

# Hohe Wuchsrleistung auch bei Null-Düngung

Stickstoff-Bindung auch ohne Wurzelknöllchen möglich – Wissenschaftlern gelingt Nachweis für N-Fixierung in Salikazeen

Von Dr. Georg von Wühlisch\*, Großhansdorf

**Pappeln und Weiden können große Mengen Biomasse produzieren, sogar auf ärmeren Standorten. Dabei haben Versuche übereinstimmend gezeigt, dass durch Düngung der Zuwachs kaum erhöht werden kann. In Zeiten in denen das Einsparen von Energie groß geschrieben ist und Produktionsmethoden auf ihren Energiebedarf mittels Energiebilanzen geprüft werden, erhalten Pflanzen, die bei geringem Aufwand viel Energie zu produzieren vermögen, erhöhte Aufmerksamkeit. Dazu gehören Pappeln und Weiden. Warum sie so genügsam sind, ist erst jetzt aufgedeckt und noch nicht im Einzelnen untersucht worden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verfügen alle schnellwachsenden Pappel- und Weidenarten über die Fähigkeit, Luftstickstoff zu fixieren. Im Zusammenhang mit der nachhaltigen Biomasse-Erzeugung bei geringem Energieeinsatz gewinnen Pappeln und Weiden dadurch an Bedeutung.**

Wegen ihres schnellen Wachstums werden Zuchtpappeln in Plantagen in der gemäßigten Zone angebaut, weltweit auf rund 10 Mio. ha. Viele Versuche wurden angestellt, um die Holzerzeugung noch weiter zu optimieren. Diese Versuche ergaben, dass Düngung mit Stickstoff (N) nur geringe oder keine Wirkung bei Pappeln zeigt (Booth, 2008; Coleman et al. 2004; DesRochers et al. 2006; Heilman and Xie, 1993; Jug et al. 1999; Liebach et al. 1999; Mao et al. 2010).

In FACE-Versuchen steigt der Bedarf an Stickstoff mit höheren CO<sub>2</sub> Mengen. Die Pappeln waren jedoch in der Lage, die höheren CO<sub>2</sub>-Mengen in erhöhtes Wachstum umzusetzen, ohne zusätzlich gedüngt worden zu sein (Pregitzer et al. 2000; Luo et al., 2006). Auch sind Düngungs-Tabellen für den Düngeraufwand bei Pappeln weitgehend unbekannt und es gibt wenige oder keine Düngungsempfehlungen für Pappeln und Weiden. Pappeln (*Populus* sp.) und Weiden (*Salix* sp.) sind schnell-

wachsende Pionierarten mit tiefgreifendem Wurzelsystem und der Fähigkeit, sogar auf nährstoffschwachen Standorten hohe Biomassezuwächse zu produzieren.

Untersuchungen an Pappeln, die entlang Flüssen in ihrem natürlichen Habitat auf Sand und Kies wuchsen, zeigten ausreichende Mengen Stickstoff in den lebenden Geweben, eine Beobachtung, die schwer erklärbar war (Coleman et al. 1994, Cooke et al. 2004, Lawrence et al. 1997). Die Erklärung für die Indifferenz der Pappeln gegenüber Nährstoffmangel im Boden wurde kürzlich gefunden und soll im Folgenden betrachtet werden.

## Diazotrophe, N-fixierende Bakterien

Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass eine große Gemeinschaft endophytischer Bakterien im lebenden Gewebe von Pappel- und Weidenarten existiert, deren Funktion noch weitgehend unerforscht ist. Ulrich et al. (2008a) fanden insgesamt 53 taxa auf der Gattungsebene, darunter *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. In auf kontaminiertem Boden wachsenden Pappeln und Weiden identifizierten Taghavi et al. (2009) 78 endophytische

Stämme, die Mehrheit (71 %) gehörten zu *Gammaproteobacteria*, als auch *Serratia* spp., *Rahnella* spp. *Pseudomonas* spp. und *Enterobacter* spp. Unter diesen Endophyten wurden verschiedene diazotrophe, also N-fixierende Bakterien identifiziert. Endophytische Bakterien blieben wegen ihres unauffälligen Vorkommens im lebenden Gewebe des Stammes und der Äste unentdeckt, da sie nicht wie die Rhizobien in der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) in auffälligen Knöllchen an den Wurzeln vorkommen.

