

Diplomarbeit

**vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen an der
Fakultät für Biologie und Biotechnologie der
Ruhr-Universität Bochum**

**Untersuchungen zur saisonalen Dynamik der Biodiversität
von bodenassoziierten Hefen im Natur- und Nutzwald**

von

Thorsten Wehde

**Angefertigt im LS Evolution und Biodiversität der Pflanzen,
AG Geobotanik**

Bochum im August 2011

Referent: Prof. Dr. D. Begerow

Koreferent: Prof. Dr. R. Tollrian

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung.....	4
1.1	Boden als Ökosystem	4
1.2	Diversität von Hefen	6
1.3	Hefen im Boden.....	7
1.4	Hefen im Waldboden.....	10
1.5	Taxonomie und Identifizierung von Hefenpilzen über die ribosomale DNA (rDNA).....	12
1.6	Die „Biodiversity Exploratories“	14
1.7	Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Laborgeräte.....	18
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Puffer, Medien, Lösungen	20
2.1.4	Kits	22
2.1.5	Software.....	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Biologisches Material und Probennahme.....	23
2.2.2	Isolation der Hefepilze	24
2.2.3	DNA-Isolation	25
2.2.4	Microsatellite primed-PCR (MSP-PCR).....	26
2.2.5	PCR zur Amplifizierung der D1/D2-Region der rDNA.....	27
2.2.6	Gelelektrophorese von PCR-Reaktionen.....	27
2.2.7	Aufreinigung der PCR-Produkte	28
2.2.8	Sequenzierung der D1/D2-Region der rDNA	28
2.2.9	Bearbeitung der Sequenzen	28
2.2.10	Artidentifizierung der isolierten Hefepilze.....	29
2.2.11	Statistische Auswertung	29

3.	Ergebnisse	30
3.1	Vorexperiment.....	30
3.1.1	Test auf Effizienz der Kultivierungsmediums.....	30
3.1.2	Test auf Unterschiede in der Wahl der Suspensionsverdünnung	31
3.2	Gesamtabundanz	32
3.3	Gesamtartenzahl	32
3.4	Test des Datensatzes auf Normalverteilung und ANOVA-Testdesign.....	33
3.5	Vergleich von Wald-Nutzungstyp und Jahresverlauf	34
3.6	Abundanz der Ascomyceten im Boden.....	37
3.7	Diversität und Taxonomie	38
3.8	Gemeinschaftsstruktur.....	40
4.	Diskussion	43
4.1	Vorexperiment.....	43
4.1.1	Wahl des Zusatzes zum Medium.....	43
4.1.2	Unterschiedliche Verdünnung der Bodensuspension.....	44
4.2	Abundanz.....	45
4.3	Diversität	46
4.4	Verteilung von Hefen im Boden: Regionale Effekte	49
4.5	Effekte durch Landnutzung	51
5.	Zusammenfassung.....	53
6.	Literaturverzeichnis.....	55
7.	Abkürzungsverzeichnis	64

8.	Anhang	65
	Anhang 1: Plotinformationen	65
	Anhang 2: Varianzanalyse (ANOVA) für Abundanz, Artenanzahl und relative Abundanz der Ascomyceten	66
	Anhang 3: Varianzanalyse (ANOVA) für Abundanz und Artenanzahl abhängig von der Suspensionsverdünnung.....	66
	Anhang 4: Artenliste und relative Abundanz von Bodenhefen.....	67
9.	Danksagung	68
10.	Erklärung.....	69

1. Einleitung

1.1 Der Boden als Ökosystem

Der Boden ist eines der diversesten und gleichzeitig eines der wichtigsten Habitate auf dem Planeten. Eine Vielzahl biophysikalischer und biochemischer Prozesse laufen dort parallel ab, die zur Aufrechterhaltung aller anderen Trophiestufen der Biosphäre benötigt werden (Young & Crawford, 2004). Es herrscht weltweit eine große Diversität von Böden und viele unterschiedliche Bodentypen sind vorhanden (Abbildung 1). Die Eigenschaften werden von der Chemie des Ausgangsgesteins, der Partikelgröße, dem pH-Wert und dem in ihm enthaltenen organischem Material bestimmt. Boden stellt eine sehr wichtige Ressource für das Leben allgemein, die Ernährung und die Biodiversität dar (European Commission Environment, 2010).

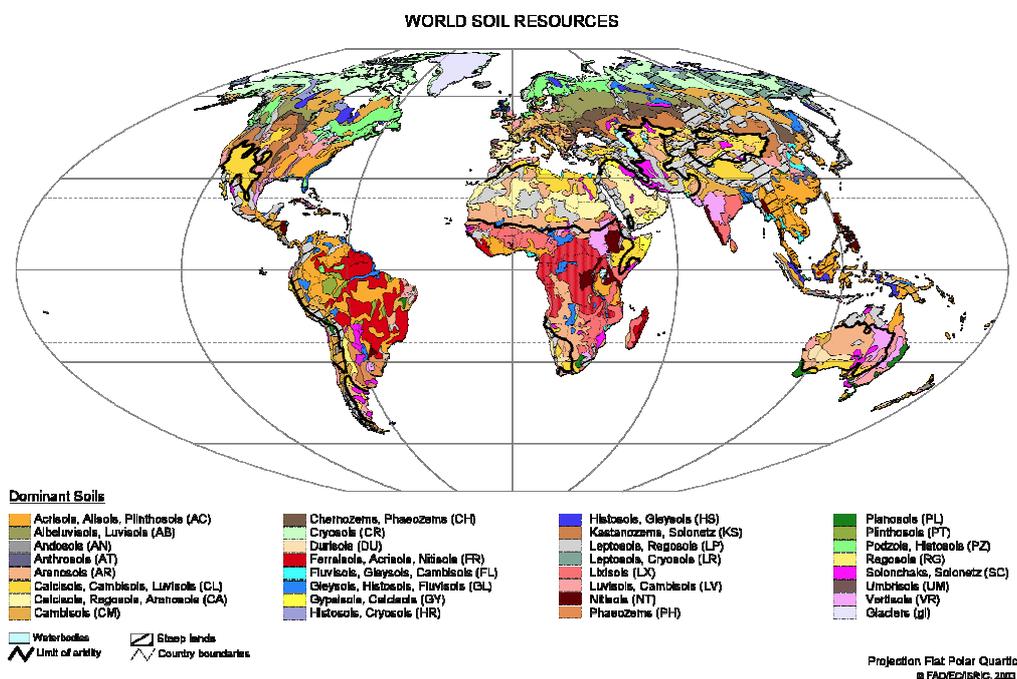


Abbildung 1: Die globale Diversität von Boden

(Quelle: Food and Agriculture Organization of the United Nations – www.FAO.org)

Im Boden kommen auf einzigartige Weise vier entscheidende und lebensfördernde Reiche zusammen, die Atmosphäre, die Lithosphäre, die Hydrosphäre und die Biosphäre. Gemeinsam bilden sie die Pedosphäre, eine Mikro-Landschaft aus vielen einzigartigen Nischen für Bodenorganismen (Parker, 2010). Diese Landschaft wird aus mineralischen und organischen Partikeln gebildet, die zu Aggregaten unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit zusammengefügt sind. Diese Aggregate bilden ein loses Netzwerk, das mit Gasen, Wasser und den darin gelösten Stoffen verbunden ist. Diese charakterisieren das physikalische Habitat Boden zu einem temporär heterogenen Lebensraum, was eine hohe Diversität potentieller Nischen für Mikroorganismen zur Folge hat (Botha, 2006; Young & Crawford, 2004).

Die wechselnden physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie das Redox-Potential, die Anwesenheit von Sauerstoff, die Verfügbarkeit von Nährstoffen, die Porengröße, Temperatur und die Verfügbarkeit von Wasser beeinflussen das Vorkommen von Mikroorganismen (Botha, 2006). Die Vielfalt von Mikroorganismen im Boden ist groß und beinhaltet viele unterschiedliche taxonomische Gruppen, wie Bakterien, Pilze, Algen und Amöben (Parker, 2010). Sie spielen im Boden eine fundamentale Rolle für die Ökosystemfunktionen, da sie zum Beispiel für die Verwertung organischer Kohlenstoffverbindungen wichtig sind, die ihnen als Nahrungsquelle dienen. Als Destruenten und N₂-Fixierer sind sie damit für den Nährstoffkreislauf essentiell und determinieren die Produktivität der Ökosysteme. Zum Beispiel beeinflussen sie so das Pflanzenwachstum sehr deutlich (Schmidt, 2007) und somit auch das Wachsen vieler für den Menschen wichtiger Nutzpflanzen.

Durch den Fluss von Nährstoffen zwischen den oberirdischen und unterirdischen Teilen des Ökosystems, kann man von einer Verknüpfung der beiden Systeme sprechen. Es existieren allerdings nicht nur Stoffaustausche, die diese Verknüpfung verdeutlichen, sondern auch zahlreiche direkte Interaktionen der Organismen selbst, wie Parasitismus oder Symbiose. Wie zum Beispiel die Mycorrhiza, eine Interaktion zwischen Pilzen und den Wurzeln höherer Pflanzen oder die Symbiose von N₂-fixierenden Bakterien und den Fabaceae. Diese Interaktionen zwischen Mikroorganismen bilden oder verändern das Habitat und machen es für andere Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft erschließbar (Wardle *et al.*, 2004).

Bisher wurde in der Erforschung der Diversität von Mikroorganismen und ihrer Rolle in Ökosystemprozessen wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei ist es im Hinblick auf die Veränderung durch Landnutzung und Klimawandel, besonders wichtig deren Einfluss auf

die Biodiversität im Boden zu kennen, die einen entscheidenden Einfluss die Funktionalität der Ökosysteme hat (Parker, 2010).

1.2 Diversität von Hefen

Hefen sind Pilze, die sich primär asexuell, durch Knospung oder Teilung vermehren oder sexuelle Stadien ohne Ausbildung geschlossener Fruchtkörper aufweisen (Kurtzman *et al.*, 2006). Sie bilden keine taxonomische, sondern eine funktionelle Gruppe, die durch eine ähnliche Lebensform charakterisiert ist. Innerhalb der Pilze kommen Hefen in den Unterabteilungen der Ascomycota vermehrt innerhalb der Saccharomycotina aber auch in den Schwestergruppen der Pezizomycotina und Taphrinomycotina vor. Bei den Basidiomycota findet man Hefen in allen drei Subphyla, den Ustilaginomycotina, Agaricomycotina und Pucciniomycotina (Hibbett *et al.*, 2007; Barnett, 2004) (Abbildung 2).

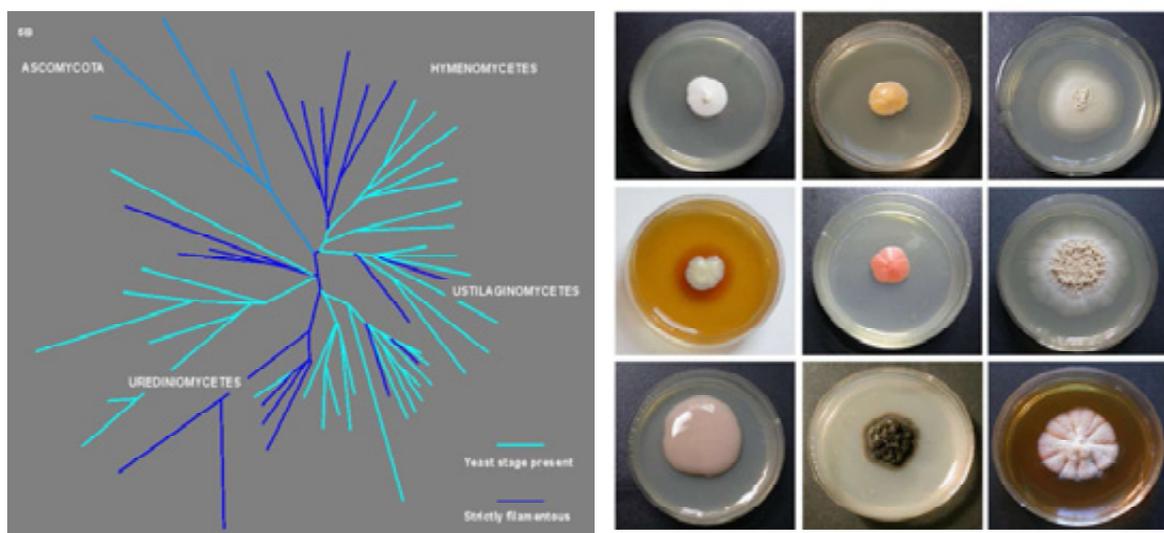


Abbildung 2: Phylogenetische und morphologische Diversität von Hefen

(Quelle: Fonseca, Sampaio (2006) Dimorphic basidiomycetes, www.crem.fct.unl.pt ; Yurkov A.)

Seit Antoni van Leeuwenhoek *Saccharomyces cerevisiae* im Wein untersuchte, wurden weitere Ascomyceten in und auf Lebensmitteln entdeckt, darunter *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces spp.*, *Kluyveromyces lactis*. Auf Früchten wurden *Hanseniospora spp.*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Zygosaccharomyces rouxii* und in Säften *Brettanomyces spp.* gefunden.

Die Diversität spiegelt sich auch in den Habitaten wieder, in denen Hefe vorkommen. Hefen sind weltweit verbreitet und in vielen Biomen der Erde vertreten. Man findet sie in ganz unterschiedlichen Habitaten, wie der Atmosphäre (Starmer and Lachance, 2006), im Meer (Takahiko, 2006), im Gletschereis (Vishniac, 2006), der Phyllosphäre (Fonseca & Inácio, 2006) und dem Boden (Starmer & Lachance, 2006; Botha, 2006). Der überwiegende Teil an Hefen im Boden und der Phyllosphäre sind Basidiomyceten, während Ascomyceten aufgrund der Fähigkeit Zucker zu fermentieren häufiger mit Nektar (Pozo *et al.*, 2011; Brysch-Herzberg, 2004) und Früchten von Pflanzen assoziiert sind (Fonseca & Inácio, 2006). Einige Linien von Hefen werden durch saprobytische, anamorphe Stadien von parasitischen Pilzen repräsentiert, darunter *Taphrina*, *Sygospora*, *Cystobasidium*, *Ustilago* und *Microbotryum*. Diese Beziehungen werden durch molekulare Phylogenien unterstützt (Aime *et al.*, 2006; Begerow *et al.*, 2006). Einige humanpathogene Arten, darunter *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* wurden ebenfalls entdeckt (Chester, Jr., 2011).

Etwa 1500 Arten von Hefen sind zurzeit beschrieben, bis zu 15.000 werden noch vermutet, damit sind bis lediglich 10% aller Arten bekannt (Lachance, 2006).

1.3 Hefen im Boden

Bodenassoziierte Hefen findet man in vielen geographischen Breiten (Spencer, 1997; Vishniac, 2006). Manche aus dem Boden isolierte Hefen sind bodenassoziiert, d.h. sie kommen ausschließlich im Boden vor, wie zum Beispiel *Lipomyces spp.*, *Cryptococcus terricola*, oder *Cryptococcus podzolicus* (Botha, 2006). Andere Hefen, wie z.B. *Cystofilobasidium capitatum* können aus der Phyllosphäre mit fallenden Blättern im Herbst (Sampaio *et al.*, 2007), Früchten oder Tieren zufällig in den Boden gelangen und dort überdauern (Fonseca & Inácio, 2006; Starmer & Lachance, 2006). Viele verschiedene Hefen von Ascomyceten und Basidiomyceten wurden im Boden gefunden (Abbildung 3). Ihre Verteilung und Zahl ist dabei sehr unterschiedlich, dabei ist ihre Anwesenheit meist auf die oberen 10cm im Boden beschränkt, wo sie in Zahlen von bis zu 10^6 Zellen pro Gramm Boden vorkommen (Botha, 2006). Im Vergleich zu oberirdischen Hefegemeinschaften, ist ihre Zahl dort relativ gering, so kann sie auf der Oberfläche von Pflanzen zum Beispiel 10^7 Zellen pro Gramm erreichen (Fonseca & Inácio, 2006). Ihre

Diversität im Boden ist verglichen mit der von Bakterien ebenfalls sehr gering. Sie besitzen dort dennoch eine feste Nische und ihre Biomasse kann mit denen der Bakterien vergleichbar sein (Starmer & Lachance, 2006).

Hefen sind besonders in borealen und arktischen Böden verbreitet. Sie machen dort einen großen Teil der Pilz-Biomasse aus und stellen dort vermutlich die dominanten Bodenmikroorganismen dar (Botha, 2006).

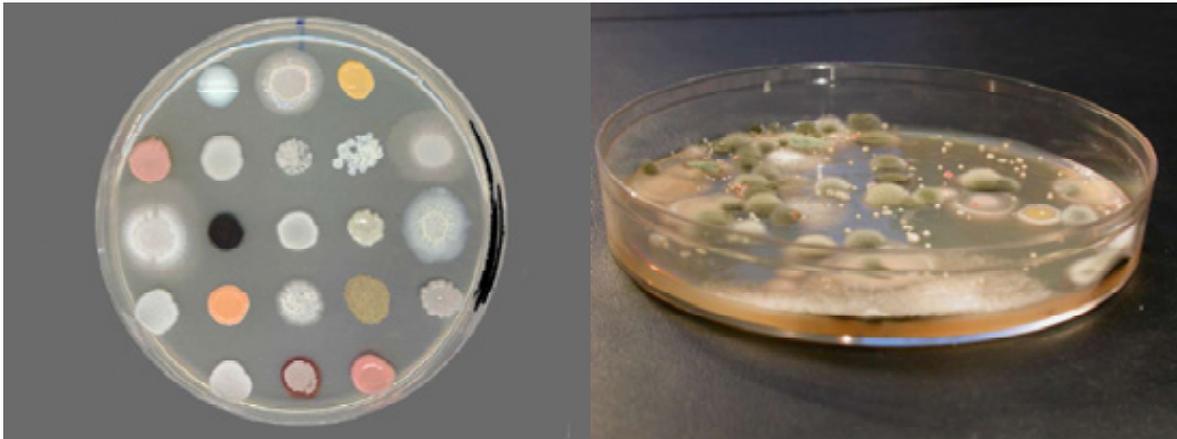


Abbildung 3: Diversität von Hefen im Boden

(Quelle: Yurkov A.)

Seit Anfang des vorletzten Jahrhunderts gibt es Untersuchungen im Habitat Boden, die Diversität von Hefen zu erforschen. Diese Untersuchungen wurden mehrfach rezensiert (Starkey & Henrici, 1926; Bouthilet, 1950; Botha, 2011). Viele Arten von bodenassoziierten Hefen sind heute beschrieben, vieles über ihre Rolle im Ökosystem ist bekannt aber längst noch nicht verstanden (Botha, 2011).

Die meisten Hefen im Boden gehören nicht zu den primären Destruenten von komplexen und stabilen Polymeren. Als sekundäre Destruenten sind sie aber in der Lage Produkte der mikrobiellen Zersetzung von lignozellulose-haltigem Pflanzenmaterial durch höhere Basidiomyceten, andere Schimmelpilze und Bakterien zu assimilieren. Dazu gehören L-Arabinose, D-Xylose, Zellobiose, Hydrobenzoesäure und Hemizellulose (Botha, 2006; 2011). Andere Hefen vor allem aus den Taxa *Trichosporonales* und *Filobasidiales* können phenolische und aromatische Komponenten aus der Holzzersetzung verwerten (Middelhoven, 1993; Sampaio, 1999). Der Großteil an Stickstoff liegt in toter organischer Materie, in Form von komplexen Polymeren, wie Proteinen, Nukleinsäuren, und Chitin vor (Schimel & Bennett, 2004). Die bodenassoziierte Gattung *Lipomyces* ist in der Lage Stickstoff aus heterozyklischen Verbindungen, wie Purinen und Pyrimidinen zu

assimilieren. Das ermöglicht den Stickstoff-Umsatz und setzt Stickstoff aus toter organischer Substanz wieder frei (LaRue & Spencer, 1967a; Larue & Spencer, 1967b). Damit leisten Hefen einen wichtigen Beitrag zu Nährstoffkreisläufen, der vielen anderen Organismen zugute kommt.

