese Weise die erwarteten Ergebnisse erzielt werden. Einige Standorte konnten jedoch sicher bestätigt werden. Abb. 40 und 41 zeigen die PCR - Produkte der Standorte Halle (H), Biedenkopf (Bi), Rasht (I), Meißen (Me), Rudolstadt (Ru), Groß - Gerau (G) und Friedeshausen (F). Zur Abgrenzung wurde eine Suspension aus lobosen Amöben (L) und die DNA aus *Cochliobolus sativus* angesetzt. Deutliche Banden entwickelten sich bei beiden Sonden für die Standorte Halle, Biedenkopf, Rasht sowie Groß - Gerau. Friedeshausen bestätigte sich nur in

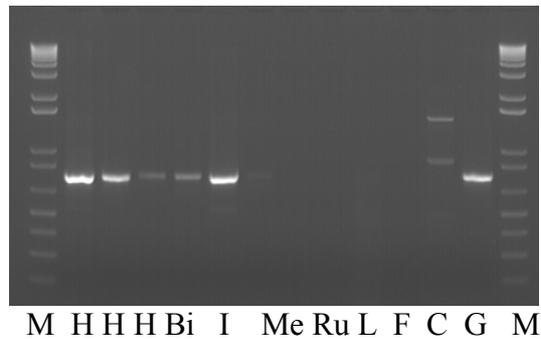


Abb.40 : Banden der PCR - Produkte der Sonde 1060F mit VA - Isolaten der Standorte Halle, Biedenkopf, Rasht, Meißen, Rudolstadt und Friedeshausen im Vergleich zu *Cochliobolus sativus*(C), lobose Amöben(L) und dem Marker(M)

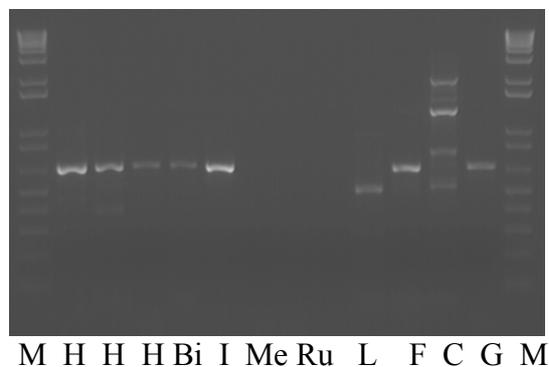


Abb.41: Banden der PCR - Produkte der Sonde vamp 630R mit VA - Isolaten der Standorte siehe Abb.40

dem Produkt der Sonde vamp 630R. Auch lobose Amöben ergaben hier ein PCR - Produkt bei ca. 500bp. Die Banden der zur Kontrolle eingesetzten PCR mit DNA von *Cochliobolus sativus* traten in keinem weiteren Ansatz auf. Die Banden liegen bei beiden Sonden in den erwarteten Bereich von ca. 750bp für die Sonde vamp1060F und ca.650bp für die Sonde 630R.

Auch mehrmaliges Wiederholen der PCR - Ansätze mit allen weiteren Standorten führte nur noch für den Standort Birkenhof bei Siegen zum Nachweis mittels DNA - Banden.

Insgesamt konnte hier bewiesen werden, dass die VA - Isolate der Standorte Biedenkopf, Birkenhof, Friedeshausen, Fritzlar - Werkel, Groß - Gerau, Halle, Rasht (Iran), Rügen, und Schwarzenburg (Schweiz) sich in der Sequenz der 18SrRNA in wesentlichen Abschnitten nicht oder nur gering unterscheiden. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass es sich zumindest hier um nahe verwandte Arten handelt, die eine großräumige Verbreitung in ackerbaulich genutzten Flächen haben. Der am Mikroskop geführte Nachweis der übrigen Standorte konnte durch die DNA - Sonden nicht bestätigt werden. Es ergab sich aber auch aus diesen Untersuchungen kein Hinweis darauf, dass es sich hier nicht um die beschriebenen Vampiramöben handelt. Gleichzeitig musste festgestellt werden, dass die gewünschte Anlagerung der Sonden bei nur geringen Mengen an Probenmaterial offenbar gestört wurde.

4 DISKUSSION

Im Jahr 1985 wurde aus dem Boden eines Feldes mit 16jähriger Weizendauerkultur mit der Sandwich - Methode (HOMMA et al. 1979) eine mykophage Vampiramoeba (VA) isoliert und in Kultur genommen (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998a). Da dieses Isolat zwischenzeitlich verlorengegangen war, wurde die VA 1996 aus dem Boden des gleichen Feldes problemlos ein weiteres Mal isoliert und scheint demnach vergleichsweise ortstreu zu sein. Die VA ist leicht zu kultivieren und kann monatelang ohne besondere Sauerstoffzufuhr bei diffusem Tageslicht und Zimmertemperatur gehalten werden (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998b). In flüssigem Medium entstehen aus kleinen Trophozoiten in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot, bis zu mehreren mm große ausgedehnte Fusionsplasmodien. Die Zellkerne der VA erscheinen *in vivo* spindelförmig und nach Fixierung länglich, bei durchschnittlich 2,5 bis 3,5 μm Länge und 1,0 bis 1,5 μm Breite (RÖPSTORF 1992). Sie gleiten im Plasma mit und schwimmen elegant durch alle Verengungen des Amöbenkörpers, indem sie sich in die Länge ziehen. Die Vermehrung der Zellkerne findet offenbar in den Zysten statt, wobei abgerundete und aufgeblähte Zellkerne paarweise angeordnet zu erkennen sind. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um Produkte einer mitotischen Teilung handelt, wie sie von RÖPSTORF (1992) beschrieben wurde. In einzelnen Zysten wurden nach der Teilung bis zu 50 Zellkerne gezählt. Die VA bewegt sich mit Schleim über den Boden der Kulturschalen und der Substrate. Sich ständig neu bildendes Ektoplasma lässt sie vorwärts wandern, wobei auch Fäden am Boden haften bleiben, die ein gutes Substrat für Bakterien bilden. Die Strömung des Protoplasmas ist gleichförmig und kann über einen längeren Zeitraum hin und her fließen, wie z.B bei der Exzystierung (Abb.9).