Hülsenfrüchtler gehen eine Symbiose mit *Rhizobia*, einer Gattung der Bodenbakterien mit der Fähigkeit der biologischen Stickstoff-Fixierung ein. Dabei gibt die Wirtspflanze Zucker aus der Photosynthese und nimmt Stickstoff der knöllchenbesiedelnden Bakterien. Bei diesem Vorgang wird atmosphärischer Stickstoff (N<sub>2</sub>) durch die Konversion zu Ammoniak (NH<sub>3</sub>) pflanzenverfügbar gemacht. Für diese Konversion wird viel Energie in Form von Adenosin-triphosphat (ATP) benötigt. Durch eine bestimmte Interaktion bindet sich ein spezifisches Bakterium mit einer spezifischen Hülsenfrucht-pflanze, woraus die bekannten Wurzelknöllchen entstehen in denen die Stickstoff-Fixierung stattfindet. Zusätzlich zu den Hülsenfrüchtlern gibt es in verholzenden Arten aus neun Familien (*Betulaceae*, *Cannabaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* und *Rosaceae*) Stickstoff-fixierende Mikroben anderer Arten, darunter *Frankia*. Auch diese leben in speziellen Wurzelknöllchen, gut bekannt ist dies bei den zu den Betulaceen gehörenden Erlen.

## Nachweise der Stickstoff-Fixierung in Salikazeen

Bei den Pappeln und Weiden finden sich die endophytischen Bakterien innerhalb der lebenden Gewebe des Stammes. Diese Endophyten verursachen keine Krankheiten, sondern wirken förderlich auf den Wirt, indem ihm Hormone, peptidische Antibiotika, Enzyme und weitere positive Substanzen bereitgestellt werden. Damit gehören sie zu den wachstumsfördernden Bakterien (Doty et al. 2005, 2009; Doty, 2010; Scherling et al. 2009; Ulrich et al. 2007, 2008a). Zur großen Anzahl wachstumsfördernder Substanzen gehören auch Stickstoff-Verbindungen wie Ammoniak. Diese wurden auch in anderen Pflanzenarten ohne Wurzelknöllchen wie Zuckerrohr, Reis, Kaffee, und Süßkartoffel gefunden (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998; Xin et al. 2009). Die allgemeine Vorstellung, dass Stickstoff-Fixierung ausschließlich mit dem Vorhandensein von Wurzelknöllchen verbunden ist, hat sich demnach als falsch herausgestellt.

Wachstumsfördernde Bakterien wurden in mehreren Pappelarten verschiedener Sektionen gefunden, *Populus trichocarpa*, *P. tremula*, *P. × wettsteinii*, [*Populus alba* × (*Populus davidiana* + *Populus simonii*) × *Populus tomentosa*], *P. × canadensis*, *P. × generosa* und auch in *Salix sitchensis* und *S. goodingii* (vgl. Tabelle). Nicht ganz sicher



Schwarz-Pappelsämlinge (*Populus nigra* L.) in ihrem natürlichen Habitat auf dem Kies einer Sandbank, wo die Nährstoffverfügbarkeit begrenzt ist.



Bestand junger Schwarz-Pappeln (*Populus nigra* L.) aus natürlicher Verjüngung in ihrem natürlichen Habitat auf dem Kies einer Sandbank, ebenfalls mit begrenzter Nährstoffverfügbarkeit.

