



Dissertation

Pflanzenverfügbares organisch gebundenes Phosphat in Abhängigkeit von Pflanzenart und Bodeneigenschaften



Aus dem Institut für Pflanzenernährung
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. Sven Schubert

Pflanzenverfügbares organisch gebundenes Phosphat in Abhängigkeit von Pflanzenart und Bodeneigenschaften

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften im
Fachbereich 09
Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vorgelegt von
Alexandra S. Wening
Erlangen/Bayern

2016

Tag der Disputation: 30.11.2016
Bestätigt durch die Prüfungskommission
Vorsitzender: Prof. Dr. Joachim Aurbacher
1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Schubert
2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Leithold
Prüfer: Prof. Dr. Bernd Honermeier
Prüfer: Prof. Dr. Jan Siemens

Meinen Eltern Evelyn und Manfred Wening

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
2	Material & Methoden	20
2.1	Bodeninkubation I - Einfluss von Bodentyp und Glucosegabe auf die Mineralisation von P_{org}	20
2.2	Bodeninkubation II - Einfluss des Boden-pH-Wertes auf die Mineralisation von P_{org}	22
2.3	Pflanzenanzucht I - Einfluss der Pflanzenart auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen am Beispiel der Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i> cv. Belana)	24
2.4	Pflanzenanzucht II - Einfluss eines Oberbodens auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen von Raps und Kartoffel	26
2.5	Pflanzenanzucht III: Aktivitätsmessung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> von Raps und Kartoffel	28
2.6	Pflanzenanzucht IV: Biochemische Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase <i>in vitro</i> von Raps und Kartoffel	33
2.7	Pflanzenanalysen	38
2.8	Bodenanalysen	39
2.9	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Bodeninkubation I - Einfluss von Bodentyp und Glucosegabe	44
3.2	Bodeninkubation II - Einfluss des Boden-pH-Wertes	50
3.3	Pflanzenanzucht I - Einfluss der Pflanzenart auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen am Beispiel der Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i> cv. Belana)	53

3.4	Pflanzenanzucht II - Einfluss eines Oberbodens auf die P-Anreicherung aus P_{org} -Verbindungen von Raps und Kartoffel	58
3.5	Pflanzenanzucht III: Aktivitätsmessung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> von Raps und Kartoffel	64
3.6	Pflanzenanzucht IV: Biochemische Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase <i>in vitro</i> von Raps und Kartoffel	69
4	Diskussion	78
4.1	Einfluss verschiedener Faktoren des Bodens auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat	78
4.2	Einfluss verschiedener Faktoren der Pflanze auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat	85
4.3	Einfluss der kombinierten Faktoren des Bodens und der Pflanze auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat . . .	90
5	Zusammenfassung	95
6	Summary	97
7	Anhang	99
8	Literatur	101
9	Danksagung	109
10	Eidesstattliche Erklärung	110

Abbildungsverzeichnis

1.1	Verschiedene Modelle von unterschiedlichen Autoren zu globalen P-Verarmungsszenarien, denen unterschiedliche Schätzungen zu Grunde liegen (Cordell <i>et al.</i> 2014).	11
1.2	Drei Modelle (A) Peak P-Produktion (B) Abbauszenario basierend auf einem durchschnittlich jährlichen Konsum (C) Abbauszenario basierend auf einer Schätzung eines generell steigenden Durchschnittskonsums. In allen drei Fällen ist die Fläche unter der Kurve gleich den verbleibenden Reserven.(Cordell <i>et al.</i> 2011)	12
1.3	Phosphatfraktionen im Boden, modifiziert nach Steffens und Schubert (2016)	13
1.4	Konzeptionelles Modell des Umsatzes von P_{org} modifiziert nach Condron <i>et al.</i> 2005	15
1.5	Reaktionsmechanismen der Weißblupine auf P-Mangel aus Zimmermann 2003.	17
2.1	Anzucht und Vorbereitung der Kartoffeln für den Wasserkulturversuch	28
2.2	Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat durch die Phosphatase, modifiziert nach http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/enzymeassay.html , 04.09.2016	30
2.3	Rapspflanzen am Tag der Ernte nach einer Woche im P-Mangel (1 μM)	32
2.4	Falcontube mit Zellwandsuspension während der Enzymreaktion	35
2.5	Comair Root Length Scanner	38
2.6	CAL-Extraktion	40
3.1	Einfluss fünf verschiedener Bodentypen (Luvisol Unterboden (a); Podsol (b); Luvisol Oberboden (c); Fluvisol (d) und Ferrasol (e)) und einmaliger Glucosegabe (10 mg (kg Boden) ⁻¹) auf die Mineralisation (CAL-extrahierbares P) von Na-Hexaphytat (100 mg P (kg Boden) ⁻¹), $Ca(H_2PO_4)_2$ (100 mg P (kg Boden) ⁻¹) und Kontrolle im Verlauf von 140 Tagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier Wiederholungen dar. Statistische Auswertung siehe Tab. 3.1	45

3.2	Einfluss fünf verschiedener Bodentypen (Luvisol Unterboden (a); Podsol (b); Luvisol Oberboden (c); Fluvisol (d) und Ferrasol (e)) und einer einmaligen (an Tag 71) Glucosegabe ($10 \text{ mg (kg Boden)}^{-1}$) auf die relative Mineralisation. CAL-extrahierbares P der $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante (ohne Glucosegabe) nach Abzug der entsprechenden Kontrollvariante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier Wiederholungen dar. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA + Tukey HSD 5%. Buchstaben sind jeweils nur pro Tag und pro Bodentyp vergleichbar.	49
3.3	Phosphat-Fraktionierung nach Kurmies der einzelnen Versuchsausgangsböden. Die Prozentangabe ist der Anteil an P_{org} am Gesamt-Phosphat. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus zwei chemischen Wiederholungen dar.	50
3.4	Einfluss des Boden-pH-Wertes fünf verschiedener Bodentypen und zwei verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Mineralisation von Na-Phytat. CAL-extrahierbarer P der Na-Phytat-Variante nach Abzug der entsprechenden Kontrollvariante in $\text{mg P (kg Boden)}^{-1}$ nach 140 Tagen Inkubationszeit. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: 3-fakt. ANOVA + Tukey-HSD 5%.	52
3.5	Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf das Wachstum von Kartoffel cv. Belana	53
3.6	Phosphat-Fraktionierung nach Kurmies des Luvisol Unterbodens an Tag 2 mit unterschiedlichen P-Düngevarianten zur Wiederfindung der P-Düngegaben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus sechs biologischen Wiederholungen mit je zweifacher chemischer Wiederholung dar.	54
3.7	Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf die Frischmasse der Kartoffelpflanze (<i>Solanum tuberosum</i>) cv. Belana. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier (Kontrolle) bzw. sechs (Na-Phytat und $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$) Wiederholungen dar. Statistik: Jeweils (Spross bzw. Gesamtfrischmasse) einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.	56
3.8	Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf die P-Konzentration der Kartoffelpflanze (<i>Solanum tuberosum</i>) cv. Belana. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier (Kontrolle) bzw. sechs (Na-Phytat und $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$) Wiederholungen dar. Ausnahme: Neue Knollen: $n = 2$ (Kontrolle); $n = 4$ (Na-Phytat); $n = 6$ ($\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$). Statistik: Je Pflanzenteil einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.	57
3.9	Relative P-Aneignungseffizienz verschiedener Kulturarten für Na-Phytat. P-Aufnahme der $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei bzw. sechs (Kartoffel) Wiederholungen dar. Grafik modifiziert nach Steffens et al. (2010).	58

3.10 Einfluss von drei P-Düngevarianten (von links nach rechts: Kontrolle, Ca- (H ₂ PO ₄) ₂ , Na-Phytat) auf den Frischmasseertrag von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. a) <i>Solanum tuberosum</i> cv. Belana; b) <i>Solanum tu- berosum</i> cv. Marabel; c) <i>Brassica napus</i> cv. Carousel	59
3.11 Einfluss von drei P-Düngevarianten auf den Frischmasseertrag von Kul- turpflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittel- wert ± Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Zweifakto- rielle ANOVA über Gesamtfrischmasse + Tukey-HSD 5%.	60
3.12 Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die P-Konzentration von Kultur- pflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA über Gesamtkonzentration + Tukey-HSD 5%.	60
3.13 Relative P-Aneignungseffizienz der drei Genotypen für Na-Phytat. P-An- eignung der Ca(H ₂ PO ₄) ₂ -Variante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Ein- faktorielle ANOVA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.	61
3.14 Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die Wurzellänge von Kulturpflan- zen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANO- VA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.	62
3.15 Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die Wurzelfeinheit von Kultur- pflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.	63
3.16 Einfluss verschiedener Substratkonzentrationsstufen auf die Enzymakti- vität der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vivo</i> . Dargestellt ist jeder Da- tenpunkt als Mittelwert ± Standardfehler aus drei biologischen Wieder- holungen und die dazugehörige Regressionsanalyse („Modell“). Statistik: Einfaktorielle ANOVA (der Datenpunkte) + Tukey-HSD 5% je Konzentra- tionsstufe (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten). Buchstaben nur in- nerhalb einer Konzentrationsstufe vergleichbar. Signifikanzen der unteren Konzentrationsstufen siehe Anhang Tab. 7.1.	64
3.17 Scatchard (reverser Eadie-Hofstee)-Plot der Sauren Phosphatase (ge- samt) <i>in vivo</i> . Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler (senkrecht wie waagrecht) aus drei biologischen Wiederholungen dar. Die schwarze Gerade beschreibt einen hypothetischen Michealis-Menten- Verlauf der Datenpunkte.	66

3.18	$V_{\max}$ -Werte der Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> bei Kartoffel cvs. Belana und Marabel sowie Raps cv. Carousel (links) und $V_{\max}$ -Werte der Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> bei Kartoffel (gepoolt aus cvs. Belana und Marabel) sowie Raps (cv. Carousel) (rechts). Berechnet mit OriginPro unter der Annahme der Hill-Gleichung. Die Anpassung (Fit) ist für Marabel fehlgeschlagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Belana und Carousel signifikant verschieden. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Kartoffel und Raps nicht signifikant verschieden.	67
3.19	K_h -Werte der Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> bei Kartoffel cvs. Belana und Marabel sowie Raps cv. Carousel (links) und K_h -Werte der Sauren Phosphatase <i>in vivo</i> bei Kartoffel (gepoolt aus cvs. Belana und Marabel) sowie Raps (cv. Carousel) (rechts). Berechnet mit OriginPro unter der Annahme der Hill-Kinetik. Die Anpassung (Fit) für Marabel ist fehlgeschlagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Belana und Carousel nicht signifikant verschieden. Zweiseitiger t-Test zwischen Kartoffel und Raps nicht signifikant verschieden.	68
3.20	Aktivierungsenergie der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).	70
3.21	Einfluss verschiedener Assay-pH-Werte auf die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Substratkonzentration = 10 mM. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Die Funktionen wurden mit Hilfe polynomischer Trendlinien durch Excel berechnet.	71
3.22	pH-Optimum (berechnet aus dem Maximum der polynomischen Trendlinien) der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).	71

3.23	Einfluss verschiedener Substratkonzentrationsstufen auf die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% je Konzentrationsstufe. Buchstaben nur innerhalb einer Konzentrationsstufe vergleichbar. Signifikanzen der unteren Konzentrationsstufen siehe Anhang Tab. 7.2.)	72
3.24	Scatchard(reverser Eadie-Hofstee)-Plot der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler (senkrecht wie waagrecht) aus vier biologischen Wiederholungen dar. Die schwarze Gerade beschreibt einen hypothetischen Michaelis-Menten-Verlauf der Datenpunkte.	73
3.25	$V_{\max}$ der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel (ungepoolt und gepoolt). Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (linke Seite) bzw. zweiseitiger T-Test 5% (rechte Seite).	75
3.26	K_h der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel (ungepoolt und gepoolt). Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).	76
3.27	Der Hill-Koeffizient h der Sauren Phosphatase (gesamt) <i>in vitro</i> bei <i>Solanum tuberosum</i> cvs. Belana und Marabel sowie <i>Brassica napus</i> cv. Carousel. Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.	77

Tabellenverzeichnis

1.1 Übersicht der P_{org} -Verbindungen nach (Condron <i>et al.</i> 2005). (Abbildungen nach Überprüfung aus wikimedia.org und chemistry.about.com) . . .	14
2.1 Physikochemische Bodeneigenschaften im Bodeninkubationsversuch I; (ergänzte Institutsunterlagen)	21
2.2 Nährstoffgaben im Bodeninkubationsversuch I	21
2.3 Physikochemische Bodeneigenschaften im Bodeninkubationsversuch II	23
2.4 Applikation von $CaCO_3$ zu den Versuchsböden zur Einstellung auf pH 7,2	23
2.5 Nährlösungszusammensetzung im Wasserkulturversuch	29
2.6 Assaypuffer	37
3.1 Statistische Auswertung zu Abb. 3.1. Buchstaben nur pro Tag und pro Bodentyp vergleichbar.	47
3.2 Vergleich der korrigierten R^2 -Anpassung von Michaelis-Menten-Kinetik und der Hill-Gleichung	74
7.1 Einfaktorielle ANOVA + Tukey HSD je Konzentrationsstufe. Signifikanzen für Abb.3.16	99
7.2 Einfaktorielle ANOVA + Tukey HSD je Konzentrationsstufe. Signifikanzen für Abb. 3.23	100

1 Einleitung

Phosphor (P) ist essenziell für alle Lebewesen, und somit auch ein wichtiger Bestandteil der Pflanzenernährung (Blume *et al.* 2010). P ist an vielen physiologischen und biochemischen Prozessen beteiligt (Energiemetabolismus, Aktivierung und Regulierung von Enzymen) und Bestandteil wichtiger Verbindungen (z. B. Nukleinsäuren, Phospholipide) (Hawkesford *et al.* 2012). Daher ist es unbedingt notwendig Pflanzen mit ausreichend P zu versorgen.

Die landwirtschaftlich genutzten Flächen in Deutschland zeigen in Bezug auf ihren P-Versorgungszustand ein heterogenes Bild. Auf der einen Seite sind viele Flächen in Deutschland durch kosteneinsparenden Mindereinsatz von Mineraldüngern und Abbau der Viehbestände unterversorgt (Bundesarbeitskreis Düngung 2010). Auf der anderen Seite zeigt die Gesamt-P-Bilanz 2007, trotz rückläufiger Überschüsse, einen kumulierten Überschuss von 15,2 Mio. t P (Frede *et al.* 2011). Auf solchen überversorgten Flächen kann durch eine erhöhte P-Gabe keine Ertragssteigerung erzielt werden, sondern das Risiko einer Eutrophierung nahegelegener Gewässer wird dadurch gesteigert (Blume *et al.* 2010). 41% der deutschen Ackerflächen sind in Versorgungsstufe D und E einzuordnen und damit überversorgt, 38% finden sich in der Optimalversorgung C wieder, die eine Erhaltungsdüngung empfiehlt und 21% liegen dagegen in Stufe A und B, in denen ein Zuschlag zur Erhaltungsdüngung empfohlen wird (Blume *et al.* 2010). Da P als Ressource endlich und durch kein anderes Element ersetzbar ist (Hawkesford *et al.* 2012), gewinnt das Problem einer Überversorgung weiter an Brisanz.

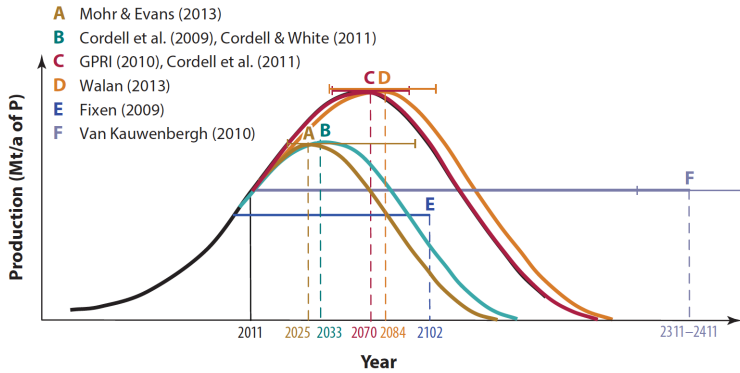


Abbildung 1.1: Verschiedene Modelle von unterschiedlichen Autoren zu globalen P-Verarmungsszenarien, denen unterschiedliche Schätzungen zu Grunde liegen (Cordell *et al.* 2014).

Die P-Vorkommen werden in Abhängigkeit von der Qualität des Abbauproduktes, von der Investition in Abbaupläne und von der Höhe des Verbrauches in 60 bis 130 Jahren (Werner 1999) erschöpft sein. Andere Studien nennen Zeiträume für das geschätzte Ende der P-Vorräte zwischen den Jahren 2025 und 2311-2411, wobei der Großteil der Schätzungen in den Jahren um ca. 2070 liegt (Cordell *et al.* 2014; Cordell *et al.* 2011) (Abb. 1.1). In der Abb. 1.2 wird der Verlauf der P-Produktion aus verschiedenen Szenarien dargestellt. Die Fläche unter der jeweiligen Kurve und damit die Menge der verbleibenden P-Vorräte ist in allen drei Fällen die gleiche. An diesen drei Varianten lässt sich erkennen, wie schwierig es ist, den tatsächlichen Verlauf vorausszusagen, da viele Faktoren hier eine Rolle spielen.

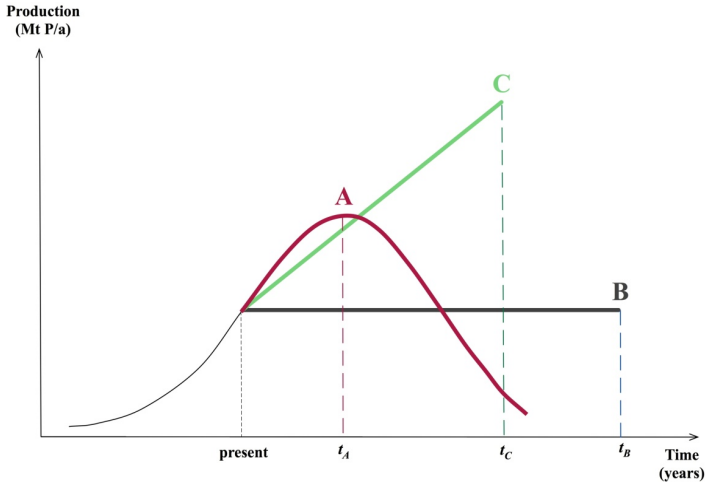


Abbildung 1.2: Drei Modelle (A) Peak P-Produktion (B) Abbauszenario basierend auf einem durchschnittlich jährlichen Konsum (C) Abbauszenario basierend auf einer Schätzung eines generell steigenden Durchschnittskonsums. In allen drei Fällen ist die Fläche unter der Kurve gleich den verbleibenden Reserven. (Cordell *et al.* 2011)

Jedoch haben all diese Schätzungen die gleiche Grundaussage: die Vorräte werden früher oder später erschöpft sein. Deshalb sollte der Einsatz von P bewusster und effizienter werden, neue Recycling-Quellen sollten erschlossen und vorhandene P-Bestände in Ackerböden besser genutzt werden. Der letzte Punkt - die Ausnutzung der bestehenden P-Bestände - bietet den Ausgangspunkt dieser Arbeit.

P liegt im Boden in verschiedenen Phosphat-Fractionen vor: adsorbiertes Phosphat, okkludiertes Phosphat, Calciumphosphat und organisch gebundenes Phosphat (P_{org}) sowie das in der Bodenlösung gelöste Phosphat (Abb. 1.3). Ca. 0,1% des Gesamt-P im Boden liegt in der Bodenlösung vor, aus der P in Form von Phosphat aufgenommen wird.

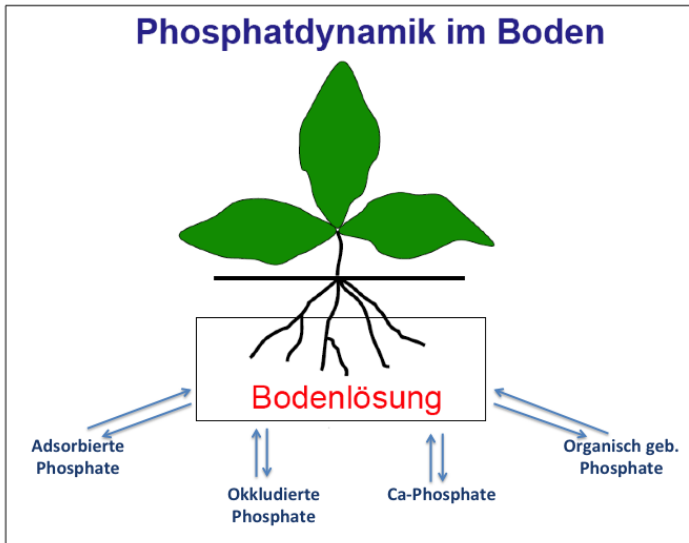
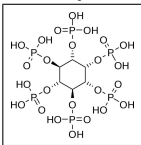
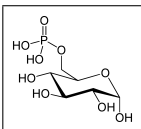
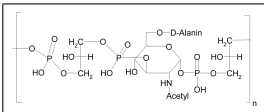
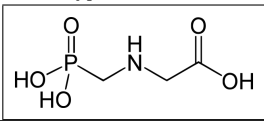
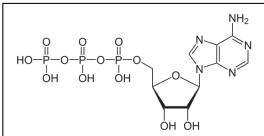


Abbildung 1.3: Phosphatfraktionen im Boden, modifiziert nach Steffens und Schubert (2016)

Die Gesamt-P-Konzentration im Boden schwankt stark zwischen $< 100 - 3000 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ (Condron *et al.* 2005; Sims 2005). Aus Pinguinkot entstandene Permafrostböden erreichen bis zu $10 \text{ g P (kg Boden)}^{-1}$, während über mehrere Jahrzehnte intensiv bewirtschaftete und gedüngte landwirtschaftliche Flächen bis über $2 \text{ g P (kg Boden)}^{-1}$ erreichen (Blume *et al.* 2010). Einen relativ großen Prozentsatz davon (25 - 65%) kann P_{org} in landwirtschaftlich genutzten Oberböden einnehmen (Werner 1999). Der Anteil nimmt im Bodenprofil zusammen mit dem Humusgehalt ab (Blume *et al.* 2010). Es werden verschiedenste Verbindungen in die Fraktion der P_{org} -Verbindungen eingeordnet (Tab. 1.1). Am stärksten vertreten sind die Monoester und hierbei vor allem das Phytat (= Inositol-Hexaphosphat). Die Konzentrationen dieser Verbindung werden bei Turner *et al.* (2002) in einer Übersicht verschiedenster Studien gezeigt und variieren je nach Boden von $0,3$ bis $987 \text{ } \mu\text{g Inositolphosphat (g Boden)}^{-1}$, was Konzentrationen von $2,2$ bis 67% des jeweils gesamten P_{org} entspricht. In einer australischen Studie von Williams und Anderson (1968)

wurde ein durchschnittlicher Wert von 16% des Boden-P_{org} angegeben.

Tabelle 1.1: Übersicht der P_{org}-Verbindungen nach (Condron *et al.* 2005).
(Abbildungen nach Überprüfung aus wikimedia.org und chemistry.about.com)

Orthophosphat-monoester	Inositolphosphate	z. B. <i>myo</i> -Inositol-Hexaphosphat
	Mononukleotide	bzw. Phytat 
	Phosphoproteine	z. B. Adenosinmonophosphat
Orthophosphat-diester	Zuckerphosphate	z. B. Casein
		z. B. Glucose-6-Phosphat 
	Nukleinsäuren	z. B. DNA
Phosphonate	Phospholipide	z. B. Phosphatidylcholin bzw. Lecithin
	Teichonsäuren	z. B. Lipoteichonsäuren 
		z. B. Glyphosat 
Orthophosphat-Anhydride		z. B. ATP 
Aromatische Verbindungen	Aromatische Dyes	bisher keine spezifischen Strukturen indentifiziert

Der Boden, ein Gefüge aus Mineralen, organischer Substanz, Bodenlösung und -luft sowie den Bodenorganismen (Blume *et al.* 2010), ist ein komplexes System in dem P_{org} vorkommt. All diese Formen unterliegen laut Yan *et al.* (2014) und Arai *et al.* (2007) physikochemischen Prozessen wie Sorption/Desorption und Ausfällung/Lösung, aber auch biologischen Abläufen wie mikrobieller Immobilisierung, Remineralisation von immobilisiertem Phosphat und der Mineralisation von nicht-lebendem P_{org} (Oehl *et al.* 2001) (Abb. 1.4).

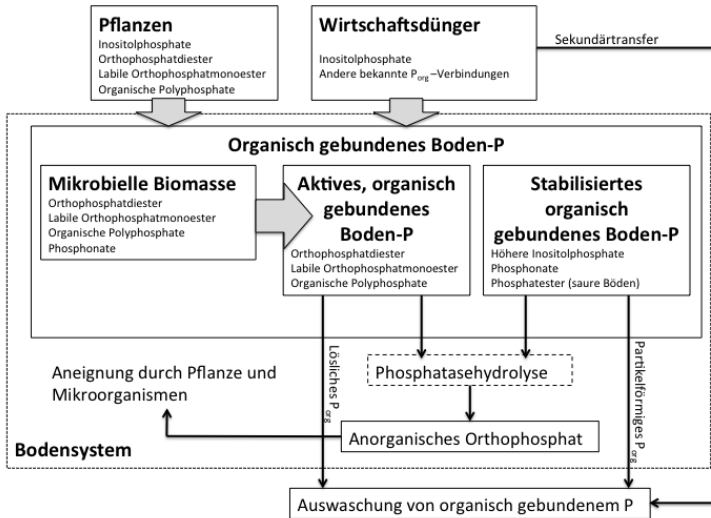


Abbildung 1.4: Konzeptionelles Modell des Umsatzes von P_{org} modifiziert nach Condron *et al.* 2005

Faktoren, die die Pflanzenverfügbarkeit von P_{org} beeinflussen, sind seit langer Zeit Bestandteil der Forschung (Helal *et al.* 1991). Zum einen ist die „Black-box“ Boden von großem Interesse mit ihren physiko- und biochemischen Prozessen. Gerade die Einflüsse verschiedener Mikroorganismen auf die P-Verfügbarkeit im Boden selbst, aber auch in Zusammenhang mit der Pflanze wie Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) und Mykorrhiza sind zu diskutieren. Zum anderen darf der Einfluss der Pflanzen nicht außer Acht gelassen werden, da viele Kulturpflanzen P_{org} als P-Quelle nutzen können (Nuruzza-

man *et al.* 2006; Leppin 2007).

Um P_{org} für Pflanzen verfügbar zu machen, muss dieses zu Orthophosphat hydrolisiert werden. Eine Möglichkeit besteht durch die mikrobielle Umsetzung im Boden. Diese ist gekennzeichnet durch die Unabhängigkeit der angebauten Kultur und sollte in der für die Mikroorganismen optimalen Umgebung ohne weiteres ablaufen können. Durch Faktoren, die auf die Mikroorganismenumgebung einwirken, sollte auch die Umsetzung beeinflussbar sein. Da die Rhizosphäre jedoch durch die jeweilige Pflanze beeinflusst wird, kann ein Einfluss durch die verschiedenen Pflanzen nicht ausgeschlossen werden. In tieferen Bodenschichten sollte es nicht mehr zu einer Umsetzung von P_{org} in Orthophosphat kommen, da in tieferen Bodenschichten die mikrobielle Aktivität stark in Abhängigkeit von Nahrungsangebot, Temperatur und Bodenfeuchte abnimmt (Blume *et al.* 2010). Daraus wird folgende Hypothese abgeleitet:

Hypothese 1: Bodeneigenschaften, wie z. B. die biologische Aktivität, beeinflussen die Pflanzenverfügbarkeit des P_{org} in hohem Maße. Böden mit verschiedenen Eigenschaften beeinflussen die Umsetzung und Aneignung von P_{org} signifikant unterschiedlich.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Umsetzung von P_{org} in Orthophosphat durch die Pflanze selbst erfolgt. Die Fraktion des P_{org} kann von verschiedenen Kulturpflanzen genutzt werden, ist jedoch nicht mit den gewöhnlichen Standardbodenuntersuchungsmethoden erfassbar (Leppin 2007; Steffens *et al.* 2010). Dadurch können P-Vorräte auf dem Feld unterschätzt und die P-Verschwendung gefördert werden. Kulturen, die P_{org} nutzen können, müssten nicht unbedingt mit P-haltigen Mineraldüngern zusätzlich versorgt werden.

Hier können ebenfalls verschiedene Faktoren Einfluss auf den Prozess der Aneignung nehmen. Ein spezielles, gut erforschtes Beispiel ist die Weißblupine, die in den Proteoidwurzeln verschiedene Mechanismen besitzt, um sich Phosphat schnell und effizient aneignen zu können (Dinkelaker *et al.* (1989), (1995), Gerke *et al.* (1994), Miller *et al.* (2001), Neumann *et al.* (1999), (2000), Yan *et al.* (2002)). Abb. 1.5 stellt eine Übersicht dieser Mechanismen von Zimmermann (2003) dar.

