Mesorhizobium onobrychidis, Eine neue Hoffnung für die Esparsette

T. Thünen[1], K. Kuka[1], M. Lorenz[2], S. Ashrafi[1]
[1]Julius Kühn-Institut (JKI) - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig, Deutschland
[2]Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland
torsten.thuenen@julius-kuehn.de

Einleitung und Problemstellung

Esparsette (*Onobrychis viciifolia*) zeigt eine Reihe positiver Eigenschaften als Futterpflanze. Sie besitzt eine anthemintische Wirkung in Wiederkäuern und ist nicht blähend (Mora-Ortiz und Smith 2018; Carbonero et al. 2011; McMahon et al. 2000). Durch ihren Gehalt an kondensierten Tanninen werden Proteine Pansen-stabil, wodurch die Proteinverfügbarkeit für das Tier erhöht wird und es zu einer Reduktion von Treibhausgas-Emissionen (CH_4, N_2O) kommt (Sheppard et al. 2019).
Trotz dieser positiven Eigenschaften findet die Esparsette in der deutschen Landwirtschaft keine große Akzeptanz. Dieses ist auf eine Reihe von „Schwachstellen“ zurückzuführen, die einen Anbau erschweren. Hierzu zählen u.a. Berichte über eine unzureichende Stickstofffixierung, die trotz der Verwendung von bakteriellen Inokula zu Stickstoffmangelerscheinungen führen kann (Burton und Curley 1970; Sims et al. 1970; Sheehy und Popple 1981). Es existieren zwar Berichte die zeigen, dass bei Esparsette ähnliche Stickstofffixierungsraten (130-160 kg/ha) wie bei Luzerne (140-160 kg/ha) erreicht werden können (Provorov und Tikhonovich 2003), dieses ist jedoch stark von der Effizienz des assoziierten Symbionten abhängig (Prévost et al. 1987).
Am Standort des Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben wurden 38 Akzessionen sowie zwei Sorten (Taja und Perly) der Esparsette über einen Zeitraum von 3 Jahren angebaut Hierbei wurde sowohl auf eine Bewässerung als auch auf eine Düngung der Pflanzen verzichtet. Es konnte beobachtet werden, dass es über die Jahre bei fast allen Akzessionen/Sorten trotz fehlender Düngung zu einem kontinuierlichem Biomassenzuwachs kam (Thünen et al. 2021). Da dieses ein Anzeichen für eine gut funktionierende Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien ist, wurden aus Knöllchen der Akzession ONO20 sowie der Sorte Taja Bakterien isoliert. Hierbei konnten zwei neue symbiotische Rhizobienarten, *Onobrychidicola muellerharveyae* und *Mesorhizobium onobrychidis* identifiziert werden (Ashrafi et al. 2022).
Im Gegensatz dazu zeigt Esparsette, welche derzeit auf dem Versuchsfeld des JKI am Standort Braunschweig/Bundesallee angebaut wird, deutliche Zeichen einer unzureichenden Stickstoff-versorgung. Der Großteil der Pflanzen zeigt eine gelbliche Färbung (Abb.1).
In diesem Beitrag berichten wir zum einen über die Ergebnisse von Inokulationsversuchen mit den beiden neu beschriebenen Rhizobienarten, zum anderen stellen wir erste Ergebnisse zur Erfassung der Knöllchenbildung mittels Mikro-Röntgen-Computertomographie (µCT) vor.