Hefepilze im Boden teilen sich den Lebensraum mit anderen Organismen, wie Bakterien und filamentösen Pilzen, die ebenfalls Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft sind (Botha, 2006). Zahlreiche Interaktionen von Hefen mit anderen Organismen der Flora und Fauna sind bereits bekannt. Men'ko *et al.* (2006) beschrieb, dass Collembolen sich nur dann von Falllaub ernähren konnten, wenn bestimmte Hefestämme auf der Oberfläche der Blätter vorhanden waren, ansonsten war das Laub für sie toxisch. Yurkov *et al.* (2008) untersuchte den Einfluss von *Lumbricus terrestris* auf die Gemeinschaftsstruktur von Bodenhefen. Es konnte gezeigt werden, dass Bodenwürmer Einfluss auf die Verteilung von Hefen im Boden haben. Symbiosen sind ebenfalls beschrieben, zum Beispiel ist *Cryptococcus laurentii* in der Lage das Wachstum von filamentösen Pilzen auf beschädigtem Obst zu inhibieren (Roberts, 1990) oder das Wachstum von Wurzeln von *Agathosma betulina*, einer in Afrika einheimischen Pflanze zu fördern (Cloete *et al.*, 2009). Eine weitere wichtige Interaktion von Hefen mit der physikalisch-chemischen Umwelt ist die Fähigkeit, extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) zu bilden, welche den Hefen, hauptsächlich aus den Gattungen *Cryptococcus* und *Lipomyces*, ermöglicht widrige Umweltbedingung in Biofilmen zu überdauern. Die Verkittung von Bodenpartikeln durch EPS führt außerdem zu einer Verringerung von Bodenerosion (Vishniac, 1995; Botha, 2006). Darüber hinaus EPS bilden ein Habitat für Bodenbakterien. EPS ermöglichen Hefen bei geringer Wasseraktivität, Trockenheit, Kälte und bei osmotischem Stress zu wachsen (Raspor and Jure, 2006). Darüber hinaus sind sie so in der Lage Nährstoffe zu konzentrieren, um andere Biotope zu erobern. Weitere Interaktionen wurden von Botha zusammengetragen (Botha, 2006; 2011).

1.4 Hefen im Waldboden

Insgesamt 30% der Landmasse ist bewaldet, den größten Teil bilden Naturwälder. In Europa ist der Anteil von Naturwäldern an der Waldfläche jedoch <1% (Paillet *et al.*, 2010). Jährlich gehen ca. 0,3% Naturwald durch Forstwirtschaft verloren und 2% der forstwirtschaftlich genutzten Wälder werden pro Jahr komplett gerodet. Der Erhalt von Naturwäldern ist ein wichtiger Punkt, wenn die Rede von Verlust von Biodiversität durch Forstwirtschaft ist (Brockerhoff *et al.*, 2008).

Die Biodiversität im Boden ist in Wäldern als hoch anzusehen. Sie stellen „hot spots“ in Landschaften dar, die überwiegend von Landwirtschaft geprägt sind. Bisher ist die Biodiversität im Boden jedoch nur stichprobenhaft untersucht (Haegvar, 1998).

Die Rolle von Hefen im Waldboden ist noch weitgehend unbekannt, aber als heterotrophe Organismen spielen sie eine Rolle bei der Zersetzung toter organischer Substanzen (Botha, 2006; 2011; Middelhoven, 1993; siehe 1.2). In vielen Regionen der Erde wurde Waldboden auf die Anwesenheit von Hefen untersucht, Wälder in Neuseeland (di Menna, 1959; 1960; 1965), auf Costa Rica (Vishniac, 2006), in Russland (Bab'eva & Chernov, 1997; Golovchenko *et al.*, 2000; Maksimova & Chernov, 2004; Golubtsova *et al.*, 2007), in der Slowakei (Slavikova & Vadkertiova, 2003), in Österreich (Wuczkowski & Prillinger, 2004), in Dänemark (Jensen, 1963) und in Deutschland (Yurkov *et al.*, 2011).

Oft waren die Studien auf eine einzige Region und Probennahmestelle begrenzt. Darüber hinaus wurden ganz unterschiedliche Böden beprobt, sie reichten von sauren und nährstoffarmen Podsolböden bis zu nährstoffreichen Schwemmlandböden. Hefen wurden aber ausnahmslos aus allen Böden isoliert und kamen in Zahlen von 10^3 - 10^4 Zellen pro g Boden vor. Die angegebene Anzahl an isolierten Arten, die besonders in den älteren Studien gemacht werden, sind schwierig mit denen von aktuelleren Untersuchungen zu vergleichen, da es in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der Artenbestimmung gegeben hat. Die regionalen Unterschiede sind ebenfalls sehr groß und die untersuchten Waldtypen divergieren enorm. Ein Großteil der Studien bezieht sich auf Koniferen- oder Birkenwälder mit überwiegend Podsolböden (Bab'eva and Chernov, 1997; Golovchenko, 2000; Maksimova & Chernov, 2004; Golubtsova *et al.*, 2007).

Lediglich vier Studien zur Diversität von Hefen im Waldboden innerhalb Mittel- und Zentraleuropas sind verfügbar. In zwei von ihnen wurden molekulare Methoden zur Identifizierung der Hefen angewandt (Wuczkowski & Prillinger, 2004; Yurkov *et al.*,

2011), die beiden anderen Studien nutzten morphologische und physiologische Methoden zur Artidentifizierung (Jensen, 1963; Slavikova & Vadkertiova, 2000).

Die von Jensen (1963) durchgeführte Studie zur Mikroflora in dänischen Buchenwäldern gibt eine Abundanz von bis zu 10^6 CFU/g in getrocknetem Mull und Moderhumus an. Insgesamt wurden 20 Arten identifiziert, aber durch das Alter der Studie ist die Artzuordnung schwierig nachzuvollziehen. Diverse Hefen aus den Gattungen *Cryptococcus* und *Trichosporon* wurden isoliert.

Slavikova & Vadkertiova (2003) untersuchten die Diversität von Hefen in Koniferenwäldern, Laub-Misch-Wäldern und Waldparks in der Umgebung von Bratislava in der Slowakei. Insgesamt 18 Arten wurden isoliert, die Gesamtabundanz lag bei $1,5 \times 10^3$ bis $1,1 \times 10^4$ CFU/g Boden. Die dominanten Arten waren *Cryptococcus laurentii*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca* und *Trichosporon cutaneum*.

Wuczowski & Prillinger (2004) untersuchten Bodenproben aus saisonal überflutetem Auwald und nicht überflutetem Wald im „Nationalpark Donauauen“ nahe Wien (Österreich). Angaben zur Gesamtabundanz und Dominanz einzelner Arten wurden nicht gemacht. Aus insgesamt 136 Stämmen wurden 18 Arten identifiziert, wovon der überwiegende Teil als zur Gattung *Cryptococcus* zugehörig identifiziert wurde, darunter *Cryptococcus terricola* und *Cryptococcus victoriae*. Ascomyceten wie *Aureobasidium pullulans* und *Candida sake* wurden ebenfalls isoliert.

Die Hefegemeinschaft in Wald- und Wiesen-Biotopen unter verschiedenen Landnutzungsgradienten wurde von Yurkov *et al.* (2011) in drei verschiedenen Regionen Deutschlands untersucht. Die Gesamtabundanz von Hefen im Wald lag im Schnitt bei $3,4 \times 10^3$. Insgesamt 40 Taxa wurden identifiziert, davon wurden maximal 8 im Waldboden gefunden. *Cryptococcus terricola*, *Trichosporon dulcitum* und *Trichosporon porosum* und *Kazachstania piceae* waren dort die dominierenden Arten.

Aus der Gesamtheit der Studien treten einige Arten als im Boden dominierend in Erscheinung, darunter Basidiomyceten wie *Cryptococcus terricola*, *Cryptococcus podzolicus*, *Leucosporidium scottii*, *Trichosporon dulcitum* und *Trichosporon porosum* und Ascomyceten wie *Kazachstania piceae*, *Lindnera misumaiensis*, *Debaryomyces hansenii* und *Candida vartiovaarae*.

Einige häufig im Boden vorkommende pigmentbildende Hefen kommen ursprünglich aus der Phyllosphäre, darunter Arten wie *Sporobolomyces roseus*, *Aureobasidium pullulans* und *Rhodotorula glutinis* (Maksimova & Chernov, 2004). Diese Hefen bewohnen die

Oberfläche von Pflanzen und wurden mehrfach in verschiedenen Regionen gefunden (Fonseca & Inácio, 2006). Es wird angenommen, dass die Pigmentation mit Karotinoiden und Melanin einen UV-Schutz, und damit eine Anpassung an die, der Sonnenstrahlung ausgesetzten Oberflächen von Pflanzen darstellt. Die Abundanz dieser Hefen im Boden ist meist niedriger als 5%.

Eine Reihe kultivierungs-unabhängige Studien zur Diversität von Mikroorganismen im Boden detektierte ebenfalls Hefen. Die angewandten Methoden waren Pyrosequenzierung und Klonierung, überwiegend der ITS- und SSU-Region der ribosomalen DNA nach der Extraktion der Gesamt-DNA aus Bodenproben. Lynch & Thorn (2006) untersuchten die Diversität von Basidiomyceten in Eichen-Savannen in Michigan (USA), Fierer *et al.*, (2007) die genetische Diversität in Prärie-, Wüsten- und Regenwaldboden, Buee *et al.* (2009) die Diversität von Pilzen in Wäldern innerhalb der Morvan-Region (Frankreich), Lim *et al.*, (2010) die von Wäldern in China und Korea und Klaubauf *et al.*, (2010) in Acker- und Wiesenböden innerhalb Österreichs.

Die Identifikation von Hefen in diesen Studien beruhten auf Referenzsequenzen, die in öffentlichen Datenbanken. z.B. NCBI und UNITE.

Auf Grund der geringen Anzahl an Sequenzen für die ITS- und SSU-Region für Hefen in Genebank wurden nur wenige Arten identifiziert, darunter *Cryptococcus podzolicus* (Buee *et al.*, 2009; Lynch, 2006), *Trichosporon dulcitum*, *Cryptococcus terricola* und *Cryptococcus terreus* (Lynch & Thorn, 2006).

1.5 Taxonomie und Identifizierung von Hefepilzen über die ribosomale DNA (rDNA)

Die ribosomale DNA ist im Kerngenom lokalisiert und liegt dort in sogenannten tandem repeats vor (Abbildung 4). Diese tandem repeats bestehen aus für die Ribosomen codierenden Gene der 18S (SSU= small subunit), 5.8S, 26S (LSU= large subunit) und 5S rRNA-Gene. In jeder Einheit trennen zwei Spacer-Regionen die verschiedenen Abschnitte. Die ITS (Internal Transcribed Spacer) liegt zwischen der SSU und LSU, die IGS (Inter Genetic Spacer) zwischen LSU und SSU.



Abbildung 4: Schema eines multicopy rDNA repeat

Der schwarze Balken markiert die am häufigsten verwendeten Bereiche (Quelle: Begerow *et al.*, 2010)



Abbildung 5: Schematische Darstellung der LSU

(Quelle: Melen *et al.*, 1999)

Die morphologischen Merkmale die früher zur Identifizierung von Hefen herangezogen wurden sind oft nicht ausreichend, da sie nicht genug Variabilität aufweisen um Arten abzugrenzen. Eine weitere Methode stellen Assimilationstests dar, wobei Hefen auf Grund der Fähigkeit bestimmte Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen zu verwerten, unterschieden werden (Barnett, 2004). Die Variabilität innerhalb einer Art und zwischen verschiedenen Arten ist mitunter jedoch sehr hoch und die Dauer dieser Tests lang, die Handhabung schwierig und kostenintensiv. Die Verwendung von Sequenzen ist dagegen eine relativ einfache und schnelle Methode. Dazu werden Sequenzunterschiede der DNA zwischen Gruppen und Arten genutzt, um diese zu klassifizieren (Kurtzman & Fell, 2006; Fell *et al.*, 2000). Kurtzman & Robnett (1998) legten mit ihrer Studie zur Nutzung der 26S D1/D2-Domäne (Abbildung 5) als Marker für die Systematik von Hefen innerhalb der Ascomyceten, den Grundstein für eine umfangreiche Sequenz-Datenbank. Diese spezielle Region der rDNA wurde ausgewählt, weil sie bei Hefen hoch konserviert ist aber genug Variabilität beinhaltet, um zwischen nahverwandten Spezies zu unterscheiden (Barnett, 2004). Zur Identifizierung von Hefen auf Artebene ist dabei mittlerweile besonders auch die ITS-Region von Interesse (Abbildung 4) und wurde zuerst von Scorzetti *et al.*, (2002) für Basidiomyceten-Hefen sequenziert. Die ITS-Region ist bei Pilzen, die am häufigsten sequenzierte Marker-Region und wird für systematische und phylogenetische Fragen herangezogen, ebenso wie zur Identifizierung von Stämmen (Begerow *et al.*, 2010).

Diese Methode, Hefen über molekulare Marker zu identifizieren, fand in verschiedenen Bereichen bereits Anwendung, wie z.B. zur Diagnose von Hefen im Veterinärmedizinischen Bereich (Garner *et al.*, 2010), zur molekularen Systematik (Fell *et al.*, 2000) und zur Identifizierung von Hefen aus Umweltproben (Buee *et al.*, 2009;

Wuczkowski & Prillinger, 2004). Als Datenbanken für rDNA-Sequenzen sind vor allem die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) mit den dort hinterlegten Sequenzen der Typus-Stämme relevant.

1.6 Die „Biodiversity Exploratories“

In vielen Fällen werden Untersuchungen zur Biodiversität und Landnutzung in einzelnen Biotopen durchgeführt. Die Ergebnisse sind dadurch kaum auf Biom-Ebene oder für Kontinente repräsentativ.

Deutschland ist Teil des Verbreitungszentrums, der einst große Flächen bedeckenden natürlichen Buchenwälder. 14,1% der Waldfläche Deutschlands sind Buchenwald, wovon lediglich etwa 5% nutzungsfrei sind. Natürliche Bestände sind durch extensive Forstwirtschaft und Ersatz mit Fichten-Monokulturen verloren gegangen. Der Schutz dieser Flächen als kulturelles Erbe ist daher ein wichtiges Ziel. Einige Buchenwald-Flächen sind bereits als UNESCO-Weltnaturerbe geschützt. Weitere Flächen sind in der Diskussion zu Schutzgebieten erklärt zu werden (Knapp, 2008; Grossmann, 2011; Deutsche UNESCO-Kommission e. V., 2001).

Landnutzung und Forstwirtschaft haben großen Einfluss auf Nährstoffkreisläufe und Biodiversität (Wardle *et al.*, 2004). Aktuelle Meta-Studien untersuchten die Auswirkungen von Forstwirtschaft auf verschiedene Taxa und konnten zeigen, dass die Diversität einiger Taxa in unbewirtschafteten Wäldern höher ist (Paillet *et al.*, 2010). Die Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen sind aber noch weitgehend unbekannt (Wardle *et al.*, 2004).

Ziel des, durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Langzeit-Projektes zur Biodiversitätsforschung, „Biodiversity Exploratories“, ist es, fachübergreifend das Zusammenspiel von Landnutzung, Biodiversität und Ökosystemprozessen in realen Ökosystemen zu erforschen. Der wichtigste Aspekt ist dabei ein System von standardisierten Untersuchungsflächen (Plots) zu schaffen, um Beobachtungen auf breiter Ebene statistisch vergleichbar zu machen.

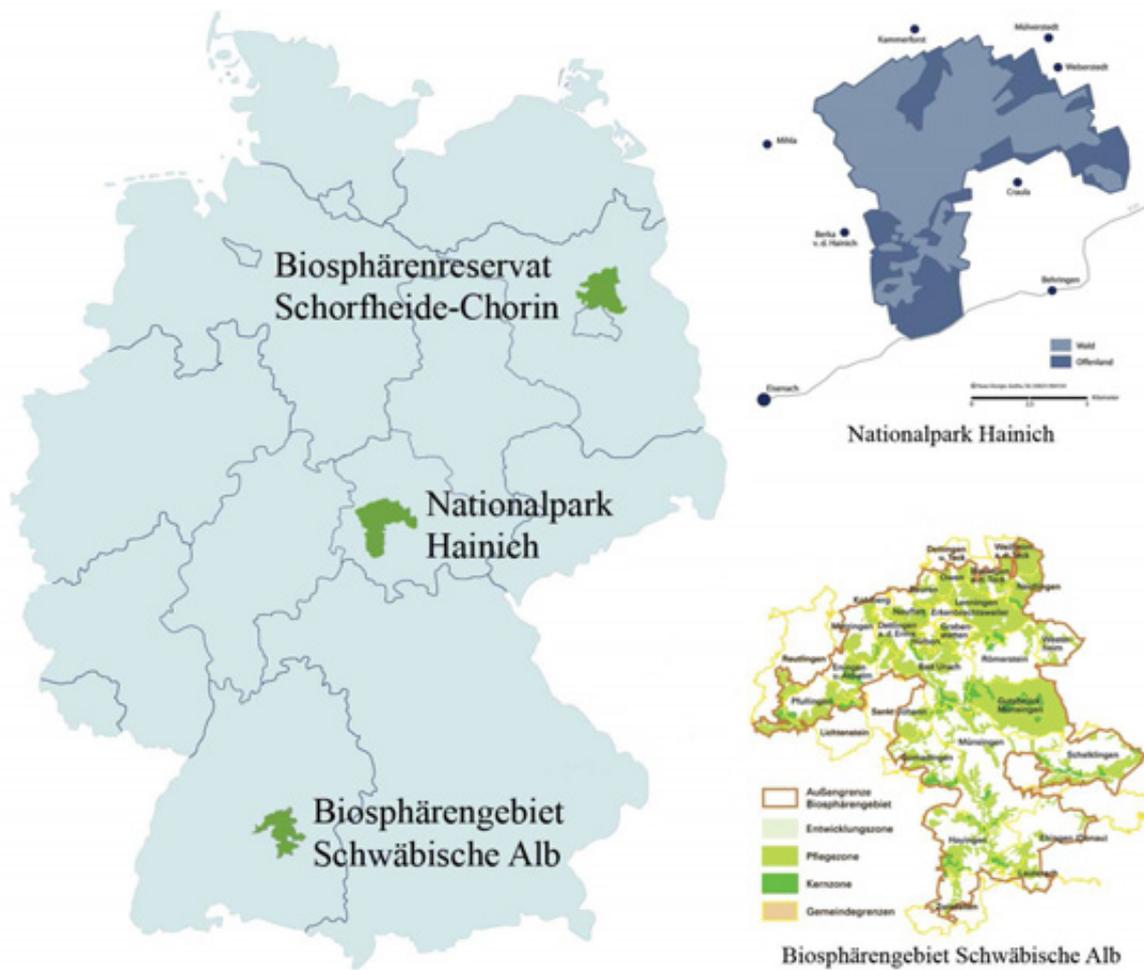


Abbildung 6: Standorte der Exploratorien

Quelle: www.biodiversity-exploratories.de, www.nationalpark-hainich.de, www.biosphaerengebiet-alb.de

Das Projekt wurde auf unterschiedliche geographische Gebiete erweitert, um auch regionale Effekte zu untersuchen und miteinander vergleichen zu können. Drei verschiedene Exploratorien in unterschiedlichen Regionen Deutschlands wurden etabliert. Alle drei Exploratorien gehören mittlerweile zu den UNESCO-Weltnaturerben. Dies sind, dass Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin in Brandenburg, der Nationalpark Hainich in Thüringen und das Biosphärengebiet Schwäbische Alb in Baden-Württemberg (Abbildung 6). Sie unterscheiden sich nicht nur auf Grund ihrer Lage, sondern auch in ihrer Geologie und Höhenlage. Jedes der Exploratorien repräsentiert die häufigsten Variationen in der Landnutzung, jeweils für Wiesen und Wälder.

