

Mikrobielle Ökologie
***N*-Acyl-*L*-Homoserinlacton-produzierender**
Bakterien in der Rhizosphäre
von Tomatenpflanzen

Stephan Are Gantner

GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Bodenökologie

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Juni 2003

**Mikrobielle Ökologie *N*-Acyl-L-Homoserinlacton-produzierender
Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen**

vorgelegt
am 20. Juni 2003 von
Dipl. Biol. Univ. Stephan Are Gantner
aus Ratingen

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 2003

meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
λ	lambda, Wellenlänge (Angabe in nm)
π	pi (3,1416)
Σ	die Summe aus...
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlacton
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
BP	Bandpaß (Filtersatz für Fluoreszenzmikroskopie)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
BHL	<i>N</i> -Butanoyl-L-Homoserinlacton
C	Cytosin oder Kohlenstoff
ca.	circa
cfu	"colony forming unit", koloniebildende Einheit
CLSM	konfocales Laser Scanning Mikroskop
CMEIAS	"Center for Microbial Ecology Imaging Analysis System", Program zur Bildanalyse
cm	Zentimeter, 0,01 m
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N-hydroxysuccinimidester
°C	Grad Celsius
DAPI	4,6'-Diamidino-2-phenylindol
DHL	<i>N</i> -3-oxo-Decanoyl-L-Homoserinlacton
DDHL	<i>N</i> -3-oxo-Dodecanoyl-L-Homoserinlacton
dem.	demineralisiert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
16S-rDNS	Gen, das für die Ribonukleinsäure der kleinen Untereinheit bakterieller Ribosomen codiert
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtOH _{abs}	absolutes Ethanol, 96 %ig
Fg	Frischgewicht
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
g	Gramm
G	Erdanziehungskraft oder Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>gfp</i>	Gen, das für das grün fluoreszierende Protein codiert
Gm	Gentamicin
Gm ^R	Gentamicinresistenz
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
h	"hour", Stunde
<i>Hin6I</i>	Restriktionsenzym für DNS, alte Bezeichnung <i>HhaI</i>
HHL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-Homoserinlacton
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O _{dem}	entionisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	entsalztes und filtriertes Wasser
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycinresistenz
l	Liter
LMGI	"Labor for Microbiologie Groningen", bakterielles Nährmedium
LMU	Ludwigs-Maximilians-Universität
LP	Langpaß (Filtersatz für Fluoreszenzmikroskopie)
m	Meter oder Milli (10 ⁻³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
max.	maximal
min	Minute
M	Molmasse, (g/mol)
Mr	relative Molmasse
<i>Msp</i> I	Restriktionsenzym für DNS
MW	Mittelwert
n	Nano (10 ⁻⁹)
NB	"Nutrient Broth", bakterielles Nährmedium
OD _x	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
Pa	Pascal (10 ⁻⁵ bar)
p.a.	pro analysis
PBS	"phosphate buffer saline", phosphathaltiger Salzpuffer
PFA	para-Formaldehyd
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen-Konzentration
r	Radius eines Kreises
RFP	rot fluoreszierendes Protein
<i>rfp</i>	Gen, das für das rot fluoreszierende Protein codiert
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen in der Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
S _D	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulphat
sog.	sogenannte
ds	"double stranded", doppelsträngig (in Bezug auf die DNS)
ss	"single stranded", einzelsträngig (in Bezug auf die DNS)
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
t-RFLP	terminaler Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
usw.	und so weiter
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche, siehe
W	Watt

A Einleitung

A.1 Die Rhizosphäre als wichtiger Lebensraum	1
A.2 Kommunikation bei Bakterien	2
A.3 Bakterien – Pflanzen - Interaktion: Möglichkeiten des Pflanzenschutzes	6
A.4 <i>Serratia liquefaciens</i> und <i>Pseudomonas putida</i>	9
A.5 Ziele dieser Arbeit	10

B Material und Methoden

B.1 Allgemeine Materialien	11
B.1.1 Lösungen und Puffer	11
B.1.2 Sterilisation	13
B.2 Verwendete Mikroorganismen	14
B.2.1 Mikroorganismen	14
B.2.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung der Mikroorganismen	15
B.2.2.1 Nährmedien	15
B.2.2.2 Anzucht der Mikroorganismen	15
B.2.2.3 Stammhaltung	15
B.2.2.4 Antibiotika	16
B.3 Versuchspflanzen	17
B.3.1 Pflanzenanzucht	17
B.3.2 Oberflächensterilisation der Tomatensamen	17
B.3.3 Das axenische System	18
B.3.4 Das Bodensystem	19
B.4 Inokulation der Tomatenpflanzen	20
B.4.1 Bestimmung der Zellzahl zur Inokulation verwendeter Bakteriensuspension	20
B.4.2 Inokulation von Tomatenpflanzen im axenischen System	20
B.4.2.1 Das monoxenische System	20
B.4.2.2 Das dixenische System	21
B.4.2.3 Inokulation von Tomatenpflanzen im Bodensystem	22
B.5 Ernte der Wurzeln	22
B.5.1 Steriles System	22
B.5.2 Bodensystem	22
B.5.3 Aufbereitung der Wurzel	23
B.5.4 Zellfixierung mit Paraformaldehyd-Lösung	23
B.5.4.1 Fixierung von gemörserten Wurzeln	24
B.5.4.2 Fixierung ganzer Wurzeln	24
B.6 Wurzelbesiedlungsstudien	24
B.6.1 Untersuchung von Epiphyten	24
B.6.2 Untersuchung endophytischer Wurzelbesiedlung	25
B.6.2.1 Oberflächensterilisation der Wurzeln	25
B.6.2.2 Anfertigung von Mikrotomschnitten	25
B.7 Bestimmung der Zellzahl wurzelassoziierter Bakterien	25
B.7.1 Koloniezählungsverfahren	25
B.7.2 Immobilisierung bakterieller Zellen auf Polycarbonatfiltern	26
B.7.2.1 Zählung von immobilisierten Bakterienzellen auf Polycarbonatfiltern	27

B.8	Statistische Auswertung der Gesamtzellzahlbestimmungen	28
B.8.1	Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung	28
B.8.2	Bestimmung der Signifikanz mittels U-Test nach Whitney und Mann	28
B.9	FISH – Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	30
B.9.1	Oligonukleotidsonden mit Fluoreszenzfarbstoffen	30
B.9.1.1	Photometrische Vermessung der markierten Oligonukleotide	30
B.9.1.2	Verwendete rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden	31
B.9.2	Hybridisierung von Zellen auf Polycarbonatfiltern	32
B.9.3	Anfärbung chromosomaler DNS mit DAPI	33
B.10	Mikroskopische Techniken	34
B.10.1	Vorbereitung der Proben	34
B.10.2	<i>In situ</i> –Studien zur Wurzelbesiedlung	34
B.10.2.1	Epifluoreszenzmikroskopie	34
B.10.2.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	35
B.11	Ausbreitung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen	36
B.11.1	AHL-Sensorstämme	36
B.11.2	Erstellung von Mosaikbildern	37
B.11.3	Messung der Diffusionsstrecke von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre	37
B.12	t-RFLP-Analyse wurzellosoziierter Bakterienpopulationen	38
B.12.1	Extraktion der DNS	39
B.12.1.1	Extraktion bakterieller DNS aus Rhizosphäre und Wurzeln	39
B.12.1.2	Extraktion genomischer DNS aus Blättern von Tomatenpflanzen	39
B.12.1.3	Agarosegelelektrophorese	40
B.12.2	Bestimmung der DNS- Konzentration	41
B.12.3	Amplifikation der 16S-rDNS	41
B.12.4	Aufbereitung der DNS	43
B.12.5	Restriktionsanalyse der 16S-rDNS Amplifikate	44
B.12.6	Detektion und Analyse der 16S-rDNS Fragmentstücke	45
B.12.7	Auswertung der Fragmentanalysedaten	46

C Ergebnisse

C.1	Studien zur bakteriellen Wurzelbesiedlung	47
C.1.1	Vergleich des axenischen Systems mit dem Bodensystem	47
C.1.2	Siedlungsstudien von <i>Serratia liquefaciens</i> und <i>Pseudomonas putida</i> an Wurzeln von Tomatenpflanzen im axenischen System	49
C.1.3	Besiedlung der Wurzelhaarzone	51

C.1.4	Kolonisierungsstudien zu <i>Pseudomonas putida</i> IsoF im Vergleich zu <i>Serratia liquefaciens</i> MG1	52
C.1.5	Untersuchungen auf endophytische Besiedlungsweise von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44	52
C.2	Bestimmung der Siedlungsdichte von <i>Serratia liquefaciens</i> an Wurzeln von Tomatenpflanzen	56
C.2.1	Siedlungsdichte von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44 im axenischen System	56
C.2.2	Siedlungsdichte von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44 im Bodensystem innerhalb einer Woche	57
C.2.3	Spezifische Siedlungsdichte von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44 im Bodensystem mehr als eine Woche	59
C.3	Einfluß von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 auf die Rhizosphärenpopulation	61
C.3.1	Einfluß auf die Rhizosphärenpopulation ausgewählter Bakteriengruppen	61
C.3.2	Untersuchung zur Populationszusammensetzung nach Inokulation mit <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 mittels t-RFLP-Analyse	65
C.3.2.1	DNS-Extraktion aus Rhizosphäre und Wurzeln von Tomatenpflanzen	65
C.3.2.2	Primerspezifität zur 16S-rDNS Amplifikation	66
C.3.2.3	Fragmentdaten der t-RFLP-Analyse	72
C.3.2.4	t-RFLP-Analyse der Kontrollprobe	72
C.3.2.5	t-RFLP-Analyse der mit <i>Serratia liquefaciens</i> inokulierten Proben	72
C.3.2.6	Vergleich der t-RFLP-Fragmentmuster	72
C.3.2.7	Auswertung der Fragmentdaten der t-RFLP-Analyse	73
C.4	<i>In situ</i> Produktion und Wirkung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre	76
C.4.1	AHL-Sensorstämme	76
C.4.2	Verteilung von AHL an der Wurzel	77
C.4.3	Ausbreitung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen	79

D Diskussion

D.1	Siedlungsverhalten von <i>Serratia liquefaciens</i> in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen	81
D.1.1	Ein Vergleich der verwendeten Kultivierungssysteme	81
D.1.2	Wurzelbesiedlung von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44 an Tomatenpflanzen	82
D.1.2.1	Einfluß der Pflanze auf die Rhizosphärenpopulation	83
D.1.2.3	Untersuchungen zur endophytischen Besiedlung	84
D.1.2.4	Einfluß der Rhizobakterien auf die Pflanze	86
D.2	Verbreitung und Wirkungsradius von AHL an Wurzeln von Tomatenpflanzen	87

D.2.1 Verbreitung von AHL auf der Wurzeloberfläche von Tomatenpflanzen	87
D.2.2 Besonderheiten für die Verbreitung von AHL an Wurzelspitzen von Tomatenpflanzen	88
D.3 Siedlungsdichte von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 und MG44 in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen	89
D.3.1 Rhizosphärenbesiedlung im monoxenischen System	89
D.3.2 Rhizosphärenbesiedlung im Bodensystem	90
D.3.3 Unterschiede der Ergebnisse aus beiden Systemen	90
D.4 Einfluß von <i>Serratia liquefaciens</i> auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft von Tomatenpflanzen	91
D.4.1 Dynamische Verschiebungen in der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft von Tomatenpflanzen	91
D.4.2 Möglichkeiten und Einschränkungen der FISH-Detektion	93
D.4.3 t-RFLP-Analyse der gesamten bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft	94
D.4.4 Möglichkeiten und Einschränkungen der t-RFLP-Analyse	95
D.4.5 Auswertung und Bedeutung der Ergebnisse der t-RFLP-Analyse	96
D.5 Bedeutung der AHL-Produktion von <i>Serratia liquefaciens</i> in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen	100

E Zusammenfassung

E.1 Zusammenfassung (deutsch)	103
E.2 Zusammenfassung (englisch)	105

F Literatur

F.1 Literaturverzeichnis	107
--------------------------	-----

G Anhang

G.1 Terminale Restriktionsfragment (t-RF)-Listen	119
G.2 U-Test nach Whitney und Mann	125
G.3 Danksagung	
G.4 Lebenslauf	

A Einleitung

A.1 Die Rhizosphäre als wichtiger Lebensraum

Verglichen mit dem wurzelfreien Boden ist die Aktivität von Mikroorganismen im wurzelnahen Bereich sehr hoch. Viele Mikroorganismen (z. B. heterotroph wachsende Bakterien) können die von Pflanzen an der Wurzel ausgeschiedenen Substanzen (Exsudate) als Nährstoffquellen nutzen (Sørensen, 1997). Die freigesetzten Stoffwechselprodukte dieser Mikroorganismen können anderen wiederum als Nahrung dienen. So entsteht an Pflanzenwurzeln ein enges Geflecht verschiedener teilweise von einander abhängiger Mikroorganismen (Goddard *et al.*, 2001). Dieses Phänomen der hohen mikrobiellen Aktivität im wurzelnahen Boden wird als Rhizosphäreneffekt bezeichnet (Whipps, 1990). Der Begriff der "Rhizosphäre" wurde ursprünglich 1904 von Professor Lorenz Hiltner (1862-1923) von der Technischen Universität München im Rahmen eines Kolloquiums der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft geprägt (Curl & Truelove, 1986). Die Rhizosphäre wurde definiert als der Bodenbereich (Sphäre) um die Wurzel (Rhizos, griechisch für Wurzel). Nach Hiltner stand die Rhizosphäre in enger Beziehung zu Nahrungsaufnahme und Wachstum von Pflanzen, ferner schien sie den Krankheitsverlauf bei Pflanzen beeinflussen zu können. Inzwischen ist die Betrachtung der Rhizosphäre viel differenzierter. Man faßt unter dem Begriff "Rhizosphäre" die Endo- und Ectorhizosphäre zusammen (Belandreau & Knowles, 1978). Der Wurzelcortex mit Wurzelepidermis und Wurzelhaaren, einschließlich der Mucosaschicht aus pflanzlichen oder bakteriellen Polysacchariden wird als Endorhizosphäre bezeichnet. Die Ectorhizosphäre umfaßt das Bodenkompartment bis 3 mm um die Wurzel. Zwischen Bakterien und Pflanzen werden die meisten Wechselwirkungen an der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) beobachtet (Whipps, 1997). Die Rhizosphäre wird dabei relativ dicht von Mikroorganismen besiedelt, so daß die Interaktionen mit der Pflanze für ihre Nährstoffversorgung und Gesundheit von großer Bedeutung sein können (Lugtenberg *et al.*, 2002). Je nachdem welche Organismen hier dominant vorkommen, kann ein für die Pflanzen positiver oder negativer Effekt auftreten. Besonders wichtige Habitate mikrobiellen Lebens an der Wurzel sind die Wurzelspitzen und die Wurzelhaarzone. Dort ist der pflanzliche Stoffumsatz von Exsudaten sowie die Aufnahme von Nährstoffen, Spurenelementen und Wasser am größten.

Für die Pflanze erfüllt die Wurzel im wesentlichen drei Aufgaben. Sie gibt dem Pflanzensproß im Boden Halt, versorgt die Pflanze mit Wasser sowie Nährstoffen und dient u. a. zur Speicherung von Stärke im Wurzelgewebe (Nultsch, 2001). Der Aufbau des Wurzelsystems

ist ein charakteristisches Pflanzenmerkmal. Man unterscheidet dabei zwischen Pflanzen, die mit einem Blatt (Ein-Keimblättrige, Monocotyledone) oder mit zwei Blättern (Zwei-Keimblättrige, Dicotyledone) auskeimen. Monocotyle Pflanzen (z. B. Weizen) zeigen ein Wurzelsystem mit vielen gleichartigen, wenig verzweigten Wurzeln, das als Homorrhizie bezeichnet wird (Strasburger *et al.*, 1991). Bei dicotylen Pflanzen (z. B. Tomate) besteht die Wurzel aus einer primären Hauptwurzel (Pfahlwurzel) und vielen sekundären Seitenästen (Nebenwurzeln). Dieses heterogene Wurzelsystem der Allorrhizie läßt sich wie folgt beschreiben (Strasburger *et al.*, 1991): Vom Sproßansatz nach unten der Pfahlwurzel entlang kommt zuerst der Wurzelhals aus dem die beiden Standwurzeln, welche die Pflanze im Boden verankern, abzweigen. Darauf folgen die Verzweigungen der Nebenwurzeln, die Wurzelhaarzone und die Streckungszone der Wurzel, die im Bereich der Wurzelspitze in eine Wachstumszone übergeht. Das meristematische Gewebe der Wurzelspitze wird zum Schutz vor Verletzungen durch Bodenpartikeln von der Calyptra (Wurzelhaube), bestehend aus abgestorbenen Zellschichten, umgeben. Der Aufbau der Seitenwurzeln entspricht dem der Hauptwurzel. Je nach Pflanzenart können Seitenwurzeln (Flachwurzler) oder Hauptwurzeln (Tiefenwurzler) stärker ausgeprägt sein.

Alter und Wachstum der Wurzeln beeinflussen die Rhizosphäre, so daß die in ihr siedelnden Mikroorganismen einem steten dynamischen Wechsel der Umweltbedingungen unterworfen sind (Sørensen, 1997). Um sich den wechselnden Lebensbedingungen in diesem relativ dicht mit Organismen besiedelten Lebensraum besser anpassen zu können, verfügen einige Bakterien u. a. über besondere Fähigkeiten zur Kommunikation.

A.2 Kommunikation bei Bakterien

Die Fähigkeit zur Kommunikation ist eine der wichtigsten Eigenschaften der Individuen einer Gemeinschaft. Sie ist unverzichtbar für die Bildung und Organisation von Gemeinschaften (Bassler, 2002). Erst die Kommunikation ermöglicht es, gezielt Informationen auszutauschen, um sich so auf äußere Veränderungen schneller einstellen zu können. Als Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) mittels selbstkonstruierter Vergrößerungsapparate die ersten Bakterien, oder wie er sie beschrieb "unglücklichen Kreaturen" (1683), entdeckte, hielt man selbst die einfache, gerichtete Signalübermittlung noch für eine Eigenschaft des Menschen:

"Signal, ist alles dasjenige, was Personen von einerley Partey einander zum Zeichen geben oder weisen, wenn sie einander von etwas einige Nachricht ertheilen wollen...Diese Signale seynd Musqueten-Schösse, Trommel-Rühren und der Schall der Trompeten oder Klöcklein."

(Johannes Hübner, Reales Staats- Zeitungs- und Conversationslexikon, 1731)

Heute, mehr als 2 Jahrhunderte später, wissen wir, daß auch Mikroorganismen über vielfache Möglichkeiten der Kommunikation verfügen. 1970 hatte man erstmals Bakterien entdeckt, die ihre Fähigkeit zu leuchten, zelldichteabhängig regulieren konnten (Nealson *et al.*, 1970; Eberhard, 1972). Diese nutzten zwar keine "Musketen" oder "Trommeln" um sich zu verständigen, doch ein im Prinzip ähnliches System. Sie sandten Signalmoleküle aus, die sie ab Erreichen einer Schwellenwertkonzentration zum Leuchten anregten. Dieses bakterielle Verhalten, bei hohen Zelldichten eine spezifische Reaktion zu zeigen, wurde als "quorum sensing" definiert (Fuqua *et al.*, 1994).

Eines der am besten beschriebenen Systeme der bakteriellen Kommunikation ist das "quorum sensing" von Gram-negativen Bakterien. Sie verwenden dazu verschiedene Derivate der *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) als Signalmoleküle. Die Struktur dieser AHL-Signalmoleküle ist sehr ähnlich. Alle bestehen aus einem Lactonring mit einer Kohlenstoffseitenkette (vgl. Abb. A.2a). AHL-Moleküle unterscheiden sich nur in der Länge und Substitution ihrer Acyl-Seitenkette. Die Kohlenstoffseitenkette kann aus 4 bis 12 C-Atomen bestehen und teilweise Doppelbindungen enthalten. Als Substituent kann am dritten C-Atom eine Carbonyl- oder Hydroxylgruppe anhängig sein.

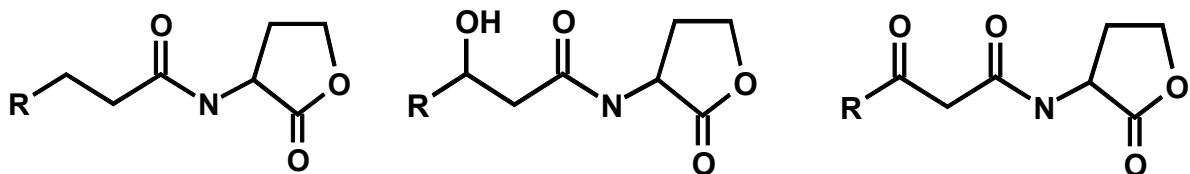


Abbildung A.2a: Ein Strukturvergleich der drei Grundformen von *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL).

Gram-negative Bakterien können mit diesen einfachen Signalmolekülen die unterschiedlichsten Interaktionen steuern. Neben der Signalinduktion in der eigenen Population sind auch Interaktionen mit anderen Bakterienarten möglich. Diese Fähigkeiten sind unter dem Begriff des "Crosstalk" für manche Bakterien beschrieben (Steidle *et al.*, 2001). Man unterscheidet derzeit drei Grundformen des "quorum sensing" (Bassler, 2002). Es gibt die 'Sprache' der Gram-negativen Bakterien (A), die der Gram-positiven Bakterien (B) und Bakterien, die eine Art Hybridsprache beider Systeme verwenden (C) (Bassler, 1999; vgl. Abb. A.2b und A.2c). Jedoch nicht alle Bakterien dieser Gruppen verfügen über die Fähigkeit zur Interaktion. Bei den Gram-negativen Bakterien sind derzeit nur etwa 50 Bakterienarten bekannt, die eine Kommunikation auf diesem Wege führen können (Bassler, 2002). Diejenigen, welche "quorum-sensing" betreiben können, zeigen dabei ähnliche Signalstrukturen. Alle Systeme verwenden bestimmte Proteine, die in Anlehnung an das

zuerst beschriebene Signalsystem von *Vibrio fischeri* den Proteinfamilien der LuxR-homologen und der LuxI-homologen Proteine zugeordnet werden (Pierson *et al.*, 1998). Das *lux* - Operon codiert bei *V. fischeri* für die Luziferase, ein Enzym, welches das Leuchten in den Bakterien katalysiert. Zu den LuxI-homologen Proteinen gehören alle Signalproduzierenden Proteine, während die LuxR-homologen alle Rezeptorproteine umfassen, die an diese Signalmoleküle binden können und so die Expression verschiedener Strukturgene ermöglichen. Bei vielen Gram-negativen Bakterien werden die verschiedenen Derivate des *N*-Acyl-L-Homoserinlactons (AHL) von der AHL-Synthase, einem LuxI-homologen Protein, produziert und gelangen je nach Größe entweder frei diffundierend durch die Zellwand (Kaplan und Greenberg 1985) oder mittels Transportsysteme (Pearson *et al.*, 1999) aus der Zelle (vgl. Abb. A.2b (A)).

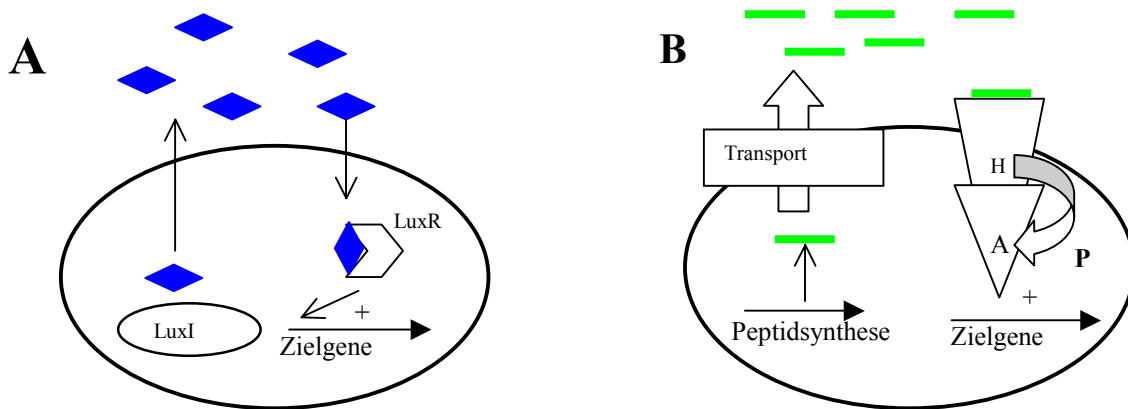


Abbildung A.2b: Signalsysteme bei Bakterien; A: das Signalsystem bei Gram-negativen Bakterien, B: das Signalsystem bei Gram-positiven Bakterien. Die Signalmoleküle sind als blaue Rhomben (A) und als grüne Balken (B) dargestellt (nach Bassler, 2002).

AHL-Moleküle werden von benachbarten Zellen wieder aufgenommen und binden innerhalb der Zelle an ein LuxR-homologes Rezeptorprotein, welches dadurch aktiviert wird und an spezifische Promotorregionen bestimmter Zielgene binden kann. Das AHL-gebundene Rezeptorprotein reguliert damit als Induktor oder Repressor die Expression dieser Strukturgene durch die Polymerase (Whitehead *et al.*, 2001). Nach einem ähnlichen Prinzip verläuft die Signalinduktion bei den Gram-positiven Bakterien (vgl. Abb. A.2b (B)). Als Signalmoleküle dienen hier jedoch verschiedene Oligopeptide (Bassler, 1999). Diese werden nach der Synthese im Cytoplasma über ein Transportprotein aktiv aus der Zelle transportiert. Die Signalerkennung erfolgt an der Zelloberfläche über einen Zwei-Komponenten-Sensor. Diese Bindung setzt eine Phosphorylierungskaskade in Bewegung, wobei von einem autophosphorylierten Histidinrest (H) des Sensors eine Phosphatgruppe (P) auf den

Aspartatrest (A) des Regulatorproteins übertragen wird. Das Regulatorprotein ermöglicht dann wieder ähnlich den LuxR-homologen Proteinen der Gram-negativen Bakterien die Expression bestimmter Strukturgene (Bassler, 1999; vgl. Abb. A.2b (B)).

Das dritte Signalsystem ist eine Art 'Hybridsprache'. Sie stellt eine Kombination beider oben beschriebenen Systeme dar. Dieses System ist jedoch noch weitgehend unerforscht. In diesen Zellen werden parallel zueinander zwei verschiedene Signalmoleküle produziert und aus der Zelle transportiert (vgl. Abb. A.2c (C)).

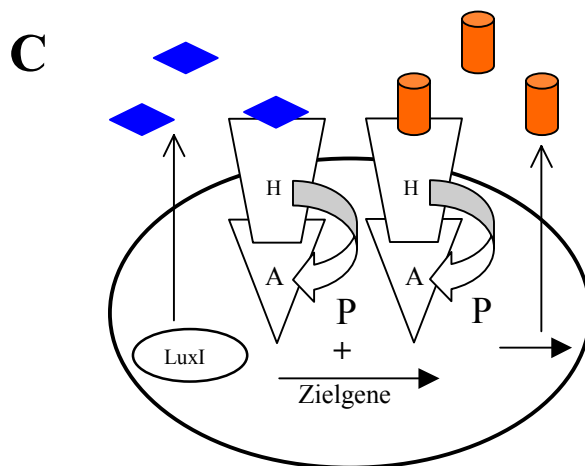


Abbildung A.2c: Signalsystem der 'Hybridsprache' als Kombination zweier Signalsysteme bei Bakterien (vgl. Abb. A.2b; nach Bassler, 2002).

Ein Signalmolekül weist eine AHL-ähnliche Struktur auf, während das andere offenbar ein Derivat eines Furanosylboratdiesters zu sein scheint (Bassler, 2002). Erkannt werden beide Signalmoleküle jedoch durch Membranproteine in einer ähnlichen Weise wie bei den Gram-positiven Bakterien. Über eine Phosphorylierungskaskade scheint ebenfalls die Expression verschiedener Strukturgene ausgelöst zu werden, wobei Details dieses hochkomplexen Signalsystems noch nicht bekannt sind (Bassler, 2002). Das Hybridsystem des "quorum sensing" ist bei *Vibrio harveyi* entdeckt worden (Bassler *et al.*, 1993). Neben diesen drei Hauptarten der Signalvermittlung gibt es noch unzählige Varianten von Regulierungssystemen, deren Funktionsweisen noch nicht aufgeklärt sind. Auch die Mechanismen der bakteriellen Interaktion sind noch nicht alle erforscht. Man geht bei den Gram-negativen Bakterien inzwischen davon aus, daß diese über mehrere Signalmoleküle verfügen, die in Abhängigkeit voneinander reguliert werden (Wilkinson *et al.*, 2002). Außerdem spielen bei der Erkennung von AHL die LuxR-homologen Rezeptorproteine eine große Rolle. Ihre genaue Funktionsweise wird derzeit u. a. am Beispiel von *Agrobacterium tumefaciens* zu entschlüsseln versucht (Zhang *et al.*, 2002).

A.3 Bakterien – Pflanzen - Interaktion: Möglichkeiten des Pflanzenschutzes

Bakterien verwenden das System des "quorum sensing" zur Koordination verschiedener Aktivitäten. Die Konzentration der Signalmoleküle, die zur Expression bestimmter Strukturgene führt, steht dabei in direkter Abhängigkeit zur Zelldichte der Bakterien. So können Bakterien ihre eigene Populationsdichte registrieren, um ab einer relativ hohen Bakteriendichte zum Beispiel den Angriff gegen eukaryotische Organismen aussichtsreich zu führen. Aus ökologischer und ökonomischer Sicht sind diejenigen Bakterien interessant, welche dabei einen Einfluß auf die Ernährung und Gesundheit der Pflanzen haben. Einige Gram-negative Bakterien können diese Koordinationsfähigkeit zur Bekämpfung phytopathogener Pilze oder auch zur Invasion von Pflanzen einsetzen. Beispiele, welche Aktivitäten Gram-negative Bakterien hierfür mittels AHL steuern können, sind in Tabelle A.3 zusammengestellt. Ausführlichere Zusammenstellungen finden sich in verschiedenen Übersichtsartikeln (Pierson *et al.*, 1998; Eberl, 1999; Pierson, 2000; Whipps, 2001).

Tabelle A.3 : Beispiele von Bakterien, die verschiedene Eigenschaften mittels AHL regulieren. Jeweils angegeben ist die Seitenkette des zur Regulation verwendeten AHL-Signalmoleküls, die Produkte der regulierten Strukturgene und die betroffenen Pflanzen. Die Tabelle ist eingeteilt in Bakterien mit positivem und negativem Effekt auf Pflanzen.

Bakterium	regulierendes AHL-Molekül	AHL regulierte Eigenschaft	Wirkung z. B. bei	Referenz
negativer Effekt auf Pflanzen				
<i>Erwinia carotovora</i>	N-3-oxo-hexanoyl (OHHL)	Produktion von Cellulasen und Proteasen	Karotte	Salmond <i>et al.</i> , 1994
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-3-oxo-octanoyl (OOHL)	konjugativer Transfer des T _i -Plasmids	Kartoffel	Winans, 1992
positiver Effekt auf Pflanzen				
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	N-hexanoyl (HHL)	Phenazin-Produktion	Weizen	Pierson <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	N-3-hydroxy-7-cis-tetradecanoyl (TDHL)	Nodulation an Wurzeln	Erbse	Rhijn & Vanderleyden, 1995

Die AHL-regulierten Eigenschaften der Bakterien können, wie in Tabelle A.3 aufgeführt, sowohl negative als auch positive Effekte auf Pflanzen haben. *Erwinia carotovora* reguliert über AHL die Produktion von Exoenzymen, welche die Zellwand von Pflanzenwurzeln angreifen und zersetzen. Die Zersetzungsprodukte werden von *E. carotovora* als Nahrungsquelle genutzt. Bei *Agrobacterium tumefaciens* wird der konjugative Transfer des

bei Kartoffelpflanzen tumorbildenden T_i-Plasmids zwischen den Bakterienzellen über AHL reguliert (Whitehead *et al.*, 2001). Somit verfügen alle *A. tumefaciens* einer Population über T_i-Plasmide, welche sie bei Befall einer Pflanze in das Pflanzengenom einschleusen. Die ins Pflanzengenom integrierte T-DNS der T_i-Plasmide führt zur Synthese verschiedener Pflanzenhormone und Aminosäurederivate, von denen *A. tumefaciens* im Tumorgewebe lebt (Zupan *et al.*, 2000). Neben diesen pflanzenpathogenen Bakterien gibt es aber auch solche, deren Anwesenheit für Pflanzen von Vorteil ist. Das sind Bakterien, die u. a. durch die Produktion verschiedener Antibiotika Pflanzen vor pathogenen Organismen schützen können. *Pseudomonas aureofaciens* produziert fungizid wirkende Antibiotika, wie z. B. Phenazine, AHL-reguliert (Pierson *et al.*, 1996). Isoliert wurde *P. aureofaciens* von Weizenwurzeln, an denen der Pilz *Gaeumannomyces graminis* (Erreger der Schwarzbeinigkeit) unterdrückt wurde. Auch *Rhizobium leguminosarum*, welches an Wurzeln von Hülsenfrüchten die Bildung von symbiontischen Organen, sogenannten Wurzelknöllchen (Nodulationen) induziert, nutzt AHL-Signalmoleküle für die Interaktion (Pierson *et al.*, 1997).

Von den vielen wechselseitigen Beziehungen von Bakterien und Pflanzen sind jene mit positiven Effekten von besonderem biotechnologischem Interesse. Im Gegensatz zu den echt symbiontischen Bakterien, wie *Rhizobium leguminosarum*, werden wurzellosoziierte Bakterien, die das Pflanzenwachstum stimulieren, als pflanzenwachstumsfördernde Rhizosphärenbakterien ("plant growth-promoting rhizobacteria", PGPR) zusammengefaßt (Kloepper & Schroth, 1978). Eine Gruppe der PGPR vermittelt Biokontrollwirkungen in der Rhizosphäre. Sie produzieren dabei unter anderem verschiedene Pflanzenhormone, wie z. B. Auxine und Cytokinine, die das Wurzelwachstum modulieren (Persello-Cartieux *et al.*, 2003). An *Arabidopsis thaliana* konnten flüchtige organische Verbindungen ("volatile organic compounds", VOC) von verschiedenen PGPR-Bakterien nachgewiesen werden, die das Blattwachstum stimulierten (Ryu *et al.*, 2003).

Antibiotika produzierende Bakterien stellen als mögliche umweltfreundliche Alternativen zu chemischen Pflanzenschutzmitteln einen weiteren Anwendungsbereich dar. Ein bekanntes Beispiel ist Pyrrolnitrin, dessen Derivate bereits kommerziell als Pilzbekämpfungsmittel (Fungizide) Verwendung finden. Pyrrolnitrin wird von *Pseudomonas fluorescens* zur Abwehr von *Pythium ultimum* an Baumwollkeimlingen produziert (Ligon *et al.*, 2000). Fungizide Eigenschaften sind bei Rhizosphärenbakterien weit verbreitet, wobei Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Serratia* eine wichtige Rolle spielen. Neben diesen direkt gegen

phytopathogene Organismen wirkenden Bakterien gibt es auch solche, welche die Pflanzenabwehr stimulieren.

Zum Verständnis der Vermittlung von Resistenzen ist ein kurzer Einblick in die Abwehrreaktion von Pflanzen gegen Phytopathogene notwendig. Pflanzen können zur Unterdrückung von Krankheitserregern verschiedene Abwehrsysteme einsetzen. Einige dieser Abwehrmechanismen sind konstitutiv in der Pflanze vorhanden, während andere erst durch Befall von Phytopathogenen induziert werden (Loon *et al.*, 1998). Auf den Befall von Phytopathogenen reagiert die Pflanze meist durch Aktivierung eines Salicylsäure-("salicylic acid", SA)-abhängigen Signalweges, der zur systemisch erworbenen Resistenz ("systemic acquired Resistance", SAR) führt (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Dabei werden charakteristische Abwehrproteine ("pathogenesis-related-proteins", PR-Proteine) ausgebildet. Auf eine Zweitinfektion kann die SAR so schneller auf denselben Erreger oder ähnliche Pathogene wirken (Delaney, 1997). Ein anderes Abwehrsystem ist die induzierte systemische Resistenz ("induced systemic resistance", ISR), die durch die Besiedlung von nicht-pathogenen Rhizosphärenbakterien ausgelöst werden kann (Pieterse *et al.*, 1996). Die induzierte systemische Resistenz (ISR) verläuft im Gegensatz zur systemischen Resistenz (SAR) Salicylsäure-unabhängig. Dabei werden die Pflanzen in eine Art 'Alarmbereitschaft' versetzt, die sie wesentlich schneller auf einen Befall von Phytopathogenen reagieren lässt. Am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas fluorescens* WCS417r wurde versucht, die Zusammenhänge der Signalinduktionen zu verstehen (Pieterse *et al.*, 2001). Biokontrollaktive Bakterien können so auch durch die einfache Besiedlung von Wurzeln eine Art der Abwehrreaktion stimulieren. Eine Salicylsäure-abhängige SAR wurde in Bohnenpflanzen durch die Besiedlung von *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 ausgelöst (Meyer *et al.*, 1999), während *Serratia marcescens* eine SA-unabhängige systemische Resistenz in Gurken- und Tabakpflanzen induziert (Press *et al.*, 2001). Als Auslöser der entsprechenden Pflanzenreaktion werden verschiedene Metabolite der Bakterien vermutet. Eine direkte Beeinflussung der Pflanze durch AHL-Signalmoleküle von Gram-negativen Bakterien konnte kürzlich am Beispiel der symbiontisch lebenden Bakterien, *Sinorhizobium meliloti* und *Pseudomonas aeruginosa*, an *Medicago truncatula* nachgewiesen werden (Mathesius *et al.*, 2003). Umgekehrt können Pflanzen auch durch Ausscheidungen verschiedener Stoffwechselprodukte (Exsudate) die Rhizosphärenpopulation beeinflussen (Lugtenberg *et al.*, 1999) und so verschiedene Bakterien zu Biokontrollaktivitäten anregen (Kravchenko *et al.*, 2003).

A.4 *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida*

In dieser Arbeit wurden Gram-negative Rhizosphärenbakterien der Gattung *Serratia* und *Pseudomonas* verwendet. Nach Sequenzanalyse der 16S-rDNS Gene werden beide der Untergruppe der γ -Proteobakterien zugeordnet. Die verwendeten Bakterienstämme von *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* kommen ubiquitär vor, wobei viele Vertreter in der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen zu finden sind. Auch Humanpathogene und Isolate aus aquatischen Systemen sind bekannt (Starr *et al.*, 1981). Bei beiden Wildtypstämmen, *S. liquefaciens* MG1 und *P. putida* IsoF, konnten Biokontrollaktivitäten in der Rhizosphäre von Pflanzen nachgewiesen werden (Givskov & Molin, 1992; Steidle *et al.*, 2001).

Serratia liquefaciens gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein Isolat von Gurken (Givskov *et al.*, 1988). *S. liquefaciens* ist beweglich und produziert verschiedene Exoenzyme, wie z. B. Proteasen, Lipasen oder Nukleasen (Givskov *et al.*, 1997). Der Wildtypstamm *S. liquefaciens* MG1 reguliert mittels der AHL-Signalmoleküle, *N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton (BHL) und *N*-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (HHL) in einem molaren Verhältnis von 10:1 die Produktion des Proteins Serrawettin (Swr). Serrawettin setzt die Oberflächenspannung herab und ist somit essentiell für das Schwärmen (Gleiten) von *S. liquefaciens* über feste Oberflächen (Eberl *et al.*, 1996). Bei *S. liquefaciens* MG44, einer AHL-negativen Mutante von *S. liquefaciens* MG1, führte eine Knock-out Mutation des *swrI* Genes (LuxI-homolog, s. o.) zu einer fünffach reduzierten Enzymaktivität und zum Verlust der Schwärmfähigkeit (Eberl *et al.*, 1999).

Pseudomonas putida IsoF gehört zur Familie der *Pseudomonaceae* und wurde aus der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen isoliert (Steidle *et al.*, 2001). Von *P. putida* IsoF sind drei verschiedene AHL-Signalmoleküle bekannt: *N*-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (HHL), *N*-3-oxo-Decanoyl-L-Homoserinlacton (DHL) und *N*-3-oxo-Dodecanoyl-L-Homoserinlacton (dDHL) (Steidle *et al.*, 2002). Welche genauen Eigenschaften durch diese AHL-Signalmoleküle bei *P. putida* gesteuert werden, ist noch nicht vollständig bekannt. In *P. putida* scheint das Gen *ppuA*, welches für die Expression einer Fettsäuren-CoA-Ligase codiert, mittels AHL reguliert zu werden (A. Steidle, Dissertation, 2002). Eine solche Regulation scheint auch für die Bildung von Biofilmen auf abiotischen Oberflächen zu existieren. Um genauere Kenntnisse zur Wirkungsweise und Steuerung von AHL regulierten Eigenschaften von *P. putida* zu bekommen, wurde neben dem Wildtyp auch eine AHL-negative Mutante eingesetzt. Bei diesem Stamm *P. putida* F117 war durch Mutagenese das Gen der AHL-Synthase *ppuI* ausgeschaltet (Steidle *et al.*, 2002).