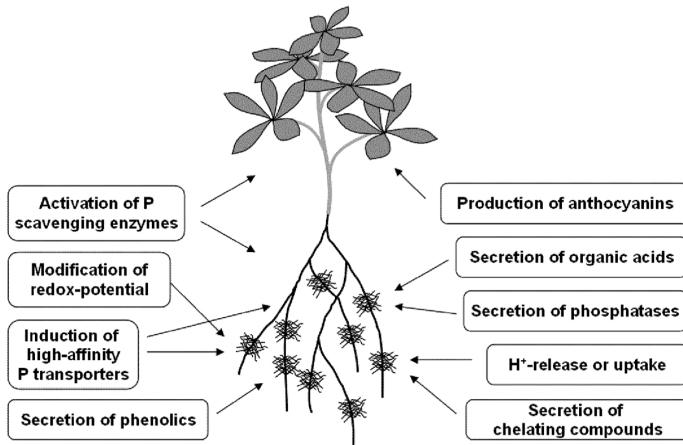


Abbildung 1.5: Reaktionsmechanismen der Weißlupine auf P-Mangel aus Zimmermann 2003.

Einer dieser Mechanismen, nicht nur bei der Weißlupine, sondern allgemein bei Pflanzen, um P_{org} zu mobilisieren, ist die Saure Phosphatase. Dieses Enzym gehört in die Gruppe der Phosphatasen und hydrolysiert Phosphorsäureester (Vincent *et al.* 1992). Wie ihr Name schon andeutet liegt der optimale pH-Wert unter 7 (Schinner *et al.* 1996). Diese Enzyme übernehmen verschiedene Aufgaben in der Pflanze: von der Mobilisierung des Phytats im Samenkorn durch die Phytase (spezielle Form der Sauren Phosphatasen) (Brinch-Pedersen *et al.* 2000), über Mobilisierung von Phosphat innerhalb der Pflanze (Duff *et al.* 1991) bis zur Mobilisierung von Phosphat im Boden (Duff *et al.* 1991). Besonders stabil scheinen die Phosphatasen zu sein, die sich in der Wurzelzellwand, dem Wurzelapikalmeristem und an der äußeren Oberfläche der Wurzelepidermiszellen befinden (Vance *et al.* 2003). Die Aktivität dieser Phosphatasen ist somit ein Weg für die Pflanze P_{org} verfügbar zu machen. Das Aneignungsvermögen von P_{org} durch Pflanzen kann somit durch verschiedene genetisch festgelegte Faktoren beeinflusst werden. Auf Grund der genetischen Vielfalt verschiedener Pflanzenarten oder sogar Pflanzensorten kann geschlussfolgert werden, dass sie sich in ihrem Aneignungsmechanis-

mus unterscheiden. Leppin (2007) und Steffens *et al.* (2010) konnten zeigen, dass verschiedene Kulturpflanzen beim Test auf ihre Fähigkeit sich Phosphat aus P_{org} anzueignen unterschiedlich reagierten. Da die Kartoffel eine wichtige Nutzpflanze darstellt - der Anbau in Deutschland beträgt 244800 ha (Statistisches Bundesamt 2014) - und diese in vorangegangenen Studien noch nicht in dieser Art und Weise getestet wurde, erwies es sich als interessant, diese weitere Kulturart zu untersuchen. Ein weiterer, interessanter Aspekt ist, ob sich unterschiedliche Sorten verschieden im Bezug auf die Aneignung von P_{org} verhalten. Es wurden daher die Sorten cv. Belana und cv. Marabel von EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH, als bekannte Speisekartoffelsorten, ausgewählt. Als Vergleichsreferenz für die Kartoffel wurde die bereits getestete Rapsorte cv. Carousel genommen (Leppin 2007; Steffens *et al.* 2010). Mit diesen Pflanzen sollte die folgende Hypothese getestet werden:

Hypothese 2: Die Aneignung von Phosphat aus P_{org} ist von der Pflanzenart abhängig und damit genetisch bedingt.

- a) Die Nutzpflanzen Raps (*Brassica napus* cv. Carousel) und Kartoffel (*Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer P_{org} -Aneignung signifikant.
- b) Die Kartoffelsorten *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel unterscheiden sich hinsichtlich ihrer P_{org} -Aneignung signifikant.

Um diese Aspekte zu testen, stellen die P-Konzentration in der Pflanze sowie die Aktivität der Sauren Phosphatase an der Wurzel entscheidende Faktoren dar. Mithilfe des P-Gehaltes in der Pflanze kann die P-Aneignung getestet werden. Hierbei spielen wiederum verschiedene Aspekte eine Rolle, die Unterschiede zwischen den Pflanzen verursachen können: Wurzelsystem, P-Transporter, Einfluss der Pflanze auf die Rhizosphäre und damit auf die Verfügbarkeit von P für die Pflanze. Durch die Datenerhebung zur Phosphataseaktivität erhält man Ergebnisse zur Fähigkeit bzw. Reaktivität der Pflanze P-Mangel zu erkennen und darauf entsprechend zu reagieren.

Weiterhin wurde die Kombination von Boden und Pflanze getestet. Wie unterscheidet sich die Aneignungseffizienz der genannten Pflanzenarten auf einem Unterboden, der eine geringe biologische Aktivität besitzt, gegenüber der An-

eignung auf einem Oberboden mit ausgeprägter biologischer Aktivität? Werden die Unterschiede zwischen Pflanzenarten auf einem biologisch aktiven Boden von den Einflüssen des Bodens überlagert, oder zeigen sich diese Unterschiede unabhängig hiervon? Können z. B. Mykorrhizapilze oder bestimmte Bakterien so den P-Stoffwechsel beeinflussen, dass die pflanzeneigenen Mechanismen überdeckt werden? Oder zeigen sich diese Unterschiede, wenn auch evtl. etwas weniger ausgeprägt, zwischen den Pflanzenarten auf jedem Boden bzw. Substrat? Diese Überlegungen führten zur folgenden Hypothese:

Hypothese 3: Genetische Unterschiede bzgl. der Phosphat-Aneignung aus P_{org} bei ausgewählten Nutzpflanzen zeigen sich bei eingeschränkter biologischer Aktivität des Bodens.

2 Material & Methoden

2.1 Bodeninkubation I - Einfluss von Bodentyp und Glucosegabe auf die Mineralisation von P_{org}

Zur Charakterisierung der Faktoren, die auf die P_{org} -Fraktion einwirken, wurde ein Bodeninkubationsversuch unter aeroben Verhältnissen angelegt. Hierbei sollte getestet werden, ob verschiedene Bodentypen und eine zusätzliche Glucosegabe sich auf die Mineralisierung von P_{org} auswirken. Zu Vergleichszwecken wurde eine Variante ohne jegliche P-Gabe mitgeführt sowie eine mit wasserlöslichem Phosphat.

Bodenaufbereitung

Für diesen Versuch wurden fünf verschiedene Bodentypen ausgewählt (nach World Reference Base (WRB) klassifiziert):

- Luvisol Unterboden (Kleinlinden)
- Podsol (Düshorn)
- Luvisol Oberboden I (Hünfeld)
- Fluvisol (Gießen)
- Ferralsol (Lich)

Tabelle 2.1: Physikochemische Bodeneigenschaften im Bodeninkubationsversuch I;
(ergänzte Institutsunterlagen)

Parameter	Luvisol Unter- boden (80-120 cm)	Podsol	Luvisol Ober- boden I	Fluvisol	Ferralsol
pH,					
0,01 M CaCl ₂	7,1	5,7	7,2	5,2	5,5
C _t , %	0,28	2,64	1,75	2,62	0,33
N _t , %	0,02	0,12	0,17	0,24	0,02
S _t , %	0,02	0,03	0,07	n. b.	0,08
CAL-P, mg kg ⁻¹	5,9	22,5	39,5	18,7	0,3
CAL-K, mg kg ⁻¹	38,8	n. b.	169,0	26,9	6,7
Sand, %	47,9	90,8	8,8	4,9	30,4
Schluff, %	34,5	8,3	66,7	64,3	39,5
Ton, %	17,6	0,9	24,5	30,8	30,1
Bodenart	sandiger Lehm	Sand	stark toniger Schluff	schluffiger Lehm	schwach toniger Lehm

Der Versuch wurde in Mitscherlichgefäßen durchgeführt. Folgende Nährstoffgaben wurden jeder Variante zugeführt, um den Bodeninkubationsversuch mit anschließenden Pflanzenversuchen vergleichen zu können:

Tabelle 2.2: Nährstoffgaben im Bodeninkubationsversuch I

Nährstoff	Form	mg Nährstoff (kg Boden) ⁻¹
N	NH ₄ NO ₃	160
K	K ₂ SO ₄	400
Mg	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	50
B	H ₃ BO ₄	0,46
Mo	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,11
Mn	MnSO ₄ × H ₂ O	40
Zn	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	10
Cu	CuSO ₄ × 5 H ₂ O	5

Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Der Versuch umfasste die nachstehenden Varianten in vierfacher biologischer Wiederholung:

- P₀ als Kontrolle
- Ca(H₂PO₄)₂ (100 mg P (kg Boden)⁻¹)
- Na-Phytat (100 mg P (kg Boden)⁻¹)

Die Gefäße wurden unter kontrollierten Bedingungen (ohne Licht; 16 h bei 21 °C und 60% relative Luftfeuchte sowie 8 h bei 16 °C und 70% relative Luftfeuchte) bei 50% Wasserhaltekapazität für insgesamt 140 Tage inkubiert, um die Ergebnisse mit vorangegangenen Studien (Leppin 2007; Steffens *et al.* 2010) vergleichen zu können. Nach der Hälfte (Tag 70) des Versuchszeitraums wurden die Böden aller Varianten und biologischen Wiederholungen zuerst getrocknet, anschließend in zwei gleich große Portionen geteilt und entweder mit Glucosegabe ($10 \text{ g (kg Boden)}^{-1}$) oder ohne Glucosegabe zurück in Mitscherlichgefäße bei gleichen Versuchsbedingungen verbracht. An den Tagen 1, 2, 4, 8, 16, 32, 71, 106, 125 und 140 wurden Bodenproben mit einem kleinen Bohrstock ($\varnothing 1,5 \text{ cm}$) mit jeweils drei Einstichen pro Gefäß bis zum Gefäßgrund entnommen. Die gezogenen Bodenproben wurden aufbereitet und auf CAL-extrahierbares P analysiert (siehe 2.8 CAL-Extraktion und Bestimmung der P-Konzentration S. 39).

2.2 Bodeninkubation II - Einfluss des Boden-pH-Wertes auf die Mineralisation von P_{org}

Da sich in dem ersten Bodeninkubationsversuch zwei Böden mit relativ hohem Boden-pH-Wert positiv in der Mineralisation von P_{org} darstellten, wurde ein weiterer Versuch angelegt. Für den Einfluss des Boden-pH-Wertes auf die Mineralisation von P_{org} wurde ein aerober Bodeninkubationsversuch angelegt, bei dem die Versuchsböden auf einen bestimmten pH-Wert aufgekalkt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden.

Bodenaufbereitung

Für diesen Versuch wurden fünf verschiedene Bodentypen ausgewählt und auf den pH-Wert 7,2 (pH-Wert des Luvisols I) aufgekalkt (Tab. 2.4), um zu prüfen, ob der Boden-pH-Wert die Mineralisationseigenschaften aller Böden einheitlich beeinflusst. Als weiterer Einflussfaktor auf den Mineralisierungsprozess wurde die Temperatur gewählt (15 °C und 25 °C), um zu testen ob die mikrobiologischen Prozesse der Mineralisierung dadurch beeinflusst werden. Es wurden nachstehende Bodentypen verwendet:

- Luvisol I (Hünfeld) (ursprünglicher pH 7,2),
- Podsol (Düshorn) (ursprünglicher pH 5,7),
- Fluvisol (Gießen) (ursprünglicher pH 5,2),
- Luvisol II (Gladbacher Hof) (erodiert) (ursprünglicher pH 6,3)
- Ferralsol (Lich) (ursprünglicher pH 5,5).

Tabelle 2.3: Physikochemische Bodeneigenschaften im Bodeninkubations-
veruch II

Parameter	Luvisol Ober- boden I	Podsol	Fluvisol	Luvisol Ober- boden II	Ferralsol
pH,					
0,01 M CaCl ₂	7,2	5,7	5,2	6,3	5,5
C _t , %	1,75	2,64	2,62	1,02	0,33
N _t , %	0,17	0,12	0,24	0,10	0,02
S _t , %	0,07	0,03	n. b.	0,01	0,08
CAL-P, mg kg ⁻¹	39,5	22,5	18,7	25,4	0,3
CAL-K, mg kg ⁻¹	169,0	n. b.	26,9	n. b.	6,7
Sand, %	8,8	90,8	4,9	3,3	30,4
Schluff, %	66,7	8,3	64,3	68,0	39,5
Ton, %	24,5	0,9	30,8	28,7	30,1
Bodenart	stark toniger Schluff	Sand	schluffiger Lehm	stark schluffiger Ton	schwach toniger Lehm

Tabelle 2.4: Applikation von CaCO₃ zu den Versuchsböden zur Einstellung
auf pH 7,2

Boden	CaCO ₃
je 500 g	(g)
Luvisol I	0
Podsol	1,325
Fluvisol	1,426
Luvisol II	0,460
Ferralsol	1,046

Die Böden wurden mit den Nährstoffen wie in Tab. 2.2 beschrieben gedüngt.

Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde in Plastikgefäßen à 500 g Boden durchgeführt. Die Plastik-
gefäße wurden mit gelochter Frischhaltefolie abgedeckt, um ein Austrocknen

der Böden zu verhindern, zugleich jedoch einen Luftaustausch zu ermöglichen. Der Versuch umfasste die nachstehenden Varianten in vierfacher Wiederholung:

- P_0 als Kontrolle (+ Na_2SO_4 als Na-Ausgleich ($140 \text{ mg Na (kg Boden)}^{-1}$))
- Na-Phytat ($100 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) als P_{org}

Um ein mögliches Auftreten arbiträrer Effekte zu vermeiden, wurde, als Verbesserung gegenüber dem ersten Versuch, ein Na-Ausgleich in der Kontrollvariante durchgeführt. Die Böden wurden unter kontrollierten Bedingungen in den Varianten 15°C und 25°C , bei 60% relativer Luftfeuchte und bei 50% Wasserhaltekapazität für insgesamt 140 Tage im Dunkeln inkubiert. Am Tag 28 wurden Bodenproben mit einem kleinen Bohrstock ($\varnothing 1,5 \text{ cm}$), an den Tagen 56 und 140 mit einem Beprobungslöffel (da dies, bei den kleinen Gefäßen, praktikabler war) mit jeweils drei Einstichen pro Gefäß bis zum Gefäßgrund entnommen. Die gezogenen Bodenproben wurden aufbereitet und auf CAL-extrahierbares P analysiert (siehe 2.8 CAL-Extraktion und Bestimmung der P-Konzentration S. 39).

2.3 Pflanzenanzucht I - Einfluss der Pflanzenart auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen am Beispiel der Kartoffel (*Solanum tuberosum* cv. Belana)

Der Einfluss der Pflanzenart auf die Verfügbarkeit von P_{org} wurde zunächst mit einem Versuch in Mitscherlichgefäßen getestet. Hierzu wurde die Pflanzenart Kartoffel (*Solanum tuberosum* cv. Belana) eingesetzt und auf ihre P-Aneignung von P_{org} (Na-hexaphytat) getestet. Die Kartoffel wurde zum einen ausgewählt, da es sich hierbei um eine wichtige Kulturpflanze in Europa handelt, zum anderen, da die Kartoffelpflanze von der Forschungsgruppe Frossard gentechnisch manipuliert worden war (Zimmermann *et al.* 2003), um ihre P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen zu verbessern. Die Kartoffel war in früheren Untersuchungen (Steffens *et al.* 2010) noch nicht auf die Aneignung von P_{org} untersucht worden.

Bodenaufbereitung

Zur Anzucht wurde aufgrund seiner geringen biologischen Aktivität und seiner niedrigen CAL-P-Konzentration ein Luvisol-Unterboden (pH 7,1; C_{org} 0,22%, CAL-P 5,9 mg P kg^{-1} Boden: „Kleinlinden 2010“) vgl. Tab. 2.1 genutzt. Um die natürliche P-Konzentration noch weiter zu verringern, wurde Quarzsand (50%) untergemischt, d. h. 3 kg Boden plus 3 kg Quarzsand. Es wurden die Nährstoffe aus Tab. 2.2 zugegeben, um Nährstoffmangel auszuschließen.

Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Sechs verschiedene P-Düngevarianten in je dreifacher biologischer Wiederholung wurden hierbei verglichen:

- P_0 als Kontrolle
- $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (100 mg P (kg Boden) $^{-1}$)
- Na-Phytat (100 mg P (kg Boden) $^{-1}$)
 - Na-Phytat als aufbereitete P_{org} -Quelle; P_{org} -Produkt, hergestellt aus Reis (Sigma-Aldrich, St. Louis USA)
- Maismehl (50 mg P (kg Boden) $^{-1}$) (120 g Maismehl)
- Maismehl (100 mg P (kg Boden) $^{-1}$) (240 g Maismehl)
- Maismehl (150 mg P (kg Boden) $^{-1}$) (360 g Maismehl)
 - Maismehl (0,42 mg P (g Maismehl) $^{-1}$) als naturbelassene P_{org} -Quelle; P_{org} natürlichen Ursprungs, nicht aufbereitet

Die Gefäße wurden mit dem Großteil des Bodengemisches befüllt, die in Plastischalen vorgekeimten Kartoffelknollen eingelegt und diese mit dem restlichen Bodengemisch, etwa eine Handschaufel voll, bedeckt. Unter standardisierten Bedingungen der Klimakammer (Lichtphase: 16 h bei 21 °C, 60% relative Luftfeuchte, 200 Wm^{-2} ; Dunkelphase: 8 h bei 16 °C, 70% relative Luftfeuchte) wurden die Pflanzen 35 Tage angezogen. 2 Tage nach Versuchsbeginn wurden Bodenproben von allen Varianten gezogen. 2 Wochen nach Versuchsbeginn wurde 0,5 g N (NH_4NO_3) je Gefäß nachgedüngt.

Für die Auswertung der P-Gehalte in der Pflanze wurde der P-Gehalt in der Knolle berücksichtigt. Dazu wurden alle Mutterknollen vor dem Setzen gewogen. Eine representative Auswahl aus der gleichen Partie Setzkartoffeln wurde

auf P nach Gericke und Kurmies (1952) untersucht (siehe 2.7 Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode S. 39). Der Durchschnitt wurde dann als Grundlage für die Berechnung des P-Gehaltes in den gesetzten Mutterknollen verwendet.

Ernte

Nach 35 Tagen wurden zuerst die Sprosssteile der Pflanzen abgeschnitten, gewogen, klein geschnitten und in Papiertüten bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank getrocknet. Parallel wurden die abgeernteten Gefäße eingeweicht, um danach die Wurzeln leichter vom Boden separieren zu können. Dazu wurden die Gefäße über einem Sieb (5 mm) umgestülpt und der Wurzelballen mit Wasser ausgespült. Die neu gebildeten Knollen sowie die Mutterknolle, wenn jeweils schon/noch vorhanden, wurden abgeschnitten, jeweils die Frischmasse ermittelt, klein geschnitten und bei 105°C in Aluschalen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die grob gereinigten Wurzeln wurden im weiteren Arbeitsschritt fein gereinigt, d. h. anhaftender Boden sowie andere Fremd- und Faserteile wurden vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Dann wurden die Wurzeln sorgfältig trocken getupft, um die Frischmasse ohne anhaftendes Wasser ermitteln zu können. Anschließend wurden auch die Wurzeln klein geschnitten und bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2.4 Pflanzenanzucht II - Einfluss eines Oberbodens auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen von Raps und Kartoffel

In diesem Experiment sollte getestet werden, wie die P-Aneignung von Raps und Kartoffel in biologisch aktivem Oberboden beeinflusst wird. Dazu wurde ähnlich wie in der Pflanzenanzucht I verfahren.

Bodenaufbereitung

Für diesen Versuch wurde ein biologisch aktiver Oberboden, vgl. Luvisol-Oberboden II, Tab. 2.3, S. 23, verwendet. Dieser wurde zu 50% mit Quarzsand gemischt, um die Nährstoffkonzentration zu senken. D. h. es wurden 3 kg Boden mit 3 kg Quarzsand vermengt und die üblichen Düngegaben hinzugefügt (vgl. Tab. 2.2, S. 21).

Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Der Versuch umfasste die nachstehenden Varianten in dreifacher Wiederholung:

- P_0 als Kontrolle (+ Na_2SO_4 als Na-Ausgleich ($140 \text{ mg Na (kg Boden)}^{-1}$))
- $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ($100 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) (+ Na_2SO_4 als Na-Ausgleich ($140 \text{ mg Na (kg Boden)}^{-1}$))
- Na-Phytat ($100 \text{ mg P kg}^{-1} \text{ Boden}$) als P_{org}

Um ein mögliches Auftreten arbiträrer Effekte zu vermeiden, wurde, als Verbesserung gegenüber der ersten Pflanzenanzucht, ein Na-Ausgleich bei P_0 und $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ durchgeführt.

Weiter wurde so verfahren wie in Pflanzenanzucht I s. S. 25f. Anzumerken ist hier, dass erst an Tag 3, nach der Bodenprobenentnahme, 6-10 Rapssamen gesät wurden. Diese wurden dann 1-2 Tage nach dem Auflaufen (14 Tage nach der Saat) auf drei homogene Pflanzen vereinzelt. Neben cv. Belana wurde mit einer weiteren Kartoffelsorte *Solanum tuberosum* cv. Marabel gearbeitet. Insgesamt umfasste der Versuch somit 27 Gefäße.

Ernte

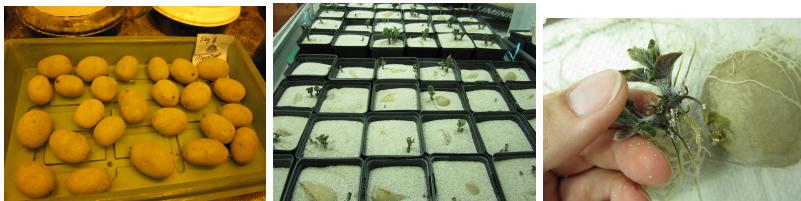
Die Ernte erfolgte ebenfalls wie in Pflanzenanzucht I (s. S. 26). Zusätzlich wurde den abgetupften Wurzeln eine Mischprobe, bestehend aus 2 cm langen Stücken von 1 g Wurzelmasse, des gesamten Wurzelapparates, für die Wurzellängenmessung entnommen und diese in Eisessig/Ethanol bis zur Messung gelagert.

2.5 Pflanzenanzucht III: Aktivitätsmessung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vivo* von Raps und Kartoffel

Pflanzenanzucht

Für das Wasserkulturexperiment wurden, wie in Pflanzenanzucht II, zwei Pflanzenarten verwendet. Die Kartoffelsorten *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie die Rapsorte *Brassica napus* cv. Carousel. Bis zum Einsetzen in die Wasserkultur wurde unterschiedlich mit den verschiedenen Pflanzenarten verfahren.

Anzucht Kartoffel



(a) Vorkeimen der Kartoffeln (b) Kartoffeln in Quarzsand (c) Abdrehen der Keimlinge

Abbildung 2.1: Anzucht und Vorbereitung der Kartoffeln für den Wasserkulturversuch

Die Kartoffelknollen beider Sorten wurden in einer Klimakammer, ausgelegt in grünen, rechteckigen Plastikschaalen, unter kontrollierten Bedingungen vorgekeimt (Abb. 2.1(a)), bis an den Augen deutlich erkennbare 3-5 mm lange Triebe zu sehen waren. Sobald dies der Fall war, wurden die Knollen in kleine Plastikgefäße mit Quarzsand gesetzt (Abb. 2.1(b)) und für 14 Tage mit 1 mM CaSO_4 -Lösung, die zusätzlich 10 μM H_3BO_4 enthielt, gegossen und in der Klimakammer unter standardisierten Bedingungen (Lichtphase: 16 h bei 21 °C, 60% relative Luftfeuchte, 200 Wm^{-2} ; Dunkelphase: 8 h bei 16 °C, 70% relative Luftfeuchte) angezogen. Nach diesen 2 Wochen waren die Keimlinge so groß (ca. 2-3 cm), dass sie von der Mutterknolle an der Sollbruchstelle

sanft abgedreht (Abb. 2.1(c)), mit Schaumstoff umwickelt und in 4,5 L-Gefäße mit $\frac{1}{4}$ konzentrierter Nährlösung überführt werden konnten. Die Konzentration der Nährlösung wurde von $\frac{1}{4}$ schrittweise nach 3 Tagen auf $\frac{1}{2}$ und nach 4 Tagen auf die volle Konzentration erhöht. Mit Erlangen der vollen Konzentration wurde die P-Konzentration ebenfalls schrittweise (nach 3 und nach weiteren 4 Tagen) herabgesetzt (Tab. 2.5).

Anzucht Raps

Die Rapssamen wurden zum Keimen in einer Styroporschale auf Quarzsand ausgestreut und für 11 Tage mit 1 mM CaSO_4 -Lösung, die zusätzlich $10 \mu\text{M}$ H_3BO_4 enthielt, gegossen und unter standardisierten Bedingungen in der Klimakammer (Lichtphase: 16 h bei 21°C , 60% relative Luftfeuchte, 200 W m^{-2} ; Dunkelphase: 8 h bei 16°C , 70% relative Luftfeuchte) angezogen. Die ca. 2-3 cm großen Keimlinge wurden mit Schaumstoff umwickelt und in die 5 L-Gefäße mit $\frac{1}{4}$ konzentrierter Nährlösung überführt. Die Konzentration der Nährlösung wurde von $\frac{1}{4}$ schrittweise nach 3 Tagen auf $\frac{1}{2}$ und nach 4 Tagen auf die volle Konzentration erhöht. Mit Erlangen der vollen Konzentration wurde die P-Konzentration ebenfalls schrittweise (nach 3 und nach weiteren 4 Tagen) herabgesetzt (Tab. 2.5).

Tabelle 2.5: Nährlösungszusammensetzung im Wasserkulturversuch

Nährstoff	Nährlösung (mM)	Nährsalz
N	2,00	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
N	1,00	NH_4NO_3
Mg	1,00	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
Cl	0,05	KCl
K	1,5	K_2SO_4
P	(anfangs) 0,250 (Übergang) 0,025 (Mangel) 0,001	KH_2PO_4
Fe	0,1	Fe(III)-EDTA
Mn	0,001	$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$
Zn	0,001	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
Cu	0,0005	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
Mo	0,00002	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
B	0,01	H_3BO_4

Enzymaktivitätsmessung *in vivo*

Nach 9 Tagen Anzucht unter P-Mangel-Bedingungen (0,001 mM P) wurde die Phosphataseaktivität der Kartoffelwurzel bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in dreifacher Wiederholung untersucht. Jede Pflanze wurde für zwei Konzentrationsstufen verwendet, wobei jeweils zuerst die niedrigere Konzentrationsstufe untersucht wurde. In Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass keine signifikanten Abweichungen durch Mehrfachnutzung der Pflanzen (6×) entstehen.

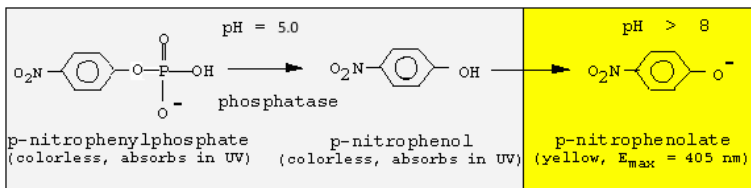


Abbildung 2.2: Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat durch die Phosphatase, modifiziert nach <http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/enzymeassay.html>, 04.09.2016

Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-Phosphat (NPP) verwendet (Abb. 2.2). Dieses Substrat hat den Vorteil, dass das Spaltungsprodukt Nitrophenolat (NP) direkt ohne weitere Anfärbeschritte im alkalischen Bereich bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Eine weitere Überlegung bestand darin, nicht das Phosphat zu messen, um zu verhindern, dass eventuell durch die Pflanze aufgenommenes Phosphat in diesem *in vivo*-Versuch nicht erfasst wird. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Pflanzen Nitrophenolat aufnehmen (Breuer 2001).

Beim Raps wurde in ähnlicher Weise verfahren. Nach 6 Tagen P-Mangel (0,001 mM P) wurde hier ebenfalls die Phosphataseaktivität untersucht. Je Substratkonzentrationsstufe wurden hier drei Wiederholungen von drei unterschiedlichen Rapspflanzen durchgeführt, und jede Pflanze wurde für zwei unterschiedliche Stufen benutzt. D. h. eine Kartoffelpflanze wurde sechsmal benutzt, eine Rapspflanze nur zweimal, da sich beim Raps in den Voruntersuchungen nach mehrfacher Nutzung bei gleicher Konzentration Unterschiede in der Enzymaktivität erkennen ließen. Da keine Unterschiede in den Vorunter-

suchungen bis zu der genannten Wiederholung auftraten, wurde bei diesem Versuch eine Teststatistik mit unabhängigen Stichproben durchgeführt. Eine Mehrfachnutzung wurde angestrebt, um den Umfang an Pflanzen für die Anzucht und Ernte zu reduzieren.