Die drei Exploratorien sind jeweils in ein Netzwerk von Untersuchungs- und Experimentierplots in Wald und Grasland aufgeteilt, die unterschiedliche Grade der Landnutzung aufweisen. Diese reichen, von stark genutzt bis naturbelassen. Die Wald-Plots bilden Buchen-Mischwälder mit unterschiedlichen Nutzungsgradienten von unbewirtschaftet bis stark genutzt, Fichten- und Buchen-Misch-Bestände (Abbildung 7).



Abbildung 7: Wald-Nutzungstypen in Hainich und der Schwäbischen Alb

Oben: Schwäbische Alb, unten: Hainich; jeweils links: Nutzwald, rechts: Naturwald

In unterschiedlichen Teil-Projekten wurden innerhalb dieser Plots verschiedene Schwerpunkte untersucht. Es handelte sich um die Erfassung von Biodiversität unterschiedlicher Taxa oder die Erfassung abiotischer Faktoren und Klimadaten (Fischer *et al.*, 2010). Im Projekt Boden ging es zum Beispiel in fünf einzelnen Teilprojekten darum, eine bodenökologische Charakterisierung vorzunehmen und die mit Boden assoziierten Organismen, wie Bakterien, Pflanzen und Pilzen, darunter auch Hefen, in verschiedenen Biotopen zu screenen und ihre Funktion zu bestimmen.

Die Effekte von Forstwirtschaft auf Bodenhefen wurden kürzlich für VIP-Plots (very intensive plots) der „Biodiversity Exploratories“ demonstriert. Diese Plots sind bezüglich des Landnutzungsgradienten kategorisiert und dienen unter anderem der genauen Erforschung von Landnutzung auf die mikrobielle Diversität (Fischer *et al.*, 2010). Die Bodenproben wurden von April-Juni 2008 aus allen drei Exploratorien gesammelt. Die Hefe-Gemeinschaften innerhalb der Exploratorien waren sehr unterschiedlich, nur 2-3 Arten wurden in Übereinkunft mit anderen Studien für Waldboden gefunden.

Trotzdem konnten zwei wesentliche Trends beobachtet werden. Zum einen wurde festgestellt, dass die Abundanz von Ascomyceten mit der Nutzungsintensität steigt. Zweitens wurde beobachtet, dass sich die Gemeinschaften mit Stärke des Nutzungsgradienten zunehmend ähnlicher sind. Auffallend ist, dass der zweite Punkt die Pflanzengemeinschaft widerspiegelt. Die Ähnlichkeit der Hefen-Gemeinschaft folgt dabei dem Grad der Landnutzung, die zu einer einheitlichen Pflanzengesellschaft führt. Die Ähnlichkeit der Vegetation scheint ein universaler Marker für den Einfluss von Landnutzung auf die Hefengemeinschaft zu sein (Yurkov *et al.*, 2011).

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Diversität bodenassoziierter Hefepilze im Natur- und Nutzwald zu untersuchen. Dazu sollten Hefepilze unter Zuhilfenahme von Kultivierungstechniken aus dem Boden isoliert, quantifiziert und über molekulare Methoden, mittels der rDNA-Sequenzen identifiziert werden. Auf dieser Grundlage war es das Ziel, die Gemeinschaftsstruktur zu rekonstruieren. Dabei wurden neben dem Schwerpunkt, mögliche Unterschiede zwischen einem Natur- und Nutzwald herauszuarbeiten, ebenfalls jahreszeitliche Aspekte einbezogen. Es wurden zudem zwei geographisch unterschiedliche Untersuchungsgebiete ausgewählt, um eventuelle regionale Unterschiede in der Anzahl von Hefen und der Gemeinschaftsstruktur zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte:

Vortex: Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Schwerte, Deutschland)

Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Mikrowelle: (Sharp, Hamburg, Deutschland)

Geldokumentationskammer: Vilbert Lourmat Rainbow CCTV RMB 92 (Vilbert, Marne La Vallee, Frankreich)

Netzteil für Gelelektrophorese: Consort EV 243 (SIGMA, Taufkirchen, Deutschland)

Thermodrucker: Mitsubishi P93 (Mitsubishi, Ratingen, Deutschland)

Zentrifuge: Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Thermocycler: DNA Engine Peltier Thermal Cycler (Bio Rad, München, Deutschland)

Sequenzierer: ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Universalschüttler: SM30 A (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)

Stereomikroskop: Wild M1 (Wild Heerburg AG, Gais, Schweiz)

Stereomikroskop: Axiostar plus (Zeiss, Jena, Deutschland)

Waage: Präzisionswaage 572 (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern Deutschland)

2.1.2 Chemiekalien:

Agar	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
DNA-Längenmarker 1kb	Bio-Budget, Krefeld, Deutschland
dNTPs	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	J. T Baker, Griesheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Fischer, Wiesbaden, Deutschland
Glukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	J. T Baker, Griesheim, Deutschland
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrochinolin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Malz-Extrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchsäure 80%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ -EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Potato Dextrose Broth	J. T Baker, Griesheim, Deutschland
Primer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Reaktionspuffer	PEQlab, Erlangen, Deutschland
RNAse	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase	PEQlab, Erlangen, Deutschland
Tris-Base	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton x-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Puffer, Medien, Lösungen:**YPD-Festmedium:**

2,0% (w/v) Glukose

0,5% (w/v) Pepton

1,0% (w/v) Hefe-Extrakt

2,0% (w/v) Agar

Mit ddH₂O ansetzen, 5min bei 121°C autoklavieren

0,2% (v/v) Milchsäure (80%) nach dem Autoklavieren zugeben

pH in Endkonzentration 4,0-4,5

PD-Flüssigmedium:

2,4% (w/v) Potato Dextrose Broth (Difco)

Mit ddH₂O ansetzen, 5min bei 121°C autoklavieren

Kanamycin-Stock-Lösung

1000× 50mg/ml (w/v)

2g in 40ml in sterilem ddH₂O lösen

Bengalrosa-Stock-Lösung

1000× 50mg/ml (w/v)

2g in 40ml sterilem ddH₂O lösen

0,01% Pepton-Lösung:

0,01% (w/v) Pepton

Mit ddH₂O ansetzen, 5min bei 121°C autoklavieren

Glukose-Glycerin-Lösung:

70% (v/v) Glycerin

0,5% (w/v) Glukose

Glycerin autoklavieren und Glukose-Lösung durch Sterilfiltrieren (Filter ϕ 2 μ m) zugeben

TE-Phenol/ Chloroform:

50% TE-Phenol (v/v) (Zugabe von 8-Hydrochinolin bis Farbe in Gelb umschlägt)

50% Chloroform (v/v) (100%)

15min bei 4000rpm zentrifugieren

Bei 4°C lagern

Usti-Lysis-Puffer:

10mM Tris HCl, pH 8,0

100mM NaCl

1mM Na₂-EDTA

1% (v/v) SDS

2% (v/v) Triton x-100

10× TE-Puffer pH 8,0:

100mM Tris-Base

10mM Na₂-EDTA*2H₂O

Mit ddH₂O ansetzen, pH-Wert mit HCl auf 8,0 einstellen, 5min bei 121°C autoklavieren

TE-RNase

1% (w/v) RNase

Mit TE-Puffer pH 8,0 ansetzen

TBE (5×)

440mM Tris-Base pH 8,0

440mM Borsäure

10mM Na₂-EDTA

Mit ddH₂O ansetzen

6× Lade-Puffer

50% (w/v) Saccharose

0,1% Bromphenolblau

Mit TE-Puffer ansetzen und sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

2.1.4 Kits

my-Budget Double Pure Kit (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland)

DNA Clean & Concentrator™-5-Kit (Zymo Research Corporation; Irvine, USA)

Taq-DNA-Polymerase (Kit beinhaltet 10x PCR-Puffer und 20mM MgCl₂); PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

2.1.5 Software

Excel 2003

Microsoft Corporation

Sequencher 4.10.1

Gene Codes Corporation

4peaks 1.7.1

SOFTONIC INTERNATIONAL S.L.

Mega 5.0

<http://www.megasoftware.net> (Tamura u.a. 2007)

Statistica

StatSoft GmbH, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Biologisches Material und Probennahme

Das Ausgangsmaterial der Arbeit bilden Bodenproben aus dem Biosphärengebiet Schwäbische Alb in Baden-Württemberg und dem Nationalpark Hainich in Thüringen. Diese beiden Gebiete sind zwei von drei Exploratorien in Deutschland, die im Rahmen einer Biodiversitätsstudie (www.biodiversity-exploratories.de) unterhalten werden. Die Bodenproben stammen jeweils aus unterschiedlichen Experimentierflächen von 20×20m, die als Experimentierplots und unter der Abkürzung AEW (Schwäbische Alb) und HEW (Hainich) bezeichnet werden. Bei den Plots AEW4-6 und HEW4-6 handelt es sich um mittel bis stark forstwirtschaftlich genutzten Buchenwald. Bei den Plots AEW7-9 und HEW10-12 um ungenutzten Buchen-Naturwald (siehe Anhang 1 für detaillierte Informationen).

Zu jedem Probenplot gehören 4 Bodenproben, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr dem A-Horizont (0-10cm) entnommen wurden, die Zeitpunkte sind jeweils April, Juni, August und Oktober 2009. Zur Probenentnahme wurde ein motorbetriebener Zylinderbohrer verwendet. Für jeden Plot wurden 5 Bohrkerne aus dem A-Horizont gezogen und vereinigt. Holzanteile, Wurzeln und Steine (>5mm) wurden zuvor entfernt. Alle Bodenproben wurden bis zur Bearbeitung im Labor in sterile Plastikbeutel verpackt, bei -20°C gelagert und ca. 12 Stunden vor der Bearbeitung bei 4°C aufgetaut.

2.2.2 Isolation der Hefepilze

Von jeder Bodenprobe wurden 3,5g Boden (natürliche Feuchtigkeit) abgewogen und in 50ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Pflanzenmaterial, wie Wurzeln und Teile von Laubstreu sowie Steine, wurden zuvor entfernt. Die Proben wurden anschließend in 35ml 0,01% Peptonlösung für mindestens 1 Stunde bei 200rpm auf einem Schüttler suspendiert. Es wurde auf diesem Weg eine 1:10-Verdünnung gewonnen und Aliquots dieser Verdünnung als Grundlage einer 1:20-Verdünnung der Bodensuspension verwendet. Für jede Bodenprobe wurde ein Replikat angefertigt. Demnach wurden für jede Bodenprobe vier Einzelproben bearbeitet.

Aliquots von 100µl jeder Verdünnung wurde auf Platten mit YPD-Festmedium verteilt. Das Medium wurde zuvor mit Laktat angesäuert, um Bakterienwachstum zu unterbinden. Die Platten wurden anschließend ca. 7-14 Tage bei 4°C inkubiert, um ein zu schnelles Wachstum von Schimmelpilzen, die im Boden ebenfalls zu erwarten sind, zu verhindern. Nachdem die gewachsenen Hefekolonien eine Größe erreicht hatten, bei der es möglich war Kolonien zu unterscheiden, wurden die Platten mit Hilfe eines Stereomikroskops begutachtet. Die Hefekolonien wurden nach morphologischen Kriterien zu Kolonietypen gruppiert und alle Kolonien quantifiziert. Die Kriterien waren Form, Farbe und Oberflächenstruktur. Von jedem Kolonietyp wurden 1-2 Kolonien pro Platte entnommen und auf neue YPD-Agar-Platten übertragen. Die Ursprungs-Platten wurden mindestens 14 Tage aufbewahrt, regelmäßig auf verzögert wachsende Kolonien überprüft und diese gegebenenfalls isoliert, bis der Bewuchs der Platten mit Schimmelpilzen dies nicht mehr zuließ. Insgesamt wurden auf diesem Weg 760 Kulturen aus den Bodenproben isoliert und mit einer Isolations-Identifikationsnummer kodiert (TSN-103 bis TSN-863).

Die in Reinkultur überführten Kolonien wurden etwa 2 Tage bei Raumtemperatur und weitere 5-14 Tage bei 4°C inkubiert.

2.2.3 DNA-Isolation

Von den Reinkulturen wurde etwas Zellmasse abgenommen und für ca. 48 Stunden in 2ml PD-Flüssigmedium bei 200rpm inkubiert. Zwei Aliquots von 500µl Kultur wurden mit 1ml Glycerin-Lösung gemischt und bei -80°C eingefroren, um den späteren Zugriff auf die Isolate zu erhalten. Der Rest Flüssigkultur wurde für die DNA-Isolation verwendet.

Protokoll DNA-Isolation:

- Vorlage: 200µl Glaskugeln (Ø0,25 – 0,58mm) in 2ml Cup
- Transfer der Flüssigkultur in das Cup
- Zentrifugieren: 2min bei 13.000rpm
- Überstand verwerfen
- Aufbewahrung des Cups bei -20°C für mindestens 30min um Zellen aufzubrechen (auch dauerhafte Aufbewahrung)
- Zugabe von 500µl Usti-Lysis-Puffer und 500µl TE-Phenol/Chloroform (1/1)
- 15–30min mischen (Vortex)
- Zentrifugieren: 15min bei mindestens 13.000rpm

- 1ml Ethanol (100%) in 1,5ml Cup vorlegen
- 400µl des Überstandes in Ethanol überführen
- Vorsichtig mischen
- Zentrifugieren: 15min bei 13.000rpm
- Überstand verwerfen (Pellet nicht trocknen lassen)
- Zugabe von 50µl TE/RNase (pH 8,0; 10µg/mL)
- Schütteln bei 55°C für 15min (Thermomixer)
- Lagerung bei -20°C

Kontrolle der Extraktion mit 0,8% Agarose-Gel (2µL DNA +5µL Ladepuffer, Marker 1kB)

2.2.4 Microsatellite primed-PCR (MSP-PCR)

Die MSP-PCR stellt eine schnelle und einfache molekulare Methode dar, um Organismen anhand von DNA-basierenden Fingerabdrücken (PCR fingerprinting) zu identifizieren. Dabei werden kurze synthetische Oligonukleotide als einzige Primer in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Das DNA-Bandenmuster, das sich mit der gelelektrophoretischen Auftrennung ergibt, bildet in der Regel ein artspezifisches Muster (Mitchell *et al.*, 1994; Meyer, 1995). Diese Methode wurde innerhalb der Gruppe der Basidiomycota bereits für Pucciniomycotina (Gadano & Sampaio, 2002), und innerhalb der Gruppe der Ascomycota für Taphrinomycotina (Inacio *et al.*, 2004) und Saccharomycotina (Yurkov, 2005) zur Untersuchung von Stämmen etabliert. Zur Analyse der Diversität von Hefen in Umweltproben fand die MSP-PCR ebenfalls Anwendung (Inacio *et al.*, 2004; Gadano *et al.*, 2003).

Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Primern (GTG)₅ oder (GAC)₅ (Gadano *et al.*, 2003) wurden die Kulturen zu Gruppen zusammengefasst. Kulturen mit gleichem elektrophoretischem DNA-Profil wurden dabei als conspezifisch angesehen.

Tabelle 1: MSP-PCR-Ansatz

MSP-PCR-Ansatz (25µl)	1x+Probe
PCR-Puffer	5µl
ddH ₂ O	30,8µl
dNTP's (10mM)	1µl
Primer (10pmol/µl)	1µl
Taq-Ploymerase (5U/µl)	0,2µl
DNA	1µl

Tabelle 2: MSP-PCR-Programm

MSP-PCR-Prgramm		
Denaturierung	96°C	2:00min
Zyklen	35	
Denaturierung	96°C	0:20min
Anealing	50°C	1:00min
Extension	72°C	2:00min
Extension	72°C	07:00
Lagerung	6°C	∞

2.2.5 PCR zur Amplifizierung der D1/D2-Domäne der rDNA:

Aus jeder conspezifischen Gruppe wurden 1-2 Kulturen ausgewählt und die Region der ITS1, 5,8rDNA, ITS2 bis zur D1/D2-Domäne der LSU des ribosomalen Gen-Clusters mit den Primern ITS1f und NL4 amplifiziert (Gardes & Bruns, 1993; O'Donell, 1993).

Tabelle 3: PCR-Ansatz

PCR-Ansatz (50µl)	1x
PCR-Puffer	5µl
ddH ₂ O	30,8µl
dNTP's (10mM)	1µl
Primer (10pmol/µl) NL4	1µl
Primer (10pmol/µl) ITS1f	1µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,2µl
DNA	1µl

Tabelle 4: PCR-Programm

PCR-Programm		
Denaturierung	96°C	2:00min
Zyklen	35	
Denaturierung	96°C	0:20min
Anealing	52°C	0:50min
Extension	72°C	1:30min
Extension	72°C	07:00
Lagerung	6°C	∞

2.2.6 Gelelektrophorese von PCR-Reaktionen

Die Produkte aus den PCR-Reaktionen wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden Agarose mit einer Endkonzentration von 0,8% in 1xTBE-Puffer gelöst und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen.

Für die Auftrennung von PCR-Produkten aus MSP-PCR-Reaktionen wurden 10µl Produkt mit 3µl Ladepuffer versetzt und 10µl der Mischung in ausgesparte Taschen im Gel pipettiert. Die Auftrennung erfolgte 10min bei 130 V, anschließend 60min bei 100Volt in 1xTBE-Puffer.

Für Produkte aus allen anderen PCR-Reaktionen wurde 2µl Produkt mit 5µl Ladepuffer versetzt und 5µl der Mischung verwendet. Die Auftrennung erfolgte dabei für 45min bei 120V.

Das DNA-Profil wurde anschließend unter UV-Licht mit Hilfe der Geldokumentationskammer sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem DNA Clean & Concentrator™-5-Kit und dem my-Budget Double Pure Kit nach den jeweiligen Angaben des Herstellers.

2.2.8 Sequenzierung der D1/D2-Region der rDNA:

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden durch den Sequenzier-Service der Analytischen Chemie der Ruhr-Universität Bochum unter Benutzung eines Kapillarelektrophoresegerätes (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer) sequenziert. Als Primer für die Sequenzierung der ITS1f-NL4-Fragmente wurde NL4, in manchen Fällen ITS1f und ITS4 (Innis *et al.*, 1990) verwendet.

2.2.9 Bearbeitung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit dem Programmen Sequencher 4.10, 4Peaks und Mega 5.0 eingelesen und bearbeitet.

2.2.10 Artidentifizierung der isolierten Hefepilze

Mit dem Algorithmus Nucleotide-BLAST wurden die bearbeiteten Sequenzen mit den Sequenzdatenbanken Genbank (NCBI) und CBS abgeglichen und die entsprechenden Hefe-Kulturen beschriebenen Arten zugeordnet, wenn eine Übereinstimmung von mindestens 95% gegeben war. Bei einer Sequenzübereinstimmung zwischen 95% und 90% wurde die Kultur der entsprechenden Gattung zugeordnet.

2.2.11 Statistische Auswertung

Für jede Einzelprobe wurde die Gesamtanzahl an Hefen in CFU/g Boden (colony forming units) und die Anzahl an gefundenen Arten berechnet. Die relative Abundanz der in jeder Einzelprobe detektierten Arten konnte kalkuliert werden.