A.5 Ziele dieser Arbeit

Bei pflanzenassoziierten Bakterien ist die zelldichteabhängige Regulation verschiedener Gene durch *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) weit verbreitet. Auch Gene, welche für die Biokontrollwirkung von Bakterien gegen Phytopathogene in der Rhizosphäre verantwortlich sind, werden auf diesem Weg reguliert. Eine Rolle von AHL-produzierenden Bakterien bei der Induktion der systemischen Resistenz bei dicotylen Pflanzen ist jedoch noch kaum bekannt. Im Rahmen eines vom BMBF-finanzierten Projektes sollte die Mikrobiologie von AHL-regulierten Bakterien in der Rhizosphäre untersucht werden. Die Bakterienstämme, *Serratia liquefaciens* MG1 und *Pseudomonas putida* IsoF, die zusammen das Spektrum der kurz- und langkettigen AHL-Signalmoleküle abdecken, sollten dazu eingesetzt werden. Als Modellorganismus einer dikotylen Pflanze wurde die Tomatenpflanze in einer kleinwüchsigen Zuchtform (MicroTom[®]) gewählt. In dieser Arbeit sollte anhand von Besiedlungsstudien festgestellt werden, ob *Serratia liquefaciens* MG1 als ursprüngliches Isolat von Gurke auch an Tomatenwurzeln siedelt und ob eine vollständige Besiedlung festzustellen ist. *Pseudomonas putida* IsoF, ein Isolat aus der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen, diente als Vergleichsorganismus und wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001) untersucht. Mittels AHL-negativer Mutanten, die zu keiner AHL-Produktion mehr befähigt waren, sollte die Rolle von AHL auf die Besiedlung der Rhizosphäre durch *in situ*-Studien ermittelt werden. Dazu sollte sowohl in einem mikrobiologisch komplexen Bodensystem als auch in einem sterilen, axenischen Pflanzensystem gearbeitet werden. Anhand des Bodensystems sollte ferner der Einfluß der inokulierten AHL-produzierenden Bakterien auf die natürliche Rhizosphärenpopulation untersucht werden. Aufschluß darüber sollten Techniken der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und der terminalen Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus (t-RFLP)-Analyse geben. Anhand von Sensorstämmen sollte die *N*-Acyl-L-Homoserinlacton-Produktion der inokulierten Bakterien *in situ* in der Rhizosphäre von Tomatpflanzen nachgewiesen werden. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden im BMBF-Projektverbund in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Leo Eberl (TU-München) die genetische Regulation von *Pseudomonas putida* IsoF entschlüsselt, sowie spezifische Mutanten und Sensor-Konstrukte entwickelt (A. Steidle, Dissertation, 2002). In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christian Langebartels (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF-Neuherberg) wurde die Resistenzvermittlung von *Serratia liquefaciens* MG1 gegen verschiedene Pilze an Tomate getestet (R. Schuegger, Dissertation, 2003).

B Material und Methoden

B.1 Allgemeine Materialien

Für die Herstellung aller Lösungen und Puffer wurde entweder einfach entionisiertes Wasser, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$, oder speziell filtergereinigtes Wasser, $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst.}}$, aus einer Reinstwasseranlage (EasypureTM UV / UF D8612-33, Werner GmbH, Leverkusen, D) verwendet. Der pH-Wert wurde mit NaOH- und HCl-Lösungen verschiedener Molaritäten an einem pH-Meter (InoLab, WTW, Weilheim, D) eingestellt. Abweichungen davon sind gesondert vermerkt. Chemikalien wurden, soweit dies nicht anders angegeben ist, in p.a. Qualität verwendet. Zur Entwässerung von pflanzlichem oder bakteriellem Zellgewebe wurde technisches Ethanol (EtOH), hingegen zu analytischen Zwecken 100 %iges Ethanol ($\text{EtOH}_{\text{abs.}}$, Merck, Frankfurt, D) eingesetzt.

B.1.1 Lösungen und Puffer

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Standardpuffer und Lösungen sind im folgenden aufgelistet. Spezielle Reagenzien sind in den jeweiligen Kapiteln extra aufgeführt.

10 x PBS

NaH_2PO_4 (100 mM)	12 g
Na_2HPO_4 (100 mM)	14,2 g
NaCl (1,3 M)	75,97 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$	ad 1000 ml
pH 7,3	

Bei Verwendung niedriger Konzentrationen wurde die Stammlösung entsprechend verdünnt.

PBS/Glycerin-Lösung

1 x PBS wurde im Verhältnis 1:1 mit Glycerin gemischt und anschließend autoklaviert.

MgSO₄-Lösung (10 mM)

MgSO_4	2,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$	ad 1000 ml

Material und Methoden

Sucrose-Lösung (4 % w/v)

Sucrose (Saccharose)	4 g
H ₂ O _{dem.}	ad 100 ml

Die Lösung wurde steril filtriert (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Eschborn, D).

EDTA-Lösung (0,5 M)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	186 g
NaOH Plätzchen	20 g
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 8,0	

SDS-Lösung (10 % w/v)

Natriumdodecylsulfat	1 g
H ₂ O _{reinst}	ad 10 ml

NaCl (5M)

NaCl 5 M	292,2 g
in H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml

Carbonatpuffer

NaHCO ₃ (1 M)	84 g
Na ₂ CO ₃ (1 M)	106 g
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 9,0	

Tris/HCl (1M)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	157,6 g
H ₂ O _{reinst}	ad 1000 ml
pH 8,0	

Formamid

Deionisiertes Formamid (Sigma, Taufkirchen, D) wurde zu 50 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aufgetautes Formamid konnte, bei 4°C dunkel gelagert, eine Woche lang verwendet werden.

B.1.2 Sterilisation

Die verwendeten Puffer, Lösungen sowie Verbrauchsmaterialien wurden in Wasserdampf-hochdruckautoklaven (Varioklav Typ 300E bzw. Vapoklav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, München, D) für 20 min bei 121°C und konstantem Druck von $1,013 \times 10^5$ Pa sterilisiert. Hitzelabile Substanzen und Hemmstoffe (z. B. Antibiotika) wurden den jeweiligen Lösungen nach dem Autoklavieren bei etwa 50°C Medientemperatur unter sterilen Bedingungen als konzentrierte Stammlösung zugegeben (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, D).

B.2 Verwendete Mikroorganismen

B.2.1 Mikroorganismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen und ihre jeweilige Herkunft sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Stamm	Eigenschaften	Resistenz	Quelle
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	Wildtyp	Amp, Tc	Eberl <i>et al.</i> , 1996
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44	AHL-negative Mutante	Amp, Tc	Givskov <i>et al.</i> , 1998
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1 chromosomal <i>gfp</i> -markiert	Wildtyp	Amp, Km, Tc	A. Steidle, TU-München
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44 chromosomal <i>gfp</i> -markiert	AHL-negative Mutante	Amp, Km, Tc	A. Steidle, TU-München
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF	Wildtyp	-	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF Plasmid pUT-Kan <i>rfp</i> -markiert	Wildtyp	Km	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF Plasmid pJBA28	Wildtyp	Km	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> F117 Plasmid pUT-Tc <i>rfp</i> -markiert	AHL-negative Mutante	Tc	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> F117 Plasmid pUT-Tell <i>gfp</i> -markiert	AHL-negative Mutante	Km	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i> F117 Plasmid pKR-C12 “Sensorkonstrukt”	AHL-negative Mutante	Gm, Km	Steidle <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 417r	Wildtyp	-	Duijff <i>et al.</i> , 1997
<i>Escherichia coli</i> K12	Wildtyp	-	DSMZ 5698

B.2.2 Nährmedien, Anzucht und Stammhaltung der Mikroorganismen

B.2.2.1 Nährmedien

Zur Anzucht der oben aufgeführten Bakterien wurden folgende Nährmedien verwendet:

LMGI Medium (Groningen, NL)

Lab Lemco Fleischextrakt	1 g
Hefe-Extrakt	2 g
Pepton (aus Casein)	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml
pH 7,4	

NB-Medium

Fleischextrakt	1 g
Pepton (aus Casein)	5 g
H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml
pH 7,0	

Zur Verfestigung der Medien wurde den Nährlösungen vor dem Autoklavieren 15g / l Agar (Fa. Nierle, Freising, D) zugegeben. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Medien in einem Dampfdrucksterilisator autoklaviert bzw. hitzelabile Substanzen, wie z. B. Antibiotika erst nach dem Autoklavieren dem handwarmen Medium steril filtriert zugegeben (vgl. B.1.2).

B.2.2.2 Anzucht der Mikroorganismen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf Agarplatten oder in Nährlösungen im Brutschrank (New Brunswick Scientific, Edison, USA) über Nacht bei 30° C. Zur Anzucht wurden Bakterien in entsprechenden Nährlösungen (s. o.) auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific, Edison, USA) bei 30° C und 125 rpm über Nacht inkubiert.

B.2.2.3 Stammhaltung

Auf Agarplatten kultivierte Stämme wurden bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert. Danach wurde jeweils eine Kolonie auf frisches Nährmedium übertragen, bei 30°C über Nacht inkubiert und anschließend wieder bei 4°C gelagert.

Zur längerfristigen Stammhaltung wurde von jedem Stamm eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurden die Zellen in Flüssigmedium über Nacht (ÜN) angezogen, anschließend in 1 x PBS Lösung gewaschen und im geeigneten Volumen PBS/Glycerin-Lösung (vgl. B.1.1) resuspendiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Zur Wiederanzucht wurde eine Impföse der aufgetauten Kultur auf einer Agarplatte mit entsprechendem Nährmedium ausgestrichen. Alternativ wurde die Aufbewahrung mittels Kunststoffperlen (Microbank™, Pro-Lab, Ontario, Canada) genutzt. Hierzu wurden 1 ml einer ÜN-Kultur (vgl. B.2.2.2) in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit "Microbeads" gefüllt, 1 min geschüttelt, anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Eppendorfreaktionsgefäß mit den Kunststoffperlen wurde bei -80°C eingelagert.

B.2.2.4 Antibiotika

Zur Anzucht der Stämme unter Selektionsdruck wurde das entsprechende Antibiotikum dem autoklavierten Medium bei ca. 50°C Medientemperatur unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Hemmstoffe sind in folgender Tabelle zusammengefaßt. Angesetzt wurden jeweils 1.000-fach konzentrierte Stammlösungen der Antibiotika, steril filtriert (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Eschborn, D) und bei -20°C gelagert. Mit Antibiotika versehene Nährmedien konnten bis zu einem Monat bei 4°C dunkel gelagert werden.

Tabelle B.2.2.4: Auflistung der verwendeten Antibiotika mit Angabe zur Wirkungsweise und Herstellung.

Antibiotikum	Wirkungsweise	gelöst in	Endkonzentration
Tetracyclin (Tc)	Hemmung der Proteinbiosynthese	Methanol	10 mg / ml
Kanamycin (Km)	Hemmung der Proteinbiosynthese	H ₂ O _{reinst}	50mg / ml
Gentamycin (Gm)	Hemmung der Proteinbiosynthese	H ₂ O _{reinst}	20 mg / ml
Ampicillin (Amp)	Hemmung der Zellwandsynthese	H ₂ O _{reinst}	100 mg / ml

B.3 Versuchspflanzen

Als Modellorganismen dienten Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom[®]. Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch die geringe Wuchshöhe von max. 15 – 20 cm leichter zu handhaben sind (Meissner *et al.*, 1997).

B.3.1 Pflanzenanzucht

Zur Anzucht der Pflanzen wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Einerseits ein steriles d.h. axenisches System zur Untersuchung der Rhizosphärenbesiedlung der inokulierten Bakterien, unbeeinflusst von anderen Mikroorganismen, andererseits ein nicht steriles Bodensystem. Hier sollten die Wechselwirkungen mit natürlich vorkommenden Rhizosphärenpopulationen untersucht werden.

Die äußeren Wachstumsbedingungen waren in beiden Systemen gleich. Es wurden Klimakammern (Heraeus, Vötsch, Balingen, D) mit Leuchtstoffröhren (FR 96T12215 W, „cool white“, Sylvania, Phillipps) verwendet bei einer konstanten Temperatur von tagsüber 25°C (14h) und nachts 20°C (10h), sowie einer Luftfeuchtigkeit von 70 [±] 5 %.

B.3.2 Oberflächensterilisation der Tomatensamen

Vor der Aussaat wurde die Oberfläche der Tomatensamen (Bruno Nebelung GmbH & Co, Kiepenkerl-Pflanzenzüchtung, Everswinkel, D) sterilisiert. Diese Oberflächensterilisation wurde mit Samen für das axenische und das Bodensystem durchgeführt.

Lösungen:

Natriumhypochlorid (NaOCl)

Eine 10-13 % NaOCl-Lösung (Sigma, Taufkirchen, D) wurde unmittelbar vor Gebrauch mit sterilem H₂O_{dem.} auf ca. 5 % verdünnt.

Durchführung

Die Tomatensamen wurden drei Minuten in 6 ml H₂O_{dem.}, das mit zwei Tropfen Tween 20 versetzt war, gewaschen. Danach wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Samen mit sterilem H₂O_{dem.} gewaschen, mit 80% EtOH bedeckt und der Ansatz drei Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde verworfen, die Samen mit einer 5 %igen NaOCl-Lösung bedeckt und 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die NaOCl-Lösung wurde abgenommen, verworfen und die so sterilisierten Samen fünfmal mit sterilem H₂O_{dem.} gewaschen,

um Reste des NaOCl zu entfernen. Zur Kontrolle der Sterilität wurden jeweils ein paar der so aufbereiteten Samen auf einer NB-Agarplatte bei 30°C inkubiert.

B.3.3 Das axenische System

Nährlösung (Simons *et al.*, 1996)

Die im axenischen System verwendete Nährlösung setzte sich aus gelösten Salzen und Spurenelementen, wie im folgenden beschrieben, zusammen. Angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen.

Salzlösung

KNO ₃ (5 mM)	0,51 g / l	} (1:1 gemischt)
Ca(NO ₃) ₂ (5 mM)	1,18 g / l	
MgSO ₄ (2 mM)	0,24 g / l	
KH ₂ PO ₄ (1 mM)	0,17 g / l	

Die Salze wurden in H₂O_{dem.} gelöst und steril filtriert. Der jeweilige Ansatz der Stammlösung erfolgte in 100-facher Konzentration.

Spurenelemente

FeEDTA	4,6 mg / l
MnSO ₄ x H ₂ O	16,7 mg / l
H ₃ BO ₃	6,2 mg / l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,6 mg / l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 mg / l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg / l
CoCl x 6 H ₂ O	25 mg / l

Die Spurenelemente wurden in 1.000-facher Konzentration in H₂O_{dem.} angesetzt und steril filtriert. Die Spurenelementelösung wurden 1:1 gemischt, mit Ausnahme des FeEDTA. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Im axenischen System wurden durchsichtige Kunststoffboxen (PhytaTray[®], Sigma, Taufkirchen, D) verwendet, die unter sterilen Bedingungen mit 250g autoklavierten Quarzsand (Dorsilit, Fa. Sakret, Ottobrunn, D) befüllt wurden. Hierzu wurden die Boxen mit Quarzsand der Korngrößen 2-3,5 mm [Nr. 3] und 0,6–1,2 mm [Nr.7] im Verhältnis 4:1 befüllt und mit je 20 ml Nährlösung (Simons *et al.*, 1996) versetzt. Pro Box wurden 10-12 oberflächensterilisierte Tomatensamen ausgesät, indem jene leicht unter den Quarzsand geschoben wurden. Die PhytaTray-Boxen wurden anschließend verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Nach ca. 2 Wochen in der Klimakammer (BIOP, Kammernr. 5) keimten die Samen und konnten mit Bakterien inokuliert werden. Aus Gründen der Sterilität mußten die Boxen außer zur Probenahme stets verschlossen bleiben. Die Pflanzen konnten maximal 8 Wochen in den Boxen gehalten werden. Zur Inokulation wurden die Tomatenpflanzen im axenischen System entweder mit einem Mikroorganismus (monoxenisch) oder mit zwei Mikroorganismen (dixenisch) beimpft (vgl. B.4.1).

B.3.4 Das Bodensystem

Als Bodensystem wurden Tomatenpflanzen in Blumentöpfen eingesetzt, die mit Standardboden des Typs T (Weißtorf, Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa, D) befüllt wurden. Dieser Boden war gedämpft, um darin vorkommende Pilze zu entfernen.

Eigenschaften des Bodens (nach Herstellerangaben)

Weißtorf, Ton, Typ 2 mittel:

pH-Wert	6,0
Salzgehalt	3,0 g / l
Stickstoffgehalt	320 mg / l
P ₂ O ₃	320 mg / l
K ₂ O	450 mg / l

Der Boden wurde ohne weitere Behandlung der Verpackung entnommen und in Blumentöpfe überführt. Die oberflächensterilisierten Tomatensamen wurden zunächst in einem größeren Topf ausgesät und die Keimlinge nach einer Woche Wachstum in Blumentöpfe vereinzelt (pikiert). Die einzelnen Töpfe wurden in Schalen gestellt, alle drei Tage mit deionisiertem Wasser gegossen und einmal pro Woche mit gelöstem Substral (30 µl / l H₂O_{dem.}, Thomson GmbH, Düsseldorf, D) gedüngt. Nach einer weiteren Woche standen die Pflanzen zur Inokulation zur Verfügung.

B.4 Inokulation der Tomatenpflanzen

Je Versuchsreihe wurden für jeden Probenahmezeitpunkt drei parallele Ansätze inokuliert. Entsprechend viele Pflanzen und zu inokulierende Bakteriensuspension mußten dazu angezogen werden. Dies galt besonders für die Inokulation der Pflanzen im Bodensystem (vgl. B.4.3).

B.4.1 Bestimmung der Zellzahl zur Inokulation verwendeter Bakteriensuspension

Zur Bestimmung der Zellzahl der Bakteriensuspensionen wurden Verdünnungsreihen mit 10 mM MgSO₄-Lösung angesetzt und nach der Methode von Miles und Misra (1938) (vgl. Abb. B.4.1) auf Nähragarplatten die Keimzahl bestimmt. Je Verdünnungsstufe erfolgte hier eine Bestimmung der Zellzahl in fünffacher Wiederholung. Dabei wurden auf LMGI-Agarplatten vier Verdünnungsstufen durch Auftropfen von je 10 µl aufgebracht und für 16 bis 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

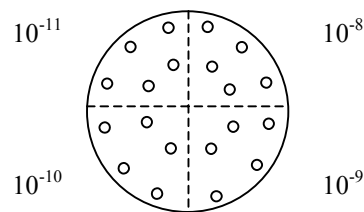


Abbildung B.4.1: Keimzahlbestimmung nach Miles und Misra. Skizze einer Agarplatte mit vier Verdünnungsstufen. Jedes der vier Felder enthält fünf Tropfen (10 µl) der Bakterienkultur in entsprechender Verdünnung.

B.4.2 Inokulation von Tomatenpflanzen im axenischen System

B.4.2.1 Das monoxenische System

Die Tomatenpflanzen wurden zehn bis elf Tage nach der Aussaat mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert. Die Inkubationsdauer betrug je nach Experiment sechs Stunden, einen Tag oder sieben Tage.

Durchführung:

Zellen einer unter selektiven Bedingungen (vgl. B.2.2.4) gewachsenen ÜN-Kultur wurden in 50 ml Polypropylen (PP)-Röhrchen (Greiner, Nürtingen, D) überführt und abzentrifugiert (10 min bei 3500 G). Der Zentrifugationsrückstand wurde mit 10 mM MgSO₄-Lösung

gewaschen und anschließend in einem geeignetem Volumen von 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Jeweils 500 µl der so behandelten Zellsuspension wurden unter sterilen Bedingungen am Wurzelansatz der Tomatenpflanze ausgebracht. Anschließend wurden die PhytaTray[®]-Kunststoffboxen erneut mit Parafilm verschlossen und in der Klimakammer für die Dauer der Inokulation inkubiert. Um mögliche Kontaminationen erkennen zu können, wurde je Versuchsreihe eine PhytaTray[®]-Box als Negativkontrolle nur mit 10 mM MgSO₄-Lösung inokuliert.

B.4.2.2 Das dixenische System

Das Gesamtvolumen des Inokulats je Pflanze (= 500 µl) änderte sich nicht. Bei Zugabe mehrerer Bakterienstämme wurde dieses Gesamtvolumen durch die Anzahl der zu inokulierenden Bakterienstämme geteilt, um den Anteil von jedem Inokulat bestimmen zu können. Die einzelnen Inokulationen erfolgten um ca. 2-3 min. zeitversetzt, um ein gleichmäßiges Einsickern der Bakterienlösung zu ermöglichen.

Bei Zugabe der Sensorstämme wurde der AHL-produzierende Bakterienstamm *Pseudomonas putida* IsoF (pUT-Kan-*rfp*) in variabler Zelldichte und der Sensorstamm *Pseudomonas putida* F 117 (pKRC12) in konstanter Zelldichte inokuliert. Die Zellen der ÜN-Kulturen wurden in 10 mM MgSO₄-Lösung gewaschen und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen der beiden Bakterienstämme im Verhältnis 1:1 gemischt und sofort auf Eis gekühlt, um eine mögliche Aktivierung des Sensorkonstrukts vor der Inokulation auszuschließen. Jeweils 500 µl dieser Suspensionen wurden unter sterilen Bedingungen direkt an den Wurzelansatz einer Tomatenpflanze pipettiert. Anschließend wurden die PhytaTray[®]-Kunststoffboxen wieder mit Parafilm verschlossen und in einer Klimakammer inkubiert.

Um eine Aktivierung des Sensors in Abwesenheit eines AHL-Produzenten erkennen zu können, wurden entsprechende Negativkontrollen durchgeführt. Neben der PhytaTray[®]-Box zur Sterilitätskontrolle wurde jeweils eine PhytaTray[®]-Kunststoffbox verwendet, in welcher nur der Sensorstamm zusammen mit der AHL-negativen Mutante *Pseudomonas putida* F117 (pUT-Tc-*rfp*) inokuliert wurde. Da sowohl Sensorstamm als auch die AHL-Negativmutante keine AHL-Signalmoleküle produzieren können, sollte dort auch keine Aktivität des Sensors feststellbar sein. Die Inkubationsdauer betrug je nach Experiment sechs Stunden, einen Tag oder sieben Tage.

B.4.3. Inokulation von Tomatenpflanzen im Bodensystem

Die Inokulation der Tomatenpflanzen im Bodensystem erfolgte zwei Wochen nach der Aussaat, d. h. eine Woche nach dem Pikieren. Die Vorbereitungen zur Inokulation entsprachen denjenigen im sterilen System. Abweichend dazu wurden hier pro Pflanze 1 ml der in 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommenen Bakterien am Wurzelansatz ausgebracht. Auch hier wurden Negativkontrollen durchgeführt. Nach der Inokulation blieben die Pflanzen in der Klimakammer stehen. Die Inkubationsdauer betrug wie im sterilen System je nach Experiment sechs Stunden, einen Tag oder sieben Tage.

B.5 Ernte der Wurzeln

Zu jedem Probennahmezeitpunkt wurden drei parallele Pflanzenansätze geerntet.

B.5.1 Steriles System

Die Wurzeln der Tomatenpflanzen wurden nach entsprechender Inkubationszeit unter sterilen Bedingungen geerntet. Dazu wurden die Pflanzen vorsichtig mit einem sterilen Löffel untergraben, angehoben und mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus dem Quarzsand herausgezogen. An der Wurzel anhaftende Sandkristalle wurden vorsichtig abgeschüttelt oder mit Hilfe einer Pinzette oder eines Spatels entfernt. Der Sproß und die Wurzel wurden nach Länge und Sproßblattanzahl vermessen, um das Entwicklungsstadium der Pflanze protokollieren zu können. Die Wurzel wurde anschließend vom Sproß getrennt und entweder frisch mikroskopiert (vgl. B.10.1) oder gewogen und zur Bestimmung der Zellzahl der anhaftenden Bakterien gemörsert (vgl. B.5.3).

B.5.2 Bodensystem

Die Ernte der Wurzel aus dem Bodensystem erfolgte ebenfalls nach den entsprechenden Inkubationszeiten. Hierzu wurde, wie im folgenden beschrieben, verfahren:

Vom Pflanzensproß wurde zunächst die Wuchsgröße bestimmt und die Anzahl der Blätter protokolliert, sowie das eventuelle Vorhandensein von Blüten. Dann wurden die Pflanzen vorsichtig aus ihren Blumentöpfen entnommen. Mit der Hand wurde der locker anhaftende Boden vorsichtig abgebröselst und der an der Wurzel fest anhaftende Boden je Pflanzenreihe in vier einzelnen Waschschritten mit 1 x PBS entfernt. Während Grobpartikel durch vorsichtiges Eintauchen der Wurzel in die sterile PBS-Lösung entfernt werden konnten, mußten die feineren Bodenpartikel mittels Pinzette aus der Wurzelhaarzone vorsichtig

entfernt werden. Anschließend wurde die Wurzel nach ihrer Länge vermessen, vom Sproß geschnitten, auf einem Papiertuch kurz abgetropft und gewogen. Nur die jeweiligen Parallelproben wurden in derselben Lösung gewaschen. Für jede Probe wurde zu verschiedenen Erntezeiten und verschiedener Inokulation eine neue PBS-Lösung verwendet. Die Wurzeln konnten nun zu Besiedlungsstudien mikroskopiert werden oder zur Bestimmung der Zellzahl gemörsert werden.

B.5.3 Aufbereitung der Wurzel

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Wurzelproben nach der Ernte wie folgt aufbereitet: Mörser und Pistill wurden mit EtOH_{abs.} gespült und abgeflammt. Daraufhin wurden die Wurzeln unter sterilen Bedingungen einzeln in 4 % Sucroslösung, in zuvor sterilisierten Mörsern mit einem Pistill fein zerrieben. Die Wurzeln aus dem axenischen System wurden jeweils in 1 ml steriler Sucroslösung (4 %ig) zerrieben, die Wurzeln aus dem Bodensystem jeweils in 2 ml. Die Suspension wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Köln, D) überführt. Aus einem Teil dieser Suspension wurde die Zellzahl bestimmt und der Rest wurde bis zur Fixierung (vgl. B.5.4) auf Eis gelagert.

B.5.4 Zellfixierung mit Paraformaldehyd-Lösung

4 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (Amann *et al.*, 1990):

45 ml H₂O_{reinst} wurden auf 60 – 65 °C erhitzt und nach Zugabe von 2,5 g Paraformaldehyd (PFA) tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt, bis die Lösung klar wurde. Anschließend wurden 5 ml 10 x PBS zugegeben, die Lösung auf ca. 20 °C abgekühlt und der pH-Wert auf 7,2-7,4 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert (0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn, D) und bis zum Gebrauch innerhalb einer Woche bei 4 °C verwahrt. Zur längeren Lagerung wurde die Lösung bei –20 °C gelagert.

B.5.4.1 Fixierung von gemörserten Wurzeln

Das in Sucroselösung zerriebene Wurzelmaterial (vgl. B.5.3) wurde bei 4 °C für 5 min bei 5000 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in einer 3:1 Mischung Paraformaldehyd-Lösung (4 %) zu PBS (1 x) aufgenommen. Der Fixierungsansatz wurde für mindestens eine Stunde bis über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 x PBS-Lösung zweimal gewaschen und anschließend zur Lagerung bei –20 °C in einem Gemisch aus eiskaltem EtOH_{abs.} und 1 x PBS (1:1) aufgenommen.

B.5.4.2 Fixierung ganzer Wurzeln

Die von Quarzsand bzw. Boden befreiten Wurzeln wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem 15 ml PP-Röhrchen (Falcon, Köln, D) bzw. einem 50 ml PP-Röhrchen (Greiner, Nürtingen, D) in einer Mischung aus drei Teilen 4 % Paraformaldehyd-Lösung und einem Teil 1 x PBS inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Wurzeln mit 1 x PBS-Lösung zwei bis dreimal vorsichtig gespült, um PFA-Reste zu entfernen. Die Waschlösung wurde verworfen und die Wurzeln in einer 1:1 Lösung aus 1 x PBS und eisgekühltem EtOH_{abs.} verwahrt. Die Lagerung der fixierten Wurzeln erfolgte bei –20°C. Eine Trockenlagerung nach Fixierung wurde vermieden, um die Wurzelhaarzonen nicht zu beschädigen.

B.6 Wurzelbesiedlungsstudien

B.6.1 Untersuchung von Epiphyten

Zur Untersuchung des Besiedlungsverhaltens der inokulierten Bakterien, die auf der Wurzeloberfläche, der Rhizoplane, siedeln (epiphytisch leben), wurden Wurzelproben aus dem axenischen System zu entsprechenden Erntezeiten, meist nach einem Tag oder einer Woche Inkubation, genommen und entweder PFA-fixiert (vgl. B.5.4) oder frisch eingesetzt. Die an den Wurzeln zu untersuchenden Bereiche wurden mittels eines sterilen Skalpell unter einem Stereoskop (Olympus Optical, Planegg, D) von der Gesamtwurzel getrennt und auf einen Objektträger gelegt. Hierzu wurde die Wurzel in eine Petrischale unter das Stereoskop (s. o.) gelegt und mit 1 x PBS betropft, um die Wurzelhaarzone besser lokalisieren zu können. Anschließend wurde ein Tropfen Citifluor zugesetzt und der Objektträger mit einem Deckglas versehen. Citifluor ist ein PBS / Glyceringemisch mit einem zugesetzten "Quencher", der ein

Ausbleichen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe verzögert. Die Untersuchungen der Wurzelbesiedlungen erfolgten an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM; vgl. B.10.2.2).

B.6.2 Untersuchung endophytischer Wurzelbesiedlung

B.6.2.1 Oberflächensterilisation der Wurzeln

Zur Feststellung, ob die inokulierten Bakterien auch in den Wurzeln siedeln (endophytisch leben), wurde eine Oberflächensterilisation nach Pirtillä *et al.* (2000) durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende Wurzel ungeschnitten in einem Falconröhrchen mit 70% EtOH 1 min und anschließend für 20 min in 6 % iger Natriumhypochlorid-Lösung (verdünnt mit 1 x PBS) inkubiert. In Abwandlung zur originalen Beschreibung wurde die Wurzel anschließend 7 x mit H₂O_{dem.} gespült und darauf 2 x zu je 15 min in aufsteigender Ethanolkonzentration (EtOH_{abs.}: 50%, 70%, 100%) dehydratisiert.

B.6.2.2 Anfertigung von Mikrotomschnitten

Die entsprechend obiger Anweisung oberflächensterilisierten und entwässerten Wurzeln wurden zur Anfertigung von Präparatschnitten 2 x je 15 min in meta-Xylol (m-Xylol) (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, D) eingelegt und anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit m-Xylol bedeckt. Die präparierten Wurzeln wurden in Paraffin eingegossen und die erstarrten Paraffinblöcke anschließend mittels eines Mikrotoms (Microtom HM355, Microtom GmbH, Walldorf, D) in Schichtdicken von 10 – 15 µm geschnitten. Die Wurzelschnitte wurden auf Objektträgern wieder in m-Xylol (5 bis 10 min) gewaschen, um vom Paraffin wieder befreit zu werden. In einem nachfolgenden Waschschrift mit 100 %igem EtOH_{abs.} wurden dann das m-Xylol entfernt.

B.7 Bestimmung der Zellzahl wurzelassoziierter Bakterien

B.7.1 Koloniezählungsverfahren

Um den Titer wurzelassoziierter Bakterien zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen von den in 4 % Sucrose-Lösung gemörserten Wurzeln (vgl. B.5.3.) angelegt. Dazu wurde die Wurzel-Sucrose-Lösung zunächst im Ultraschallbad (Sonorex RK 100, Bandelin, Berlin, D) 1 - 2 min behandelt, um an Wurzelresten anhaftende Bakterien zu lösen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen mit 10 mM MgSO₄ angesetzt. Es wurden vier Verdünnungsstufen

(10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) in fünffacher Wiederholung auf LMGI-Platten nach der Methode von Miles und Misra (vgl. B.4.1) aufgetropft. Die Platten wurden für 16 bis 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Durch Auszählen der Kolonien wurde die Zahl wurzellosoziierter Bakterien bestimmt. Es wurde weiterhin stets eine Negativkontrolle mit nicht inokuliertem Wurzelmaterial mitgeführt.

B.7.2 Immobilisierung bakterieller Zellen auf Polycarbonatfiltern

Die fixierte Wurzelsuspension (vgl. B.7.1.) wurde für 1 - 2 min im Ultraschallbad behandelt (Sonorex RK 100, Bandelin, Berlin, D). Um Wurzelreste zu entfernen, wurden anschließend 5-10 µl der Zellsuspension durch einen mit 1 ml 1 x PBS befeuchteten Gazefilter (Maschenweite 37 µm, Bückmann, Mönchengladbach, D) filtriert und in einem 15 ml Probengefäß (Greiner, Nürtingen, D) aufgefangen. Um die möglicherweise am Gazefilter anhaftenden Bakterien zu entfernen, wurde 4 mal mit je 1 ml 1 x PBS nachgespült, wobei das Filtrat im gleichen Probengefäß aufgefangen wurde. Die gefilterte Bakteriensuspension wurde dann mit Hilfe einer Saugapparatur, bestehend aus Trichter (Sartorius AG, Göttingen, D), Saugflasche (Schott, Mainz, D) und einer Vakuumpumpe (Firma Leybold, Typ S 1,5, Köln, D), auf einem Polycarbonatfilter (Millipore Polycarbonatfilter, GTTP 0,2 µm, Eschborn, D) aufgebracht. Diese Saugflaschenapparatur wurde zunächst mit 70 %igem EtOH gespült. Beim Zusammenbau war darauf zu achten, daß die glänzende Seite des Polycarbonatfilters oben lag, die matte unten. Die Apparatur wurde nun mit 1 x PBS gespült und anschließend die gefilterte Wurzelsuspension am Glasrand des Trichters entlang auf den mit 1 x PBS befeuchteten Polycarbonatfilter in 1 ml Aliquots vor dem Anlegen eines Vakuums aufgebracht. Das Gefäß, in dem sich zuvor die Suspension befunden hatte, wurde mit 5-10 ml 1 x PBS nachgespült und die Spüllösung ebenfalls auf den Filter aufgetragen. Nach 2 min Wartezeit zur Sedimentierung der Probe wurde die Flüssigkeit mit Hilfe der Vakuumpumpe (s. o.) abgesaugt. Durch diesen Schritt sollte erreicht werden, daß sich die Zellen gleichmäßig auf dem Filter verteilen. Um die Polycarbonatfilter für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung vorzubereiten, wurden diese zur Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min mit 50 %, 80 % und 96 %EtOH_{abs.}) behandelt. Anschließend wurden die Polycarbonatfilter aus der Apparatur entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet. So fixierte Filter konnten staubgeschützt und dunkel gelagert über mehrere Monate verwendet werden.

B.7.2.1 Zählung von immobilisierten Bakterienzellen auf Polycarbonatfiltern

Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Zeiss Axioplan 2, Oberkochen, D), das mit einem Zählkular ausgestattet war. Die Kantenlänge des Gitternetzes, das sich in dem Zählkular befand, betrug bei Verwendung des 100 x Objektivs 126 µm. Damit konnte die mittels Gitternetz bestimmte Anzahl der Zellen in Relation zur gesamten Filterfläche gesetzt werden und damit die Gesamtzellzahl der Zellen, die auf dem Filter immobilisiert waren, berechnet werden.

Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ):

$$GZZ = \bar{x} \cdot M_F \cdot V$$

Legende:

\bar{x} = Mittelwert der ausgezählten Zellen je Zählgitter

M_F = Mikroskopiefaktor des verwendeten Epifluoreszenzmikroskops
Axioplan 2 von Zeiss: 21819x

V = verwendeter Verdünnungsfaktor

Der Mikroskopierfaktor ist aus der effektiven Filterfläche und der Fläche des verwendeten Gitternetzes zu berechnen:

$$M_F = \frac{\text{effektive Filterfläche } (\pi \cdot r^2)}{\text{Fläche Gitternetz}}$$

Der Radius bezieht sich auf die tatsächliche Saugfläche des Polycarbonatfilters (GTTP 0,2µm; Millipore, Eschborn, D). Sie beträgt bei den verwendeten Filtern 10,5 mm. Die Kantenlänge des Zählgitters bei Verwendung des 100x Objektivs ist 126 µm. Daher gilt:

$$GZZ = \frac{\bar{x} \cdot \pi \cdot (10,5 \text{ mm})^2 \cdot V}{(0,126 \text{ mm})^2}$$

Für die Gesamtzellzahl ergibt sich damit folgende Formel:

$$GZZ = \bar{x} \cdot 21819 \cdot V$$

Die Gesamtzellzahl wurde immer in Bezug auf 1 g (Frischgewicht, Fg) Boden oder Wurzel angegeben.

B.8 Statistische Auswertung der Gesamtzellzahlbestimmungen

B.8.1 Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung

Aus den Gesamtzellzahlen wurde zunächst der arithmetrische Mittelwert gebildet und die dazugehörige Standardabweichung wie folgt berechnet:

Arithmetrischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

x_i = Einzelwert

n = Anzahl der Einzelwerte

Standardabweichung

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i = Einzelwert

\bar{x} – arithmetrischer Mittelwert

n = Anzahl der Einzelwerte

B.8.2 Bestimmung der Signifikanz mittels U-Test nach Whitney und Mann

Als geeignete statistische Auswertungsmethode wurde der U-Test von Whitney und Mann (Lozan *et al.*, 1998) gewählt. Die zu vergleichenden Stichproben bestanden aus metrischen Daten der Zellzahl nach festgelegten Inkubationszeiten. Der U-Test sollte klären, ob den Werten zweier unabhängiger Stichproben X (Zellzahlen nach Inokulation von Wurzeln mit einem AHL-Produzenten) und Y (Zellzahlen nach Inokulation von Wurzeln mit einer AHL-negativen Mutante) die gleiche Verteilung zu Grunde liegt. Die Nullhypothese besagt, daß bei beiden Beobachtungen die gleiche homogene Verteilung zu Grunde liegt, d.h. daß kein biologischer Effekt erkennbar ist.

Dazu mußten folgende Voraussetzungen gegeben sein:

Die beiden Grundgesamtheiten (Ergebnisse aller Stichproben) sollen stetig verteilt sein und die gleiche Form besitzen. Zudem müssen die Stichproben unabhängig sein (sich nicht gegenseitig beeinflussen) und mindestens ordinalskaliert sein. Die Anzahl der Stichproben von A wird mit n_1 beschrieben und die Anzahl der Stichproben von B mit n_2 . Zunächst wurden die Stichprobenwerte zur Ordinalskalierung in eine gemeinsame Reihenfolge gebracht, sortiert nach der Wertgröße, d.h. der kleinste Wert aus beiden Stichproben erhielt die Rangzahl 1, der nächst größere die Rangzahl 2 usw...

Anschließend wurden die Summen der Rangzahlen (R_A und R_B) je Stichprobenreihe A und B berechnet, sowie im weiteren daraus die Werte U_1 und U_2 wie folgt bestimmt:

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2} - R_A$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - R_B$$

Der kleinere der beiden Größen von U_1 und U_2 wurde als U_{vers} definiert und mit einem empirischen U_{Tab} -Wert in einer U-Tabelle verglichen (Lozan & Kausch, 1998).

In der U-Tabelle ist das Signifikanzniveau α auf 0,05 % festgelegt.

Zur Auswertung gilt:

Ist $U_{\text{vers}} > U_{\text{Tab}}$ kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Das bedeutet, daß kein biologischer Effekt erkennbar ist, also kein signifikanter Unterschied zwischen den gewählten Stichproben A und B nachweisbar ist.

Ist $U_{\text{vers}} \leq U_{\text{Tab}}$ wird die Nullhypothese abgelehnt.

Es liegt ein biologischer Effekt vor. Die Stichproben A und B unterscheiden sich signifikant.

B.9 FISH – Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Zu Studien des Wurzelbesiedlungsverhaltens der inokulierten Bakterien wurde u. a. die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Bei der FISH binden (hybridisieren) fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden spezifisch an die ribosomale RNS (rRNS) 16S und 23S von Bakterien. Je spezifischer verwendete Oligonukleotidsonden binden, desto genauer kann eine phylogenetische Zuordnung der detektierten Bakterien erfolgen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Sonden dienten der Einteilung in eine Auswahl häufig in der Rhizosphäre vorkommender Untergruppen von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien (vgl. B.9.1.2). FISH ist nur an mit Paraformaldehyd (PFA) fixierten Bakterienzellen möglich, da PFA die Zellwandstruktur für das Eindringen der Oligonukleotidsonden modifiziert (vgl. B.5.4). Nicht hybridisierte, überschüssige Oligonukleotidsonden wurden bei der Präparation ausgewaschen, so daß nur spezifisch gebundene Sonden durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes detektiert wurden.

B.9.1 Oligonukleotidsonden mit Fluoreszenzfarbstoffen

Alle für die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotidsonden wurden vom Hersteller (Interactiva, Ulm, D) markiert (Fluoreszenzfarbstoffe: Fluorescein, Cy3 und Cy5) bezogen.

B.9.1.1 Photometrische Vermessung markierter Oligonukleotide

Die in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelösten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wurden zur Überprüfung der Qualität (Fluoreszenzstärke) im Verhältnis 1:100 in Carbonatpuffer (Fluorescein markierte Sonden) oder in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ (Cy3 und Cy5 markierte Sonden) verdünnt und im Spektralphotometer (CE 3021, Cecil Instruments Limited, Cambridge, GB) vermessen. Die Qualität der Farbstoffmarkierung konnte durch Bildung des Quotienten aus der Nukleotidabsorption (OD_{260}) und Farbstoffabsorption (Fluos: OD_{490} , Cy3: OD_{550} und Cy5: OD_{650}) errechnet werden. Bei vollständiger Umsetzung war der gemessene Wert gleich dem Quotienten der beiden molaren Extinktionskoeffizienten (\AA), was bei den verwendeten Farbstoffen und einer durchschnittlichen Länge der eingesetzten Oligonukleotide von 18 bp Werten von 2,5 – 3 entsprach. Die Konzentration der markierten Oligonukleotide wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$1 \text{ OD}_{260} \approx 20 \text{ \mu g ssDNS / ml}$$

Die Stammlösungen der markierten Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert. Aus diesen wurden durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ Arbeitslösungen mit einer Endkonzentration von $50 \text{ ng} / \mu\text{l}$ (Fluorescein markierte Sonden) bzw. mit einer Endkonzentration von $30 \text{ ng} / \mu\text{l}$ (Cy3 und Cy5 markierte Sonden) hergestellt und bei -20°C gelagert.