Die Enzymaktivität wurde nach einer von (Beißner 1997) modifizierten Technik analysiert: Die Pflanzen wurden aus der Nährlösung entnommen, die Wurzeln in einer 1 mM CaSO_4 -Lösung, die zusätzlich 10 μM H_3BO_4 enthielt, gewaschen und anschließend in mit Alufolie eingewickelte 250 mL-Bechergläser, die 140 mL NPP-Lösung mit der entsprechenden Konzentration enthielten, überführt. Die NPP-Lösung enthielt einen 0,1 M Na-Citrat-Puffer, eingestellt auf pH 5,0. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Aufrechterhaltung der niedrigen Substratkonzentrationen nicht garantiert werden konnte, da im Anschluss an die Versuchsdurchführung keine Überprüfung der Substratkonzentration stattfand. Zusätzlich wurden die Gefäße während der Inkubationszeit belüftet. Nach 10 min Inkubationszeit wurden die Pflanzen entnommen, die Wurzeln wieder mit der Waschlösung gewaschen und in ihre ursprünglichen Gefäße überführt. Aus dem Becherglas wurde sofort nach Beenden der Inkubationszeit ein Aliquot von 1 mL entnommen und in 25 mL-Kölbchen gegeben, in denen 4 mL 0,1 M NaOH vorgelegt worden waren. Durch dieses alkalische Milieu stoppte die Reaktion, färbte sich die Lösung gelb und konnte im Anschluss im Photometer bei 405 nm gemessen werden. Die Messdaten wurden in ein Modellberechnungsprogramm (DynaFit 3.28.070 © Petr Kuzic) eingegeben, das aus den Messpunkten eine Regressionanalyse und damit eine Michaelis-Menten-Kinetik erstellte. Es zeigte sich jedoch, durch eine Überprüfung mit Lineweaver-Burk bzw. Scatchard-(reverser Eadie-Hofstee)Plot, dass hier bei der Sauren Phosphatase keine Michaelis-Menten-Kinetik vorlag. Deswegen wurden die Daten mit der Hill-Funktion dargestellt (nach Ahlers 1982):

$$v = V_{max} \frac{S^n}{K_m + S^n} \quad (2.1)$$

Die Gleichung beschreibt im Kurvenverlauf die Reaktionsgeschwindigkeit (v) einer Enzymkinetik, wobei hier V_{max} für die Maximalgeschwindigkeit steht, K_m für die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit und S für Substratkonzentration, die durch den Hill-Koeffizient n beeinflusst wird. Im Folgenden wird der Hill-Koeffizient n (s.o. Gleichung 2.1) mit h bezeichnet, um

hier eine Eindeutigkeit in Bezug zur Hill-Gleichung zu schaffen. Er gibt die minimale Anzahl an Bindungsstellen am Enzym an (Ahlers *et al.* 1982). Wenn der Hill-Koeffizient $h > 1$ ist, liegt positive Kooperativität vor, bei $h = 1$ liegt Michaelis-Menten-Kinetik vor und bei $h < 1$ liegt negative Kooperativität vor. Auch K_m wird durch K_h ersetzt, um keine Verwechslungen mit der Michaelis-Menten-Kinetik aufkommen zu lassen, und die eindeutige Zuweisung der Konstanten zur Hill-Gleichung klar zu stellen. Um die Regressionsanalyse auf Basis der Hill-Gleichung (Hill 1910) zu berechnen, wurde das Programm Origin-Pro verwendet.

Ernte

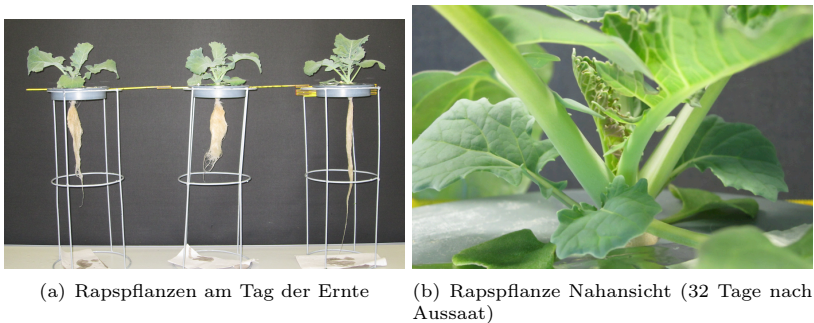


Abbildung 2.3: Rapspflanzen am Tag der Ernte nach einer Woche im P-Mangel ($1 \mu\text{M}$)

Ein Tag nach den Tests wurden die betreffenden Pflanzen, die deutliche P-Mangelsymptome zeigten (vgl. Abb. 2.3), geerntet und in Spross und Wurzel getrennt und die Sprossfrischmasse gewogen. Die Wurzeln wurden mit dest. Wasser gespült, um anhaftende Nährlösung abzuwaschen. Nach dem Trockentupfen der Wurzeln wurde deren Frischmasse gewogen. 1 g Wurzelfrischmasse, bestehend aus 2 cm-Stücken des gesamten Wurzelapparates, wurde zur Wurzellängenbestimmung in Eisessig/Ethanol aufbewahrt. Der Rest der Wurzel sowie die Sprosssteile wurden bei 105°C getrocknet, um später deren P-Konzentration mit der P-Bestimmung nach Gericke und Kurmies (1952) (siehe 2.7 Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode S. 39) zu ermitteln.

2.6 Pflanzenanzucht IV: Biochemische Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vitro* von Raps und Kartoffel

Pflanzenanzucht

Für ein Wasserkulturexperiment wurden wiederum zwei Pflanzenarten verwendet. Die Kartoffelsorten *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie die Rapsorte *Brassica napus* cv. Carousel. Bis zum Einsetzen in die Wasserkultur wurde unterschiedlich mit den verschiedenen Pflanzenarten verfahren.

Anzucht Kartoffel

Die Anzucht erfolgte wie in der Pflanzenanzucht III mit Ausnahme des Nährlösungswechsels: Die Konzentration der Nährlösung wurde von $\frac{1}{4}$ schrittweise nach 4 Tagen auf $\frac{1}{2}$ und nach 3 Tagen auf die volle Konzentration erhöht. Mit Erlangen der vollen Konzentration wurde die P-Konzentration ebenfalls schrittweise (nach 4 und nach weiteren 3 Tagen) herabgesetzt (Tab. 2.5).

Anzucht Raps

Auch beim Raps erfolgte die Anzucht wie bei Pflanzenanzucht III. Hier waren die Keimlinge allerdings schon nach 10 Tagen groß genug, um in die 5 L-Gefäße mit $\frac{1}{4}$ konzentrierter Nährlösung überführt zu werden. Die Nährlösung wurde von $\frac{1}{4}$ konzentrierter schrittweise nach 4 Tagen auf $\frac{1}{2}$ konzentrierte und nach 3 Tagen auf die volle Konzentration erhöht. Mit Erlangen der vollen Konzentration wurde die P-Konzentration ebenfalls schrittweise (nach 4 und nach weiteren 3 Tagen) herabgesetzt und für 17 Tage fortgeführt (Tab. 2.5).

Ernte & Zellwandextraktion

Nach insgesamt 31 Tagen Wachstum in Wasserkultur wurden die Pflanzen geerntet und in Wurzel und Spross getrennt. Der Spross wurde gewogen, klein geschnitten, bei 105°C getrocknet und als Rückstellprobe aufbewahrt. Die

Wurzeln wurden mit dest. Wasser abgespült, trocken getupft, gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Extraktion der Wurzelzellwand modifiziert nach Dracup *et al.* (1984). Hierzu wurde das tiefgefrorene Material in flüssigem Stickstoff gemörsert, 1 g davon abgenommen, in einen gekühlten Mörser gegeben und mit 10 mL kühlem Homogenisationspuffer (500 mM Sorbitol, 2,5% (w/v) Ficoll, 50 mM MES, 1 mM EDTA, 45 mM K⁺; pH 6,0) für 1 Minute gemörsert. Danach wurde das Homogenisat über Nylongaze (200 µm lichte Maschenweite) gefiltert und der Rückstand erneut mit 10 mL Homogenisationspuffer gespült. Das gesamte Filtrat wurde in gekühlten Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 4 °C mit 1000 g (Beckman J2-21M/E Centrifuge) 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit dem restlichen Rückstand, der in der Nylongaze aufgefangen worden war, erneut, inkl. 0,1 g sauer gewaschenem Seesand sowie 10 mL Homogenisationspuffer, für 2 min gemörsert. Das gesamte Homogenisat wurde dann erneut bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 5 mL Triton-X-100-haltigem Puffer (35 mM MES, 30 mM KOH, 1% (v/v) Triton-X-100) 30 min auf dem Vortex resuspendiert, wobei die Zentrifugenröhrchen in einem Plastikgefäß während der gesamten Zeit auf Eis standen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation unter den genannten Bedingungen. Anschließend folgten fünf Waschschrte mit dem sog. Dialysepuffer (35 mM MES, 30 mM K⁺, pH 6,5) und jeweils anschließender Zentrifugation. Das Pellet wurde jeweils weitergeführt, der Überstand verworfen. Die gewonnene Zellwandfraktion wurde zum Abschluss in 10 mL Dialysepuffer suspendiert, in 20 mL-Plastikgefäße umgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase

Als Substrat der Sauren Phosphatase wurde p-Nitrophenyl-Phosphat (NPP) verwendet (Abb. 2.2). Dieses Substrat hat den Vorteil, dass das Spaltungsprodukt Nitrophenolat (NP) im alkalischen Bereich direkt bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Es besteht daher kein Bedarf, einen weiteren Anfärbeschritt wie bei der Phosphatbestimmung (siehe 2.7 Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode S. 39, 2.8 CAL-Extraktion und Bestimmung der

P-Konzentration S. 39 oder 2.8 Phosphat-Fraktionierung nach Kurmies S. 41) durchzuführen. Jedoch muss beachtet werden, dass das Substrat nicht allzu lange (gelöst in Assay-Puffer) gelagert werden sollte, da sich das NPP nach einer gewissen Zeit durch Autolyse zersetzt und sich die Lösung nach und nach gelb färbt. Dies kann zu einem sehr hohen Blindwert führen und könnte die Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms beeinflussen, da möglicherweise nicht mehr ausreichend Substrat vorliegt.

In Vorversuchen wurde die Enzymaktivität im Überstand, der bei der Zellwandextraktion immer verworfen wurde, gemessen. Phosphataseaktivität war vorhanden, jedoch deutlich geringer (nur 14% im Vergleich zu den eigentlichen Phosphataseaktivitätsmessungen der drei Genotypen) und vermutlich von Phosphatasen verursacht, die nicht in der Zellwand lokalisiert sind. Die Behauptung, dass die Umsetzung des Substrates im eigentlichen Assay hauptsächlich durch zellwandgebundene Phosphatasen stattfindet, kann durch Abb. 2.4 unterstützt werden, in der die deutliche Gelbfärbung des Pellets, also an Zellwandpartikeln, zu erkennen ist.

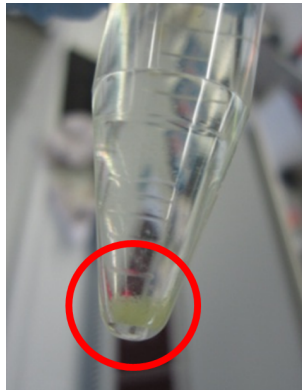


Abbildung 2.4: Falcontube mit Zellwandsuspension während der Enzymreaktion

Die Aktivierungsenergie der Phosphatase der Wurzelzellwand wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Die Zellwandsuspension wurde aufgetaut und ein Aliquot von 0,1 mL in 8,9 mL des Assaypuffers (pH 5,5; 35 mM MES; 40 mM K⁺ (pH-Wert-Einstellung mit 1 M KOH; restliches

K⁺ in Form von 3 M KCl ergänzt)) in ein 14 mL-Falcontube gegeben. Enzym und Puffer wurden zusammen im Wasserbad bei 20 °C bzw. bei 30 °C für ca. 15 min inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe des Substrates im Überschuss (10 mM NPP gelöst in Assay-Puffer pH 5,5) die Reaktion gestartet. Nach 5, 10, 15, 20, 30 und 40 min wurde ein Aliquot (1 mL) entnommen und die enzymatische Hydrolyse durch 2 mL vorgelegter 1 M KOH gestoppt. Jede Zeitreihe wurde vierfach biologisch wiederholt. D. h., dass pro Variante mit jeweils Zellwandextrakten von vier verschiedenen Pflanzen gearbeitet wurde.

Weiterhin wurde das pH-Optimum der zellwandgebundenen Phosphatase ermittelt. Hierzu wurde ein Aliquot der aufgetauten Zellwandsuspension von 0,1 mL in 8,9 mL der verschiedenen Assaypuffer (Tab. 2.6) in ein 14 mL-Falcontube gegeben. Es waren zwei verschiedene Puffersysteme nötig, um den breiten pH-Bereich abdecken zu können. Enzym und Puffer wurden zusammen im Wasserbad (30 °C) für ca. 15 min inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe des Substrates (10 mM gelöst in Assay-Puffer) die Reaktion gestartet. Nach 30 min wurde ein Aliquot (1 mL) entnommen und die enzymatische Hydrolyse durch 2 mL vorgelegter 1 M KOH gestoppt. Pro pH-Wert-Stufe wurden vier biologische Wiederholungen durchgeführt.

Zur Untersuchung des K_i-Wertes wurde das Experiment wie folgt abgewandelt. Bei allen drei Sorten wurde im entsprechenden pH-Optimum gearbeitet. Ein Aliquot der aufgetauten Zellwandsuspension von 0,1 mL wurde in den entsprechenden MES-Assaypuffern (Carousel: pH 5,6; Marabel: 5,65; Belana: 5,9) in ein 14 mL-Falcontube gegeben. Enzym und Puffer wurden zusammen im Wasserbad (30 °C) für ca. 15 min inkubiert.

Tabelle 2.6: Assaypuffer

pH-Wert	MES-Puffer	Essigsäurepuffer
	35 mM MES; 40 mM K ⁺ (pH-Wert-Einstellung mit 1 M KOH; restliches K ⁺ in Form von 3 M KCl ergänzt)	35 mM Eisessig, 40 mM K ⁺ (pH-Wert-Einstellung mit 1 M KOH; restliches K ⁺ in Form von 3 M KCl ergänzt)
4,3		×
4,5		×
4,9		×
5,2		×
5,6	×	
5,8		×
6,4	×	
6,7	×	

Anschließend wurde durch Zugabe des Substrates in verschiedenen Konzentrationen von 0 bis 20 mM (Carousel), 40 mM (Belana) und bis 60 mM (Mara-bel) die Reaktion gestartet. Nach 10 min wurde ein Aliquot (1 mL) entnommen und die enzymatische Hydrolyse durch 2 mL vorgelegte 1 M KOH gestoppt. Je Substratkonzentrationsstufe wurden vier biologische Wiederholungen durchgeführt. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Aufrechterhaltung der niedrigen Substratkonzentrationen nicht garantiert werden kann, da im Anschluss an die Versuchsdurchführung keine Überprüfung der Substratkonzentration stattfand.

Alle durch diese Untersuchungen erhaltenen und gestoppten Proben konnten im Anschluss direkt am Photometer (LKB Biochrom Ultraspec II) bei 405 nm gemessen werden. Diese Werte wurden mit Hilfe einer p-Nitrophenolat-Kalibrierreihe abzüglich der Blindwerte, bestehend aus Puffer und NPP-Lösung aber ohne Enzym, verrechnet. Die Daten wurden in OriginPro zur Auswertung der Regressionsanalyse mittels der Funktion nach Hill eingegeben, da erneut keine Michaelis-Menten-Kinetik vorlag. Dadurch konnte ein Modell der Kinetik der Sauren Phosphatase erstellt und sich der tatsächlichen Kinetik angenähert werden.

2.7 Pflanzenanalysen

Wurzellängenbestimmung

Für die Wurzellängenbestimmung wurde das Gerät Comair Root Length Scanner (Abb. 2.5) benutzt. Vor Beginn der Messung wurde darauf geachtet, dass der Glasteller waagrecht ausgerichtet und staubfrei war. Um die Richtigkeit der Messung zu überprüfen, wurde ein Nullabgleich sowie ein Kalibrierlauf gestartet. Die Wurzelprobe (siehe z. B. 2.5 Pflanzenanzucht II Ernte S.32) wurde anschließend in einem feinen Sieb aufgefangen und auf den Glasteller mit Hilfe von 1 L destilliertem Wasser überspült. Die Probe wurde gleichmäßig auf dem Glasteller im Wasser verteilt, um Überlagerungen der Wurzeln, und damit ein Nichterfassen von Wurzelteilen, zu vermeiden. Die Messung erfolgte durch einen Scan-Arm, der sich innerhalb von 9,5 min von innen nach außen über den sich drehenden Glasteller bewegte, und durch die Unterbrechung des Lichtstrahls, verursacht durch die Wurzelfragmente, deren Gesamtlänge abscannte. Es wurden pro Probe mindestens zwei Messwiederholungen durchgeführt.

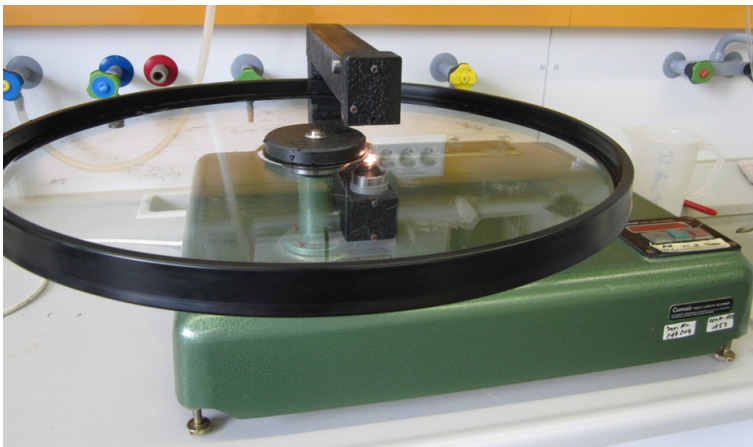


Abbildung 2.5: Comair Root Length Scanner

Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode

Um die P-Konzentration in der Pflanze zu ermitteln, wurde die Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode nach Gericke und Kurmies (1952) verwendet. Dazu wurden die getrockneten Pflanzenteile jeweils grob zerkleinert, um anschließend in einer dafür geeigneten Mühle klein gemahlen zu werden. Dann wurde von der entsprechenden Probe je 0,5 g in Tiegel eingewogen und über Nacht bei 550 °C im Muffelofen verascht. Parallel wurden ein Standard (Heu) und ein Blindwert mitgeführt. Nach dem Abkühlen wurden die veraschten Proben mit ca. 1 mL destilliertem Wasser angefeuchtet. Anschließend wurden 2,5 mL verdünnte HNO_3 (1 : 3) hinzugefügt und die Tiegel vorsichtig erhitzt. Die Proben wurden in einen 50 mL-Kolben mit Hilfe warmen Wassers überspült, auf 50 mL aufgefüllt und über einen Weißbandfilter (MN 640 Ø 125 mm) filtriert, wobei die ersten Milliliter des Filtrats verworfen wurden. Im Anschluss wurden je Probe 10 mL entnommen, 0,75 mL verdünnter HNO_3 (1 : 3) sowie 7,5 mL des Molybdat-Vanadat-Färbereagens hinzugefügt und auf 25 mL aufgefüllt. Nach frühestens einer halben Stunde wurde bei 450 nm photometrisch gemessen, und die P-Konzentrationen wurden in den einzelnen Proben mit Hilfe der Kalibrierreihe errechnet.

2.8 Bodenanalysen

CAL-Extraktion und Bestimmung der P-Konzentration

Nach der Trocknung bei 40 °C im Trockenschrank wurde der Boden gemörsert und auf 2 mm gesiebt, um ihn für die Extraktion vorzubereiten. Für die Extraktion wurden 5 g Boden in 250 mL-PE-Plastikflaschen eingewogen, ein kleiner Maßlöffel (zylindrische Form, 1 cm lang, Ø ca. 0,5 cm) Aktivkohle hinzugefügt und anschließend 100 mL der CAL-Gebrauchslösung dazugegeben. Die Vorratslösung besteht aus 395 g Calciumacetat, 770 g Calciumlactat und 895 mL Eisessig in 10 L, die bei Bedarf auf 1 : 5 für die Gebrauchslösung verdünnt wird (Schüller 1969). Die Flaschen wurden mit nur leicht angedrehtem Deckel auf einen Horizontalschüttler (Edmund Bühler SM) gestellt und für eine 1 h bei mit 120 horizontalen Bewegungen pro Minute (Einstellung 3,5) geschüttelt, damit freiwerdendes CO_2 entweichen konnte. Anschließend wurden die

Flaschen fest zugedreht und mit 160 horizontalen Bewegungen pro Minute (Einstellung 4,5) eine weitere Stunde geschüttelt. Danach konnte die Lösung über einen P-freien Faltenfilter MN 619 G $\frac{1}{4}$ filtriert (die ersten Milliliter des Filtrats wurden verworfen) und in 100 mL Plastikflaschen überführt werden (Abb. 2.6).



Abbildung 2.6: CAL-Extraktion

Um die P-Konzentration in den Extrakten zu bestimmen, wurde die Ammonium-Vanadat-Molybdat-Methode verwendet. 20 mL des Filtrats wurden entnommen, in einen 50 mL-Kolben überführt und mit 0,8 mL konzentrierter HNO_3 ($w = 65\%$) versetzt. Nach Durchmischung wurden 4 mL P-Gelb-Reagenz (bestehend aus Salpetersäure, Ammoniumvanadat und Ammoniummolybdat; genaue Zusammensetzung siehe (Schüller 1969)) zugegeben und erneut durchgemischt. Nach einer halben Stunde Wartezeit konnte gegen den Blindwert am Photometer bei 406 nm gemessen werden. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden und des Faktors von 0,437 ($P = P_2O_5 \times 0,437$) konnte im Anschluss die P-Konzentration im Boden errechnet werden.

Phosphat-Fraktionierung nach Kirmies

Für die Phosphat-Fraktionierung nach Kirmies (1972) wurden die einzelnen Bodenproben ähnlich der CAL-Methode aufbereitet (1 mm). Von dem homogenen Material wurden 5 g Boden in 250 mL-Polypropylen-Zentrifugenflaschen eingewogen. Um Ca^{2+} zu eliminieren, wurden 75 mL einer alkoholischen KCl-Lösung (Ethanol 99%ig : 1 M KCl, 6 : 4) hinzugefügt, 5 min auf dem Horizontalschüttler (Edmund Bühler SM) mit 180 horizontale Bewegungen pro Minute (auf Stufe 5) geschüttelt und anschließend 10 min bei 5520 g zentrifugiert (Beckman J2-21M/E Centrifuge). Der Überstand wurde verworfen. Diese Waschung wurde drei weitere Male wiederholt. Danach wurden zu der gewaschenen Bodenprobe 75 mL der nächsten Lösung (1 M NaOH/0,5 M Na_2SO_4), die zur Erfassung der Al-/Fe-Phosphate dient, gegeben, 1 h auf dem Horizontalschüttler auf Stufe 5,5 (200 horizontale Bewegungen pro Minute) geschüttelt und dann bei 5520 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde dann in einen 250 mL-Kolben überführt und ein zweites Mal 75 mL der Lösung zum Bodensatz zugegeben. Für 5 min wurden die Proben auf dem Horizontalschüttler auf Stufe 5 (180 horizontale Bewegungen pro Minute) aufgerührt, um danach für 2 h im Wasserbad (GFL Mot (100 °C, 60 horizontale Bewegungen pro Minute) zu verbleiben. Verdampftes Wasser wurde in dieser Zeit mit Reinstwasser immer wieder aufgefüllt und der Bodensatz aufgerührt. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte wiederum ein Zentrifugationsschritt (10 min; 5520 g), wobei der Überstand (Ü2) zu dem anderen Überstand (Ü1) in den 250 mL-Kolben überführt wurde. Danach wurde der Bodensatz einmal mit einer 4%igen (w/v) Na_2SO_4 -Lösung gewaschen, 5 min auf dem Horizontalschüttler aufgerührt, erneut zentrifugiert, dann der Überstand (Ü3) zu dem anderen (Ü1 + Ü2) hinzugefügt und der 250 mL-Kolben mit Reinstwasser aufgefüllt (Fraktion F1 = Al-/Fe-Phosphate). Von dieser Fraktion wurden 25 mL entnommen, in einen 100 mL-Kolben überführt und 5 mL 2,5 M H_2SO_4 hinzugefügt. Nach 30 min wurde mit Reinstwasser aufgefüllt und über Faltenfilter (MN 619 G ¼) in Plastikflaschen filtriert. 5 mL dieser F1-Fraktion wurden mit 1 M KOH gegen Nitrophenol-Indikator in einem 25 mL-Messkolben neutralisiert und mit der Phosphormolybdänblau-Methode nach Murphy & Riley (1962) angefärbt, aufgefüllt, geschüttelt und nach 30 min bei 750 nm photometrisch gemessen.

Für die zweite Fraktion (Fraktion F2 = Ca-Phosphate) wurden 75 mL der dritten Lösung (0,5 M H_2SO_4) zum Bodensatz gegeben, um die Ca-Phosphate zu extrahieren. Die Mischung wurde auf dem Horizontalschüttler wieder aufgerührt, um danach für 2 h in einem siedenden Wasserbad (100°C, 60 horizontale Bewegungen pro Minute) zu verbleiben. Nach dem Abkühlen erfolgte die erste Zentrifugation (10 min; 5520 g), wobei der Überstand in einen zweiten 250 mL-Kolben überführt wurde (Ü4). Anschließend wurden mit 75 mL der Waschlösung (4%ige (w/v) Na_2SO_4 -Lösung) die Reste der Lösung 3 entfernt, indem wiederum im Horizontalschüttler kurz aufgeschüttelt, zentrifugiert (10 min; 5520 g) und der Überstand (Ü5) in den Kolben für F2 überführt wurde. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt (Ü6) und der Kolben mit Reinstwasser aufgefüllt. Hiervon wurden dann 1,25 mL entnommen, in einem 25 mL-Messkolben mit 1 M KOH gegen Nitrophenol-Indikator neutralisiert und mit der Phosphormolybdänblau-Methode angefärbt und wie oben genannt anschließend am Photometer gemessen.

Die dritte Fraktion (P_{org}) wurde aus der ersten gewonnen. Hierzu wurden 25 mL von F1 entnommen, in einen 100 mL-Kolben gegeben und mit 2 mL konzentrierter H_2SO_4 ($\rho = 1,84 \text{ g/L}$) sowie 0,5 mL HClO_4 ($\rho = 1,53 \text{ g/L}$) ergänzt. Anschließend wurden die Proben auf ein Sandbad (150-160°C) gestellt und so lange gekocht, bis das gesamte Wasser verdampft war und weiße Schwefeldämpfe aufstiegen. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde 1 mL konzentrierte HNO_3 zugegeben und die Proben erneut auf das Sandbad gestellt. Nach weiteren ca. 2,5 h war der Aufschluss beendet, die Proben konnten abkühlen, wurden zum Schluss mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt (F3.1) und über P-freie Faltenfilter (MN 619 G $\frac{1}{4}$) gefiltert. Von dieser Lösung wurden 5 mL wie oben beschrieben angefärbt und anschließend gemessen. Der Anteil an P_{org} (F3) errechnete sich dann aus dieser Fraktion: $F3 = F3.1 - F1$.

Für den Gesamtaufschluss (A_{ges}) wurden 2,5 g Boden in einen 250 mL-Messkolben eingewogen, 10 mL H_2SO_4 ($\rho = 1,84 \text{ g/L}$) sowie 2 mL HClO_4 ($\rho = 1,53 \text{ g/L}$) zugegeben und auf dem Sandbad bis zur Verkohlungs erhitze. Nach dem Auflösen der Verkohlungs und dem Abkühlen der Proben wurden 2 mL konzentrierte HNO_3 zugefügt, die Proben erneut erhitzt und nach weiteren ca. 3 h war der Aufschluss beendet, wenn wiederum weiße Schwefeldämpfe aufstiegen. Nach dem Abkühlen der Proben konnte mit Reinstwasser aufgefüllt

werden und im Anschluss daran wurden über P-freie Faltenfilter (MN 619 G 1/4) die Proben gefiltert. Von dieser Fraktion wurden zum Schluss 1,25 mL mit der Phosphormolybdänblau-Methode wie oben beschrieben angefärbt und am Photometer gemessen.

Im Anschluss erfolgte die Berechnung der P-Konzentration der einzelnen Fraktionen.