Fotos: *Populus nigra* Network, Euforgen, Bioversity International, Rom

ist, ob diazotrophische Bakterien in allen Salikazeenarten vorkommen. Angenommen werden kann, dass an typische Flussauen mit nährstoffarmen Sanden angepasste schnell wachsende Pappel- und Weidenarten in der Lage sind, Stickstoff zu fixieren. Im Hinblick auf potenzielle Nutzungsmöglichkeiten wachstumsfördernder Bakterien wäre es wichtig, mögliche Unterschiede in der Wachstumsförderung bestimmter Pappel- und Weiden-Genotypen aufgrund der jeweils besiedelnden Bakterienstämme genauer zu quantifizieren.

## Wachstum auf stickstofffreiem Medium

Um einen zweifelsfreien Nachweis der Stickstoff-Fixierung zu erbringen, haben Xin et al. (2009) die Assimilation des seltenen Isotops <sup>15</sup>N<sub>2</sub> statt des häufigen <sup>14</sup>N<sub>2</sub> analysiert. Sie konnten zeigen, dass der von einer am Naturstandort herangewachsenen *Populus trichocarpa* isolierten Stamm des endophytischen Bakteriums *Burkholderia vietnamensis* in der Lage war, unter <sup>15</sup>N<sub>2</sub> eine zwanzigfach höhere Konzentration dieses Isotops zu assimilieren als unter üblichem Luftstickstoff. Dieser Versuch kann als ein Nachweis der Fähigkeit der Stickstoff-Fixierung eines mit Pappel assoziierten Endophyten gewertet werden.

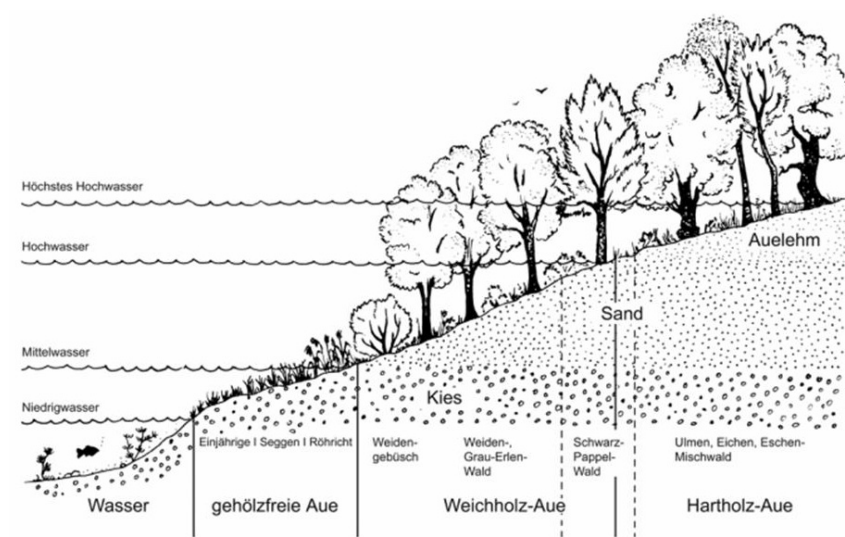
Dieser Endophyt wurde in einem weiteren Versuch auf Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) inokuliert und auf einem stickstofffreien Medium kultiviert. Nach 50 Tagen hatten die inokulierten Pflanzen 42 % an Gewicht und 37 % an Stickstoff im Vergleich zu den nicht inokulierten Vergleichspflanzen zugenommen. Dieses Ergebnis zeigt, wie Inokulierung stickstofffixierender Endophyten das Wachstum anderer Pflanzen unter begrenztem Stickstoff fördern kann. Hinzugefügt werden muss hier, dass dieser *B. vietnamensis*-Stamm in der Lage ist, auch IAA – ein Wachstumshormon – der Wirtspflanze zur Verfügung zu stellen, welches bei der Wachstumsförderung auch eine Rolle gespielt haben mag.