B.9.1.2 Verwendete rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden

Die Tabelle B.9.1.2 zeigt die verwendeten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden.

Tabelle B.9.1.2: Verwendete Oligonukleotidsonden, EUB338_{MIX} besteht aus EUB338-I+II+III und LGC354_{MIX} aus LGC354a+b+c.

Sonde	SONDENSEQUENZ 5'-3'	SPEZIFITÄT	REFERENZ
Eub338 Eub-338-I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i> (außer * und **)	Amann <i>et al.</i> , 1990
Eub-338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	<i>Planctomycetales</i> *	Daims <i>et al.</i> , 1999
Eub-338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i> **	Daims <i>et al.</i> , 1999
Alf-968	GGTAAGGTTTCTGCGCGT	α -Proteobakterien, Gram-negativ	Neef <i>et al.</i> , 1998
Beta-42a	GCCTTCCCACCTCGTTT	β -Proteobakterien, Gram-negativ	Manz <i>et al.</i> , 1992
Gam-42a	GCCTTCCCACATCGTTT	γ -Proteobakterien, Gram-negativ	Manz <i>et al.</i> , 1992
HGC	TATAGTTACCACCGCCGT	Gram-positive Bakterien (DNS mit hohem G+C-Gehalt)	Roller <i>et al.</i> , 1994
LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	Gram-positive Bakterien (DNS mit niedrigem G+C-Gehalt)	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC	Gram-positive Bakterien (DNS mit niedrigem G+C-Gehalt)	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC	Gram-positive Bakterien (DNS mit niedrigem G+C-Gehalt)	Meier <i>et al.</i> , 1999

B.9.2 Hybridisierung von Zellen auf Polycarbonatfiltern

Die auf Polycarbonatfiltern immobilisierten Zellen (Polycarbonatfilter GTTP 0,2 µm, Millipore, Eschborn, D) (vgl. B.7.2), wurden mit den entsprechenden Sonden hybridisiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Diese Technik wurde vor allem für die Zählungen im Bodensystem angewandt. Im axenischen System wurde dieses Verfahren nur zu speziellen Untersuchungen, wie z. B. zur Detektion endophytisch lebender Organismen eingesetzt.

Hybridisierungspuffer (Hybridisierung bei 46 °C)

Die Stringenz wurde durch Zugabe von 35 % deionisiertem Formamid im Hybridisierungspuffer eingestellt.

NaCl	(5 M)	360 µl
Tris/HCl	(1 M; pH 8,0)	40 µl
Formamid (deionisiert)		700 µl
H ₂ O _{reinst}		900 µl
SDS	(10 % (w/v))	2 µl

Waschpuffer (Waschen bei 48 °C)

Der Waschpuffer für Hybridisierungen mit 35 % Formamid im Hybridisierungspuffer hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	(5 M)	700 µl
Tris/HCl	(1 M; pH 8,0)	1000 µl
EDTA	(0,5 M; pH 8,0)	500 µl
SDS	(10 % (w/v))	50 µl
H ₂ O _{reinst}		ad 50 ml

Durchführung:

Pro Hybridisierung wurde ein Viertel eines Polycarbonatfilters verwendet, der auf einen Objektträger (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim, D) aufgelegt wurde. Der Polycarbonatfilter wurde mit 50 µl Hybridisierungspuffer und je 6 µl Sonde versetzt. Zur Detektion aller Bakterien wurden bei der Hybridisierung eine 1:1:1 Mischung aller drei fluoreszenzmarkierten EUB-Sonden (EUB_{MIX}) eingesetzt. Zur Detektion der γ -Proteobakterien wurde gleichzeitig mit einer fluoreszenzmarkierten GAM-42a-Sonde eine

unmarkierte BET42a–Oligonukleotidsonde als Kompetitor eingesetzt. Das unmarkierte Oligonukleotid sollte die Fehlpaarung der GAM-42A-Sonde an β -Proteobakterien verhindern, da sich die Sondenbindungssequenz beider Bakteriengruppen nur in einer Base unterscheiden (vgl. Tab. B.9.1.2). Der Objektträger wurde in ein 50 ml Probengefäß (Greiner, Nürtingen, D), in dem ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetes Stück Zellstoff eingebracht wurde, überführt und zwei Stunden bei 46°C in einem Hybridisierungsofen (Mettler Typ BE20, Schwanbach, D) inkubiert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch einen anschließenden Waschschrift für 30 min bei 48°C in einem mit 50 ml Waschlösung befüllten Probengefäß entfernt. Schließlich wurden die Filter in $H_2O_{dem.}$ geschwenkt und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Einbettung der Filter (vgl. B.10.2.1) konnten diese nun direkt mikroskopiert werden.

B.9.3 Anfärbung chromosomaler DNS mit DAPI

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) interkaliert in doppelsträngiger DNS, wobei sich die Fluoreszenzintensität um ca. das 10-fache erhöht. Dadurch können alle Organismen nach Anregung mit UV-Licht geeigneter Wellenlänge (vgl. B.10.2.1) als blau fluoreszierende Zellen erkannt werden. Mit Hilfe von DAPI können alle Zellen mit intaktem Genom bzw. hochmolekularer DNS, d.h. auch physiologisch inaktive oder nicht kultivierbare Zellen, nachgewiesen werden. Die blaue Fluoreszenzstrahlung von DAPI hat bei 395 nm ihr Emissionsmaximum, wenn sie mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt wird.

DAPI-Stammlösung (500-fach konzentriert)

4',6-Diamidino-2-phenylindol	3,5 mg
H_2O_{reinst}	ad 10 ml

Durchführung:

Die DAPI-Färbung wurde mit den auf Polycarbonatfiltern immobilisierten Wurzelextrakten durchgeführt. Dazu wurde ein Filter mit einem geeigneten Volumen der DAPI-Lösung (Stammlösung 1:500 verdünnt) betropft und 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige DAPI-Lösung auf dem Polycarbonatfilter durch vorsichtiges Schwenken in $H_2O_{dem.}$ entfernt und die Filter für ca. 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

B.10 Mikroskopische Techniken

B.10.1 Vorbereitung der Proben

Polycarbonatfilter wurden nach FISH und DAPI-Färbung (vgl. B.9.3) zur Lufttrocknung auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die getrocknete Filter auf den Objektträgern mit einem Tropfen Antifadingreagenz (Citifluor Ltd., London, GB) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Hingegen mußten fixierte Wurzeln, in 1 x PBS gelegt, unter einem Stereoskop (Olympus Optical, Planegg, D) mit Hilfe eines Skalpells in kleinere Abschnitte geschnitten werden, bevor sie ebenfalls auf einen Objektträger gelegt werden konnten. Die so gewonnenen Wurzelstücke wurden soweit wie möglich von Flüssigkeit befreit, jedoch nicht getrocknet und sofort in das Antifadingreagenz eingebettet, sowie anschließend ein Deckglas aufgelegt. Die Behandlung frischer Wurzeln erfolgte ähnlich zu den fixierten Wurzeln, jedoch mit dem Unterschied, daß sie statt mit Antifadingreagenz, mit 1 x PBS betropft und direkt mit einem Deckglas bedeckt wurden.

B.10.2 *In situ* Studien zur Wurzelbesiedlung

Das Wurzelbesiedlungsverhalten der inokulierten Bakterien wurde mittels verschiedener Mikroskopiertechniken untersucht. Verwendung fanden dabei die Epifluoreszenz Mikroskopie (vgl. B.10.2.1), sowie die konfokale Laserscanning Mikroskopie (B.10.2.2). Hierzu wurden entweder PFA-fixierte Wurzelproben (vgl. B.5.1) oder frische Wurzelproben eingesetzt. Die zu untersuchenden Bereiche wurden mittels eines sterilen Skalpells unter einem Stereoskop (Firma Olympus Optical, Planegg, D) von der Gesamtwurzel getrennt und auf einen Objektträger aufgelegt.

B.10.2.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit fand das Axioplan 2 Mikroskop der Firma Zeiss (Oberkochen, D) Verwendung. Zur Betrachtung der entsprechend vorbereiteten Proben wurde ein Plan-Neofluor Objektiv mit 100-facher Vergrößerung (Ölimerision 1,3) eingesetzt. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe diente eine Quecksilberdampfampe (HBO50, Firma Osram, München, D).

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet:

- FLUOS 5,6-Carboxyfluorescein-*N*-hydroxysuccinimidester (FLUOS, Firma Boehringer Mannheim, D);
- Cy3 5,5'-Disulfo-1,1'-(γ carbopentynyl)-3,3,3',3'tetramethylindolocarocyanin-*N*-hydroxysuccinimidester (Cy 3.18, Biological Detection Systems, Pittsburgh, OH, USA);
- Cy5 Cy5.18-Derivat, *N*-hydroxysuccinimidester (Biological Detection Systems, Pittsburgh, OH, USA);

Die Anregungs- und Emissionswerte der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle B.10.2.1 angegeben.

Tabelle B.10.2.1: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Anregung [nm]	Emission [nm]	Verwendung
335-385	435-485 blaue Fluoreszenz	DAPI
460-500	510-560 grüne Fluoreszenz	FLUOS und GFP
510-560	572-648 orangerote Fluoreszenz	Cy3 und RFP
590-650	662-738 blaue Fluoreszenz	Cy5

B.10.2.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zur Visualisierung fluoreszenzmarkierter Bakterienzellen und zur Unterdrückung der Autofluoreszenz von Pflanzenwurzeln und Bodenpartikeln wurden in dieser Arbeit inverse konfokale Laser Scanning Mikroskope (LSM 410 und LSM 510, Zeiss, Oberkochen, D) eingesetzt. Das Präparat wird dabei punktförmig mit monochromatischem Licht (Laser) angeregt. Signale, die von außerhalb der Fokusebene stammen, sowie Streulicht wird nicht detektiert, da die konfokale Anordnung „optische Schnitte“ mit der Präzision von Bruchteilen von μm erlaubt („z-scan“). Somit werden ausschließlich Fluoreszenzsignale, die aus der Fokusebene stammen von der Detektorblende (Pinhole) erfaßt. Als Lichtquelle wurden Laserstrahlen verwendet, die Linien unterschiedlicher Wellenlängen (Argon: 488 nm, Helium-Neon: 543 nm bzw. 633 nm) erzeugten. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal unter Verwendung der in Tabelle B.10.2.2 angegebenen Filtersätze.

Tabelle B.10.2.2: Verwendete Filtersysteme. Abkürzungen: BP = Bandpaßfilter, FT = Farbteiler, LP = Langpaßfilter. 1) Filtersätze der Firma Zeiss (Oberkochen, D).

Filtersatz ¹⁾	Anregungs- bzw. Bandpaßfilter	Farbteiler (nm)	Emissionsfilter	verwendbar für
01	BP 365	FT 395	LP 397	DAPI
15	BP 546	FT 580	LP 590	TRITC, Cy3
16	BP 485	FT 510	LP 520	FLUOS
26	BP 575-625	645	BP 660-710	Cy5

Die erstellten Bildaufnahmen erfolgten mit Hilfe einer computergestützten Auswertungseinheit der Fa. Zeiss ("Laser Scanning Microscope" (LSM) 510, Version 2.80.1123 sowie LSM410, Version 3.85 Beta, Carl Zeiss, Jena, D).

B.11 Ausbreitung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre von Tomaten

B.11.1 AHL-Sensorstämme

Bei den Sensorstämmen handelte es sich um Bakterienstämme, die als AHL-negative Mutanten zu keiner AHL-Produktion mehr fähig waren, jedoch noch über eine hohe Sensitivität zur Rezeption von AHL-Molekülen verfügten. Sobald ein Sensorstamm mit AHL im nM-Konzentrationsbereich in Kontakt kommt (s. u.), erfolgt die Expression von grün- (GFP) oder rot-fluoreszierenden Proteinen (RFP). Eine *in situ* Detektion der Sensorstämme konnte anhand dieser im UV-Licht zur entsprechenden Fluoreszenz angeregten Proteine (GFP oder RFP) durchgeführt werden. Die verwendeten Sensorkonstrukte *Serratia liquefaciens* MG44 pJBA132 und *Pseudomonas putida* F117 pKR-C12 wurden vom Projektpartner an der TU-München (PD. Dr. Leo Eberl, AG Quorum Sensing, TU-München, Weihenstephan) zur Verfügung gestellt (Steidle *et al.*, 2001). *S. liquefaciens* MG44 pJBA132, zeigte eine GFP Produktion sobald er mit *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-Homoserinlacton (OHHL) bei einer Detektionsempfindlichkeit von ca. 20 nM in Berührung kam. *P. putida* F117 pKR-C12 hatte hingegen eine Detektionsempfindlichkeit von 40 nM für *N*-(3-oxo-dodecanyl)-L-Homoserinlacton (OdDHL) (K. Sigl, Diplomarbeit, 2001). Sensorstamm und Wildtypstamm wurden immer in zwei zueinander verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt, um bei einer späteren Bildanalyse die Bakterienzellen voneinander unterscheiden zu können (vgl. B.11.3).

B.11.2 Erstellung von Mosaikbildern

Zusammengesetzte Bilder (Mosaikbilder) wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM 410, Zeiss, Oberkochen, D) und einem Programm zur Mosaikbilderstellung (GSF, Institut für Pathologie, München, D) aufgenommen. Mosaikbilder bestehen aus überlappenden Einzelaufnahmen verschiedener Bereiche der Wurzel die zu einem einheitlichen Gesamtbild zusammengesetzt wurden, um größere Übersichtsaufnahmen einer Wurzel zu erhalten. Dabei konnten Aufnahmen unter Verwendung verschiedener Filter übereinander gelegt werden. Ein Mosaikbild mit Darstellung zweier Farbkanäle setzte sich aus einer Überlagerung von 3 x 3 Einzelbildern je Farbkanal zusammen. Jedes Einzelbild hatte eine Auflösung von 512 x 512 Pixel, das Gesamtbild 1536 x 1536 Pixel. Die Mosaikbilder dienten zur Vermessung der Distanzen zwischen den abgebildeten Bakterien auf der Wurzeloberfläche.

B.11.3 Messung der Diffusionsstrecke von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre

Um herauszufinden, wie weit die von *Pseudomonas putida* IsoF pUT-Kan-*rfp* gebildeten AHL-Signalmoleküle in der Rhizosphäre diffundieren konnten, wurden Messungen direkt an Wurzeln von Tomatenpflanzen aus dem axenischen System durchgeführt. Die Wurzeln waren mit einer 1:1 Mischung aus unverdünnten ÜN-Kulturen des Sensorstammes *Pseudomonas putida* F117 (pKR-C12) und des AHL-Produzenten *Pseudomonas putida* IsoF pUT-Kan-*rfp* für einen Tag inkubiert worden. Nach dieser Zeit wurden die Wurzeln geerntet (vgl. B.5) und sofort mikroskopiert (vgl. B.10.1). Es wurde ein Mosaikbild aus achtzehn Einzelaufnahmen erstellt, das aus jeweils neun Einzelaufnahmen mit dem Filter zur Detektion der grünen (Filtersatz 09) und neun Einzelaufnahmen mit dem Filter zur Detektion der roten Fluoreszenz (Filtersatz 15; vgl. Tab. B.10.2.2) bestand. Durch die Überlagerung der Einzelaufnahmen entstand das Mosaikbild (vgl. B.11.2). Um die Diffusionsstrecke der AHL-Signalmoleküle zu bestimmen, wurden die Abstände von aktivierten grünen Sensorzellen zu den jeweils nächstgelegenen AHL-produzierenden roten Zellen, ausgehend vom Mittelpunkt der Zellen, gemessen. Die Messungen wurden mit Hilfe eines dafür entwickelten Programmes (CMEIAS, "Center for Microbial Ecology Image Analysis System", Professor F. B. Dazzo, Department of Microbiology & Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, USA) durchgeführt (Liu *et al.*, 2001).

B.12 t-RFLP-Analyse wurzelassoziierter Bakterienpopulationen

Zur Untersuchung wurzelassoziierter Bakterienpopulationen wurde die Analysemethode der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (t-RFLP) eingesetzt. Die t-RFLP-Analyse ist eine weiterentwickelte Form des RFLP (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus). Ähnlich diesem wird die DNS der für die 16S-rDNS codierenden Gene aus Umweltisolaten extrahierter chromosomaler DNS mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (vgl. Abb. B.12). Bei der t-RFLP werden jedoch fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt, so daß alle 16S-rDNS Amplifikate eine terminale Markierung erhalten. Werden diese markierten 16S-rDNS Amplifikate anschließend mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten (vgl. B.12.5), erhält man bei der t-RFLP Fragmentstücke unterschiedlicher Länge, von denen je ein Fragment eines 16S-rDNS Amplifikats an einem Ende eine Fluoreszenzmarkierung aufweist. Mittels einer automatischen Sequenzierereinheit kann die Größe dieser markierten Fragmentstücke bestimmt werden. Die Anzahl der detektierten DNS-Fragmentstücke gibt indirekt Aufschluß über die Anzahl der im untersuchten Umweltisolat (hier Rhizosphäre von Tomate) dominant vorkommenden Bakterien. Während bei der RFLP Analyse charakteristischer Bandenmuster der auf Agarosegelen aufgetrennten Fragmente mit bekannten Mustern verglichen werden müssen, können auch ohne nähere Kenntnis zur Rhizosphärenpopulation Angaben zu deren Zusammensetzung mittels der t-RFLP Analyse gemacht werden.

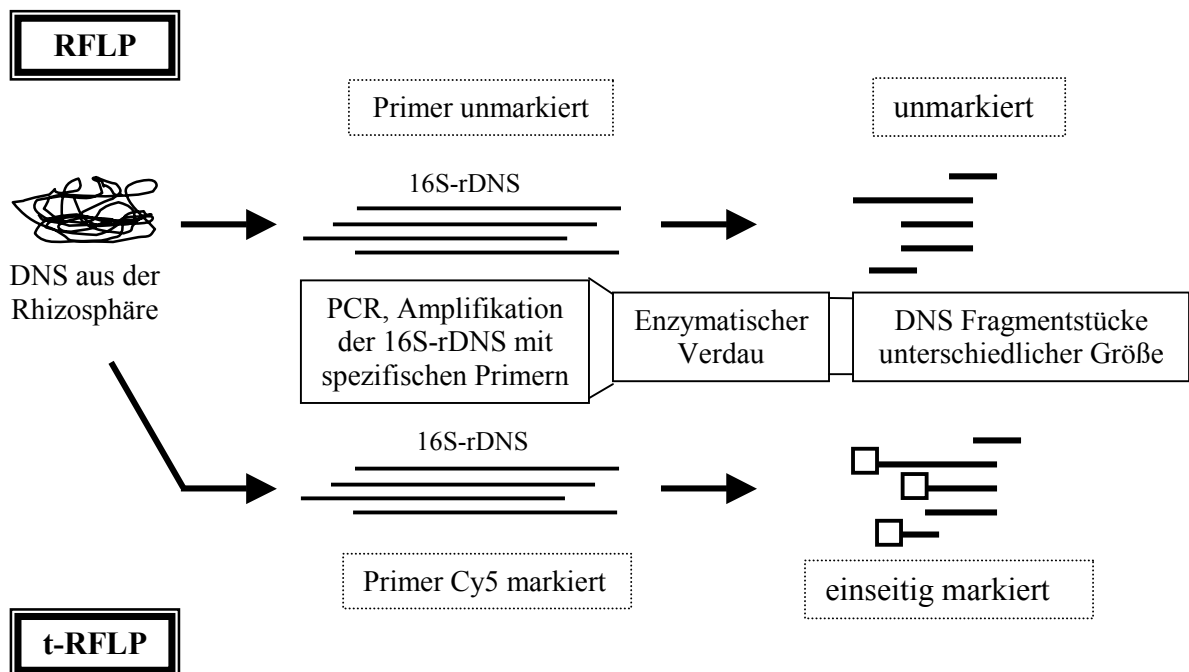


Abbildung B.12: Grafische Darstellung der Methoden der t-RFLP im Vergleich zur RFLP in ihrer Durchführung. Nähere Erläuterung sind dem Text zu entnehmen.

Die Durchführung der t-RFLP-Analyse erfolgte nach folgenden methodischen Schritten:

- Extraktion der bakteriellen DNS aus der Rhizosphäre und Wurzeln
- Bestimmung der DNS-Konzentration
- Amplifizierung der 16S-rDNS
- Aufreinigung der PCR-Amplifikate
- Enzymverdau der 16S-rDNS
- t-RFLP-Analyse

B.12.1 Extraktion der DNS

B.12.1.1 Extraktion bakterieller DNS aus Rhizosphäre und Wurzeln

Die Wurzeln der Tomatenpflanzen wurden hierzu nach bestimmten Inkubationszeiten geerntet und wie folgt behandelt:

Mörser und Pistill wurden mit EtOH_{abs.} gespült und abgeflammt. Alle verwendeten Labormaterialien wurden anschließend in flüssigen Stickstoff getaucht und abgekühlt, um ein Verkleben der Wurzel mit unterschiedlich temperierten Oberflächen zu vermeiden. In Mörsern wurde das gefrorene Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff zerrieben. Die gemörserten Wurzeln wurden als gefrorenes Pulver in 2 ml Eppendorfgläser (Eppendorf, Köln, D) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Wurzelproben konnten bei -20°C zwischengelagert werden. Die DNS wurde unter Verwendung des "Fast DNA[®]SPIN[®]Kit" für Boden (BIO101, Carlsbad, CA) nach Herstellerangaben extrahiert. Der Erfolg der Extraktion wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese (vgl. B12.1.3) überprüft.

B.12.1.2 Extraktion genomischer DNS aus den Blättern von Tomatenpflanzen

Die genomische DNS aus Blättern von Tomatenpflanzen wurde nach Bahnweg *et al.* (1998) isoliert. 100-200 mg unter flüssigem Stickstoff gemörserter Blätter wurden zunächst mit 1 ml 50 % Methanol und 50 µl 20 % CaCl₂ + 1 %-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, D) auf einem Rüttler 10 min bei 4 °C extrahiert. Nach Zentrifugation (17530 G, 10 min, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet erneut mit 50 % Methanol, 10 min bei 4 °C unter Rütteln extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (17530 G, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand wieder verworfen. Der dritte Extraktionsschritt bestand aus 500 µl CTAB-Puffer (100 mM TrisHCl, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % v/v CTAB) mit 1 % Mercaptoethanol und 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, Merck, Darmstadt) sowie aus 400 µl Benzylchlorid

(10 min schütteln, 4 °C). Zu dieser Mischung wurden dann 300 µl Chloroform und 100 µl Kunstharz (PhytoPure Resin, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) pipettiert und weitere 5 min bei 4 °C geschüttelt. Daran schloß sich eine Zentrifugation an (10 min, 4 °C, 1500 G). Der Schritt (Chloroform und Kunstharz) wurde mit dem wässrigen Überstand einmal wiederholt. Für die Isolierung der genomischen DNS aus den Blättern von Tomatenpflanzen genügte es, in flüssigem Stickstoff gemörsertes Material einmal mit 500 µl Chloroform und 500 µl CTABPuffer mit 1 % Mercaptoethanol zu extrahieren. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand zu 500 µl Chloroform mit 100 µl Kunstharz gegeben und 5 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurde die Mischung bei 7245 G, 5 min bei 4 °C zentrifugiert. 400 µl Überstand wurden anschließend zu 200 µl eiskaltem Isopropanol gegeben und 10 min auf Eis gestellt. Durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 17530 G und 4 °C wurden die Nukleinsäuren pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 0,1 M Natriumacetat/70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 100 % Ethanol jeweils für 5 min gewaschen.

B.12.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50 x):

Tris HCl (2 M)	2,42 g / l
EDTA (0,1 M)	36,4 g / l
H ₂ O _{dem.}	ad 1000 ml
pH 8,8	(titriert mit Eisessig)

Bei der Agarosegelelektrophorese werden unterschiedlich große DNS-Fragmente durch Wanderung in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Als Matrix dient ein 1 % bis 2,5 %iges Agarosegel, das in einer Gelkammer in TAE-Puffer (1 x) liegt. Die DNS wird in Geltaschen eingefüllt, wobei je 5 µl DNS Probe mit 10 µl Probenpuffer (1:6 verdünnt in H₂O_{reinst}) (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D) gemischt wurden. Bei angelegter Spannung (80 Ampère, 120 Volt) wandert die negativ geladene DNS durch das Gel in Richtung des positiven Pols (Kathode). Es erfolgt eine Auftrennung der DNS nach ihrer Größe, die unter Verwendung eines Größenstandards (GeneRulerTM, MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D) bestimmt werden kann.

B.12.2 Bestimmung der DNS- Konzentration

Die extrahierte DNS wurde qualitativ und quantitativ mittels der Spektralphotometrie bestimmt. Zur quantitativen Bestimmung wurde die DNS 1:200 in H₂O_{bidest} verdünnt und in einem Spektralphotometer (Cecil 3021CE, Cambridge, GB) bei einer OD von 260 nm vermessen. Folgende Näherungswerte zur Konzentrationsberechnung der DNS wurden verwendet (Cryer *et al.*, 1995):

Doppelsträngige (ds) DNS 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml

Die DNS wurde aliquotiert, so daß je 100 ng in die PCR eingesetzt werden konnten.

Zur Bestimmung der Qualität konnten Verunreinigungen der Nukleinsäuren anhand der Quotienten aus den Extinktionswerten bei einer OD von 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Für Verunreinigungen durch Proteine oder RNS, die bei der Extraktion der DNS nicht ausgewaschen wurden, galten folgende Richtwerte (Sambrook *et al.*, 1989):

$$E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}} > 1,8 \text{ (Proteine) bzw. } E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}} > 2,2 \text{ (RNA)}$$

B.12.3 Amplifikation der 16S-rDNS

Die Amplifikation der 16S-rDNS erfolgte mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Verwendet wurden die Primer 616F (vorwärts) und 630R (rückwärts) (Juretschko *et al.*, 1998; vgl. Tab. B.12.3). Zur späteren t-RFLP-Analyse war es notwendig, daß je Reaktionsansatz ein Primer eine Fluoreszenzmarkierung besaß, so daß die 16S-rDNS Amplifikate ein markiertes Ende erhielten (s. o.). Bei der verwendeten Markierung der Primer handelte es sich um den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (Anregungsmaximum ca. 600 nm).

Tabelle B.12.3: Tabellarische Auflistung der zur 16S-rDNS Amplifikation verwendeten Primer mit Angabe der Sequenz und Markierung. Die Angabe "F" steht für die Leserichtung vorwärts und "R" für rückwärts der Polymerase. Mit * sind die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Primer bezeichnet.

Primer	Sequenz	Markierung
616F	5'-AGA-GTT-TGA-TYM-TGG-CTC-AG-3'	keine
616F *	5'-AGA-GTT-TGA-TYM-TGG-CTC-AG-3'	Cy5, Fluoreszenz
630R	5'-CAK-AA-GGA-GGT-GAT-CC-3'	keine
630R *	5'-CAK-AA-GGA-GGT-GAT-CC-3'	Cy5, Fluoreszenz

Material und Methoden

Für jeden markierten Primer wurden je Probenreihe zunächst ein Mastermix des entsprechenden Reaktionsansatzes (s. u.) ohne Template (Proben-DNS) in geeignetem Volumen (Anzahl der Proben + 1 Positivkontrolle + 1 Negativkontrolle + 1) angesetzt, mit Taq-Polymerase versetzt, in dünnwandige PCR-Eppendorfreagenzgefäße (Firma Eppendorf, Köln, D) aliquotiert und auf Eis gekühlt. Das eingesetzte Volumen von H₂O_{reinst} richtete sich nach der Zugabe der Proben-DNS, da die optimale Proben-DNA-Konzentration zur 16S-rDNS Amplifikation 100 ng/μmol betrug. Die entsprechende Menge der Proben-DNS für eine PCR wurde je Reaktionsansatz zugegeben. Als Positivkontrolle diente die 16S-rDNS von *Escherichia coli* K12, sowie als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Proben-DNS. Um eine größere Ausbeute des Amplifikats zu erzielen, konnte auch der doppelte Ansatz verwendet werden. Für die markierten Primer ergab die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) (verhindert die Bildung von Primer Dimeren) oder eine Erhöhung der MgCl₂-Konzentration (verbessert die Polymerasenbindung an die DNS) bessere Ausbeuten. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

für den Cy5 markierten Primer 616F *		für den Cy5 markierten Primer 630R *	
Primer 616F * [50 pmol]	1 μl	Primer 616F [50 pmol]	1 μl
Primer 630R [50 pmol]	1 μl	Primer 630R * [50 pmol]	1 μl
PCR-Puffer [10 x]	5 μl	PCR-Puffer [10 x]	5 μl
dNTP-Mix [2,5 mM]	5 μl	dNTP-Mix [2,5 mM]	5 μl
MgCl ₂ [25 mM]	7 μl	MgCl ₂ [25 mM]	6 μl
DMSO	2 μl	DMSO	-
Proben-DNS	1 μl	Proben-DNS	1 μl
Taq-DNS-Polymerase	0,5 μl	Taq-DNA-Polymerase	0,5 μl
H ₂ O _{reinst.}	ad 50 μl (= 27,7 μl)	H ₂ O _{reinst.}	ad 50 μl (= 30,7 μl)

* = mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 terminal markierter Primer

Als PCR-Cycler wurden Geräte des Typs Primus 25 und Primus 96 (MWG Biotech, Ebersberg, D) eingesetzt.

Schritt	Reaktionsschritt	Zyklen
1. Deckelbeheizung an	auf 110°C	-
2. Denaturierung	5 Minuten, 94°C	1
3. Denaturierung	1 Minute, 94°C	35
4. "Annealing"	30 Sekunden, 50°C	
5. Elongation	2 Minuten, 72°C	
6. Elongation	10 Minuten, 72°C	1
7. Deckelbeheizung aus	-	-
8. Programmende	Kühlung, 4°C	unbegrenzt

Die verwendete "Annealing"-Temperatur (T_M) zur Anlagerung der Primer an die DNS-Stränge ist von der Länge und Basenfolge der verwendeten Oligonucleotidprimer abhängig. Zur Bestimmung der geeigneten Temperatur dient näherungsweise die „2 + 4“ Regel:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$

Wobei A, T, G, C die Anzahl der vorkommenden Basen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) angibt. In dieser Arbeit wurde die "Annealing"-Temperatur des Primers 630R gewählt.

B.12.4 Aufbereitung der DNS

Mittels der Agarosegelelektrophorese (1,5 %ig in TAE, vgl. B.12.1.3) wurde überprüft, ob die PCR die gewünschten Amplifikate lieferte. Erwartet wurde eine Bande in der Größe von 1,5 kb, wobei als Größenmarker ein 1 kb Standardmarker diente.

Die jeweiligen Proben, die ein entsprechendes Amplifikat aufwiesen, wurden mit dem "NucleoSpin® Extract 2 in 1" Kit (Macherey & Nagel, Düren, D) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Abweichend zur dortigen Vorschrift wurde der vorletzte Zentrifugationsschritt von 2 auf 6 Minuten verlängert, sowie das Endvolumen jeweils um die Hälfte des Ausgangsvolumens zur Aufkonzentrierung der 16S-rDNS reduziert.

B.12.5 Restriktionsanalyse der 16S-rDNS Amplifikate

Die gereinigte DNS wurde anschließend in verschiedenen Ansätzen mit Restriktionsenzymen geschnitten. Anhand des Computerprogramms Clone Manager (Version 5.02, 1998) konnte zuvor berechnet werden, welches Enzym welches Schnittmuster der 16S-rDNS Fragmente ergeben würde. In der Literatur werden zur Analyse von Bakteriengemeinschaften die Restriktionsenzyme *Hin6I*, *MspI* und *RsaI* eingesetzt (Marsh, 1999; Liu *et al.*, 1997). Für die hier vorgenommene Charakterisierung der Rhizosphärengemeinschaft erwies sich die Verwendung der 4 bp Restriktionsenzyme *Hin6I* (5'-G[^]CGC-3') und *MspI* (5'-C[^]CGG-3') (Firma MBI-Fermentas, D) als ausreichend. Eine spätere t-RFLP-Analyse zeigte, daß das Schnittmuster des Restriktionsenzym *Hin6I* besser geeignet war. Die Fragmentstücke die beim Enzymverdau mit *MspI* entstanden, waren im Vergleich zum 400 bp Größenstandard entweder zu klein oder zu groß um gut detektiert werden zu können (vgl. Tab. B.12.5). Auch eine Kombination von *Hin6I* mit *MspI* brachte keine Verbesserung gegenüber der alleinigen Verwendung von *Hin6I*. Die verwendeten Enzyme wurden in einer Konzentration von 4 Units eingesetzt. Der Einsatz einer höheren Konzentration von 10 bis 20 Units, wie in der Literatur von Lueders und Friedrich (2003) oder Liu *et al.* (1997) beschrieben, führte zu keinem verbesserten Ergebnis.

Tabelle B.12.5: Auflistung der erwarteten Fragmentstücke nach dem Enzymverdau der 16S-rDNS-Amplifikate.

Mikroorganismus	Enzym	Fragmentgröße (bp)	markiertes Fragment (bp)	
			Cy5-616 f	Cy5-630 r
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1 / MG44	<i>Hin 6I</i>	363, 344, 197, 80, 13	363	13
	<i>Msp I</i>	469, 280, 162, 137, 110, 106, 89, 81, 4	469	4
<i>Pseudomonas putida</i> Iso F / F117	<i>Hin 6I</i>	413, 357, 279, 250, 211, 2	413	2
	<i>Msp I</i>	549, 496, 135, 130, 110, 81, 11	549	11
<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Hin 6I</i>	378, 217, 197, 136, 83	378	83
	<i>Msp I</i>	503, 280, 162, 159, 137, 111, 106, 81, 4	503	4

Beim Enzymverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

Enzympuffer	2	µl
Enzym (4 U)	0,4	µl
PCR-DNA	10	µl
H ₂ O _{reinst}	7,6	µl
	20	µl

Vom Reaktionsansatz wurde zunächst ein "Mastermix" angesetzt, auf PCR-Reaktionsgefäße (Firma Eppendorf, Köln, D) verteilt und zuletzt mit der entsprechenden Menge der PCR-DNA-Probe versetzt. Die Inkubation der PCR-Reaktionsgefäße erfolgte im Wasserbad bei 37°C zwei bis drei Stunden. Anschließend wurden die Proben zur kurzzeitigen Lagerung bis zur t-RFLP-Analyse im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, bzw. zur längeren Aufbewahrung (> 1 Woche) im -20 °C Eisschrank gelagert.

B.12.6 Detektion und Analyse der 16S-rDNS Fragmentstücke

Die Detektion und Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmentstücke wurde an einem automatischen Sequenzierapparat, CEQTM 2000 XL, (Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, D) durchgeführt. Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese, wonach Substanzen je nach Stärke ihrer elektrischen Ladung durch ein elektromagnetisches Feld wandernd aufgetrennt werden. Große Moleküle wandern dabei langsamer als kleinere, so daß die zu untersuchenden Proben (hier fluoreszenzmarkierte DNS in unterschiedlicher Fragmentlänge) einzeln detektiert werden. Die durch Enzyme geschnittenen 16S-rDNS-Proben wurden mit einem 400 bp Größenstandard aus DNS-Fragmentstücken in definierter Größe und einem Probenpuffer (SLS) versetzt. Pro Analyse wurden vom automatischen Sequenzierapparat immer 8 Proben gleichzeitig bearbeitet. Ein Reaktionsansatz von 30 µl bestand aus:

DNS-Probe (enzymatisch verdaut)	0,5 µl
Größenstandard (400bp)	0,5 µl
Probenpuffer	29 µl

Alternativ zum 400 bp Größenstandard wurde zur Detektion größerer DNS-Fragmentstücke auch ein 600 bp Größenstandard eingesetzt. Angesetzt wurde obiger Reaktionsansatz jeweils als "Mastermix" für 8 Proben. Auf jeden Reaktionsansatz wurden jeweils zwei Tropfen Öl als Verdampfungsschutz getropft.

Die anschließende Detektion der Fragmente erfolgte nach folgenden Parametern:

Tabelle B.12.6: Programmablauf der t-RFLP-Analyse am Sequenzer CEQ™ 2000XL, mit Angabe der verwendeten Parameter.

Schritt	Reaktion	Einstellungsparameter
1	Kapillare wird erwärmt	auf 35°C
2	Denaturierung der DNS-Probe	bei 90°C 120 Sekunden
3	Injektion der Probe in die Kapillare	bei 2,0 kV 30 Sekunden
4	Auftrennung der Probe in der Kapillare	bei 7,5 kV 40 Minuten
5	Pause bei mehreren Reaktionsansätzen	keine

Zur Auswertung der nach der Analyse erhaltenen Rohdaten wurde ein Fragmentanalyse-Programm der Firma Beckman Coulter CEQ™ 2000 XLDNS Analysis System, der Version 4.3.9, angewendet.

B.12.7 Auswertung der Fragmentanalysedaten

Die Auswertung der Fragmentdaten erfolgte mittels des TAP-Programmes (t-RFLP-Analysis Program) der Datenbank RDPII (Ribosome Database Project II, Michigan State University, [<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html>], Marsh *et al.*, 2000). Die Datenbank besteht aus einer Sammlung von Bakterienstämmen, von denen die nach einer t-RFLP-Analyse zu detektierenden 16S-rDNS-Fragmente bekannt sind. Mittels eines Javaprogramms kann die Datenbank nach geeigneter 16S-rDNS-Sequenz durchsucht werden. Notwendig zur Recherche sind Angaben der DNS-Sequenz des verwendeten Primers und des eingesetzten Restriktionsenzym. Die Ergebnisse werden, je nach Wahl, als t-RF-Liste oder in einem phylogenetischen Baum dargestellt. Ein Vergleich der in der Datenbank gefundenen Fragmentstücke mit denen bei der t-RFLP-Analyse der Wurzelprobe detektierten Fragmente ermöglichte Rückschlüsse auf die in der Rhizosphärengemeinschaft vorkommenden dominanten Bakteriengruppen zu den verschiedenen Probenahmezeiten.

C Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Bakterienstämme untersucht, die mittels des Signalmoleküls *N*-Acyl-L-Homoserinlacton (AHL) zu einer Interaktion befähigt sind (vgl. A.2). Hierbei handelte es sich um *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 sowie *Pseudomonas putida* IsoF und F117. *Pseudomonas putida* IsoF ist ein Rhizosphärenisolat von Tomatenpflanzen und produziert langkettige AHL, während *Serratia liquefaciens* MG1 von Gurkenpflanzen isoliert wurde und kurzkettige AHL produziert (vgl. A.4). Von beiden Stämmen lag je der Wildtyp (MG1 und IsoF), der AHL produzierte, sowie eine AHL-negative Mutante (MG44 und F117) vor, die zu keiner AHL-Produktion mehr befähigt war. Als Modellpflanze diente eine kleinwüchsige Tomatenpflanze (MicroTom[®]). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beziehen sich hauptsächlich auf Untersuchungen an *S. liquefaciens*, da *P. putida* in einer dieser Arbeit eingegliederten Diplomarbeit von Frau Christine Dürr gesondert bearbeitet wurde. Soweit entsprechende Ergebnisse zum Vergleich herangezogen werden, wird darauf im Folgenden hingewiesen.

C.1 Studien zur bakteriellen Wurzelbesiedlung

C.1.1 Vergleich des axenischen Systems mit dem Bodensystem

Zwei verschiedene Anzuchtssysteme wurden für die MicroTom[®]-Pflanzen verwendet. Zum einen ein axenisches, keimfreies System (AS), bestehend aus Quarzsand mit Minimalmedium in verschlossenen Kunststoffboxen, und zum anderen ein nicht steriles eher natürliches Bodensystem (BS) aus Einheitserde Typ T (vgl. B.3.3) in Blumentöpfen (Abb. C.1.1a).

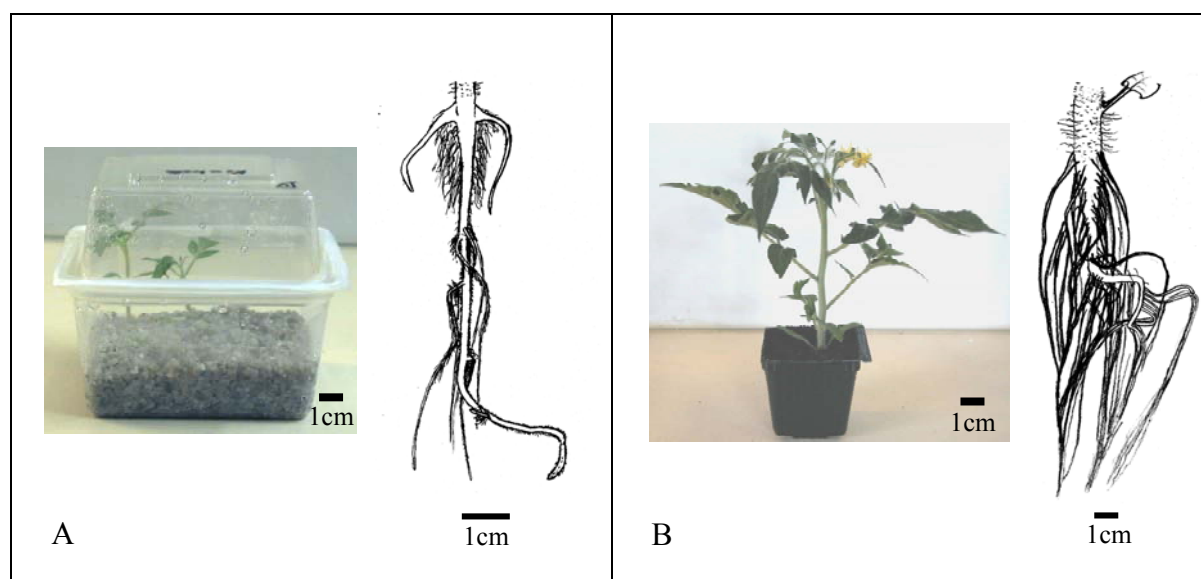


Abbildung C.1.1a: Fotoaufnahmen beider Anzuchtssysteme. Die Handskizzen zeigen die jeweilige Wurzelbildung. Die skizzierten Wurzeln stammten beide von 4-5 Wochen alten Pflanzen. **A** zeigt das axenische System (AS) und **B** das Bodensystem (BS).