Mit Hilfe der Varianzanalyse ANOVA/MANOVA im Programm STATISTICA wurden die Größen CFU/g Boden und Artenanzahl auf signifikante Unterschiede im Bezug auf Suspensionsverdünnung, Region, Landnutzung und Zeitpunkt untersucht. Bedingung für die Benutzung von ANOVA/MANOVA ist die unimodale Verteilung bzw. Normalverteilung der Messwerte, diese wurde zunächst überprüft. Der Zweck der Analyse besteht darin, Mittelwertvarianzen von Variablen, z.B. die gesamte Abundanz von Hefen (CFU/g Boden), auf statistische Signifikanz zu testen.

Mit MANOVA ist es, im Vergleich zum t-Test möglich, die Varianz mehrerer Faktoren zu testen. In der ANOVA werden dabei zwei Hypothesen gegeneinander getestet, die Nullhypothese, die annimmt, dass alle Mittelwerte keine Unterschiede aufweisen und die Alternativhypothese, die davon ausgeht, dass die Mittelwerte in ihrer Grundgesamtheit verschieden sind. Die Prüfgröße p , die bei der Analyse errechnet wird, gibt an, ob ein signifikanter Unterschied vorliegt, ein Wert von $p=0,05$ gilt als statistisch signifikant. Die Bedingung für die Verwendung von ANOVA ist, dass die Messwerte unimodal verteilt sind bzw. der Normalverteilung folgen (Looser, 2003; Ross, 2006; Röhr, 1997).

Von insgesamt 192 Einzelproben wurden 180 in die Analyse einbezogen, 12 wurden davon ausgeschlossen, weil die Einzelproben entweder keine Hefen enthielten oder ein zu starker Bewuchs der Proben mit filamentösen Pilzen eine Auswertung nicht zuließ.

3. Ergebnisse

Insgesamt 760 Hefepilz-Kulturen wurden aus Bodenproben aus dem Biosphärengebiet Schwäbische Alb in Baden-Württemberg und dem Nationalpark Hainich in Thüringen isoliert und kultiviert. Die Bodenproben stammten jeweils aus Natur- und Nutzwald und von jeweils vier verschiedenen Zeitpunkten im Jahr. Mit Hilfe von DNA-Fingerprinting-Methoden (MSP-PCR) wurden die Kulturen zu conspezifischen Gruppen zusammengefasst. Die Sequenzen der D1/D2-Domäne der rDNA wurden amplifiziert und mit entsprechenden Sequenz-Datenbanken abgeglichen und die Hefepilze durch Sequenz-Alignment identifiziert.

3.1 Vorexperiment

3.1.1 Test auf Effizienz des Kultivierungsmediums

Drei verschiedene Zusätze für das verwendete YPD-Medium zur Isolation von Hefen aus Bodenproben wurden auf ihre Wirksamkeit geprüft den Bakterien- und Schimmelwuchs auf den Agar-Platten zu verhindern bzw. zu reduzieren (siehe Material und Methoden).

YPD+Milchsäure

YPD+Kanamycin

YPD+Kanamycin+Bengalrosa

Es zeigte sich, dass auf sämtlichen Platten mit dem Zusatz von Kanamycin kaum Hefepilz-Kolonien wuchsen. Neben filamentösen Pilzen, die auf YPD+Milchsäure und YPD+Kanamycin gleichermaßen stark wuchsen, entwickelten sich lediglich dimorphe Pilze. Es handelte sich dabei hauptsächlich um die Art *Trichosporon dulcitum*. Bei beiden Zusätzen war die Anzahl etwa gleich.

Der Zusatz von Bengalrosa zum Medium hemmte und verzögerte deutlich die Entwicklung von filamentösen Pilzen auf den Agar-Platten. Durch den Zusatz von Kanamycin im

Medium, war das Wachstum von Hefen allerdings genauso unergiebig, lediglich dimorphe Pilze konnten wachsen.

Die starke farbliche Beeinflussung von Bengalrosa auf das Medium und auf die gewachsenen Hefe-Kolonien, führte zu einer schlechten Unterscheidbarkeit verschiedenfarbiger Kolonien, deshalb wurde auf eine weitere Untersuchung verzichtet YPD+Milchsäure+Bengalrosa gegen YPD+Milchsäure zu testen.

YPD+Milchsäure erwies sich als die geeignete Kombination zur Isolierung der Hefepilze.

3.1.2 Test auf Unterschiede in der Wahl der Suspensionsverdünnung

Die zwei Verdünnungen, die für die Bearbeitung der Bodensuspension angefertigt wurden, wurden mit ANOVA auf signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an CFU/g Boden und der damit detektierten Anzahl an Arten überprüft.

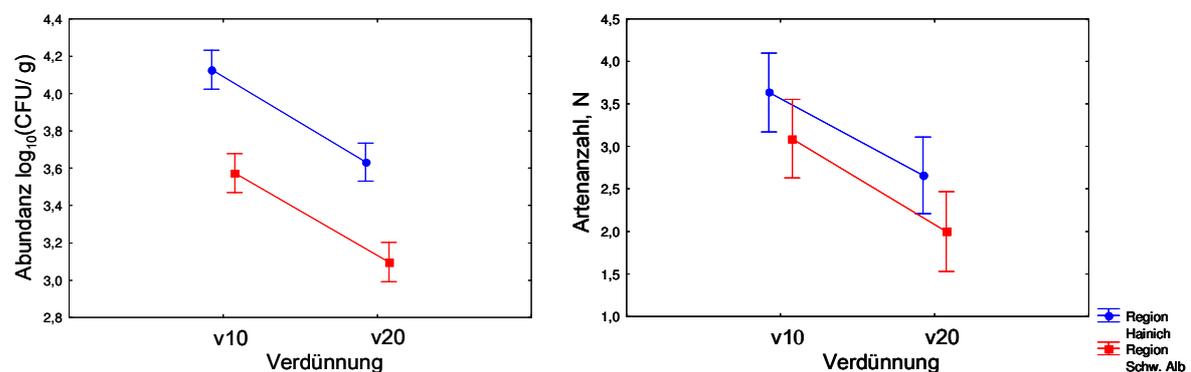


Abbildung 8: Effizienz der Verwendung unterschiedlicher Verdünnungen von Bodensuspensionen bei der Isolation von Hefepilzen

Die Abbildung zeigt links die Mittelwerte für die Anzahl isolierter Hefen pro Replik und Verdünnung, angegeben in \log_{10} CFU/g Boden und rechts die Mittelwerte der Anzahl detektierter Arten pro Replik und Verdünnung. Die vertikalen Balken zeigen 0,95 Konfidenzintervalle.

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass mit der 1:10-verdünnten Bodensuspension signifikant mehr Hefen quantifiziert wurden als mit der 1:20-Verdünnung ($F=50,54$, $p<0,001$). Es ergibt sich für Hainich eine Differenz $\Delta=0,5$ und für die Schwäbische Alb $\Delta=0,4$, dies entspricht 2-3 Kolonien.

Die Abundanz korreliert mit der Anzahl an detektierten Arten pro Replik. Mit der niedrigeren Verdünnung wurde ca. eine Hefeart mehr isoliert.

3.2 Gesamtabundanz

Die Gesamtabundanz der Hefepilze (CFU pro g Boden, natürliche Feuchtigkeit) wurde berechnet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gesamtabundanz von Hefepilzen im Waldboden (CFU/g Boden)

Region		Maximum	Mittelwert
Hainich	gesamt	$4,10 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$
	Nutzwald	$4,10 \times 10^4$	$9,93 \times 10^3$
	Naturwald	$3,60 \times 10^4$	$1,01 \times 10^4$
Schwäbisch Alb	gesamt	$1,36 \times 10^4$	$3,61 \times 10^3$
	Nutzwald	$1,36 \times 10^4$	$3,21 \times 10^3$
	Naturwald	$1,83 \times 10^4$	$3,36 \times 10^3$

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass sich die Gesamtabundanz regional deutlich unterscheidet. In Hainich wurden im Schnitt dreimal mehr Hefen pro Bodenprobe gefunden als in der Schwäbischen Alb.

In den beiden Regionen besteht für die Gesamtabundanz jedoch kein Unterschied zwischen den Nutzungstypen Natur- und Nutzwald.

3.3 Gesamtartenzahl

Insgesamt wurden 34 Arten aus den Bodenproben isoliert, davon werden 23 zu den Basidiomycota und 11 zu den Ascomycota gezählt. Insgesamt sieben Isolate konnten keiner Art, sondern lediglich einer Gattung zugeordnet werden und stellen vermutlich neue Arten dar. Diese wurden im Laufe dieser Arbeit zunächst als *Candida sp.* (TSN-107), *Candida sp.* (TSN-198), *Saccharomyces sp.* (TSN-505) *Debaryomyces sp.* (TSN-747), *Rhodotorula sp.* (TSN-574), *Dioszegia sp.* (TSN-530), *Cryptococcus sp.* (TSN-649) und *Mrakia sp.* (TSN-231) bezeichnet.

Von den insgesamt 34 Arten wurden 11 sowohl in den Bodenproben aus Hainich, als auch in den Proben aus der Schwäbischen Alb isoliert. 9 Arten wurden lediglich in Hainich, 14 Arten lediglich in der Schwäbischen Alb gefunden.

3.4 Test des Datensatzes auf Normalverteilung und ANOVA-Testdesign

Aus der Gesamtanzahl der Hefekolonien jeder Einzelprobe wurde die Anzahl CFU/g Boden ermittelt und für die Analyse in logarithmische Form überführt.

Die Normalverteilung des Datensatzes für die Abundanz-Werte pro Replikat wurde mit dem Programm STATISTICA überprüft. Eine Normalverteilung ist gegeben, wenn die Verteilungsfunktion bei doppelt-logarithmischer Auftragung eine Gerade ergibt.

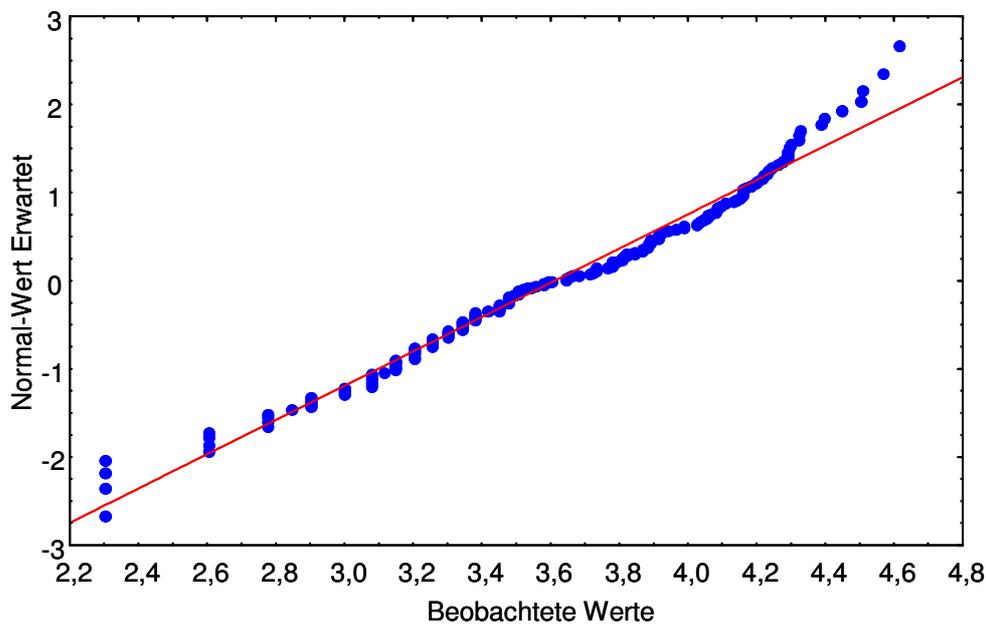


Abbildung 9: Normalverteilungsplot für \log_{10} CFU pro Einzelprobe

Aus der Abbildung 9 geht hervor, dass eine unimodale Verteilung, bzw. Normalverteilung vorliegt und dadurch die Verwendung von ANOVA zulässig ist.

Zur Analyse der Mittelwertvarianzen mittels ANOVA wurden drei Faktoren, mit entsprechenden Kategorien als unabhängige Variabel und vier abhängige Variablen eingesetzt.

Die drei Faktoren waren:

Region	Kategorie: Hainich, Schwäbische Alb
Nutzungstyp	Kategorien: Natur-, Nutzwald
Zeit	Kategorien: April, Juni, August, Oktober

Die Variablen waren:

Abundanz, \log_{10} CFU/g Boden
Artenanzahl, N
Abundanz der Ascomyceten
Abundanz der Arten

3.4 Vergleich von Wald-Nutzungstyp und Jahresverlauf

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, dass die Gesamtabundanz an Hefen in Hainich höher ist als in der Schwäbischen Alb ($F=73,06$, $p<0,001$). Grundsätzlich ist die Abundanz im Sommer signifikant höher als im Frühling und Herbst ($F=2,86$, $p<0,05$), eine Ausnahme zeigt sich im Nutzwald in Hainich, wo diese Korrelation nicht ersichtlich ist. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Naturwald-Typen zeigen im Jahresverlauf einen ähnlichen Trend, im Gegensatz zum Nutzwald. Es besteht jedoch zwischen Natur- und Nutzwald bezüglich der Abundanz kein signifikanter Unterschied ($0,01$, $p>0,05$).

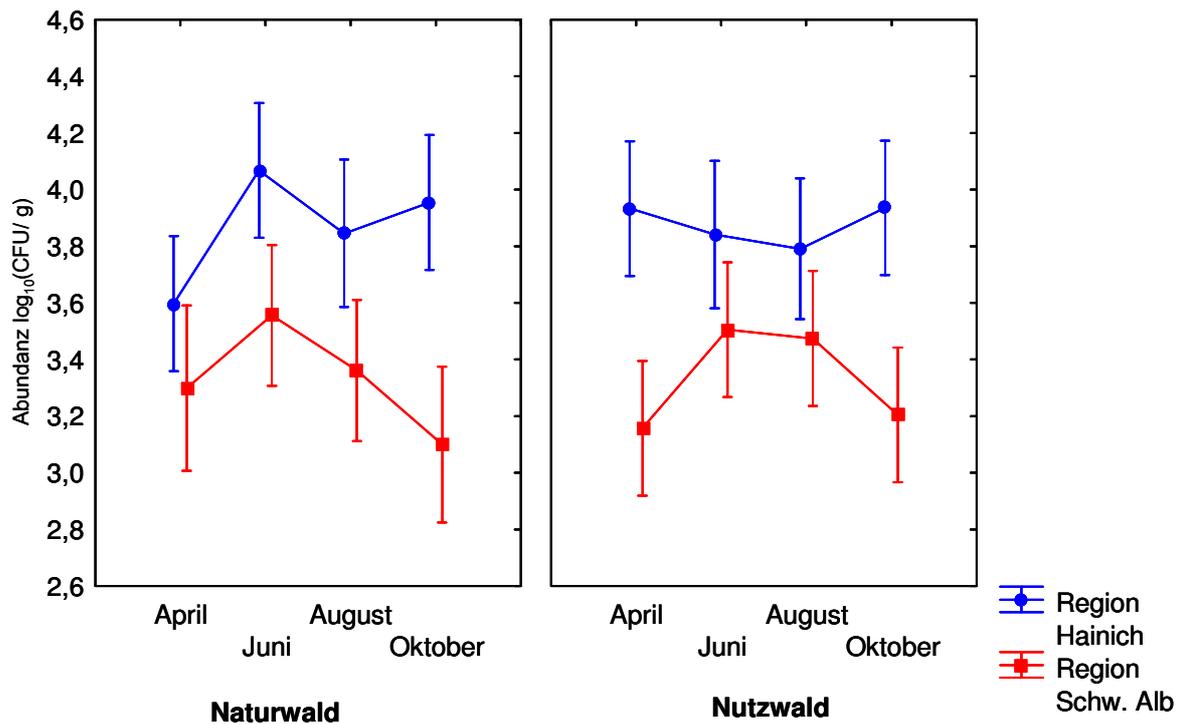


Abbildung 10: Abhängigkeit der Anzahl an Hefen vom Nutzungstyp und Jahresverlauf

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Anzahl Hefen pro Zeitpunkt, angegeben in CFU/g Boden. Die vertikalen Balken zeigen 0,95 Konfidenzintervalle.

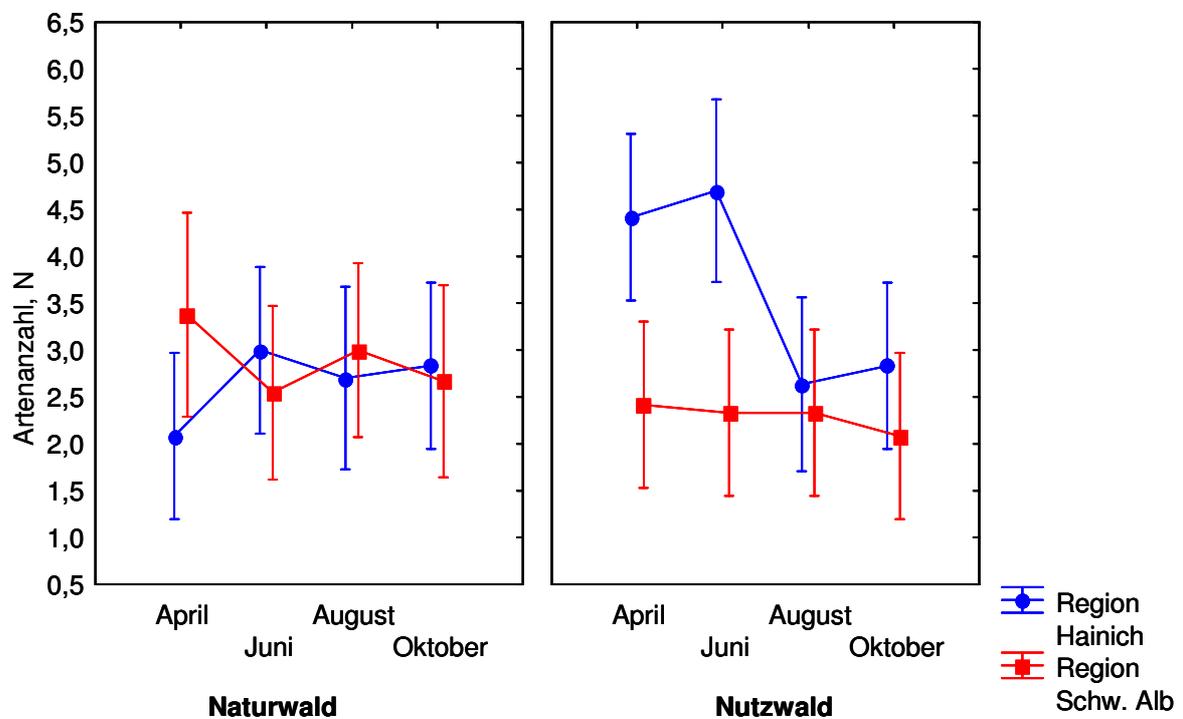


Abbildung 11: Abhängigkeit der detektierten Arten vom Nutzungstyp und Jahresverlauf

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Anzahl detektierter Arten pro Zeitpunkt. Die vertikalen Balken zeigen 0,95 Konfidenzintervalle.

Die Anzahl detektierter Arten pro Einzelprobe beläuft sich auf eine Zahl zwischen 1 bis 10 Arten, die höchste Anzahl an Arten wurde dabei in einigen Einzelproben für April und Juni aus der Region Hainich gefunden. In der Regel wurden jedoch meist nicht mehr als 4 Arten pro Einzelprobe detektiert. In Abbildung 11 sind die Mittelwerte der Anzahl an detektierten Arten pro Region und Zeitpunkt und Nutzungsgradienten dargestellt. Ein signifikanter Unterschied konnte auf regionaler Ebene für die Monate April und Juni festgestellt werden, dort wurde etwa 1 Art pro Probe mehr detektiert ($F=5,58$, $p<0,05$). Bezüglich der Landnutzung besteht zwischen Hainich und der Schwäbischen Alb kein Unterschied in der Artenanzahl pro Zeitpunkt.