Zur Übersicht:

$\bar{U}_1 + \bar{U}_2 + \bar{U}_3 = F1 = \text{Al-/Fe-Phosphate}$

$\bar{U}_4 + \bar{U}_5 + \bar{U}_6 = F2 = \text{Ca-Phosphate}$

$F3.1 - F1 = F3 = P_{\text{org}}$

$A_{\text{ges}} = F4 = \text{Gesamt-Phosphat}$

2.9 Statistik

Jede Variante eines Versuches wurde in mindestens dreifacher Wiederholung angelegt. Abweichungen hiervon wurden in der Versuchsbeschreibung kenntlich gemacht. Der Standardfehler wurde in Excel wie folgt berechnet: $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$ (s = Standardabweichung; n = Stichprobenumfang).

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit R bzw. R Studio (Version 3.0.2). Je nach Versuchsaufbau wurde ein zweiseitiger t-Test $p = 5\%$ oder eine ein- oder mehrfaktorielle ANOVA $p = 5\%$ durchgeführt, der ein Tukey-HSD-Anschluss test $p = 5\%$ folgte. Verschiedene Buchstaben zeigen hier signifikante Unterschiede zwischen den Varianten an. Für die Auswertung der *in vivo*- und *in vitro*-Versuche ist anzumerken, wurde mit OriginPro gearbeitet, um die Regressionanalyse mit der Funktion nach Hill (1910) durchzuführen.

Bei der Bodeninkubation I ist festzuhalten, dass meistens keine Varianzhomogenität vorlag, jedoch wurde trotzdem eine ANOVA durchgeführt, da die Variantengruppen alle gleich groß waren (Stevens 2007).

3 Ergebnisse

3.1 Bodeninkubation I - Einfluss von Bodentyp und Glucosegabe

Um zu testen, welchen Einfluss unterschiedliche Bodeneigenschaften auf die Mineralisation von organisch gebundenem Phosphat (P_{org}) haben, wurden fünf verschiedene Böden mit den drei verschiedenen Düngevarianten (P_0 , P_{min} , P_{org}) in Mitscherlichgefäßen inkubiert. Nach 71 Tagen erfolgte eine Erweiterung der Varianten, indem der Versuch geteilt und der einen Hälfte Glucose zur Unterstützung der mikrobiellen Aktivität hinzugefügt wurde. Die zu zehn Terminen gezogenen Bodenproben wurden auf CAL-verfügbares Phosphat untersucht, um festzustellen, ob durch mikrobielle Aktivität, und damit durch unterschiedliche Bodeneigenschaften, das organisch gebundene Phosphat mineralisiert wurde.

In der Abb. 3.1 (S. 45) sind die CAL-extrahierten Phosphatkonzentrationen der fünf verschiedenen Bodentypen im Zeitverlauf aufgeführt. Ab der Hälfte der Zeit ist neben den drei unterschiedlichen Düngeformen ($Ca(H_2PO_4)_2$, Na-Phytat und Kontrolle), der zusätzliche Faktor Glucosegabe eingetragen. In Abb. 3.1 a) ist die Mineralisierung von Na-Phytat im Luvisol Unterboden (pH 7,1) zu sehen, der schon in einer vorangegangenen Arbeit (Leppin 2007) untersucht wurde. Dabei wurde beobachtet, dass die Na-Phytat-Variante ca. ab Tag 30 einer Mineralisation unterlag. Diese Entwicklung zeigte sich auch im Experiment von (Leppin 2007) ab Tag 14. Die leicht lösliche, und damit leicht verfügbare Düngevariante, das $Ca(H_2PO_4)_2$ unterlag während der gesamten Inkubationszeit geringen Adsorptions- und Mineralisationsprozessen, also natürlichen Schwankungen. Erstaunlich ist, dass die 100 mg P, die pro kg

Boden zugefügt worden waren, selbst einen Tag nach Versuchsbeginn, durch die CAL-Extraktion in keinem der fünf Bodentypen mehr wiedergefunden werden konnten.

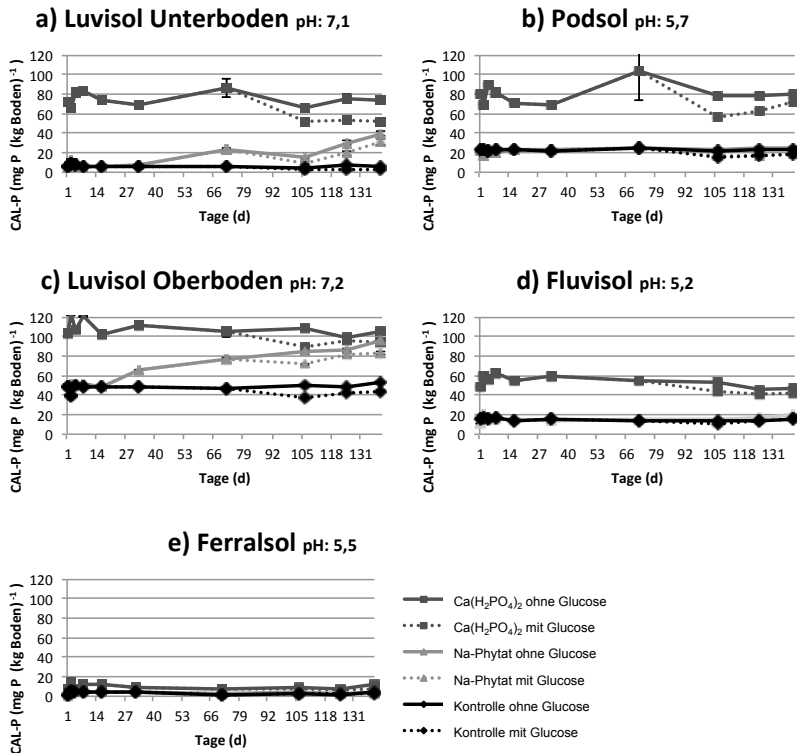


Abbildung 3.1: Einfluss fünf verschiedener Bodentypen (Luvisol Unterboden (a); Podsol (b); Luvisol Oberboden (c); Fluvisol (d) und Ferralsol (e)) und einmaliger Glucosegabe (10 mg (kg Boden)⁻¹) auf die Mineralisation (CAL-extrahierbares P) von Na-Hexaphytat (100 mg P (kg Boden)⁻¹), Ca(H₂PO₄)₂ (100 mg P (kg Boden)⁻¹) und Kontrolle im Verlauf von 140 Tagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier Wiederholungen dar. Statistische Auswertung siehe Tab. 3.1

Bis zum Tag 71 kann man bei allen fünf Böden gleichermaßen feststellen, dass sich die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante signifikant von den anderen beiden Varianten unterschied, d. h. dass in der Variante mit dem leicht verfügbaren Phosphatdünger signifikant mehr P in der CAL-extrahierbaren Form vorlag. Hingegen zeigte sich die Kontrollvariante im Vergleich zur Na-Phytat-Variante in diesem Zeitraum bei allen Böden mit Ausnahme des Ferralsols an Tag 32 und des Luvisol Oberbodens an Tag 71 als nicht signifikant verschieden (siehe Tab. 3.1).

In der zweiten Hälfte des Versuchs ab Tag 106 kam der zweite Faktor Glucose neben der P-Düngung hinzu. Das Erstaunliche hierbei ist, dass in allen fünf Böden der Trend, dass Glucose die CAL-P-Verfügbarkeit verminderte, zu erkennen ist.

Im Luvisol Unterboden (a) ist dieser Trend nur in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante statistisch abgesichert. Jedoch zeigte der Luvisol Unterboden ab Tag 106 signifikante Unterschiede zwischen den Varianten Na-Phytat und Kontrolle, unabhängig davon, ob mit oder ohne Glucose. Im Podsol (b) ließen sich die signifikanten Unterschiede zwischen der Variante mit und ohne Glucose nur in den Varianten $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ und Na-Phytat bestätigen. Die Kontrolle zeigte hier nur an Tag 106 signifikante Unterschiede, danach waren die Varianten mit und ohne Glucose bei der Kontrollvariante nicht signifikant verschieden. In der Abb. 3.1 (c) beim Luvisol Oberboden waren alle Varianten signifikant verschieden, mit Ausnahme an Tag 106 und 140 die Varianten $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ mit Glucose und Na-Phytat ohne Glucose sowie an Tag 125 die Varianten $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ mit und ohne Glucose. Im Fluvisol (d) zeichnete sich an Tag 106 und 125 ab, dass die Varianten Na-Phytat und Kontrolle, unabhängig von der Glucose, nicht signifikant verschieden waren. Jedoch besaß in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante an allen drei folgenden Probeentnahmetagen (106, 125 und 140) die Variante ohne Glucosegabe eine signifikant höhere P-Konzentration als die mit Glucose. An Tag 140 unterschieden sich hingegen die Varianten Na-Phytat mit Glucose, Kontrolle mit und ohne Glucose nicht voneinander. Die Na-Phytat-Variante ohne Glucose war signifikant geringer in der P-Konzentration als die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Varianten, und signifikant höher als die Kontrollvarianten, aber sie unterschied sich nicht signifikant von der Na-Phytat-Variante mit Glucose. Im Ferralsol (e) unterschieden sich die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Varianten mit und ohne

Glucose nur an Tag 140, wobei hier die Variante ohne Glucose die höhere CAL-extrahierbare P-Konzentration aufwies. Die Na-Phytat- und die Kontrollvarianten unterschieden sich an allen 3 Tagen signifikant von der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante. Die Glucosegabe führte nur in der Kontrollvariante zu signifikanten Unterschieden an Tag 125 und 140. Wobei hierzu zu sagen ist, dass insgesamt die Konzentrationen im Ferralsol sehr gering waren und es dadurch nicht verwunderlich erscheint, dass an Tag 125 die Variante mit Glucose, an Tag 140 aber die ohne Glucose signifikant niedriger war. Hervorzuheben in diesem Versuch ist die Tatsache, dass nur in einem Bodentyp, dem Luvisol Oberboden, die Konzentration des CAL-extrahierbaren P der Na-Phytat-Variante durch Mineralisation das gleiche Niveau wie die der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante erreichte.

Tabelle 3.1: Statistische Auswertung zu Abb. 3.1. Buchstaben nur pro Tag und pro Bodentyp vergleichbar.

Boden	Tag	Einfaktorielle ANOVA							Glucose	Zweifaktorielle ANOVA		
		1	2	4	8	16	32	71		106	125	140
Luvisol Unterboden	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	a	a	a	a	a	a	a	ohne mit	a	a	a
	Na-Phytat	b	b	b	b	b	b	b	ohne mit	c	c	c
	Kontrolle	b	b	b	b	b	b	b	ohne	d	d	d
									mit	d	d	d
Podsol	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	a	a	a	a	a	a	a	ohne mit	a	a	a
	Na-Phytat	b	b	b	b	b	b	b	ohne mit	c	c	c
	Kontrolle	b	b	b	b	b	b	b	ohne	d	d	d
									mit	c	cd	cd
Luvisol Oberboden	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	a	a	a	a	a	a	a	ohne mit	a	a	a
	Na-Phytat	b	b	b	b	b	b	b	ohne mit	b	b	b
	Kontrolle	b	b	b	b	b	b	c	ohne	c	c	c
									mit	d	d	d
Fluvisol	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	a	a	a	a	a	a	a	ohne mit	a	a	a
	Na-Phytat	b	b	b	b	b	b	b	ohne mit	b	b	b
	Kontrolle	b	b	b	b	b	b	b	ohne	c	c	c
									mit	c	c	cd
Ferralsol	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	a	a	a	a	a	a	a	ohne mit	a	a	a
	Na-Phytat	b	b	b	b	b	b	b	ohne mit	a	a	b
	Kontrolle	b	b	b	b	b	c	b	ohne	bc	b	c
									mit	c	b	d

In der Abb. 3.2 S. 49 ist der Einfluss der Bodentypen und der einmaligen Glucosegabe auf die relative Mineralisation zu sehen. In dieser Darstellung wird noch einmal verdeutlicht, wie stark die Bodentypen jeweils das Na-Phytat mineralisierten im relativen Vergleich zu der mineralisch gedüngten $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante. Hierzu wurden die jeweiligen Kontrollvarianten von den P-gedüngten Varianten abgezogen und ins Verhältnis zu der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante ohne Glucosegabe, nach Abzug der entsprechenden Kontrollvariante, gesetzt, da diese in allen Fällen die höchste CAL-P-Konzentration hatte:

Luvisol Oberboden als Beispielrechnung:

Variante Na-Phytat mit Glucose

$$\frac{\text{Na-Phytat}_{\text{mit Glucose}} - \text{Kontrolle}_{\text{mit Glucose}}}{\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \text{ ohne Glucose} - \text{Kontrolle}_{\text{ohne Glucose}}} \times 100\% = 68,3\%$$

Variante Na-Phytat ohne Glucose

$$\frac{(\text{Na-Phytat}_{\text{ohne Glucose}} - \text{Kontrolle}_{\text{ohne Glucose}})}{\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \text{ ohne Glucose} - \text{Kontrolle}_{\text{ohne Glucose}}} \times 100\% = 81,8\%$$

Dadurch ist der direkte Vergleich zwischen den Varianten einfacher. Man kann erkennen, dass die relative Mineralisation der Variante Luvisol Oberboden Na-Phytat ohne Glucose (81,8%) das gleiche Niveau erreichte wie die P-Konzentration der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante mit Glucose (92,1%). D. h., dass in diesem Bodentyp nach 140 Tagen die CAL-extrahierbare P-Konzentration der Na-Phytat-Variante ohne Glucose statistisch nicht verschieden zur $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante mit Glucose war. Das Na-Phytat konnte also zum Großteil in diesem Boden mineralisiert werden. Ein anderer Bodentyp - der Luvisol Unterboden - schaffte dies nur zu 48,9% (Na-Phytat ohne Glucose) im Bezug auf die P-Konzentration der leicht löslichen $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante ohne Glucose. Der Podsol (b), der Fluvisol (d) und der Ferralsol (e) zeigten hingegen wenig bis gar keine Netto-Mineralisationsprozesse des Na-Phytats. Außerdem ist auch in dieser Grafik (Abb. 3.2) erkennbar, dass die Varianten mit Glucose jeweils verglichen mit der Variante ohne Glucose, den Trend aufwiesen, bzw. statistisch abgesichert, geringere CAL-extrahierbare P-Konzentrationen besaßen.

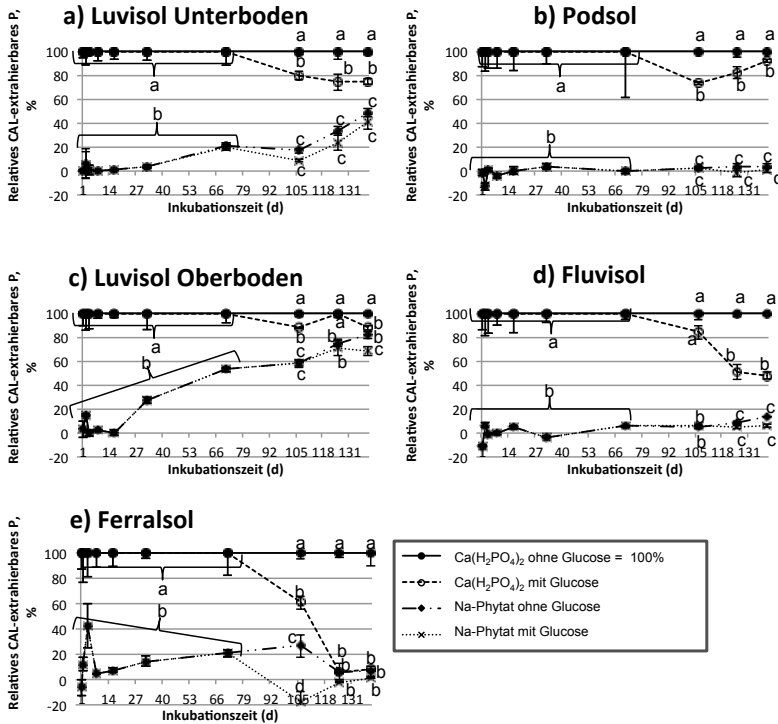


Abbildung 3.2: Einfluss fünf verschiedener Bodentypen (Luvisol Unterboden (a); Podsol (b); Luvisol Oberboden (c); Fluvisol (d) und Ferralsol (e)) und einer einmaligen (an Tag 71) Glucosegabe (10 mg (kg Boden)⁻¹) auf die relative Mineralisation. CAL-extrahierbares P der Ca(H₂PO₄)₂-Variante (ohne Glucosegabe) nach Abzug der entsprechenden Kontrollvariante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert ± Standardfehler aus vier Wiederholungen dar. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA + Tukey HSD 5%. Buchstaben sind jeweils nur pro Tag und pro Bodentyp vergleichbar.

3.2 Bodeninkubation II - Einfluss des Boden-pH-Wertes

In diesem Versuch lag der Schwerpunkt darauf, herauszufinden, ob der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf den Mineralisationsprozess von Na-Phytat ausübt. Hierzu wurden fünf verschiedene Bodentypen für 140 d inkubiert. Als weitere Faktoren dienten, neben dem Bodentyp, die P-Düngung (Na-Phytat bzw. Kontrolle P_0), die Inkubationstemperatur (15°C bzw. 25°C) und der pH-Wert (ursprünglicher oder mittels CaCO_3 auf pH 7,2 angehobener pH-Wert).

Zu Beginn wurden die Ausgangsböden mittels Kurmies-Fraktionierung analysiert (Abb. 3.3).

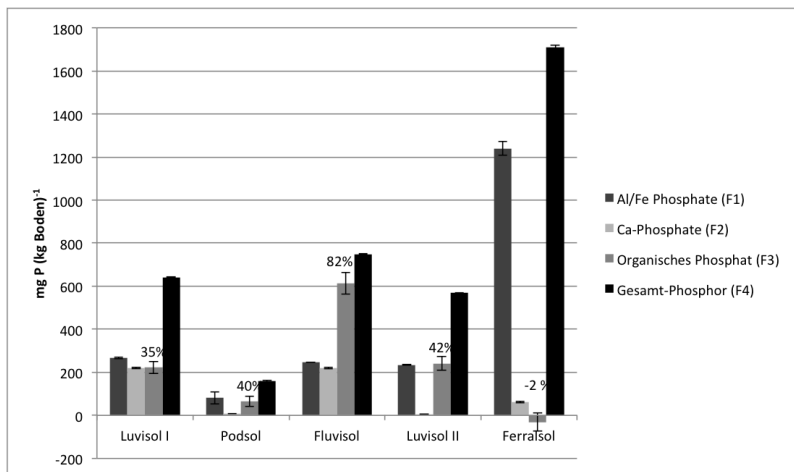


Abbildung 3.3: Phosphat-Fraktionierung nach Kurmies der einzelnen Versuchsausgangsböden. Die Prozentangabe ist der Anteil an P_{org} am Gesamt-Phosphat. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus zwei chemischen Wiederholungen dar.

Deutlich zu sehen ist hier die Vielfalt der Bodentypen hinsichtlich der Phosphat-Fractionen. Der Luvisol I zeigte relativ gleiche Anteile an Al-/Fe-, Ca-Phosphaten und P_{org} . Der Podsol besaß insgesamt eine geringe Menge an Gesamtphosphat, wovon in etwa die eine Hälfte aus Al-/Fe-Phosphaten be-

stand, die andere Hälfte P_{org} war. Der Fluvisol zeigte ungefähr gleiche Anteile an Al-/Fe- wie an Ca-Phosphaten und einen relativ hohen Anteil von P_{org} (82% des Gesamtphosphats). Auffällig ist hier, dass die Summe aller Fraktionen höher war, als der Gesamtaufschluss. Hierbei handelt es sich um Ungenauigkeiten, die sich trotz hoher Präzision in der Versuchsdurchführung bei dieser aufwändigen Methode nicht vermeiden lassen. Vermutlich wurde in Fraktion 4 nicht alles aufgeschlossen. In Luvisol II setzten sich die Fraktionen hauptsächlich aus Al-/Fe-Phosphaten und aus P_{org} zusammen. Der Ferralsol mit der höchsten Phosphat-Gesamt-Konzentration bestand hauptsächlich aus Al-/Fe-Phosphaten. Hier zeigten sich ebenfalls Diskrepanzen zwischen dem Gesamtaufschluss (F4) und der Summe aller Fraktionen, die hier geringer war als F4. Dabei handelt es sich, wie oben schon erwähnt, um Ungenauigkeiten, die sich bei der Anwendung dieser Methode nicht vermeiden lassen. Jedoch erhält man durch diese Fraktionierung eine Vorstellung, welche Phosphatfraktionen quantitativ in den einzelnen Böden vorkommen.

In Abb. 3.4 (S. 52) ist die Netto-Mineralisation der Na-Phytat-Variante, d. h.

$$CAL-P_{Na-Phytat} - CAL-P_{Kontrolle}$$

unter Einfluss der fünf Bodentypen, des pH-Werts und der Temperatur zu sehen, wobei hier der Faktor pH-Wert durch die Darstellung im Vordergrund liegt. Um zu prüfen, ob und wie stark die Faktoren die Netto-Mineralisation beeinflussen, wurde eine mehrfaktorielle ANOVA durchgeführt. Die stärkste Varianzursache, laut F-Wert der mehrfaktoriellen ANOVA ($F = 235,82$), ist der Bodentyp, der einen entscheidenden Einfluss auf die Mineralisation von Na-Phytat hatte. Der pH-Wert sowie die Wechselwirkungen zwischen pH-Wert und Bodentyp, beeinflussten die Netto-Mineralisation ebenfalls signifikant, bei einem F-Wert von 28,81 bzw. 13,67. Die Temperatur beeinflusste den Mineralisationsprozess in diesem Versuch hingegen nicht signifikant. Genauso die Wechselwirkungen von Temperatur und Bodentyp, Temperatur und pH sowie Temperatur, pH und Bodentyp beeinflussten den genannten Prozess hier nicht. In der Abb. 3.4 ist bei den beiden pH-Varianten des Luvisol I jeweils derselbe Wert zu erkennen, da dieser als Kontrollboden einen ursprünglichen pH-Wert von 7,2 aufwies und somit nicht aufgekalkt werden musste. Es wurde deshalb nur jeweils eine Variante bei 15 °C und eine bei 25 °C mitgeführt. Im Vergleich

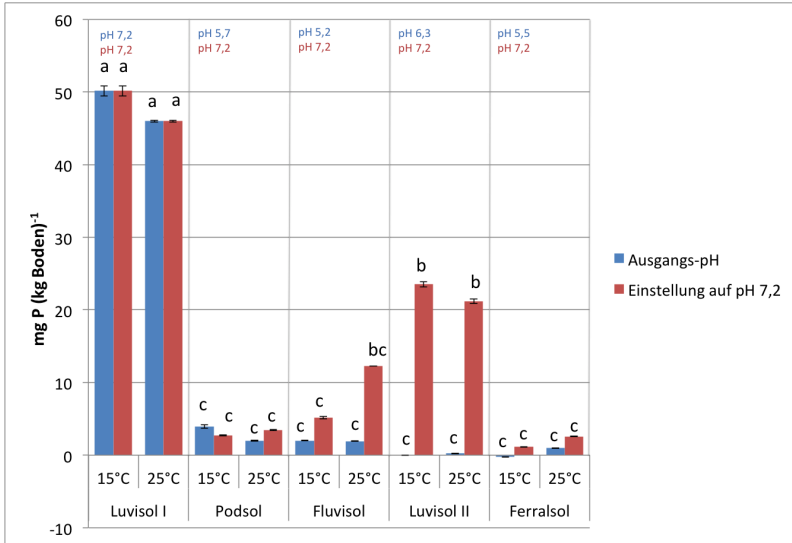


Abbildung 3.4: Einfluss des Boden-pH-Wertes fünf verschiedener Bodentypen und zwei verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Mineralisation von Na-Phytat. CAL-extrahierbarer P der Na-Phytat-Variante nach Abzug der entsprechenden Kontrollvariante in $\text{mg P (kg Boden)}^{-1}$ nach 140 Tagen Inkubationszeit. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: 3-fakt. ANOVA + Tukey-HSD 5%.

mit Abb. 3.1 ist zu sehen, dass hier ähnliche Werte der Netto-Mineralisation (ca. 50 mg P kg^{-1}) nach 140 d zu verzeichnen waren, was eine Wiederholbarkeit des Prozesses nahelegt. Im Vergleich der Mittelwerte konnten drei Gruppen unterschieden werden. Der Luvisol I, also der Kontrollboden, erreichte die höchste Netto-Mineralisation mit $50,15 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ (15°C) und $45,98 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ (25°C). Die zweithöchste Gruppe erreichten die Varianten Fluvisol 25°C pH 7,2, Luvisol II 15°C pH 7,2 und 25°C pH 7,2 mit $12,28 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$, $23,51 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ und $21,18 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$. Diese Varianten des Luvisols II unterschieden sich damit jeweils signifikant in ihren P-Konzentrationen von den dazugehörigen Varianten mit ursprünglichem pH-Wert. Alle anderen Varianten des Podsoles, des Ferralsols und auch

alle Varianten des Fluvisols unterschieden sich untereinander nicht signifikant und gehören damit zur dritten Gruppe, in der am wenigsten netto mineralisiert wurde ($-0,24$ bis $+12,27$ mg P (kg Boden) $^{-1}$).

3.3 Pflanzenanzucht I - Einfluss der Pflanzenart auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen am Beispiel der Kartoffel (*Solanum tuberosum* cv. Belana)

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Kartoffel auf ihre Eigenschaften hinsichtlich P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen zu überprüfen. Die Kartoffeln wurden in einem Unterboden-Sandgemisch inklusive Nährstoffe angezogen und mit drei verschiedenen P-Varianten (Kontrolle, Na-Phytat und $Ca(H_2PO_4)_2$) gedüngt. Im Versuch wurde auch noch Maismehl in drei verschiedenen hohen Mengen als natürliche P_{org} -Quelle gedüngt.

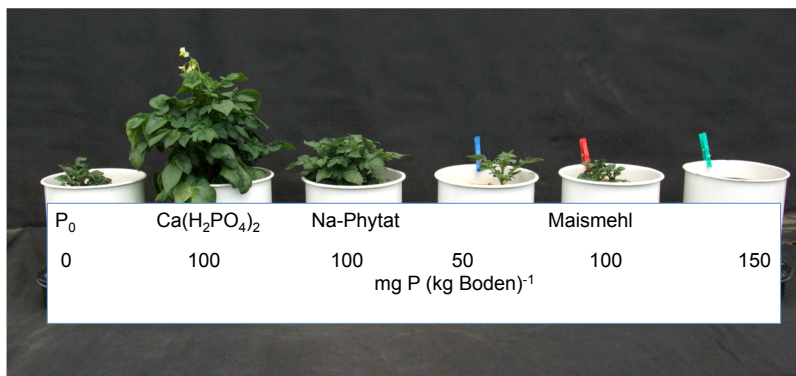


Abbildung 3.5: Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf das Wachstum von Kartoffel cv. Belana

Bei den mit Maismehl gedüngten Varianten stellte sich jedoch eine, möglicherweise durch Inhaltsstoffe des Maismehls verursachte, hemmende Wirkung auf das Wachstum der Kartoffelpflanzen heraus (Abb. 3.5 S. 53), sodass diese Varianten bei der Auswertung der Pflanzenergebnisse nicht weiter berücksichtigt und ausschließlich bzgl. der gezogenen Bodenproben (Abb. 3.6) ausgewertet wurden.

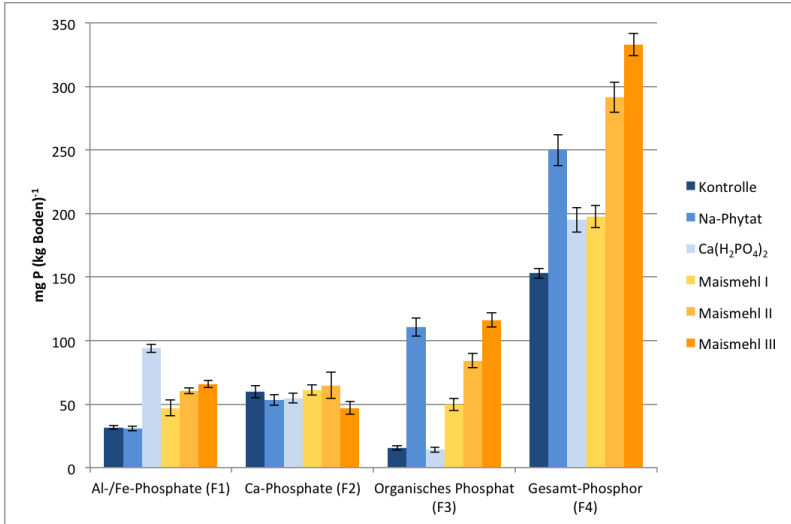


Abbildung 3.6: Phosphat-Fraktionierung nach Kurmies des Luvisol Unterbodens an Tag 2 mit unterschiedlichen P-Düngevarianten zur Wiederfindung der P-Düngegaben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus sechs biologischen Wiederholungen mit je zweifacher chemischer Wiederholung dar.