Im direkten Vergleich zueinander zeigten die Wurzeln aus dem axenischen System ein weniger stark ausgeprägtes System aus Seitenwurzeln als Wurzeln aus dem Bodensystem. Abbildung C.1.1a zeigt zur Verdeutlichung Wurzelskizzen von 4-5 Wochen alten Pflanzen in älteren Wachstumsstadien. In den Inokulationsexperimenten wurden die Pflanzen im Alter von 1-2 Wochen eingesetzt (vgl. B.4). Im axenischen System zeigte der Pflanzensproß einen reduzierten Wuchs und kürzere Lebenszeiten als im Bodensystem. In Tabelle C.1.1 sind die gemittelten Werte der Messung in Bezug auf den Pflanzenwuchs nach einer Woche wiedergegeben. Gemessen wurde die Größe der geernteten Pflanze, der Radius ihrer entfalteten Blätter, die Anzahl der Blätter und falls vorhanden (im Bodensystem) die Blüten, die Wurzellänge und das Wurzelgewicht. Die Anzahl und Art der Blätter gab Aufschluß über das Pflanzenstadium. Zuerst entstanden immer zwei Keimblätter (K), darauf zwei morphologisch auffallende Primärblätter (P), deren Fiederung noch nicht ganz ausgebildet war, und anschließend die Sekundärblätter (S) mit 5-fach gefiederten, wechselständigen Blättern.

Tabelle C.1.1: Liste der gemittelten Meßdaten jeder Pflanze aus dem axenischen System (AS) und dem Bodensystem (BS). Die gemessenen Werte stammen jeweils von den nicht inokulierten Kontrollpflanzen eine Woche nach Versuchsbeginn, wobei vor Versuchsbeginn die Pflanzen des AS 1 Woche und die des BS 2 Wochen alt waren.

	Pflanzen- größe [cm]	Pflanzen- radius [cm]	Fieder- blätter K / P / S	Blüten	Wurzel- länge [cm]	Wurzel- gewicht [mg]
AS	3,3	2,8	2 / 2 / 0	-	8,6	11,6
BS	12,4	20,9	2 / 2 / 7	3	18	95,7

Die gemittelten Pflanzengrößen zeigten Unterschiede im Wuchs, wobei das Wurzelgewicht im Bodensystem durch anhaftende Bodenpartikel, die sich nicht vollständig aus der Wurzelhaarzone lösen ließen, verfälscht ist. Der Quarzsand hingegen ließ sich vollständig von der Wurzel entfernen.

Das sterile System diente zur Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens der Bakterien an der Tomatenwurzel unbeeinflusst von anderen Mikroorganismen oder Faktoren eines komplexeren Systems, wie dem hier verwendeten Bodensystem. In vergleichbaren Entwicklungsstadien zeigten beide Systeme große strukturelle Ähnlichkeiten im Wurzelbau (vgl. A.1). Der Unterschied beider Systeme bestand nur in der Länge der Wurzelzonen.

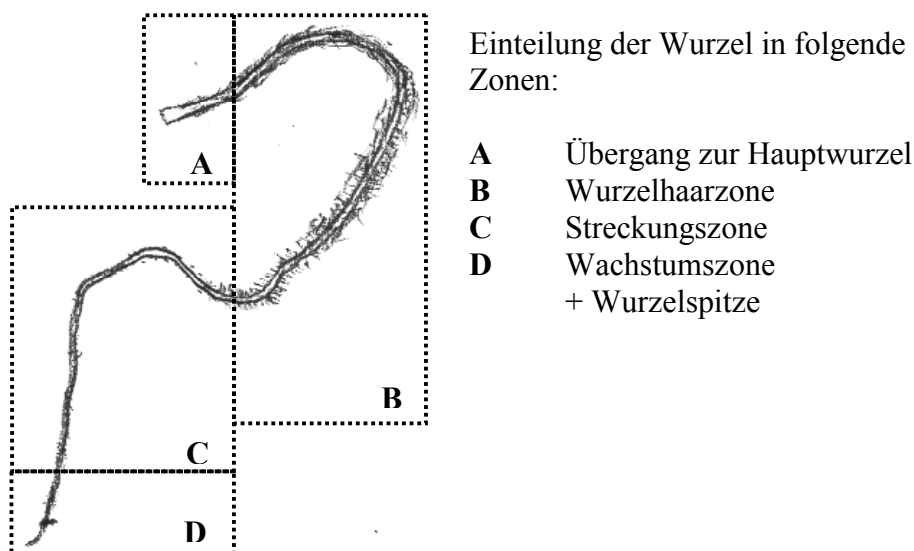


Abbildung C.1.1b: Einteilung der Wurzel in verschiedene Wurzelzonen. Dargestellt am Beispiel einer handskizzierten Seitenwurzel. Die Übergänge sind fließend (Aufbau der Wurzel (A-D) nach Strasburger, 1991, verändert).

C.1.2 Siedlungsstudien von *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* im axenischen System an Wurzeln von Tomatenpflanzen

Die Siedlungsweise von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44, sowie *Pseudomonas putida* IsoF und F117 wurde an Tomatenwurzeln in einem monoxenischen System (ein axenisches System der Tomatenpflanze, beimpft mit einem Bakterienstamm) durchgeführt. Mit Hilfe eines confokalen Laser Scanning Mikroskops (CLSM, vgl. B.10.2.2) und der chromosomalen *gfp*- und *rfp*- Markierung der Bakterien war so eine *in situ*-Lokalisierung der Bakterien an der Wurzel möglich.

Es wurden unterschiedliche Stellen an der Wurzel auf das Vorkommen der Bakterien untersucht, beginnend mit dem Wurzelhals, dem Übergang von Sproß zur Wurzel, die Hauptwurzel entlang, über die Seitenwurzeln bis hin zur Wurzelspitze (vgl. Abb. C1.1b). Im Bereich der Seitenwurzelansätze, an der Hauptwurzel und am Wurzelhals konnte nur eine schwache Besiedlung von *S. liquefaciens* MG1 festgestellt werden. An der Wurzelhaube der Hauptwurzel von Tomatenpflanzen war kein Bewuchs nachweisbar (vgl. Abb. C.1.2a).

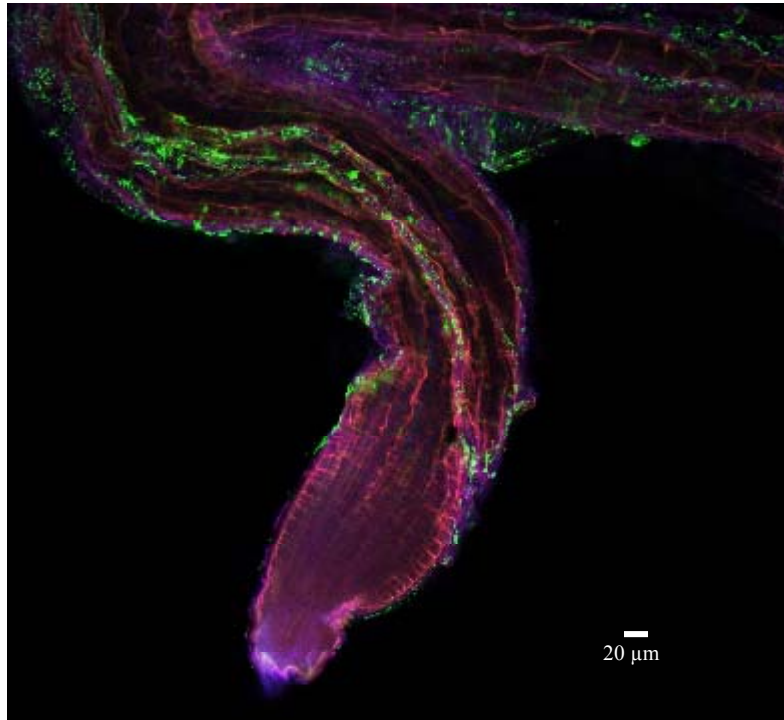


Abbildung C.1.2a: Mikroskopische Aufnahme der Wurzelspitze der Hauptwurzel einer Tomate. *Serratia liquefaciens* MG1 ist als grünes Signal erkennbar (*gfp* markiert). Die Wurzel zeigt eine rote und blaue Autofluoreszenz. *S. liquefaciens* MG1 besiedelt die Wurzel nur ab der Wachstumszone. Die Wurzelhaube selbst bleibt unbesiedelt. Objektiv 20x; 0,5 Luft.

Serratia liquefaciens MG1 siedelte sehr stark im Bereich der Wurzelhaarzone, der Hauptwurzel und an den jüngeren Seitenwurzeln. Am Beispiel der Seitenwurzel ließ sich die Siedlungweise von *S. liquefaciens* MG1 besonders gut darstellen. Abbildung C.1.2b zeigt die einzelnen Bereiche einer Seitenwurzel: Die Verzweigungsstelle, wo der Seitenwurzelast aus der Hauptwurzel wächst, zeigte eine relativ leichte Besiedlung von *S. liquefaciens* MG1 (Bild A). In der folgenden Wurzelhaarzone nahm diese Besiedlung jedoch stark zu (Bild B) und flachte dann in der anschließenden Streckungszone, sowie der Wachstumszone der Seitenwurzel wieder ab (Bild C). An der Wurzelspitze der Seitenwurzel war nur noch eine schwache Besiedlung feststellbar (Bild D). Die AHL-negative Mutante, *Serratia liquefaciens* MG44, unterschied sich im Vorkommen der Siedlungsbereiche nicht vom Wildtyp. Sie konnte an den gleichen Stellen nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

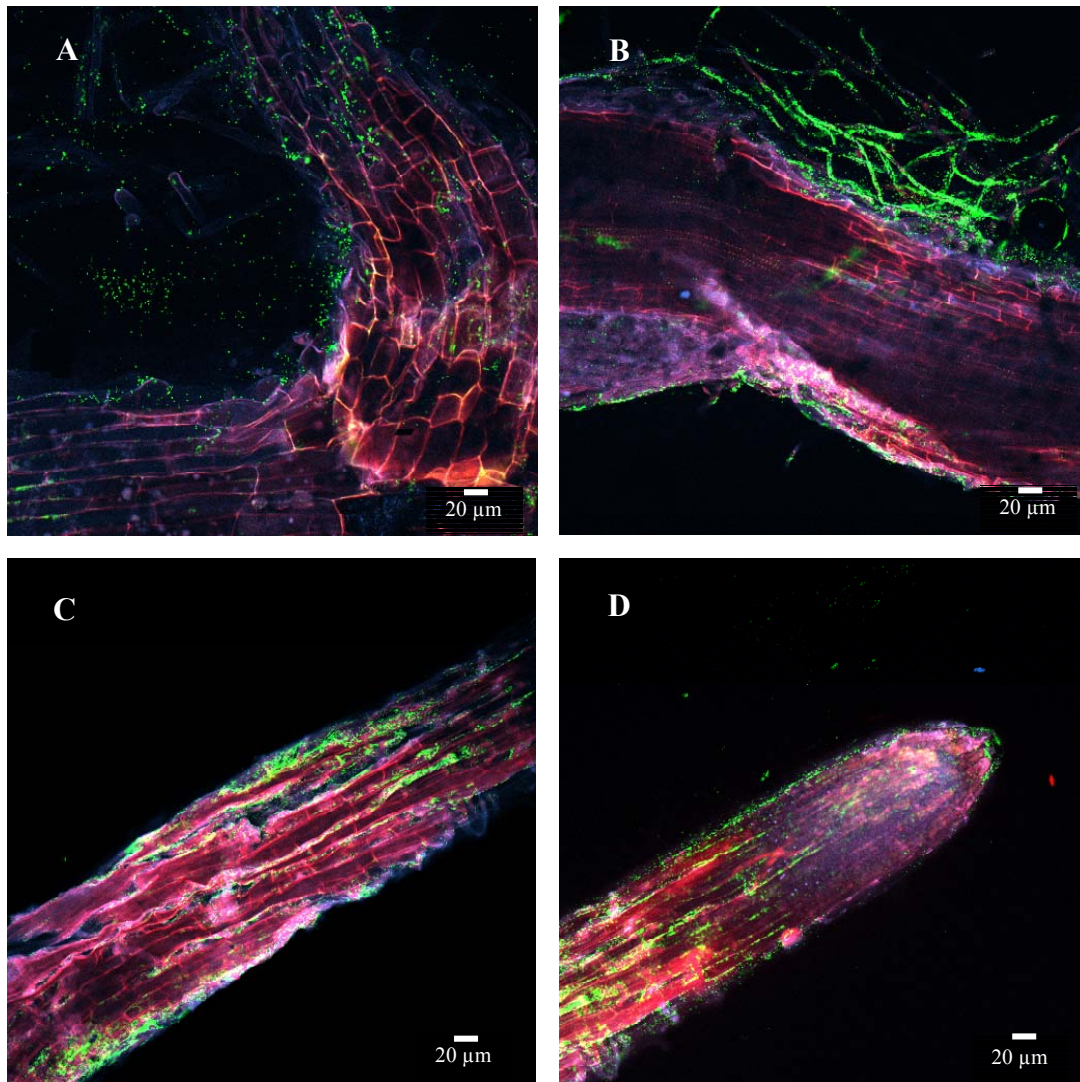


Abbildung C.1.2b: Mikroskopische Ausnahmen einer Seitenwurzel. Grün fluoreszierend *Serratia liquefaciens* MG1 (*gfp* markiert), blau und rot ist die Autofluoreszenz der Wurzel dargestellt. Die Wurzelbilder (A bis D) sind nach den Zonen der Wurzel sortiert (vgl. Abb. C.1.1b). Objektiv 20x; 0,5 Luft.

C.1.3 Besiedlung der Wurzelhaarzone

Eine genauere Untersuchung der Wurzelhaarzone zeigte für *Serratia liquefaciens* MG1 ein spezifisches Kolonisierungsverhalten, wobei keine Unterschiede zu *S. liquefaciens* MG44, der AHL-negativen Mutante, festgestellt werden konnten (vgl. Abb. C.1.3). Die Wurzelhärchen der Wurzelhaarzone wurden von beiden Bakterienstämmen in einer lockeren Zellverteilung besiedelt.

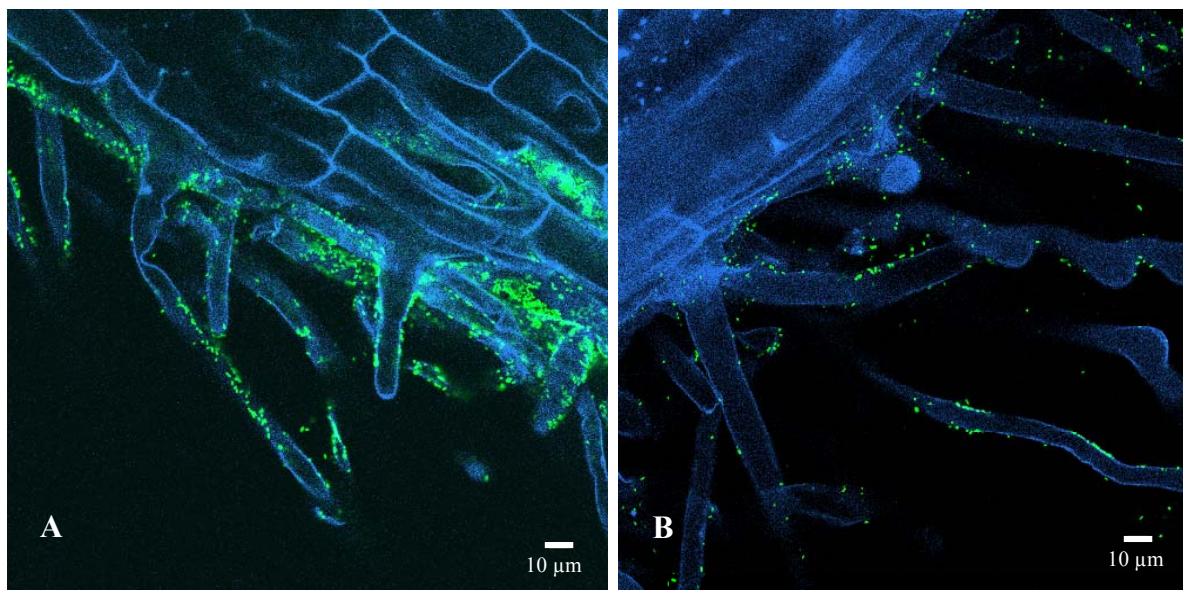


Abbildung C.1.3: Zwei mikroskopische Aufnahmen zur Besiedlung der Wurzelhaarzone einer Seitenwurzel von Tomate im axenischen System. Dargestellt sind unterschiedliche Inokulationsdichten. A) zeigt *Serratia liquefaciens* MG1, Wildtyp und B) *S. liquefaciens* MG44, AHL-negative Mutante. Beide *gfp*-markierten Bakterienstämme sind zur grünen Fluoreszenz angeregt, während die Wurzel eine blaue Autofluoreszenz zeigt. Erkennbar ist die lockere Zellverteilung der Stämme auf den Wurzelhaaren. Objektiv 63x; 1,2 Wasser.

Serratia liquefaciens MG1 und *S. liquefaciens* MG44 zeigten keine Unterschiede im Kolonisierungsverhalten an der Wurzel von Tomatenpflanzen. Sie besiedelten dieselben Wurzelbereiche mit vorwiegend einzelnen Zellen.

C.1.4. Kolonisierungsstudien zu *Pseudomonas putida* IsoF im Vergleich zu *Serratia liquefaciens* MG1

Untersuchungen des Kolonisierungsverhaltens von *Pseudomonas putida* IsoF Wildtyp zeigten die Besiedlung entsprechender Wurzelbereiche wie bei *Serratia liquefaciens* MG1 (s. o.), jedoch unterschieden sie sich deutlich in der Art der Besiedlung. Während *S. liquefaciens* MG1 eine vorwiegend lockere Einzelzellbesiedlung zeigte, war *Pseudomonas putida* IsoF in clusterartigen Mikrokolonien zu finden (vgl. Abb. C.1.4). Der AHL-produzierende Wildtypstamm, *Pseudomonas putida* IsoF, zeigte dabei im Kolonisierungsverhalten ebenfalls keinen Unterschied zu seiner AHL-negativen Mutante (Dürr, Diplomarbeit, LMU-München, 2001). Ein direkter Vergleich beider AHL-produzierender Bakterienstämme zueinander (*S. liquefaciens* MG1, *gfp*-markiert und *P. putida*, *rfp*-markiert), zeigte deutlich die unterschiedlichen Siedlungsformen, wobei beide Stämme die Wurzelhärchen besiedelten.

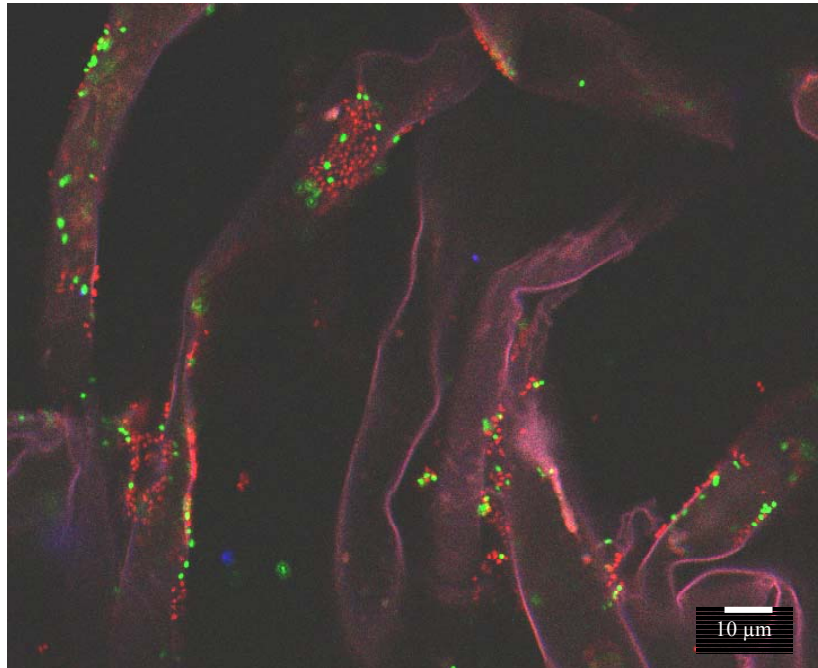


Abbildung C.1.4: Mikroskopische Aufnahme der Wurzelhaarbesiedlung (Ausschnitt) von *Serratia liquefaciens* MG1 (*gfp*-markiert) und *Pseudomonas putida* IsoF (*rfp*-markiert). Deutlich sichtbar ist das unterschiedliche Siedlungsverhalten *Serratia liquefaciens* MG1

C.1.5. Untersuchungen auf endophytische Besiedlungsweise von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44

Tomatenpflanzen aus dem axenischen System wurden auf eine mögliche endophytische Besiedlung der Wurzel durch *Serratia liquefaciens* MG1 oder MG44 untersucht. Unterschiedliche Verfahren wurden hierzu angewendet.

Es wurden Tomatenwurzeln im konfokalen Laser Scanning Mikroskop betrachtet, um mit Hilfe des Lasers tiefere Gewebeschichten auf Vorkommen der Inokulate, *Serratia liquefaciens* MG1 oder MG44, zu untersuchen. Bei diesen Untersuchung konnten maximal Schichten bis 25 μm Tiefe betrachtet werden. *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 wurden hierbei nur an der Oberfläche gefunden (vgl. C.1.5a und C.1.5b). Ausnahmen bildeten die Bereiche um Wurzelverzweigungen, wo auch Bakterien bei Gewebeerletzungen in der Wurzel gefunden werden konnten. Solche Gewebeerletzungen treten im Bereich von Wurzelverzweigung häufiger auf (Jaeger *et al.*, 1999). Das "Durchschimmern" von

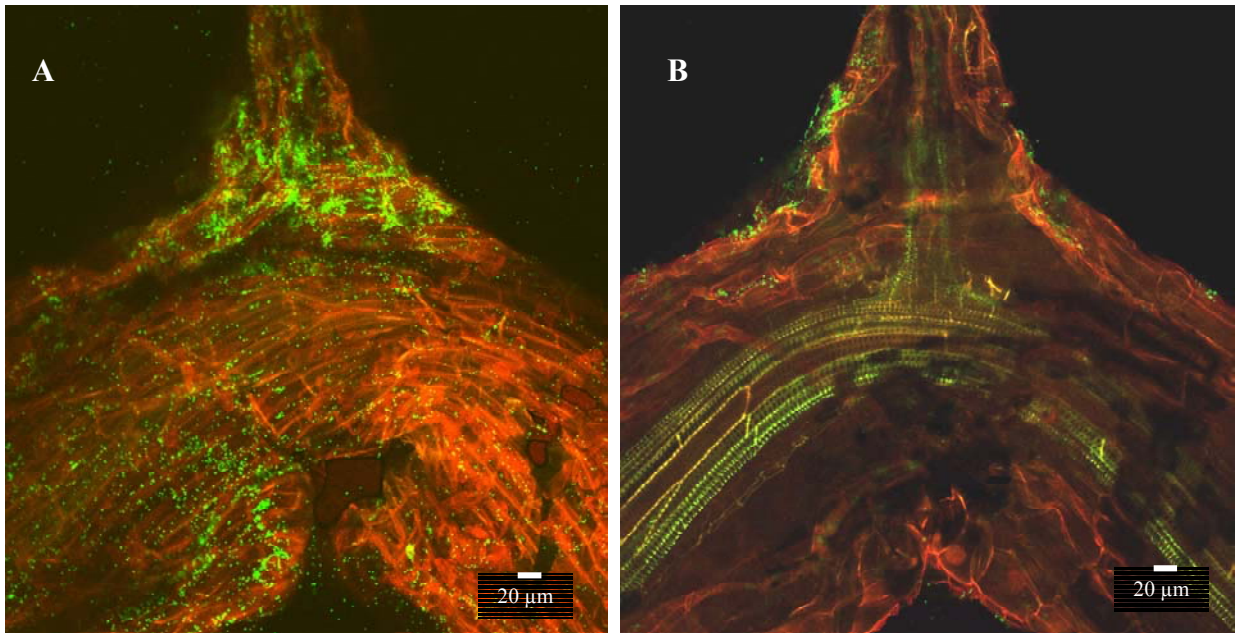


Abbildung C.1.5a und b: Mikroskopische Aufnahmen einer Astverzweigung einer Seitenwurzel von der Hauptwurzel. A) zeigt eine Aufsicht (Wurzeloberfläche) dieser Astverzweigung, während in B) ein 20 µm visueller Tiefenschnitt zu sehen ist. In B) ist das Durchschimmern von Fluoreszenzen und Bakterien in einer Gewebeerkrankung der Wurzel (Mitte links) erkennbar. Objektiv 20x; 0,5 Luft.

Fluoreszenzen der markierten Bakterien von der Wurzeloberfläche und der Wurzel schränkte die Tiefenschärfe der Detektion ein (vgl. Abb. C.1.5b).

In Tomatenwurzeln, die zur Eliminierung der Oberflächenbesiedlung mit Natriumhypochlorid sterilisiert wurden (vgl. B.6.2.1) konnten keine Bakterien in Gewebeschichten bis 25 µm Tiefe nachgewiesen werden (vgl. C.1.5c). Der in Tomatenwurzeln endophytisch lebende *Pseudomonas putida* WCS417r diente dabei als Vergleichsorganismus (Duijff *et al.*, 1997). Die Untersuchungen mit *Pseudomonas putida* WCS417r zeigten nur eine sehr schwache endophytische Besiedlung (Daten nicht gezeigt).

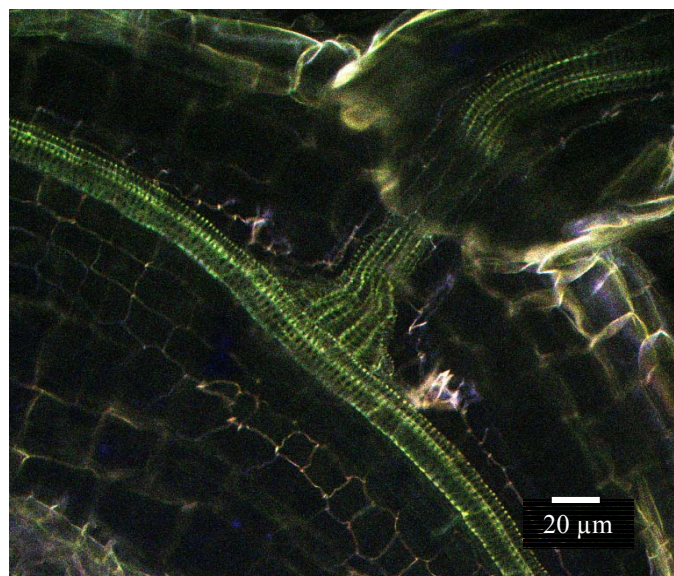


Abbildung C.1.5c: Astverzweigung einer Hauptwurzel nach Oberflächensterilisation (vgl. B.6.1). Visueller Tiefenschnitt in 20 µm. Wurzel inokuliert mit *gfp*-markiertem *S. liquefaciens* MG1 (10^9 Zellen / Pflanze). Objektiv 40x; 0,5 Luft.

Schnittanfertigungen am Mikrotom (vgl. B.6.2.2) ermöglichten tiefere Gewebeschichten zu untersuchen. Die Wurzeln wurden hierzu in Parafin fixiert und in Schnittstücke von 10 – 15 µm Dicke geschnitten. Mit Hilfe der confokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) kombiniert mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnten so die inneren Gewebeschichten der Wurzeln nach dem Vorkommen von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 in endophytischer Lebensweise untersucht werden. *S. liquefaciens* MG1 und MG44 wurde hierbei nur am äußeren Rand (Wurzeloberfläche) von Radialschnitten gefunden (vgl. Abb. C.1.5d). Im Gewebeinneren der Wurzel (wie z. B. in den Leitbündeln) konnte weder der AHL produzierende Wildtypstamm *S. liquefaciens* MG1 noch dessen AHL-negative Mutante MG44 nachgewiesen werden.

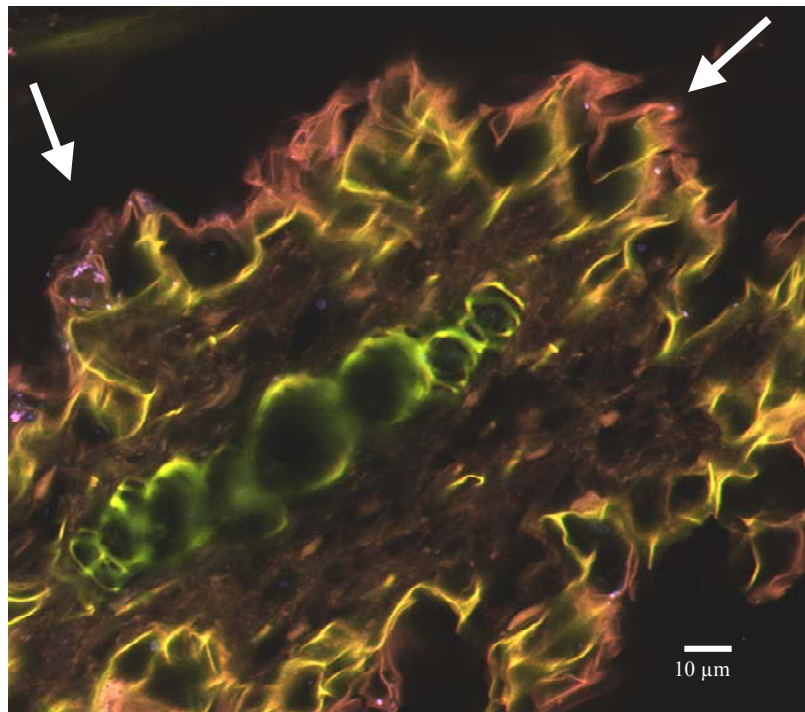


Abbildung C.1.5d: Radialschnitt durch eine Seitenwurzel. *Serratia liquefaciens* MG1 ist nur an den äußeren Schichten zu finden (s. Pfeile). Im Inneren des Schnittes sind die Leitbündel zu erkennen. Zur besseren Darstellung wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit EUB338_{MIX} Cy5, Gam42a Cy3 und Bet42a Oligo durchgeführt. Objektiv 63x; 1,2 Wasser.

C.2 Bestimmung der Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* an Wurzeln von Tomatenpflanzen

C.2.1 Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 im axenischen System

Die Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und der AHL-negativen Mutante MG44 an Wurzeln von MikroTom[®]-Tomatenpflanzen wurde anhand der Bakterienzellzahl bestimmt. Hierzu wurden die Wurzeln nach der Ernte gemörsert, fixiert und auf Polycarbonatfiltern mit definierter Oberfläche immobilisiert (vgl. B.5 und B.7). Untersucht wurde zunächst die Siedlungsdichte der Bakterien im axenischen System. Hier konnte das Wurzelbesiedlungsverhalten eines Bakterienstammes unabhängig von Einflüssen anderer Bakterien untersucht werden (vgl. C.1.1). Die Inokulation erfolgte an eine Woche alten Tomatenpflanzen mit je 1 ml Bakterien in einer Konzentration von $1-4 \times 10^9$ Zellen / Pflanze. Die inokulierte Zelldichte im axenischen System war derjenigen des Bodensystems angepasst, um die Besiedlungsergebnisse aus beiden Systemen besser vergleichen zu können. Dasselbe galt auch für die Probenahmen, die in beiden Systemen in der gleichen Zeitfolge genommen wurden. Dabei zeigte sich, daß die Zellzahl zwar innerhalb des ersten Tages nach Inokulation von *Serratia liquefaciens* leicht zunahm, sich jedoch anschließend auf $3-5 \times 10^9$ Zellen / g Wurzel Frischgewicht (Fg) stabilisierte (vgl. Abb C.2.1 und Tab. C.2.1).

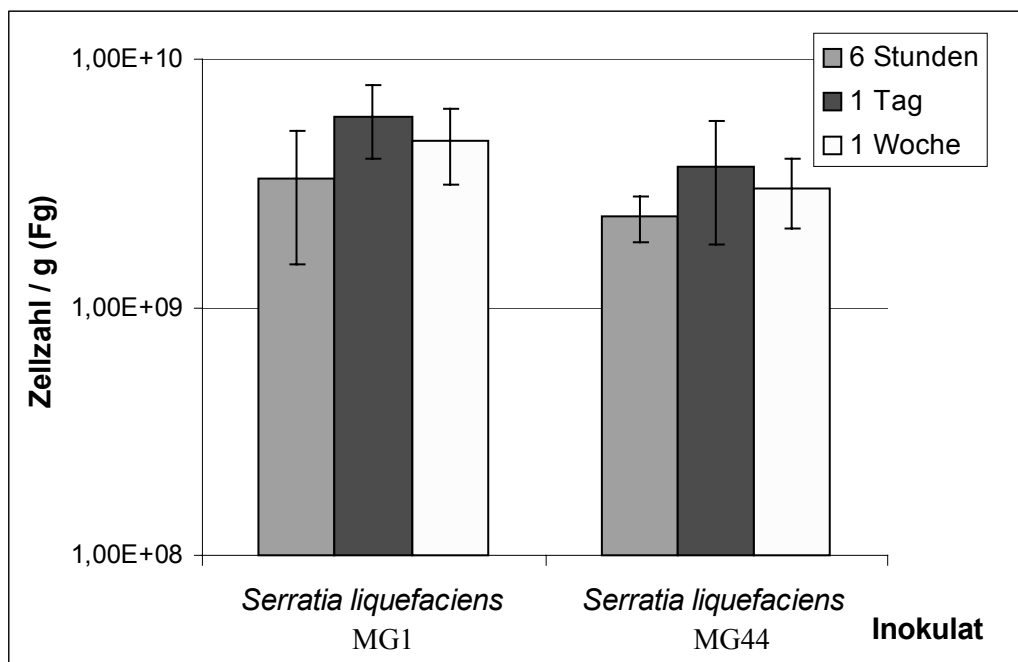


Abbildung C.2.1: Siedlungsdichten von *Serratia liquefaciens* MG1 (AHL-Produzent) und MG44 (AHL-negative Mutante) im **monoxenischen System** (vgl. Tab. C.2.1).

Die maximale Siedlungsdichte im monoxenischen System lag ebenfalls bei 10^9 Zellen / g Wurzel Frischgewicht (Fg). Bei Verwendung einer niedrigeren oder höheren Inokulationsdichte (10^8 und 10^{10} Zellen / Pflanze) pendelte sich die Siedlungsdichte im Verlauf einer Woche ebenfalls auf diese Zellzahl ein (ohne Abbildung).

Tabelle C.2.1: Siedlungszahlen von *Serratia liquefaciens* MG1 (Wildtyp) und MG44 (AHL-negative Mutante) an Tomatenwurzeln im **monoxenischen System**. Die Zellzählung erfolgte auf Polycarbonatfiltern. Die Zellzahlen gelten je g Wurzelfrischgewicht und sind aus 3 parallelen Ansätzen gemittelt (vgl. B.4). Inokuliert wurden $1 - 3 \times 10^9$ Zellen je Pflanze. Die jeweilige Standardabweichung ist den Zellzahlen in Klammern nachgefügt.

	Mittelwerte der Siedlungszellzahl pro g Wurzel (Fg)	
Probenahme	<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	<i>Serratia liquefaciens</i> MG44
6 Stunden	$3,3 \times 10^9$ ($\pm 1,8 \times 10^9$)	$2,3 \times 10^9$ ($\pm 4,8 \times 10^8$)
1 Tag	$5,9 \times 10^9$ ($\pm 1,9 \times 10^9$)	$3,7 \times 10^9$ ($\pm 1,9 \times 10^9$)
1 Woche	$4,7 \times 10^9$ ($\pm 1,6 \times 10^9$)	$3,0 \times 10^9$ ($\pm 9,4 \times 10^8$)

Mittels des U-Tests nach Whitney und Mann wurde die Signifikanz der einzelnen Werte bei einem Signifikanzniveau (α) von 0,05 % bestimmt (vgl. B.8.2 und G.2). Der Unterschied der Zelldichten zwischen der ersten Probenahme nach 6 Stunden und der zweiten nach 1 Tag war signifikant, jedoch nicht der Wert nach 1 Tag verglichen mit dem Wochenwert nach 7 Tagen (vgl. Tab C.2.1). Ein direkter Vergleich der einzelnen Siedlungsdichten des Wildtyps mit der AHL-negativen Mutante von *Serratia liquefaciens* scheint auf ein besseres Siedlungsverhalten des AHL produzierenden Wildtypstammes (MG1) hinzudeuten (vgl. Abb. C.2.1). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (vgl. G.2).

C.2.2 Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 im Bodensystem innerhalb einer Woche

Im Bodensystem wurden Tomatenpflanzen in Blumentöpfen, befüllt mit Standardboden Typ T (Weißtorf, Einheitserde, vgl. B.3.3) verwendet. Inokuliert wurden zwei Wochen alte Pflanzen mit Inokulationsdichten von je 10^9 Zellen / Pflanze. Probenahmen über einen Zeitraum von einer Woche (vgl. Abb. C.2.2 und Tab. C.2.2) zeigten, daß sowohl bei *Serratia liquefaciens* MG1 wie auch bei der AHL-negativen Mutante *S. liquefaciens* MG44 die inokulierte Zellzahl von 10^9 Zellen / g Wurzel (Fg) auf 10^7 Zellen / g abnahm.

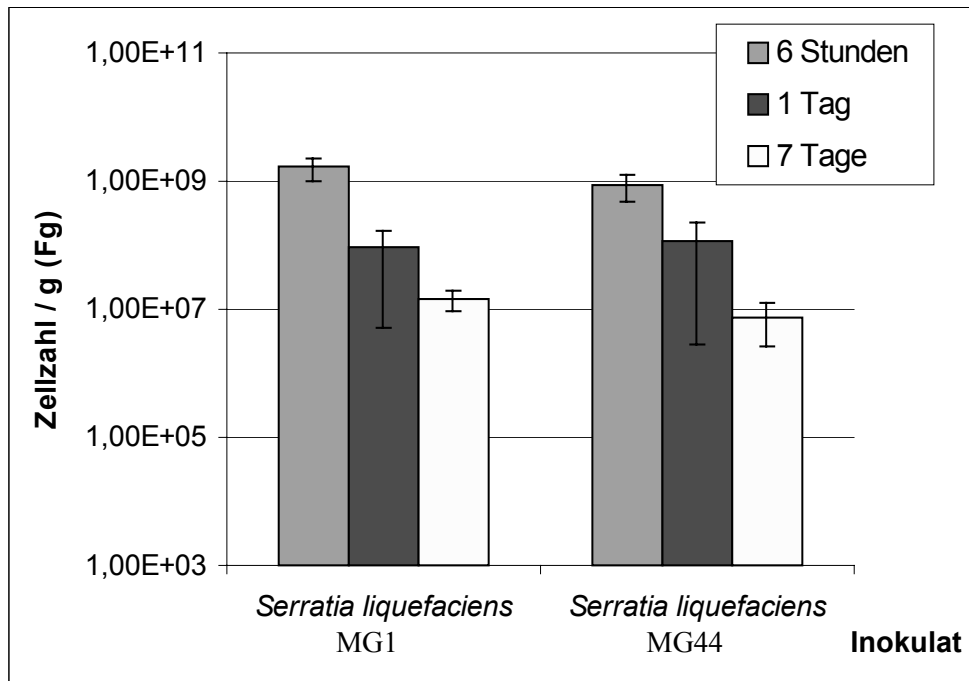


Abbildung C.2.2: Siedlungsdichten von *Serratia liquefaciens* MG1 (AHL-Produzent) und MG44 (AHL-negative Mutante) im **Bodensystem** (vgl. Tab. C.2.2).

Die erste Probenahme 6 Stunden nach der Inokulation der Pflanzen zeigte noch eine Zelldichte von 10^9 Zellen (vgl. Abb. C.2.2). Nach 1 Tag reduzierte sich die Zellzahl bereits um den Faktor 10, nach einer Woche dann um den Faktor 100 (vgl. Tab. C.2.2).

Tabelle C.2.2: Siedlungszahlen von *Serratia liquefaciens* MG1 (Wildtyp) und MG44 (AHL-negative Mutante) an Tomatenwurzeln im **Bodensystem**. Die Zellzahlen gelten je g Wurzelfrischgewicht und sind gemittelt aus 2 Versuchen je 3 Parallelen (vgl. B. 4). Inokuliert wurden $1-4 \times 10^9$ Zellen je Pflanze. Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

Probenahme	Mittelwerte der Siedlungszellzahl pro g Wurzel (Fg)	
	<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	<i>Serratia liquefaciens</i> MG44
6 Stunden	$1,6 \times 10^9$ ($\pm 6,3 \times 10^8$)	$8,8 \times 10^8$ ($\pm 4,1 \times 10^8$)
1 Tag	$9,0 \times 10^7$ ($\pm 8,4 \times 10^7$)	$1,2 \times 10^8$ ($\pm 1,1 \times 10^8$)
7 Tage	$1,5 \times 10^7$ ($\pm 5,4 \times 10^6$)	$7,5 \times 10^6$ ($\pm 3,7 \times 10^6$)

Der Signifikanztest nach Whitney und Mann zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Siedlungsdichte des Wildtyps (MG1) und der AHL-negativen Mutante (MG44) von *Serratia liquefaciens* (vgl. G.2). Der Effekt der Abnahme der Zellzahlen über den Zeitraum von einer Woche (7 Tage) war jedoch signifikant. Ihre Siedlungsdichten verringerten sich im Zeitraum von einer Woche um den Faktor 100. Damit zeigten weder der Wildtyp noch die AHL-negative Mutante von *Serratia liquefaciens* ein dominantes Wachstum an der Wurzel von Tomatenpflanzen im Bodensystem verglichen mit dem axenischen System.