Die VA kommt in Agrarböden weit verbreitet vor (s.3.3.1) und konnte sogar in einem Boden aus dem Iran nachgewiesen werden. Die Identifizierung erfolgte durch PCR mit VA - spezifischen DNA - Sonden. Damit wurde sichergestellt, dass es sich bei den Isolaten um die gleiche Art von Amöben handelte bzw zumindest um Vertreter sehr nah verwandter Arten.

Wie ernährt sich die VA? Eine entsprechende Untersuchung des Beutespektrums im flüssigen Medium lässt folgende Aussagen zu. Die VA kann verschiedene Bodenorganismen als Nahrungsquelle nutzen (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998c). Neben Algen und Nematoden sind Pilze besonders gut geeignet. Dabei gibt es deutliche Unterschiede in der Nutzbarkeit. Pilze wie *Rhizopus stolonifer*, *Botrytinia fuckeliana* und *Geotrichum candidum* fördern in starkem Maße eine Vermehrung der VA. Viele andere Pilzarten erhalten nur den status quo der VA - Populationen. Andere Pilze wie *Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum* und *Trichoderma harzianum* bringen die VA in kurzer Zeit zum Absterben. Diese Arten sind bekannt für eine Bildung toxischer Metabolite, die für die Abtötung der VA verantwortlich sein könnten. Alle fünf geprüften Arten von Bakterien führten zu keiner Vermehrung der VA und sind demnach als Nahrungsquelle nicht geeignet. Solche Präferenzen bei der Nahrungsaufnahme sind auch von anderen Protozoen bekannt und beziehen sich auf Vorkommen, Größe, Morphologie (einzeln oder als Aggregat) der Zellen, sowie die chemische Zusammensetzung des Zellinhaltes hinsichtlich Pigmenten und Toxinen (GRIFFITHS 1994). Zur Nahrungsaufnahme umschließen Trophozoite Algen, Nematoden, Pilzfäden und - konidien, perforieren die Zellwände (Abb.1) und entleeren den Inhalt befallener Zellen. Hat ein Trophozoit genügend Nahrung aufgenommen, dann stellt er seine Fortbewegung ein und bildet eine Verdauungszyste mit einer zentralen Vakuole. Nach einigen Tagen verlässt die VA die Zyste mit Plasmaaustritt durch mehrere Perforationen der Zystenwand unter Hinterlassung einer Defäkation.

Durch mikroskopische Beobachtungen und Zeitrafferaufnahmen konnte der Lebenszyklus der VA weitgehend aufgeklärt werden. Dabei blieb aber ein wesentlicher Punkt offen. Wie überdauert VA widrige Umstände wie Trockenheit und Frost? Viele Mikroorganismen bilden hierfür widerstandsfähige Dauerzysten. Dies scheint bei VA nicht der Fall zu sein, denn langsam ausgetrocknete Kulturen oder vollständig eingetrocknete Bodenproben enthielten nach Zugabe von Wasser keine lebensfähigen VA - Formen. FINLAY et al. (2000) konnten zeigen, dass eine Reihe im Boden lebender Protozoen keine Dauerorgane bildet, die ihnen ein Überleben in ausgetrockneten Böden sichern. Terrestrische Gymnamöben versuchen der Gefahr einer Austrocknung durch vertikale Wanderung in tiefere Bodenschichten auszuweichen (BISCHOFF 2002) und brauchen deshalb keine Überdauerungsorgane. In ähnlicher Weise könnte VA mit dem Bodenwasser in den Kapillaren auf- und absteigen und durch Ausweichen in tiefere Bodenschichten bedrohlichen Situationen entgehen. Die Tatsache, dass VA in einer Bodentiefe bis zu einem Meter isoliert werden konnte, spricht für diese Annahme und würde das Fehlen von Überdauerungsorganen verständlich machen.

Mykophag Amöben sind weltweit verbreitet (s. Einleitung). Meist werden morphologische Charakteristika und die antimykotischen Eigenschaften beschrieben, ohne taxonomische Zuordnung der Amöben. Eine besondere Aufmerksamkeit richtet sich auf *Arachnula impatiens*. Diese Art wurde erstmals von CIENKOWSKI (1876) isoliert und von DOBELL (1913) ausführlich beschrieben. Er hat sie nur einmal aus einem Flösschen in der Nähe von Cambridge isoliert und konnte sie trotz intensiver Suche nicht wieder finden. OLD & DARYSHIRE (1980) charakterisierten eine "Riesenamöbe", die sie als *A. impatiens* definierten. Aufbauend auf den vorstehenden Arbeiten hat PAGE (1987) die neue Familie Arachnulidae aufgestellt, mit der monotypischen Gattung *Arachnula* CIENKOWSKI, 1876. Sie enthält nur die

Tab.2: Vergleich charakteristischer Merkmale der VA mit denen von
Arachnula impatiens