In der Abb. 3.6 wurde zum einen dargestellt, inwieweit die verschiedenen P-Gaben mit der Kurmies-Methode wiedergefunden werden können, zum anderen sollten die Fraktionen der einzelnen Düngegaben erfasst werden. Betrachtet man die Fraktion der Al-/Fe-Phosphate, ist zu erkennen, dass mit der Na-Phytatgabe Al-/Fe-Phosphate nicht zunehmen. Mit der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Gabe wurden durch die Kurmies-Methode $62,32 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ in dieser Fraktion 1 erfasst. Mit dem Maismehl war ebenfalls Phosphat gedüngt worden, welches der Al-/Fe-Phosphat-Fraktion zuzuordnen war. Mit zunehmender Maismehlgabe erhöhte sich auch die Konzentration der Al-/Fe-Phosphate. Die zweite Fraktion, die Ca-Phosphate, wurden durch die Düngegaben kaum beeinflusst. Die Fraktion der organischen Phosphate erhöhte sich bei der Na-Phytat-Variante gegenüber der Kontrollvariante um $95 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$, d. h., dass fast die komplette P-Gabe ($100 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) mit dieser Methode erfasst wurde. Auch das Maismehl zeigte einen hohen Anteil an organi-

schem Phosphat: Die Gabe mit $50 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ fand sich in der Summe von F1 bis F3 ($= 50,97 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) vollkommen mit dieser Methode wieder. D. h., dass jeweils nach Abzug der Kontrollvariante in F1 $15,34 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$, F2 $1,57 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ und in F3 $34,06 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ für die Variante Maismehl I wiedergefunden wurden. Bei Maismehl II konnte ebenfalls die P-Gabe von $100 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ wiedergefunden werden: hier ergibt die Summe aus F1 ($28,95 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$), F2 ($5,09 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) und F3 ($68,57 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$) einen Wert von $102,61 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$. Betrachtet man die Summe der einzelnen Fraktionen bei der Variante Maismehl III, erreichte diese nicht ganz die $150 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$, die gedüngt worden waren. Hier waren es $122,20 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$, da die Fraktion 2 in dieser Variante einen negativen Wert nach Abzug der Kontrollvariante aufwies. Stellt man diesem Wert den Gesamtaufschluss der Fraktion 4 gegenüber, zeigt sich wiederum ein anders Bild. Hier konnten mit der Kurmies-Methode $96,88 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ (≈ 100) in der Na-Phytat-Variante wiedergefunden werden, in der $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$ dagegen nur $42,09 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ ($\ll 100$) nach Abzug der Kontrollvariante. Die Maismehlvarianten zeigten ein ebenfalls gemischtes Bild, in der Maismehl I-Variante konnten im Gesamtaufschluss $44,58 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ (< 50), in der Maismehl-II-Variante $138,47 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ ($\gg 100$) und in der Maismehl-III-Variante $179,99 \text{ mg P (kg Boden)}^{-1}$ ($\gg 150$) gemessen werden. Wie in Kapitel 3.2 Bodeninkubation II, Abb. 3.3 S. 50 bereits erwähnt, sind diese Ungenauigkeiten ein Nachteil dieser Methode.

Die Auswertung der Frischmasse ergab folgende Ergebnisse (Abb. 3.7 S. 56): Mit 181 g Sprossfrischmasse bzw. 420 g Gesamtfischmasse pro Gefäß war die $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante die Variante mit der größten Frischmasse. Die Na-Phytat-Variante folgte mit 51 bzw. 160 g und die Kontrolle mit 34 bzw. 135 g . Sowohl die Frischmasse des Sprosses als auch die Gesamtfischmasse der Variante mit $\text{Ca(H}_2\text{PO}_4)_2$ unterschied sich daher signifikant von der Kontroll- und der Na-Phytatvariante.

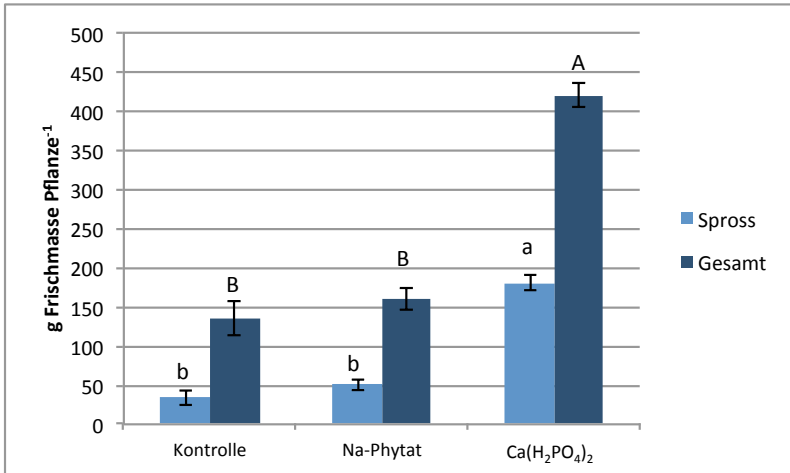


Abbildung 3.7: Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf die Frischmasse der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*) cv. Belana. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier (Kontrolle) bzw. sechs (Na-Phytat und $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) Wiederholungen dar. Statistik: Jeweils (Spross bzw. Gesamtfrischmasse) einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.

Dies spiegelte sich auch in der P-Konzentration wider (Abb. 3.8 S. 57). Hier zeigte sich, abgesehen von der Mutterknolle und den neu gebildeten Knollen, sogar noch eine differenziertere Aufspaltung der Varianten. Im Spross, in der Wurzel und in der Gesamtkonzentration, also dem Mittelwert aller Pflanzenteile, unterschieden sich alle drei Varianten signifikant voneinander.

Die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante erreichte im Spross eine P-Konzentration von $3,9 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$, hingegen die Na-Phytat-Variante nur $2,9 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$ und die Kontrollvariante lediglich $1,8 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$.

In der Wurzel war die Abstufung ähnlich: hier war die höchste Konzentration $3,3 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$ in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante, gefolgt von $1,9$ und $1,4 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$ in der Na-Phytat bzw. Kontrollvariante. Die Mittelwerte aus Spross, Wurzel, neuen Knollen und Mutterknolle ergaben folgende P-Konzentrationen: die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante hatte im Schnitt $3,2 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$, die Na-Phytat-Variante $2,4 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$ und die Kontrollvariante $1,5 \text{ mg P (g TM)}^{-1}$.

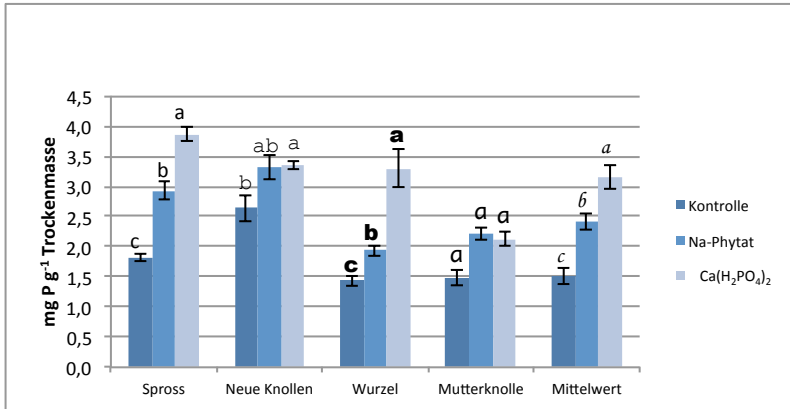


Abbildung 3.8: Einfluss verschiedener P-Düngemittel auf die P-Konzentration der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*) cv. Belana. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier (Kontrolle) bzw. sechs (Na-Phytat und Ca(H₂PO₄)₂) Wiederholungen dar. Ausnahme: Neue Knollen: n = 2 (Kontrolle); n = 4 (Na-Phytat); n = 6 (Ca(H₂PO₄)₂). Statistik: Je Pflanzenteil einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.

Wenn man die neuen Knollen separat betrachtet, unterschieden sich nur die P-Konzentrationen der Kontroll- und Ca(H₂PO₄)₂-Variante (2,6 und 3,3 mg P (g TM)⁻¹) signifikant voneinander. Die Na-Phytatvariante lag mit 3,3 mg P (g TM)⁻¹ und einem größeren Standardfehler, als die Ca(H₂PO₄)₂-Variante, dazwischen. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass nur zwei Pflanzen der Kontrollvariante neue Knollen bildeten, vier der Na-Phytat-Variante und alle Pflanzen der Ca(H₂PO₄)₂-Variante. Die P-Konzentration der Kontrollvariante in der Mutterknolle lag bei 1,5 mg P (g TM)⁻¹ und damit tendenziell geringer als die der Na-Phytat- (2,2 mg P (g TM)⁻¹) und Ca(H₂PO₄)₂-Variante (2,1 mg P (g TM)⁻¹). Jedoch unterschieden sie sich nicht signifikant voneinander.

Betrachtet man nun den P-Gehalt pro Pflanze und setzt die Na-Phytat-Variante, nach Abzug der Kontrollvariante, ins Verhältnis zur Ca(H₂PO₄)₂-Variante, ebenfalls nach Abzug der Kontrollvariante, erhält man die relative Aneignungseffizienz. Diese liegt bei der Kartoffel bei 11% (Abb. 3.9).

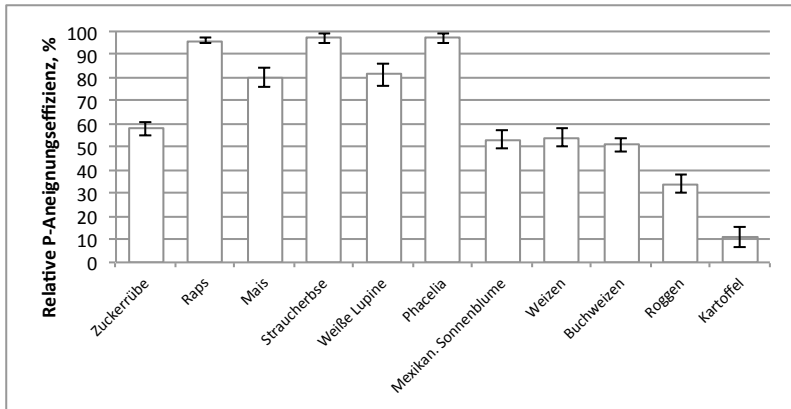


Abbildung 3.9: Relative P-Aneignungseffizienz verschiedener Kulturarten für Na-Phytat. P-Aufnahme der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei bzw. sechs (Kartoffel) Wiederholungen dar. Grafik modifiziert nach Steffens et al. (2010).

3.4 Pflanzenanzucht II - Einfluss eines Oberbodens auf die P-Aneignung aus P_{org} -Verbindungen von Raps und Kartoffel

In diesem Versuch wurde untersucht, wie ein biologisch aktiver Oberboden die Aneignungseffizienz von organisch gebundenem Phosphor beeinflusst. Der Versuch sollte helfen zu verstehen, ob die Aneignung maßgeblich durch die Pflanze beeinflusst wird oder ob auch der Boden eine entscheidende Rolle spielt.

(a) *Solanum tuberosum* cv. Belana(b) *Solanum tuberosum* cv. Marabel(c) *Brassica napus* cv. Carousel

Abbildung 3.10: Einfluss von drei P-Düngevarianten (von links nach rechts: Kontrolle, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Na-Phytat) auf den Frischmasseertrag von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. a) *Solanum tuberosum* cv. Belana; b) *Solanum tuberosum* cv. Marabel; c) *Brassica napus* cv. Carousel

Die Vermutung, die in der Abb. 3.10 mit dem bloßen Auge auftaucht, kann mit der Abb. 3.11 (S. 60) statistisch nachgewiesen werden, dass sich bei allen Genotypen die mit P gedüngten Varianten in ihrer Frischmasse innerhalb der Genotypen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Jedoch zeigte die Kontrollvariante in allen drei Fällen eine statistisch signifikant geringere Frischmasse. Das gleiche Bild zeigte sich auch bei der P-Konzentration (Abb. 3.12 S. 60). Hier ist hervorzuheben, dass sich auch die P-Konzentration sowohl in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante, als auch in der Na-Phytat-Variante, nicht signifikant voneinander unterscheiden. Nur die Kontrollvariante ohne P-Düngung wies eine signifikant geringere P-Konzentration gegenüber den anderen Varianten auf. Dies war bei allen drei Genotypen zu beobachten.

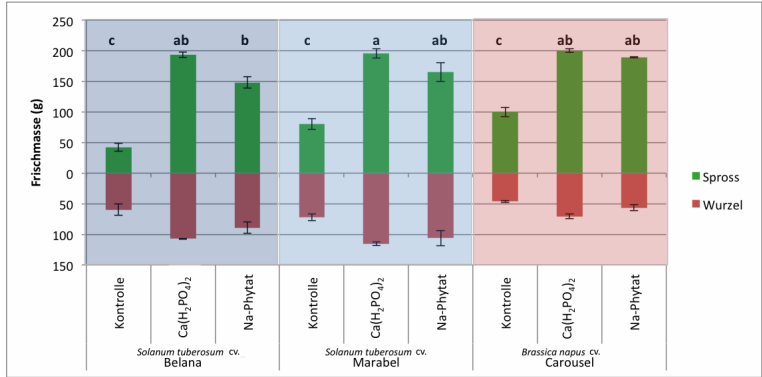


Abbildung 3.11: Einfluss von drei P-Düngevarianten auf den Frischmasseertrag von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA über Gesamtfrischmasse + Tukey-HSD 5%.

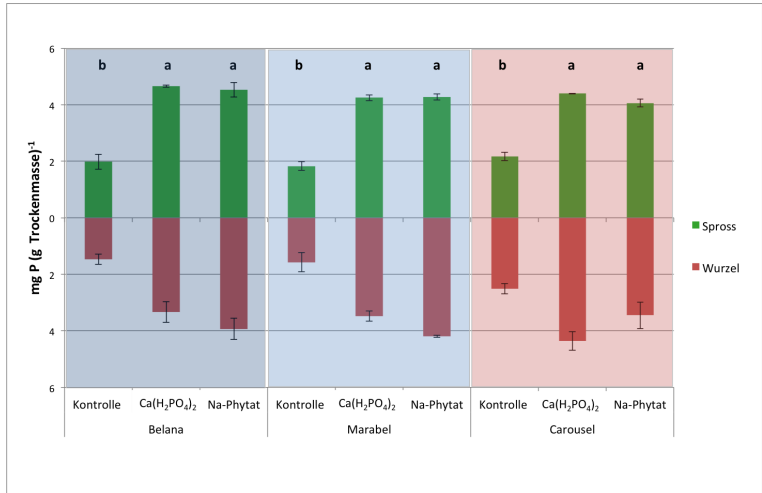


Abbildung 3.12: Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die P-Konzentration von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Zweifaktorielle ANOVA über Gesamtkonzentration + Tukey-HSD 5%.

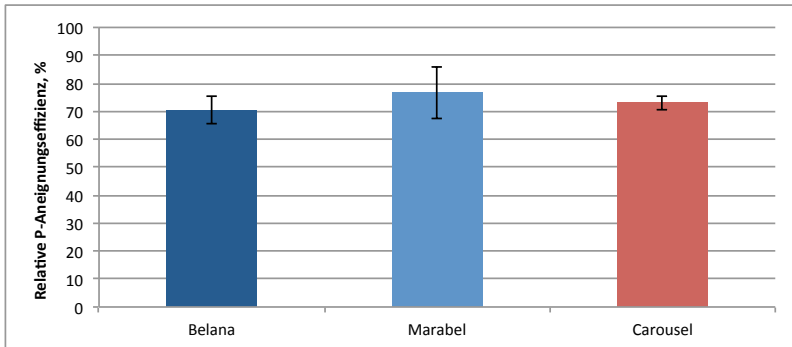


Abbildung 3.13: Relative P-Aneignungseffizienz der drei Genotypen für Na-Phytat. P-Aneignung der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante = 100%. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.

In der Abb. 3.13 ist die relative P-Aneignungseffizienz der drei Genotypen für Na-Phytat zu sehen. Alle drei Genotypen zeigten eine Aneignungseffizienz im Vergleich zur $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante von ca. 70%. Sie unterschieden sich also nicht signifikant voneinander. Im Vergleich zu den 100% der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante war die Aneignungseffizienz der Na-Phytatvariante von Belana signifikant geringer, wie auch die von Carousel. Marabel hingegen unterschied sich nicht signifikant in der Aneignungseffizienz zwischen den beiden Düngevarianten.

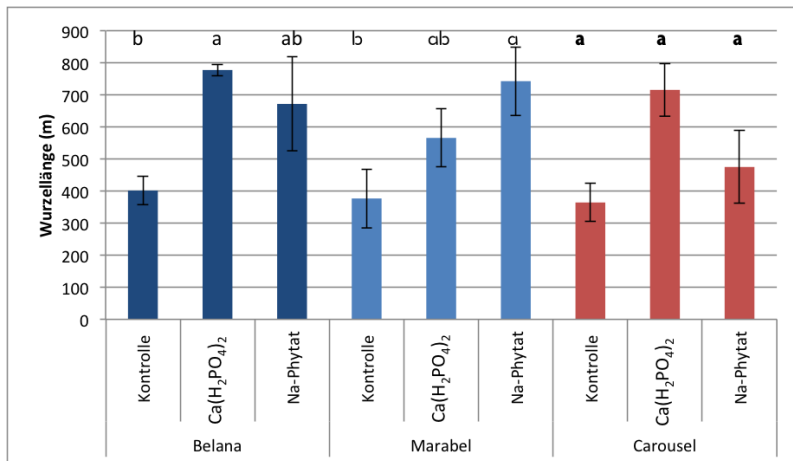


Abbildung 3.14: Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die Wurzellänge von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.

In der Abb. 3.14 ist die gesamte Wurzellänge der drei Genotypen dargestellt. Bei allen drei Genotypen war die Kontrolle die Variante mit der geringsten Wurzellänge (Belana 402 m, Marabel 377 m, Carousel 365 m). Bei Belana folgte dann die Variante mit Na-Phytat mit einer Länge von 672 m und dann die Variante mit $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ mit 778 m, welche sich signifikant von der Kontrollvariante unterschied. Beim Raps erkennt man das gleiche Schema, hier unterschieden sich alle drei Varianten auf dem gewählten Niveau von 5% nicht voneinander. Hier lag die Na-Phytat-Variante bei 475 m und die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante bei 716 m. Die zweite Kartoffelsorte Marabel hatte eine Wurzellänge von 743 m in der Na-Phytatvariante und 566 m in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante. Hier unterschied sich die Kontrollvariante signifikant von der Na-Phytat-Variante.

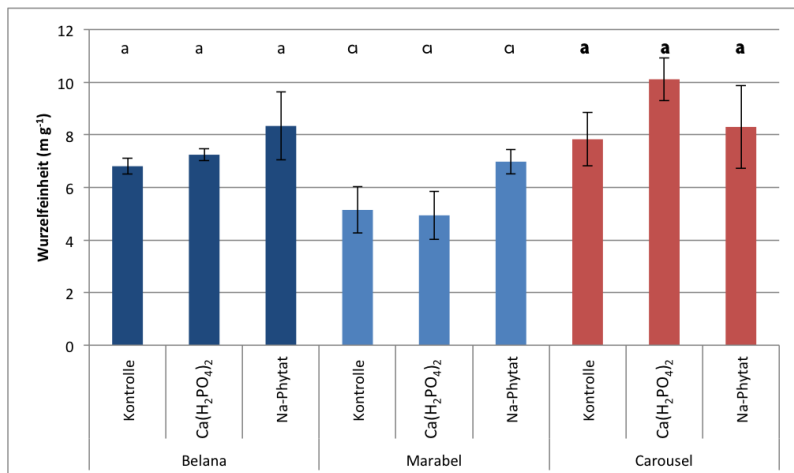


Abbildung 3.15: Einfluss von drei P-Düngevarianten auf die Wurzelfeinheit von Kulturpflanzen auf Oberboden Luvisol II. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA über den jeweiligen Genotyp + Tukey-HSD 5%.

Die Abb. 3.15 zeigt die Wurzelfeinheit, die als Länge pro g Wurzelfrischmasse gemessen wird. Es konnten innerhalb der Sorten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei Durchführung einer zweifaktoriellen ANOVA, erkannte man aber den durchaus nachvollziehbaren Einfluss der Sorte, hier gab es Unterschiede zwischen Marabel und Carousel (hier nicht dargestellt), jedoch sollte in dieser Abbildung der Fokus auf dem Einfluss der P-Düngung liegen. Dieser war allerdings bei diesem Parameter statistisch nicht nachweisbar. Die geringste Wurzelfeinheit zeigte Marabel in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante mit $4,94 \text{ m g}^{-1}$, die höchste zeigte Carousel mit $10,11 \text{ m g}^{-1}$ in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante.

3.5 Pflanzenanzucht III: Aktivitätsmessung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vivo* von Raps und Kartoffel

Nachdem festgestellt worden war, dass die Kartoffel cv. Belana eine sehr niedrige P-Aneignungseffizienz hinsichtlich Na-Phytat besaß (Abb. 3.9, S. 58), sollten die Gründe dieser Schwäche untersucht werden. Dazu wurde ein Wasserkulturversuch angelegt und die Pflanzen unter P-Mangel angezogen. Eine weitere Kartoffelsorte cv. Marabel und als Kontrollvergleich die Rapsorte cv. Carousel wurden als Versuchspflanzen ergänzt. Nach der P-Mangelphase wurden die Pflanzen ihren Gefäßen entnommen und die Wurzeln der intakten Pflanzen in ein Medium mit NPP getaucht, um die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase messen zu können.

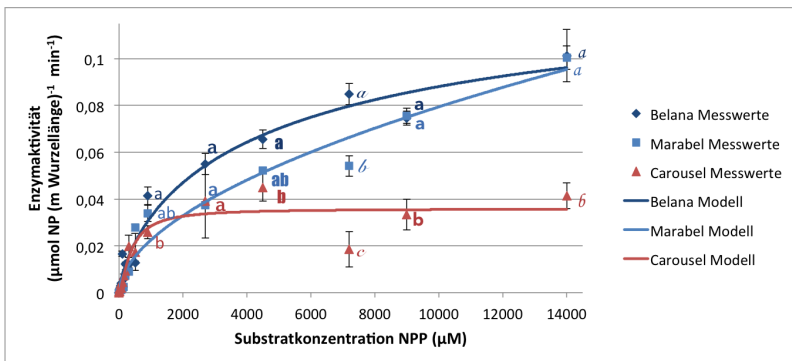


Abbildung 3.16: Einfluss verschiedener Substratkonzentrationsstufen auf die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vivo*. Dargestellt ist jeder Datenpunkt als Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei biologischen Wiederholungen und die dazugehörige Regressionsanalyse („Modell“). Statistik: Einfaktorielle ANOVA (der Datenpunkte) + Tukey-HSD 5% je Konzentrationsstufe (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten). Buchstaben nur innerhalb einer Konzentrationsstufe vergleichbar. Signifikanzen der unteren Konzentrationsstufen siehe Anhang Tab. 7.1.

In Vorversuchen wurden die freien, von der Wurzel abgeschiedenen Phosphatasen extra gemessen (nicht gezeigt). Hierbei stellte sich heraus, dass nur ca. 0,5 bis 3% des $V_{\max}$ -Wertes der Gesamtposphatase (= wurzelgebundene + freie Phosphatase) erreicht wurde. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen die Aktivitätserfassung der wurzelabgeschiedenen Enzyme vernachlässigt. Die Messwerte der Gesamtposphatase wurden anschließend mit DynaFit ausgewertet (Abb. 3.16 S. 64). Es zeigte sich jedoch, dass die Kinetik nicht der Michaelis-Menten-Kinetik folgte, sondern einer negativen Kooperativität unterworfen war. Deswegen wurde eine weitere Regressionsanalyse mit OriginPro durchgeführt, bei der die Hill-Gleichung dieser Berechnung zu Grunde gelegt wurde.

In der Abb. 3.16 ist die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase an der Wurzel *in vivo* von Raps und Kartoffel zu sehen. Die Datenpunkte sind die Messdaten, die durch den oben beschriebenen Versuch 2.5 „Pflanzenanzucht III: Aktivitätsmessung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vivo* von Raps und Kartoffel“ (S. 28) erhoben wurden. Die drei Kurven sind die jeweiligen Regressionsanalysen, die mittels der Datenpunkte und der Hill-Gleichung (mit OriginPro) (vgl. Gleichung 2.1 S. 31) errechnet wurden und eine Annäherung an die tatsächliche Enzymaktivität der Sauren Phosphatase darstellen.

In dieser Abb. 3.16 ist die Enzymaktivität von Raps hervorzuheben. In der Regressionsanalyse war die Aktivität der Phosphatase von Raps bis zu einer Substratkonzentration von 525 μM NPP höher als die von Belana und Marabel. Ab dieser Substratkonzentration war die Aktivität von Belana höher als die von Carousel. Bei 1750 μM NPP überstieg dann auch die Aktivität der Sauren Phosphatase von Marabel die Aktivität der Sauren Phosphatase von Carousel. Die Regressionsanalyse der Phosphataseaktivität beschreibt somit bei Carousel einen steilen Anstieg zu Beginn, jedoch erreichte die Aktivität bald ihr Maximum. Im Gegensatz dazu begannen beide Kartoffelsorten eher verhalten, erreichten aber bei hohen Substratkonzentrationen eine ca. doppelt so hohe Enzymaktivität wie Carousel.

Vergleicht man die Datenpunkte, worauf sich die statistische Auswertung bezieht, stellt man fest, dass die gemessenen Phosphataseaktivitätswerte von Carousel bei allen hohen Konzentrationsstufen von 900 bis 14000 μM NPP, mit Ausnahme von 2700 μM NPP, signifikant niedriger waren als die von Bela-

na. Marabel lag dazwischen, jedoch ab einer Konzentration von 7200 μM NPP aufwärts unterschied sich auch diese Kartoffelsorte signifikant in ihrer Enzymaktivität von Carousel. Der untere Konzentrationsbereich war etwas diffuser. Hier schwankten die signifikanten Unterschiede (vgl. Anhang Tab. 7.1). Diese Auswertung sollte eine erste Idee geben. Deshalb ist es wichtig sich Kennzahlen der Regressionsanalyse, also des Aktivitätsverlaufes, anzusehen und diese zu vergleichen.

Zuerst wurde eine Michealis-Menten-Kinetik angenommen, jedoch zeigte sich nach einer Auftragung der Werte als Scatchard-Plot (Abb. 3.17) und einer weiteren Überprüfung durch Lineweaver-Burk (hier nicht dargestellt), dass die Kinetik der Sauren Phosphatase bei allen drei Genotypen nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Kinetik würde in diesem Fall eine Gerade aufweisen, wie sie in der Abb. 3.17 als schwarze Gerade eingezeichnet ist.

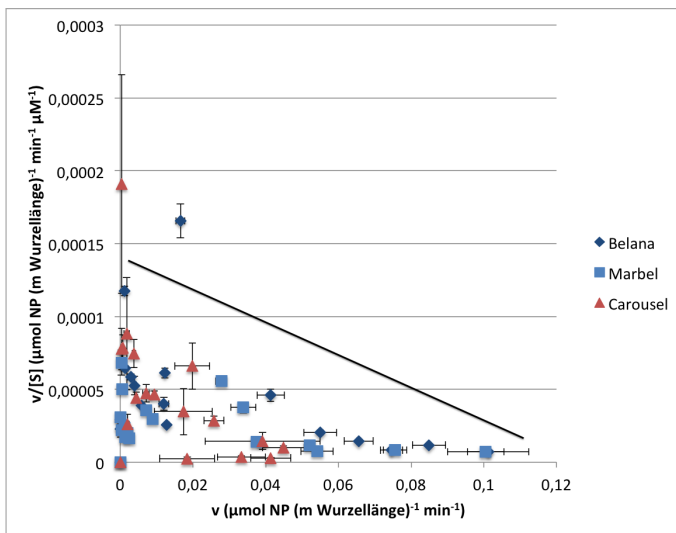


Abbildung 3.17: Scatchard (reverser Eadie-Hofstee)-Plot der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vivo*. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler (senkrecht wie waagrecht) aus drei biologischen Wiederholungen dar. Die schwarze Gerade beschreibt einen hypothetischen Michealis-Menten-Verlauf der Datenpunkte.

Daraus lässt sich schließen, dass die Kinetik einer Kooperativität unterworfen ist. Positive Kooperativität bedeutet allgemein, dass wenn Liganden sich an die Untereinheiten anlagern, diese den Weg ans Enzym bzw. den Weg zur Umsetzung durch das Enzym für weitere Liganden erleichtern (Ahlers *et al.* 1982). Negative Kooperativität bedeutet dagegen, dass wenn Liganden an Untereinheiten binden, der Weg für weitere Liganden erschwert wird (Ahlers *et al.* 1982). Um diese Kinetiken als Gleichung darstellen zu können, wurde die Gleichung nach Hill verwendet.