Abbildung 12 zeigt die reale Artenanzahl, die pro Zeitpunkt gefunden wurden. Die Anzahl liegt in einem Bereich von 5-13 Arten. Die Maxima in Hainich zum Zeitpunkt April und Juni korrelieren mit dem Mittelwert detektierter Arten pro Einzelprobe (Abbildung 11). Es ist kein deutlicher Jahresgang ersichtlich, lediglich im Naturwald in Hainich ist eine Zunahme von 1-2 Arten im Jahresverlauf zu sehen. In der Schwäbischen Alb wurde ein Maximum von 11 detektierten Arten im Monat August im Naturwald festgestellt, ansonsten bleibt die Artenanzahl über das Jahr im Schnitt gleich verteilt.

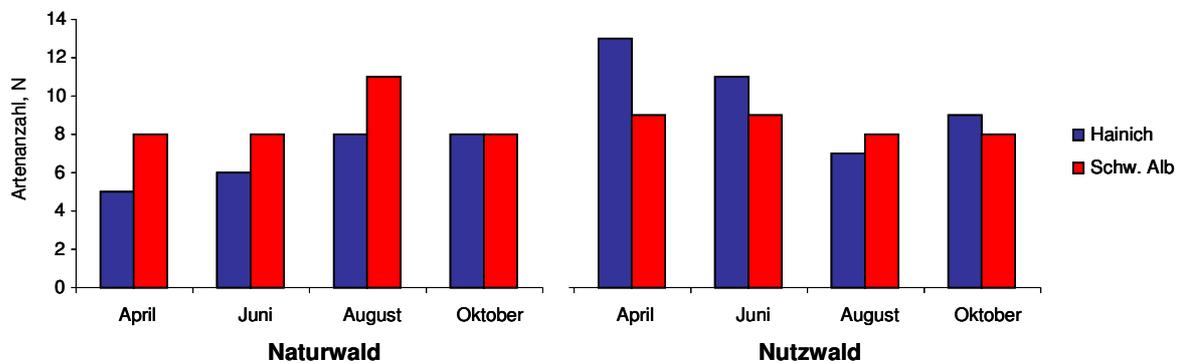


Abbildung 12: Reale Anzahl detektierter Arten pro Zeitpunkt und Nutzungstyp

3.6 Abundanz von Ascomyceten im Boden

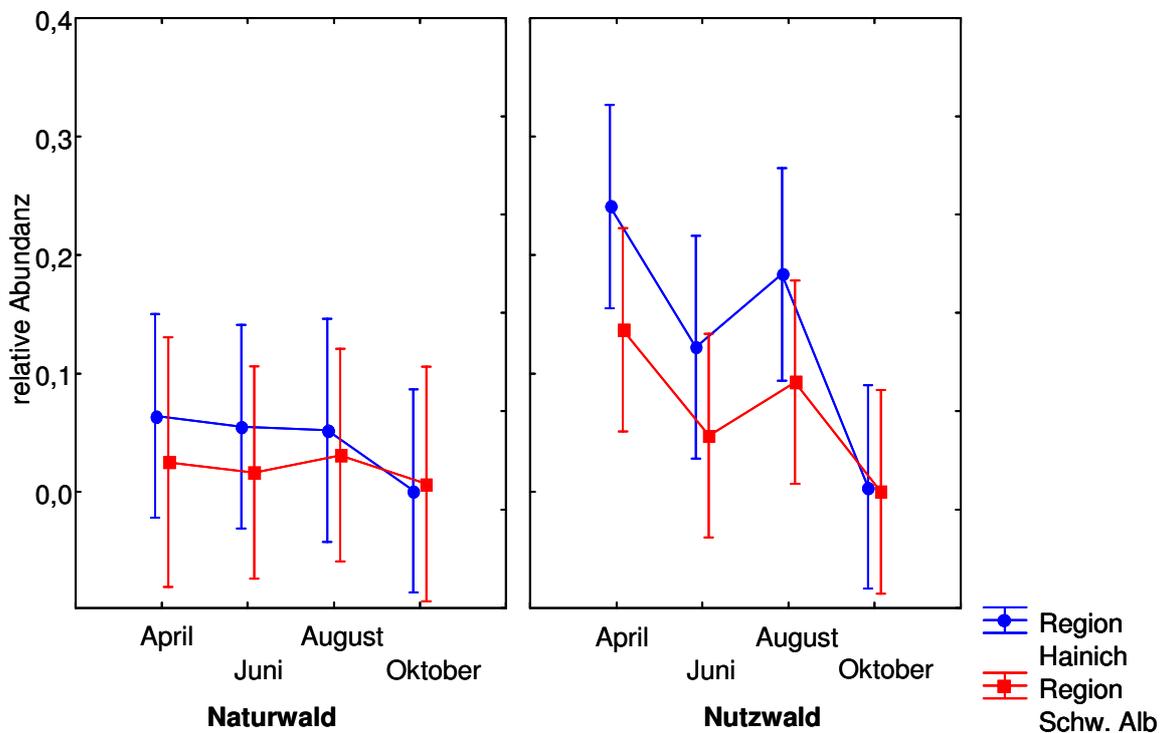


Abbildung 13: Relative Abundanz von Ascomyceten

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die relative Abundanz aller Ascomyceten pro Zeitpunkt, vergleichend für Natur- und Nutzwald der beiden Regionen Hainich und Schwäbische Alb. Die vertikalen Balken zeigen 0,95 Konfidenzintervalle.

Die relative Abundanz aller Ascomyceten wurde unabhängig der Taxonomie berechnet (Abbildung 13). Es zeigt sich, dass die Verteilung unabhängig von der Region jeweils im Nutz- und Naturwald ähnlich aussieht. Deutlich ist, dass die Abundanz von Ascomyceten im Nutzwald signifikant höher ist ($F= 10,02$; $p<0,01$). Besonders im April und August ist der Anteil an der Gemeinschaftsstruktur deutlich erhöht. Im Naturwald stellt sich über die gesamte Vegetationsperiode ein gleichbleibender Anteil ein. Im Oktober sind sowohl im Nutz- als auch im Naturwald sehr wenig, bis gar keine Ascomyceten im Boden vertreten.

Im April sind die Ascomyceten in Hainich durch die Arten *Candida kruisii*, *Candida sake*, *Candida sp.* (TSN-107) und *Candida sp.* (TSN-198) repräsentiert. In der Schwäbischen Alb sind es die Arten *Kazachstania piceae* und *Barnettozyma pratensis*.

Im August geht die Diversität in Hainich zurück, zu diesem Zeitpunkt konnte lediglich *Candida kruisii* nachgewiesen werden. In der Region Schwäbischen Alb sind im Sommer

Lindnera misumaiensis und *Debaromyces castelli* die Vertreter der Ascomyceten im Boden.

3.7 Diversität und Taxonomie

Die als unterschiedliche Taxa identifizierten Isolate gehören zu vier verschiedenen Unterordnungen der Pilze, Agaricomycotina (19 Arten), Pucciniomycotina (4 Arten), Saccharomycotina (10 Arten) und Pezzizomycotina (1 Art) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Liste identifizierter Arten

Art	Abteilung	Unterabteilung	Klasse	Ordnung
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Cystofilobasidiales
<i>Guehomyces pullulans</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Cystofilobasidiales
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	-
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus aerius</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus fillicatus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus gastricus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus stepposus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus terreus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus terricola</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Cryptococcus wieringae</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Holtermanniella takashimae</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Holtermanniales
<i>Leucosporidium scottii</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	Leucosporidiales
<i>Rhodotorula colostri</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	Sporidiobolales
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales
<i>Cryptococcus victoriae</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales
<i>Trichosporon dulcitum</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Trichosporonales
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Trichosporonales
<i>Trichosporon porosum</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Trichosporonales
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ascomycota	Pezizomycotina	Dothideomycetes	Dothideales
<i>Barnettozyma pratensis</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Kazachstania piceae</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Lindnera misumaiensis</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Candida kruisii</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Candida sake</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales

Aufgrund ihrer genetischen Distanz, stellen acht weitere Taxa vermutlich neue Arten dar (Tabelle 7). Sie wurden entsprechend des BLAST-Ergebnisses, zunächst mit dem Gattungsnamen der Art versehen, zu dem die größte Sequenzübereinstimmung bestand.

Tabelle 7: Liste potentieller neuer Arten

Vorläufige Art	Abteilung	Unterabteilung	Klasse	Ordnung
<i>Mrakia sp. (TSN-231)</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Cystofilobasidiales
<i>Cryptococcus sp. (TSN-649)</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Filobasidiales
<i>Dioszegia sp. (TSN-530)</i>	Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales
<i>Rhodotorula sp. (TSN-574)</i>	Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	-
<i>Dabaryomyces sp. (TSN-747)</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Candida sp. (TSN-198)</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Candida sp. (TSN-107)</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales
<i>Saccharomyces sp. (TSN-505)</i>	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales

Die Art mit der größten Sequenzübereinstimmung waren für:

Mrakia sp. (TSN-231) *Mrakia psychrophila*
Dioszegia sp. (TSN-530) *Dioszegia cryoxerica*
Dabaryomyces sp. (TSN-747) *Debaryomyces hansenii*
Candida sp. (TSN-198) *Candida santamariae*
Candida sp. (TSN-107) *Candida santamariae*
Saccharomyces sp. (TSN-505) *Saccharomyces bayanus*

Rhodotorula sp. (TSN-574) gehört zu den Microbotryomycetes und bildet eine Gruppe (schlecht unterstützt) mit zwei teleomorphischen Gattungen, *Curvibasidium* und „*Leucosporidium*“ *fasciculatum* und der Gruppe *Rhodotorula ingensosa-Rh.vanillica*

Cryptococcus sp. (TSN-649) fällt in die Gruppe Filobasidiales, die nächste verwandte Art ist *Filobasidium capsuligenum*.

3.8 Gemeinschaftsstruktur

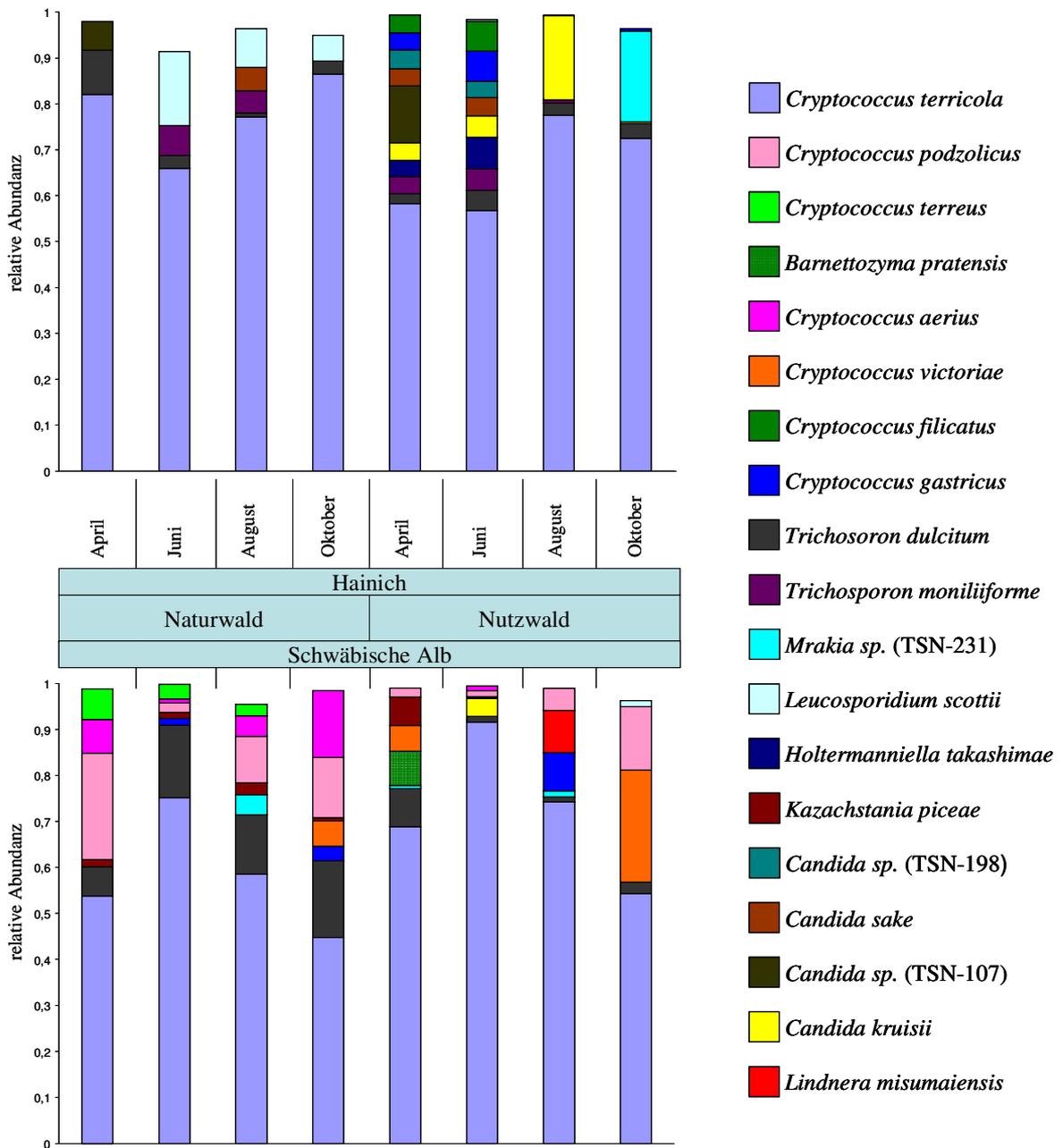


Abbildung 14: Relative Abundanz dominierender Arten

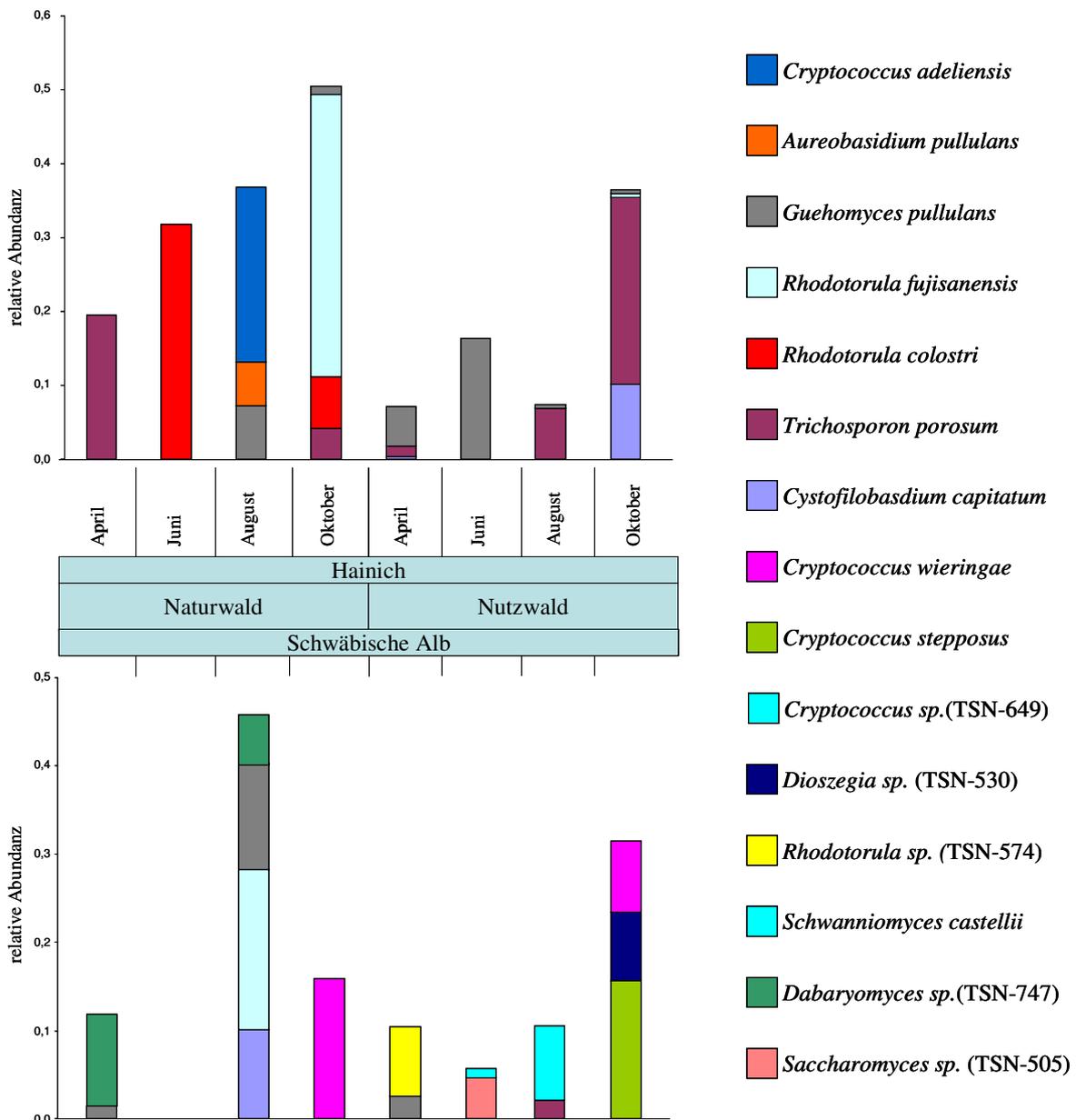


Abbildung 15: Relative Abundanz von Arten unter 5% Anteil an der Gemeinschaftsstruktur

Für die Gemeinschaftsstruktur zeigte sich, dass meist 3-4 Arten über 90% der Gesamtabundanz ausmachen.

Die meist abundante und in allen Proben anzutreffende Art war *Cryptococcus terricola*, mit einem Anteil von 44-91% ist sie zu jeden Zeitpunkt die dominierende Art (Abbildung 14). *Trichosporon dulcitum* war ebenfalls in fast allen Proben anzutreffen, die relative Abundanz schwankt zwischen 1-10% in Hainich, konnte in der Schwäbischen Alb aber auch auf bis zu 16% steigen. Generell war die Abundanz im Naturwald höher als im Nutzwald.

Leucosporidium scottii war im Naturwald in Hainich neben *Cryptococcus terricola* eine häufige Art, in der Schwäbischen Alb lediglich im Oktober und nur in geringer Menge

nachzuweisen. Im Naturwald in der Schwäbischen Alb zeigten dafür *Cryptococcus podzolicus*, *Cryptococcus aerius* und *Cryptococcus terreus* eine ähnlich relative Abundanz. Diese Arten konnten in Hainich nicht nachgewiesen werden.

Einige Arten waren nur wenig abundant aber regelmäßig zu finden, dazu gehörten *Trichosporon porosum* und *Aureobasidium pullulans*. Pigmentierte Hefen aus der Gattung *Rhodotorula* wurden ebenfalls gefunden (Abbildung 15).

Kazachstania piceae war ein in vielen Proben zu findender Ascomycet. Generell dominierten jedoch Basidiomyceten. Die Anzahl an Ascomyceten stieg jedoch in den Nutzwaldproben, vor allem in Hainich, was für *Candida kruisii*, *Candida sake*, *Candida sp.* (TSN-107) und *Barnettozyma pratensis* deutlich zu sehen ist.

Einige Arten wurden lediglich in den Herbstproben nachgewiesen, diese sind *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus stepposus*, *Dioszegia sp.* in der Schwäbischen Alb und *Cryptococcus sp.* (TSN-530) und *Mrakia sp.* (TSN-231) in Hainich.