Material und Methoden

Zur Überprüfung der Symbiosefähigkeit und -effektivität der neu beschriebenen Rhizobienarten wurden Gewächshausexperimente durchgeführt. Hierbei wurden die beiden Esparsetten-Sorten Perly und Taja, sowie die Genbank Akzession ONO20 mit *M. onobrychidis* und *O. muellerharveyae* inokuliert. *Rhizobium leguminosarum*, welches bei einem breit angelegten Screening sehr häufig aus oberflächensterilisierten Knöllchen von Esparsette isoliert wurde (unveröffentlichte Daten), diente als Positivkontrolle. Da das Genom von *O. muellerharveyae* keine Nudulations-Gene enthält (Ashrafi et al. 2022), wurde angenommen, dass die Besiedlung der Wirtspflanze nur durch eine Co-Inokulation mit einem knöllchenbildenden Rhizobium erfolgen kann. Daher wurde eine zusätzliche Variante in den Versuch aufgenommen, bei der die Sorte Taja mit *O. muellerharveyae* und *R. leguminosarum* co-inokuliert wurden. Die Esparsettensamen wurden von ihrer Hülse befreit und oberflächensterilisiert. Als Substrat für den Versuch diente sterilisierter Quarzsand. Die Bakterienstämme wurden auf Hefe-Manitol-Agar angezüchtet, in 10 mM $MgCl_2$ gewaschen und in 10 mM $MgCl_2$ auf eine OD von 0,2 eingestellt. Jeder Topf wurde bei der Aussaat, sowie eine und zwei Wochen nach der Aussaat mit je 10 ml des entsprechenden Bakterienstamms inokuliert. Die Kontrollen erhielten nur 10 ml 10 mM $MgCl_2$. Als Düngung wurde eine stickstofffreie Nährlösung nach Broughton und Dilworth (1971) verwendet.

Zwölf Wochen nach der Inokulation wurden die Pflanzen geerntet, und die ober- und unterirdische Pflanzenbiomasse ermittelt. Statistische Analysen wurden mit R v. 3.6.1 (R Core Team 2018) durchgeführt.
Am JKI-Standort Braunschweig/Bundesallee wurde die Esparsette (Sorte Sarzenz) auch im Feldversuch angebaut, um die Stickstofffixierung im Freiland zu untersuchen (Abb. 1). Die Pflanzen zeigten starke Unterschiede in der Färbung, was auf eine unterschiedliche Nährstoffversorgung hindeutet, die möglicherweise auf eine unterschiedliche Knöllchenbildung zurückzuführen ist. Dies wurde mit dem bildgebenden Verfahren der µCT untersucht. Dabei wurde das ungestörte Wurzelsystem, einschließlich des umgebenden Bodens, als Probe entnommen. Die Proben wurden anschließend mit einer Auflösung von 49 µm mit den µCT-Einstellungen von 160 kV und 140 µA gescannt. Ein Teil der Wurzeln wurde gemäß der Methode von Kuka et al. (2013) als 3D-Bild extrahiert.

Abb. 1: Esparsette (Sorte Sarzenz) im Freilandversuch am JKI-Standort Bundesallee/Braunschweig. Zu erkennen sind Pflanzen unterschiedlicher Grünfärbung.

Ergebnisse und Diskussion

In dem hier durchgeführten Inokulationsexperiment konnte einzig bei einer Inokulation mit *M. onobrychidis* ein signifikanter Anstieg (ca. 4-fach gegenüber der Kontrolle) der oberirdischen Biomasse beobachtet werden. Pflanzen, die mit *O. muellerharveyae* oder *R. leguminosarum* beimpft wurden, zeigten keine signifikante Zunahme der Biomasse. Die co-inokulation von Taja-Pflanzen mit *O. muellerharveyae* und *R. leguminosarum* führte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Pflanzenbiomasse. Zwischen der Espasetten Akzession ONO20, sowie den beiden Sorten Taja und Perly konnten keine Unterschiede im Biomasse-Zuwachs beobachtet werden.

Die hier gezeigten positiven Ergebnisse für *M. onobrychidis* konnten mittlerweile in weiteren unabhängigen Gewächshausversuchen bestätigt werden. Hierbei wurden auch weitere potentiell neue *Mesorhizobium* Arten, welche wir aus Knöllchen der Esparsette an unterschiedlichen Standorten isolieren konnten untersucht. Diese zeigte ebenfalls statistisch signifikante Biomassezuwüchse (unveröffentlichte Daten).
Onobrychidicola muellerharveyae zeigte in unserem Inokulationsexperiment unter stickstoff-limitierten Bedingungen keine Wirkung auf die Esparsette. Es ist zu vermuten, dass *O. muellerharveyae* eher eine Rolle bei biotischen Stressbedingungen spielt, da in dessen Genom eine sehr hohe Anzahl von Genen für eine biotische Stresstoleranz gefunden wurden (Ashrafi et al. 2022). Interessant ist auch die Tatsache, dass R. *leguminosarum* in unseren Untersuchungen keinen wachstumsfördernden Effekt auf die Esparsette hat, obwohl diese Art sehr häufig aus dessen Knöllchen isoliert wurde. Leguminosen besitzen zwar die Fähigkeit sich gegen ineffektive Rhizobien zu wehren (Sachs et al. 2018), eventuell sind diese Mechanismen bei Esparsette aber weniger stark ausgebildet.