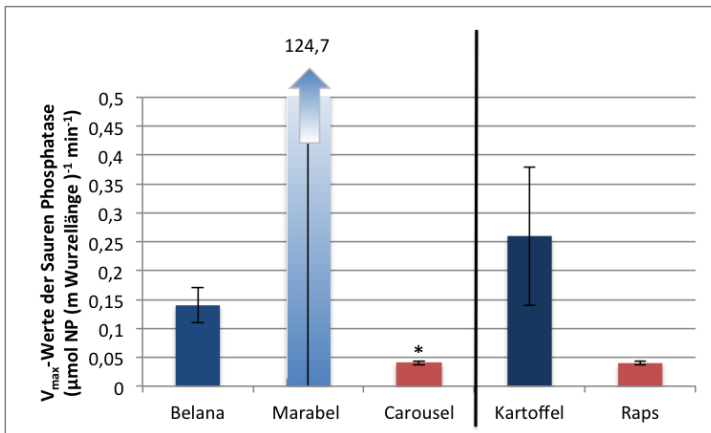


Abbildung 3.18: $V_{\max}$ -Werte der Sauren Phosphatase *in vivo* bei Kartoffel cvs. Belana und Marabel sowie Raps cv. Carousel (links) und $V_{\max}$ -Werte der Sauren Phosphatase *in vivo* bei Kartoffel (gepoolt aus cvs. Belana und Marabel) sowie Raps (cv. Carousel) (rechts). Berechnet mit OriginPro unter der Annahme der Hill-Gleichung. Die Anpassung (Fit) ist für Marabel fehlgeschlagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Belana und Carousel signifikant verschieden. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Kartoffel und Raps nicht signifikant verschieden.

Die Abb. 3.18 zeigt die $V_{\max}$ -Werte, die durch die Regressionsanalyse - unter Annahme der Hill-Gleichung - errechnet wurden. Marabel wurde in der Beschreibung außen vor gelassen, da hier die Anpassung fehlgeschlagen ist

(vermutlich auf Grund dessen, dass die Werte der höchsten Substratkonzentrationen noch kein Plateau erreicht hatten). Belana ($0,14 \mu\text{mol NP (m Wurzellänge)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) und Carousel ($0,04 \mu\text{mol NP (m Wurzellänge)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) unterschieden sich signifikant voneinander. Fasst man Marabel und Belana zu „Kartoffel“ zusammen, schlägt allerdings die hohe Standardabweichung von Marabel durch, wodurch Kartoffel und Raps keinen signifikanten Unterschied zeigten.

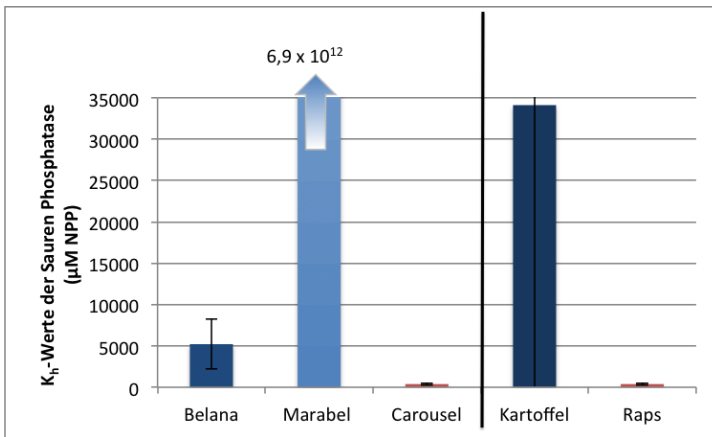


Abbildung 3.19: K_h -Werte der Sauren Phosphatase *in vivo* bei Kartoffel cvs. Belana und Marabel sowie Raps cv. Carousel (links) und K_h -Werte der Sauren Phosphatase *in vivo* bei Kartoffel (gepoolt aus cvs. Belana und Marabel) sowie Raps (cv. Carousel) (rechts). Berechnet mit OriginPro unter der Annahme der Hill-Kinetik. Die Anpassung (Fit) für Marabel ist fehlgeschlagen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus drei Wiederholungen dar. Zweiseitiger t-Test 5% zwischen Belana und Carousel nicht signifikant verschieden. Zweiseitiger t-Test zwischen Kartoffel und Raps nicht signifikant verschieden.

In Abb. 3.19 ist nach dem gleichen Verfahren, wie oben genannt, der K_h -Wert errechnet und hier dargestellt worden. Hier konnten jedoch weder zwischen Belana und Carousel noch zwischen Kartoffel und Raps Unterschiede festgestellt werden.

3.6 Pflanzenanzucht IV: Biochemische Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vitro* von Raps und Kartoffel

Nach den Zwischenergebnissen aus der Pflanzenanzucht III, in der die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase *in vivo* gemessen worden war, sollte sichergestellt werden, dass die Messungen nicht von physiologischen Prozessen der intakten Pflanze, die evtl. mit Stress auf die veränderte Wurzelumgebung reagieren könnte, gestört werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Tendenz, dass $V_{\max}$ und K_h der Sauren Phosphatase bei den Kartoffelpflanzen höher waren, sich signifikant nachweisen ließe. Deshalb wurde eine weitere Pflanzenanzucht in Wasserkultur durchgeführt, um erneut zu testen, ob sich die Pflanzenarten in den Eigenschaften ihrer Sauren Phosphatase unterscheiden. Die Pflanzen wurden unter P-Mangel angezogen und die Wurzeln am Tag der Ernte schockgefroren. Die Wurzelzellwand wurde extrahiert und daran erfolgte dann die Charakterisierung und Aktivitätsmessung der Sauren Phosphatase (vgl. Material und Methoden 2.6, Pflanzenanzucht IV: Biochemische Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase *in vitro* von Raps und Kartoffel, S. 33).

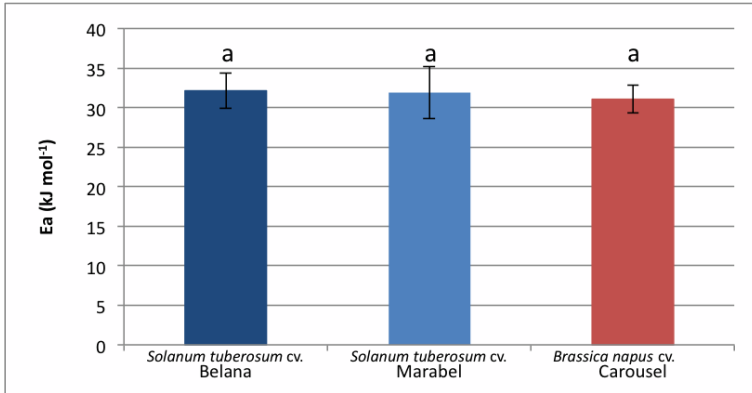


Abbildung 3.20: Aktivierungsenergie der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).

Zunächst wurde die Aktivierungsenergie der Sauren Phosphatase (Abb. 3.20) in den jeweiligen Genotypen mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung bestimmt (Methode siehe S. 36). Das Enzym von Belana besaß eine Aktivierungsenergie von $32,13 \text{ kJ mol}^{-1}$, Marabel eine von $31,91 \text{ kJ mol}^{-1}$ und Carousel eine von $31,06 \text{ kJ mol}^{-1}$. Diese sind statistisch nicht signifikant voneinander unterscheidbar.

Als nächstes erfolgte die pH-Optimum-Bestimmung für jeden Genotyp. Hierzu wurden die zellwandgebundenen Enzyme in verschiedenen Essays, die einen pH-Bereich von 4,3 bis 6,7 erfassten, inkubiert und deren Aktivität ausgewertet (Methode siehe S. 36). Die Kurven in Abb. 3.21, die mit Hilfe von Excel durch die Datenpunkte gelegt wurden (polynomische Trendlinien), beschreiben eine quadratische Funktion. Hierdurch konnte das Maximum dieser quadratischen Funktion und damit das pH-Optimum (Abb. 3.22) berechnet werden. Belana besaß das pH-Optimum bei pH 5,95, Marabel bei 5,64 und der Raps Carousel bei 5,57. Auch diese drei Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant verschieden.

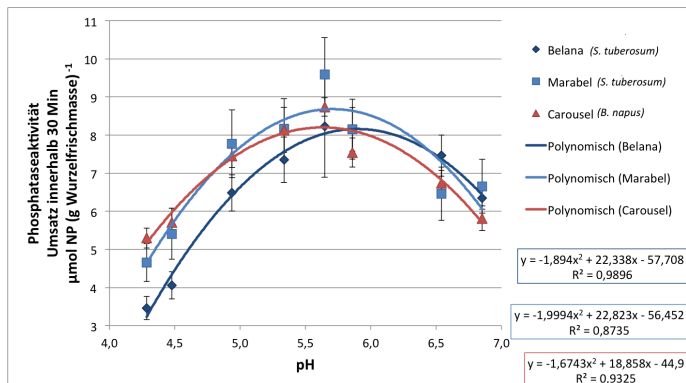


Abbildung 3.21: Einfluss verschiedener Assay-pH-Werte auf die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel. Substratkonzentration = 10 mM. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Die Funktionen wurden mit Hilfe polynomischer Trendlinien durch Excel berechnet.

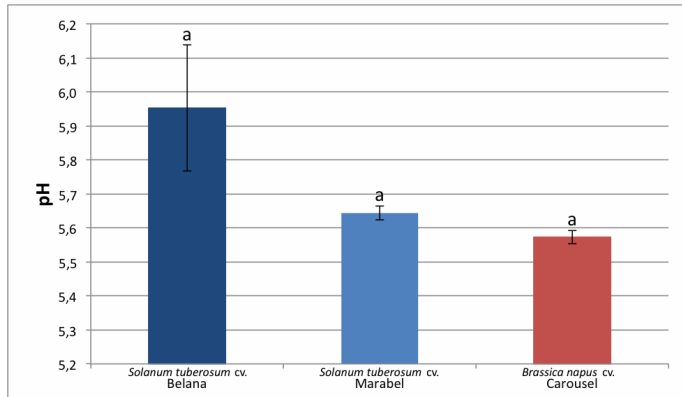


Abbildung 3.22: pH-Optimum (berechnet aus dem Maximum der polynomischen Trendlinien) der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).

Daraufhin wurde für jeden Genotyp ein Assay-Puffer angesetzt, bei dem der pH-Wert entsprechend dem pH-Optimum eingestellt wurde (vgl. Material und Methoden 2.6, Charakterisierung der wurzelgebundenen Sauren Phosphatase, S. 36). In diesen Assay-Puffern wurden dann die jeweiligen Aktivitätsmessungen durchgeführt.

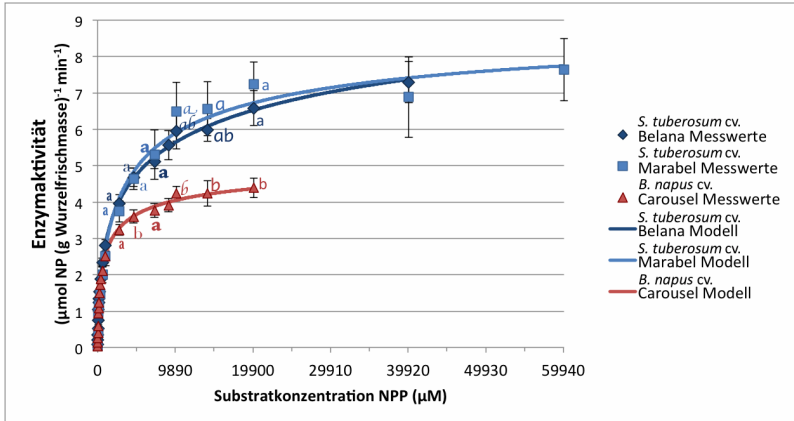


Abbildung 3.23: Einfluss verschiedener Substratkonzentrationsstufen auf die Enzymaktivität der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Caroussel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% je Konzentrationsstufe. Buchstaben nur innerhalb einer Konzentrationsstufe vergleichbar. Signifikanzen der unteren Konzentrationsstufen siehe Anhang Tab. 7.2.)

In der Abb. 3.23 sind zum einen die jeweiligen Messpunkte, als auch die Regressionsanalysen mittels Origin Pro berechnet, zu sehen. Sie beruhen auf dem Modell von Hill. Statistisch verschieden waren die Messpunkte von Caroussel und Marabel hinsichtlich ihrer Phosphataseaktivität, ab $\geq 4,5$ mM NPP, mit Ausnahme bei 7,2 mM NPP. Bei den Kartoffelsorten wurde die Substratkonzentration bis 40 mM NPP (Belana) und 60 mM NPP (Marabel) erhöht, da beide bei 20 mM NPP noch immer eine deutliche Zunahme ihrer Enzymaktivität zeigten. Auch in diesem *in vitro*-Versuch zeigte sich erneut,

wie im *in vivo*-Versuch, dass der Raps eine deutlich niedrigere Maximalgeschwindigkeit erreichte, als die beiden Kartoffelsorten. Um die Einzelheiten näher zu betrachten, musste nun näher auf den Ablauf der Kinetik geschaut werden. Schon im vorangegangenen Versuch stellte sich beim Auswerten des Versuches heraus, dass keine Michaelis-Menten-Kinetik vorlag. Deswegen wurde auch bei diesem Versuch mittels eines Scatchard-(reverser Eadie-Hofstee)Plots (Abb. 3.24), der sehr empfindlich auf Abweichungen von einer Michaelis-Menten-Kinetik reagiert, überprüft, ob eine Michaelis-Menten-Kinetik vorliegt oder nicht.

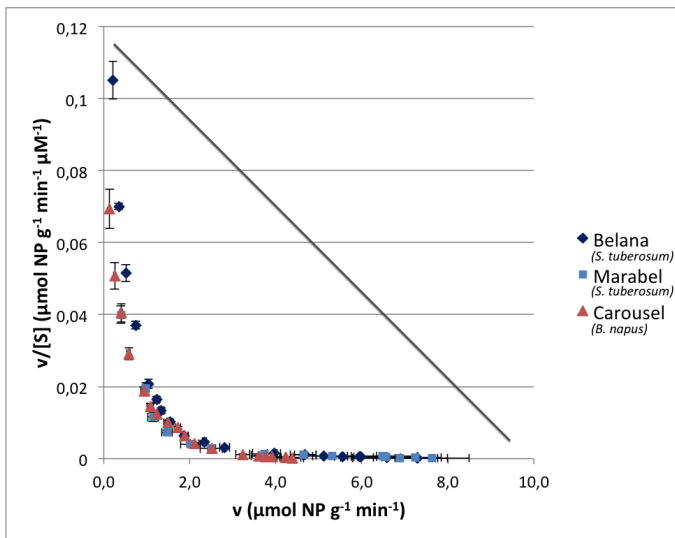


Abbildung 3.24: Scatchard(reverser Eadie-Hofstee)-Plot der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler (senkrecht wie waagrecht) aus vier biologischen Wiederholungen dar. Die schwarze Gerade beschreibt einen hypothetischen Michaelis-Menten-Verlauf der Datenpunkte.

Wenn man sich diese Grafik nun ansieht (Abb. 3.24), stellt man fest, dass der Verlauf der Enzymkinetik der Sauren Phosphatase aller drei Genotypen sich

als eine Kinetik darstellte, die nicht Michaelis-Menten folgte. Die Kinetik würde in diesem Fall eine Gerade aufweisen, wie sie in der Abb. 3.24 als schwarze Gerade eingezeichnet ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Kinetik der Formel von Hill folgt und einer negativen Kooperativität unterworfen ist. Daher wurden die Daten mit der Hill-Gleichung ausgewertet (vgl. 2.1 S. 31).

Ein weiterer Hinweis ist der Vergleich der beiden Regressionsanalysen. Da die korrigierten R^2 -Werte bei der Regressionsanalyse nach Hill jeweils höher sind (Tab. 3.2), als die bei Michaelis-Menten-Kinetik, kann angenommen werden, dass die Anpassung durch die Hill-Gleichung der wahren Enzymkinetik der Sauren Phosphatase besser entspricht.

Tabelle 3.2: Vergleich der korrigierten R^2 -Anpassung von Michaelis-Menten-Kinetik und der Hill-Gleichung

Sorte	Michaelis-Menten	Hill
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Belana	0,92	0,96
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Marabel	0,86	0,87
<i>Brassica napus</i> cv. Carousel	0,93	0,97

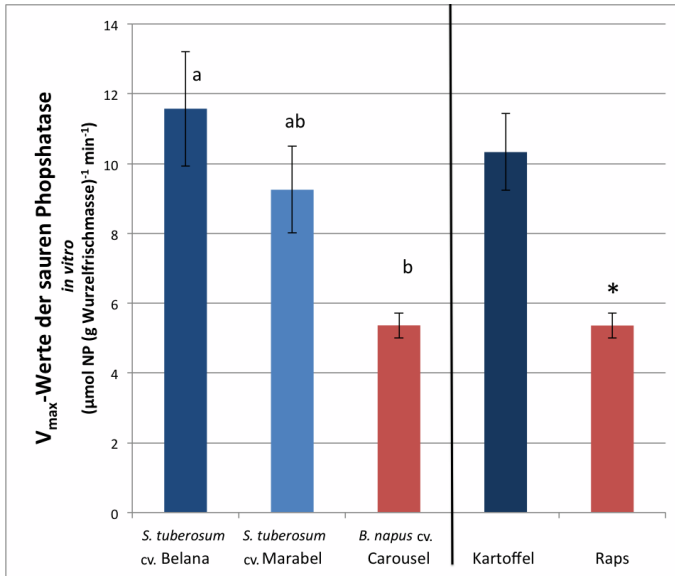


Abbildung 3.25: $V_{\max}$ der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel (ungepooled und gepooled). Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (linke Seite) bzw. zweiseitiger T-Test 5% (rechte Seite).

Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Enzymaktivität mit OriginPro vorgenommen, welches die allgemeinere Formel von Hill zur Berechnung der Regressionsanalyse zu Grunde legte. In Abb. 3.25 ist $V_{\max}$ abgetragen. Belana zeigte hier die höchste Maximalgeschwindigkeit mit $11,57 \mu\text{mol NP g}^{-1} \text{min}^{-1}$, welche sich signifikant von Carousel mit $5,36 \mu\text{mol NP g}^{-1} \text{min}^{-1}$ unterschied. Marabel lag mit $9,25 \mu\text{mol NP g}^{-1} \text{min}^{-1}$ dazwischen und unterschied sich von beiden nicht signifikant. Verwendet man den gepoolten Datensatz (Belana + Marabel = Kartoffel) so ist deutlich erkennbar, dass die Kartoffelpflanze eine signifikant höhere Maximalgeschwindigkeit ($10,3 \mu\text{mol NP g}^{-1} \text{min}^{-1}$) besaß als der Raps ($5,4 \mu\text{mol NP g}^{-1} \text{min}^{-1}$) (Abb. 3.25 rechts).

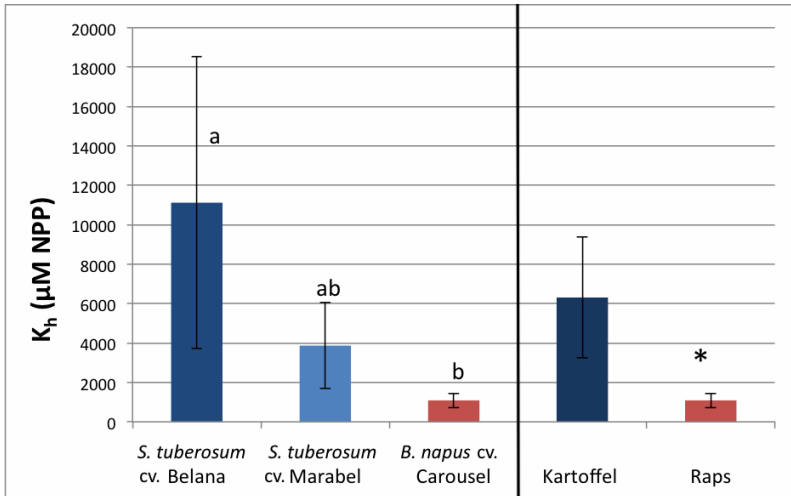


Abbildung 3.26: K_h der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel (ungepoolt und gepoolt). Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5% (trotz ungleicher Varianzhomogenitäten).

Die zweite charakteristische Kennzahl ist K_h . Sie ist, wie schon beschrieben, mit dem K_m -Wert der Michaelis-Menten-Kinetik vergleichbar. Wie aus der Abb. 3.26 ersichtlich, unterschied sich der K_h -Wert von Belana (11121 $\mu\text{M NPP}$) signifikant von Carousel (1089 $\mu\text{M NPP}$). Marabel lag mit 3869 $\mu\text{M NPP}$ dazwischen. Poolt man die Kartoffelsorten (Kartoffel = 6310 $\mu\text{M NPP}$) unterschieden diese sich signifikant vom Raps (1089 $\mu\text{M NPP}$).

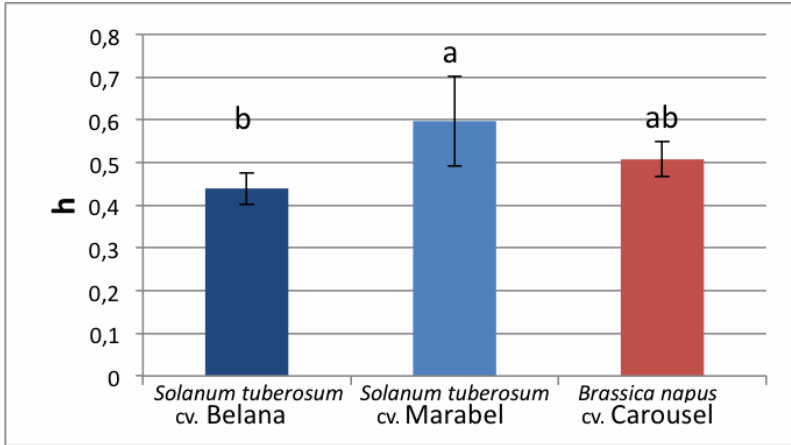


Abbildung 3.27: Der Hill-Koeffizient h der Sauren Phosphatase (gesamt) *in vitro* bei *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel sowie *Brassica napus* cv. Carousel. Berechnet mit OriginPro unter Annahme der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert $\pm$ Standardfehler aus vier biologischen Wiederholungen dar. Statistik: Einfaktorielle ANOVA + Tukey-HSD 5%.

Eine weitere Kenngröße in der Hill-Gleichung ist der Hill-Koeffizient h . Dieser betrug bei allen drei Sorten $h \leq 1$, was einer negativen Kooperativität gleichzusetzen ist. Belana unterschied sich hier mit 0,44 (einheitslos) signifikant von der zweiten Kartoffelsorte Marabel mit 0,60. Der Hill-Koeffizient h von Carousel (0,51) unterschied sich jedoch nicht signifikant von den beiden Kartoffelsorten.

4 Diskussion

4.1 Einfluss verschiedener Faktoren des Bodens auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Faktoren an der Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat (P_{org}) mitwirken und damit der Pflanze das Orthophosphat zur Aneignung bereitstellen. Es sollte untersucht werden, welchen Anteil hierzu die Pflanze, der Boden und auch das Zusammenspiel beider leisten.

Da in vorangegangenen Studien (Steffens *et al.* 2010; Leppin 2007) verschiedene Pflanzen auf ihre Fähigkeit getestet wurden, sich Phosphat aus organischen Verbindungen anzueignen, lag der Fokus darauf, inwieweit die Pflanzen vom Umsatz im Boden abhängig sind, oder ob sie selbst einen großen Beitrag dazu liefern.

Dazu wurde die erste Hypothese aufgestellt: Bodeneigenschaften, wie z. B. die biologische Aktivität, beeinflussen die Pflanzenverfügbarkeit des P_{org} in hohem Maße. Böden mit verschiedenen Bodeneigenschaften beeinflussen die Umsetzung und Aneignung von P_{org} signifikant unterschiedlich.

Daher wurde zunächst untersucht, welche Eigenschaften im Boden von Vorteil sind, um P_{org} zu mobilisieren und damit pflanzenverfügbar zu machen. Es wurde untersucht, ob die Mobilisierung von P_{org} in verschiedenen Bodentypen unterschiedlich verläuft und ob diese in verschiedenen Bodentypen auf gezielte Änderungen von Einflussfaktoren reagiert.

In dem hierzu angesetzten Versuch zeigte sich, dass verschiedene Bodentypen das zugegebene Na-Phytat unterschiedlich stark mobilisieren (S. 45, Abb. 3.1). Die beiden Bodentypen, Luvisol Unterboden und Luvisol Oberboden I, bei denen eine messbare Mineralisation stattfand, besitzen beide einen sehr

ähnlichen pH-Wert (7,1 und 7,2). Eivazi und Tabatabai (1977) berichten, dass in den meisten Böden ein Aktivitätsmaximum der Phosphatasen nahe des neutralen pH-Wertes auftritt. Es ist also möglich, dass bei diesem pH-Wert sich Mikroorganismen bevorzugt ansiedeln, die Phosphataseaktivität besitzen oder deren Phosphatasen bei diesem pH-Wert optimal bzw. verstärkt arbeiten. Dies erscheint auf der anderen Seite wiederum erstaunlich, da es sich bei dem einen Bodentyp um einen Unterboden handelt, der eigentlich eine geringe biologische Aktivität haben sollte. Dieser Unterboden wurde jedoch auch bei Leppin (2007) einer Bodeninkubation mit denselben Rahmenbedingungen unterzogen und lieferte vergleichbare Ergebnisse. Dass aber genau dieser Bodentyp, neben dem Luvisol Oberboden, der einzige war, der P_{org} deutlich mineralisierte (S. 49, Abb. 3.2), bleibt trotzdem erklärungsbedürftig. Entweder gibt es weitere Faktoren, die hier nicht berücksichtigt wurden, aber einen Einfluss auf die Mineralisation besitzen, oder es herrscht in dem Unterboden zwar eine durchschnittlich geringe biologische Aktivität, aber für die Mineralisation von P_{org} mit genau den richtigen Mikroorganismen, die Schritt für Schritt, jedoch kontinuierlich, die organisch gebundenen Phosphatverbindungen umsetzen.

Beim Ferralsol ist, aufgrund der hohen Sesquioxidkonzentration (Fe- und Al-Oxide) zu vermuten, dass die Phosphate des Na-Phytats wie auch die des leicht löslichen $Ca(H_2PO_4)_2$ mit den Fe- und Al-Oxiden reagierten und adsorbiert wurden (Stewart *et al.* 1987). Yan *et al.* (2014) nennt eine weitere Möglichkeit: die Ausfällung der Inositolhexaphosphatmoleküle an den Al-Hydroxiden. Aufgrund der nicht vorhandenen Netto-Mineralisation (Netto-Mineralisation bedeutet mit der CAL-Methode messbare Veränderungen in der P-Konzentration) (S. 45, Abb. 3.1) kann hierbei also nur spekuliert werden, ob eine Mineralisation stattfand und das entstandene Phosphat gleich wieder adsorbiert wurde, oder ob die Bedingungen in diesem Boden für eine Mineralisation eher ungünstig sind. Schwarz (2005) vergleicht u.a. die biologische Aktivität brasilianischer Ferralsole (ca. 1200 mg NP (kg Boden h)⁻¹) mit deutschen Parabraunerden (ca. 300-500 mg NP (kg Boden h)⁻¹). Die biologische Aktivität von Ferralsolen hinsichtlich Phosphataseaktivität kann also relativ hoch sein (Schwarz 2005), wodurch die erste Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden sollte.

Der Fluvisol und der Podsol zeigten auch keine maßgebliche Mineralisation während der 140-tägigen Inkubationszeit (S. 49, Abb. 3.2). Hier kann wieder nur spekuliert werden, welche Faktoren dabei ausschlaggebend sind. Der Fluvisol hat, wie auch der Podsol, einen niedrigen pH-Wert (5,2 bzw. 5,7). Der Podsol mit seinem sehr hohen Sandanteil ist wenig biologisch aktiv und ein vorwiegend nährstoffarmer Bodentyp. Interessant ist, dass frühestens nach 16 Tagen der Mineralisationsprozess bei allen untersuchten Bodentypen sichtbar einsetzte. Dies liegt vermutlich daran, dass anfangs nur geringe Mengen mineralisiert wurden, die nicht messbar waren bzw. von den Mikroorganismen selbst sofort wieder genutzt wurden.