C.2.3 Spezifische Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 im Bodensystem von mehr als einer Woche

Untersucht wurde die Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 relativ zur Gesamtzellzahl über einen längeren Zeitraum, um die bereits in den vorangegangenen Experimenten beobachtete Stabilisierung der Siedlungsdichten (vgl. C.2.2) zu überprüfen. Inokuliert wurden jeweils zwei Wochen alte Tomatenpflanzen mit *Serratia liquefaciens* in einer Zellkonzentration von $1-4 \times 10^9$ Zellen / Pflanze. Bestimmt wurde die spezifische Zellzahl der Inokulate anhand ihrer *gfp*-Markierung im Vergleich zur mittels der DAPI-Färbung (vgl. B.9.3) bestimmten Gesamtzellzahl aller Bakterien an der Wurzel.

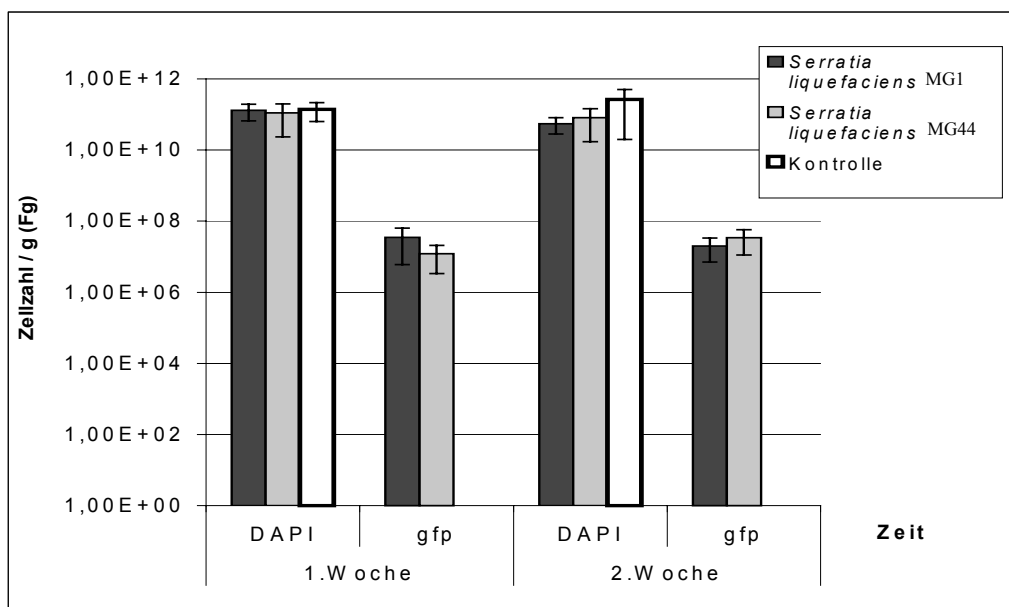


Abbildung C.2.3: Kombinierte Grafik der Zellzahlbestimmungen an Wurzeln von Tomatenpflanzen **im Bodensystem** über einen Zeitraum von zwei Wochen (vgl. Tab. C.2.3). Dargestellt ist einerseits die mittels DAPI-Färbung bestimmte Gesamtzellzahl an mit *Serratia liquefaciens* MG1 oder MG44 inokulierten Wurzeln, sowie einer nicht inokulierten Kontrolle. Und andererseits ein Vergleich der Siedlungsdichte der *gfp*-markierten Bakterienstämme *S. liquefaciens* MG1 und MG44 bestimmt anhand der Anregung zur grünen Fluoreszenz. Die Zellzahlen je g Wurzelfrischgewicht sind gemittelt aus drei parallelen Ansätzen, wobei die inokulierte Zelldichte $1-4 \times 10^9$ Zellen / Pflanze betrug.

Eine Veränderung der Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 war auch nach zwei Wochen nicht feststellbar. Gleiches galt für die mittels DAPI-Färbung bestimmte Gesamtzellzahl. Die Gesamtzellzahl blieb an der Wurzel unabhängig davon ob eine Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 vorlag, bzw. keine Inokulation (Kontrolle) vorgenommen wurde relativ konstant. Auch im Zeitraum von zwei Wochen konnte hier keine Veränderung festgestellt werden. Die Zellzahlen der *gfp*-markierten Bakterien lagen bei

10^7 Zellen / g Frischgewicht (Fg) der Wurzel, während die Gesamtzellzahl 10^{11} Zellen / g Wurzel (Fg) betrug (vgl. Tab. C.2.3).

Statistische Untersuchungen zur Signifikanz (U-Test; vgl. B.8.2) belegten, daß sich die Zellzahlen in beiden Fällen nach einer Woche stabilisierten (vgl. G.2). Es waren keine signifikanten Unterschiede der Siedlungsdichten zwischen *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 nach einer Inkubationszeit von 1 oder 2 Wochen feststellbar. Auch zeigte die Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 im Vergleich mit einer nicht inokulierten Kontrollprobe keinen Einfluß auf die Gesamtzellzahl im gleichen Zeitraum (vgl. Tab. C.2.3).

Tabelle C.2.3: Siedlungsdichten (3 Parallelen je 2 Versuche) pro g Wurzelfrischgewicht von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 über einen Inkubationszeitraum von zwei Wochen **im Bodensystem**. Die Gesamtzellzahl wurde mittels DAPI-Färbung, die Siedlungsdichte von *S. liquefaciens* anhand der *gfp*-Markierungen bestimmt. Untersucht wurde die Wurzelbesiedlung von Pflanzen inokuliert mit *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 und nicht inokulierten Pflanzen (Kontrolle). Die inokulierte Zelldichte betrug $1\text{-}4 \times 10^9$ Zellen / Pflanze. Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

	1 Woche nach Inokulation	2 Wochen nach Inokulation
Gesamtzellzahl nach Inokulation mit <i>S. liquefaciens</i> MG1	$1,3 \times 10^{11}$ ($\pm 6,4 \times 10^{11}$)	$5,5 \times 10^{10}$ ($\pm 2,7 \times 10^{10}$)
davon <i>S. liquefaciens</i> MG1	$3,5 \times 10^7$ ($\pm 2,9 \times 10^7$)	$2,0 \times 10^7$ ($\pm 1,3 \times 10^7$)
Gesamtzellzahl nach Inokulation mit <i>S. liquefaciens</i> MG44	$1,1 \times 10^{11}$ ($\pm 8,7 \times 10^{10}$)	$8,1 \times 10^{10}$ ($\pm 6,4 \times 10^{10}$)
davon <i>S. liquefaciens</i> MG44	$1,2 \times 10^7$ ($\pm 8,7 \times 10^6$)	$3,4 \times 10^7$ ($\pm 2,3 \times 10^7$)
Kontrolle (nicht inokuliert)	$1,4 \times 10^{11}$ ($\pm 7,7 \times 10^{10}$)	$2,6 \times 10^{11}$ ($\pm 2,4 \times 10^{11}$)

C.3 Einfluß von *Serratia liquefaciens* MG1 auf die Rhizosphärenpopulation

Der mögliche Einfluß, den der AHL-produzierende Bakterienstamm *Serratia liquefaciens* MG1 auf die an der Wurzel natürlich vorkommende bakterielle Rhizosphärengemeinschaft hat, wurde mit Hilfe zweier Methoden untersucht. Einerseits wurde die Zusammensetzung ausgewählter Gruppen in der Rhizosphärenpopulation mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestimmt (vgl. B.9). Zum anderen wurde die Methode der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-(t-RFLP)-Analyse zur Erfassung möglicher Veränderungen in der natürlichen Gesamtpopulation der Tomatenrhizosphäre angewendet (vgl. B.12).

C.3.1 Einfluß auf die Rhizosphärenpopulation ausgewählter Bakteriengruppen

Bakterien, die zum "quorum-sensing" befähigt sind lassen sich den Gruppen der Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zuordnen (Bassler *et al.*, 1999; vgl. A.2). Da die AHL-produzierenden Bakterien alle zur Gruppe der Gram-negativen Bakterien gehören, wurde untersucht, welchen Einfluß die Inokulation von *Serratia liquefaciens* MG1 auf die natürliche Gemeinschaft der Gram-negativen Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen hat. Dazu wurde das komplexere Bodensystem verwendet (vgl. B.3.3). Die Inokulationsdosis betrug $1-3 \times 10^9$ Zellen / Pflanze. Die Wurzeln wurden nach der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 zu unterschiedlichen Zeiten geerntet, gemörsert und die so gewonnene Wurzellösung, nach einer PFA-Fixierung, auf Polycarbonatfilter aufgetragen (vgl. B.7.2). Mittels FISH und 16S-rDNS gerichteten Oligonucleotidsonden wurde die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora Gram-negativer Bakterien in α -Proteobakterien, β -Proteobakterien und in γ -Proteobakterien, bestimmt. Eingesetzt wurden hierzu die Sonden: Eub338, Gam42a, Bet42a und Alf1b (vgl. B.9). Stellvertretend für Populationsveränderungen der Gram-positiven Bakterien wurden die Oligonucleotidsonden LGC354_{MIX} und HGC ("low" oder "high", niedriger oder hoher Anteil von GC Basen in der DNS) eingesetzt. Bei den Proteobakterien waren zum ersten Erntezeitpunkt (6 Stunden nach der Inokulation) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Population an der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten und der nicht inokulierten Wurzel (Kontrolle) feststellbar (vgl. Tab. C.3.1a und Abb. 3.1). Bei der Kontrolle fiel ein großer Anteil von α -Proteobakterien ($6,9 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel Frischgewicht (Fg)) und γ -Proteobakterien ($7,5 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) auf. An der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Wurzel zeigten ebenfalls die α -Proteobakterien ($6,3 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) und die γ -Proteobakterien (insgesamt $9,1 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) große Anteile an der

Rhizosphärengemeinschaft. Da *Serratia liquefaciens* MG1 gehört taxonomisch ebenfalls zur Gruppe der γ -Proteobakterien. Der Anteil von *S. liquefaciens* MG1 wurde anhand der *gfp*-Markierung bei der Bestimmung der Siedlungsdichten der γ -Proteobakterien getrennt bestimmt. Damit war ein Vergleich der Siedlungsdichten zwischen den natürlich vorkommenden γ -Proteobakterien und dem *gfp*-markierten Inokulat, *S. liquefaciens* MG1, an der Wurzel möglich. Der Anteil der natürlich vorkommenden γ -Proteobakterien war in der inokulierten Probe ($4,0 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) kleiner als in der Kontrolle ($7,5 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)). Die von *S. liquefaciens* MG1 bestimmte Zellzahl ($5,1 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) deutete auf einen Konkurrenzkampf zwischen *S. liquefaciens* MG1 und den natürlich vorkommenden γ -Proteobakterien hin. Die Anteile der β -Proteobakterien unterschieden sich zur ersten Probenahme kaum zwischen der inokulierten Probe ($2,8 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)) und der Kontrolle ($2,2 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg)).

Tabelle C.3.1a: Zusammensetzung der Bakterienpopulationen an der Wurzel im Bodensystem **6 Stunden** nach der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 (10^9 Zellen / ml) im Vergleich zur nicht inokulierten Kontrolle. Die gemittelten Zellzahlen gelten je g Wurzelfrischgewicht. In Klammern sind die Standardabweichungen angegeben. Die Einteilung in die taxonomische Gruppenzugehörigkeit der Gramnegativen Bakterien erfolgte nach der spezifische Sondenhybridisierung (FISH, s. o.). Die γ -Proteobakterien geben die natürliche Population ohne *S. liquefaciens* MG1 an.

Wurzel	α -Proteobakterien	β -Proteobakterien	γ -Proteobakterien	<i>S. liquefaciens</i> MG1
inokuliert mit <i>S. liquefaciens</i> MG1	$6,3 \times 10^8$ ($\pm 1,2 \times 10^8$)	$2,8 \times 10^8$ ($\pm 1,8 \times 10^8$)	$4,0 \times 10^8$ ($\pm 2,8 \times 10^8$)	$5,1 \times 10^8$ ($\pm 8,8 \times 10^7$)
Kontrolle	$6,9 \times 10^8$ ($\pm 1,3 \times 10^8$)	$2,2 \times 10^8$ ($\pm 1,9 \times 10^8$)	$7,5 \times 10^8$ ($\pm 1,3 \times 10^8$)	-

Beim Erntezeitpunkt 1 Woche nach der Inokulation von *Serratia liquefaciens* MG1 zeigten sich Veränderungen in der Populationszusammensetzung. Auffallend war die starke Abnahme von *S. liquefaciens* MG1 auf $7,2 \times 10^7$ Zellen / g Wurzel (Fg), sowie eine leichte Abnahme der α -Proteobakterien auf $3,6 \times 10^8$ Zellen/g Wurzel (Fg) (vgl. Tab. C.3.1b und Abb. C.3.1). Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme an β -Proteobakterien auf $5,3 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg) und an γ -Proteobakterien auf $6,2 \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg) festgestellt werden. Bei den Kontrollen zeigten sich keine Veränderungen.

Tabelle C.3.1b: Zusammensetzung der Bakterienpopulationen an der Wurzel im Bodensystem **1 Woche** nach der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 (10^9 Zellen / ml) im Vergleich zur nicht inokulierten Kontrolle. Die gemittelten Zellzahlen gelten je g Wurzelfrischgewicht. In Klammern sind die Standardabweichungen angegeben. Die Einteilung in die taxonomische Gruppenzugehörigkeit der Gram-negativen Bakterien erfolgte nach der spezifische Sondenhybridisierung (FISH, s. o.). Die γ -Proteobakterien geben die natürliche Population ohne *S. liquefaciens* MG1 an.

Wurzel	α -Proteobakterien	β -Proteobakterien	γ -Proteobakterien	<i>S. liquefaciens</i> MG1
inokuliert mit <i>S. liquefaciens</i> MG1	$3,6 \times 10^8$ ($\pm 1,7 \times 10^8$)	$5,3 \times 10^8$ ($\pm 1,5 \times 10^8$)	$6,2 \times 10^8$ ($\pm 1,5 \times 10^8$)	$7,2 \times 10^7$ ($\pm 4,0 \times 10^7$)
Kontrolle	$6,6 \times 10^8$ ($\pm 2,2 \times 10^8$)	$2,2 \times 10^8$ ($\pm 1,0 \times 10^8$)	$7,2 \times 10^8$ ($\pm 2,2 \times 10^8$)	-

In Abbildung C.3.1 ist ein graphischen Überblick über die prozentuale Zusammensetzung der Bakterien an der Wurzel aus dem Bodensystem, welche mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert wurde (volle Balken), im Vergleich zur natürlichen, nicht inokulierten Kontrolle (leere Balken) dargestellt.

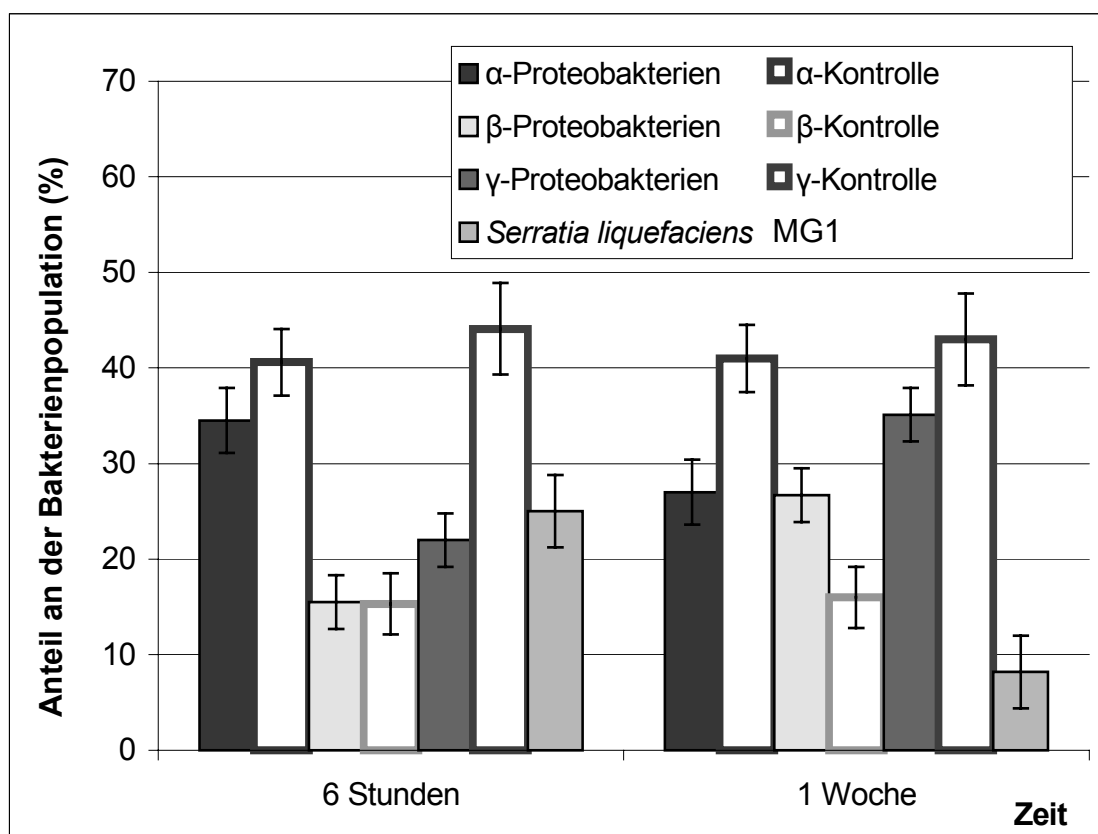


Abbildung C.3.1: Zusammensetzung der Bakterienpopulationen an der Wurzel im Bodensystem nach 6 Stunden und 1 Woche Inkubationszeit (Angaben in Prozent). Dargestellt sind als volle Balken die gemittelten Werte der mit *S. liquefaciens* MG1 (10^9 Zellen / ml) inokulierten Wurzel und als gestreifte Balken die Werte der nicht inokulierten Kontrolle. Die Einteilung der taxonomischen Gruppenzugehörigkeit der Gram-negativen Bakterien erfolgte mittels FISH (vgl. Text). Als γ -Proteobakterien aufgeführt sind jene Bakterien, die nicht *Serratia liquefaciens* MG1 zugeordnet werden konnten. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf EUB =100%.

Die Bakterienpopulation wurde anhand der EUB338-Sonde nach FISH als 100% festgelegt. Die angegebenen prozentualen Anteile der bestimmten Gram-negativen Bakteriengruppen beziehen sich auf diesen Wert. Der Anteil der Bakterienpopulation betrug an der Gesamtzellzahl (nach DAPI) bei der inokulierten Probe 49%, bei der Kontrolle 41%.

Die in diesem Experiment verwendete einfache Oligonucleotidsonde EUB338 umfaßt im Gegensatz zur inzwischen standardmäßig eingesetzten Sonde EUB338 I, II und III (EUB338_{Mix}) nicht die Bakterien der *Planctomycetales* und *Verrucomicrobiales* (vgl. B.9.1.2). Eine vergleichende Nachprüfung beider Sonden an den hier verwendeten Rhizosphärenproben zeigte eine Übereinstimmung der Zellzahlen bestimmt nach EUB338 zu EUB338_{Mix} von 95 %. Die verbleibende Differenz zeigte sich in den untersuchten Proben als nicht signifikant.

Der U-Test zur Feststellung der Signifikanz nach Whitney und Mann zeigte, daß die Verschiebungen der Gemeinschaft der untersuchten Gram-negativen Bakterien in der Tomatenrhizosphäre signifikant waren (vgl. G.2). Die Abnahme der Siedlungsdichten von α -Proteobakterien und *Serratia liquefaciens* MG1 im Zeitraum von einer Woche waren ebenso signifikant, wie die Zunahme der β -Proteobakterien. Die Kontrollen zeigten im gleichen Zeitraum keine signifikanten Änderungen.

Die Überprüfung der Gram-positiven Bakterienpopulation in der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Rhizosphären ergab nur signifikante Veränderungen bei den LGC-Bakterien. Hier verdoppelte sich die Zellzahl innerhalb einer Woche von $1,04 (^{+/-} 0,42) \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg) auf $2,34 (^{+/-} 0,89) \times 10^8$ Zellen / g Wurzel (Fg). Die Zellzahl der nicht inokulierten Kontrolle zeigte bei $0,93 (^{+/-} 0,28) \times 10^7$ Zellen / g Wurzel (Fg) keine Veränderungen. Auch die Zahl der HGC-Bakterien zeigte sich mit $0,98 (^{+/-} 0,26) \times 10^7$ Zellen im Vergleich zur nicht inokulierten Kontrolle mit $0,93 (^{+/-} 0,33) \times 10^7$ Zellen / g Wurzel (Fg) unverändert.

C.3.2 Untersuchung zur Populationszusammensetzung nach Inokulation mit *Serratia liquefaciens* MG1 mittels t-RFLP-Analyse

Für die Anwendung der t-RFLP-Analyse zur Untersuchung der Rhizosphären- und Wurzelpopulation an Tomatenpflanzen waren Optimierungen zu folgenden Versuchsschritten notwendig:

- Extraktion der DNS aus Rhizosphäre und Wurzel
- Testung der Primerspezifität zur 16S-rDNS Amplifikation

C.3.2.1 DNS-Extraktion aus Rhizosphäre und Wurzeln von Tomatenpflanzen

Für die gleichzeitige Extraktion von DNS aus pflanzlichem Gewebe und aus wurzelanhaftenden Rhizosphärenboden erwies sich das Zerreiben in flüssigem Stickstoff gefrorener Tomatenwurzeln in Verbindung mit einem Bodenextraktionsverfahren als bestgeeignete Methode (vgl. B.12.1). Die wurzelassoziierten Bakterienzellen waren nach Zerreiben des gefrorenen Wurzelgewebes für die Extraktion der DNS besser zugänglich, wobei die DNS gut von Huminstoffen und freier RNS aus den anhaftenden Bodenpartikeln der Rhizosphäre getrennt werden konnte. Photometrische Bestimmungen der Optischen Dichte (OD, vgl. B.12.2) ergaben eine hohe Ausbeute und große Reinheit in Bezug auf RNS-Verunreinigungen oder Proteinanteile bei dieser Methode. Die Tabelle C.3.2.1 zeigt die gemittelten Werte der Ausbeute an extrahierter DNS von 12 inokulierten Pflanzen je Inokulat.

Tabelle C.3.2.1: Gemittelte Werte der DNS Ausbeute aus 12 gemörserten Wurzelextrakten je Inokulat. Kontrolle ist die nicht inokulierte Wurzel. Die Zeit gibt den Erntezeitpunkt nach der Inokulation an. Der Reinheitsgrad berechnet sich nach der OD-Messung der DNS (vgl. B.12.2).

Inokulat	DNS-Konzentration (µg / ml)	Reinheitsgrad	
		frei von RNS ($\geq 2,2$)	frei von Proteinen ($\geq 1,8$)
<i>S. liquefaciens</i> MG1	64	10,9	5,3
<i>S. liquefaciens</i> MG44	53,7	13,6	2,5
Kontrolle	51,2	16,8	2,3

Andere Verfahren zur Anreicherung von Bakterienzellen in Bodenproben, wie z. B. die Verwendung von Extraktionslösungen oder die Dichtegradientenzentrifugation, erbrachten bei der anschließenden Extraktion keine Verbesserung der gewonnenen Ausbeute von DNS.

C.3.2.2 Primerspezifität zur 16S-rDNS Amplifikation

Die zur 16S-rDNS Amplifizierung eingesetzten Primer (vgl. B.12.3) wurden auf ihre Bindungsspezifität getestet, um sicherzustellen, daß nur bakterielle DNS amplifiziert wurde. Die Überprüfung der Primerspezifität erfolgte über einen Vergleich der Bindungssequenzen mit DNS-Sequenzen der Datenbank von Genomatix (Genomatix Software GmbH, München, D; www.genomatix.de). Der Datenbankabgleich ergab erst bei einer Toleranz von 4 bis 5 Fehlpaarungen eine Ähnlichkeit mit Strukturgenen der Tomatenpflanze (*Lycopersicon esculentum*) (vgl. Tab. C.3.2.2).

Tabelle C.3.2.2: Bindungsmöglichkeiten der eingesetzten Primer 616F und 630R im Genom der Tomatenpflanze.

Primer	Fehlpaarungen	Gen-Amplifikat	Referenz
616F	5	Sucrose Phosphat Synthase (sps)	Islam, 2001
630R	4	CLB1	Kiyosue & Ryan, 1997

Um auszuschließen, daß Fehlbindungen mit Tomaten-DNS die Amplifikation der 16S-rDNS zur t-RFLP-Analyse stören, wurde DNS aus dem Sproß einer im Bodensystem gewachsenen Tomatenpflanze, ebenso wie aus der Wurzel einer im axenischen Pflanzensystem gewachsenen Tomatenpflanze extrahiert (vgl. B.12.1.2). Die durchgeführten PCR-Ansätzen ergaben jedoch kein Amplifikat. Damit konnte eine Fehlamplifikation bei Verwendung der Primer 616F und 630R ausgeschlossen werden.

C.3.2.3 Fragmentdaten der t-RFLP-Analyse

Die t-RFLP-Analyse erfolgte mit Hilfe eines automatischen Sequenzierapparates, der nach dem Verfahren der Kapillarelektrophorese die 16S-rDNS Fragmentstücke nach Größe trennte und die fluoreszenzmarkierten Fragmentstücke der 16S-rDNS als Meßsignale ("Peak") detektierte. Da die Amplifikate der für die 16S-rDNS codierenden Gene nur an einem Ende mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen waren, entsprach jedes Detektionssignal einem 16S-rDNS-Amplifikat und damit einer Bakterienpopulation (vgl. Abb. B.12.). Die Anzahl der detektierten Signale ermöglicht einen Einblick auf die zahlenmäßig dominanten Mitglieder der Bakteriengemeinschaft in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen. Bei diesem Detektionsverfahren konnten nur qualitative und keine quantitativen Aussagen über das Vorkommen bestimmter Bakterien getroffen werden (vgl. D.4.4). Die Dynamik der Rhizosphärenpopulation wurde an Veränderungen des jeweiligen Fragmentmusters verfolgt. Dazu wurden Wurzeln, die mit dem AHL-produzierenden Bakterienstamm *Serratia*

liquefaciens MG1 inokuliert worden waren, mit Proben verglichen, die mit der AHL-negativen Mutante *S. liquefaciens* MG44 inokuliert worden waren. Nicht inokulierte Wurzeln wurden als Kontrolle verwendet. Die Probenahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, um den zeitlichen Zusammenhang berücksichtigen zu können. Von der extrahierten DNS wurden mittels der fluoreszenzmarkierten Primer die DNS der für die 16S-rDNS codierenden Gene in der PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *Hin6I* geschnitten (vgl. B12.1-5). Bei der anschließend durchgeführten t-RFLP-Analyse dienten Fragmentstücke in definierter Größe als interner Standard und ermöglichten eine Größenübereinstimmung der in der t-RFLP detektierten fluoreszenzmarkierten Fragmentstücke (vgl. B.12). Wiederholungen der Untersuchungen ergaben eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Analyse der Fragmentstücke der mit dem fluoreszenzmarkierten 616F-Primer amplifizierten 16S-rDNS zeigten gut vergleichbare Fragmentmuster. Bei den inokulierten Proben fand sich das erwartete Meßsignal für *Serratia liquefaciens* bei 363 bp (vgl. B.12.5). Die Analyse der mit dem fluoreszenzmarkierten 630R-Primer amplifizierten 16S-rDNS ergab jedoch unvollständige Fragmentmuster. Charakteristische Merkmale wie z. B. das Meßsignal für *Serratia liquefaciens* lagen mit 13 bp außerhalb des detektierbaren Bereiches. Die t-RFLP-Analyse stützte sich daher auf das gesicherte Fragmentmuster der mit dem Primer 616F amplifizierten 16S-rDNS.

Die t-RFLP-Untersuchungen wurden zu 4 verschiedenen Zeiten der Probenahme (2 Stunden, 6 Stunden, 1 Tag und 1 Woche nach der Inokulation) durchgeführt (vgl. Tabellen C.3.2.3a-c). Bei der Detektion der Fragmentmuster traten in jedem Analyse-Lauf funktionsbedingt (Kapillarelektrophorese) leichte Verschiebungen der Retentionszeiten auf. Da diese Verschiebungen der Retentionszeiten für alle Signale galten, blieben die Einzelwerte in Relation zur ebenfalls verschobenen Retentionszeit der Standardgrößen charakteristisch. Die Einzelergebnisse je Probenahme sind als gemittelte Werte der Fragmentstücke einer Probe zu allen Zeiten zusammengefaßt und im Vergleich den anderen Proben gegenübergestellt (vgl. C.3.2.3d). So konnten die Stellen gleicher Fragmentmuster und Unterschiede lokalisiert werden. Die Kapitel C.3.2.4 bis C.3.2.6 beziehen sich auf die Retentionszeiten der detektierten Fragmentstücke zu den verschiedenen Probenahmezeiten, die in den Tabellen C.3.2.3a-d zusammengefaßt sind. Im Anhang finden sich die Originalergebnisse mit weiteren Meßdaten tabellarisch zusammengefaßt (vgl. G.1).

Tabelle C.3.2.3a: Liste der Retentionszeiten der detektierten Fragmentstücke aus der Rhizosphäre von **nicht inokulierten** Pflanzen (**Kontrollen**) zu 4 Probenahmezeiten. Der Fragment-Größenstandard ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Retentionszeiten des Größenstandards sind grau unterlegt.

Größen-Standard	2 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	1 Woche
	0	-	-	0
60	0,04	0	0	0,04
	0,39	0,34	0,34	0,37
70	0,43	0,38	0,38	0,42
	0,61	0,61	0,61	0,63
	0,66	0,68	0,68	0,67
	0,73	0,75	0,76	0,71
	0,81	0,80	0,80	0,79
80	0,85	0,83	0,82	0,84
	0,87	0,84	0,84	0,85
90	1,28	1,21	1,21	1,24
100	1,72	1,65	1,65	1,67
	2,19	2,18	2,19	2,19
	2,22	2,23	2,22	2,24
	2,31	2,32	2,31	2,33
	2,38	2,38	2,38	2,38
	2,43	2,43	2,42	2,43
	2,49	2,48	2,46	2,48
120	2,53	2,51	2,50	2,52
	2,56	2,52	2,52	2,53
	2,58	2,55	2,56	2,57
	2,60	2,60	2,59	2,61
	2,73	2,74	2,73	2,74
140	3,47	3,37	3,36	3,38
160	4,46	4,35	4,34	4,34
	4,50	4,52	4,51	4,52
	4,58	4,57	4,57	4,57
180	5,43	5,31	5,29	5,29
190	5,93	5,8	5,77	5,77
200	6,43	6,29	6,26	6,26
220	7,48	7,32	7,29	7,27
240	8,51	8,33	8,30	8,28
260	9,59	9,40	9,35	9,33
280	10,70	10,48	10,43	10,40
300	11,82	11,58	11,52	11,49
320	12,94	12,69	12,62	12,59
340	14,08	13,8	13,73	13,70
360	15,24	14,94	14,87	14,83
380	16,39	16,07	15,99	15,95
400	17,55	17,21	17,12	17,09
420	18,74	18,37	18,28	18,25

Ergebnisse

Tabelle C.3.2.3b: Liste der Retentionszeiten der detektierten Fragmentstücke aus der Rhizosphäre von mit *S. liquefaciens* MG44 inokulierten Pflanzen zu 4 Probenahmezeiten. Der Fragment-Größenstandard ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Retentionszeiten des Größenstandards sind grau unterlegt.

Größen-Standard	2 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	1 Woche
60	0	0	0	0
	0,34	0,33	0,34	0,34
70	0,38	0,38	0,38	0,36
	0,6	0,6	0,6	0,57
	0,64	0,62	0,62	0,61
	0,68	0,67	0,68	0,65
	0,76	0,74	0,75	0,73
	0,80	0,79	0,79	0,78
80	0,82	0,81	0,81	0,80
90	1,21	1,20	1,21	1,17
100	1,64	1,62	1,64	1,60
	2,10	2,11	2,10	2,10
	2,19	2,19	2,21	2,19
	2,28	2,28	2,28	2,29
	2,34	2,34	2,35	2,34
	2,39	2,39	2,4	2,38
	2,44	2,43	2,45	2,43
120	2,49	2,47	2,49	2,46
	2,56	2,56	2,58	2,56
	2,58	2,69	2,65	2,65
	3,23	3,23	3,24	3,24
140	3,36	3,32	3,35	3,28
160	4,34	4,29	4,32	4,22
	4,46	4,48	4,49	4,49
	4,52	4,52	4,54	4,53
180	5,30	5,23	5,26	5,15
190	5,79	5,71	5,74	5,63
	-	6,11	6,13	6,11
200	6,29	6,19	6,23	6,14
220	7,32	7,20	7,24	7,10
240	8,34	8,20	8,24	8,09
260	9,41	9,25	9,29	9,12
280	10,5	10,31	10,36	10,17
300	11,6	11,39	11,44	11,24
320	12,72	12,48	12,52	12,31
340	13,84	13,57	13,62	13,40
360	14,99	14,69	14,74	14,51
	15,55	15,54	15,55	15,56
380	16,12	15,79	15,85	15,62
400	17,27	16,91	16,98	16,72
420	18,44	18,05	18,12	17,85

Ergebnisse

Tabelle C.3.2.3c: Liste der Retentionszeiten der detektierten Fragmentstücke aus der Rhizosphäre von mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Pflanzen zu 4 Probenahmezeiten. Der Fragment-Größenstandard ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Retentionszeiten des Größenstandards sind grau unterlegt.

Größen-Standard	2 Stunden	6 Stunden	24 Stunden	1 Woche
60	0	0,04	0	0
	0,12	0,11	0,12	0,12
	0,33	0,34	0,33	0,33
70	0,38	0,42	0,38	0,39
	0,63	0,64	0,62	0,63
	0,67	0,72	0,67	0,69
	0,75	0,78	0,75	0,75
	-	0,81	0,79	0,80
80	0,79	0,82	0,8	0,82
	0,82	0,84	0,82	0,83
90	1,2	1,25	1,2	1,22
100	1,63	1,68	1,63	1,66
	2,14	2,2	2,15	2,18
	2,2	2,26	2,21	2,24
	2,34	2,33	2,36	2,34
	2,39	2,4	2,4	2,4
	2,44	2,45	2,45	2,44
	-	2,5	2,48	2,48
120	2,48	2,54	2,49	2,52
	2,52	2,58	2,53	2,58
	2,57	2,63	2,58	2,62
	2,7	2,77	2,72	2,75
	3,3	3,33	3,32	3,31
140	3,40	3,41	3,36	3,40
160	4,30	4,38	4,33	4,38
	4,57	4,55	4,50	4,56
	4,63	4,60	4,65	4,61
180	5,24	5,32	5,28	5,34
190	5,73	5,81	5,77	5,83
	-	6,28	6,26	6,28
200	6,31	6,30	6,28	6,33
220	7,23	7,33	7,29	7,36
	-	-	-	8,34
240	8,23	8,33	8,30	8,39
260	9,29	9,39	9,36	9,46
280	10,36	10,47	10,44	10,55
300	11,45	11,57	11,55	11,66
320	12,55	12,67	12,65	12,78
340	13,65	13,78	13,77	13,91
360	14,79	14,92	14,92	15,07
	15,43	15,43	15,42	15,44
380	15,91	16,04	16,05	16,22
400	17,04	17,18	17,20	17,38
420	18,20	18,34	18,38	18,57

Ergebnisse

Tabelle C.3.2.3d: Liste der aus den Einzelproben (vgl. Tab. C.3.2.3a-c) gemittelten Retentionszeiten der detektierten **Fragmentstücke** aller Proben **im Vergleich**. Kontrolle = nicht inokulierte Pflanzen; MG1 = *S. liquefaciens* MG1; MG44 = *S. liquefaciens* MG44. Der Fragment-Größenstandard ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die Retentionszeiten des Größenstandards sind grau unterlegt. Die Unterschiede der Fragmentmuster sind mit Pfeilen hervorgehoben.

Größen-Standard	Kontrolle	MG1	MG44	Unterschiede
60	0,02	0,01	0	
	0,12	0,12	0,11	
	0,36	0,35	0,34	
70	0,39	0,39	0,38	
	0,58	0,59	0,59	
	0,63	0,63	0,65	
	0,68	0,69	0,71	
	0,74	0,76	0,77	
	0,80	0,80	0,79	
80	0,83	0,81	0,8	
	0,85	0,83	0,84	
90	1,24	1,22	1,2	
100	1,67	1,65	1,63	
	2,21	2,16	2,13	
	2,24	2,22	2,18	
	2,32	2,3	2,29	
	2,38	2,37	2,34	
	2,45	2,4	2,39	
	2,51	2,46	2,44	
120	2,53	2,51	2,47	
	2,55	2,54	2,56	
	2,58	2,6	2,59	
	2,72	2,73	2,68	
	3,43	3,34	3,28	
140	3,50	3,38	2,47	
160	4,37	4,35	4,29	
	4,52	4,52	4,45	
	4,57	4,58	4,56	
180	5,33	5,3	5,24	
190	5,82	5,79	5,72	
(199)		6,18	6,15	←
200	6,31	6,28	6,21	
220	7,34	7,3	7,22	
(238)		8,34		←
240	8,36	8,31	8,22	
260	9,42	9,38	9,27	
280	10,5	10,55	10,28	
300	11,6	11,56	11,42	
320	12,71	12,66	12,51	
340	13,83	13,78	13,61	
360	17,97	14,93	14,73	
(363)		15,43	15,56	←
380	16,1	16,06	15,85	
400	17,24	17,2	16,97	
420	18,41	18,37	18,12	

C.3.2.4 t-RFLP-Analyse der Kontrollprobe

Die Kontrollprobe war eine nicht inokulierte Wurzel aus dem Bodensystem (vgl. B.4). Die Kontrollprobe zeigte 18 Fragmentstücke bis zu einer Größe von 180 bp (vgl. Tab. C.3.1.3a). Die meisten Fragmentstücke (insgesamt 15) wurden im Bereich 70 bis 140 bp detektiert. Weitere Fragmentstücke fanden sich zu den Retentionszeiten 0,36 (< 70 bp) und 4,52 sowie 4,57 (jeweils > 160 bp). Diese detektierten Fragmentstücke waren zu allen Probezeitpunkten feststellbar.

C.3.2.5 t-RFLP-Analyse der mit *Serratia liquefaciens* inokulierten Proben

Bei den mit der AHL-negativen Mutante *Serratia liquefaciens* MG44 inokulierten Proben wurden dagegen 19 Fragmentstücke bis zu einer Größe von 363 bp nachgewiesen (vgl. Tab. C.3.2.3b und c). Die Mehrheit der Fragmentstücke (insgesamt 14) fand sich auch hier zwischen 70 und 140 bp. Weitere Fragmentstücke wurden zu den Retentionszeiten von 0,34 (< 70 bp), 0,59 (> 70 bp), 4,45 und 4,50 (beides > 160 bp), sowie 6,15 (> 190 bp) und 15,56 (> 360 bp) gefunden. Bei *Serratia liquefaciens* MG1, dem AHL produzierenden Wildtyp sah das Fragmentmuster dem der AHL-Mutante sehr ähnlich. Es wurden 22 Fragmente detektiert, davon wieder 15 im Bereich zwischen der Fragmentgrößen 70 und 140 bp. Das größte Fragmentstück lag bei 363 bp, das kleinste bei 60 bp. Weitere Fragmentstücke konnten zu den Retentionszeiten von 4,52 und 4,58 (beides > 160 bp) sowie 6,28 (>190 bp), 8,34 (> 220 bp) und 15,43 (> 360 bp) festgestellt werden (vgl. Tab. C.3.2.3b und c).

C.3.2.6 Vergleich der t-RFLP-Fragmentmuster

Ein direkter Vergleich des gesamten Fragmentmusters aller Proben unabhängig von dem Zeitpunkt der Probenahme (vgl. Tab. C.3.2.3 d) zeigte große Ähnlichkeiten der inokulierten mit den nicht inokulierten Proben. Das galt besonders für den Bereich der 20 Fragmentstücke der Kontrolle zwischen 60 bp und 180 bp. Für jedes detektierte Fragmentensignal der Kontrolle gab es ein adäquates bei der inokulierten Probe. Auffallende Unterschiede im Vergleich der Fragmentmuster aller Proben waren Fragmente der Größe 199 bp, 238 bp und 363 bp (vgl. Tab. C.3.2.3d). Bei dem Fragment der Größe 363 bp handelte es sich um das bei einem computersimulierten Enzymverdau der 16S-rDNS ermittelte charakteristische Fragmentstück von *Serratia liquefaciens* (vgl. B.12.5). Das Vorhandensein der Fragmentstücke in der Größe von 199 bp in den mit *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 inokulierten Wurzelproben und des

238 bp in der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Probe konnte damit jedoch nicht erklärt werden. Während das Fragment der Größe 199 bp bereits 6 Stunden nach der Inokulation detektierbar war, trat das Fragmentstück der Größe 238 bp erst bei der Probenahme nach einer Woche auf (vgl. Tab. C.3.2.3 c). Möglich wäre eine durch die Inokulation von *Serratia liquefaciens* Kulturen stimulierte Veränderung an der Wurzel von Tomatenpflanzen.