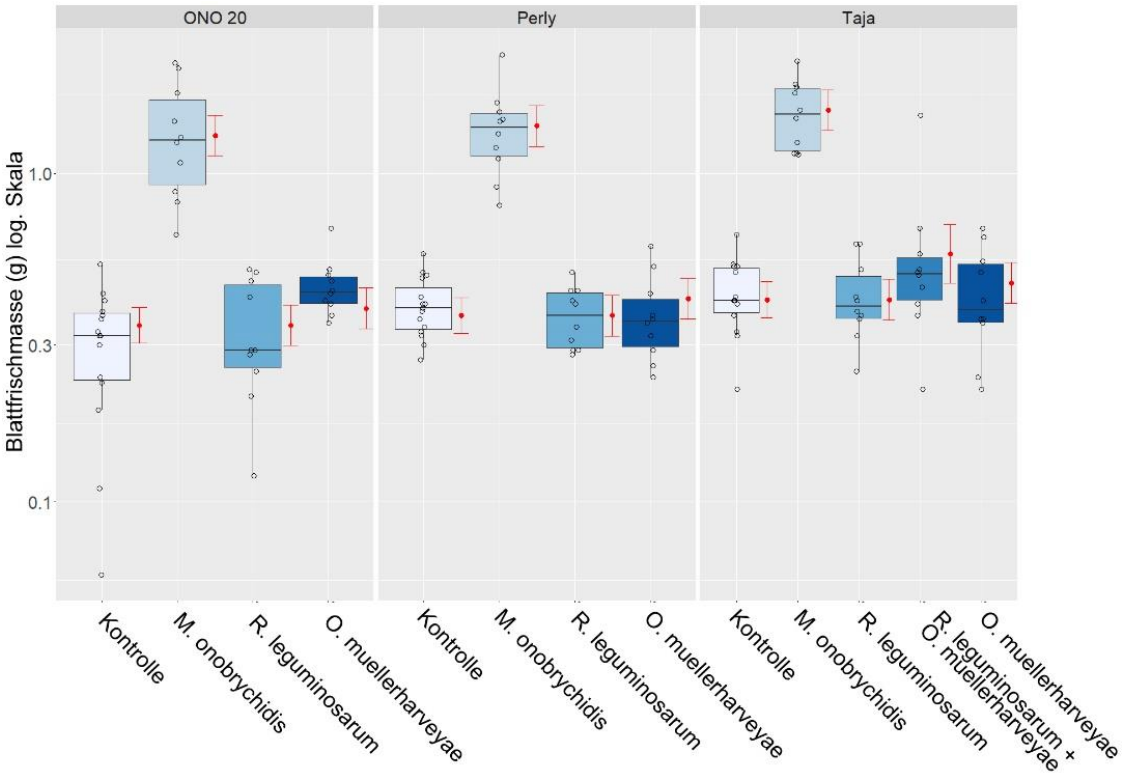

Abb. 2: Ergebnisse des Inokulationstests. Blattfrischmasse der Esparsetten Akzession ONO20, sowie der beiden Sorten Perly und Taja nach Inokulation mit den Rhizobien *Mesorhizobium onobrychidis*, *Rhizobium leguminosarum* und *Onobrychidicola muellerharveyae*. Werte für die Blattfrischmasse in Gramm, logarithmisch aufgetragen. In Rot angezeigt die Ergebnisse der GLM-Statistik.