Eigenschaft	<i>A. impatiens</i> (PAGE 1991)	VA
Größe der Fusionsplasmodien	< 350 µm	bis mehrere mm
Zellkerne	viele, länglich, 1,6-2,0µm sphärisch(DOBELL 1913)	viele, spindelförmig 2,5-3,5x1,0-1.5µm
Kernteilung	in den Zysten	in den Zysten
Fortbewegung der Trophozoite	schnell, unruhig mit hervorschießenden Plasmasträngen, stelzen auf Ektoplasmafäden	langsam, kriechend
Beutespektrum	Bakterien, Blaualgen, Diatomeen, Flagellaten, Ciliaten, Nematoden, Pilze	Algen, Nematoden, Pilze
Annullierung von Zellwänden	ja	ja
Verdauungszysten mit einer Vakuole	rund, 40 µm	oval, 50 x 35 µm
Wiederbelebung aus getrockneten Kulturen mit Wasser	ja	nein

eine Art *Arachnula impatiens*, die von PAGE & SIEMENSMA (1991) ausführlich beschrieben und definiert wird. Handelt es sich bei VA um *A. impatiens* oder eine andere Art? Beim Vergleich charakteristischer Merkmale (Tab.2) ist klar zu erkennen, dass es Merkmale gibt, die VA eindeutig von *A. impatiens* unterscheiden.

Hervorzuheben sind die andersartige Fortbewegung und die Überdauerung bei Austrocknung. Nach diesen Befunden handelt es sich bei der VA nicht um die weltweit verbreitete *A. impatiens* sondern um eine neue Art. Eine PCR mit spezifischen DNA - Sonden hätte die Verschiedenartigkeit bestätigen können. Leider ist z. Z.. keine Kultur von *A. impatiens* für eine solche Untersuchung verfügbar, so dass dieser endgültige Nachweis nicht erfolgen konnte.

Neuere Untersuchungen vor allem die Anwendung molekularbiologischer Methoden haben zu einer vollständigen Revision der Taxonomie der Protozoa geführt, die bis heute keineswegs abgeschlossen ist. Zur Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaumes eignen sich die ribosomalen RNA - Sequenzen besonders gut, da sie in allen Organismen, Chloroplasten und Mitochondrien verbreitet sind und überall die gleichen Funktionen haben. Außerdem scheint es bei den ribosomalen RNA - Genen keinen lateralen Gentransfer zu geben. Die größte Datenmenge existiert über die 5SrRNAs mit ca. 125 bis 319 Nukleotiden und über die small subunit r RNAs (ssurRNA) mit 1200 bis 2300 Nukleotiden. Da die letztere mehr Nukleotide besitzt und neben hoch konservierten auch nur teilweise konservierte Abschnitte enthält, kann sie zum Aufdecken von nahen und entfernten phylogenetischen Beziehungen eingesetzt werden (SCHLEGEL 1991). Die Stammbaum - Analysen mit Hilfe der ssurRNA Sequenzen führten zu der Erkenntnis, dass die Protozoa in hohem Masse polyphyletisch sind und Ähnlichkeiten in den ssurRNA - Sequenzen zu einigen Metazoa größer sind als zu anderen Protozoa. So kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die Protozoa im allgemeinen Vorläufer der Metazoa sind. Die früher gültige Einordnung der Vampyrellidae Zopf, 1885 in das Phylum PROTOZOA von Siebold, 1845 mit dem Subphylum

SARCOMASTIGOPHORA Honigberg u. Balamuth, 1963 und der Subclassis FILOSEA Leidy, 1879 kann so nicht mehr übernommen werden. PATTERSON (1999a u.b) beschreibt in dem in Internet aufgeführten TREE OF LIFE Projekt 60 verschiedene Abstammungslinien von Eukaryoten, die eine eigene ultrastrukturelle Identität besitzen und keine ihnen entsprechende Schwestergruppen vorhanden sind. Unter diesen sind die Vampyrelliden als sich von Pilzen und Algen ernährende Amöben aufgeführt. CORLISS (1994) beschreibt in seiner als 'user - friendly' bezeichneten Klassifikation der Eukaryonten 6 verschiedene Reiche. Das Reich der PROTOZOA umfasst hier 34 unterschiedliche Phyla mit 83 verschiedenen Klassen. In dem 10. Phylum RHIZOPODA von Siebold, 1845 finden sich 5 Klassen:

- 1 Lobosea Carpenter, 1861
- 2 Entamoebidea Cavalier - Smith, 1991
- 3 Filosea Leidy, 1879
- 4 Granuloreticulosea de Saedeleer, 1934
- 5 Xenophyophorea Schulze, 1904

Ständig fortschreitende Erkenntnisse im Bereich der phylogenetischen Zusammenhänge führten dazu, dass dieser Vorschlag von CORLISS (1994) schon nach 4 Jahren wieder abgeändert wurde (CAVALIER - SMITH 1998). In dem Superreich (Empire) EUKARYOTA, bilden die PROTOZOA ein Reich (kingdom) neben 4 weiteren Reichen der CHROMISTA, der FUNGI, der PLANTAE und der ANIMALIA. Das Reich der PROTOZOA wird hierbei in 2 Unterreiche (subkingdoms) ARCHEZOA und NEOZOA unterteilt. Während die ARCHEZOA die beiden Phyla METAMONADA und TRICHOZOA umfassen, sind die NEOZOA weiter in 3 Infrareiche (infrakingdoms) aufgeteilt: SARCOMASTIGOTA mit den Phyla NEOMONADA, CERCOZOA, FORAMINIFERA und AMOEBOZOA; DISCICRISTATA mit den Phyla PERCOLOZOA und EUGLENOZOA, sowie ALVEOLATA mit den Phyla DINOZOA, SPOROZOA und CILIOPHORA.

Mit der Sequenzierung der 18S rRNA ist die Möglichkeit geschaffen, die VA phylogenetisch einzuordnen. Ein Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen anderer nahe verwandter Arten, wie den Vamyrelliden oder einer sicher bestimmten *Arachnula impatiens* ist zur Zeit noch nicht möglich, da noch keine weiteren Sequenzierungen dieser Arten vorliegen. Bisher vorliegenden Ergebnissen einer phylogenetischen Einordnung durch WYLEZICH (2003) zufolge, gehört die VA mit hoher Wahrscheinlichkeit in das Phylum CERCOZOA.