C.3.2.7 Auswertung der Fragmentdaten der t-RFLP-Analyse

Interessant war die Detektion dieser zur Kontrolle unterschiedlichen Fragmentstücke, da sie Hinweise auf die Veränderung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft an Tomatenpflanzen nach Inokulation von *Serratia liquefaciens* liefert. Während das 199 bp große Fragmentstück sowohl bei dem AHL-produzierenden Wildtyp von *S. liquefaciens* MG1 als auch bei dessen AHL-negativen Mutante MG44 auftrat, fand sich das 238 bp ausschließlich bei dem AHL-produzierenden Wildtypstamm. Ein Datenbankvergleich mittels des Analyseprogramms TAP ("T-RFLP Analysis Program") sollte Ähnlichkeiten zu Fragmentstücken bekannter Bakterien darstellen ("Ribosomal Data Project II" (RDPII), Michigan State University, vgl. B.12.7). Es ist zu berücksichtigen, daß die Datenbank sich noch im Aufbau befindet und daher nur eingeschränkte Aussagen erlaubt. Daher wurden die Ergebnisse einzeln mit Hilfe des computergestützten Analyseprogramms ARB geprüft (Ludwig *et al.*, 2002 submitted). Die Überprüfung der im Vergleich zur TAP 10 x größeren Datenbank an 16S-rDNS-Sequenzen von ARB bestätigte die Ergebnisse.

Das Ergebnis dieser Datenbanksuche ist in Tabelle C.3.2.7a und b dargestellt. Der Datenbankabgleich des 199 bp großen Fragments ergab drei Bakterien mit ähnlich großen Fragmentstücken, die alle zur Gruppe der Fusobakterien gehörten (vgl. Tab. C.3.2.7a). Fusobakterien sind als humanpathogene Krankheitserreger des Intestinaltraktes oder der Keimbahn beim Menschen bekannt (Pschyrembel, 1998). Sie sind strikte Anaerobier, die nur unter sehr selektiven Bedingungen leben können. Bei einer höheren Fehlertoleranz von ± 10 bp waren ebenfalls Übereinstimmungen zu Bakterien der Gattung *Burkholderia* zu finden. Phylogentisch gehören alle Bakterien, die Übereinstimmungen zu den detektierten Fragmentstücken zeigten, zu den Gram-negativen Bakterien und dort zur Untergruppe der β -Proteobakterien.

Ergebnisse

Tabelle C.3.2.7a: TAP-Analyse für das 199 bp große Fragmentstück. Die Fehlertoleranz lag bei ± 1 bp.

Fragmentgröße (bp)	Bakterienstamm	Referenz-Nr.
199	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	ATCC2557
199	<i>Fusobacterium varium</i>	ATCC8501
200	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	ATCC25563

Das 238 bp große Fragmentstück, das 1 Woche nach der Inokulation des AHL-produzierenden Wildtypstammes *Serratia liquefaciens* MG1 in den Proben zu finden war, ergab beim Datenbankabgleich 31 Bakterienstämme mit übereinstimmenden Fragmenten (vgl. Tabelle C.3.2.7b). Davon gehörten 28 Bakterienstämme zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien und können dort zur Gruppe der "low GC" (DNS mit niedrigem GC-Gehalt) zusammengefaßt werden. Bei 25 der angegebenen Bakterienstämme stimmte die Größe des Fragmentstückes von 238 bp genau überein. Zu den genau übereinstimmenden gehörten die Bakterienstämme der Gattungen *Staphylococcus*, *Aneurinibacillus* und *Bacillus*, wobei *Staphylococcus* und *Bacillus* besonders dominant vertreten waren. Die anderen Bakterienstämme der Gattungen *Clostridium*, *Brochothrix* und *Erysipelothrix* wurden im Fehlertoleranzbereich von ± 1 bp gefunden. Nach den natürlichen Lebensverhältnissen, in denen diese Bakterien zu finden sind, können jedoch *Brochothrix* (Erreger der Lebensmittelfäulnis), *Aneurinibacillus* (humanpathogener Erreger) und *Erysipelothrix* (Rotlaufkrankung bei Schweinen) als potentielle Bodenbakterien ausgeschlossen werden. In der engeren Auswahl standen damit Bakterienstämme von *Clostridium*, *Staphylococcus* und *Bacillus*. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß die aufgeführten humanpathogenen Clostridien (*Clostridium botulinum* und *Clostridium estertheticum*) zu den von *Serratia liquefaciens* MG1 induzierten Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen gehören. Bei den verbliebenen Daten der Datenbankanalyse fanden sich mehrfach Übereinstimmung mit Bakterienstämmen von *Bacillus subtilis*, während von der Gattung *Staphylococcus* insgesamt 16 verschiedene Stämme ausgewiesen wurden. In Tabelle C.3.2.7b sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Ergebnisse

Tabelle C.3.2.7b: Dargestellt ist eine Liste der mit dem TAP-Analyseprogramm ermittelten Bakterien, die bei einer t-RFLP-Analyse Fragmente der gleichen Größe zeigen. Die Fehlertoleranz lag bei ± 1 bp.

Fragmentgröße (bp)	Bakterienstamm	Referenz-Nr.
237	<i>Brochothrix campestris</i>	ATCC43754
237	<i>Clostridium butulinum</i> D6f	NCTC8265
237	<i>Clostridium estertheticum</i>	NCIMB12511
238	<i>Staphylococcus succinus</i>	AF008220
238	<i>Staphylococcus arletta</i> BP47	ATCC43957
238	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC12600
238	<i>Staphylococcus capitis</i>	ATCC49326
238	<i>Staphylococcus caprae</i>	ATCC35538
238	<i>Staphylococcus carnosus</i>	ATC51365
238	<i>Staphylococcus cohnii</i>	ATCC49330
238	<i>Staphylococcus delphini</i>	ATCC49330
238	<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC43958
238	<i>Staphylococcus kloosii</i>	ATCC43959
238	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC43809
238	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	ATCC51129
238	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	ATCC49545
238	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	DSMZ4807
238	<i>Staphylococcus succinus</i>	ATCC700337
238	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	ATCC51154
238	<i>Bacillus subtilis</i>	AF008220
238	<i>Bacillus subtilis</i> A405	AF058767
238	<i>Bacillus subtilis</i> YB380	AF078812
238	<i>Bacillus subtilis</i> A405	AF058767
238	<i>Bacillus circulans</i>	IAM12462
238	<i>Bacillus circulans</i>	NCDO1775
238	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	ATCC12856
238	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	ATCC9999
239	<i>Bacillus alcalophilus</i>	DSMZ485
239	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> alpha-P15	ATCC19414
239	<i>Brochothrix thermophacta</i>	ATCC11509

C.4 *In situ* Produktion und Wirkung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre

Anhand von AHL-Sensorstämmen, die auf die Anwesenheit von AHL eine optisch nachweisbare Reaktion zeigten, war ein *in situ* Nachweis der AHL-Produktion in der Rhizosphäre möglich. Dazu wurden AHL-Sensorstämme verwendet, die ein Reporterkonstrukt besitzen, welches nach dem AHL induzierbarem Promoter über eine *gfp*-Kassette verfügt (Anderson *et al.*, 2001). Sobald ein Sensorstamm mit AHL in Kontakt kommt, erfolgt die Expression von grün fluoreszierenden Proteinen (GFP). Eine *in situ* Detektion konnte anhand der im UV-Licht zur grünen Fluoreszenz angeregten GFP der Sensorstämme durchgeführt werden. Die verwendeten Sensorkonstrukte wurden vom Projektpartner an der TUM (PD Dr. L. Eberl, TU-München, Weihenstephan) zur Verfügung gestellt (Steidle *et al.*, 2001).

C.4.1 AHL-Sensorstämme

Sensorstämme für lang- und kurzkettige AHL der Stämme *Serratia liquefaciens* MG1 und *Pseudomonas putida* IsoF waren *S. liquefaciens* MG44 pJBA132 bzw. *P. putida* F117 pKR-C12. Bei den Sensorstämmen handelte es sich um AHL-negative Mutanten, die keine AHL-Produktion durchführen konnten, jedoch noch über eine hohe Sensitivität zur Rezeption von AHL-Molekülen verfügten. *S. liquefaciens* MG44 pJBA132 zeigte eine GFP Produktion sobald dieser mit *N*-(3-oxo-Hexanoyl)-L-Homoserinlacton (OHHL) ab einer Konzentration von mindestens 20 nM in Berührung kam (K. Sigl, Diplomarbeit, TU-München, 1999). Zur *in situ* Untersuchung der AHL-Produktion von *S. liquefaciens* war eine *rfp*-Markierung des Wildtypstammes notwendig gewesen. Der Versuch einer *rfp*-Markierung mittels des konjugativen Plasmidtransfers in *Serratia liquefaciens* scheiterte an der mangelnden Selektivität der zur Verfügung stehenden Donorstämme *Escherichia coli* pUT HT102 (Tc^R) und *E. coli* pUT CL118 (Tc^R) oder der nicht ausreichenden Stabilität des Plasmids pMH433 in *S. liquefaciens*. Das Sensorkonstrukt aus dem Plasmidtransfer von *E. coli* pMH433 (Gm^R) auf *Serratia liquefaciens* zeigte nur eine maximale Stabilität von 3 Generationen ohne Selektionsdruck. Für den an der Tomatenwurzel notwendigen Inkubationszeitraum war dies zu kurz. Ein Selektionsdruck (durch Antibiotika-Resistenz) konnte wegen der nicht abschätzbaren Reaktionen der inokulierten Pflanze nicht angewandt werden (pers. Mitteilung PD Dr. C. Langebartels, BIOP, GSF-Neuherberg).

Die Produktion und Verteilung der AHL-Signalmoleküle bei der Besiedlung der Wurzeln von Tomatenpflanzen wurde deshalb in dieser Arbeit nur am AHL-produzierenden Wildtypstamm *Pseudomonas putida* IsoF untersucht. Der Wildtypstamm lag mit *rfp*-Markierung (Steidle *et al.*, 2001) vor, wobei der Sensorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 über eine durch AHL induzierbare *gfp*-Markierung verfügte. *P. putida* F117 pKR-C12 zeigte eine hohe Sensitivität für *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (OdDHL) mit einer Detektionsempfindlichkeit von 40 nM (K. Sigl, Diplomarbeit, TU-München, 1999). Anhand von Inokulationsversuchen des Sensorstammes *P. putida* F117 im axenischen System ohne Zugabe des AHL-produzierenden Bakteriums *P. putida* IsoF konnte eine Aktivierung des Sensorstammes durch andere Faktoren außer AHL ausgeschlossen werden (vgl. Abb. C.4.1).

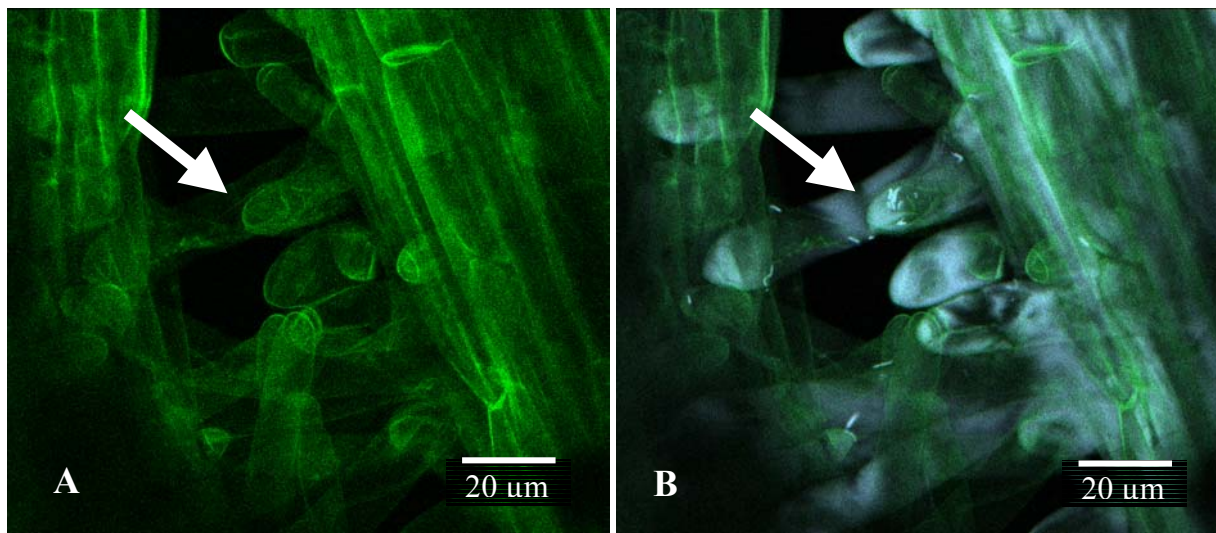


Abbildung C.4.1: Dargestellt sind Kontrollaufnahmen zur Aktivierung des Sensorstammes in der Tomatenrhizosphäre aus dem monoxenischen System. **A** zeigt keine *gfp*-Fluoreszenz als Zeichen der Aktivierung des Sensorstammes in der Rhizosphäre ohne Coinokulation des AHL-Produzenten. **B** beweist anhand einer FISH mit Eub338 (Cy3 in Falschfarbendarstellung) die Anwesenheit des nicht aktivierten Sensorstammes in der Tomatenrhizosphäre (Wurzelhaarzone; vgl. Pfeil). Objektiv 63x; 1,2 Wasser. Aufnahmen 12 x vergrößert.

C.4.2 Verteilung von AHL an der Wurzel

Die Produktion von AHL-Signalmolekülen an der Tomatenwurzel wurde am Beispiel des AHL-produzierenden Wildtypstammes *Pseudomonas putida* IsoF durchgeführt. Dazu wurden Tomatenpflanzen des axenischen Systems mit einer Mischung von *P. putida* IsoF und *P. putida* F117 mit einer Zelldichte von je 10^8 Zellen / Pflanze inokuliert (vgl. B.4.2.). Die Wurzeln wurden nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden geerntet und an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop frisch untersucht (vgl. B.10.1). Im Rahmen einer Diplomarbeit von C. Dürr (2001) konnten erste Erkenntnisse zur Verteilung des AHL-

produzierenden Wildtypstammes *P. putida* IsoF und dessen Mutante *P. putida* F117, sowie des AHL-Sensorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 an der Tomatenwurzel gewonnen werden (C. Dürr, Diplomarbeit, LMU-München, 2001). Dabei wurde bei den untersuchten Stämmen eine dichte Besiedlung der Wurzeloberfläche sowohl im Bereich der Wurzelhaarzone als auch an den Wurzelspitzen festgestellt. Unterschiede zwischen dem AHL-produzierenden Wildtyp und der AHL-negativen Mutante waren weder in der Art noch in der Stärke der Besiedlungsweise feststellbar (vgl. C.2). Anhand der oben beschriebenen Sensortechnik wurde eine Signalreaktion des AHL-Sensorstammes *P. putida* F117 pKR-C12 nach Inokulation mit dem Wildtypstamm *P. putida* IsoF nachgewiesen. Ohne Inokulation des AHL-Produzenten war keine Aktivierung des Sensorstammes *P. putida* F117 pKR-C12 feststellbar (vgl. Abb. C.4.2a). Der Wildtypstamm *P. putida* IsoF produziert damit nachweisbar AHL bei der Wurzelbesiedlung. Großformatige Mosaikbilder (1024x1536 Pixel), welche aus 2 x 3 Einzelbildern (je 512 x 512 Pixel) zusammengesetzt waren (vgl. B.11.1), ermöglichten die Betrachtung größerer Wurzelbereiche (vgl. Abb. C.4.2b), womit Untersuchungen zur Verteilung der AHL-Moleküle an der Wurzel möglich waren.

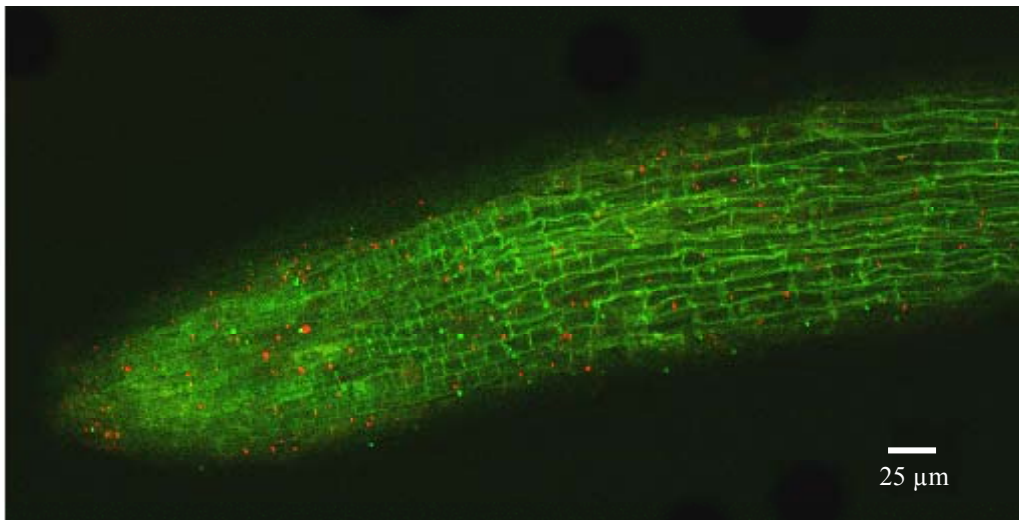


Abbildung C.4.2a: Oberfläche der Tomatenwurzel besiedelt vom AHL produzierenden Wildtyp *P. putida* IsoF (rfp) und dessen Sensorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 (gfp). Der Wildtypstamm fluoresziert rot, während der Sensorstamm grün fluoresziert. Die grüne Fluoreszenz des Sensorstammes ist eine spezifische Reaktion, die nur bei der Detektion von OdDHL auftritt (vgl. Text). Die Aufnahme besteht aus 2 x 3 Einzelbildern je 512 x 512 Pixel Größe. Objektiv 40 x; 0,5 Luft.

C.4.3 Ausbreitung von AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen

Mittels einer von Prof. Dr. Frank B. Dazzo (Michigan State University, East Lansing, USA) entwickelten Software gestützten Methode des "Center of Microbial Ecology Imaging Analysis Systems" (CMEIAS) war es möglich, die Distanz zwischen den rot fluoreszierenden AHL-Produzenten zu ihren nächsten grün fluoreszierenden aktivierten Sensorstämmen zu bestimmen (vgl. Abb. C.4.3a). Für den Bereich der Wurzeloberfläche in der Streckungs- und Wurzelhaarzone (siehe Ergebnisse C.1) wurden Distanzen von bis zu 60 μm gemessen (C. Dürr, Diplomarbeit, LMU-München, 2001). Die Distanzvermessung erfolgte anhand zweidimensionaler Wurzelaufnahmen (vgl. Abb. C.4.3a).

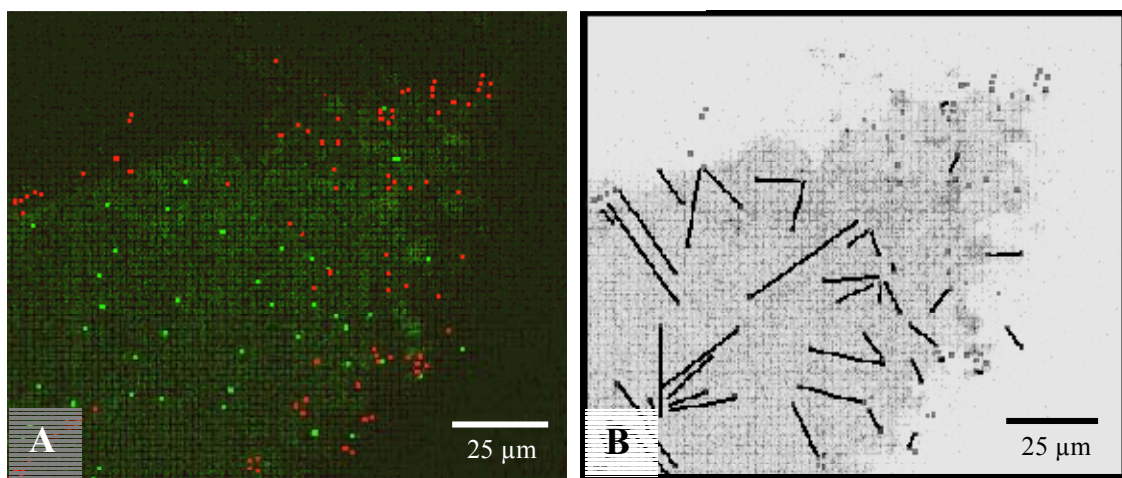


Abbildung C.4.3a: Wurzelspitze einer Tomatenwurzel besiedelt vom AHL produzierenden Wildtyp *P. putida* IsoF (rot fluoreszierend) und dessen Sensorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 (grün fluoreszierend). In Bild A ist die Besiedlung der Wurzelspitze dargestellt. Bild B zeigt die Distanzvermessung zwischen dem rot fluoreszierenden Wildtypstamm und dessen nächst gelegenen Sensorstamm, der auf die Freisetzung von OdDHL des Wildtypstammes mit grüner Fluoreszenz reagiert. Objektiv 63 x; 1,2 Wasser.

Da die Wurzeln jedoch nicht planar sind, sondern bei stereoskopischer Vergrößerung (4x - 10x) eine radiale Querschnittsform zeigten, wurde untersucht, ob auch AHL-Produzenten in der dritten Dimension ober- oder unterhalb der Fokusebene vorkamen. Solche Bakterien wären damit außerhalb der Betrachtungsebene gewesen und nicht dargestellt worden, d. h. die grün fluoreszierenden Bakterien hätten ihre Anregung zur Fluoreszenz durch andere als in der gleichen Ebene dargestellten AHL-Produzenten erfahren. Mittels der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie konnte dies durch optische Schnitte, sogenannte "z-scans", der Wurzel überprüft werden (vgl. B.10.2.2). Die durchgeführten optischen Querschnitte zeigten, daß die Wurzeln zwischen Objektträger und Deckglas stark gequetscht

wurden. Die unter einem Stereoskop nach der Probenahme beobachtete radiale Wurzel nahm damit eine eher ovale Form an (vgl. Abb. C.4.3b).

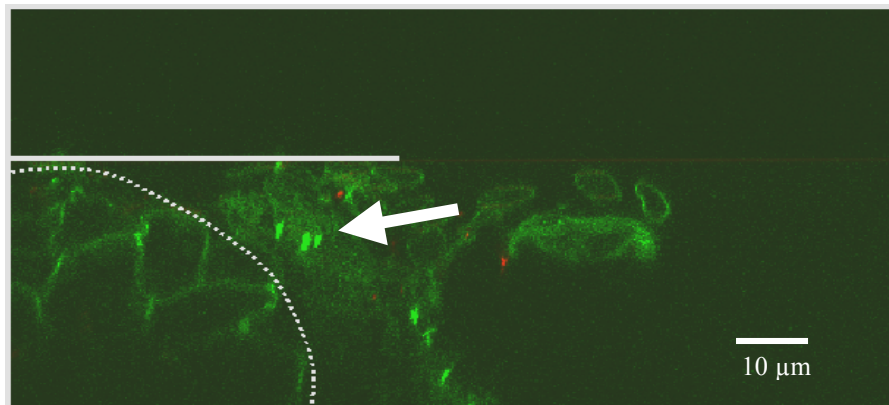


Abbildung C.4.3b: Dargestellt ist der visuelle Querschnitt einer Wurzel. Die Quetschung der Wurzel ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben, ebenso wie der Deckglasrand. Deutlich zu erkennen ist die Keulenform der Bakterien (siehe Pfeil). Objektiv 63 x; 1,2 Wasser.

Die Distanz zwischen Deckglas und Wurzel betrug bei den untersuchten Proben maximal 7,5 µm. Die Erfassung und Darstellung fluoreszierender Bakterien erfolgt jedoch aus technischen Gründen bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie nicht punktförmig sondern keulenartig (Wilhelm *et al.*, 2000). Im optischen Querschnitt erschienen daher die Bakterien auf ca. 3-4 µm vergrößert (vgl. Abb. C.4.3b). Die Fokusebene einer Wurzeloberflächenaufnahme entsprach damit dem Abstand zwischen Wurzeloberfläche und Deckglas. Ein Bakterium wäre, egal wo es sich zwischen dem Wurzelgewebe und dem Deckglas befände, immer detektierbar. Anders sah dies an den Wurzelspitzen aus. Die konisch zulaufenden Wurzelspitzen zeigten eine starke Besiedlung durch *Pseudomonas putida* IsoF und *Pseudomonas putida* F117. Zur Erfassung aller Bakterien wurde die Wurzelspitze durch konfokale Analyse in 32 optische Schnittebenen à 2 µm zerlegt. Eine Distanzanalyse der *rfp*-markierten Wildtypstämme zu den *gfp*-markierten Sensorstämmen ergab eine durchschnittliche Entfernung von 37 µm (vgl. Abb. C.4.3a).

D Diskussion

Viele Bakterien in der Rhizosphäre können potentiell Pflanzen vor phytopathogenen Mikroorganismen schützen, indem sie verschiedene biologische Kontrollaktivitäten auf Phytopathogene ausüben, z. B. durch die Produktion von Antibiotika (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003). Für den ökologischen Pflanzenschutz ist ihre Wirkung gegen verschiedene Phytopathogene von besonderem Interesse. "Quorum sensing" (vgl. A.2) spielt bei der Regulation von Biokontroll-relevanten Funktionen von Bakterien in der Rhizosphäre eine wichtige Rolle (Pierson *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Ökologie der AHL-produzierenden Bakterienstämme *Serratia liquefaciens* MG1 und als Vergleichsorganismus *Pseudomonas putida* IsoF in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen untersucht.

D.1 Siedlungsverhalten von *Serratia liquefaciens* in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen

D.1.1 Ein Vergleich der verwendeten Kultivierungssysteme

Zwei verschiedene Kultivierungssysteme fanden hierbei Verwendung (vgl. B.3): Ein steriles, axenisches System diente zur Charakterisierung der Besiedlung von Tomatenwurzeln unter definierten Bedingungen (Simons *et al.*, 1996), während in einem Einheitsboden die Einflüsse auf und in einer komplexen Mikroorganismengemeinschaft untersucht wurden. Ein axenisches Modellsystem wird für Untersuchungen der Biokontrollaktivität von Bakterien häufig eingesetzt (Notz *et al.*, 2002, Simons *et al.*, 1997). Im Unterschied zum verwendeten Bodensystem war die Lebensdauer der Pflanzen im axenischen System kürzer, womit nur sehr junge Pflanzen untersucht werden konnten. Ein Vergleich der Wuchsgröße zwischen Pflanzen aus dem Bodensystem und dem sterilen System zeigte deutliche Unterschiede (vgl. C1.1), jedoch interessierten bei der Betrachtung der Wurzeln aus dem axenischen System nur spezielle Bereiche. Ein direkter morphologischer Vergleich der Wurzeln von Pflanzen aus beiden Systemen zeigte, daß der Aufbau der Wurzeln identisch war (vgl. Abb. C.1.1.b). Die in der Einheitserde entwickelten Wurzeln zeigten eine etwas stärkere Wurzelverzweigung als Pflanzen aus dem axenischen System. Durch Verwendung von Tomatenpflanzen in vergleichbaren Wachstumsstadien (vgl. C.1.1) im axenischen und im Bodensystem konnte dieser Unterschied minimiert werden. Das axenische System bietet unter definierten Bedingungen unbeeinflusst von anderen Bodenorganismen gute reproduzierbare Ergebnisse

(Simons *et al.*, 1996), die vergleichbar mit Effekten aus dem Bodensystem sind (Yedidia *et al.*, 2001). Dennoch ist zu berücksichtigen, daß es sich im axenischen System nur um ein Modell handelt, das unter künstlichen Bedingungen als einfacher Vergleich zu einem Wurzelsystem im Boden mit weitaus komplexeren Interaktionen dient. Im Detail können z. B. Unterschiede in der Siedlungsdichte auftreten (Simons *et al.*, 1996). Vergleichende Untersuchungen mit dem Bodensystem sind deshalb unerlässlich.

D.1.2 Wurzelbesiedlung von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 an Tomatenpflanzen

Der AHL produzierende Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 ist ein Rhizosphärenisolat von Gurkenpflanzen, wo es in verschiedene Biokontrolleigenschaften involviert ist (Givskov *et al.*, 1997). Im Hinblick auf seine hemmenden Eigenschaften gegen verschiedene Phytopathogene (Kalbe *et al.*, 1996) war sein Siedlungsverhalten an der Wurzel von Tomatenpflanzen von Interesse. Untersucht wurden dazu der AHL-produzierende Wildtypstamm von *S. liquefaciens* MG1 sowie die AHL-negative Mutanten *S. liquefaciens* MG44 an Tomatenpflanzen im axenischen System. Als Vergleichsorganismen dienten *Pseudomonas putida* IsoF, ein Isolat aus der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen, sowie dessen AHL-negative Mutante *P. putida* F117 (Steidle *et al.*, 2001). Es zeigte sich, daß die Bakterienstämme, unabhängig davon, ob sie AHL produzieren konnten oder nicht, die gleichen Stellen der Wurzeln besiedelten. Beide Stämme, *S. liquefaciens* und *P. putida*, zeigten eine stabile Zellzahl bei Wurzelbesiedlung. Bei *S. liquefaciens* waren das besonders die jüngeren Bereiche der Wurzel, d. h. Nebenwurzeln und der Wurzelhaarzone (C.1.2). Die Nebenwurzeln zeigten eine vollständige Besiedlung bis hin zur Wurzelspitze. Auffallend war die besonders ausgeprägte Besiedlung der Wurzelhaarzone, sowie eine geringe Besiedlung der Wurzelspitze. Die Wurzelhaube zeigte keine Besiedlung (vgl. Abb. C.1.2a und b). Eine gute Besiedlung der jüngeren Wurzelzonen, wie der Wurzelhaarzone, ist häufig zu finden (Chin-A-Woeng *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu *S. liquefaciens* MG1 zeigte *P. putida* IsoF eine gute Besiedlung der Wurzelhaube (vgl. Abb. C.4.3a). In der Wurzelhaarzone und den Wurzelspitzen findet der größte Stoffaustausch der Pflanzenwurzeln statt (Lugtenberg *et al.*, 1999). Hier erfolgt u. a. die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen sowie die Ausscheidung von Exsudaten der Pflanze. Die Wurzelspitzen zeigen dabei eine gute Diffusion von Stoffen innerhalb des Gewebes, auch wenn das Diffusionspotential direkt an der Wurzelspitze etwas reduziert ist (Aguilar *et al.*, 1999). Depolarisierungsversuche am Beispiel der Zellmembranen von Weizenwurzeln zeigten eine hohe Empfindlichkeit der Wurzelspitze auf Änderungen des

elektrischen Membranpotentials (Pavlovkin & Mistrik, 1999). Die Wurzelspitze reagiert damit sehr sensitiv auf äußere Einflüsse. Die Wurzelhaube zeichnet sich durch eine besondere Struktur der Oberfläche aus (vgl. Abb. D.1.1). Bei der Durchdringung des Bodens sind Verletzungen der Wurzelspitze unvermeidlich. Zum Schutz davor ist sie umgeben von mehreren Gewebeschichten abgestorbener Zellen und einer Schleimschicht (Hawes *et al.*, 2000). Die unterschiedliche Besiedlungsweise von *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* an der Wurzelspitze könnte durch den Abrieb dieser schützenden Gewebeschicht bei

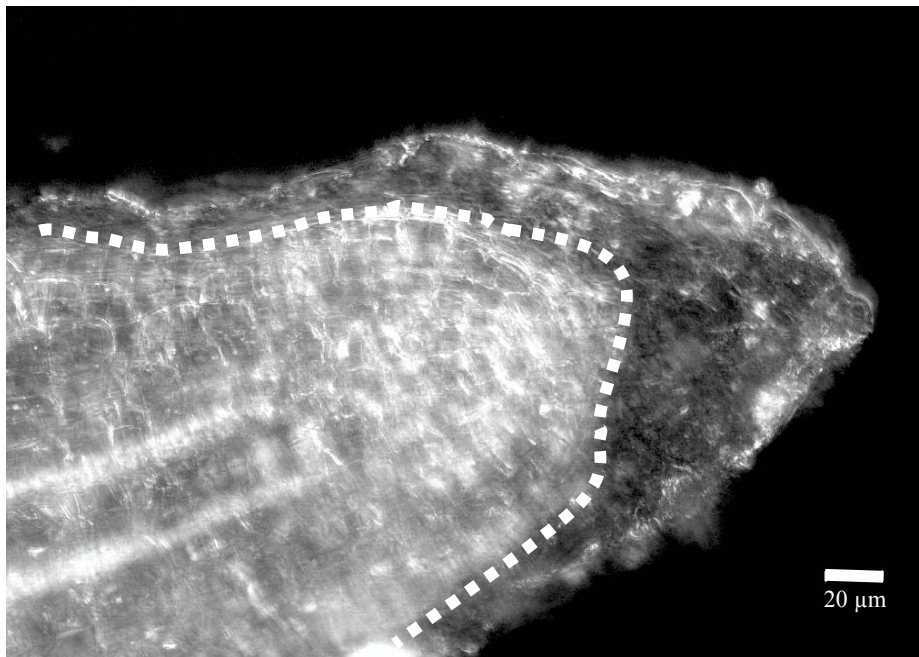


Abbildung D.1.1: Mikroskopische Phasenkontrastaufnahme der Wurzelspitze einer Tomatenpflanzenwurzel. Die Calyptra aus abgestorbenen Wurzelgewebeschichten ist vom meristematischen Wurzelcortex durch eine gestrichelte Linie getrennt. Objektiv 63 x; 1,2 Wasser.

der Durchdringung des Bodens, der an der Hauptwurzel besonders groß ist, erklärt werden. Einzelzellen wie *S. liquefaciens* gehen dort leichter verloren als die dichteren Mikrokolonien von *P. putida*.

D.1.2.1 Einfluß der Pflanze auf die Rhizosphärenpopulation

Daß *Serratia liquefaciens* im Gegensatz zu *Pseudomonas putida* die Wurzelhaube der Hauptwurzel nicht besiedelte, könnte aber auch mit den an der Wurzelspitze ausgeschiedenen Exsudaten in Zusammenhang stehen. Die Diffusion ausgeschiedener Stoffe ist in diesen Gewebeschichten sehr groß. Exsudate haben auf das Siedlungsverhalten von Rhizobakterien einen vielfältigen Einfluß (Duijff *et al.*, 1997). Von Reispflanzen sind direkte Einflüsse durch

Ausscheidung von Alkaloiden, Phenolen, Terpenen und Steroiden auf die sie besiedelnden Mikroorganismen bekannt (Neori *et al.*, 2000). Es konnte sogar gezeigt werden, daß Pflanzen durch die Exsudate wasserlöslicher Vitamine die Expression bakterieller Gene regulieren können (Phillips *et al.*, 1998). Neben diesen "einseitigen" Regulationen gibt es auch wechselseitige Beziehungen zwischen Pflanzen und den sie besiedelnden Mikroorganismen. Beispiele hierfür finden sich bei denen das Pflanzenwachstum fördernden Bakterien (PGPR). Die PGPR *Pseudomonas sp.* produzieren u. a. Auxine, die das Wurzelwachstum anregen können (Glick *et al.*, 1998). Versuche an *Arabidopsis thaliana* zeigten eine Freisetzung von 1-Aminocyclopropan (ACC) als pflanzliche Reaktion auf die bakterielle Auxinproduktion. Die *Arabidopsis thaliana* besiedelnden Rhizobakterien konnten ACC als C-Quelle nutzen, was indirekt wiederum zu einer verstärkten Auxinproduktion führte (Shah *et al.*, 1998). Daraus entstand ein Kreislauf aus dem sowohl die Bakterien als auch die Pflanzen Vorteile zogen. Die beschriebenen Besiedlungsweisen der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen durch *Serratia liquefaciens* MG1 und *Pseudomonas putida* IsoF (vgl. C.1) sind sicherlich ebenfalls in Abhängigkeit zu den Exsudaten der Tomatenpflanze zu sehen. Am Beispiel von *Pseudomonas fluorescens* WCS 417r an Tomatenwurzeln konnte gezeigt werden, daß die Art und Menge der pflanzlichen Exsudaten in Abhängigkeit zum Pflanzenalter variiert (Lugtenberg *et al.*, 1999) Welche dieser pflanzlichen Ausscheidungsprodukte hierbei eine Rolle spielen, ist derzeit jedoch unbekannt. Im Bereich des Pflanzenschutzes zeigte sich an Tomatenpflanzen, daß durch verschiedene Wurzelexsudate Bakterienstämme der Gattung *Pseudomonas* gezielt zur Produktion von fungizid wirkenden Substanzen angeregt werden konnten (Kravchenko *et al.*, 2003). Diese vielfältigen wechselseitigen Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen beeinflussen das Vorkommen von Bakterien an Pflanzen stark (Phillips *et al.*, 2003). Rhizobakterien sind daher in allen Bereichen der Wurzel zu finden, so auch in endophytischer Lebensweise, innerhalb der Pflanze (Zinniel *et al.*, 2002).

D.1.2.3 Untersuchungen zur endophytischen Besiedlung

Bei der Resistenzausbildung gegen Phytopathogene spielen endophytisch lebende Bakterien eine besondere Rolle. Endophyten können entweder direkt auf Phytopathogene wirken oder Abwehrreaktionen in der Pflanze fördern. Pflanzen besitzen dazu verschiedene Abwehrmechanismen gegen Phytopathogene. Eine Möglichkeit hierzu stellt die systemisch erworbene Resistenz (SAR) dar, die bei Befall von Pilzen oder Mikroorganismen aktiviert wird (vgl. A.3). Auch endophytisch siedelnde Bakterien können die SAR in Pflanzen aktivieren und damit die Pflanze so vor dem Befall von Phytopathogenen schützen (Persello-

Cartieaux *et al.*, 2003). Von der Gattung *Serratia* sind einige endophytisch lebende Vertreter bekannt, wie *Serratia marcescens* in einkeimblättrigen Pflanzen, z. B. in Reispflanzen (Gyaneshwar *et al.*, 2000) oder *Serratia plymuthicum* in zweikeimblättrigen Pflanzen, z. B. in Gurkenpflanzen (Benhamou *et al.*, 2000). In beiden Fällen besiedeln die Bakterien die Interzellularräume (Apoplasten) der äußeren Gewebeschichten der Wurzel. Ein solches Siedlungsverhalten konnte bei der Wurzelbesiedlung von *Serratia liquefaciens* MG1 an Tomatenpflanzen jedoch nicht festgestellt werden. Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) wurde ein "Durchleuchten" des Wurzelgewebes ("z-scan", vgl. B.10.2.2) vorgenommen. Endophytisch vorkommende Bakterien des *gfp*-markierten Stammes *S. liquefaciens* MG1 waren dabei nicht zu finden. Eine Ausnahme stellte die bakterielle Besiedlung von Gewebeverletzungen der äußeren Wurzelepidermis dar. Solche Gewebeverletzungen treten an Stellen des Durchbruchs der Nebenwurzel aus der Hauptwurzel auf. Der erleichterte Zugang von Pflanzenmetaboliten in Gewebeverletzungen dient Bakterien als Eintrittsstellen zur endophytischen Besiedlung von Wurzeln (Jaeger *et al.*, 1999). Der "z-scan" mittels CLSM der Tomatenwurzeln nach der Oberflächensterilisation zeigte ebenfalls keine endophytisch lebenden Bakterien von *S. liquefaciens* MG1 und MG44 in den Wurzeln von Tomatenpflanzen. Auch Untersuchungen an Schnittstücken zeigten deutlich, daß *S. liquefaciens* MG1 ausschließlich die Rhizoplane, die Wurzeloberfläche, besiedelte (vgl. Abb. C.1.5d). Die Summe dieser Ergebnisse ergab keine endophytische Wurzelbesiedlung der Wurzeln von Tomatenpflanzen durch *S. liquefaciens* MG1 und MG44. Dies ist für die Interpretation der Entwicklung einer systemischen Resistenz bei Tomatenpflanzen nach Kontakt der Wurzel mit bakteriellen Metaboliten oder auch AHL dieser Bakterien von Bedeutung. Nach Inokulation der Wurzel mit *S. liquefaciens* MG1 zeigten die Tomatenpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen den Blattfäulnispilz *Alternaria alternata* (R. Schuegger, Dissertation, 2003). Die Inokulation der AHL-negativen Mutante *S. liquefaciens* MG44 hingegen hatte keinen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung. Da jedoch *S. liquefaciens* die Pflanze nicht systemisch besiedelt, können direkte Interaktionen mit dem Pilz ausgeschlossen werden. Möglich wäre, daß *S. liquefaciens* MG1 eine systemische Resistenz in der Pflanze induziert.

D.1.2.4 Einfluß der Rhizobakterien auf die Pflanze

Die induzierte systemische Resistenz (ISR) wurde am Beispiel von *Pseudomonas fluorescens* WCS417r an *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Pieterse *et al.*, 1996; Ton *et al.*, 2002). Bei Tomatenpflanzen konnte ebenfalls eine ISR gegen den Pilz *Fusarium oxysporum* durch die endophytische Wurzelbesiedlung von *P. fluorescens* WCS417r nachgewiesen werden (Duijff *et al.*, 1997). Die endophytische Pflanzenbesiedlung von Rhizobakterien ist häufig Ursache einer induzierten systemischen Resistenz in Pflanzen, jedoch nicht zwingende Voraussetzung (Steijl *et al.*, 1999). Nicht endophytisch siedelnde Rhizobakterien können bei der Besiedlung der Rhizosphäre eine systemisch erworbene Resistenz (SAR; vgl. A.3) in Pflanzen auslösen (Robledo *et al.*, 1998). Dabei dienen verschiedene von Bakterien freigesetzte Stoffe als Auslöser wie z. B. Antibiotika (Robledo *et al.*, 1998) oder eisenkomplexbildende Siderophore (Buysens *et al.*, 1996). Von verschiedenen Bakterien der Gattung *Serratia* ist die Produktion solcher Siderophoren als Auslöser von pflanzlichen Resistenzen gegen phytopathogene Pilze bekannt (Kalbe *et al.*, 1996; Press *et al.*, 2001). Auch Bestandteile der Bakterien wie Flagellen (Pieterse *et al.*, 2001) oder Lipopolysaccharide der Zellwand (van Wees *et al.*, 1997) können eine systemische Resistenz in Pflanzen induzieren. Die systemische Resistenz in den Tomatenpflanzen gegen den phytopathogenen Pilz *Alternaria alternata* könnte also auch durch die Produktion von verschiedenen Substanzen z. B. den Siderophoren ausgelöst worden sein. Die jedoch schwache Wirkung der AHL-negativen Mutante *Serratia liquefaciens* MG44, die den Pilzbefall nicht verhindern konnte, zeigte, daß noch ein anderer Faktor eine Rolle spielen muß (R. Schuegger, Dissertation, 2003). Damit kam der Produktion von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHL) als Unterschied des Wildtypstammes *S. liquefaciens* MG1 von der AHL-negativen Mutante MG44 eine besondere Bedeutung zu. So könnten die AHL-Signalmoleküle Auslöser der systemischen Resistenz sein, womit die bakterielle Produktion und Verbreitung von AHL an der Wurzel eine wichtige Rolle spielen.