Ein anderes Beispiel der Wachstumsförderung konnten Ulrich et al. (2008b) mit dem von Pappeln isolierten endophytischen Bakterienstamm P22 von *Paenibacillus humicus* zeigen. Er bewirkte an Pappel-Explantaten eine deutlich gesteigerte Wurzelanzahl und -länge, im Vergleich zu den nicht-inokulierten Vergleichsexplantaten. Dieselbe Wirkung wurde auch bei der Bewurzelung von Stechhölzern dieses Pappelklons erreicht (Ulrich et al. 2010). Eine Analyse der nach Inokulierung produzierten Metabolite zeigte, dass die Pappel-Explantate deutlich auf die Anwesenheit des Endophyten durch Produktion höherer Mengen an Asparaginen und Harnstoff, aber reduzierter Mengen organischer Säuren des Tricarbonsäure-Cyclus reagierte. Die Wirkung auf das Metabolitenprofil weist auf eine Stickstoff-Fixierung in der Pflanze hin (Scherling et al. 2009).

## Möglichkeiten der praktischen Nutzung

Die technische Fixierung pflanzenverfügbaren Stickstoffs aus dem molekularen N<sub>2</sub> benötigt einen Energieaufwand von 946 Kilojoules pro Mol und ist damit hoch energieaufwendig. Aus diesem Grund werden Pflanzen für die Erzeugung erneuerbarer Energien bevorzugt, die große Mengen Biomasse mit geringen Kunstdüngermengen erzeugen können. Darüber hinaus können die negativen Auswirkungen überschüssigen Stickstoffs auf die Umwelt (Auswaschung ins Grundwasser, Emission schädlichen N<sub>2</sub>O, usw.) vermieden werden, wenn Stickstoff-fixierende Pflanzen angebaut werden.

Die Energiequelle für die biologische Stickstoff-Fixierung ist ATP, von dem während der Reaktionen ein Äquivalent von 16 Mol hydrolysiert wird. Biologische Stickstoff-Fixierung ist energieeffizienter als der technische Prozess, da er durch Enzyme unterstützt und das N in der erforderlichen Menge an der Stelle



Flußaue im Querschnitt: Dargestellt ist ein Bodenaufbau mit vorwiegend nährstoffarmem Kies im Bereich der Weichholzaue, in der Pappel und Weide ihr natürliches Habitat finden.

## Pappel- und Weidenarten und davon isolierte Bakterien, bei denen die N-Bindung mit verschiedenen Methoden nachgewiesen wurde

Baumart	Bakterienstamm	Nachweismethode	Quellennachweis
<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	Kultur auf N-freiem Medium	Doty et al. 2005
[ <i>Populus alba</i> × ( <i>Populus davidiana</i> + <i>Populus simonii</i> ) × <i>Populus tomentosa</i> ]	<i>Paenibacillus</i>	Metaboliten Analyse (Urea)	Scherling et al. 2009
<i>P. trichocarpa</i> <i>Salix sitchensis</i>	<i>Burkholderia</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Acinetobacter</i>	Kultur auf N-freiem Medium PCR mit <i>nifH</i> Primer Azetylenreduktionsnachweis	Doty et al. 2009
<i>P. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	Kultur auf N-freiem Medium PCR mit <i>nifH</i> Primer Azetylenreduktionsnachweis <sup>15</sup> N <sub>2</sub> Assimilierung Okulation auf anderen Wirt	Xin et al. 2009

# Hohe Wachstumsleistung auch bei Null-Düngung

Fortsetzung von Seite 970

produziert wird, wo es gebunden wird. Stickstofffixierende Pflanzenarten haben deshalb viel Interesse gefunden, sowohl für die Bodenverbesserung als auch das Einsparen von Aufwendungen für Dünger. Deshalb wurde nach Möglichkeiten geforscht, Stickstoff-Fixierung in Kulturpflanzen durch Inokulierung diazotropher Endophyten zu induzieren (Cocking, 2005).

Da die Stickstoff-Fixierung ein energieaufwendiger Prozess ist, nutzen auch stickstofffixierende Pflanzen bevorzugt im Boden frei verfügbaren Stickstoff. Sie können deshalb dazu eingesetzt werden, um überschüssigen Stickstoff auf stark stickstoffhaltigen Standorten abzuschöpfen. Beispielsweise werden Pappeln und Weiden genutzt, um Stickstoff aus aufgebrauchten Klärschlämmen abzuschöpfen (Dimitriou and Aronsson, 2004), jedoch könnte es möglich sein, dass andere Arten besser in der Lage sind, größere Mengen Stickstoff abzuschöpfen.