Nur wenn weitere Daten vorliegen, wird es möglich sein zu entscheiden, ob die von PAGE & SIEMENSMA (1991) vorgeschlagene Ordnung Cristivesiculatida Page, 1987 mit den Familien Vampyrellidae und Arachnulidae Bestand hat und ob die hier untersuchte Amöbe zu einer von beiden gehört.

Ein Nachweis pathogener Bakterien in der Umwelt mittels PCR unter Anwendung spezifischer DNA - Sonden wird in weiten Bereichen erfolgreich durchgeführt. Zur Bestimmung von Bakteriengattungen bzw. - spezies werden die konservierten Regionen der benachbarten 16S und 23S rRNA - Gene als Primer genutzt, um die dazwischen liegenden sehr heterogenen Spacerregionen zu untersuchen (NEWTON & GRAHAM 1994). Zur Beschreibung von phylogenetischen Beziehungen werden bei Bakterien die 16S und die 23S rRNA - Gene eingesetzt. AMANN et al. (1995) setzen aus diesen Genen hergestellte Sonden in einer PCR zur artspezifischen Identifizierung in Mischpopulationen verschiedener Arten ein und umgehen damit die bisher obligatorische Isolierung und Reinkultur.

Hier sollten die aus der 18S rDNA – Sequenz konstruierten Sonden die aus den verschiedenen Standorten isolierten Amöben identifizieren, um zeitraubende ultrastrukturelle Untersuchungen zu vermeiden. Die Isolate unterschiedlicher Standorte in Deutschland, der Schweiz und dem Iran ergaben ein PCR – Produkt mit der erwarteten Anzahl an Nukleotidbasen. In diesen Fällen kann

davon ausgegangen werden, dass alle diese Amöben entweder zu einer bestimmten Art, jedoch mit höchster Wahrscheinlichkeit zur gleichen Familie gehören. Die hier untersuchten Amöben sind allgemein verbreitet und damit sicherlich ein wesentlicher Bestandteil der Protozoenfauna in landwirtschaftlich genutzten Böden.

Die Anwendung der Sonde ohne vorhergehende DNA – Isolierung erwies sich als äußerst schwierig, da die PCR eine Reaktion darstellt, die durch chemische Einflüsse, insbesondere auch durch Stoffe aus dem Boden, leicht gestört werden kann (NEWTON & GRAHAM 1994). Offenbar konnten solche Störungen auch durch intensives Waschen und wiederholtes Zentrifugieren der Proben nicht beseitigt werden. Ein verwertbares PCR – Produkt konnte nur erzielt werden, wenn die Amöben schon einen längeren Zeitraum in Kultur genommen waren, wobei, bedingt durch mehrmaliges Überimpfen, keine Bodenpartikel mehr in der Lösung waren. Es zeigte sich außerdem, dass auch hier eine größere Anzahl an Zysten pro Probe erforderlich war. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist es sicherer, vor einer PCR mit den Sonden, die DNA der Organismen zu isolieren.

VA ist in Agrarböden Deutschlands allgemein verbreitet. Durch einen Vergleich unterschiedlicher Anbaumethoden sollte untersucht werden, durch welche Maßnahmen das antiphytopathogene Potential der VA in den landwirtschaftlich genutzten Flächen beeinflusst wird. Eine Förderung der mikrobiellen Flora des Bodens führt auch zu einem vermehrten Wachstum an Protozoen. Im Nahrungsnetz des Bodens sind die Protozoen sowohl Beute als auch Jäger, indem sie sich von Bakterien und Pilzen ernähren und ihrerseits von Nematoden und Mikroarthropoden gejagt werden (GRIFFITHS 1994).

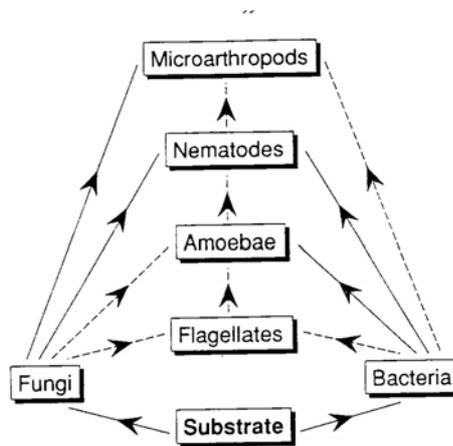


Abb.42: Vereinfachte Darstellung des Nahrungsnetzes im Boden.
(schwächere Flusslinien gestrichelt) nach GRIFFITH(1994)

Nach FOISSNER (1987a) beträgt der Anteil der Protozoen an der Biomasse (standing crop) ca.30% und an der Respiration des Bodens sogar 70%. Protozoen veratmen 10% des gesamten Kohlenstoffeintrags und haben einen Anteil von 30% am Energieumsatz des Bodens, der damit etwa dem Anteil der Würmer entspricht. Durch diese Untersuchungen wird eindrucksvoll unterstrichen, dass der oft in seiner Bedeutung unterschätzte und daher wenig untersuchte Anteil der Protozoen am gesamten Bodenleben deutlich höher ist als bisher angenommen.

Unterschiedliche Ackerbausysteme können entscheidende Auswirkungen auf das Überleben der VA im Boden haben. So eliminieren einige im konventionellen Landbau eingesetzte Fungizide und Insektizide die VA (PAKZAD & SCHLÖSSER 1998b), aber auch andere Protozoen werden stark beeinträchtigt (EKELUND et al. 2000).