D.2 Verbreitung und Wirkungsradius von AHL an Wurzeln von Tomatenpflanzen

Die Entwicklung einer systemischen Resistenz in Pflanzen tritt nur bei gleichmäßig konstanter Verfügbarkeit des induzierenden Stoffes in hoher Konzentration an der Wurzel auf (De Cal *et al.*, 2001). Daher wurde die Verbreitung und Wirksamkeit von AHL in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen anhand von AHL-Sensorstämmen untersucht. Diese AHL-Sensorstämmen konnten selbst kein AHL mehr produzieren und reagierten sensitiv auf AHL mit der Expression eines Reporterkonstruktes zur Produktion grün fluoreszierender Proteine (GFP) (vgl. B.11). Solche Sensorstämmen ermöglichten die *in situ* Detektion verschiedener AHL-Signalmoleküle in Bakteriengemeinschaften (Andersen *et al.*, 2001). Am Beispiel von *Pseudomonas putida* IsoF wurde die Verbreitung von AHL-Signalmolekülen (hier *N*-3-oxo-Dodecanoyl-L-Homoserinlacton, OdDHL) in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen untersucht, da das Verfahren für *Serratia liquefaciens* MG1 nicht durchführbar war (vgl. C.4.1). Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann aber davon ausgegangen werden, daß sich die beiden kurzkettigeren Signalmoleküle *N*-Butanoyl-L-Homoserinlacton (BHL) und *N*-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (HHL) des Wildtypstammes *S. liquefaciens* MG1 mindestens ebensogut auf der Wurzeloberfläche verteilen. Der Sensorstamm *Pseudomonas putida* F117 pKR-C12 wurde zusammen mit dem AHL-Produzenten *P. putida* IsoF im axenischen System von Tomatenpflanzen getestet. Da der Sensorstamm eine Mindestinkubationszeit von 2 Stunden (K. Sigl, Diplomarbeit, 2001) brauchte, konnte eine vorzeitige Reaktion (z. B. bei der Inokulation) ausgeschlossen werden.

D.2.1 Verbreitung von AHL auf der Wurzeloberfläche von Tomatenpflanzen

Erste Untersuchungen zur Verbreitung von AHL auf der Oberfläche von Tomatenpflanzenwurzeln am Beispiel von *Pseudomonas putida* IsoF waren im Rahmen der Diplomarbeit von Christine Dürr vorgenommen worden. In einer Kooperation mit Prof. F. B. Dazzo ("michigan state university", East Lansing, USA) war es möglich, die Distanzen zwischen den AHL-produzierenden Bakterien, die konstitutiv rot fluoreszierten, zu denen, die bei AHL-Detektion zur Bildung grüner Fluoreszenz angeregt wurden, zu messen. Hierzu wurde das "Center for Microbial Ecology Imaging Analysis System" (CMEIAS) eingesetzt. Dieses ermöglichte anhand von Einzelbildaufnahmen eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) die Verbreitung und das Vorkommen von AHL auf der Wurzeloberfläche von Tomate zu analysieren. Für die Wurzeloberflächen der Streckungszone konnte damit eine maximale Wirkung von bis zu 60 µm festgestellt werden (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). Da die Wurzel in diesem Bereich zwischen Deckglas und Objektträger

eingeklemmt starke Deformationen aufwies, konnten mögliche Einflüsse aus der dreidimensionalen Ebene ausgeschlossen werden (vg. Abbildung C.4.2). Aufgrund der Eigenschaften der Lasertechnik erfolgt die Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien nicht punktförmig sondern flächig. Die Darstellung erscheint daher eher keulenartig, wobei eine bakterielle Zelle als 3-4 μm Keule erfaßt wird (Wilhelm *et al.*, 2000). Somit wären selbst Zellen, die oberhalb oder unterhalb der dargestellten Fokusebene hätten vorkommen können, in der Darstellung erfaßt worden, da die Distanz zwischen Deckglas und Wurzelgewebe mit 7 μm zu gering war, um hier nicht auch in der Fokusebene dargestellt zu werden.

D.2.2 Besonderheiten für die Verbreitung von AHL an Wurzelspitzen von Tomatenpflanzen

Die Wurzelspitze wird von Rhizobakterien besonders von *Pseudomonas spp.* dicht besiedelt (Lugtenberg *et al.*, 2001), da die Wurzelspitzen ein Ort des starken Stoffwechselfaustausches der Pflanze sind (Sörensen, 1997; vgl. D.1.2). Morphologisch betrachtet läuft die Wurzel im Bereich der Wurzelspitze konisch zusammen, weshalb der Quetschungseffekt der Wurzel hier nicht mehr festzustellen war. Stapelaufnahmen verschiedener Ebenen im Abstand von 2 μm setzten die Bakterien in räumliche Beziehungen zueinander. Die Distanzvermessungen zwischen den AHL-Produzenten und den AHL-Sensorzellen ergaben hier eine kürzere Distanz von insgesamt 37 μm . Die höhere Dichte an Bakterien im Bereich der Wurzelspitze trägt möglicherweise mit dazu bei, daß die gemessene Distanz an der Wurzelspitze geringer ist, als auf den größeren Abschnitten der Streckungszone. Ferner könnte auch die vermutlich kürzere Zeit der Lokalisierung von Bakterienzellen an der Wurzelspitze zu den kleineren Wirkungsradien beigetragen haben.

Die Ergebnisse zeigten, daß *Pseudomonas putida* IsoF AHL in hoher effektiver Konzentration auf der Wurzeloberfläche produziert haben muß, um über die gemessenen, relativ weiten Entfernungen noch mit dem Sensorstamm *P. putida* F117 pKR-C12 zu interagieren. Der Sensorstamm reagierte erst ab einer AHL-Konzentration von mindestens 40 nM (K. Sigl, Diplomarbeit, 2001). Die effektive Produktion von verschiedenen AHL-Signalmolekülen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen durch die natürliche Rhizosphärenpopulation wurde bereits von Steidle *et al.* (2001) nachgewiesen. Worin der Vorteil der AHL-Produktion für *Pseudomonas putida* IsoF und *Serratia liquefaciens* MG1 bei der Besiedlung der Wurzeloberfläche von Tomatenpflanzen liegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Für die Pflanze bedeutet es jedoch, daß ihre Wurzeln großflächig mit AHL-Signalmolekülen in

Berührung kommen. Die Anwesenheit von AHL könnte daher tatsächlich eine systemische Resistenz bei Pflanzen auslösen. Damit die Konzentration der AHL-Moleküle ausreicht, um einen Effekt in der Pflanze auszulösen, müssen die Bakterien in ausreichender Zelldichte und konstantem Zeitraum die Tomatenwurzel besiedeln können. Die Wirkung der Biokontrolleigenschaften von Rhizobakterien ist abhängig von einer effektiven Siedlungsdichte an Pflanzenwurzeln (Duijff *et al.*, 1997; Chin-A-Woeng *et al.*, 1998).

D.3 Siedlungsdichte von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen

D.3.1 Rhizosphärenbesiedlung im monoxenischen System

Die Bestimmungen der Zellzahl der wurzelassoziierten *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 ergaben stabile Werte an Tomatenwurzeln im monoxenischen System (vgl. C.2.1). Dazu wurden Tomatenwurzeln zu drei verschiedenen Erntezeitpunkten (6, 24 und 168 Stunden (= 1 Woche)) nach der Inokulation geerntet, die Wurzeln gemörsert (vgl. B.5) und anschließend die Zellen auf Polycarbonatfiltern immobilisiert und ausgezählt (vgl. B.7). Der Zeitverlauf zeigte sowohl bei dem AHL produzierenden Wildtypstamm MG1 als auch bei der AHL-negativen Mutante *S. liquefaciens* MG44 einen leichten Anstieg der Zellzahl innerhalb eines Tages und eine Stabilisierung der Zellzahl nach einer Woche. Verlauf und Wert der Zelldichte zeigten sich in diesem Zusammenhang unabhängig von der Fähigkeit, ob der inokulierte Bakterienstamm *S. liquefaciens* bei der Besiedlung der Tomatenwurzel AHL produzieren konnte oder nicht. Die inokulierte Zellzahl war mit 10^9 Zellen pro Pflanze absichtlich hoch gewählt, da dies der im Bodensystem zur Inokulation verwendeten Menge entsprach, die eine Reaktion in der Tomatenpflanze verursachte (pers. Mitteilung R. Schuegger, GSF-Neuherberg). Höhere und niedrigere Zelldichten der Inokulate führten zu ähnlichen Besiedlungszahlen. Daraus kann gefolgert werden, daß *S. liquefaciens* MG1 die Tomatenwurzel effektiv besiedelt und mit 10^9 Zellen / g Wurzel (Frischgewicht, Fg) eine konstante Siedlungsdichte erreicht. Ein ähnliches Besiedlungsverhalten an Tomatenwurzel im monoxenischen System zeigte auch der Vergleichsstamm *Pseudomonas putida* IsoF. Die Zellzahl nahm auch hier 24 Stunden nach der Inokulation zu und stabilisierte sich im Verlaufe einer Woche (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). Die stabilisierte Zelldichte lag hier jedoch bei 10^8 Zellen / g Wurzel (Fg). Dies mag an der Bildung von Mikrokolonien des *P. putida* liegen, welche die rasche Ausbreitung auf der Wurzeloberfläche beeinflusst (Chin-A-Woeng *et al.*,

1997) oder in einem ähnlichen zu *Pseudomonas fluorescens* WCS365 vergleichbaren Effekt, wonach die Verwertbarkeit der in der Wurzelhaarzone ausgeschiedenen Exsudate (s. o.) nur eingeschränkt möglich war (Lugtenberg *et al.*, 1999).

D.3.2 Rhizosphärenbesiedlung im Bodensystem

Die Besiedlung der Wurzel durch *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 innerhalb der ersten Woche nahm im Bodensystem eine andere Entwicklung als im axenischen System. Zwar war das Siedlungsverhalten auch hier unabhängig von der Fähigkeit AHL zu produzieren, jedoch nahm die Zellzahl innerhalb einer Woche um zwei Zehnerpotenzen (Faktor 100) auf 10^7 Zellen / g Wurzel (Fg) ab. Danach blieb die Zellzahl über einen längeren Zeitraum stabil (vgl. C.2.3). Ein ähnlicher Effekt wurde bei *Pseudomonas putida* IsoF und F117 nach einer Inokulation von 10^8 Zellen beobachtet, wo nach einer Woche nur noch 10^6 Zellen nachzuweisen waren (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). Auch hier stabilisierte sich die Zellzahl nach einer Woche. Damit erfüllen die inokulierten Stämme sowohl von *S. liquefaciens* als auch von *P. putida* das Kriterium der effektiven Wurzelbesiedlung eines gut wirkenden Biokontrollstammes (vgl. D.2.2; Lugtenberg *et al.*, 2001).

D.3.3 Unterschiede der Ergebnisse aus beiden Systemen

Ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Anzuchtssystemen der Tomatenpflanzen zeigt, daß das monoxenische System keine endgültigen Aussagen, wohl aber zusätzliche Informationen zum komplexen Bodensystem liefern kann. Aus den Ergebnissen des monoxenischen Systems konnte geschlossen werden, daß sowohl *Serratia liquefaciens* als auch *Pseudomonas putida* die Wurzel effektiv besiedeln. Diese Ergebnisse wurden im Bodensystem bestätigt, wenn auch die Zelldichten sich unterschieden. Die Art der bei der Besiedlung von Wurzeln auftretenden Stabilisierung der Zellzahl ist bei verschiedenen biokontrollaktiven Bakterien beobachtet worden (Hessenmuller & Zeller, 1996). Anders als im axenischen System sind die Wurzeln im Bodensystem stärkeren dynamischen Veränderungen der Rhizosphäre beim Wurzelwachstum unterworfen. Einerseits treten hier verstärkt Veränderungen im pH-Wert, an Substraten oder Exsudaten auf (Handelsman & Stabb, 1996). Die Ergebnisse im Bodensystem zeigten, daß die inokulierten Bakterienstämme sich auch unter diesen Konkurrenzbedingungen zu anderen Rhizobakterien an der Tomatenwurzel in konstanter Größe etablieren können. Die Fähigkeit zur AHL-Produktion zeigte auch hierbei keinen Einfluß auf die Siedlungsdichte (vgl. D.5). Die Inokulate standen im Bodensystem in direkter Konkurrenz zur natürlichen Rhizosphärenpopulation, so daß die inokulierten Bakterien sich in

denen von ihnen im axenischen System bevorzugt besiedelten Wurzelbereichen im Bodensystem erst behaupten mußten. Die in der Rhizosphäre mittels DAPI-Färbung ermittelte Gesamtzellzahl (vgl. C.2.3) blieb konstant und schien damit unbeeinflusst von Veränderungen nach der Inokulation von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 zu sein. Dies könnte in einer dynamischen Neuordnung der Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft begründet liegen.

D.4 Einfluß von *Serratia liquefaciens* auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft von Tomatenpflanzen

Da der AHL-produzierende Stamm *Serratia liquefaciens* MG1 bei der Vermittlung einer systemischen Resistenz in Tomate eine Rolle zu spielen schien, sollte anhand von verschiedener Methoden der mögliche Einfluß von *S. liquefaciens* MG1 auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft untersucht werden. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) diene zur Erkennung dynamischer Verschiebungen innerhalb der phylogenetischen Gruppe der Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Die Technik der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus-(t-RFLP)-Analyse wurde zur Detektion von Änderungen in der gesamten bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft eingesetzt.

D.4.1 Dynamische Verschiebungen in der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft von Tomatenpflanzen

Zahlreiche Gram-negative Bakterien verfügen über das "quorum-sensing" durch AHL zur Zell-Zell-Kommunikation wie *Serratia liquefaciens* MG1 (vgl. A.2). So war es von besonderem Interesse festzustellen, ob der AHL-produzierende Wildtypstamm, *S. liquefaciens* MG1, Einfluß auf die Rhizosphärenpopulation der Gram-negativen Bakterien an der Tomatenpflanze hat. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurde dazu als eine schnelle und zuverlässige Methode zur Charakterisierung der aktiven Rhizosphärenpopulation Gram-negativer Bakterien gewählt. Bei FISH binden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden spezifisch an die 16S und 23S der ribosomalen RNS bakterieller Ribosomen (vgl. B.9). Zur Überprüfung dynamischer Veränderungen wurden gruppenspezifisch bindende Oligonukleotide eingesetzt, die eine Einteilung in α -, β - oder γ -Proteobakterien (vgl. B.9.1.2) ermöglichen. Vergleichend wurde zur Erfassung von Veränderungen in der Gram-positiven Bakterienpopulation der Unterschied der LGC- und

HGC-Bakterien überprüft. Die Untersuchungen der Rhizosphärenpopulation wurde an Tomatenwurzeln, inokuliert mit *S. liquefaciens* MG1, durchgeführt und verglichen mit nicht inokulierten Tomatenwurzeln als Kontrollen jeweils 6 Stunden, sowie 1 Woche nach der Inokulation. Dabei konnten signifikante zeitlich dynamische Verschiebungen in der Rhizosphärenpopulation Gram-negativer Bakterien (vgl. C.3.1) festgestellt werden. An der mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokulierten Wurzel war der Anteil an α -Proteobakterien auffallend groß, während in der nicht inokulierten Kontrolle neben den α -Proteobakterien auch eine starke Dominanz der γ -Proteobakterien festzustellen war. Ein Effekt, der mit der Besiedlung von Wurzeln durch Rhizosphärenbakterien übereinstimmt, da α - und γ -Proteobakterien als sogenannte Erstbesiedler der Wurzel gelten (Sørensen, 1997). Die leichte Abnahme der α -Proteobakterien nach einer Woche könnte auf die sich ändernden Lebensbedingungen an der wachsenden Wurzel hinweisen oder aber auf einen Einfluß durch die Zugabe von *S. liquefaciens* MG1. Die Zugabe von biokontrollaktiven Bakterien in eine bestehende Rhizosphärenpopulation kann zu einer Verdrängung von α -Proteobakterien führen; dies wurde in der Rhizosphäre von Bohnen festgestellt (Robleto *et al.*, 1998). Der dort zugegebene Bakterienstamm produzierte ein Antibiotikum, auf das viele Bakterien der Gruppe der α -Proteobakterien sensitiv reagierten. Ob *Serratia liquefaciens* MG1 ebenfalls Stoffe produziert, die toxisch auf bestimmte Bakteriengruppen wirken, ist nicht bekannt. In der Rhizosphäre wird es einerseits zu einem Verdrängungskampf an bestimmten Positionen der Wurzel und andererseits auch zu einer unterschiedlichen Stimulierung verschiedener Rhizosphärenbakterien gekommen sein. Für die These der Verdrängung spricht, daß *S. liquefaciens* MG1 eine Woche nach der Inokulation in stabiler Zelldichte an der Tomatenwurzel nachweisbar war (vgl. C.2.3). Viele Bakterien besiedeln die Rhizosphäre von Wurzeln wobei besonders häufig auftretende Bakterien der Gattung *Pseudomonas* als effektiver Besiedler von Tomatenwurzeln bekannt sind (Lugtenberg *et al.*, 2001). Diese gute Besiedlungsweise der Tomatenrhizosphäre konnte auch bei Inokulationsversuchen mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Pseudomonas putida* IsoF beobachtet werden (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). Dieser Stamm wurde ursprünglich aus der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen isoliert (vgl. A.4). *P. putida* IsoF siedelte dort in konstanter Zellzahl unbeeinflusst von der natürlich vorkommenden Bakterienpopulation der γ -Proteobakterien. Eine Abnahme der Zellzahl, wie bei der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 beobachtet, war bei *P. putida* IsoF nicht feststellbar (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). So kann nach der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 von einem Konkurrenzkampf um die besiedelbaren Nischen in der Rhizosphäre zwischen den Pseudomonaden der natürlichen Population und

dem Inokulat ausgegangen werden. Dafür spricht auch, daß die Besiedlungsdichte der natürlich in der Rhizosphäre vorkommenden γ -Proteobakterien in der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Probe immer niedriger war als in der Kontrolle (vgl. Abb. C.3.1). Die Zunahme der β -Proteobakterien, in der mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Wurzel nach einer Woche, kann ebenfalls das Resultat solcher Veränderungen der Lebensbedingungen oder aber auch die Produktion von AHL-Signalmolekülen durch *Serratia liquefaciens* MG1 sein. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, daß in der nicht inokulierten Kontrollprobe der Anteil der β -Proteobakterien in der Rhizosphärenpopulation der Gram-negativen Bakterien von Tomate über die Zeit unverändert blieb. Die relative Konstanz in der Zusammensetzung der natürlichen Rhizosphärengemeinschaft während des Versuchzeitraums ist bezeichnend und steht dynamischen Veränderungen bedingt durch Alter, Wachstum und Streß der Pflanze gegenüber (Sørensen, 1997). Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Pflanzen zum Zeitpunkt der Inokulation erst zwei Wochen alt waren (vgl. B.4.3). Große Veränderungen bedingt durch ein verstärktes Wurzelwachstum sollten in der Meßzeit von einer Woche nicht zu erwarten sein. Neben diesen Veränderungen in der bakteriellen Population der Proteobakterien in der Rhizosphäre konnten auch solche Effekte bei den untersuchten Bakterien der Gram-positiven festgestellt werden. Hier verdoppelte sich die Zahl der in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen siedelnden LGC-Bakterien, während die der HGC unverändert blieb. Die Änderungen in der Gram-positiven Bakterienpopulation scheinen durch das AHL-Signalmolekül ausgelöst zu werden (vgl. D.5).

D.4.2 Möglichkeiten und Einschränkungen der FISH-Detektion

Bei den erhaltenen Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung sind die methodischen Limitierungen zu berücksichtigen. Da die Oligonukleotidsonden an die ribosomale RNS der Bakterien binden (hybridisieren), können somit auch nur physiologisch aktive Zellen, die über einen hohen Anteil ribosomaler RNS verfügen, gut detektiert werden (Amann *et al.*, 1995). Mittels FISH ist also nur ein Ausschnitt der bakteriellen Rhizosphärenpopulation, die zum Zeitpunkt der Untersuchung aktiv waren, detektierbar (Amann *et al.*, 2000). Bakterien, die zu einem anderen Zeitpunkt ihr Aktivitätsmaximum erreichten, werden entweder nur noch vermindert stark erfaßt oder fallen ganz aus der Betrachtung. Die gewählten Sonden erfaßten eine Auswahl der großen Gruppen Gram-negativer Bakterien, von denen erwartet wurde, daß sie in der Rhizosphäre eine Rolle spielen. Je spezifischer die Sondenwahl ist, desto genauer wird die Darstellung zur Identifizierung von Bakterien. Die bei der Untersuchung der

dynamischen Verschiebungen verwendete Sonde EUB338 (EUBI) detektiert ein engeres Spektrum an Bakterien die inzwischen standardmäßig eingesetzten Sondenmischung aus EUB338I + II + III. Dieses EUB_{MIX} bezieht auch Bakterien der *Planctomycetales* und *Verrucomicrobiales* mit ein (vgl. Tab. B.9.1.2). Ein Vergleich der detektierten Zellzahlen bestimmt mit beiden Sonden zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der untersuchten Rhizosphärenprobe. Ein anderes Ergebnis wäre daher bei Verwendung der Sonde EUB338_{MIX} nicht zu erwarten gewesen. Für die FISH stehen nur drei verwendbare Sondenfluoreszenzmarkierungen (vgl. B.10.2.1): "Cy3" (rot), "Cy5" (blau) und "FLUOS" (grün), wobei das "Cy5"-Fluoreszenzsignal mit 662-738 nm nur elektronisch erfaßbar ist. Die manuelle Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop ermöglichte so nur die gleichzeitige Erfassung zweier Sonden signale. FISH-Untersuchungen sind daher eher im diagnostischen Bereich zum schnellen, direkten Nachweis spezifischer Organismen einsetzbar (Amann *et al.*, 2000). Je komplexer die zu untersuchende Probe, desto aufwendiger wird die Bestimmung. Die in dieser Arbeit eingesetzten Sonden erfaßten die Untergruppen in der Rhizosphäre häufig vorkommender Proteobakterien (vgl. B.9.1.2), die in sich jedoch hoch divers sein können. Eine Verschiebung innerhalb dieser Untergruppen konnte mit diesem Ansatz nicht verfolgt werden.

D.4.3 t-RFLP-Analyse der gesamten bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft

Die Gram-negativen Bakterien stellen jedoch nur einen Teil der gesamten bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft dar, weshalb eine Analyse der Gesamtpopulation von besonderem Interesse war. Mittels der Analyse des terminalen Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus (t-RFLP) wurde die Rhizosphärenpopulation auf Veränderungen untersucht. Hierzu wurden drei unterschiedliche Kollektive von Wurzelproben zu verschiedenen Probezeiten untersucht (vgl. C.3.2.3): zum einen Wurzelproben, die mit dem AHL-produzierendem Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert worden waren, zum anderen Wurzelproben inokuliert mit der AHL-negativen Mutante MG44 und schließlich nicht inokulierte Wurzelproben als Kontrollen. Die Probenahmen erfolgten nach 2, 6, 24 und 168 Stunden (= 1 Woche; vgl. B.5.2). Die Resultate zeigten generell eine hohe Übereinstimmung der Restriktionsfragmentmuster, der mit *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 inokulierten Wurzelproben und der nicht inokulierten Kontrolle. Der Vergleich der inokulierten Wurzelproben mit der Kontrolle ergab einen Unterschied in drei Fragmentensignalen in der Größe von 199 bp, 238 bp und 363 bp (vgl. C.3.2.6). Das Fragment

der Größe 363 bp entsprach in der Länge dem zu erwartenden einseitig markierten Fragmentstück der 16S-rDNS von *Serratia liquefaciens* nach einem Enzymverdau mit den verwendeten Restriktionsenzymen *Hin6I* bzw. *MspI* (vgl. Tabelle B.12.5). Die Ergebnisse der t-RFLP-Analyse legen den Schluß nahe, daß die Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 und MG44 Einfluß auf die natürliche Rhizosphärenpopulation von Tomatenpflanzen hat. So wurde das Fragmentstück der Größe 199 bp nur in den mit *S. liquefaciens* MG1 oder MG44 inokulierten Wurzelproben gefunden und war dort erst nach 6 Stunden nach der Inokulation nachzuweisen. In der Kontrolle wurde es nicht gefunden. Das Fragment der Größe 238 bp hingegen war nur in der Rhizosphärenpopulation von Wurzeln, inokuliert mit dem AHL-produzierenden Wildtyp, *S. liquefaciens* MG1, nachzuweisen. Es trat dort erst nach einer Woche auf. Weder in der nicht inokulierten Kontrolle, noch nach Inokulation der AHL-negativen Mutante konnte ein solches Fragment festgestellt werden. Dieses Fragment trat also nur unter dem Einfluß der Produktion von AHL des *S. liquefaciens* MG1 auf. Daß diese Fragmentsignale nicht schon zu einem früheren Zeitpunkt detektiert wurden, läßt sich anhand der Detektionsgrenzen der Analyse erklären. In der Rhizosphärengemeinschaft nicht häufig vorkommende Bakterien werden bei der t-RFLP-Analyse nur schlecht erfaßt (vgl. D.4.4). Das zeitversetzte Auftreten der im Vergleich zur Kontrolle charakteristischen Fragmentstücke in den inokulierten Rhizosphärenproben könnte damit Folge einer sich erst langsam durchsetzenden dynamischen Veränderung der Rhizosphärenpopulation sein.

D.4.4 Möglichkeiten und Einschränkungen der t-RFLP-Analyse

Die t-RFLP-Analyse ermöglicht eine qualitativ umfassende und genaue Analyse einer komplexen Bakteriengemeinschaft mit guter Reproduzierbarkeit (Marsh *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2001). Dies ließ sich durch Parallelversuche, sowie durch die auffallenden Homologien der Fragmentmuster einer Versuchsreihe von Wurzelproben, die unterschiedlich inokuliert wurden, bestätigen. Eine mögliche Limitierung stellt die Qualität und Präparation der zur t-RFLP verwendeten 16S-rDNS dar, wobei die Güte der 16S-rDNS-Amplifikation (PCR) einen besonderen Stellenwert einnimmt. Dazu ist es wichtig, daß die aus den Wurzeln extrahierte DNS möglichst frei von Boden- oder Pflanzensubstanzen ist, welche die Amplifikation der 16S-rDNS der Bakterien stören könnten (vgl. C.3.2.2). Ferner müssen Fehlamplifikationen der verwendeten Primer vermieden werden (vgl. C.3.2.2). Bei der Amplifikation der DNS der für die 16S-rRNS codierenden Gene kommt es auf die Anzahl der PCR-Zyklen an. Hierbei ist wichtig, daß die 16S-rDNS der Bakterien, die nur in geringer

Anzahl in der untersuchten Rhizosphärenprobe vertreten sind, ebenso wie diejenigen die dominant vorkommen, in ausreichender Menge amplifiziert wird. Das Status quo aller vorkommenden Bakterien sollte gewahrt bleiben, damit es nicht zu einer methodisch bedingten Populationsverschiebung kommt. Denn sowohl eine zu hohe Zahl von PCR-Zyklen als auch eine zu geringe Zahl kann dazu führen, daß die 16S-rDNS nicht dominant vorkommender Bakterien in der Fülle der Amplifikate dominanter Vertreter der Rhizosphärenpopulation untergeht. Bei der t-RFLP-Analyse könnte dies zu einem Detektionsausschluß führen, da das Detektionssignal sich nicht mehr signifikant hervorheben würde. Laut Literatur wurden gute Ausbeuten bei der Amplifikation von 30-35 PCR-Zyklen erreicht (Marsh *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden 16S-rDNS Amplifikationen mit 35 PCR-Zyklen eingesetzt, um eine ausreichende (detektierbare) Menge an 16S-rDNS-Amplifikaten von *Serratia liquefaciens* zu erhalten.

Ein anderes Problem können Signalüberlagerungen darstellen. Diese entstehen entweder bei Fehlamplifikationen in der PCR (M. Egert, pers. Mitteilung, MPI Marburg) oder durch Fragmentensignale sehr ähnlicher Größe, so daß eine Differenzierung dieser Überlagerungen die computergestützte Auswertung erschwert. Dieses Phänomen trat bei den detektierten Fragmentensignalen der Größen 199 und 238 bp auf. Während das Signal in den detektierten Fragmentlisten eindeutig als Einzelsignal identifizierbar war, zeigte die graphische Darstellung der Signalanalyse eine Überlappung mit der Detektion des Standardfragments. In diesem Falle lag ein Grenzfall in der Darstellbarkeit der Analysesoftware vor, da der verwendete Sequenzierautomat, die als Standard verwendeten Fragmente definierter Größen im gleichen Detektionskanal erkennt, wie auch die anderen Signale der Probefragmente. Diese Einschränkungen berücksichtigend, konnten dennoch verlässliche Ergebnisse über die qualitative Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft erzielt werden. Quantitative Aussagen waren bei dieser Analyse nicht möglich, da hierzu definierte Bezugsgrößen fehlten. Es ist allerdings wahrscheinlich, daß zahlenmäßig häufig vorliegende 16S-rDNS-Sequenzen zu höheren t-RFLP-Signalen führen und somit eher die dominierenden Anteile der Bakteriengemeinschaft über die t-RFLP-Analyse erfaßt werden.

D.4.5 Auswertung und Bedeutung der Ergebnisse der t-RFLP-Analyse

Die Auswertung erfolgte anhand eines Fragmentgrößenvergleichs zu Fragmentstücken gleicher Größe bekannter Bakterien mittels der Datenbank "Ribosome Database Project II" (vgl. B.12.7). Verglichen wurden dabei die bei der t-RFLP gefundenen Fragmentstücke der

Größen 199 bp und 238 bp, die nur nach Inokulation von *Serratia liquefaciens* auftraten, jedoch nicht in der nicht inokulierten Kontrolle zu finden waren. Die Analyse 199 bp großen Fragmentstückes ergab beim Vergleich der Fragmentgröße eine Ähnlichkeit zu Stämmen der Gruppe der Fusobakterien (vgl. Tab. D.3.2.1). Fusobakterien sind Gram-negative Bakterien, die zur phylogenetischen Untergruppe der β -Proteobakterien gezählt werden. Sie sind als humanpathogene Krankheitserreger des Intestinaltraktes oder der Keimbahn beim Menschen bekannt (Pschyrembel, 1998).

Tabelle D.3.2.1: Liste der in der RDPII-Datenbank gefundenen Bakterien, die bei einer t-RFLP-Analyse Fragmente der gleichen Größe zeigen. Die Fehlertoleranz lag bei ± 1 bp (vgl. Tabellen C.3.2.7a und b im Anhang).

Fragmentstück (bp)	Ähnlichkeit mit der Gruppe der	Beispiel der Datenbank
199	Fusobakterien	<i>Fusobacterium mortiferum</i>
238	Chlostridien	<i>Clostridium butulinum</i> D6f
238	Staphylokokken	<i>Staphylococcus aureus</i>
238	Bacillen	<i>Bacillus subtilis</i>

Ein Vorkommen von humanpathogenen Erregern bzw. von phylogenetisch nah verwandten Bakterien ist in der Rhizosphäre nicht ungewöhnlich. Hierbei sind die Grenzen zur Einteilung, welche Mikroorganismen als humanpathogen gelten, schwierig zu ziehen. Inzwischen gilt auch *Serratia liquefaciens* als potentiell humanpathogen (Bundesministerium für Gesundheit, 2001). Betrachtet man nur die bekannten humanpathogenen Erreger (ohne die als potentiell eingestuft) so finden sich wegen der guten Nährstoffversorgung viele in Assoziation mit Pflanzen (Beuchat, 2002). Sie sind dort vor allem in den Früchten, im Sproß von Pflanzen oder in den Samen zu finden, wie z. B. *Listeria monocytogenes* in Tomaten (Vahidy, 1992). Auch aus der Rhizosphäre konnten verschiedene Isolate humanpathogener Erreger isoliert werden (Tabacchioni *et al.*, 2002). Viele humanpathogene Erreger sind auch als natürliche Bodenisolat bekannt, wie z. B. Bakterien der Gattung *Pseudomonas*. In ihren Interaktionen und Lebensweisen, z. B. in der Biofilmbildung, unterscheiden sie sich kaum von apathogenen Bakterien (Tolker-Nielsen & Molin, 2000). Am Beispiel des humanpathogenen Erregers *Bartonella hensellae* konnten inzwischen große Homologien im Virulenzmechanismus zum phytopathogenen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* gefunden werden (Kempf *et al.*,

2002). Damit sind bei der Analyse der Rhizosphärenpopulation durchaus auch Bakterien, die als humanpathogene Erreger gelten, zu erwarten. Die Interpretation des Vorkommens von Fusobakterien ist hierbei jedoch problematisch. Die Erreger von Darmerkrankungen zeigen eine hohe Anpassung an Temperatur und Nährstoffangebot im menschlichen oder tierischen Darm (nach Angaben der DSMZ, Braunschweig, D). Fusobakterien sind damit in ihren Lebensbedingungen nicht den Bodenverhältnissen der Tomatenrhizosphäre angepaßt. Falls die detektierten Fragmentensignale tatsächlich von Fusobakterien stammen, wäre nur denkbar, daß *Serratia liquefaciens* MG1 bzw. MG44 die Rhizosphärenpopulation und eventuell darin auftretende apathogene Umweltkeime so stark ändert, daß im Boden vorkommende Fusobakterien zur Kolonisierung der Wurzel stimuliert werden. Einen Hinweis für eine solche Änderung zeigte das Ergebnis der FISH-Analyse der Gram-negativen Bakterien in der Rhizosphäre (vgl. C.3.1). Dort war eine Woche nach der Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 eine dynamische Verschiebung in der Bakteriengemeinschaft festzustellen, die zu einer Verdopplung der β -Proteobakterien in der bakteriellen Rhizosphärenpopulation führte. Die Zuordnung des 196 bp großen Fragmentstückes zur Gruppe der β -Proteobakterien bestätigt damit die Ergebnisse der FISH-Analyse. Selbst eine Vergrößerung der Fehlertoleranz in der Größe des Fragmentstückes bei der Datenbankanalyse bis ± 10 bp ergab noch Zuordnungsmöglichkeiten zur Gruppe der β -Proteobakterien. Auf welchen Effekt die Stimulierung der β -Proteobakterien in der Rhizosphäre nach Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 zurückzuführen ist, läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Änderungen in der Rhizosphäre z. B. durch verschiedene pflanzliche Exsudate (Lugtenberg *et al.*, 2001) oder deren Abbauprodukte durch *Serratia liquefaciens* könnten die Ursache hierfür sein.

Die RDPII-Datenbankanalyse ergab für das 238 bp große Fragmentstück eine Zuordnung zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien. Die dazu mögliche Übereinstimmung konnte jedoch nicht so eng gefaßt werden wie beim 199 bp großen Fragmentstück. Gemessen am natürlichen Habitat der in der Datenbank als übereinstimmend gefundenen Bakterien konnte die Auswahl auf Vertreter der Gattungen von *Clostridium*, *Staphylococcus* oder *Bacillus* beschränkt werden (vgl. C.3.2.7). Bei diesen wies die Datenbank nur bestimmte Bakterienstämme aus. Alle dort aufgeführten Gram-positiven Bakterien haben LGC Eigenschaften, d. h. ihre DNS verfügt über einen niedrigen Gehalt an GC-Basen. Die Zunahme der Population der LGC-Bakterien bestätigte auch das Ergebnis der FISH-Analyse (vgl. C.3.1). Die Zellzahl der LGC-Bakterien verdoppelte sich ähnlich den β -Proteobakterien der Gram-negativen Bakterien innerhalb einer Woche nach der Inokulation von *Serratia liquefaciens* MG1. Über die

Diversität innerhalb der LGC-Bakterienpopulation konnte jedoch mittels der FISH-Analyse keine Aussage getroffen werden (vgl. D.4.2). Da bei der t-RFLP-Analyse nur einzelne Bakterienpopulationen, die sich signifikant von der übrigen Rhizosphärengemeinschaft der Bakterien unterscheiden, detektiert werden (vgl. D.4.4), ist hier von der deutlichen Zunahme einer bestimmten Bakterienpopulation auszugehen. Den Eigenschaften nach kann dabei als unwahrscheinlich angenommen werden, daß die Clostridien (*Clostridium botulinum* und *Clostridium estertheticum*) zu den von *Serratia liquefaciens* MG1 stimulierten Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen gehören. Damit bestand nach der Datenanalyse nur noch die Auswahl zwischen *Staphylococcus* und *Bacillus*. In der Auswertung zur Datenbankanalyse fiel auf, daß der Bakterienstamm *Bacillus subtilis* mehrfach ausgegeben wurde, während bei den Staphylokokken 16 verschiedene Stämme zur Auswahl standen (vgl. C.3.2.7b). In der Rhizosphäre von Pflanzen konnte *B. subtilis* häufig isoliert werden (Schmiedeknecht *et al.*, 1998). Für eine Reihe von *B. subtilis*-Arten ist eine ausgeprägte Biokontrollaktivität im Boden und in der Rhizosphäre von Pflanzen beschrieben (Schmiedeknecht *et al.*, 1998; Grosch *et al.*, 1999). *Bacillus subtilis* wurde aber nicht nur im Boden isoliert (Weber & Marahiel, 2002), sondern auch eng assoziiert an Blättern von Tomatenpflanzen gefunden (Theoduloz *et al.*, 2003). Im Zusammenhang mit der Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen an Tomatenpflanzen stand *B. subtilis* auch im Verdacht, eine systemische Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* auslösen zu können (Gupta *et al.*, 2000). Bisherige Erkenntnisse ergaben aber nur Bekämpfungsmöglichkeiten gegen Phytopathogene bei direktem Kontakt in der Rhizosphäre (Khan & Khan, 2002) oder bei *in vitro* Versuchen, wo die fungizide Wirkung von *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus* auf *Fusarium oxysporum* bzw. auch auf *Alternaria alternata* nachgewiesen werden konnte (Kumar *et al.*, 2003). Interessant ist dieses Ergebnis, da die Stimulierung dieser Organismen durch die AHL-Produktion von *S. liquefaciens* MG1 verursacht zu sein scheint.

D.5 Bedeutung der AHL-Produktion von *Serratia liquefaciens* in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen

Projektpartner konnten nachweisen, daß Reinsubstanzen von 3-oxo-Hexanoyl-L-Homoserinlacton, ein AHL-Signalmolekül von *Serratia liquefaciens* MG1, eine systemische Resistenz in Tomatenpflanzen auslösen kann. (R. Schuhegger, Dissertation, 2003). Tomatenpflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, zeigten eine Resistenz gegen den phytopathogenen Pilz *Alternaria alternata*. Die AHL-negative Mutante *S. liquefaciens* MG44 hingegen konnte diese Resistenz nicht verursachen. Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die AHL-Signalmoleküle auf die Besiedlung der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen durch *Serratia liquefaciens* MG1 keinen Einfluß haben, jedoch eine Wirkung auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft zeigten.

Bemerkenswert waren hierbei die Ergebnisse der t-RFLP-Analyse, welche Zunahmen der Gram-positiven Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen nach der Inokulation von *Serratia liquefaciens* MG1 aufzeigte. Hingegen zeigte die t-RFLP-Analyse, daß die bei der FISH-Analyse nachgewiesenen Veränderungen in der β -Proteobakterienpopulation nach Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 nicht durch AHL-Produktion verursacht wurden. Eine direkte AHL-regulierte Interaktion verschiedener Bakterienpopulationen mittels "quorum-sensing", wie sie von einigen Gram-negativen Bakterien als "Crosstalk" bekannt ist (Whiters *et al.*, 2001), findet hier nicht statt. Gram-positive Bakterien zeigen zwar auch "quorum-sensing"-Aktivitäten (vgl. A.2), doch die Signalübermittlung erfolgt hier nicht mittels AHL, sondern über Peptide (Bassler *et al.*, 2000). Direkte Interaktionen zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien über AHL-Signalmolekülen sind nicht bekannt.

Davon ausgehend, daß es sich bei der Stimulierung der LGC-Gram-positiven Bakterien um die Zunahme von *Bacillus subtilis* handeln könnte, besteht auch eine ganz andere Erklärungsmöglichkeit. Von verschiedenen *Bacillus sp.*-Isolate ist die Fähigkeit zum Abbau von *N*-Acyl-L-Homoserinlacton-Molekülen bekannt (Lee *et al.*, 2002). Das Auftreten der Gram-positiven Bakterienpopulation wäre bei *B. subtilis* mit der Nutzung der AHL-Moleküle als zusätzliche C-Quelle zu erklären. Ein zusätzlicher Effekt der Gram-positiven Bakterien (z. B. von *B. subtilis*) auf die Resistenzbildung gegen Phytopathogene bei Tomatenpflanzen ist damit nicht auszuschließen, jedoch im Zusammenhang mit der beobachteten systemischen Resistenz gegen *Alternaria alternata*, die durch AHL-Signalmoleküle ausgelöst wurde, eher unwahrscheinlich.