In Agroforstsystemen werden Pappeln gemeinsam mit verschiedensten Kulturpflanzen angebaut (Yadava, 2010). Diese Systeme haben sich in vielen Regionen über lange Zeiträume bewährt, weil nachhaltig hohe Erträge sowohl bei den Kulturpflanzen als auch bei den Pappeln für gesicherte Einkommen sorgen (Bangarwa and von Wuehlich, 2009). Analysen des Stickstoff-Haushalts in diesen Systemen würden den positiven Beitrag des durch die Pappeln fixierten Stickstoffs aufzeigen.

Pappeln wurden in Agroforstsystemen auch gemeinsam mit stickstofffixierenden Pflanzen, z. B. *Hippophae rhamnoides* angebaut (Mao et al. 2010). Obwohl der Stickstoff-Gehalt im Boden etwas zunahm, zeigten die Pappeln keinen erhöhten Zuwachs in diesem System. Offensichtlich war der im Boden frei verfügbare Stickstoff nicht der wachstumsbegrenzende Faktor.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es auch durch zwei stickstofffixierende Pflanzenarten nicht zu einer Eutrophierung des Standortes kommt.

## Implikationen der Untersuchungsergebnisse für die Züchtung

Untersuchungen der Endophyten-gesellschaften in Pappel- und Weiden-individuen zeigen, dass sich die Zusammensetzungen vorkommender Bakterien zwischen den Einzelbäumen erheblich unterscheidet (Ulrich et al. 2008a, b; Scherling et al. 2009). Offensichtlich interagieren der Baum und die ihn besiedelnden Bakterien so, dass sich eine bestimmte Bakteriengesellschaft auf einem bestimmten Baum-Genotyp entwickelt. Der Baum kann dadurch zusätzliche Eigenschaften entwickeln, die nicht durch seine Gene beeinflusst sind. Das könnte aufgrund der vorhandenen Gene in marker-gestützten Selektionsprozessen vorhergesagte Eigenschaften verfälschen. Der Erfolg künstlicher Inokulierungen mit wachstumsfördernden Bakterien hängt von der Übereinstimmung der Bakterienstämme und dem Genotyp des Wirtsbaumes ab.

Von praktischer Bedeutung wäre es herauszufinden, ob sich Arten und Genotypen der Salikazeen in ihrer Fähigkeit, Stickstoff zu fixieren, unterscheiden. Das unterschiedliche Bakterien-Spektrum in den verschiedenen Wirt-Genotypen lässt dies vermuten. Es könnte sogar Arten geben, die nicht in der Lage sind, Stickstoff zu fixieren. Das könnte auf solche Arten zutreffen, die an Standorte angepasst sind, wo Stickstoff nicht im Minimum ist. Es sollte eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, viele Genotypen nach ihrer stickstofffixierenden Fähigkeit zu selektieren.