COWLING (1994) nennt folgende Umweltfaktoren, die für die Verteilung von Protozoen im Boden relevant sind:

- Bodentyp
- Geometrie der Bodenporen
- pH - Wert, Temperatur, Feuchtigkeit und Belüftung des Bodens
- Vegetation (oberhalb und im Boden)
- Abfall und Humustyp der Pflanzen
- Wurzelexudate
- Vorkommen von mikrobieller Nahrung

Wird einer dieser Faktoren verändert, welches in den landwirtschaftlich genutzten Böden durch Bodenbearbeitung und Fruchtfolgen ständig geschieht, kommt es auch zu Veränderungen in den Protozoenpopulationen.

Der Vergleich unterschiedlicher Formen des Ackerbaus zeigt ein vermehrtes Vorkommen von Amöben in nicht gepflügten Böden und unter Grünland. Hier könnten durchaus ähnliche Parameter eine Rolle spielen, da Grünland ebenfalls nicht umgebrochen wird. Vorteilhaftere Bedingungen für die VA liegen vor, wenn der Boden nicht so stark austrocknet oder durchfriert und damit auch mehr Pilze als Nahrungsquelle enthält. Außerdem scheint der durchgängig höhere Humusgehalt der Varianten Direktsaat und Grünland (Tab.1) der ansonsten gleichen Standorte für ein besseres Wachstum der Protozoen verantwortlich zu sein. So beschreibt FOISSNER (1987b), daß der Anteil der Protozoen mit dem Anteil an Humus im Boden stark korreliert.

Besonders günstig wirkt sich die Bewirtschaftung der Böden nach biologisch - dynamischen Grundsätzen aus. Alle Böden unter dieser Anbaumethode zeigten einen höheren Besatz mit Amöben im Vergleich zu allen anderen Böden. Viele Maßnahmen des ökologischen Landbaus wie

- Verzicht auf chemische Schädlingsbekämpfung
- Verzicht auf synthetische Mineraldünger und Wachstumsregulatoren
- Gründüngung
- Organische Düngung

beeinflussen das Bodenleben allgemein und damit auch das Wachstum der Mikroorganismen des Bodens positiv. Untersuchungen der Protozoenfauna in ökologisch und konventionell bewirtschafteten Flächen zeigen einen deutlichen Trend, dass der ökologische Landbau durch einen hohen Humusgehalt und geringe Lagerungsdichte der bewirtschafteten Böden das Wachstum von Protozoen fördert. Dies passt zu der Erkenntnis, dass Humusform, Humusmenge und Lagerdichte des Bodens wichtige Faktoren für die Abundanz und Verteilung von Protozoen sind (FOISSNER 1992, BRELAND & ELTUN 1999).

Bis heute wurden etwa 213000 Arten von Protisten beschrieben, die sich in etwa 36 Phyla über alle 5 eukaryotischen Reiche verteilen, wobei der Anteil der bis dato noch nicht beschriebenen Arten auf das zwei- bis dreifache geschätzt wird. Viele Protisten sind aktiv in den mikrobiellen Nahrungskreislauf involviert und spielen eine wichtige Rolle in den aquatischen und terrestrischen Nahrungsketten bzw. Nahrungsnetzen. Im Boden beteiligen sie sich an der Restriktion von Bakterien und Pilzen und dem Recycling von Pflanzennährstoffen (CORLISS 2002). Bis jetzt wurden Protozoen in der Landwirtschaft nicht berücksichtigt, obwohl sie sich auch in landwirtschaftlich genutzten Böden in größerer Zahl vorfinden (FOISSNER 1994). Die Leistungen der Protozoen bei Nährstoff - Recycling und der Vernichtung von phytopathogenen Erregern im Boden sind kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unterschiedliche Methoden der Bodenbearbeitung das

Überleben der VA im Boden beeinflussen. Andererseits wird auch deutlich, dass VA durchaus das Potential besitzt, im Boden vorhandene Schädlinge zu kontrollieren und damit als ein Teil des antiphytopathogenen Potential eines Bodens angesehen werden kann. In Gefäßversuchen gelang CHAKRABORTY & WARCUP (1983) der Nachweis, dass in mit mycophagen Protozoen besetzten Böden die Überlebensrate von *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* deutlich geringer war im Vergleich mit Böden ohne diese Organismen. Ob nun unter den Verhältnissen im Freiland Effekte erzielt werden können, die gleichermaßen deutlich ausfallen, bleibt abzuwarten, da hier sehr viele nicht kontrollierbare Faktoren eine Rolle spielen.

Eine Sterilisierung der Böden mit aggressiven chemischen Mitteln kann aber keine Lösung für im Boden persistierende Schädlinge sein, denn damit werden auch alle anderen im Boden lebenden Organismen stark geschädigt oder abgetötet. Auch für das Ökosystem Boden gilt, was in bezug auf andere Ökosysteme längst anerkannt ist: Nur durch den Erhalt der Artenvielfalt kann die Stabilität eines Ökosystems gewährleistet werden. Eine gezielte Förderung der Biodiversität der Bodenorganismen sollte daher in allen landwirtschaftlichen Ackerbausystemen berücksichtigt werden, damit die in allen Böden vorhandenen Potentiale optimal genutzt werden und eine nachhaltige Bewirtschaftung der landwirtschaftlichen Flächen möglich bleibt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Boden eines Feldes mit mehr als 16jähriger Weizendauerkultur in Nordhessen wurde 1996 erneut eine mykophage Vampiramoeba (VA) isoliert, die bereits elf Jahre zuvor am gleichen Standort nachgewiesen worden war. Mit Hilfe eines vergleichsweise einfachen und zuverlässigen Kulturverfahrens wurde versucht die VA zu charakterisieren. Dabei wurden folgende Informationen erhalten:

- Mit licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie Zeitrafferaufnahmen wurde ein Lebenszyklus entworfen, der weitgehend aufgeklärt ist. Offen bleibt die Frage auf welche Weise die VA widrige Umstände wie Trockenheit und Frost überdauert.
- Anhand der Vermehrung in künstlicher Kultur wurde ermittelt welche Organismen der VA als Nahrungsgrundlage dienen. Es zeigte sich, dass einige Arten von Pilzen, Algen und Nematoden gut verwertet werden konnten. Von fünf phytopathologisch interessanten Bakterienarten führte keine zu einer Vermehrung der VA. Insgesamt hat die VA ein breites Nahrungsspektrum.
- Aus vier VA - Kulturen unterschiedlicher Standorte wurde die genomische DNA isoliert. Von zwei dieser Proben wurde die 18SrRNA an der Universität Leipzig (Prof. Dr. M. Schlegel) sequenziert und von den Sequenzen die zwei DNA - Sonden vamp 630R und vamp 1060F konstruiert. Die mit diesen Sonden bei der PCR erhaltenen Produkte von etwa 650 und 750 bp erlauben eine sichere Identifizierung der VA.
- Morphologische Charakteristika und Verhaltensweisen der VA zeigen einige Ähnlichkeiten mit der weltweit verbreiteten *Arachnula impatiens* von der sie aber eindeutig unterschieden ist. Sie könnte zu den Cercozoa gehören.
- Auf der Basis perforierter Konidien von *Cochliobolus sativus*, morphologischer Charakteristika und der Verhaltensweise in künstlicher

Kultur ist die VA, neben anderen mykophagen Arten von Amöben, in Agrarböden weit verbreitet und wurde auch in einem Boden aus dem Iran nachgewiesen. Die überwiegende Anzahl der Isolate ergab bei der PCR mit den zwei DNA - Sonden die gleichen Reaktionsprodukte wie die ursprüngliche VA. Danach handelt es sich entweder um die gleiche Art oder zumindest um nahe verwandte Arten.

- Landwirtschaftlich genutzte Flächen mit unterschiedlichen Anbausystemen zeigen verschiedene Populationsdichten der VA. Beim Vergleich von jeweils 4 - 5 Flächen der Systeme Direktsaat - Pflug und Ackerland - Grünland sowie ökologisch dynamischem Landbau war in den Flächen ohne Bodenbearbeitung (Direktsaat, Grünland) die VA deutlich dichter als in den entsprechenden Varianten mit Bodenbearbeitung. Eine ökologisch - dynamische Bewirtschaftung fördert die VA im Vergleich zum konventionellen Landbau.

Mit den Befunden über Beutespektrum, Lebenszyklus, Identifizierung mit DNA - Sonden, geographische Verbreitung und dem Einfluss verschiedener Formen der landwirtschaftlichen Bearbeitung von Agrarböden wurde eine bisher unbekannt mykophage Vampiramöbe charakterisiert. Eine exakte taxonomische Zuordnung dieser neuen Art ist wegen fehlender 18SrRNA - Sequenzierungen nahe verwandter Arten von Amöben bisher noch nicht möglich.

6 SUMMARY

In 1996 a vampyrellid amoeba (VA) was isolated again from the soil of a field with more than 16 years of wheat monoculture in Northern Hesse, which was already found at the same place eleven years ago. The VA could be characterised by means of a comparatively simple and dependable maintenance, whereby the following information was received:

- With light and electron microscopic investigations as well as with time-laps pictures a life history was sketched, which is almost completely resolved. The question how the VA survives adverse circumstances like drought and frost remains open.
- Based on the degree of propagation during maintenance, the nourishment of the VA was investigated. It appears that some species of fungi, algae and nematodes could serve as a food base for the VA. None of the five phytopathologically relevant species of bacteria could increase propagation of the VA. Altogether the VA has a wide nourishment spectrum.
- Gene DNA was isolated out of four VA - cultures from different locations. Two of these samples were used for ssu rRNA sequencing at University of Leipzig (Prof. Dr. M. Schlegel). From these Sequences the two DNA - probes vamp630R and vamp1060F were constructed. The products received with these probes in the PCR consist of about 650 and 750 bp and permit a dependable identification of the VA.
- Morphological characteristics and behaviour of the VA resemble these of the worldwide spread *Arachnula impatiens* Cienk., however it is unambiguously different. It could belong to the Phylum Cercozoa.
- On the basis of perforated conidia of *Cochliobolus sativus* , morphological characteristics and the behaviour during maintenance, it was proved that the VA is, like other species of mycophagous amoebae, widespread in agricultural fields. It was also isolated from a field in Iran.

- The predominant number of isolates yielded the same reaction product as the original VA in the PCR with the two DNA - probes. Accordingly, it must be the same species or at least a closely related one.
- Agricultural areas with different cropping systems show different densities of the VA. In the comparison of 4 - 5 areas respectively of the systems direct sowing - ploughing and arable land - forage as well as ecological agriculture, the population of the VA was higher in the areas without tillage (direct sowing, forage) than in the corresponding variants with soil treatment. Ecological farming promotes the development of the VA as compared with conventional cropping systems.