Entscheidend für eine messbare Netto-Mineralisation von Na-Phytat ist das Vorhandensein von biologischer Aktivität (Oehl *et al.* 2004). Je nach Umweltfaktoren bilden sich unterschiedliche Mikroorganismengemeinschaften aus, deren Ansprüche unterschiedlich sind. Dies können zum einen die Porengröße, Bodenfeuchte und -temperatur, Sauerstoffkonzentration sowie ein optimaler Boden-pH-Wert sein, aber auch die Nährstoffmenge und deren Verhältnisse zueinander. Dies zeigte sich auch ab der Hälfte des Versuches nach Zugabe von Glucose. Bei Kim *et al.* (1998) wurde die Glucose zur Ernährung phosphorlösender Bakterien genutzt, weshalb auch in diesem vorliegenden Experiment die Glucose als Energielieferant hinzugefügt wurde. Hier sollte nochmals erwähnt werden, dass in beiden Bodeninkubationsversuchen dem Boden eine Nährlösung zugegeben wurde, um gleiche Voraussetzungen für die Mikroorganismen zu schaffen und vor allem das mikrobielle Wachstum nicht durch den Mangel eines bestimmten Nährstoffes zu hemmen. Da aber jeder Boden die Nährstoffe anders annimmt, durch verschiedene chemische Reaktionen, könnte es vorgekommen sein, dass z. B. bestimmte Nährstoffe sofort wieder festgelegt wurden und damit den Mikroorganismen nicht zur Verfügung standen. Dies sollte jedoch die Ausnahme sein. Zu Beginn der Inkubation wurde vermutet, dass durch die Glucosegabe die Mikroorganismen in ihrer Aktivität unterstützt würden, dadurch mehr Na-Phytat mineralisiert würde und deshalb vermehrt CAL-extrahierbares P zur Verfügung stünde. Jedoch zeigte sich in dem hier vorliegenden Versuch ein gegenläufiger Trend bei der Mineralisation, denn mit Zugabe der Glucose stellte sich in allen Böden eine geringere CAL-extrahierbare P-Konzentration ein. Bei zwei Böden (Podsol

und Luvisol Oberboden) waren die CAL-extrahierbaren P-Konzentrationen in der Variante mit Glucose sogar signifikant niedriger (siehe Tab. 3.1) als ohne Glucose. Als logische Erklärung hierfür kann die Vermehrung der Mikroorganismen herangezogen werden, deren Populationen aufgrund des höheren Zuckerangebotes wuchsen. Aber für das Wachstum ist nicht nur Kohlenstoff erforderlich, sondern auch andere Nährstoffe wie z. B. P (Blume *et al.* 2010). D. h. je mehr Kohlenstoff gegeben wird, desto mehr P wird organisch in den Mikroorganismen gebunden und ist deshalb weniger verfügbar. Anzumerken ist, dass bei Kim *et al.* (1998) keine Kontrollvariante zu dieser Methode mit Glucose geführt wurde. Es könnte also durchaus sein, dass auch hier sich Unterschiede ergeben hätten. Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit, durch Veränderung des Nahrungsangebotes Mikroorganismen zu fördern, die P_{org} nicht mineralisieren oder die mineralisierenden Mikroorganismen hemmen (Blume *et al.* 2010). Spohn und Kuzyakov (2013) stellten in einer anderen Studie fest, dass mit der Gabe von Glucose-6-phosphat die Mikroorganismen vor allem Glucose, aber nur einen geringen Teil des mineralisierten P aufnahmen. Sie schlossen daraus, dass die Mineralisation durch Mikroorganismen von organisch gebundenem P eher ein Nebeneffekt der Aneignung von Kohlenstoff sei, wovon die Pflanzen gut profitieren könnten. Auch beim Experiment Boden-inkubation I könnte dieses Phänomen die dargestellten Ergebnisse untermauern. Da hier nur Glucose gegeben wurde und nicht Glucose-6-phosphat, musste die wachsende Mikroorganismenpopulation ihren geringen, benötigten Anteil an Phosphat aus dem vorhandenen Pool entnehmen. Durch die Inkorporation des mineralisierten P konnte weniger P im Boden nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Vermutlich ist der enzymatische Aufschluss des Phytats aufwändiger für die Mikroorganismen, um an die Kohlenstoffe im Inositol zu gelangen, als die Glucose als C-Quelle zu nutzen. Die Mikroorganismen scheinen somit durch die C-Quelle limitiert worden zu sein, nicht jedoch durch P.

Abschließend ist noch einmal zu betonen, dass der Luvisol Oberboden in diesem Versuch als einziger eine CAL-P-Konzentration in der Na-Phytat-Variante zeigte, die nach 140 Tagen ca. 80% der Konzentration in der $Ca(H_2PO_4)_2$ -Variante entsprach. Dies war mit Abstand die höchste netto-Mineralisation. Hier sei noch einmal der pH-Wert von 7,2 und die C_{org} -Konzentration von

1,75% als mögliche entscheidende Faktoren erwähnt. Insgesamt ist das Ergebnis dieses Versuchs so zu bewerten, dass verschiedene Bodentypen durch verschiedenste, nicht näher definierte Faktoren unterschiedlich Na-Phytat mineralisierten.

Da diese Einflussfaktoren im ersten Versuch nicht genau geklärt werden konnten, wurde im zweiten Bodeninkubationsversuch der Fokus auf die Inkubationstemperatur und den pH-Wert gelegt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Inkubationstemperatur kein signifikanter Faktor war, der die Mineralisation in irgendeiner Art und Weise beeinflusste (S. 52, Abb. 3.4). Eine Überlegung ist die, dass der Mineralisationsprozess biologisch unabhängig verläuft, dass es also ein rein chemischer Prozess ist. Dies erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C Unterschiede ergeben hätten, da man davon ausgeht, dass die Mikroorganismen sich der Optimaltemperatur annähern und dann aktiver sind. Warum dieser Versuch aber trotzdem keine Mineralisationsunterschiede zeigte, bleibt spekulativ. Eine Möglichkeit besteht darin, dass durch die Aufteilung in zwei Klimakammern, die kälteren Proben mit anderen Umwelteinflüssen konfrontiert waren, als in der warmen Klimakammer. Dies sollte man jedoch vernachlässigen können, da der Versuch mit großer Sorgfalt und Überwachung durchgeführt worden ist. Aber es könnten auch folgende Gründe für die nicht vorhandenen Unterschiede verantwortlich sein. Die Mikroorganismen, die für die Mineralisation zuständig sind, könnten sich genau in dieser Temperaturspanne (15-25 °C) möglicherweise in ihrem Optimum befunden haben oder zumindest keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Mineralisation aufweisen. Ullah *et al.* (1987) wiesen für eine Saure Phosphatase in *Aspergillus ficuum* ein breites Temperaturspektrum nach. Sie zeigten, dass diese aufgereinigte Phosphatase bei 0 °C hoch stabil ist, jedoch ab 70 °C instabil wird, ein sehr breites Temperaturoptimum besitzt und ihr Aktivitätsmaximum bei 63 °C liegt. Wenn man eine größere Temperaturspanne gewählt hätte, wären die Unterschiede in der vorliegenden Arbeit evtl. hervorgetreten, wobei dies weniger den realen Temperaturen im Boden entspräche und auch von den Bakterien abhängen würde, welche Optimal- bzw. Maximaltemperatur sie besitzen. Auch Rastin *et al.* (1988) berichten von keiner Korrelation zwischen

Enzymaktivität der Sauren Phosphatase und Bodenfeuchte bzw. Bodentemperatur in einem Buchenwaldboden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass, wie bei der Glucosegabe, die Mikroorganismen sich bei der höheren Temperatur zwar vermehrt, jedoch daher mehr P für sich selbst beansprucht haben, und deshalb kein sichtbarer Einfluss der Temperatur erkennbar ist. Dadurch könnte der Netto-Umsatz zwischen den beiden Temperaturen gleich geblieben sein.

Der zweite Faktor, der näher untersucht wurde, war der Boden-pH-Wert. Da im ersten Inkubationsversuch, der Bodentyp mit dem höchsten pH-Wert (pH 7,2) die höchste nachweisbare Mineralisation aufwies, wurde dieser Luvisol Oberboden aus Versuch 1 als Referenz gewählt und alle weiteren Bodentypen auf den pH-Wert von 7,2 aufgekalkt. Es konnte beobachtet werden, dass auch hier wiederum der Bodentyp, als dritter Faktor in diesem Versuch, mit all seinen Einflussgrößen, die Mineralisation von Na-Phytat innerhalb von 140 Tagen beeinflusste. Die Anhebung des pH-Wertes auf 7,2 führte bei zwei weiteren Böden (S. 52, Abb. 3.4), neben dem schon zuvor getesteten Luvisol I (Oberboden), zu einer, zum Teil signifikant, erhöhten Mineralisation von Na-Phytat. Wenn man diese beiden Bodentypen hinsichtlich ihrer P-Fractionen betrachtet (S. 50, Abb. 3.3), kann man erkennen, dass die Gesamt-P-Konzentration derjenigen von Luvisol I ähnlich war. Außerdem waren die Konzentrationen der Al-/Fe-Fraktion (F1) in allen drei Bodentypen auf einem vergleichbaren Niveau, der Anteil an P_{org} unterschied sich jedoch. Der ursprüngliche pH-Wert der beiden Böden lag im sauren Bereich bei 5,2 (Fluvisol) und 6,3 (Luvisol II). Daher kann eine mikrobielle Gemeinschaft angenommen werden, in der Saure Phosphatasen vorherrschen, da Saure Phosphatasen verstärkt in sauren Böden vorkommen (Juma *et al.* 1978). Für den Boden Luvisol II liegen außerdem von einem Nachbarschlag Ergebnisse zur mikrobiellen Biomasse ($964 \pm 144 \mu\text{g C (g Boden)}^{-1}$ in 0 - 12 cm Bodentiefe) sowie zur Dehydrogenaseaktivität ($49,5 \pm 3,2 \mu\text{g Iodonitrotetrazoliumformazan (g Boden)}^{-1}$ in 0 - 12 cm Bodentiefe bzw. $35,5 \pm 1,3 \mu\text{g Iodonitrotetrazoliumformazan (g Boden)}^{-1}$ in 0 - 40 cm Bodentiefe) vor (Schulz 2012). Die Dehydrogenaseaktivität gibt an, wie gut ein Boden unter gegebenen Bedingungen zugegebene Elektronenakzeptoren reduzieren kann (Schinner *et al.* 1996) und damit, ob mikrobielles Leben vorhanden ist. Mit der Erweiterung auf 40 cm Bodentiefe sinkt dieser Wert.

Dies ist darin begründet, dass Mikroorganismen Luft, Wasser und organische Substanz zum Leben benötigen. Die Konzentration dieser Faktoren nimmt mit zunehmender Bodentiefe deutlich ab. Die Werte der Dehydrogenaseaktivität im Nachbarschlag des Versuchsbodens Luvisol II liegen im Bereich normaler Ackerböden (Kumar *et al.* 2013).

Eivazi und Tabatabai (1977) konnten zeigen, dass das pH-Optimum für Saure Phosphatase in sauren Böden zwischen 6 und 7 liegt. Dies steht jedoch etwas im Widerspruch mit den Böden aus dem vorliegenden Bodeninkubationsversuch II, da der Luvisol II schon bei seinem Ursprungs-pH deutliche Mineralisation gezeigt hätte. Möglicherweise wurde mit der Erhöhung des Boden-pH-Wertes eine Stimulation der Alkalischen Phosphatasen erreicht (Acosta-Martínez *et al.* 2000), so dass diese durch positive Korrelation mit dem pH-Wert auch aktiviert wurden und ein Aktivitätsmaximum durch beide Phosphatasen entstand. Ein anderer Aspekt könnte der indirekte Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Sauren Phosphatase sein, indem der pH-Wert die Nährstoffverfügbarkeit für die Mikroorganismen positiv verändert. Durch die pH-Wert-Änderung könnte die mikrobielle Gemeinschaft so verschoben werden, dass vermehrt Mikroorganismen wachsen, die Phosphatasen verstärkt nutzen. Es könnte aber auch sein, dass der pH-Wert die Konzentrationen von Inhibitoren oder Aktivatoren beeinflusst und somit die Mineralisation gesteigert wird (Dick *et al.* 2000). Außerdem konnten Acosta-Martínez und Tabatabai (2000) zeigen, dass die Aktivität der Sauren Phosphatase (pH-Optimum bei 6,5) negativ, die der Alkalischen Phosphatase (pH-Optimum bei 11,0) positiv mit dem Boden-pH korreliert. Wie oben bereits schon einmal erwähnt, berichten Eivazi und Tabatabai (1977), dass in den meisten Böden ein Aktivitätsmaximum der Phosphatasen nahe des neutralen pH-Wertes auftritt. Daher kann aus diesem Versuch geschlossen werden, dass weitere Aspekte für die Mineralisation im Boden wichtig sind, da die Erhöhung der Boden-pH-Werte auf 7,2 nicht durchgängig zu der erwünschten Mineralisation von Na-Phytat führte. Beispielsweise könnte die Ionenkonkurrenz und die Zusammensetzung des Bodenlebens Einfluss ausüben.

Hypothese 1 kann nicht widerlegt werden, da verschiedene Bodeneigenschaften, wie z. B. der pH-Wert, zu signifikant unterschiedlichen Umsatzraten führten. Ein Temperaturunterschied von 10°C führte zu keinen Unterschieden.

Insgesamt betrachtet sollten all diese Faktoren noch weiter untersucht und erforscht werden.

4.2 Einfluss verschiedener Faktoren der Pflanze auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat

Nach dem Boden wurde der Fokus auf die Pflanze gerichtet. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Pflanzen in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage sind, P_{org} zu mobilisieren und sich P daraus anzueignen (Steffens *et al.* 2010; Leppin 2007).

Aus Abb. 3.9 S. 58 geht hervor, dass Raps, Straucherbse und Phacelia fast zu 100%, also genauso gut das P aus dem Na-Phytat nutzen können, wie das aus der $Ca(H_2PO_4)_2$ -Variante. Es besteht eine hohe relative Nutzungseffizienz. Es folgen mit rund 80% der Mais und die Weißlupine und in absteigender Reihenfolge Zuckerrübe, Weizen, Mexikanische Sonnenblume und Buchweizen mit 58 - 51%. Zu 34% kann Roggen P aus Na-Phytat im Vergleich zur $Ca(H_2PO_4)_2$ -Variante nutzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Nutzpflanze, die Kartoffel (*Solanum tuberosum*), in Gefäßversuchen untersucht. Die Kartoffel stellt zum einen eine wichtige Kulturart in Deutschland dar und zum anderen wählte eine Forschergruppe diese Pflanzenart aus, um sie gentechnisch zu verändern. Hierbei wurde eine synthetisierte Phytase hochreguliert (Zimmermann *et al.* 2003), um damit die Aneignung von P_{org} zu steigern. Außerdem gilt die Ertragsfähigkeit der Kartoffel als sehr vom im Boden verfügbaren Phosphor abhängig (Hüwing 2011). Der Phosphor-Düngebedarf bei der Kartoffel liegt je nach Versorgungsstufe bei 0 - 180 kg/ha, in der Versorgungsstufe C bei 70 - 100 kg/ha (Hüwing 2011). Es wird empfohlen den Dünger aufgrund des schwachen Wurzelsystems wurzelnah zu platzieren. Dies bedeutet entweder eine Unterfußdüngung vorzunehmen oder den Dünger in den Damm einzuarbeiten (Hüwing 2011).

Daher kam die Frage auf, wie effizient diese Pflanzenart sich P aus P_{org} aneignen kann. Dies führte zu Hypothese Nummer 2: Die Aneignung von organisch gebundenem Phosphor P_{org} ist von der Pflanzenart abhängig und damit genetisch bedingt.

a) Die Nutzpflanzen Raps (*Brassica napus* cv. Carousel) und Kartoffel (*Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer P_{org} -Aneignung signifikant.

b) Die Kartoffelsorten *Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel unterscheiden sich hinsichtlich ihrer P_{org} -Aneignung signifikant.

Es zeigte sich bei dem oben genannten Versuch (Abb. 3.9, S. 58), dass die Kartoffel nur minimal P_{org} als P-Quelle verwenden konnte und statistisch keine Unterschiede in der Frischmasse im Vergleich zur Kontrolle auftraten (Abb. 3.7, S. 56). In der Übersicht und im Vergleich zu anderen Kulturarten wird deutlich, dass die Kartoffel so gut wie keine Fähigkeit besitzt (11%), sich P_{org} anzueignen (Abb. 3.9).

Da es sich bei dem Versuchsboden um den Luvisol Unterboden handelte, konnte eine mikrobielle Aktivität innerhalb der Versuchszeit von 35 Tagen vernachlässigt werden (Abb. 3.1a). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in der Aneignungseffizienz durch die Pflanze hervorgerufen wurden. Eine unterschiedliche P_{org} -Aneignungseffizienz könnte in den Wurzelexsudaten begründet liegen. Verschiedene Strategien, die z. B. die Weißblupine verwendet, um sich P anzueignen, stellt Zimmermann (2003) in einer Übersicht sehr anschaulich dar (s. S. 17, Abb. 1.5). Er nennt hier u.a. die Sekretion von organischen Anionen, Chelatkomplexen, Phosphatasen und Phenolen, die reduzierend auf z. B. Eisenphosphate ($FePO_4 + 1e^- \rightarrow Fe^{2+} + PO_4^{3-}$) wirken und organische Anionen vor mikrobiologischem Abbau schützen.

Eine zusätzliche Gabe von organischen Anionen, vor allem Citrat, führen bei Kohl unter P-Mangelbedingungen zu einer verbesserten P-Aufnahme (Dechassa *et al.* 2004), da die Anionen einen Austausch von Phosphat an amorphem Aluminium fördern können (Dechassa *et al.* 2004; Fox *et al.* 1990; Bolan *et al.* 1997). Im Vergleich dazu führt ein P-Mangel bei der Kartoffel nur zu einer erhöhten Exudation von Succinat (Dechassa *et al.* 2004), welches nicht so stark wirksam zur Mobilisierung von P ist, wie Citrat (Nagarajah *et al.* 1970). Hoffland *et al.* (1989) untersuchten Raps auf die Abscheidung von organischen Anionen und stellten fest, dass vor allem Malat und Citrat direkt hinter der Wurzelspitze mit einer signifikant höheren Menge als in anderen Wurzelzonen abgeschieden wurden. Die Exudation organischer Anionen war bei der

P-Mangelvariante signifikant höher als bei der mit ausreichend P versorgten Rapspflanze, aber auch die Ansäuerung der Rhizosphäre und die Konzentration an organischen Säuren in den entsprechenden Wurzelabschnitten waren signifikant erhöht (Hoffland *et al.* 1989). Raps könnte daher durch Abgabe von Protonen das pH-Optimum für die P-Verfügbarkeit und die wurzelgebundene Phosphatase besser als die Kartoffel einhalten. Man vergleiche hierzu auch die Abschnitte der Wurzel an denen ausreichend Phosphataseaktivität messbar ist (Zimmermann *et al.* 2004). Diese Abschnitte decken sich, auch wenn jeweils zwei unterschiedliche Pflanzenarten untersucht wurden, annähernd mit denen der Citrat- und Malatabgabe. Hoffland *et al.* (1989) und andere Wissenschaftler sprechen von organischen Säuren, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass nicht organische Säuren, sondern deren Anionen abgeschieden werden und ein Ausgleich je nach Pflanzenart mit unterschiedlichen Kationen erfolgt (Ryan *et al.* 2001). An der Weißblupine (*Lupinus albus* L.) konnten Zhu *et al.* (2005) zeigen, dass die Abgabe von Citrat über die Plasmamembran der Proteiodwurzelzellen nicht streng an die Abgabe von H^+ gebunden ist, es können auch andere Kationen, wie K^+ und Na^+ dazu dienen. Die Abgabe von Malat zeigt jedoch eine starke Abhängigkeit zur H^+ -Abgabe (Zhu *et al.* 2005).

In Vorversuchen in Wasserkultur konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass kaum Aktivität von Sauren Phosphatasen, die abgeschieden wurden, in der Lösung vorlag (ca. 0,5 bis 3% des V_{max} -Wertes der Gesamtphosphatase (= wurzelgebundene + freie Phosphatase)). Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass wurzelgebundene Saure Phosphatasen eine viel höhere Aktivität zeigten. Deshalb wurde in den nachfolgenden Versuchen die Aktivitätserfassung der wurzelabgeschiedenen Enzyme vernachlässigt. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass die Pflanze Werkzeuge abgeben würde, die in der Bodenlösung zwar ihre Arbeit leisten, wobei aber noch nicht gesichert ist, dass das abgespaltene Phosphat tatsächlich die Wurzel wieder erreicht, oder ob vorher ein Mikroorganismus oder eine Konkurrenzpflanze das Phosphat aufnimmt. Wurzelgebundene Enzyme haben daher den Vorteil, die Chancen erheblich zu erhöhen, das abgespaltene Phosphat direkt über nebenliegende Transporter aufzunehmen. Inwieweit die Effizienz der P-Transporter eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft.

Auf der anderen Seite ist das Abscheiden der Enzyme dann von Vorteil, wenn die Mobilität der Substrate, aufgrund z. B. ihrer Größe oder Ladung, eingeschränkt ist.

Warum die Aneignung von P aus P_{org} bei der Kartoffel aus dem Unterboden so schlecht ausfiel (s. S. 53, Abb. 3.5 bzw. S. 58, Abb. 3.9), sollte mit Hilfe der Wasserkulturversuche untersucht werden, bei denen die wurzelgebundenen Sauren Phosphatasen, in den Fokus rückten. Es sollte geklärt werden, welche biochemischen Unterschiede bei dem, für die Mobilisierung wichtigen Enzym, zwischen den Pflanzenarten und gegebenenfalls Pflanzensorten (*Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel) die Ursache für die schlechte bzw. gute P-Aneignungseffizienz aus organisch gebundenen Verbindungen sind. Eine mögliche Ursache wären verschiedene Isoformen der Sauren Phosphatase in unterschiedlichen Pflanzenarten oder auch -sorten.

In dem *in vivo*-Experiment stellte sich heraus, dass die Enzyme, die getestet wurden (Saure Phosphatasen) unterschiedliche Affinitäten zu dem Substrat NPP aufwiesen (Abb. 3.19; S. 68). Dies war der erste Hinweis auf Unterschiede in der genetischen Ausstattung der verschiedenen Pflanzenarten bezüglich der Fähigkeiten, P aus organisch gebundenen Verbindungen anzueignen.

Erstaunlich war bei beiden Wasserkulturversuchen, dass sowohl *in vivo* also auch *in vitro* die Enzymkinetik der Sauren Phosphatase nicht der Michaelis-Menten-Kinetik folgte (S. 66 Abb. 3.17; S. 73 Abb. 3.24). Es konnte durch die Eadie-Scatchard-Darstellung eine negative Kooperativität festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Zimmermann (2003), der ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf der Enzymaktivität der Phosphomonoesterase feststellte. Mögliche Ursachen für eine negative Kooperativität sind bei Ahlers *et al.* (1982) erklärt. Die Autoren weisen nicht nur auf allosterische Effekte hin, die die mögliche Ursache für dieses Phänomen sein können, sondern lenken die Aufmerksamkeit zum einen auf mögliche elektrostatische Abstoßungen zwischen den Liganden, die den normalen Ablauf der Michaelis-Menten-Kinetik stören, und zum anderen auf die Möglichkeit, dass die Kinetik sich aus zwei Isoformen mit jeweils eigener Michaelis-Menten-Kinetik zusammensetzen könnte. Ganz unwahrscheinlich ist der letzte Aspekt nicht, da als Substrat NPP verwendet wurde, das als Molekül, welches nicht in der Natur vorkommt,

mit seiner Struktur wahrscheinlich mehrere Phosphatasen anspricht. Jedoch wird vermutlich bei keiner Phosphatase die höchste Affinität erreicht, da evolutionstechnisch keine gemeinsame Entwicklung möglich war. Daher könnte es sein, dass z. B. das Enzym Phytase auf NPP angesprochen hat, aber auch gleichzeitig eine andere Saure Phosphatase. Es könnte sich natürlich auch um allosterische Effekte handeln, dass das Enzym mehr als eine Bindungsstelle aufweist und beim Andocken des ersten Liganden sich in seiner Struktur verändert, sodass ein zweiter Ligand nur erschwert an die andere Bindungsstelle herankommt (Bisswanger 2008).

Im *in vivo*-Experiment wurde weiterhin festgestellt, dass der Raps mit seiner niedrigen Maximalgeschwindigkeit, dafür aber auch mit niedrigerer Konstante K_h besser für die niedrigen P_{org} -Konzentrationen in der Bodenlösung (Bodenlösung: ca. 10 - 200 μM P_{org} (Steffens 2011)) geeignet zu sein scheint (s. S. 64, Abb. 3.16). Die im Gegensatz zur Kartoffel hohe Affinität der Sauren Phosphatase beim Raps, ist eine mögliche Ursache für die bessere P-Aneignungseffizienz des Rapses.

Mit dem Substrat NPP, welches in der wissenschaftlichen Praxis üblicherweise für ebendiese Versuchszwecke verwendet wird, konnte vorerst geklärt werden, ob überhaupt Unterschiede bei den Enzymen bestehen. Um diese Erkenntnis auf andere Substrate zu übertragen, müssten diese erst getestet werden. Bekanntlich sind einige Enzyme sehr substratspezifisch, andere weniger. Auf der anderen Seite konnte in dem ersten Pflanzenexperiment gezeigt werden, dass die Kartoffel das Na-Phytat kaum nutzen kann. Es scheinen also Parallelen zwischen den Substraten aufzutreten, was das Ergebnis dieser Arbeit unterstützt.

In dem zweiten Wasserkulturversuch sollte die Zellwand der Wurzeln inkl. der Zellwand gebundenen Phosphatase isoliert werden, um arbiträre Fehler auszuschließen. Die Ergebnisse des ersten Wasserkulturversuches sollten mit diesem Versuch bestätigt werden, da ausgeschlossen werden sollte, dass die Pflanze durch mögliche Stressreaktionen im *in vivo*-Versuch durch die Versuchsdurchführung Einfluss auf die Enzymaktivität hatte. Aber es zeigte sich, auch wenn die absoluten Zahlen aufgrund der unterschiedlichen Größeneinheiten schlecht miteinander vergleichbar sind, dass die Aussagen, dass Un-

terschiede in der Enzymaktivität bestehen, grundsätzlich die gleichen bleiben. Die Sauren Phosphatasen in der Zellwand zeigten keine weiteren biochemischen Unterschiede, pH-Optimum und Aktivierungsenergie waren bei allen drei Genotypen statistisch nicht signifikant verschieden (S. 71 Abb. 3.22; S. 70 Abb. 3.20). Das lässt darauf schließen, dass die eben genannten biochemischen Eigenschaften im Genom konserviert wurden. Es können posttranslationale Modifikationen in den jeweiligen Genotypen nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hypothese II a) nicht widerlegt werden kann. Die beiden Pflanzenarten Raps (cv. Carousel) und Kartoffel (cvs. Belana und Marabel) unterschieden sich signifikant in der Aneignung von P aus P_{org} . Die Hypothese II b) muss vorerst abgelehnt werden, da die Untersuchungsergebnisse - mit Ausnahme des Hill-Koeffizienten - alle nicht signifikant verschieden waren. Man sollte nochmals darauf hinweisen, dass eine gewisse Tendenz zum Unterschied zu sehen ist. Dazu müssten aber molekulargenetische Methoden verwendet werden, um die Aussage schärfen zu können. Es liegt jedoch bei der gleichen Pflanzenart nahe, dass die Unterschiede nicht allzu groß sind, weil darauf kein Zuchtziel ausgerichtet wurde.

4.3 Einfluss der kombinierten Faktoren des Bodens und der Pflanze auf die Mobilisierung von organisch gebundenem Phosphat

Nach diesen Erkenntnissen wurde ein erneuter Gefäßversuch angelegt, der die bisherigen Erkenntnisse kombinieren sollte. Es wurde angenommen, dass die biologische Aktivität doch insgesamt mehr Einfluss auf die Verfügbarkeit ausübt, als die genetischen Unterschiede innerhalb der Pflanzen, was zur dritten Hypothese führt: Genetische Unterschiede bzgl. der P_{org} -Aneignung bei ausgewählten Nutzpflanzen zeigen sich bei eingeschränkter biologischer Aktivität des Bodens.