Als dominante Art trat lediglich *Cryptococcus terricola* auf, gefolgt von den Subdominanten *Trichosporon dulcitum*, *Leucosporidium scottii*, *Cryptococcus podzolicus* und *Cryptococcus aerius*. *Cryptococcus victoriae*, *Candida kruisii*, *Candida sp.* (TSN-107), *Mrakia sp.* (TSN-231) und *Lindnera misumaiensis* gehören ebenfalls zu den subdominanten Arten, traten aber nur zu bestimmten Zeitpunkten auf.

Minora Arten waren *Cryptococcus terreus*, *Cryptococcus filicatus*, *Cryptococcus gastricus*, *Trichosporon moniliforme*, *Barnettozyma pratensis*, *Holtermanniella takashimae*, *Kazachstania piceae*, *Candida sp.* (TSN-198) und *Candida sake*.

Fünfzehn weitere Arten besaßen durchgehend nicht mehr als 5% Anteil an der Gemeinschaftsstruktur.

4 Diskussion

4.1 Vorexperiment

4.1.2 Wahl des Zusatzes zum Medium

Ziel dieses Versuches war es zu testen, ob die Zahl und Diversität an Hefen von der Wahl des Zusatzes zum Medium abhängt. Bei ökologischen Untersuchungen von Hefen aus Umweltproben, die auf Kultivierung ausgelegt sind, ist es generell nötig, dem Medium einen Zusatz zuzugeben, der das Bakterienwachstum unterbindet. Bakterien sind ubiquitär im Boden verbreitet, deshalb können sie auf den Agarplatten ebenfalls wachsen und die Isolation von Hefen stören. Ein weiteres Problem stellen ubiquitäre Schimmelpilze dar, die die Detektion von Hefen aufgrund ihres schnellen Wachstums auf Agarplatten erschweren. Um das Bakterienwachstum zu verhindern, werden dem Medium Antibiotika wie Kanamycin, Chloramphenicol und Oxytetracyclin zugesetzt. Eine Alternative zu Antibiotika soll die Ansäuerung des Mediums durch Zugabe von organischen oder anorganischen Säuren darstellen. Viele Bakterien wachsen nicht bei niedrigem pH-Wert. Pilze und daher auch Hefen tolerieren im Allgemeinen niedrige pH-Werte und sind sogar in sauren Habitaten zu finden (Starmer & Lachance, 2006). Zur Reduzierung von Schimmelpilzen wird dem Medium unter anderem häufig Bengalrosa zugesetzt (Boundy-Mills, 2006; Inacio *et al.*, 2002). Die Methode Bakterien mit Antibiotika und Schimmel mit Bengalrosa zu hemmen, wurde unter anderem von Lachance *et al.* (2001), Rodrigues *et al.* (2001), Rosa *et al.* (2003) und Villa-Carvajal *et al.* (2004) in ökologischen Studien verwendet. Maksimova & Chernov (2004), Golubtsova *et al.* (2007) und Yurkov *et al.* (2011) verwendeten in den Studien zur Diversität von Bodenhefen Medien mit dem Zusatz von Milchsäure.

In der Literatur wird allerdings von Mycocinen berichtet, die von einer Reihe von Hefestämmen, vornehmlich Ascomyceten der Gattung *Candida*, *Wickerhamomyces* und *Barnettozyma*, aber auch von vielen Basidiomyceten gebildet werden können. Diese Mycocine sind Proteine oder Glycoproteine, die gerade bei pH 3-6 aktiviert werden und für andere sensitive Hefe-Stämme toxisch sein können (Vital *et al.*, 2002; Golubev, 2006). Eine besonders hohe Aktivität von Mycocinen bei pH 3-4 wurde von (Kulakovskaya *et al.*,

2010) für *Trichosporon porosum* beschrieben. Diese Art war in der Studie von Yurkov *et al.* (2011) im Boden der Regionen Hainich und der Schwäbischen Alb besonders abundant. Es wurde dadurch zunächst von der Hypothese ausgegangen, dass Lactat indirekt die Diversität der Hefen auf den Platten beeinflusst. Es war daher zu testen, ob ein Antibiotikum wie Kanamycin, das keinen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums hat, lediglich das Bakterienwachstum oder auch das von Hefen hemmt.

Es zeigte sich, dass gerade die Zugabe von Kanamycin neben den Bakterien, auch das Wachstum von den Hefen hemmte. Kanamycin hatte lediglich auf die Entwicklung dimorphischer Pilze der Gattung *Trichosporon* keinen Einfluss. Die Diversität von unterschiedlichen Kolonietypen und die Abundanz von Hefen waren auf den Platten mit dem Zusatz von Milchsäure am größten. Hinweise auf die Aktivität von Mycocinen durch Hemmhöfe oder niedrige Zelldichte konnten nicht festgestellt werden. Das Wachstum von Bakterien wurde durch die Zugabe von Milchsäure erfolgreich gehemmt, nur wenige Kolonien konnten sich entwickeln. Die Zugabe von Bengalrosa hemmte das Wachstum von Schimmelpilzen deutlich. Es erwies sich aber als nicht sinnvoll, da morphologische Merkmale zur Differenzierung von Hefen herangezogen wurden. Die starke farbliche Beeinflussung von Bengalrosa erschwerte es, Unterschiede zwischen Kulturen festzustellen und so möglicherweise pigmentierte Hefen von anderen zu unterscheiden. Dies ist aber besonders wichtig, da es nicht möglich war alle Hefekolonien zu isolieren, sondern es wurden Kolonietypen erfasst und daraus einige Vertreter isoliert.

Die Wirkung anderer Antibiotika im Vergleich zur pH-abhängigen Kontrolle von Bakterienbewuchs konnte nicht getestet werden, jedoch erwies sie sich als effiziente und einfache Methode.

4.1.2 Unterschiedliche Verdünnung der Bodensuspension

Es wurden zwei verschiedene Verdünnungen der Bodensuspension eingesetzt, um erstens eine zusätzliche Reduktion von filamentösen Pilzen zu erwirken und hauptsächlich, um Arten zu detektieren, deren Zelldichte im Boden gering ist. Dadurch sind manche Arten möglicherweise in höheren Verdünnungen nicht zu finden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl detektierter Hefen zwischen der 1:10- und 1:20-Verdünnung, der im Schnitt aber nur 2-3 Kolonien pro Platte bei der 1:10-Verdünnung ausmacht (Abbildung 8). *Cryptococcus podzolicus* konnte nur in der Schwäbischen Alb

nachgewiesen werden (Abbildung 14). Darüber hinaus wurde *Cryptococcus podzolicus* als einzige Art lediglich auf Platten mit 1:20 verdünnter Suspension gefunden. Dies mag aber eher mit der relativ geringen Anzahl von Replikaten zusammenhängen. Die Anzahl der Replikate für Bodenproben und Platten sollte möglichst hoch sein, um den Verlust von Platten durch Schimmelbewuchs in der statistischen Auswertung zu kompensieren.

Die Unterschiede von Plots bezüglich der Gesamtabundanz waren sehr groß, es gab Platten mit 1:10 verdünnter Bodensuspension auf denen bis zu 300 Kolonien wuchsen und andere mit ca. 30. Die Verwendung von unterschiedlichen Verdünnungen ist daher sinnvoll, um die Quantifizierung von Hefen bei sehr hoher oder sehr niedriger Gesamtabundanz praktikabel zu halten. Je mehr Kolonien sich auf einer Platte befinden, desto höher steigt die Wahrscheinlichkeit Kolonien doppelt zu zählen. Darüber hinaus macht eine zu große Koloniedichte die Unterscheidbarkeit verschiedener morphologischer Typen schwierig. Die niedrigen Verdünnungen helfen aber dabei minore Arten zu finden. Insgesamt 6 Arten wurden nur auf Platten mit 1:10-Verdünnung detektiert, darunter *Cryptococcus wieringae*, *Schwanniomyces castellii* und 4 der 8 potentiellen neuen Arten (Tabelle 7). Alle diese Arten waren im analysierten Waldboden sehr rar (Abbildung 15) und wären ohne den Einsatz von niedrigeren Verdünnungen wahrscheinlich nicht entdeckt worden.

Die Wichtigkeit von raren Arten für die Biodiversität von Hefen in unbewirtschafteten Wäldern wurde kürzlich gezeigt. Die Kombination verschiedener Verdünnungen von Bodensuspensionen gewährt einen besseren Überblick über die Gesamtheit der Bodenhefen (Yurkov *et al.*, PLoS 2011).

4.2 Abundanz

Die Gesamtabundanz von Hefen im Buchenwald innerhalb dieser Studie (Tabelle 5) und der von Jensen (1963) und Yurkov *et al.*, (2011) unterschied sich nicht von anderen für Laubwälder (di Menna, 1957; Slavikova & Vadkertiova, 2003) und Koniferenwälder (Golovchenko *et al.*, 1999; Maksimova & Chernov, 2004) bekannten. Die Abundanz einzelner Plots ist jedoch sehr divers und kann mehrere Zehnerpotenzen ausmachen. Zum selben Schluss kam bereits die Studie von Yurkov *et al.* (2011), die ebenfalls die Regionen Hainich und Schwäbische Alb untersuchte und Bodenproben aus dem April 2008 zur Grundlage hat. Die deutlichen Unterschiede in der Gesamtabundanz von Hefen zwischen

den beiden Regionen welche in dieser Studie signifikant waren (Abbildung 10), werden durch Yurkov *et al.* (2011) nicht bestätigt. Das impliziert, dass von Jahr zu Jahr möglicherweise auch größere Schwankungen in der Gesamtabundanz der Hefegemeinschaft auftreten können. Deak (2006) stellt dar, dass Temperatur und Feuchtigkeit das Wachstum von Hefen aber auch von Bakterien und anderen Pilzen beeinflusst. Die Tagesmittelwerte für Temperatur und Niederschlag in Deutschland waren zum Beispiel im April 2008, 7,6°C und 80mm/m². Im April 2009 waren es 11,8°C und 30mm/m² (Deutscher Wetterdienst, 2011). Der April 2008 war demnach etwas kälter und feuchter als 2009. Die Aktivität von Hefen wird nicht nur von Temperatur und Feuchtigkeit beeinflusst, sondern auch von Nährstoffen die aus den Aktivitäten von Pflanzen, Bakterien und anderen Pilzen stammen (siehe 1.3). Diese werden ebenfalls unter anderem durch Temperatur und Feuchtigkeit beeinflusst. Die klimatischen Schwankungen sind vermutlich für die beobachteten Unterschiede in die Abundanz von Hefen verantwortlich. Das Regionalklima und die geographische Lage sind ebenfalls Faktoren, die zu berücksichtigen sind.

4.3 Diversität

Insgesamt 34 Arten wurden aus den Bodenproben isoliert davon werden 10 als bodenassoziiert betrachtet. Dazu gehören die Basidiomyceten *Cryptococcus terricola*, *Cryptococcus aerius*, *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus terreus*, *Cryptococcus podzolicus*, *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium capitatum* *Leucosporidium scottii* und der Ascomycet *Barnettozyma pratensis* (Vishniac, 2006; Botha, 2006). *Kazachstania piceae* war in der Schwäbischen Alb regelmäßig abundant, und wurde von Yurkov *et al.* (2011) auch in Hainich nachgewiesen. Wuczkowski & Prillinger (2004) isolierten diese Art in Österreich. *Kazachstania piceae* wurde im Zusammenhang mit der Rhizosphäre von Nadelbäumen beschrieben, das Vorkommen in Laubwäldern ist nicht geklärt aber es wird vermutet, dass diese Art weiter verbreitet ist als bisher angenommen (Yurkov *et al.*, 2011). Einige pigmentierte Hefen wurden in Übereinstimmung mit anderen Studien (Slavikova & Vadkertiova, 2003; Wuczkowski & Prillinger, 2004; Yurkov *et al.*, 2011) ebenfalls im Boden gefunden, darunter *Cryptococcus victoriae* und *Rhodotorula colostri*. Auch nichtpigmentierte Arten, die in dieser Untersuchung isoliert wurden, werden sowohl in

Beziehung mit Boden als auch mit Phyllosphäre genannt, darunter *Leucosporidium scottii*, *Debaryomyces hansenii*, *Cystofilobasidium capitatum* und *Aureobasidium pullulans* (Botha, 2006; Fonseca & Inácio, 2006).

Generell sind Basidiomyceten die dominierende Gruppe der Pilze im Boden, über 50% der Arten gehören zu den Tremellomycetes innerhalb der Agaricomycotina (Tabelle 6). Zu dieser Unterabteilung gehören auch die Pilze, die echte Fruchtkörper ausbilden, wie zum Beispiel *Tremella* und *Holtermannia*. Die Dominanz von Basidiomyceten wurde durch mehrere Studien belegt (Yurkov *et al.*, 2011; Wuczkowski & Prillinger, 2004; Maksimova & Chernov, 2004; Slavikova & Vadkertiova, 2000). *Trichosporon dulcitum*, *Trichosporon porosum* und *Trichosporon moniliiforme*, Arten aus der Ordnung Trichosporonales, dimorphische Pilze, die Hyphen bilden, waren im Boden in Hainich oder der Schwäbischen Alb regelmäßig abundant. In einer aktuellen Studie wurden *Trichosporon porosum* und *Trichosporon moniliiforme* auf Nadelstreu isoliert, *Rhodotorula colostri* wird in diesem Zusammenhang ebenfalls genannt (Golubev & Tomashevskaya, 2010). Durch die Fähigkeit, niedrige pH-Werte zu tolerieren und phenolische Komponenten verwerten zu können, werden sie mit dem Abbau von Nadelstreu in Zusammenhang gebracht (Golubev & Tomashevskaya, 2010). Die Tatsache, dass diese Arten ebenfalls in europäischen Buchenwäldern vorkommen, lässt vermuten, dass ihre ökologische Nische größer ist und sie generell mit Wäldern assoziiert sind.

Trichosporon dulcitum wurde im Boden innerhalb Europas von Wuczkowski & Prillinger (2004) und Yurkov *et al.* (2011) und ebenfalls in den USA von Vishniac (2006) gefunden. Klaubauf *et al.* (2010) detektierte ebenfalls *Trichosporon dulcitum* in einer kultivierungs-unabhängigen Studie in Österreich und Lynch & Thorn (2006) in den USA. Das impliziert, dass diese Arten, neben *Cryptococcus terricola* und anderen, die weltweit aus dem Boden isoliert wurden, kosmopolitische Pedobionten sind (Yurkov *et al.*, 2011).

Einige Arten zeigten deutliche jahreszeitliche Trends und waren meist nur zu bestimmten Zeitpunkten im Jahr im Boden zu finden (Abbildung 14 u. 15). *Saccharomyces sp.* (TSN-505) wurde nur im Juni, *Aureobasidium pullulans* nur im August, *Rhodotorula fujisanensis* im August und Oktober nachgewiesen. *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus stepposus*, *Cryptococcus victoriae*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Dioszegia sp.* (TSN-530) und *Mrakia sp.* (TSN-231) traten zum Ende der Vegetationsperiode auf.

Die Gattung *Saccharomyces* ist häufig mit zuckerreichen Früchten assoziiert. Der Nachweis im Boden ist dadurch unklar, keine der europäischen Studien isolierte *Saccharomyces* im Waldboden (Slavikova & Vadkertiova, 2000; Wuczkowski &

Prillinger, 2004; Yurkov *et al.*, 2011). Jedoch wurden zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces paradoxus* in Eichen-Naturwäldern in Pennsylvania (USA) nachgewiesen. Dort wurden sie auf Borke und im Boden nahe von Eichen gefunden (Naumov, 1998; Sniegowski *et al.*, 2002). Sampaio & Goncalves (2008) fanden *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces kudriavzevii* und *Saccharomyces uvarum* auf der Oberfläche von Eichen-Borke in Portugal. Glushakova *et al.* (2007) isolierten *Saccharomyces paradoxus* von lebenden und faulenden Blättern aus Wäldern in der Umgebung von Moskau. Sie vermuteten, dass diese Art einen festen Platz in der Sukzession phylloplaner Hefen einnimmt, da diese Art besonders im Frühjahr zur Zeit der Blattentwicklung und im Herbst auf verfaulenden Blättern und Blattstreu abundant war. Arten der Gattung *Saccharomyces* wachsen bei hohen Temperaturen (Kurtmann *et al.*, 2011). Das erklärt das Auffinden von *Saccharomyces sp.* (TSN-505) im Sommer. Die Gattung *Saccharomyces* scheint auch in Buchenwäldern als phylloplane Hefen vorzukommen.

Aureobasidium pullulans, *Rhodotorula fujisanensis*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus stepposus*, *Cryptococcus victoriae* und *Cystofilobasidium capitatum* sind mit der Phyllosphäre assoziiert und gelangen vermutlich mit Pflanzenteilen auf den Boden. Von dort werden sie mit dem Regen in den Boden gespült und können im Boden einige Zeit überdauern (Fonseca & Inácio, 2006).

Mrakia sp. (TSN-231) war im Nutzwald in Hainich besonders im Oktober abundant, *Dioszegia sp.* (TSN-530) kam in der Region Schwäbische Alb nur im Oktober vor. Die Gattung *Mrakia* wurde von (Yamada & Komagata, 1987) begründet. Acht Arten sind bisher beschrieben. Sie wurden alle in kalten Klimaten gefunden, z.B. in Sedimenten in den Vestfoldbergen innerhalb der Antarktis (Thomas-Hall *et al.*, 2010), in Böden in Zentralrussland (Maksimova & Chernov, 2004) und in Gletschereis und Schmelzwasser in den Alpen (Turchetti *et al.*, 2008; Thomas-Hall *et al.*, 2010). Allen ist gemein, dass sie als psychrophil gelten, da ihre optimale Wachstumstemperatur zwischen 12-15°C liegt und sie nicht in der Lage sind, bei Temperaturen über 20°C zu wachsen. Eine Ausnahme bildet *Mrakia curviuscula*, deren Zugehörigkeit zur Gattung *Mrakia* aber umstritten ist (Thomas-Hall *et al.*, 2010).

Zur monophyletischen Gattung *Dioszegia* gehören auch psychrophile Arten wie *Dioszegia antarctica* und *Dioszegia cryoxerica* (Connell *et al.*, 2010), die die nächste verwandte Art zu *Dioszegia sp.* (TSN-530) darstellt. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt ebenfalls, wie bei *Mrakia spp.*, unter 20°C.

Auch diese Arten wurden von Connell *et al.* (2008) aus Antarktis-Sedimenten aus Süd-Victoria-Land isoliert. Süd-Victoria-Land und die Vestfoldberge gehören mit zu den extremsten Orten der Erde, beide sind sehr kalt und trocken. Zur Gattung *Dioszegia* gehören aber nicht ausschließlich psychrophile Arten, sondern auch sehr viele Vertreter der Phyllosphäre, die in gemäßigten Klimaten vorkommen (Inacio *et al.*, 2005).

Dass *Mrakia sp.* (TSN-231) und *Dioszegia sp.* (TSN-530) nur zum Ende der Vegetationsperiode vorkommen, wenn die Temperaturen deutlich sinken, lässt darauf schließen, dass die Vertreter dieser Gattungen besser bei kälteren Temperaturen wachsen. Die Klimate in Mitteleuropa sind aber nicht so extrem wie in der Antarktis und in Gletschern. Daher kann nicht von obligaten psychrophilen gesprochen werden. *Mrakia spp.* wurde bisher noch nicht in Böden in Mitteleuropa gefunden. Die Vermutung liegt jedoch nun nahe, dass diese Gattung nicht nur in extremen Habitaten gefunden werden kann, sondern auch in europäischen Wäldern verbreitet ist. Die Beobachtungen stellen ein Beispiel für die natürliche Sukzession von Hefen im Waldboden dar. Die saisonalen Veränderungen korrelieren mit den ökologischen Präferenzen der einzelnen Arten wie zum Beispiel den Wachstumstemperaturen.