Based on the results of prey spectrum, life history, identification with DNA - probes, geographic distribution and the influence of different cropping systems, a previously unknown vampire amoeba was characterised. Lacking 18S rRNA sequencing of closely related organisms, the taxonomic position of the VA remains uncertain.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ALABOUVETTE, C., LEMAITRE, J. & M. PUSSARD (1981): Densité de population de l'amibe mycophage *Thecamoeba granifera* s. sp. minor (Amoebida, Protozoa). Mesure et variations expérimentales dans le sol. Rev. Ecol. Biol. Sol. **18**, 179 -192.
- AMANN, R. I. , LUDWIG, W. & K-H. SCHLEIFER (1995): Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiol. Rev. **59**, 143 - 169.
- ANDERSON, T.R. & Z.A. PATRICK (1978): Mycophagous Amoeboid Organisms from Soil that Perforate Spores of *Thielaviopsis basicola* and *Cochliobolus sativus*. Phytopathology **68**, 1618 - 1626.
- BISCHOFF, P. J. (2002): An Analysis of the Abundance, Diversity and Patchiness of Terrestrial Gymnamoebae in Relation to Soil Depth and Precipitation Events Following a Drought in Southeastern U.S.A. Acta Protozool. **41**, 183 - 189.
- BRELAND, T. A & R. ELTUN (1999): Soil microbial biomass and mineralization of carbon and nitrogen in ecological, integrated and conventional forage and arable cropping systems. Biol. Fertil. Soils **30**, 193 - 201.
- CAVALIER-SMITH, T. (1998): A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. Cam. Phil. Soc. **73**, 203 - 266.
- CHAKRABORTY, S., OLD, K.M. & J. H. WARCUP (1983): Amoebae from a Take-all Suppressive Soil which feed on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and other Soil Fungi. Soil Biol. Biochem. **15**, 17 -24.
- CHAKRABORTY, S. & J. H WARCUP (1983): Soil Amoebae and Saprophytic Survival of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in a Suppressive Pasture Soil. Soil Biol. Biochem. **15**, 181 - 185.
- CIENKOWSKI, L. (1876): Über einige Rhizopoden und verwandte Organismen. Archiv mikr. Anatomie **12**, 15 - 50.
- COOK, R.J.& K.F. BAKER (1983): The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota

- CORLISS, J. O.(1994): An interim utilitarian ('user - friendly') hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool.* **33**, 1 -51.
- CORLISS, J. O. (2002): Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an Overview of Their Significant Roles in Maintenance of Our Biosphere. *Acta Protozool.* **41**, 199 - 219.
- COWLING, A. J. (1994): Protozoan Distribution and Adaption In: DARBYSHIRE, J. F. (ed.): *Soil Protozoa*, 5 - 42, CAB International, Wallingford.
- DOBELL, C. (1913): Observations on the life - history of Cienkowsky's 'Arachnula'. *Archiv f. Protistenkunde* **31**, 317 - 353.
- EKELUND, F., WESTERGAARD, K. & D. SOE (2000): The toxicity of the fungicide propiconazol to soil flagellates. *Biol. Fertil Soils* **31**, 70 - 77.
- FINLAY, B. J., BLACK, H.I.J., BROWN, S., CLARKE, K.J., ESTEBAN, G. F., HINDLE, R. M., OLMO, J. L., ROLLETT, A. & K. VICKERMAN (2000): Estimating the Growth Potential of the Soil Protozoan Community. *Protist.* **151**, 69 - 80.
- FOISSNER, W. (1987a): Ökologische Bedeutung und bioindikatives Potential der Bodenprotozoen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie (Giessen 1986)* **16**, 45 -52.
- FOISSNER, W. et al. (1987b): Untersuchungen über das Bodenleben in ökologisch und konventionell bewirtschafteten Acker - und Grünlandböden im Raum Salzburg. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie (Giessen 1985)* **15**, 333 - 339.
- FOISSNER, W. (1992): Comparative studies on the soil life in ecofarmed and conventionally farmed fields and grassland of Austria. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **40**, 207 - 218.
- FOISSNER, W. (1994): Soil Protozoa as Bioindicators in Ecosystems under Human Influence. In: *Soil Protozoa* DARBYSHIRE, J.F. CAB INT. , 147 - 194.
- GRIFFITHS, B. S. (1994): Soil Nutrient Flow In: DARBYSHIRE, J.F. (ed): *Soil Protozoa*, 65 -92. CAB International, Wallingford.
- HEAL, O. W. (1963): Soil fungi as food for amoebae. In: J. DOEKSEN, & J. van de DRIFT (ed): *Soil Organisms*, 289 - 297.

- HOMMA, Y., SITTON, J.W., COOK, R.J. & K.M. OLD (1979): Perforations and Destruction of Pigmented Hyphae of *Gaeumannomyces graminis* by Vampyrellid Amoebae from Pacific Northwest Wheat Field Soils. *Phytopathology* **69**, 1118 - 1122.
- HOMMA, Y. & M. ISHII (1984): Perforations of Hyphae and Sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn by Mycophagous Soil Amoebae. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **50**, 229 -240.
- KÖHLER, W., SCHACHTEL, G. & P. VOLESKE (1995): *Biostatistik: Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler*. Springer 2.Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- MÖLLER, E.M., BAHNWEG, G., SANDERMANN, H. & H.H. GEIGER (1992): A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**, 6115 - 6116.
- NEWTON, C. R. & A.GRAHAM (1994): *PCR Spektrum*, Heidelberg, Berlin, Oxford
- OLD, K. M. & Z. A. PATRICK (1976): Perforations and lysis of spores of *Cochliobolus sativus* and *Thielaviopsis basicola* in natural soils. *Can. J. Bot.* **54**, 2798 -2809.
- OLD, K. M (1977): Notes and Brief Articles. Giant Soil Amoebae cause Perforation of Conidia of *Cochliobolus sativus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **68**, 272 - 320.
- OLD, K. M (1978): Soil Fungi as Food for Giant Amoebae. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 93 - 100.
- OLD, K. M. & J. F. DARBYSHIRE (1980): *Arachnula impatiens* CIENK. A Mycophagous Giant Amoeba from Soil. *Protistologica* **16**, 277 -287.
- OLD, K. M. & J. M. OROZ (1980): Mycophagous amoebae in Australian Forest Soils. *Soil Biol. Biochem.* **12**, 169 - 175.
- PAGE, F.C. (1987): The Classification of 'Naked' Amoebae (Phylum Rhizopoda). *Archiv f. Protistenkunde* **133**, 199 - 217.
- PAGE, F. C. & F. J. SIEMENSMA (1991): *Protozoenfauna 2: Nackte Rhizopoda und Heliozoa* Gustav Fischer, Stuttgart