Um dies zu testen, wurde der Boden Luvisol Oberboden II verwendet, als aktiver Oberboden (siehe S. 83), der von einer Fläche des ökologisch wirt-

schaftenden Universitätsversuchsbetriebes Gladbacher Hof stammt. Getestet wurden wiederum Raps (cv. Carousel) und Kartoffeln (cvs. Belana und Mabelle) unter Kontrollbedingungen ohne P-Gabe, mit $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ und mit Na-Phytat. Erstaunlicherweise konnten sowohl bei Raps, als auch bei den beiden Kartoffelsorten jeweils keine signifikanten Unterschiede bei der Frischmasse (s. S. 60, Abb. 3.11) und der P-Konzentration (s. S. 60, Abb. 3.12) zwischen der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ - und der Na-Phytat-Variante festgestellt werden. Dass in der Tendenz die Kartoffelsorten eine höhere P-Konzentration in der Na-Phytat-Variante besaßen als bei der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante, lässt sich mit dem Effekt der Aufkonzentrierung erklären. Auch lag in diesem Versuch bei allen drei Genotypen die Aneignungseffizienz des Phosphats aus Na-Phytat bei ca. 70% (s. S. 61, Abb. 3.13). Die Kartoffeln konnten in diesem Oberboden deutlich besser die angebotene P-Quelle nutzen, als in den Versuchen auf dem Unterboden. Dagegen zeigte der Raps schlechtere Werte als angenommen. Durch den Vergleich mit den Bodeninkubationsversuchen, die eine deutlich längere Versuchszeit aufwiesen, kann eine vermehrte Mineralisation im Oberboden nicht der Grund für diesen Anstieg der Aneignungseffizienz bei den Kartoffeln sein. Eine Möglichkeit, die verbesserte Aneignungseffizienz bei der Kartoffel zu erklären, ist, dass die P_{org} -Konzentration der Bodenlösung in dem V_{max} -Bereich der Kartoffelphosphatase liegt. Dadurch könnte sie einen gewissen Vorteil im Bezug auf die Aneignung besitzen. Eine wahrscheinlichere Erklärung, jedoch nicht nachgewiesen, ist die mögliche Mykorrhizierung der Kartoffeln. Dadurch könnte eine ca. siebenfach höhere Aneignungseffizienz (vgl. Abb. 3.13, S. 61) im Vergleich zu dem Pflanzenanzucht I Versuch (vgl. Abb. 3.9, S. 58) erklärt werden, da aufgrund der ökologischen Wirtschaftsweise eine hohe biologische Aktivität vorhanden ist, und damit die Wahrscheinlichkeit höher auch auf passende mykorrhizierende Pilze zu treffen. In einer Untersuchung von Bayrami *et al.* (2012) konnte festgestellt werden, dass durch die Inokulation von Kartoffelpflanzgut mit Mykorrhiza-Pilzen, der Aufwand von P-Düngemitteln reduziert werden konnte. Das Argument, dass durch die Präsenz der Pflanze im Boden die Aktivität der Phosphatasen und die Population der Mikroorganismen erhöht werden kann (Tarafdar *et al.* 1988), sollte mit Vorsicht genutzt werden, da dies dann auch auf den Raps zutreffen könnte. Hierbei müsste näher untersucht werden, ob die Wurzelexsudate der zwei Pflanzen sich in

der Auswirkung auf Mikroorganismenpopulationen unterscheiden. Des Weiteren wird bei Yao *et al.* (2001) beschrieben, dass durch die Mykorrhizierung eine pH-Absenkung in der unmittelbaren Nähe der Hyphen erfolgte. Dadurch könnten die Umstände, P verfügbarer zu machen, sich bei der Kartoffel verbessert haben. Raps, wie alle Brassicaceae, geht keine Symbiose mit einem Mykorrhizapilz ein (Kadereit *et al.* 2014). Die Erklärung für das schlechte Abschneiden des Raps, ist zum einen, dass in der $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante mehr vorhandenes Boden-P aufgenommen wurde, als in der Kontrolle, da in dieser Variante die P-Aneignungsmaschinerie schneller durch die $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Gabe angelaufen war und durch z. B. vermehrtes Wurzelwachstum die verschiedenen P-Quellen besser erschließen konnte. Dadurch wäre der P-Gehalt in der Pflanze, der aus dem Düngemittel stammt, überschätzt worden und drückt damit das Verhältnis aus Na-Phytat zur $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ -Variante. Die andere, wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass in der Na-Phytat-Variante weniger vorhandenes Boden-P aufgenommen wurde, da es wahrscheinlich gleichwertig zum hinzugefügten Na-Phytat war, wenn man den Aufwand für die Pflanze sich P aus diesen beiden Quellen anzueignen, vergleicht. Dies hat zur Folge, dass eine zu große P-Menge der Kontrollvariante von der Na-Phytat-Variante abgezogen wurde, woraus sich schließen lässt, dass eine größere Menge an P aus dem Na-Phytat vom Raps aufgenommen wurde, als angenommen und daher die Aneignungseffizienz eigentlich größer als 70% sein müsste. Allerdings hätte man dies nur mit radioaktiver Markierung der Düngemittel nachweisen können.

Eine Möglichkeit, weshalb das Projekt von (Zimmermann *et al.* 2003) nicht weiter verfolgt wurde, könnten die Eigenschaften des Enzyms selbst sein. Dieses Enzym wurde, durch die Hochregulation, vermehrt gebildet. Diese Maßnahme konnte zwar auf Substrat (Quartz) mit Phytatzusatz eine 40% erhöhte P-Konzentration in den Blättern und um 20% verbesserte Sprossmasse erzielen, jedoch konnten in Vorversuchen auf Bodensubstrat keine Unterschiede bei der P-Konzentration im Spross zwischen genetisch veränderter und Kontrollpflanze festgestellt werden (Zimmermann *et al.* 2003). Dies wiederum untermauert die Vermutung der dritten Hypothese, dass nur bei eingeschränkter biologischer Aktivität genetische Unterschiede hervortreten. Ob die Verfüg-

barkeit von P_{org} im Boden oder ob das Phosphat gleich wieder gebunden wird und damit limitierend wirkt (Zimmermann *et al.* 2003), oder ob die Enzymkinetik die Ursache sein könnte, bleibt zu klären. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass die Aneignungseffizienz aus der Effizienz der Komponente Nährstofftransport zur Wurzel und der Nährstoffaufnahme in die Pflanze besteht (Schubert 2006). Daher könnte man die Wurzelmorphologie als Ursache für verschiedene Effizienzen annehmen. Je größer das Wurzelsystem ist, desto besser bzw. wahrscheinlicher ist die Nährstoffaufnahme, da der Transport zur Wurzel wahrscheinlicher ist. Auch die Verteilung der Enzyme an der Wurzel könnte einen Einfluss auf die Aneignung haben (Zimmermann *et al.* 2004). So ist bei der Kartoffelsorte Desiree, bei den Sauren Phosphatasen StPAP2 und StPAP3, die bei P-Mangel vermehrt produziert werden, hauptsächlich an den Wurzelspitzen Aktivität zu sehen (Zimmermann *et al.* 2004). In dem Pflanzenexperiment mit dem Oberboden (Pflanzenanzucht II) zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen bei der Wurzelfrischmasse (s. S. 60, Abb. 3.11 bzw. bei der Wurzellänge (s. S. 62, Abb. 3.14) nur zwischen wenigen verschieden gedüngten Varianten. Ein Grund hierfür könnte der begrenzte Wurzelraum in den Mitscherlichgefäßen sein.

In einem normalen Bodenprofil ist die Kartoffel dem Raps mit seinem Wurzelsystem unterlegen (Hopkins 2015), wie z. B. bei der Wurzeldichte (50% geringer als bei Weizen und Winterraps) (Stalham *et al.* 2001). Auch beim Auftreten von Haarwurzeln im Vergleich zur Gesamtwurzel schneidet die Kartoffel im Vergleich zum Weizen schlecht ab (nur 21% der Kartoffelwurzeln hatten einen Durchmesser von 10 μm , im Vergleich Weizen: 58%; Raps wurde nicht untersucht) (Yamaguchi 2002). Außerdem unterscheidet sich in der Wurzelfinheit der Genotyp Carousel (Raps) signifikant von Marabel (Kartoffel) (Abb. 3.15). Wie schon vorher erwähnt, könnte der Grund für die Kartoffel, ein nicht so feines Wurzelsystem auszubilden, daran liegen, dass sie mit den Mykorrhizapilzen eine Symbiose eingeht und daher feinste Wurzelhaare nicht ausbilden muss.

Ein weiterer Aspekt ist, dass je nach Alter der Pflanzen der Bedarf und damit die Aneignung von P in einer Pflanze unterschiedlich ist (Gransee 2002), daher kann nur gemutmaßt werden, dass die gewählten Zeiträume von Raps und Kartoffel sich entsprechen. Jedoch zeigen die Pflanzenversuche, dass bei

beiden Kulturarten nach 35 Tagen ein P-Mangel in den Kontrollpflanzen nachzuweisen war.

Somit kann die dritte Hypothese, dass genetische Unterschiede bzgl. der P_{org} -Aneignung bei ausgewählten Kulturpflanzen sich nur bei eingeschränkt biologisch aktiven Böden darstellen, nicht widerlegt werden, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf dem biologisch aktiven Boden zeigten. Wie genau dies alles in seiner Komplexität zusammenhängt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht genau erörtert werden. Jedoch scheint es, als wären die Pflanzen genetisch so codiert, dass sie mit oder auch ohne Hilfe anderer Organismen Systeme aufgebaut haben, um P_{org} für sich verfügbar zu machen.

5 Zusammenfassung

Phosphor ist eine endliche Ressource. Deswegen wird in der Landwirtschaft nach Möglichkeiten gesucht, die Ressource zu schonen, um sie so lange wie möglich als Nährstofflieferanten zu erhalten. Verschiedene Recyclingmethoden, aber auch die Nutzung vorhandener P-Vorräte im Boden, wie z. B. organisch gebundenen Phosphaten (P_{org}), stehen im Fokus. In dieser Arbeit wurde die Mobilisierung von Phosphat aus P_{org} in verschiedenen Bodentypen, das Aneignungsvermögen von Phosphat aus P_{org} von verschiedenen Pflanzenarten bzw. -sorten, sowie das Zusammenspiel von Mobilisierung im Boden und Aneignung der Pflanze bzgl. P_{org} untersucht.

Wie verschiedene Faktoren die Mobilisierung von P_{org} im Boden beeinflussen, wurde anhand von zwei Bodeninkubationsversuchen, die unter kontrollierten Bedingungen abliefen, untersucht. Es stellte sich heraus, dass der Bodentyp auf die Umsetzung von P_{org} zu Phosphat signifikanten Einfluss hat. Auch der pH-Wert beeinflusst die Mobilisierung signifikant. Bei unterschiedlichen Temperaturen (15°C und 25°C) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Der zweite Aspekt der Arbeit war die Fähigkeit zu untersuchen, wie gut sich Pflanzen Phosphat aus P_{org} aneignen können. In vorangegangenen Arbeiten wurden schon einige Kulturpflanzenarten, wie z. B. Mais oder Zuckerrübe dazu untersucht. In dieser Arbeit wurde die Kartoffel (*Solanum tuberosum* cvs. Belana und Marabel) dem Raps gegenübergestellt (*Brassica napus* cv. Caroussel), von dem bekannt ist, dass er P_{org} nutzen kann. Es stellte sich im Versuch auf biologisch kaum aktivem Unterboden heraus, dass die Kartoffel (*Solanum tuberosum* cv. Belana) nur 11% des Phosphats aus P_{org} in Form von Na-Phytat nutzen konnte. Deswegen wurden weitere Untersuchungen bzgl. der Phosphataseaktivität (eine Möglichkeit der Pflanzen Phosphat zu mobilisieren) an den drei Versuchspflanzen vorgenommen, um mögliche Gründe der Unterschiede zwischen Pflanzenarten oder sogar -sorten zu finden. Beim Vergleich der Enzymkinetik konnte festgestellt werden, dass sich die Pflanzentypen signi-

fikant unterscheiden. Die Unterschiede zwischen den Kartoffelsorten waren nicht signifikant, jedoch eine gewisse Tendenz erkennbar, dass auch hier Unterschiede, evtl. auf molekulargenetischer Ebene, vorliegen. Sowohl im *in vivo*- als auch im *in vitro*-Versuch wurde festgestellt, dass die Saure Phosphatase nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt, sondern einer negativen Kooperativität unterliegt.

Zum Schluss wurden beide Faktoren (Pflanze und Boden) zusammen untersucht, ob die genetischen Unterschiede bzgl. der Phosphataneignung aus P_{org} sich nur bei eingeschränkt biologischer Aktivität des Bodens zeigen. Dazu wurde ein biologisch aktiver Oberboden verwendet und die drei Genotypen mit drei Düngungsvarianten darauf angezogen. Es konnten keine Unterschiede in der P_{org} -Aneignung festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass viele Einflussfaktoren in diesem komplexen System Pflanze/Boden noch nicht bekannt sind bzw. noch nicht untersucht wurden. Es scheint jedoch so, dass Pflanzen Systeme entwickelt haben, wie sie mit oder ohne Hilfe von Mikroorganismen, Phosphat aus P_{org} -Verbindungen mobilisieren können.

Deshalb sollten Methoden entwickelt werden, um P_{org} standardmäßig in Böden zu untersuchen, um P-Düngemittel bei entsprechend fähigen Pflanzen einsparen und dadurch die P-Vorkommen besser schonen zu können.

6 Summary

Phosphorus is an exhaustible raw material. For this reason agriculture is searching for possibilities to conserve the resource, keeping it as a nutrient supplier as long as possible. Various recycling methods, but also the use of available P in the soil, such as organically bound phosphates (P_{org}), stand at the focal point of view. In this work, the mobilization of phosphate from P_{org} in different types of soil, the uptake capacity of phosphate from P_{org} of different plant species or varieties, as well as the interaction of mobilization in soil and uptake efficiency P_{org} of the plant was investigated.

How different factors affect mobilization of P_{org} in soil was investigated with two soil incubation trials that took place under controlled conditions. It turned out that the type of soil has significant impact on the mobilization of phosphate from P_{org} . Also the pH-value influenced the mobilization significantly. At different temperatures (15°C and 25°C), no differences were found.

The second aspect of the work was to investigate the ability of how well plants can acquire phosphate from P_{org} . In previous works already some other crop species, such as corn or sugar beet have been studied. In this work potato (*Solanum tuberosum* cvs. Belana and Marabel) was opposed to oilseed rape (textit Brassica napus cv. Carousel) which is known to be able to use P_{org} . In a trial with hardly biological active soil it turned out that the potato (*Solanum tuberosum* cv. Belana) could only use 11% of the phosphate derived from P_{org} in form of Na-phytate. Therefore further investigations of the phosphatase activity (one possible kind of mobilizing phosphate by the plant) had to be done by testing the three plants to find possible causes of the differences between plant species or even varieties. When comparing the enzyme kinetics significant differences of the plant species were observed. The differences between the varieties of potatoes were not significant, however, a certain tendency can be seen that differences possible at the molecular genetic level might occur. Both *in vivo*- as well as in *in vitro*-trials showed that acid phosphatase does

not follow Michaelis-Menten kinetics, but a negative cooperativity.

Finally, both factors (plant and soil) were examined together, whether the genetic differences of phosphate acquisition from P_{org} only occur at limited biological activity of the soil. A biologically active topsoil was used and the three genotypes with three fertilization treatments were grown on it. There were no differences in the P_{org} acquisition. This suggests that many factors in this complex plant/soil system are not yet known or have not yet been studied. However, it appears that plants have developed systems for phosphate mobilization from P_{org} compounds with or without the aid of microorganisms.

Therefore, methods should be designed to investigate P_{org} in soils by default to reduce P-fertilizer in accordance to plant types and to protect the P-deposits better.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Einfaktorielle ANOVA + Tukey HSD je Konzentrationsstufe. Signifikanzen für Abb.3.16

Substrat- konzentration in μM	Belana	Marabel	Carousel	Varianz- homogenität
14000	a	a	b	ja
9000	a	a	b	ja
7200	a	b	c	ja
4500	a	ab	b	ja
2700	a	a	a	ja
900	a	ab	b	ja
500	a	a	a	nein
300	a	a	a	nein
200	a	b	b	ja
150	a	b	a	nein
100	a	b	b	nein
75	a	b	b	ja
50	a	b	a	nein
20	a	a	a	nein
10	a	c	b	ja
5	b	a	a	ja
2	a	a	a	nein
0	a	a	a	ja

Tabelle 7.2: Einfaktorielle ANOVA + Tukey HSD je Konzentrationsstufe. Signifikanzen für Abb. 3.23

Substrat- konzentration in μM	Belana	Marabel	Carousel	Varianz- homogenität
20000	a	a	b	ja
14000	ab	a	b	ja
10000	ab	a	b	ja
7200	a	a	a	ja
4500	a	a	b	ja
2700	a	a	a	ja
900	a	a	a	ja
500	a	a	a	ja
100	a	a	a	ja
50	a	a	a	ja
10	a	b	b	ja
0	a	b	b	ja

8 Literatur

- Acosta-Martínez, V. & Tabatabai, M. A.: Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* **31**, 85–91 (2000).
- Ahlers, J., Arnold, A., von Döhren, F. R. & Peter, H. W.: *Enzymkinetik*, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1982).
- Arai, Y. & Sparks, D.: Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. *Advances in Agronomy* **94**, 135–179 (2007).
- Bayrami, S., Mirshekari, B. & Farahvash, F.: Response of potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) to seed inoculation with mycorrhiza strains in different phosphorus fertilization. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **10**, 726–728 (2012).
- Beißner, L.: Mobilisierung von Phosphor aus organischen und anorganischen P-Verbindungen. Doktorarbeit Göttingen (1997).
- Bisswanger, H. In: *Enzyme kinetics - principles and methods*. 2nd ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2008).
- Blume, H.-P., Brümmer, G., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K. & Wilke, B.-M.: *Scheffer/Schachtschabel - Lehrbuch der Bodenkunde*, 16., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2010).
- Bolan, N., Elliott, J., Gregg, P. & Weil, S.: Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* **24**, 169–174 (1997).
- Breuer, J.: Aufnahme, Metabolismus und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus 4-Nitrophenol in Soja und Weizen Ein Vergleich verschiedener in-vitro-Systeme. Doktorarbeit an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (2001).

- Brinch-Pedersen, H., Olesen, A., Rasmussen, S. K. & Holm, P. B.: Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Molecular Breeding* **6**, 195–206 (2000).
- Bundesarbeitskreis Düngung, B. In: Phosphor- und Kaliumdüngung – brauchen wir neue Düngekonzepte? (2010).
- Condron, L. M., Turner, B. L. & Cade-Menun, B. J. In: Phosphorus: Agriculture and the environment, Agronomy Monograph no. 46 (Hrsg. Sims, J. T. & Sharpley, A. N.) 87–121 American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI (2005).
- Cordell, D. & White, S.: Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future. *Annual Review of Environment and Resources* **39**, 161–188 (2014).
- Cordell, D. & White, S.: Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability* **3**, 2027–2049 (2011).
- Dechassa, N. & Schenk, M. K.: Exudation of organic anions by roots of cabbage, carrot, and potato as influenced by environmental factors and plant age. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **167**, 623–629 (2004).
- Dick, W., Cheng, L. & Wang, P.: Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1915–1919 (2000).
- Dinkelaker, B., Hengeler, C. & Marschner, H.: Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanica Acta* **108**, 183–200 (1995).
- Dinkelaker, B., Römheld, V. & Marschner, H.: Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.) *Plant Cell and Environment* **12**, 285–292 (1989).
- Dracup, M. N. H., Barrett-Lennard, E. G., Greenway, H. & Robson, A. D.: Effect of phosphorus deficiency on phosphatase activity of cell walls from roots of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany* **35**, 466–480 (1984).

- Duff, S. M. G., Lefebvre, D. D. & Plaxton, W. C.: Purification, characterization, and subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures: comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **286**, 226–32 (1991).
- Duff, S. M. G., Plaxton, W. C. & Lefebvre, D. D.: Phosphate-starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 9538–9542 (1991).
- Eivazi, F. & Tabatabai, M. A.: Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **9**, 167–172 (1977).
- Fox, T. R., Comerford, N. B. & McFee, W. W.: Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic acids. *Soil Science Society of American Journal* **54**, 1763–1767 (1990).
- Frede, H.-G. & Bach, M. In: *Landwirtschaft 2025 - Anforderungen an den effizienten Pflanzenbau* 61–65 (2011).
- Gerke, J., Römer, W. & Jungk, A.: The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* L.: effects on soil solution concentrations of phosphate, iron, and aluminum in the proteoid rhizosphere in samples of an oxisol and a luvisol. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **157**, 289–294 (1994).
- Gransee, A.: Wechselwirkungen zwischen den Wurzelabscheidungen von Kulturpflanzen und der P-Dynamik in der Rhizosphäre. Ansätze zur Verbesserung der Nährstoffeffizienz. Habilitationsschrift an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002) Habilitationsschrift.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Skromsager Møller, I. & White, P. In: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* 3. Auflage (Hrsg. Marschner, P.) 135–189 Academic Press, Elsevier, Amsterdam (2012).
- Helal, H. M. & Sauerbeck, D. In: *Plant roots and their environment* (Hrsg. McMichael, B. L. & Perrson, H.) 93–97 Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam (1991).

- Hill, A. V.: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin in its dissociation curves. *Proceedings of the Physiological Society* iv–vii (1910).
- Hoffland, E., Findenegg, G. R. & Nelemans, J. a.: Solubilization of rock phosphate by rape II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant and Soil* **113**, 161–165 (1989).
- Hopkins, B. G. In: *Handbook of Plant Nutrition* 2nd ed. (Hrsg. Barker, A. V. & Pilbeam, D. J.) 65–126 (2015).
- Hüwing, H.: *Kartoffelanbau: Düngung für Ertrag und Qualität*. LWK Niedersachsen, Bezirksstelle Uelzen (2011).
- Juma, N. G. & Tabatabai, M. A.: Distribution of phosphomonoesterases in soil. *Soil Science* **126** (1978).
- Kadereit, J. W., Körner, C., Kost, B. & Sonnewald, U.: *Strasburger - Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*, 37. Auflage, 486–488 Springer Spektrum, Heidelberg (2014).
- Kim, K. Y., Jordan, D. & McDonald, G. A.: Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* **26**, 79–87 (1998).
- Kumar, S., Chaudhuri, S. & Maiti, S. K.: Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil - a review. *Middle-East Journal of Scientific Research* **13**, 898–906 (2013).
- Kurmies, B.: Fraktionierung der Bodenphosphate. *Phosphorsäure* **29**, 118–151 (1972).
- Leppin, T.: *Mobilisierungspotential unterschiedlicher Pflanzen für stabile Phosphatformen im Boden*. Doktorarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen (2007).
- Miller, S., Liu, J., Allan, D., Menzhuber, C., Fedorova, M. & CP, V.: Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant physiology* **127**, 594–606 (2001).

- Nagarajah, S., Posner, A. M. & Quirk, J. P.: Competitive adsorption of phosphate with polygalacturonate and other organic anions on kaolinite and oxide surfaces. *Nature* **228**, 83–85 (1970).
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Römheld, V. & Martinoia, E.: Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.) *Annals of Botany* **85**, 909–919 (2000).
- Neumann, G., Massonneau, A., Martinoia, E. & Römheld, V.: Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* **208**, 373–382 (1999).
- Nuruzzaman, M., Lambers, H., Bolland, M. D. a. & Veneklaas, E. J.: Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* **281**, 109–120 (2006).
- Oehl, F., Frossard, E., Fliessbach, A., Dubois, D. & Oberson, A.: Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 667–675 (2004).
- Oehl, F., Oberson, A., Sinaj, S. & Frossard, E.: Organic phosphorus mineralization studies using isotopic dilution techniques. *Soil Science Society of American Journal* **65**, 780–787 (2001).
- Rastin, R., Rosenpläter, K. & Hüttermann, A.: Seasonal variation of enzyme activity and their dependence on certain soil factors in a beech forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* **20**, 637–642 (1988).
- Ryan, P. R., Delhaize, E. & Jones, D. L.: Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 527–560 (2001).
- Schinner, F. & Sonnleitner, R.: *Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik*, 1. Auflage, 450 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1996).
- Schubert, S.: *Pflanzenernährung Grundwissen* Bachelor, 219 Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (2006).

- Schüller, H.: Die CAL- Methode, eine neue Methode zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Phosphates in Böden. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **123**, 48–63 (1969).
- Schulz, F.: Vergleich ökologischer Betriebssysteme mit und ohne Viehhaltung bei unterschiedlicher Intensität der Grundbodenbearbeitung - Effekte auf Flächenproduktivität, Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit. Doktorarbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen (2012).
- Schwarz, H. M.: Aggregateigenschaften und biologische Aktivität in ausgewählten brasilianischen und deutschen Böden bei unterschiedlicher Bewirtschaftungsweise. Masterarbeit an der Christian-Albrechts-Universität Kiel (2005) Masterthesis.
- Sims, G. M. J. Thomas Pierzynski: Chemistry of phosphorus in soils. In: Chemical processes in soils, 151–192 Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA (2005).
- Spohn, M. & Kuzyakov, Y.: Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. Soil Biology and Biochemistry **61**, 69–75 (2013).
- Stalham, M. A., Allen, E. & J.: Effect of variety, irrigation regime and planting date on depth, rate, duration and density of root growth in the potato (*Solanum tuberosum*) crop. Journal of Agricultural Science **137**, 251–270 (2001).
- Statistisches Bundesamt: Land- und Forstwirtschaft, Fischerei - Bodennutzung der Betriebe (Landwirtschaftlich genutzte Flächen). Fachserie 3 Reihe 3.1.2 **49** (2014).
- Steffens, D.: Persönliches Gespräch zur Konzentration an organisch gebundenem P in der Bodenlösung. (2011).
- Steffens, D., Leppin, T., Luschin-Ebengreuth, N., Yang, Z. M. & Schubert, S.: Organic soil phosphorus considerably contributes to plant nutrition but is neglected by routine soil-testing methods. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **173**, 765–771 (2010).
- Steffens, D. & Schubert, S.: Wir brauchen eine bessere Analytik. DLG Mitteilungen **Juni** (2016).

- Stevens, J. P.: Intermediate statistics, Third ed., pp. 448 Lawrence Erlbaum Associates, (2007).
- Stewart, J. W. B. & Tiessen, H.: Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* **4**, 41–60 (1987).
- Tarafdar, J. & Claassen, N.: Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* **5**, 308–312 (1988).
- Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M. & McKelvie, I. D.: Inositol phosphates in the environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **357**, 449–69 (2002).
- Ullah, A. H. J. & Cummins, B. J.: Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Preparative Biochemistry* **17**, 397–422 (1987).
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C. & Allan, D. L.: Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* **157**, 423–447 (2003).
- Vincent, J. B., Crowder, M. W. & Averill, B. A.: Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 105–110 (1992).
- Werner, W.: Ökologische Aspekte des Phosphor-Kreislaufs. *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **11**, 343–351 (1999).
- Williams, C. & Anderson, G.: Inositol phosphates in some Australian soils. *Australian Journal of Soil Research* **6**, 121–130 (1968).
- Yamaguchi, J.: Measurement of root diameter in field-grown crops under a microscope without washing. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**, 625–629 (2002).
- Yan, F., Zhu, Y., Müller, C., Zörb, C. & Schubert, S.: Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology* **129**, 50–63 (2002).

- Yan, Y., Li, W., Yang, J., Zheng, A., Liu, F., Feng, X. & Sparks, D. L.: Mechanism of myo-inositol hexakisphosphate sorption on amorphous aluminum hydroxide: spectroscopic evidence for rapid surface precipitation. *Environmental science & technology* **48**, 6735–42 (2014).
- Yao, Q., Li, X., Feng, G. & Christie, P.: Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant and Soil* **230**, 279–285 (2001).
- Zhu, Y., Yan, F., Zörb, C. & Schubert, S.: A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? *Plant Cell Physiology* **46**, 892–901 (2005).
- Zimmermann, P.: Root-secreted phosphomonoesterases mobilizing phosphorus from the rhizosphere - A molecular physiological study in *Solanum tuberosum*. Doktorarbeit an der ETH Zürich (2003).
- Zimmermann, P., Regierer, B., Kossmann, J., Frossard, E., Amrhein, N. & Bucher, M.: Differential expression of three purple acid phosphatases from potato. *Plant Biology* **6**, 519–28 (2004).
- Zimmermann, P., Zardi, G., Lehmann, M., Zeder, C., Amrhein, N., Frossard, E. & Bucher, M.: Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 353–360 (2003).

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

9 Danksagung

Um so eine Arbeit zu erstellen, bedarf es nicht nur der Wissbegierigkeit, Ausdauer und Demut, sondern auch der Unterstützung durch einige Mitmenschen, bei denen ich mich abschließend bedanken möchte.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sven Schubert für die Bereitstellung des Themas und Finanzierung, aber vor allem für die Unterstützung während der gesamten Zeit herzlich bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Leithold, der mich nach meinem Masterabschluss in der Idee zu promovieren tatkräftig unterstützte. Durch seine Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Diedrich Steffens konnte ich diese Idee dann am Institut für Pflanzenernährung in die Tat umsetzen.

Bei Herrn Prof. Dr. Diedrich Steffens möchte ich mich ebenfalls für seine kontinuierliche Unterstützung herzlichst bedanken. Er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Auch Herrn Dr. Stefan Hanstein möchte ich meinen Dank aussprechen, da er für den biochemischen Teil meiner Arbeit immer zu Diskussionen und Beantwortung meiner Fragen bereit war.

Mein großer Dank gilt dem gesamten Team des Instituts für Pflanzenernährung sowie dem Team der Gefäßversuchsstation. Vielen Dank Birgit Hütsch, Roland Pfanschilling, Anita Langer, Christina Plachta, Sigrid Beckermann, Christa Lein, Helga Tripp, Edeltraud Rödiger, Claudia Weimer, Elke Kauffeld, Anne Weber sowie Lutz Wilming und Corinna Alles-Becker!

Nicht zu vergessen alle Doktoranden und Studenten des Instituts, sowie Freunde und Familie, die mich in der Zeit begleitet haben. Ohne euch hätte das alles viel länger gedauert ;-)

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

.....

Datum, Ort

.....

Unterschrift: (Alexandra S. Wening)