4.4 Verteilung von Hefen im Boden: Regionale Effekte

Viele Studien belegen, dass sich Hefen im Boden sehr unterschiedlich verteilen und manche Arten nur an einer bestimmten Stelle gefunden werden oder sich die Gesamtabundanz von einer Bodenprobe zur anderen, sogar innerhalb derselben Region deutlich unterscheiden kann.

Lediglich 11 Arten wurden gemeinsam in beiden untersuchten Regionen gefunden. Dennoch zeigt sich, dass sich darunter auch Kosmopoliten wie *Cryptococcus terricola* und *Trichosporon dulcitum* befanden, deren Verteilung sehr gleichmäßig verläuft (Abbildung 14). Insgesamt 8 Arten die Yurkov *et al.* (2011) in denselben Regionen im Frühjahr 2008 isolierten, sind in Bodenproben zum gleichen Zeitpunkt ein Jahr später nicht gefunden worden. Darunter befinden sich 2 neue Arten der Gattung *Rhodotorula*, die Basidiomyceten *Cryptococcus ramirezgomezianus* und *Cystofilobasidium macerans* und die Acomyceten *Barnettozyma vustinii*, *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* und *Candida vartiovaarae*. Ebenso sind 2 Arten in dieser Untersuchung isoliert worden, die im April

2008 nicht detektiert wurden. Dies sind *Candida sp* (TSN-107) und *Debaryomyces sp.* (TSN-747), 2 potentiell neue Arten. Der Großteil dieser Arten war in beiden Studien im Boden selten, ihr Anteil an der Gemeinschaftsstruktur lag meist unter 5%.

Der überregionale Vergleich zeigt ebenfalls, dass zum Beispiel Wuczowski & Prillinger (2004) und Slavikova & Vadkertiova (2000) im Waldboden Arten isoliert haben, die in anderen Studien nicht gefunden wurden. Auffällig ist, dass dies auch meist minore Arten sind. Übereinstimmungen gibt es bei den bereits diskutierten Kosmopoliten, diese werden regelmäßig gefunden. Die Verteilung der übrigen Arten scheint mit Faktoren zusammenzuhängen, die sich von einer Sammelstelle zur anderen stark unterscheiden und zu einer Aggregation der Gemeinschaft an bestimmten Stellen führen. Ein elementarer Faktor kann die organische Substanz sein, die in Wäldern nicht gleichmäßig verteilt ist und sich zum Beispiel auch im Natur- und Nutzwald unterscheiden kann. Genauso können sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften räumlich ebenfalls unterscheiden (Saetre & Baath, 2000), was zu einer Vielzahl von Mikrohabitaten innerhalb eines begrenzten Raumes führt (Ettema & Wardle, 2002). Dies deckt sich mit den Ergebnissen, dass die Gesamtabundanz an einzelnen Stellen sehr hoch sein kann, an anderen sehr niedrig und einige Probestellen größere Artenvielfalt aufweisen als andere, wo lediglich eine Art vorkommt. Verschiedene Regionen können vermutlich sehr viele unterschiedliche Nischen für minore Arten aufweisen. Die Beprobungsstelle und der Zeitpunkt können ebenfalls großen Einfluss auf die Diversität haben, die sich aus den Bodenproben darstellt. Insgesamt 11 Arten die zu den Zeitpunkten Juni, August und Oktober isoliert wurden, wurden im April 2008 von Yurkov *et al.* (2011) nicht gefunden. Darunter befinden sich *Leucosporidium scottii* und *Mrakia sp.* (TSN-231), diese Arten waren im April nicht zu finden, zu den anderen Zeitpunkten aber teilweise mit 10% deutlich abundant (Abbildung 14). Einen großen Teil machen wieder minore Arten aus, die darüber hinaus nur zu einem bestimmten Zeitpunkt isoliert wurden. Zum Beispiel *Cryptococcus adeliensis* im August, *Rhodotorula fujisanensis* und *Cryptococcus stepposus* im Oktober (Abbildung 15).

Ein Problem besteht darin, dass möglicherweise eine zu kleine Menge an Boden analysiert wird. Dies kann dazu führen, dass Arten, die nur eine geringe Abundanz besitzen nicht gefunden werden. Der Vorteil einer kultivierungs-gestützten Untersuchung ist dabei, dass die Menge an Boden, die pro Einzelprobe analysiert werden kann, mit 3-7 g ein Vielfaches größer ist, als bei Direkt-DNA-Methoden. Mit Direkt-DNA-Methoden ist nur möglich etwa 0,5-1g Boden auf einmal zu analysieren (Buee *et al.*, 2009; Klaubauf *et al.*, 2010). Obwohl die Diversität von Pilzen, die mit dieser Methode aufgedeckt wird sehr

groß sein kann, steigt die Wahrscheinlichkeit auf Artefakte zu stoßen, die die Gemeinschaftsstruktur nicht realistisch wiedergeben. Eine großflächige und umfangreiche Beprobung ist in jedem Fall sehr wichtig, um nicht nur qualitative Aussagen über die Anwesenheit bestimmter Arten im Boden an einer bestimmten Stelle treffen zu können, sondern auch quantitative Aussagen und so die Möglichkeit des Vergleichs von Habitaten, Biotopen, Regionen und Biomen zu schaffen.

4.5 Effekte durch Landnutzung

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Gesamtabundanz in Abhängigkeit zur Landnutzung festgestellt werden. Die Unterschiede die sich ergaben, waren regionaler Natur. In Ansätzen konnte die saisonale Dynamik der Hefengemeinschaft die Golubtsova *et al.* (2007) in der Rhizosphäre von *Ajuga reptans* und *Taraxacum officinale* beobachteten nachvollzogen werden (Abbildung 10). Sie zeigten, dass die Abundanz von Hefen über die Vegetationsperiode stieg und zum Ende hin wieder sank. Sie vermuteten einen Zusammenhang mit der Struktur und Zusammensetzung von Exudaten der Pflanzenwurzeln. Kuzyakov (2010) zeigte, dass ein großer Einfluss von Wurzelexudaten auf die gesamte mikrobielle Gemeinschaft und die Mineralisation von organischem Material im Boden besteht.

Die Unterschiede der Gesamtabundanz zu den vier Zeitpunkten waren jedoch nicht signifikant, sondern folgten lediglich einem Trend. Dieser Trend schien in den Naturwäldern von Hainich und der Schwäbischen Alb gleichmäßiger zu sein als in den Nutzwäldern (Abbildung 10).

Auffällig ist, dass sich die Gemeinschaftsstrukturen im Naturwald zwischen den Regionen unterscheiden, jedoch innerhalb einer Region sehr ähnlich sind. Sie zeigen zwar über die Vegetationsperiode Veränderungen in der Abundanz von Arten, jedoch bilden immer dieselben Arten den Großteil der Gemeinschaft. Im Nutzwald zeigt sich ein heterogenes Bild, *Cryptococcus terricola* ist zwar auch hier die dominierende Art und auch *Trichosporon dulcimum* ist regelmäßig zu finden, jedoch treten zu jedem Zeitpunkt mit Ausnahme von April und Juni in Hainich, wo sich die Gemeinschaftsstrukturen sehr ähnlich sind, immer neue subdominante Arten auf (Abbildung 14 und 15). Bestimmte Arten zeigten eine ausgesprochene Präferenz für einen Nutzungstyp. *Leucosporidium*

scottii war in Hainich im Naturwald eine subdominante Art. Sie konnte im Nutzwald aber nicht mehr nachgewiesen werden. *Cryptococcus terreus* kam in der Schwäbischen Alb nur im Naturwald vor. Die Abundanz von *Cryptococcus podzolicus* nahm im Nutzwald über die Vegetationsperiode stark ab.

In beiden Regionen stieg im Nutzwald die Diversität von Ascomyceten, besonders deutlich war dies in Hainich zu Beginn der Vegetationsperiode. Das Vorkommen der Ascomyceten *Candida kruisii* und *Barnettozyma pratensis* war auf den Nutzwald beschränkt.

Der Anteil von Ascomyceten im Nutzwald ist signifikant höher als im Naturwald (Abbildung 13). Bereits Yurkov *et al.* (2011) kamen zu diesem Ergebnis und vermuten, dass die Störung des Ökosystems durch regelmäßige Abholzung zu einer Nischen-Fragmentierung führt, die Ascomyceten fördert, die normalerweise in der Klimax-Gesellschaft nicht konkurrenzfähig sind. Durch Veränderungen des Nährstoffgleichgewichts durch die Landnutzung (Madou & Haynes, 2006) scheinen für diese Ascomyceten verwertbare Nährstoffe zu entstehen. Das heißt, im Nutzwald entstehen Nischen, die Ascomyceten, die im Allgemeinen nicht mit dem Waldboden als Habitat assoziiert sind, nutzen können. Diese Nischen sind im Naturwald nicht vorhanden.

In der Schwäbischen Alb und in Hainich kommen zwei verschiedene Gesellschaften von Ascomyceten vor. Zu den jeweiligen Zeitpunkten sind jeweils andere Arten maßgeblich an der Gesellschaft der Ascomyceten beteiligt. Dies könnte mit wechselnden Bedingungen der Nährstoffverfügbarkeit im Jahresverlauf zusammenhängen und einem sukzessiven Trend folgen, der sich über die Vegetationsperiode ergibt.

Die Abundanz der Ascomyceten zeigt im April und August ihr Maximum. In Hainich bildeten im April *Candida kruisii*, *Candida sake*, *Candida sp.* (TSN-107) und *Candida sp.* (TSN-198) die Gemeinschaftsstruktur der Ascomyceten. Im August dominierte nur *Candida kruisii*. In der Schwäbischen Alb waren es im April *Kazachstania piceae* und *Barnettozyma pratensis* und im August *Lindnera misumaiensis*.

Der Einfluss von Landnutzung auf die Diversität von Hefen ist deutlich. Sie verändert nicht die Abundanz von Hefen im Boden, aber deren Artenzusammensetzung. Zum Beispiel ist die Abundanz der Ascomyceten im Nutzwald wesentlich höher als im Naturwald. Die Störung durch Forstwirtschaft lässt neue Nischen für Arten entstehen, die im Naturwald in der Regel nicht zu finden sind. Wiederum sind bestimmte Arten nur im Naturwald zu finden und im Nutzwald nicht mehr nachzuweisen, da sie vermutlich Spezialisten darstellen, die auf die Nährstoffkreisläufe im Waldboden angewiesen sind, die nur in unbewirtschafteten Wäldern ablaufen.

5. Zusammenfassung

Die Diversität bodenassoziierter Hefen im Buchen-Natur- und Nutzwald wurde für die beiden Regionen, den Nationalpark Hainich in Thüringen und das Biosphärengebiet Schwäbische Alb in Baden-Württemberg, untersucht. Diese beiden Regionen sind durch die UNESCO als Weltnaturerbe geschützt. Aus 47 Bodenproben von vier verschiedenen Zeitpunkten wurden insgesamt 760 Hefe-Kulturen isoliert. Zwei verschiedene antibiotische Zusätze und Verdünnungen wurden auf Unterschiede in der Effizienz untersucht, die Diversität von Hefen optimal zu wiederzugeben.

Insgesamt 34 verschiedene Hefepilze, darunter auch einige potentielle neue Arten, wurden molekular identifiziert. Die Gesamtabundanz im Boden lag bei 10^3 - 10^4 Zellen pro Gramm Boden. Die Anzahl von Hefen im Boden war im Schnitt in Hainich dreimal so hoch wie in der Schwäbischen Alb.

Auf der Grundlage der quantifizierten Hefen und der identifizierten Arten wurden die Gemeinschaftsstrukturen für die beiden Regionen, für die Nutzungstypen und für die vier Zeitpunkte rekonstruiert und statistisch ausgewertet. Die dominanten Arten im Waldboden waren *Cryptococcus terricola* und *Trichosporon dulcitum*, diese waren in beiden Regionen regelmäßig zu finden. Die Gemeinschaftsstrukturen sind für die beiden Regionen sehr heterogen, lediglich 11 Arten wurden in beiden Regionen gleichzeitig gefunden. Das Auffinden bestimmter Arten hängt stark von der Region, dem Zeitpunkt und dem Wald-Nutzungsgrad ab. Die Variationen in der Gemeinschaftsstruktur im Boden können innerhalb einer Region aber auch sehr groß sein, besonders betrifft dies minore Arten. Diese Arten treten äußerst punktuell auf. Dennoch konnte ein sukzessiver Trend der Gemeinschaft im Jahresverlauf beobachtet werden. Einige Arten sind nur zu bestimmten Zeitpunkten im Jahr aufzufinden, darunter vor allem Hefen die mit der Phyllosphäre assoziiert sind und hauptsächlich im Spätsommer und Herbst im Boden gefunden werden. Sie sind häufig auf der Oberfläche von Blättern anzutreffen und gelangen mit fortschreitender Blattsukzession auf den Boden. Zum Ende der Vegetationsperiode wurden Arten im Boden gefunden, deren nächste Verwandte als obligat psychrophil gelten und aus bodenähnlichen Substraten teilweise in extrem kalten Regionen isoliert wurden.

Es wurde festgestellt, dass sich die Landnutzung nicht auf die Gesamtabundanz von Hefen auswirkt, sie verändert aber die Gemeinschaftsstruktur. Ein großer Einfluss besteht auf die Abundanz von Ascomyceten, die im Nutzwald deutlich höher ist als im Naturwald. Ein Maximum zeigt sich im Frühling und Sommer, die Artenzusammensetzung ändert sich jedoch über die Vegetationsperiode stetig. Diese Effekte entstehen vermutlich durch Nischenfragmentierung und veränderte Nährstoffkreisläufe durch die Bewirtschaftung. Dadurch werden andere Arten gefördert, die normalerweise in der Klimaxgesellschaft im Naturwald nicht zu finden wären, da sie nicht die erforderlichen Anpassungen an dieses Habitat besitzen.

6. Literaturverzeichnis

- Aime M. C., Matheny P. B., Henk D. A., Frieders E. M., Nilsson R. H., Piepenbring M., Mclaughlin D. J., Szabo L. J., Begerow D., Sampaio J. P., Bauer R., Weiss M., Oberwinkler F., and Hibbett D. (2006), An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia* 98, 896–905.
- Bab'eva I. P. and Chernov I. Y. (1997), *Geographical aspects of yeast ecology*. Routledge.
- Barnett J. A. (2004), A history of research on yeasts 7 enzymic adaptation and regulation. *Yeast* 21, 703–746.
- Barnett J. A. (2004), A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* 21, 1141–1194.
- Begerow D., Nilsson H., Unterseher M., and Maier W. (2010), Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 99–108.
- Begerow D., Stoll M., and Bauer R. (2006), A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98, 906–916.
- Botha A. (2006), Yeasts in Soil. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Botha A. (2011), The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1–8.
- Boundy-Mills K. (2006), Methods for Investigating Yeast Biodiversity. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bouthilet R. J. (1950), A taxonomik study of soil yeasts. *Mycologia* 6, 79–85.
- Brockhoff E. G., Jactel H., Parrotta J. A., Quine C. P., and Sayer J. (2008), Plantation forests and biodiversity: oxymoron or opportunity? *Biodiversity and Conservation* 17, 925–951.
- Brysch-Herzberg M. (2004), Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology* 50, 87–100.
- Buee M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R. H., Uroz S., and Martin F. (2009), 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184, 449–456.
- Chester C. R., Jr. (2011), Yeasts Pathogenic to Humans. In: *The Yeasts. A Taxonomik Study*, 5. Edition (Kurtmann C. P., Fell J. W., and Boekout T., eds.). Elsevier Science BV.

- Christensen M. (1989), A View of Fungal Ecology. *Mycologia* 81, 1–19.
- Cloete K. J., Valentine A. J., Stander M. A., Blomerus L. M., and Botha A. (2009), Evidence of Symbiosis Between the Soil Yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous Medicinal Shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. *Microbial Ecology* 57, 624–632.
- Connell L., Redman R., Craig S., Scorzetti G., Iszard M., and Rodriguez R. (2008), Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology* 56, 448–459.
- Connell L. B., Redman R., Rodriguez R., Barrett A., Iszard M., and Fonseca A. (2010), *Dioszegia antarctica* sp nov and *Dioszegia cryoxerica* sp nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1466–1472.
- Deak T. (2006), Environmental Factors Influencing Yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Deutscher Wetterdienst (2011). www.dwd.de. (3.08.2011)
- Deutsche UNESCO-Kommission e. V. (2011). http://www.unesco.de/deutsche_biosphaerenreservate.html (3.8.2011).
- di Menna M. E. (1957), The Isolation of Yeasts from Soil. *Journal of General Microbiology* 17, 678–688.
- di Menna M. E. (1959), Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats. *Journal of General Microbiology* 20, 13–23.
- di Menna M. E. (1960), Yeasts from soils under forest and under pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 3, 623–632.
- di Menna M. E. (1965), Yeasts in New Zealand Soils. *New Zealand Journal of Botany* 3, 194–203.
- Ettema C. H. and Wardle D. A. (2002), Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 17, 177–183.
- European Commission Environment (2010), Soil biodiversity. functions, threats and tools for policy makers.
- Exploratorien zur funktionellen Biodiversitätsforschung (2011). www.biodiversity-exploratories.de. (3.08.2011)
- Fell J. W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., and Statzell-Tallman A. (2000), Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1351–1371.

- Fierer N., Breitbart M., Nulton J., Salamon P., Lozupone C., Jones R., Robeson M., Edwards R. A., Felts B., Rayhawk S., Knight R., Rohwer F., and Jackson R. B. (2007), Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and environmental microbiology* 73, 7059–7066.
- Fischer M., Bossdorf O., Gockel S., Hänsel F., Hemp A., Hessenmöller D., Korte G., Nieschulze J., Pfeiffer S., Prati D., Renner S., Schöning I., Schumacher U., Wells K., Buscot F., Kalko E. K., Linsenmair K. E., Schulze E.-D., and Weisser W. W. (2010), Implementing large-scale and long-terms functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories. *Basic and Applied Ecology*, 473–485.
- Fonseca A. and Inácio J. (2006), Phylloplane Yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011), www.FAO.org.
- Gadanho M., Almeida J., and Sampaio J. P. (2003), Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 84, 217–227.
- Gadanho M. and Sampaio J. P. (2002), Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*. *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research* 2, 47–58.
- Gardes M. and Bruns T. D. (1993), ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes. Application to the identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118.
- Garner C. D., Starr J. K., McDonough P. L., and Altier C. (2010), Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 Region of the Large Ribosomal Subunit. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2140–2146.
- Glushakova A. M., Ivannikova Y. V., Naumova E. S., Chernov I. Y., and Naumov G. I. (2007), Massive isolation and identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant phyllosphere. *Microbiology* 76, 205–210.
- Golovchenko A. V., Dobrovol'skaya T. G., Maksimova I. A., Terekhova V. A., Zvyagintsev D. G., and Trofimov S. Y. (2000), Structure and Role of Microbial Communities in Southern Taiga Soils. *Microbiology* 69, 371–380.
- Golubev W. I. (2006), Antagonistic Interactions Among Yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 197–219.
- Golubev W. I. and Tomashevskaya M. A. (2010), Yeast fungi in *Picea abies* (L.) Karst. needle litter. *Microbiology* 79, 385–389.