## Literatur

- Bangarwa, K. S., von Wuehlich, G., 2009: Using exotic poplar in northern India for higher returns in agroforestry. *Asia-Pacific Agroforestry Newsletter* 35, 3-5
- Cocking, E.C. 2005. Intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 369-375.
- Coleman, G.D., Banados, M.P., and Chen, T.H.H. (1994) Poplar bark storage protein and a related wound-induced gene are differentially induced by nitrogen. *Plant Physiol.* 106: 211-215.
- Coleman, M. D.; Friend, A. L.; Kern, C. C. (2004) Carbon allocation and nitrogen acquisition in a developing *Populus deltoides* plantation. *Tree Physiology* 24:1347-1357
- Cooke, J. E. K.; Martin, T. A.; Davis, J. M. (2005): Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist* 167: 41-52
- DesRochers, A.; van den Driessche, R.; Thomas B. R. (2006): NPK fertilization at planting of three hybrid poplar clones in the boreal region of Alberta. *Forest Ecology and Management* 232, 216-225
- Dimitriou, I., Aronsson, P. (2004) Nitrogen leaching from short-rotation willow coppice after intensive irrigation with wastewater. *Biomass and Bioenergy* 26 433-441
- Doty, S. L. 2010. Nitrogen-fixing endophytic bacteria for improved plant growth. In *Bacteria In Agrobiology*. D. K. Maheshwari, editor. (Springer Germany, in press).
- Doty, S. L., Oakley, B., Xin, G., Kang, J. W., Singleton, G., Khan, Z., Vajzovic, A., and Staley, J. T. 2009. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47:27-33.
- Doty, S. L., Doshier, M. R., Singleton, G. L., Moore, A. L., Van Aken, B., Stettler, R. F., Strand, S. E., Gordon, M. P. 2005. Identification of an endophytic Rhizobium in stems of *Populus*. *Symbiosis* 59(1):27-36.
- Heilman, P.E., and F. Xie. 1995. Influence of nitrogen on growth and productivity of short-rotation *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* hybrids. *Can. J. For. Res.* 25: 1865-1869
- Jug, A., Hofmann-Schielle, C., Makeschin, F., Rehfuess, K.E. (1999): Short rotation plantations of balsam poplars, aspen and willows on former arable land in the Federal Republic of Germany. II. Nutritional status and bioelement export by harvest of shoot axes. *Forest Ecol. Manag.* 121, 67-85.
- Lawrence, S.D., Greenwood, J.S., Korhnan, T.E., and Davis, J.M. (1997): A vegetative storage protein homolog is expressed in the growing shoot apex of hybrid poplar. *Planta* 203: 237-244.
- Liesebach, M.; Wühlisch, G. von; Muhs, H.-J., 1999: Aspen for short-rotation coppice plantations on agricultural sites in Germany: Effects of spacing and rotation time on growth and biomass production of aspen progenies. *For. Ecol. Manage., Amsterdam* 121 25-39.
- Luo, Z.-B.; Calfapietra, C.; Loo, M. L.; Scarascia-Mugnozza, G.; Polle A. Carbon partitioning to mobile and structural fractions in poplar wood under elevated CO<sub>2</sub> (EUROFACE) and N fertilization. *Global Change Biology* (2006) 12, 272-283
- Mao, R., Zeng, D.-H., Ai, G.-Y., Yang D., Li, L.-J., Liu, Y.-X. (2010) Soil microbiological and chemical effects of a nitrogen-fixing shrub in poplar plantations in semi-arid region of Northeast China. *European Journal of Soil Biology* 46 325-329
- Pregitzer, K.S., Zak, D.R., Maziasz, J., DeForest, J., Curtis, P.S. and Lussenhop, J. 2000. Interactive effects of atmospheric CO<sub>2</sub> and soil-N availability on fine roots of *Populus tremuloides*. *Ecological Applications* 10: 18-33
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* 6: 139-144.
- Scherling, C.; Ulrich, K.; Ewald, D.; Weckwerth, W. (2009) A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Molecular plant-microbe interactions*, 22, 1032-1037
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weycens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75:748-757
- Ulrich, K., Ulrich, A., and Ewald, D. 2008a. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63:169-180.
- Ulrich, K., Stauber, T., and Ewald, D. 2008b. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 93:347-351.
- Ulrich, K.; Scherling, C.; Weckwerth, W. and Ewald, D. 2010. Kleine Helfer – großer Nutzen. *Holz-Zentralblatt* 136: p.386.
- Xin, G., Zhang, G., Kang, J. W., Staley, J. T., and Doty, S. L. 2009. A diazotrophic, indole-3-acetic acid-producing endophyte from wild cottonwood. *Biol. Fertil. Soils* DOI 10.1007/s00374-009-0377-8.
- Yadava, A. K. 2010: Carbon Sequestration: underexploited environmental benefits of Tarai agroforestry Systems. *Report and Opinion* 2, 35-41