Zwei Esparsettepflanzen wurden mittels µCT qualitativ auf die Bildung von Wurzelknöllchen untersucht. Die erste Pflanze (Abb. 1 & Abb. 3) wies eine hellgrüne Färbung auf, während die zweite Pflanze dunkelgrün war (Abb. 1 & Abb. 4). Die Ergebnisse der µCT-Analyse zeigen einen deutlichen Unterschied in der Anzahl und Größe der Wurzelknöllchen zwischen den beiden Pflanzen, wobei die hellgrüne Pflanze eine deutlich geringere Anzahl an Wurzelknöllchen aufweist (Abb. 3). Im Gegensatz dazu wurden bei der dunkelgrünen Pflanze eine deutlich höhere Anzahl und größere Wurzelknöllchen gefunden (Abb. 4).

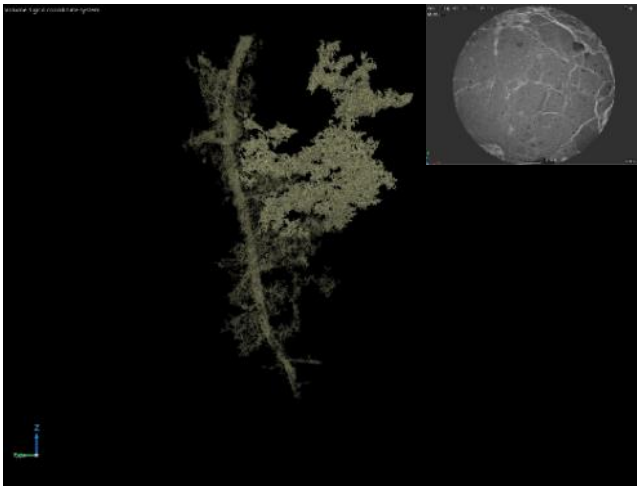

Abb. 3: 3D-µCT Bild eines Teils der Wurzeln der der hellgrünen Esparsettenpflanze und zugehöriges 2D µCT Bild

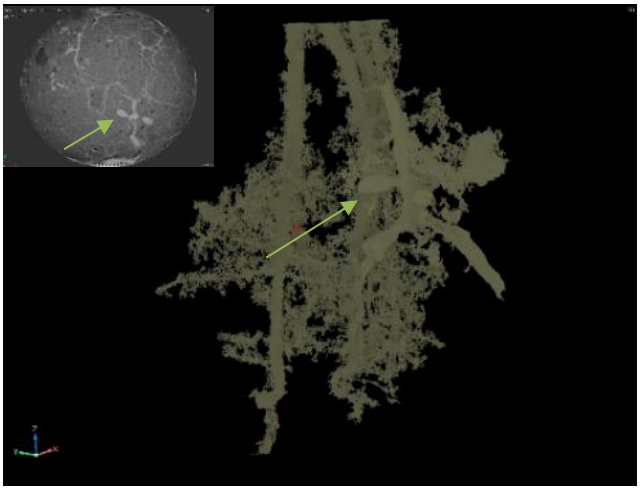

Abb. 4: 3D-µCT Bild eines Teils der Wurzeln der der dunkelgrünen Esparsettenpflanze und zugehöriges 2D µCT Bild (Pfeile zeigen auf Wurzelknöllchen)

Schlussfolgerungen

Esparsette wird aufgrund ihrer chemischen, ernährungsphysiologischen und biologischen Eigenschaften als vorteilhaftes Futtermittel bezeichnet (Hayot Carbonero et al. 2011). Einer der Kritikpunkte, die eine breitere Akzeptanz in der Landwirtschaft verhindern, ist eine oft beobachtete ineffektive Stickstofffixierung. Die hier getestete *Mesorhizobium* Art *M. onobrychidis* stellt einen vielversprechenden Kandidaten für ein Inokulm da, mit welchem eine verlässlichere Stickstofffixierung in der Esparsette erreicht werden könnte.