- PAKZAD, U. & E. SCHLÖSSER (1998a): Isolation and maintenance of a vampire amoeba from a Hessian field with wheat monoculture. *Z. Pflanzenkrankheit u. Pflanzenschutz* **105**, 95 -99.
- PAKZAD, U. & E. SCHLÖSSER (1998b): Effect of pesticides on a vampire amoeba. *Z. Pflanzenkrankheit u. Pflanzenschutz* **105**, 100 - 103.
- PAKZAD, U. & E. SCHLÖSSER (1998c): The Nutritional Basis of a Myxophagous Vampire Amoeba. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. **63**, 983 - 985.
- PATTERSON, D. J. (1999a): The Lineages of Eukaryotes. Tree of Life Web Project, Internet: [www. Tree of Life](http://www.TreeofLife)
- PATTERSON, D. J. (1999b): The Diversity of Eukaryotes. *Am. Nat.* **154**, 96 - 124.
- RÖPSTORF, P. (1992): Karyologie der Vampyrellidae Zopf 1885 (Filosea, Rhizopoda). Dissertation FU Berlin
- SCHLEGEL, M. (1991): Protist Evolution and Phylogeny as Discerned from Small Subunit Ribosomal RNA Sequence Comparisons. *Europ. J. Protistol.* **27**, 207 - 219.
- SCHLEGEL, M. (1994): Molekular phylogeny of Eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 330 - 335.
- SCHLÖSSER, E. (1997): *Allgemeine Phytopathologie*, 2. neubearbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart, New York
- WYLEZICH, C., MEISTERFELD, R., MEISTERFELD, S. & M. SCHLEGEL (2002): Phylogenetic Analyses of Small Subunit Ribosomal RNA Coding Regions Reveal a Monophyletic Lineage of Euglyphid Testate Amoebae (Order Euglyphida). *J.Eukaryot. Microbiol.* **49**(2), 108 - 118.
- WYLEZICH, C. (2003): *Amöben - Einzeller mit rätselhafter Stammesgeschichte*. Dissertation Uni - Leipzig

8 ANHANG

Verteilung der VA innerhalb der Probenentnahmeflächen mit den Nummern 20 bis 248. Die Unterschiede der Populationsdichte wird in Graustufen angegeben:

0	wenige	> 25%	> 50%
---	--------	-------	-------

20	21	22
25	24	23
28	27	26

Friedeshausen, Demeterbetrieb

38	37	36
35	34	33
30	31	32

Birkenhof, Demeterbetrieb

48	47	46
45	44	43
40	41	42

Birkenhof, Grünland

58	57	56
55	54	53
50	51	52

Gladbacher Hof, Demeterbetrieb

68	67	66
65	64	63
60	61	62

Dottenfelder Hof, Demeterbetrieb

78	77	76
75	74	73
70	71	72

Hasselbach, Direktsaat

88	87	86
85	84	83
80	81	82

Hasselbach, Pflug

98	97	96
95	94	93
90	91	92

Giessen, Direktsaat

108	107	106
105	104	103
100	101	102

Giessen, Pflug

118	117	116
115	114	113
110	111	112

Werndorf, Direktsaat

128	127	126
125	124	123
120	121	122

Werndorf, Pflug

138	137	136
135	134	133
130	131	132

Ossenheim, Pflug

148	147	146
145	144	143
140	141	142

Ossenheim, Direktsaat

158	157	156
155	154	153
150	151	152

Hanau, Direktsaat

168	167	166
165	164	163
160	161	162

Hanau, Pflug

176	177	178
175	174	173
170	171	172

Reiskirchen, Grünland

186	187	188
185	184	183
180	181	182

Reiskirchen, Acker

196	197	198
195	194	193
190	191	192

Rechtenbach, Grünland

206	207	208
205	204	203
200	201	202

Dutenhofen, Acker

216	217	218
215	214	213
210	211	212

Dutenhofen, Grünland

226	227	228
225	224	223
220	221	222

Rechtenbach, Acker

236	237	238
235	234	233
230	231	232

Ehringshausen, Acker

246	247	248
245	244	243
240	241	242

Ehringshausen, Grünland

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus Liebig Universität Giessen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Schlösser angefertigt. Hiermit danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen dieses Instituts für die stets gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Schlösser für die Überlassung des Themas, sein unermüdliches Interesse und seine hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Versuche und der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. - H. Kogel für die Erlaubnis die molekularbiologischen Untersuchungen im dortigen Labor durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. T. Basedow für die zur Verfügungsstellung eines Arbeitsplatzes am Umkehrmikroskop.

Herrn Prof. Dr. M. Schlegel und Frau Dr. C. Whylezich für die Sequenzierungen und die Herstellung der Sonden.

Herrn Dr. G. Langen und Frau Martina Claar für die Hilfestellung während der molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Dr. O. Heller für die Zeitrafferaufnahmen und die Bewegungsstudien.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau S. Habermehl für die effektive Hilfestellung in Sachen EDV und Frau E. Stein für die Betreuung im phytopathologischen Labor.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schl. 90/34 - 1 und 34 - 2) unterstützt, wofür ich mich bedanke.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof Dr. U. Bertold gedenken, der die EM - Untersuchungen im Fachbereich Biologie an der Universität Siegen betreute und dessen Tod leider dazu führte, dass ich meine Arbeiten dort nicht fortsetzen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem lieben Mann und meinen Kindern, die mir während der Fertigstellung der Arbeit viel Verständnis entgegen gebracht haben.