- Golubtsova Y. V., Glushakova A. M., and Chernov I. Y. (2007), The Seasonal Dynamic of Yeast Communities in the Rhizosphere of Soddy-Podzolic Soils. *Eurasian Soil Science* 40, 875–879.
- Grossman, M. (2011). <http://weltnaturerbe-buchenwaelder.de> (3.8.2011).
- Hagvar S. (1998), The relevance of the Rio-Convention on biodiversity to conserving the biodiversity of soils. *Applied Soil Ecology* 9, 1–7.
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P. M., Luecking R., Lumbsch H. T., Lutzoni F., Matheny P. B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Stalpers J. A., Vilgalys R., Aime M. C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G. L., Castlebury L. A., Crous P. W., Dai Y.-C., Gams W., Geiser D. M., Griffith G. W., Gueidan C., Hawksworth D. L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R. A., Hyde K. D., Ironside J. E., Koljalg U., Kurtzman C. P., Larsson K.-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J.-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J. D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schuessler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M. M., Winka K., Yao Y.-J., and Zhang N. (2007), A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111, 509–547.
- Inacio J., Pereira P., Carvalho M. de, Fonseca A., Amaral-Collaco M. T., and Spencer-Martins I. (2002), Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44, 344–353.
- Inacio J., Portugal L., Spencer-Martins I., and Fonseca A. (2005), Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Research* 5, 1167–1183.
- Inacio J., Rodrigues M. G., Sobral P., and Fonseca Á. (2004), Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. *FEMS Yeast Research* 4, 541–555.
- Inácio J. and Fonseca Á. (2004), Reinstatement of *Rhodotorula colostri* (Castelli) Lodder and *Rhodotorula crocea* Shifrine & Phaff, former synonyms of *Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder. *FEMS Yeast Research*, 557–561.
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. (1990), PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, London, Boston.
- Jensen V. (1963), Studies on the microflora of Danish beech forest soils. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitologie, Infektionskrankheiten und Hygiene* 117, 41–65.
- Klaubauf S., Inselsbacher E., Zechmeister-Boltenstern S., Wanek W., Gottsberger R., Strauss J., and Gorfer M. (2010), Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Diversity* 44, 65–75.
- Knapp H. (2008), Bonner Thesen zum „Naturerbe Buchenwälder“.

- Kulakovskaya T. V., Golubev W. I., Tomashevskaya M. A., Kulakovskaya E. V., Shashkov A. S., Grachev A. A., Chizhov A. S., and Nifantiev N. E. (2010), Production of Antifungal Cellobiose Lipids by *Trichosporon porosum*. *Mycopathologia* 169, 117–123.
- Kurtmann C. P., Fell J. W., Boekhout T., eds. (2011), *The Yeasts. A Taxonomik Study*. Elsevier Science BV.
- Kurtzman C. P. and Robnett C. J. (1998), Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 73, 331–371.
- Kurtzman C. P. and Fell J. W. (2006), *Yeast Systematics and Phylogeny. Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology*. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kurtzman C. P., Fell J. W., and Boekhout T. (2006), Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kuzyakov Y. (2010), Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371.
- Lachance M.-A. (2006), Yeast Biodiversity: How Many and How Much? In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Lachance M.-A., Klemens J. A., Bowles J. M., and Janzen D. H. (2001), The yeast community of sap fluxes of Costa Rican *Maclura (Chlorophora) tinctoria* and description of two new yeast species, *Candida galis* and *Candida ortonii*. *FEMS Yeast Research* 1, 87–92.
- Landesamt für Natur U. u. V. N. (2011), LANUV-Fachbericht 27.
- LaRue T. A. and Spencer J. F. (1967), Utilization of D-Amino acids by yeasts. *Canadian Journal of Microbiology* 13, 777-&.
- LaRue T. A. and Spencer J. F. (1967), Utilization of Imidazoles by yeasts. *Canadian Journal of Microbiology* 13, 789-&.
- Lim Y. W., Kim B. K., Kim C., Jung H. S., Kim B.-S., Lee J.-H., and Chun J. (2010), Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *The Journal of Microbiology* 48, 284–289.
- Looser R. (2003), *Statistische Messdatenauswertung. Praktische Einführung in die Auswertung von Messdaten mit Excel und spezifischer Statistik-Software für naturwissenschaftlich und technisch orientierte Anwender*. Franzis Verlag GmbH, Poing.
- Lynch M. D. J. and Thorn R. G. (2006), Diversity of Basidiomycetes in Michigan Agricultural Soils. *Applied and environmental microbiology* 72, 7050–7056.

- Maksimova I. A. and Chernov I. Y. (2004), Community Structure of Yeast Fungi in Forest Biogeocenoses. *Microbiology* 73, 474–481.
- Melen G. J., Pesce C. G., Rossi M. S., and Kornblihtt A. R. (1999), Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: tissue-specific elimination of an `intron' bearing a hidden break site. *The EMBO Journal* 18, 3107–3118.
- Men'ko E. V., Chernov I. Y., and Byzov B. A. (2006), Interrelationships between yeast fungi and collembolans in soil. *Microbiology* 75, 708–715.
- Meyer W. (1995), Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences Strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis* 16, 1648.
- Middelhoven W. J. (1993), Catabolism of Benzene compounds by Ascomycetous and Basidiomycetous yeasts and yeast-like Funig – A Literatur-Review and an experimental approach. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 63, 125–144.
- Mitchell T. G., Sandin R. L., Bowman B. H., Meyer W., and Merz W. G. (1994), Molecular mycology – DNA probes and applications of PCR technology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 32, 351–366.
- Naumov G. I. (1998), *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1045–1050.
- O'Donnell K. (1993), *Fusarium* and its near relatives. In: *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (Reynolds and Taylor J. W., eds.). CAB International, pp. 225–233.
- Paillet Y., Berges L., Hjaltén J., Odor P., Avon C., Bernhardt-Roemermann M., Bijlsma R.-J., Bruyn L. de, Fuhr M., Grandin U., Kanka R., Lundin L., Luque S., Magura T., Matesanz S., Meszaros I., Teresa Sebastia M., Schmidt W., Standovar T., Tothmeresz B., Uotila A., Valladares F., Vellak K., and Virtanen R. (2010), Biodiversity Differences between Managed and Unmanaged Forests: Meta-Analysis of Species Richness in Europe. *Conservation Biology* 24, 101–112.
- Parker S. S. (2010), Buried treasure: soil biodiversity and conservation. *Biodiversity and Conservation* 19, 3743–3756.
- Payne R. P., Kurtzman C. P., Fell J. W., and Boekhout T. (2011), Key to species. In: *The Yeasts. A Taxonomik Study*, 5. Edition (Kurtzman C. P., Fell J. W., and Boekhout T., eds.). Elsevier Science BV.
- Pozo M. I., Herrera C. M., and Bazaga P. (2011), Species Richness of Yeast Communities in Floral Nectar of Southern Spanish Plants. *Microbial Ecology* 61, 82–91.

- Raspor P. and Jure Z. (2006), Yeasts in Extreme Environments. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Roberts R. G. (1990), Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80, 526–530.
- Rodrigues F., Goncalves G., Pereira-da-Silva S., Malfeito-Ferreira M., and Loureiro V. (2001), Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 588–599.
- Röhr M. (1997), *Statistica für Windows. Eine anwendungsorientierte Einführung*. Addison-Wesley, Bonn.
- Rosa C. A., Lachance M. A., Silva J. O., Teixeira A. C., Marini M. M., Antonini Y., and Martins R. P. (2003), Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research* 4, 271–275.
- Rosa C. A., Gábor P., eds. (2006), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Ross S. M. (2006), *Statistik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Elsevier Spektrum Akad. Verl, München, Heidelberg.
- Saetre P. and Baath E. (2000), Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 909–917.
- Sampaio A., Sampaio J. P., and Leao C. (2007), Dynamics of yeast populations recovered from decaying leaves in a nonpolluted stream: a 2-year study on the effects of leaf litter type and decomposition time. *FEMS Yeast Research* 7, 595–603.
- Sampaio J. P. (1999), Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic implications. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 491–512.
- Sampaio J. P. and Fonseca A. (2002), Dimorphic basidiomycetes, an overview. http://www.crem.fct.unl.pt/dimorphic_basidiomycetes/Papers/Overview/overview.htm.
- Sampaio J. P. and Goncalves P. (2008), Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and environmental microbiology* 74, 2144–2152.
- Schimel J. P. and Bennett J. (2004), Nitrogen mineralization: Challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85, 591–602.
- Schmidt S. K. (2007), Biogeochemical consequences of rapid microbial turnover and seasonal succession in soil. *Ecology* 88, 1379–1385.
- Scorzetti G., Fell J. W., Fonseca A., and Stätzell-Tallman A. (2002), Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research* 2, 495–517.

- Slavikova E. and Vadkertiova R. (2000), The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal of Basic Microbiology* 40, 207–212.
- Slavikova E. and Vadkertiova R. (2003), The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology* 43, 430–436.
- Sniegowski P. D., Dombrowski P. G., and Fingerman E. (2002), *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research* 2002, 299–306.
- Spencer J. F. T. and Spencer D. M. (1997), *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin.
- Starkey R. L. and Henrici A. T. (1927), The Occurrence of Yeasts in Soil. *Soil Science* 23, 33–46.
- Starmer W. T. and Lachance M.-A. (2006), Yeast Ecology. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 65–83.
- Takahiko N. (2006), Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 241–262.
- Thomas-Hall S. R., Turchetti B., Buzzini P., Branda E., Boekhout T., Theelen B., and Watson K. (2010), Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp nov., *Mrakia blollopis* sp nov and *Mrakiella niccombsii* sp nov. *Extremophiles* 14, 47–59.
- Turchetti B., Buzzini P., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., Smiraglia C., and Vaughan-Martini A. (2008), Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology* 63, 73–83.
- Villa-Carvajal M., Coque J. J., Alvarez-Rodriguez M. L., Uruburu F., and Belloch C. (2004), Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. *FEMS Yeast Research* 4, 745–750.
- Vishniac H. S. (1995), Simulated in Situ Competitive Ability and Survival of a Representative Soil Yeast, *Cryptococcus Albidus*. *Microbial Ecology* 30, 309–320.
- Vishniac H. S. (2006), A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial Ecology* 52, 90–103.
- Vishniac H. S. (2006), Yeast Biodiversity in the Antarctic. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook* (Rosa C. A. and Gábor P., eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 419–440.

- Vital M. J., Abranches J., an Hagler, and Mendonca-Hagler L. C. (2002), Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maraca Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 230–235.
- Vital M. J., Abranches J., an Hagler, and Mendonca-Hagler L. C. (2002), Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maraca Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 230–235.
- Wardle D. A., Bardgett R. D., Klironomos J. N., Setälä H., van der Putten W. H., and Wall D. H. (2004), Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304, 1629–1633.
- Wuczowski M. and Prillinger H. (2004), Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). *Microbiological Research* 159, 263–276.
- Yamada Y. and Komagata K. (1987), Taxonomic Significance of the Coenzyme-Q System in yeasts and yeast-like Fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology* 33, 455–457.
- Young I. M. and Crawford J. W. (2004), Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304, 1634–1637.
- Yurkov A. M. (2005), First Isolation of the Yeast *Saccharomyces paradoxus* in Western Siberia. *Microbiology* 74, 459–462.
- Yurkov A. M., Chernov I. Y., and Tiunov A. V. (2008), Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter. *Microbiology* 77, 107–111.
- Yurkov A. M., Kemler M., and Begerow D. (2011), Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*: in press, DOI: 10.1016/j.funeco.2011.07.004.
- Yurkov A. M., Kemler M., and Begerow D. (2011), Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. *PLoS ONE*: in press, DOI: 10.1371/journal.pone.0023671.

5. Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variation
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CFU	colonyforming unit
dd	doppelt destilliert
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HCl	Chlorwasserstoff-Säure (Salzsäure)
IGS	internal genetic spacer
ITS	internal transcribed spacer
LSU	large subunit
MANOVA	Multivariate analysis of variance
MSP	Microsatellite primed
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
rDNA	ribosomale DNA
RNase	Ribonuklease
rpm	revolution per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat Natriumdodecylsulfat
SSU	small subunit
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-Na ₂ EDTA
TE	Tris-HCl
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolet
VIP-Plots	very intensive plots

8. Anhang

Anhang 1: Plotinformationen

Plot ID	Exploratorium	Bodentyp	Vegetation und Landnutzungstyp	Landnutzungs- Intensität	Breitengrad N	Längengrad O
AEW 4	Schwäbische Alb	Cambisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	48° 23' 56,8"	9° 14' 41,4"
AEW 5	Schwäbische Alb	Cambisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	48° 25' 10,6"	9° 24' 52,9"
AEW 6	Schwäbische Alb	Cambisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	48° 23' 38,6"	9° 26' 45,4"
AEW 7	Schwäbische Alb	Leptosol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	48° 23' 46,5"	9° 15' 40,9"
AEW 8	Schwäbische Alb	Cambisol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	48° 22' 57,3"	9° 22' 56,6"
AEW 9	Schwäbische Alb	Leptosol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	48° 22' 9,6"	9° 24' 54,8"
HEW 4	Hainich	Luvisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	51° 22' 11,1"	10° 32' 1,5"
HEW 5	Hainich	Luvisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	51° 15' 50,9"	10° 14' 25,9"
HEW 6	Hainich	Luvisol	Buchenwald, bewirtschaftet	mittelstark genutzt	51° 16' 3,8"	10° 14' 20,2"
HEW 10	Hainich	Stagnosol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	51° 5' 24,6"	10° 27' 45,8"
HEW 11	Hainich	Luvisol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	51° 6' 10,2"	10° 24' 3,1"
HEW 12	Hainich	Luvisol	Buchenwald, unbewirtschaftet	wenig genutzt	51° 6' 3,1"	10° 27' 18,6"

Anhang 2: Varianzanalyse (ANOVA) für Abundanz, Artenanzahl, und relative Abundanz der Ascomyceten

Varianz-quelle	Freiheits- grade	Abundanz Lg CFU/g			Artenanzahl, N			Abundanz von Ascomyceten		
		Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert	Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert	Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert
Konstante	1	2275,87	2275,87	73,06 ***	1447,75	1447,75	5,58 *	0,8	0,8	4,07 *
Exoloratorien, Region E	1	12,73	12,73	0,01 ns	13,57	13,57	0,68 ns	0,09	0,09	10,03 **
Landnutzungs-Typ (L)	1	0,00	0,00	2,86 *	1,65	1,65	1,38 ns	0,23	0,23	4,58 **
Datum (D)	3	1,50	0,5	0,00 ns	10,06	3,35	11,52 ***	0,10	0,10	0,99 ns
E*L	1	0,00	0,00	2,06 ns	27,99	27,99	1,66 ns	0,02	0,02	0,49 ns
E*D	3	1,07	0,36	0,66 ns	12,08	4,03	1,65 ns	0,01	0,01	1,88 ns
L*D	3	0,34	0,11	1,56 ns	12,02	4,01	1,85 ns	0,04	0,04	0,09 ns
E*L*D	3	0,82	0,27		13,49	4,5		0,00	0,00	
Fehler	162	28,22	0,17		393,68	2,43		3,68	0,02	

Statistische Signifikanz: ns, nicht signifikant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Anhang 3: Varianzanalyse (ANOVA) für Abundanz und Artenanzahl abhängig von der Suspensionsverdünnung

Varianz-quelle	Freiheits- grade	Abundanz Lg CFU/g			Artenanzahl, N			Abundanz von Ascomyceten		
		Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert	Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert	Summe der Quadrate	Varianz	F-Wert und p- Wert
Konstante	1	2315,03	2315,03	18673,78	1440,88	1440,88	593,58	0,8	0,8	4,07 *
Exoloratorien, Region E	1	13,2	13,2	106,49 ***	16,14	16,14	6,65 *	0,09	0,09	10,03 **
Verdünnung (V)	1	10,48	10,48	84,56 ***	47,51	47,51	19,57 ***	0,23	0,23	4,58 **
E*V	1	0,004	0,004	0,03 ns	0,15	0,15	0,06 ns	0,02	0,02	0,99 ns
Fehler	174	21,57	0,124		422,371	2,43		3,68	0,02	

Statistische Signifikanz: ns, nicht signifikant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Anhang 4: Artenliste und relative Abundanz von Bodenhefen

Arten	Hainich						Schwäbische Alb					
	Naturwald			Nutzwald			Naturwald			Nutzwald		
	April	Juni	August	Oktober	April	Juni	August	Oktober	April	Juni	August	Oktober
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Barnetozyma pratensis</i>	-	-	-	<0,01	-	-	-	-	0,07	<0,01	-	-
<i>Candida kruisii</i>	-	-	0,05	-	0,04	0,05	0,18	<0,01	-	0,04	-	-
<i>Candida sake</i>	-	-	0,04	-	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-
<i>Candida sp. (TSN-107)</i>	0,06	-	-	-	0,12	-	<0,01	-	-	-	-	-
<i>Candida sp. (TSN-198)</i>	-	-	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus adeliensis</i>	-	-	0,02	-	-	-	-	-	0,07	<0,01	0,05	0,15
<i>Cryptococcus aeneus</i>	-	-	-	-	0,04	0,07	-	-	-	<0,01	0,01	-
<i>Cryptococcus filicatus</i>	-	-	-	-	0,04	0,07	-	-	-	<0,01	0,08	-
<i>Cryptococcus gastricus</i>	-	-	-	-	0,04	0,07	-	<0,01	-	<0,01	0,05	0,14
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,02	0,01	0,05
<i>Cryptococcus sp. (TSN-649)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	0,01	<0,01
<i>Cryptococcus stepposus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
<i>Cryptococcus terreus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	0,03	0,02	-
<i>Cryptococcus terricola</i>	0,82	0,66	0,77	0,86	0,58	0,57	0,77	0,72	0,54	0,75	0,59	0,45
<i>Cryptococcus victriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06	0,06	0,06	0,24
<i>Cryptococcus wieringae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,01
<i>Cystoflobasidium capitatum</i>	-	-	-	-	<0,01	-	-	0,01	-	-	0,01	-
<i>Dabaryomyces sp. (TSN-747)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	<0,01	-	-
<i>Dioszegia sp. (TSN-530)</i>	-	-	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	<0,01
<i>Guehomyces pullulans</i>	-	-	-	-	0,04	0,07	-	-	0,01	0,01	0,03	-
<i>Holtermanniella takashimae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,01	0,03	<0,01
<i>Kazachstania piceae</i>	-	0,16	0,08	0,06	-	<0,01	-	-	-	-	-	0,02
<i>Leucosporidium scottii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,09
<i>Lindnera misumaiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	<0,01	0,01	-
<i>Mrakia sp. (TSN-231)</i>	-	0,03	-	<0,01	-	-	-	<0,01	-	-	-	-
<i>Rhodotorula colostri</i>	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	0,02	-
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	<0,01	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp. (TSN-574)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces sp. (TSN-505)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schwannomyces castellii</i>	-	0,10	<0,01	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,06	0,16	0,13	0,17
<i>Trichosporon dulcitum</i>	-	0,07	0,05	-	0,04	0,05	<0,01	-	<0,01	<0,01	0,01	0,03
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	-	-	-	<0,01	<0,01	-	<0,01	0,03	<0,01	-	-	-
<i>Trichosporon porosum</i>	0,02	-	-	<0,01	<0,01	-	<0,01	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	-

9. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dominik Begerow dafür bedanken, dass ich meine Diplomarbeit in der AG Geobotanik anfertigen konnte.

Ich bedanke mich bei meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Ralph Tollrian für die Erstellung des Zeitgutachtens.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Andrey Yurkov für die wunderbare Betreuung, die er seit dem S-Block geleistet hat, für die Einführung in die Welt der Hefen und die vielen wichtigen Tipps den Überblick zu behalten, besonders über die hunderten von Hefekulturen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Ilse Weßel für die Aufmunterungen und die viele Unterstützung im Labor.

Ich bedanke mich bei Dr. Angela Schäfer, Ronny Kellner und Dr. Wolfgang Maier für die vielen kleinen Tipps zwischendurch.

Natürlich bedanke ich mich auch bei Sabine Kühle, allen anderen Mitarbeitern der AG und meinen ganzen Kommilitonen und Leidensgenossen, ohne die es niemals so lustig gewesen wäre.

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der Vorliegenden Diplomarbeit handelt es sich um vier in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Betreuer der Arbeit war: Prof. Dr. D. Begerow

Als Korreferenten schlage ich vor: Prof. Dr. R. Tollrian

Bochum, den 08.08.2011

.....

Thorsten Wehde