Die geringere Knöllchenbildung einer hellgrünen Pflanze ist Zeichen einer schlecht ausgebildeten Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien und einer daraus resultierenden Stickstoffunterversorgung der Pflanze. Bei der dunkelgrünen Esparsette wurden hingegen mehr und größere Wurzelknöllchen gefunden. Die hier ausgebildete Symbiose ist für die Stickstoffversorgung ausreichend. Die dunklere, tiefgrüne Blattfärbung ist zusätzlich ein Indiz für einen höheren Chlorophyllgehalt. Dieser führt zu einer effizienteren Photosynthese und insgesamt gesünderen Pflanzen.

Literatur

Ashrafi, S., Kuzmanović, N., Patz, S., Lohwasser, U., Bunk, B., Spröer, C. et al. (2022): Two New Rhizobiales Species Isolated from Root Nodules of Common Sainfoin (Onobrychis viciifolia) Show Different Plant Colonization Strategies. In: Microbiol. Spectr., e0109922. DOI: 10.1128/spectrum.01099-22.

Broughton, W. J., Dilworth, M. J. (1971): Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. In: The Biochemical journal 125 (4): 1075–1080. DOI: 10.1042/bj1251075.

Burton, J. C., Curley, R. L. (1970): Nodulation and nitrogen fixation in sainfoin (Onobrychis sativa, Lam.) as influenced by strains of rhizobia. In: Bull. Mont. agric. Exp. Stn. 627: 3–5.

Carbonero, C. H., Mueller-Harvey, I., Brown, T. A., Smith, L. (2011): Sainfoin (Onobrychis viciifolia). a beneficial forage legume. In: Plant Genetic Resources Characterization and Utilization 9: 70–85.

McMahon, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D. et al. (2000): A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. In: Can. J. Plant Sci. 80 (3): 469–485. DOI: 10.4141/P99-050.

Mora-Ortiz, M., Smith, L. M.J. (2018): Onobrychis viciifolia; a comprehensive literature review of its history, etymology, taxonomy, genetics, agronomy and botany. In: PLANT GENETIC RESOURCES-CHARACTERIZATION AND UTILIZATION 16 (5), S. 403–418. DOI: 10.1017/S1479262118000230.

Prévost, D., Bordeleau, L. M., Antoun, H. (1987): Symbiotic effectiveness of indigenous arctic rhizobia on a temperate forage legume: Sainfoin (Onobrychis viciifolia). In: Plant Soil 104 (1): 63–69. DOI: 10.1007/BF02370626.

Provorov, N. A., Tikhonovich, I. A. (2003): Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. In: Genetic Resources and Crop Evolution 50 (1): 89–99. DOI: 10.1023/A:1022957429160.

Sachs, Joel L., Quides, K. W.; Wendlandt, C. E. (2018): Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. In: New Phytologist 219 (4), S. 1199–1206. DOI: 10.1111/nph.15222.

Sheehy, J. E., Popple, S. C. (1981): Photosynthesis, water relations, temperature and canopy structure as factors influencing the growth of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) and lucerne (Medicago sativa L.). In: Ann Bot 48.

Sheppard, S. C., Cattani, D. J., Ominski, K. H., Biligetu, B., Bittman, S., McGeough, E. J. (2019): Sainfoin production in western Canada: A review of agronomic potential and environmental benefits. In: Grass Forage Sci 74 (1), S. 6–18. DOI: 10.1111/gfs.12403.

Sims, J. R., Muir, M. K., Carleton, A. E. (1970): Evidence of ineffective rhizobia and its relation to the nitrogen nutrition of sainfoin. In: Bull. Montana. Agricultural Experimental Station 627: 8–12.

Thünen, T., Lohwasser, U., Ahrens, T., Kemus, M. (2021): Evaluierung und pflanzenbauliche Optimierung verschiedener Herkünfte der Esparsette für die Biomasseproduktion und Untersuchung des Einflusses der Tannine auf die Schaumbildung in der Biogasanlage: Schlussbericht zum Verbundvorhaben: Laufzeit: 01.01.2017 bis 31.05.2020. Julius Kühn-Institut - Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde; Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung; Ostfalia Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Braunschweig. Online verfügbar unter https://www.tib.eu/de/suchen/id/TIBKAT%3A1815810769.