Entgegen diesen Wirkungen der AHL-Moleküle auf die Pflanze und auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft zeigten sich beim AHL-produzierenden Bakterienstamm von *Serratia liquefaciens* MG1 keine Vorteile in der Besiedlung der Rhizosphäre durch die Produktion von AHL. Gleiches konnte auch beim AHL produzierenden Wildtyp von *Pseudomonas putida* IsoF festgestellt werden (C. Dürr, Diplomarbeit, 2001). Dabei kann die Produktion von AHL-Molekülen neben evtl. AHL-regulierten Abwehrmechanismen gegen verschiedene Bodenpilze auch für die bakterielle Rhizosphärenbesiedlung vorteilhaft sein. Wurzeln von Bohnenpflanzen zeigten auf den Kontakt mit AHL-Molekülen einen erhöhten Stoffwechsel mit verstärkter Exudatbildung, der zum Zuwachs der Rhizosphärenbakterien führte (Joseph & Phillips, 2003). Solche Effekte konnten jedoch an Tomatenpflanzen weder in der Art noch in der Dichte der Wurzelbesiedlung durch *S. liquefaciens* MG1 oder *P. putida* IsoF festgestellt werden. Untersuchungen an *Pseudomonas chlororaphis* SPR044 zeigten, daß ein vorteilhafter Effekt in der Besiedlung erst nach 2-3 Wochen, z. B. durch Nahrungsmangel in der Rhizosphäre auftreten kann (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 2002). Dies lag bei *P. chlororaphis* jedoch in der Funktion AHL-regulierter Enzyme begründet. Die Mutation bei *S. liquefaciens* MG1 verursachte nur Einschränkungen in der Schwärmfähigkeit und bei Proteaseaktivitäten, so daß ein gleicher Effekt, wie bei *P. chlororaphis* eher unwahrscheinlich ist. Auszuschließen sind auch der Einfluß von *Bacillus subtilis* oder Kompensationseffekte durch andere AHL-Synthasen. *Bacillus subtilis* kann durch verstärkten Abbau von AHL-Molekülen in der Rhizosphäre die Fähigkeit zum "quorum-sensing" unterbinden (Dong *et al.*, 2001). Jedoch erklärt dies nicht die Ergebnisse aus dem monoxenischen System, wo die AHL-Produktion auch keinen Einfluß auf die Wurzelbesiedlung zeigte.

Kompensationen von AHL-Mutationen bei AHL-negativen Mutanten z. B. durch verschiedene Signalkaskaden (Wisniewski-Dye & Downie, 2002), wie am Beispiel von *Rhizobium leguminosarum* bekannt (Wilkinson *et al.*, 2002), zeigten, daß blockierte AHL-Synthesewege durch parallele AHL-Synthasen ersetzt werden können (Rodelas *et al.*, 1999). Monitorversuche mit Sensorstämmen hingegen bewiesen, daß bei *S. liquefaciens* MG44 und auch *P. putida* F117 solche Kompensationen nicht möglich waren, da keine AHL-Moleküle mehr produziert wurden (K. Sigl, Diplomarbeit, 2001; C. Dürr, Diplomarbeit, 2001).

Es bestünde jedoch die Möglichkeit, daß über strukturell verschiedene Signalmoleküle Interaktionen zwischen Bakterien auch auf AHL-unabhängigen Signalwegen stattfinden könnten. Am Beispiel von *Vibrio harveyi* konnte ein solches System der "Hybridsprache" beschrieben werden (Whitehead *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um ein über Peptide gesteuertes Signalsystem, das parallel zum AHL-Signalsystem existiert und gleiche Aufgaben

übernehmen kann (vgl. A.2; Bassler, 2002). Ob solche Systeme auch Einfluß auf die Rhizosphärenbesiedlung von Bakterien haben können, ist noch unbekannt.

Da die AHL-Produktion für die Wurzelbesiedlung von *Serratia liquefaciens* MG1 an Tomatenpflanzen keine Vorteile zeigte, jedoch eine systemische Resistenz gegen phytopathogene Pilze in der Pflanze auslöste, diente die AHL-Produktion *S. liquefaciens* MG1 indirekt zum Schutz des eigenen Lebensraumes. Ob dies als eine gezielte Abwehr gegen phytopathogenen Organismen zu sehen ist oder nur ein Nebeneffekt, der bei der Besiedlung der Wurzeln von Tomatenpflanzen auftritt, bleibt noch zu klären. Insbesondere auch, welche Rolle die festgestellten Veränderungen in der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft dabei spielen könnten.

E Zusammenfassung

N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) sind bakterielle Signalstoffe, welche in Gram-negativen Bakterien Zelldichte-abhängig wichtige interaktive Funktionen steuern.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von AHL-Produktion auf das Siedlungsverhalten der Rhizosphärenbakterien *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* auf die Zusammensetzung der Rhizosphärenmikroflora von Tomatenpflanzen untersucht. Es wurden jeweils ein AHL-produzierender Wildtypstamm (*S. liquefaciens* MG1, *P. putida* IsoF) und eine AHL-negative Mutante (*S. liquefaciens* MG44, *P. putida* F117), deren Fähigkeit zur AHL-Produktion unterbunden war, eingesetzt. Die Stämme waren zur *in situ* Lokalisierung *gfp*- oder *rfp*-markiert. Zwei Pflanzensysteme wurden dabei verwendet: Tomatenpflanzen in einem axenischen, definierten System und in einem komplexen Bodensystem. Die Wurzelbesiedlungsstudien wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) durchgeführt und die Siedlungsdichten der Inokulate anhand der Zellzahl bestimmt. Techniken der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und die terminale Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus (t-RFLP) – Analyse dienten zur Untersuchung von Veränderungen in der Zusammensetzung der Rhizosphärenpopulation. Am Beispiel von *P. putida* IsoF konnte die Verbreitung von AHL an der Wurzel untersucht werden.

- (1) *S. liquefaciens* MG1 zeigte ebenso wie die AHL-negative Mutante, *S. liquefaciens* MG44 eine effektive Besiedlung der Tomatenwurzel, besonders in der Wurzelhaarzone. Eine endophytische Besiedlung konnte nicht nachgewiesen werden.
- (2) In Studien zur Siedlungsdichte konnten keine Unterschiede zwischen *S. liquefaciens* MG1 und MG44 festgestellt werden. Im axenischen System siedelten sie in stabilen Zellzahlen von bis zu 10^9 Zellen / g Wurzel (Frischgewicht (Fg)). Im Bodensystem nahm ihre Zellzahl innerhalb einer Woche auf 10^7 Zellen / g Wurzel (Fg) ab.
- (3) Untersuchungen der AHL-Verteilung am Beispiel von *P. putida* IsoF zeigten einen Wirkungsradius des AHL-Signalmoleküls *N*-3-oxo-Dodecanoyl-L-Homoserinlacton (OdDHL) von bis zu 60 µm im Bereich der Wurzelstreckungszone und von 37 µm an der Wurzelspitze.

- (4) Mittels FISH konnte ein Einfluß von *S. liquefaciens* MG1 auf die Rhizosphärenpopulation nachgewiesen werden. Dabei verdoppelten sich die Zellzahlen der β -Proteobakterien (Gram-negativen Bakterien) und der LGC-Bakterien (Gram-positiven Bakterien) eine Woche nach Inokulation von *S. liquefaciens* MG1.
- (5) Die t-RFLP-Analyse bestätigte diese Veränderungen in der Zusammensetzung der natürlichen bakteriellen Rhizosphärenpopulation von Tomatenpflanzen. Nach der Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 bzw. MG44 wurden zwei zusätzliche 16S-rDNS-Fragmentstücke im Unterschied zur nicht inokulierten Kontrolle detektiert. Ein 199 bp großes Fragment, das ca. 6 Stunden nach Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 bzw. MG44 in der Rhizosphäre auftrat und ein Fragmentstück der Größe 238 bp, das ausschließlich eine Woche nach Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 zu finden war. Eine Datenbankanalyse ergab für das 199 bp große Fragmentstück eine mögliche Zuordnung zu den Gram-negativen Fusobakterien und für das 238 bp große Fragmentstück eine Zuordnung zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien, wahrscheinlich aus den Gattungen *Clostridium*, *Staphylococcus* und *Bacillus*.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß AHL bei der Besiedlung der Tomatenwurzel produziert wird und dort eine Wirkung auf die Rhizosphärenmikroflora nachzuweisen ist. Auf das Siedlungsverhalten von *S. liquefaciens* oder *P. putida* hat die AHL-Produktion keinen Einfluß.

N-Acylhomoserinlactones (AHL) are signalling molecules in gram-negative bacteria, which regulate, in a cell density dependent way, important interactive functions.

This work characterised the microbial ecology of the autoinducer (AHL) producing bacteria *Serratia liquefaciens* MG1 and *Pseudomonas putida* IsoF in the rhizosphere of tomato plants. *Gfp*- and *rfp*-tagged strains of the AHL producing wildtypes *S. liquefaciens* MG1 and *P. putida* IsoF were compared with its AHL-negative mutants, which were unable to produce AHL. Two kinds of plants cultivating systems were used: a defined axenic system and a complex soil system. The characterisation of the root colonisation behaviour was performed using confocal laserscanning microscopy (CLSM) and cell counting of bacteria. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and terminal restrictions fragment length polymorphism (t-RFLP)-techniques were used to examine shifts of the bacterial population in the rhizosphere on tomato plants. The effective *in situ* production and spreading of AHL on tomato roots was demonstrated with *P. putida* IsoF using an AHL-sensor strain *P. putida* F117 pKR-C12.

- (1) *S. liquefaciens* MG1 and its AHL-negative mutant MG44 showed effective root colonisation mostly in the root hair zone of tomato plants. No differences were observed between the AHL producing wildtype and its AHL-negative mutant. An endophytic root colonization behaviour was not found.
- (2) *S. liquefaciens* MG1 and MG44 showed no differences in the root colonisation patterns. They colonised roots in constant cell numbers of 10^9 cells / g root (fresh weight, fg) in the axenic system one week after inoculation. In soil system the rhizosphere-cell numbers stabilized on 10^7 cells / g root (fg) one week after inoculation.
- (3) Using the *in situ* AHL reporterstrain *P. putida* F117 a spreading of 3-oxo-dodecanoyl-L-homoserinlacton (OdDHL) produced by *P. putida* IsoF in an effective range up to 60 μ m in the root elongation zone and 37 μ m in the root tip zone of tomato plants could be demonstrated.

- (4) Inoculation of *S. liquefaciens* MG1 caused shifts in the native bacterial rhizosphere population of tomato plants. Cell numbers of β -proteobacteria (gram-negative bacteria) and gram-positive (LGC) doubled in the rhizosphere one week after inoculation with *S. liquefaciens* MG1, as determined by FISH-analysis.
- (5) The t-RFLP-analysis supported the results applying the FISH-technique. Two different fragments of 16S-rRNA in size of 199 bp and 238 bp were detected after inoculation of *S. liquefaciens* in the rhizosphere of tomato plants. None of them was found in the non-inoculated control samples. The 199 bp fragment was discovered in the rhizosphere of tomato plants inoculated with *S. liquefaciens* MG1 or MG44 (about 6 hours after inoculation). The fragment of 238 bp could only be detected in the rhizosphere of tomato plants which were inoculated with *S. liquefaciens* wildtype MG1. Databank analysis showed high similarity of the 199 bp fragment to the β -proteobacterium *Fusobacterium* and in the cases of the 238 bp fragment to Gram-positive bacteria e. g. *Clostridium*, *Staphylococcus* and *Bacillus*.

AHL was produced in effective concentrations in the rhizosphere of tomato plants and influenced the bacterial rhizosphere population. However, the AHL-production had no influence on the colonization behaviour of the AHL-producing strains *S. liquefaciens* MG1 and *P. putida* IsoF.

F Literaturverzeichnis

- Aguilar, E.A., Turner, D.W. and Sivasithamparam, K. (1999).** *Aerenchyma* formation in roots of four banana (*Musa spp.*) cultivars. *Sci. Hort.* **80**, 57-72.
- Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990).** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**, 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995).** Phylogenetic Identification and In situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Amann, R. and Ludwig, W. (2000).** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 555-565.
- Anderson, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S. and Givskov, M. (2001).** *gfp*-Based *N*-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 575-585.
- Bahnweg, G., Schulze, S., Möller, E.M., Rosenbrock, H., Langebartels, C. and Sandermann, H. (1998).** DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **262**, 79-82.
- Bassler, B.L., Whright, M., Showalter, M.E. and Silverman, M.R. (1993).** Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol* **9**, 773-786.
- Bassler, B.L., Wright, M. and Silverman, M.R. (1994).** Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**, 273-286.
- Bassler, B.L. (1999).** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 582-587.
- Bassler, B.L. (2002).** Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.
- Belandreau, J. and Knowles, R. (1978).** Interaction between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants. (Amsterdam: Elsevier).

- Benhamou, N., Gagne, S., Le Quere, D. and Dehbi, L. (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* **90**, 45-56.
- Beuchat, L.R. (2002).** Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection* **4**, 413-423.
- Bundesministerium für Gesundheit. (2001).** Bundesgesetzesblatt I: Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. (Bonn: Bundesanzeiger Verlagsges. mbH.).
- Buysens, S., Heugens, K., Poppe, J. and Höfte, M. (1996).** Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 865-871.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., de Priester, W., van der Bij, A.J. and Lugtenberg, B.J.J. (1997).** Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 79-86.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P., Tichy, H.V., de Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E. and Lugtenberg, B.J.J. (1998).** Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1069-1077.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2003).** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas bacteria*. *New Phytol.* **157**, 503-523.
- Cryer, D.R., Eccleshall, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**, 711-745.
- Curl, E.A. and Truelove, B. (1986).** *The Rhizosphere*. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag).
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R.L., Schleifer, K.-H. and Wagner, M. (1999).** The domain-specific probe Eub-338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444.

- De Cal, A. and Melgarejo, P. (2001).** Repeated applications of *Penicillium oxalicum* prolongs biocontrol of *fusarium* wilt of tomato plants - Biological control of *fusarium* wilt in tomato plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 805-811.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F. and Zhang, L.H. (2001).** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl Homoserine lactonase. *Nature* **411**, 813-817.
- Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V. and Lemanceau, P. (1997).** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol* **135**, 325-334.
- Dürr, C.M. (2001).** Besiedlung der Rhizosphäre von Tomate mit dem Autoinducerproduzierenden Bakterium *Pseudomonas putida* IsoF. In Lehrstuhl für Mikrobiologie (Ludwig-Maximilians-Universität München: Diplomarbeit).
- Eberhard, A. (1972).** Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**, 1101-1105.
- Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. and Givskov, M. (1996).** Involvement of *N*-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers in Controlling the Multicellular Behavior of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **20**, 127-136.
- Eberl, L., Molin, S. and Giskov, M. (1999).** Surface Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **181**, 1703-1712.
- Eberl, L. (1999).** *N*-Acyl Homoserinelactone-mediated Gene Regulation in Gram-negative Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **22**, 493-506.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994).** Quorum sensing in *bacteria*: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269-275.
- Givskov, M. and Molin, S. (1992).** Expression of extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens* is growth-phase-dependent, catabolite-repressed and regulated by anaerobiosis. *Molecular Microbiology* **6**, 1363-1374.
- Givskov, M., Östling, J., Eberl, L., Lindum, P.W., Christensen, A.B., Christensen, G. and Molin, S. (1998).** Two Separate Regulatory Systems Participate in Control of Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**, 742-745.
- Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. (1998).** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* **190**, 63-68.

- Goddard, V.J., Bailey, M.J., Darrah, P., Lilley, A.K. and Thompson, I.P. (2001).** Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: A community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant Soil* **232**, 181-193.
- Grosch, R., Junge, H., Krebs, B. and Bochow, H. (1999).** Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* **106**, 568-580.
- Gupta, V.P., Bochow, H., Dolej, S. and Fischer, I. (2000).** Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* **107**, 145-154.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B. and Ladha, J.K. (2001).** Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **183**, 2634-2645.
- Handelsman, J. and Stabb, E.V. (1996).** Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Plant Cell* **8**, 1855-1869.
- Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S. and Zhao, X. (2000).** The role of root border cells in plant defense. *trends in plant science* **5**, 128-132.
- Hessenmuller, A. and Zeller, W. (1996).** Biological control of soil-borne *Phytophthora* species on strawberry with bacterial antagonists. Antagonistic effect and colonization of rhizoplane. *Z. Pflanzenk. Pflanzens.-J. Plant Dis. Prot.* **103**, 602-609.
- Islam, M.S. (2001).** Sucrose metabolism in domesticated cherry tomato, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Alef., and purification of sucrose synthase. *J. Horticult. Sci. Biotechnol.* **76**, 40-47.
- Jaeger, C.H., III, Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E. and Firestone, M.K. (1999).** Mapping of Sugar and Amino Acid Availability in Soil around Roots with Bacterial Sensors of Sucrose and Tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2685-2690.
- Joseph, C.A. and Phillips, D.A. (2003).** Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. *Plant Physiol. Biochem.* **41**, 189-192. d,g 1,3,2 dioxaphosphocin 6-oxides. *J. Heterocycl. Chem.* **40**, 345-351.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P. and Wagner, M. (1998).** Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3042-3051.

- Kalbe, C., Marten, P. and Berg, G. (1996).** Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbial Res* **151**, 433-439.
- Kaplan, H.B. and Greenberg, E.P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**, 1210-1214.
- Khan, M.R. and Khan, S.M. (2002).** Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresour. Technol.* **85**, 213-215.
- Kempf, V.A.J., Hitziger, N., Riess, T. and Autenrieth, I.B. (2002).** Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol.* **10**, 269-275.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N. (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (Tour, France: Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie), pp. 879-882.
- Kiyosue, T. & Ryan, C.A. (1997).** A novel gene of tomato preferentially expressed in fruit encodes a protein with a Ca²⁺-dependent lipid-binding domain. *Plant Molecular Biology* **35**, 969-972.
- Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Leonova-Erko, E.I., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N.M. and Tikhonovich, I.A. (2003).** Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology* **72**, 37-41.
- Kumar, K.A., Kasthuraiah, M., Reddy, C.S., Reddy, C.D. and Berlin, K.D. (2003).** Facile syntheses and antimicrobial studies of 6-(aryloxy/arylthio/chloroethoxy)-2,10-dichloro-4,8-dinitro-12-trichloromethyl-12H-dibenzo d,g 1,3,2 dioxaphosphocin 6-oxides. *J. Heterocycl. Chem.* **40**, 345-351.
- Lee, S.J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.Y., Koo, B.T. and Lee, J.K. (2002).** Genes encoding the *N*-Acyl-L-Homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3919-3924.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H.-J. and van Pée, K.-H. (2000).** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag Sci* **56**, 688-695.
- Liu, J., Dazzo, F.B., Glagoleva, O., Yu, B. and Jain, A.K. (2001).** CMEIAS: A Computer - Aided System for the Image Analysis of Bacterial Morphotypes in Microbial Communities. *Microb. Ecol.* **41**, 173-194.

- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. (1997).** Characterisation of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516-4522.
- Loon, van L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**, 453-483.
- Lozan, J.L. and Kausch, H. (1998).** *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler.* (Berlin, Wien: Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag).
- Lueders, T. and Friedrich, M.W. (2003).** Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and *mcrA* Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 320-326.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V. and Simons, M. (1999).** Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**, 439-446.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L. and Bloemberg, G.V. (2001).** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 461-490.
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C. and Bloemberg, G.V. (2002).** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 373-383.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H. (1992).** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 593-600.
- Marsh, T.L. (1999).** Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 323-327.
- Marsh, T.L., Saxman, P., Cole, J., and Tiedje, J. (2000).** Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3616-3620.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., s, G.C.-A., Rolfe, B.G. and Bauer, W.D. (2003).** Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *PNAS* **100**, 1444-1449.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1999).** Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 186-196.

- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. and Levi, A. (1997).** A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**, 1465-1472.
- Meyer, G.D., Capiéau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J.P. and Höfte, M. (1999).** Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 450-458.
- Miles, A.A. and Misra, S.S. (1938).** The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene, Cambridge* **38**, 732-749.
- Nealson, K.H., Platt, T. and Hastings, J.W. (1970).** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system **104**, 313-322.
- Neef, A. (1997).** Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populations-Analyse (TU-München: Dissertation).
- Neori, A., Reddy, K.R., Ciskova-Koncalova, H. and Agami, M. (2000).** Bioactive chemicals and biological-biochemical activities and their functions in rhizospheres of wetland plants. *Bot. Rev.* **66**, 350-378.
- Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. and Defago, G. (2001).** Biotic factors affecting expression of the 2,4- diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* **91**, 873-881.
- Nultsch, W. (2001).** Allgemeine Botanik. (Stuttgart: Thieme Verlag).
- Pavlovkin, J. and Mistrik, I. (1999).** Phytotoxic effect of aluminium on maize root membranes. *Biologia* **54**, 473-479.
- Pearson, J.P., van Delden, C. and Iglewski, B.H. (1999).** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**, 1203-1210.
- Persello-Cartieux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C. (2003).** Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* **26**, 189–199.
- Phillips, D.A. and Streit, W.R. (1998).** Modifying rhizosphere microbial communities to enhance nutrient availability in cropping systems. *Field Crop. Res.* **56**, 217-221.
- Phillips, D.A., Ferris, H., Cook, D.R. and Strong, D.R. (2003).** Molecular control points in rhizosphere food webs. *Ecology* **84**, 816-826.

- Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A., Blachere, F.M. and Pierson III, L.S. (1998).** Interpopulation Signaling via *N*-Acyl-Homoserine-Lactones among *Bacteria* in the Wheat Rhizosphere. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **11**, 1978-1084.
- Pierson, L.S.I., Wood, D.W. and Chancey, S.T. (1996).** Phenazine antibiotic biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated at multiple levels. In *Biology of Plant-Microbe Interactions*, G. Stacey, B. Mullin, and P.M. Gresshoff, eds (St. Paul, MN: IS-MPMI), pp. 463-468.
- Pierson, L.S.I., Pierson, E.A., Wood, D.W., Chancey, S.T. and Harvey, D.E. (1997).** Recent advances in the genetic regulation of the activity of plant-growth promoting rhizobacteria. In *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*, A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, eds (Paris/Sapporo: OECD Press), pp. 94-101.
- Pierson, L.S.I., Wood, D.W. and Pierson, E.A. (1998).** Homoserine Lactone-Mediated Gene Regulation in Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol* **36**, 207-225.
- Pierson, L.S. (2000).** Expanding the club: engineering plants to talk to bacteria. *Trends Plant Sci.* **5**, 89-91.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A., and van Loon, L.C. (1996).** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Pelt, J.A., van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Sluis, I.v.d., Bakker, P.A.H.M. and van Loon, L.C. (2001).** *Rhizobacteria*-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. *Eur J Plant Pathol* **107**.
- Pirtillä, L.A., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R. and Hohtola, A. (2000).** Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3073-3077.
- Press, C.M., Loper, J.E. and Kloepper, J.W. (2001).** Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* **91**, 593-598.
- Pschyrembel, W. (1998).** *Klinisches Wörterbuch*. (Berlin: W de Gruyter).
- Rhijn, P.v. and Vanderleyden, J. (1995).** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**, 124-142.

- Robleto, E.A., Borneman, J. and Triplett, E.W. (1998).** Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5020-5022.
- Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P. and Downie, J.A. (1999).** Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J. Bacteriol.* **181**, 3816-3823.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1994).** *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiol. Rev.* **140**, 2849-2858.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. and Kloepper, J.W. (2003).** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS* **100**, 4927–4932.
- Sakai, M., Matsunaga, N., Matsuka, A. and Kanazawa, S. (2001).** Application of T-RFLP Analysis to the Study of Bacterial Community Structure in the Rhizosphere. *Soil Science and Plant Nutrition* **47**, 773-778.
- Salmond, G.P.C., Golby, P. and Jone, S. (1994).** Global Regulation of *Erwinia Caratovora* Virulence Factor Production. In *Advances in Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. (Boston: Kluwer).
- Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. (USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmidt-Eisenlohr, H., Gast, A. and Baron, C. (2003).** Inactivation of *gacS* Does Not Affect the Competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1817-1826.
- Schmiedeknecht, G., Bochow, H. and Junge, H. (1998).** Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **105**, 376-386.
- Schuhegger, R.M. (2003).** Induktion systemischer Resistenz durch *N*-Acyl-L-homoserinlacton-produzierende Bakterien in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen. In Fakultät für Chemie (TU-München: Dissertation).
- Shah, S., Li, J., Moffatt, B.A. and Glick, B.R. (1998).** Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**, 833-843.

- Sigl, K. (2001).** In situ Visualisierung von Zell-Zellkommunikation mittels Homoserinlactonen in der Tomatenrhizosphäre. In Lehrstuhl für Mikrobiologie (Technische Universität München: Diplomarbeit).
- Simons, M., van der Bij, A., Brand, I., de Weger, L.A., Wiffelman, C.A. and Lutgenberg, B.J.J. (1996).** Gnotobiotic System for Studying Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas* Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **9**, 600-607.
- Sørensen, J. (1997).** The Rhizosphere as a Habitat for Soil Microorganisms. In *Modern Soil Microbiology*, T.J.T.a.E.M.H.W. van Elsas J. D., ed (Marcel Dekker Inc.), pp. 21-45.
- Starr, M., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (1981).** The Prokaryotes. (New York, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag).
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Gantner, S., Ihring, A., Schmid, M., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C. and Eberl, L. (2001).** Visualization of *N*-Acylhomoserine Lactone (AHL)-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5761-5770.
- Steidle, A.D.C. (2002).** Die Bedeutung bakterieller Zell-Zell Kommunikation für die Besiedelung von Pflanzenwurzeln. In Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (TU-München: Dissertation).
- Steijl, H., Niemann, G.J. and Boon, J.J. (1999).** Changes in chemical composition related to fungal infection and induced resistance in carnation and radish investigated by pyrolysis mass spectrometry. *Mycological Research* **103**, 769-778.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H. and Schimper, A.F.W. (1991).** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. (Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag).
- Tabacchioni, S., Bevivino, A., Dalmastri, C. and Chiarini, L. (2002).** *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. *Ann. Microbiol.* **52**, 103-117.
- Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., Gonzalez, E. and Meza-Basso, L. (2003).** Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin *cryIAb* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *J. Appl. Microbiol.* **94**, 375-381.
- Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2000).** Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb. Ecol.* **40**, 75-84.

- Ton, J., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. (2002).** The *Arabidopsis* ISR1 locus is required for rhizobacteria-mediated induced systemic resistance against different pathogens. *Plant Biol.* **4**, 224-227.
- Vahidy, R. (1992).** Isolation of *Listeria monocytogenes* from fresh fruits and vegetables. *HortScience* **27**, 628–628.
- Weber, M.H.W., and Marahiel, M.A. (2002).** Coping with the cold: the cold shock response in the Gram- positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* **357**, 895-906.
- Wees, van S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., van t. Westende, Y.A.M., Hartog, F. and van Loon, L.C. (1997).** Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 716-724.
- Whipps, J.M. (1990).** Carbon economy. In *The rhizosphere*, L. J.M., ed (Chichester: Wiley), pp. 59-97.
- Whipps, J.M. (1997).** Interactions between fungi and plant pathogens in soil and the rhizosphere. In *Multitrophic interactions in terrestrial systems*, A.C. Gange and V.K. Brown, eds (Oxford: Blackwell Science), pp. 47-63.
- Whipps, J.M. (2001).** Microbial Interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**, 487-511.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. and Salmond, G.P.C. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 365-404.
- Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M. and Heinz, H. (2000).** Die konfokale Laser Scanning Mikrokopie. (Jena).
- Wilkinson, A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K. and Downie, J.A. (2002).** *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **184**, 4510-4519.
- Winans, S.C. (1992).** Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* **56**, 12-31.
- Wisniewski-Dye, F. and Downie, J.A. (2002).** Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 397-407.
- Withers, H., Swift, S. and Williams, P. (2001).** Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *CURR OPIN MICROBIOL* **4**, 186-193

- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. and Chet, I. (2001).** Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* **235**, 235-242.
- Zhang, R., Pappas, T., Brace, J., Miller, P.C., Oulmassov, T., Molyneaux, J.M., Anderson, J.C., Bashkin, J.K., Winans, S.C. and Joachimiak, A. (2002).** Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* **417**, 971-974.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. and Vidaver, A.K. (2002).** Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2198-2208.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. and Zambryski, P. (2000).** The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23**, 11-28.

G Anhang

G.1 Terminale Restriktionsfragment (t-RF)-Listen

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse der terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (t-RFLP) – Analyse in Listen aufgeführt. Die detektierten terminalen Restriktionsfragmente (t-RF) sind in der Reihenfolge der Messung wiedergegeben. Die Retentionszeit ist in der Originalzeit ("gemessen") und mit vereinheitlichten Startzeiten ("berechnet") dargestellt. Grau unterlegt sind die Fragmente des Größenstandards, wobei die Angabe der Fragmentgröße in Basenpaaren (bp) erfolgt. Erklärungen zum Meßverfahren sind im Kapitel Material und Methoden (vgl. B.12) zusammengefaßt.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,41	0,04	5190	16687
2		13,76	0,39	717	2348
3	70	13,8	0,43	5318	17031
4		13,98	0,61	1087	4951
5		14,03	0,66	3697	17263
6		14,1	0,73	471	2149
7		14,18	0,81	987	2583
8	80	14,23	0,85	5218	18259
9		14,23	0,87	2660	12113
10	90	14,65	1,28	4785	15057
11	100	15,09	1,72	5090	18632
12		15,36	2,19	526	1661
13		15,59	2,22	715	2431
14		15,68	2,31	832	2561
15		15,75	2,38	483	1356
16		15,9	2,43	694	1927
17		15,86	2,49	561	1630
18	120	15,96	2,53	5904	23034
19		16,06	2,56	859	3000
20		16,8	2,58	1034	3983
21		15,97	2,6	982	4523
22		16,1	2,73	3415	15321
23	140	16,84	3,47	5157	19756
24	160	17,83	4,46	4407	18929
25		17,78	4,5	2835	29654
26		17,95	4,58	5216	22180
27	180	18,8	5,43	4885	23824
28	190	19,3	5,93	4377	22926
29	200	19,8	6,43	4397	26607
30	220	20,85	7,48	4089	24558
31	240	21,88	8,51	4225	33394
32	260	22,96	9,59	3753	28093
33	280	24,07	10,7	3773	29158
34	300	25,19	11,82	3531	28904
35	320	26,31	12,94	3515	30883
36	340	27,45	14,08	3206	30056
37	360	28,61	15,24	2706	25944
38	380	29,76	16,39	2582	30181
39	400	30,92	17,55	3028	30433
40	420	32,11	18,74	2413	24474

t-RF-Liste der nicht inokulierten Kontrolle, 2 Stunden nach Versuchsbeginn.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,16	0	7244	24989
2		13,5	0,34	989	3152
3	70	13,54	0,38	7743	24698
4		13,77	0,61	7739	35672
5		13,84	0,68	22524	104387
6		13,92	0,75	3695	17037
7		13,96	0,8	19131	88751
8	80	13,97	0,83	8065	28904
9		14	0,84	7988	21345
10	90	14,37	1,21	7136	22339
11	100	14,81	1,65	7793	28428
12		15,38	2,18	2136	17625
13		15,39	2,23	2604	21633
14		15,48	2,32	5011	41597
15		15,54	2,38	3265	10823
16		15,62	2,43	2981	7623
17		15,64	2,48	4678	13283
18	120	15,66	2,51	8830	35843
19		15,68	2,52	6146	50707
20		15,71	2,55	2454	10474
21		15,76	2,6	2823	15136
22		15,9	2,74	3125	12345
23	140	16,52	3,37	7568	32693
24	160	17,5	4,35	6513	27897
25		17,68	4,52	3127	14862
26		17,73	4,57	3319	15009
27	180	18,45	5,31	7241	35434
28	190	18,93	5,8	6250	33039
29	200	19,42	6,29	6396	39827
30	220	20,45	7,32	5832	35424
31	240	21,48	8,33	6142	48100
32	260	22,51	9,4	5448	41373
33	280	23,59	10,48	5707	43804
34	300	24,68	11,58	5242	43147
35	320	25,78	12,69	5449	47112
36	340	26,89	13,8	4937	45175
37	360	28,03	14,94	4253	39644
38	380	29,15	16,07	3854	44099
39	400	30,28	17,21	4888	46447
40	420	31,44	18,37	3750	35344

t-RF-Liste der nicht inokulierten Kontrolle, 6 Stunden nach Versuchsbeginn.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,16	0	7244	24989
2		13,5	0,34	989	3152
3	70	13,54	0,38	7743	24698
4		13,77	0,61	7739	35672
5		13,84	0,68	22524	104387
6		13,92	0,76	3695	17037
7		13,96	0,8	19131	88751
8	80	13,97	0,82	8065	28904
9		14	0,84	6374	25481
10	90	14,37	1,21	7136	22339
11	100	14,81	1,65	7793	28428
12		15,35	2,19	2136	17625
13		15,38	2,22	2604	21633
14		15,47	2,31	5011	41597
15		15,54	2,38	3183	24316
16		15,58	2,42	4362	33561
17		15,62	2,46	5892	47652
18	120	15,66	2,5	8830	38843
19		15,75	2,52	6146	50707
20		15,89	2,56	2454	10474
21		15,75	2,59	3651	27465
22		15,89	2,73	4567	40238
23	140	16,52	3,36	7568	32693
24	160	17,5	4,34	6513	27897
25		17,67	4,51	7132	21351
26		17,73	4,57	6892	39561
27	180	18,45	5,29	7241	35434
28	190	18,93	5,77	6250	33039
29	200	19,42	6,26	6396	39827
30	220	20,45	7,29	5832	35424
31	240	21,46	8,3	6142	48100
32	260	22,51	9,35	5448	41373
33	280	23,59	10,43	5707	43804
34	300	24,68	11,52	5242	43147
35	320	25,78	12,62	5449	47112
36	340	26,89	13,73	4937	45175
37	360	28,03	14,87	4253	39644
38	380	29,15	15,99	3854	44099
39	400	30,28	17,12	4888	46447
40	420	31,44	18,28	3750	35344

t-RF-Liste der nicht inokulierten Kontrolle, 6 Stunden nach Versuchsbeginn.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,03	0,04	11649	40099
2		13,36	0,37	1596	5326
3	70	13,41	0,42	11287	37184
4		13,62	0,63	2191	8246
5		13,66	0,67	3566	13651
6		13,7	0,71	11651	44279
7		13,78	0,79	1917	7107
8	80	13,83	0,84	11956	41497
9		13,83	0,85	6687	25603
10	90	14,23	1,24	10450	32531
11	100	14,66	1,67	11793	43435
12		15,18	2,19	783	2918
13		15,23	2,24	4176	16257
14		15,32	2,33	764	3120
15		15,37	2,38	1571	6256
16		15,42	2,43	2026	8378
17		15,47	2,48	4818	19330
18	120	15,51	2,52	13865	52928
19		15,52	2,53	1207	4814
20		15,56	2,57	1734	6926
21		15,6	2,61	4307	17154
22		15,73	2,74	886	3853
23	140	16,37	3,38	11693	49810
24	160	17,33	4,34	9907	42078
25		17,51	4,52	1638	8796
26		17,56	4,57	931	5110
27	180	18,28	5,29	11102	53246
28	190	18,76	5,77	9698	49638
29	200	19,25	6,26	9926	60912
30	220	20,26	7,27	8749	52080
31	240	21,27	8,28	9041	71462
32	260	22,32	9,33	8223	62119
33	280	23,39	10,4	8139	63387
34	300	24,48	11,49	7349	61786
35	320	25,58	12,59	7420	66064
36	340	26,69	13,7	6789	61763
37	360	27,82	14,83	5761	55730
38	380	28,94	15,95	5147	62070
39	400	30,08	17,09	6607	64579
40	420	31,24	18,25	4991	51092

t-RF-Liste der nicht inokulierten Kontrolle, 1 Woche nach Versuchsbeginn.

Anhang

Peak-Nr.	Fragmentgröße gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,3	5828	21436
2		13,64	649	2311
3	70	13,68	6006	20866
4		13,9	1209	4671
5		13,94	1415	5523
6		13,98	4715	18356
7		14,06	978	3858
8		14,1	4364	17495
9	80	14,11	6152	23111
10	90	14,51	5856	20214
11	100	14,94	6181	23698
12		15,4	1141	4223
13		15,49	3892	16541
14		15,58	2856	12280
15		15,64	1540	6468
16		15,69	2648	11916
17		15,74	4623	18492
18	120	15,79	7153	28852
19		15,86	1860	8551
20		15,88	1302	4892
21		16,53	2190	8760
22	140	16,66	6441	24324
23	160	17,64	5630	22861
24		17,76	5821	29105
25		17,82	6313	26531
26	180	18,6	6197	28375
27	190	19,09	5755	27848
28	200	19,59	5685	29117
29	220	20,62	5409	29728
30	240	21,64	5388	40307
31	260	22,71	941	4894
32	280	23,8	10,5	4871
33	300	24,9	11,6	4597
34	320	26,02	12,72	4584
35	340	27,14	13,84	4227
36	360	28,29	14,99	3473
37	(363)	28,85	15,55	34470
38	380	29,42	16,12	3208
39	400	30,57	17,27	3997
40	420	31,74	18,44	2980

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG44 inokulierten Probe, 2 Stunden nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,12	5205	17922
2		13,45	644	2173
3	70	13,5	5294	17853
4		13,72	3855	17192
5		13,79	11397	51265
6		13,86	2192	9850
7		13,91	10103	46592
8		13,91	0,79	58185
9	80	13,91	5536	18269
10	90	14,32	5480	16831
11	100	14,74	5399	19265
12		15,23	3869	13789
13		15,31	1215	10263
14		15,4	3247	27200
15		15,46	3332	29988
16		15,55	2983	23864
17		15,55	4376	28326
18	120	15,59	6375	24376
19		15,68	3891	32662
20		15,81	1557	6343
21		16,35	2731	8839
22	140	16,44	5696	23327
23	160	17,41	4912	19553
24		17,58	1805	8905
25		17,63	1193	5784
26	180	18,35	5503	25182
27	190	18,83	4909	23545
28	(199)	19,23	997	5157
29	200	19,31	6,19	4848
30	220	20,32	4424	25261
31	240	21,32	8,2	34830
32	260	22,37	9,25	29716
33	280	23,43	10,31	30744
34	300	24,51	11,39	3905
35	320	25,6	12,48	33764
36	340	26,69	13,57	33422
37	360	27,81	14,69	29166
38	(363)	28,66	15,54	29832
39	380	28,91	15,79	31954
40	400	30,03	16,91	34869
41	420	31,17	18,05	26301

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG44 inokulierten Probe, 6 Stunden nach der Inokulation.

Anhang

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	13,05	0	8275	27320
2		13,39	0,34	958	3278
3	70	13,43	0,38	8185	27247
4		13,65	0,6	3417	14586
5		13,67	0,62	11850	50691
6		13,73	0,68	1625	6909
7		13,8	0,75	9043	38410
8		13,84	0,79	9525	40448
9	80	13,85	0,81	8749	30560
10	90	14,26	1,21	7948	25859
11	100	14,69	1,64	8311	30948
12		15,2	2,1	2033	8964
13		15,26	2,21	13118	56921
14		15,33	2,28	1701	7391
15		15,4	2,35	3689	16278
16		15,45	2,4	3381	14646
17		15,5	2,45	10409	45741
18	120	15,54	2,49	9405	38557
19		15,63	2,58	8559	37180
20		15,76	2,65	2082	9869
21		16,29	3,24	4392	15196
22	140	16,4	3,35	8239	35175
23	160	17,37	4,32	7221	31144
24		17,54	4,49	6217	32122
25		17,59	4,54	5428	27734
26	180	18,31	5,26	7808	39489
27	190	18,79	5,74	6867	36874
28	(199)	19,18	6,13	5834	20185
29	200	19,28	6,23	7084	42567
30	220	20,29	7,24	6641	39396
31	240	21,29	8,24	6815	52885
32	260	22,34	9,29	6093	45079
33	280	23,41	10,36	6197	47362
34	300	24,49	11,44	5940	48199
35	320	25,57	12,52	6033	52301
36	340	26,67	13,62	5559	50982
37	360	27,79	14,74	4885	45136
38	(363)	28,6	15,55	5153	17830
39	380	28,9	15,85	4098	47851
40	400	30,03	16,98	5341	51694
41	420	31,17	18,12	3964	39170

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG44 inokulierten Probe, 24 Stunden nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Größe	Peak-Fläche
1	60	12,93	0	6103	19213
2		12,73	0,34	5734	18350
3	70	13,29	0,36	6072	18994
4		13,5	0,57	3841	14633
5		13,54	0,61	5439	19849
6		13,58	0,65	19556	71276
7		13,66	0,73	3146	11832
8		13,71	0,78	12939	48028
9	80	13,71	0,8	6565	21666
10	90	14,1	1,17	5958	18149
11	100	14,53	1,6	6287	21467
12		15,03	2,1	2320	7617
13		15,08	2,19	33156	107357
14		15,23	2,29	2650	8825
15		15,27	2,34	3726	13005
16		15,31	2,38	12899	43669
17		15,36	2,43	5782	20006
18	120	15,39	2,46	7578	26829
19		15,45	2,56	9896	34307
20		15,58	2,65	2593	9891
21		16,17	3,24	1223	4338
22	140	16,21	3,28	6564	22652
23	160	17,15	4,22	5752	21516
24		17,32	4,49	10386	39966
25		17,37	4,53	8431	31989
26	180	18,08	5,15	6306	27318
27	190	18,56	5,63	5418	25180
28	(199)	18,99	6,11	971	4600
29	200	19,04	6,14	5772	27708
30	220	20,03	7,1	5173	27292
31	240	21,02	8,09	5365	37274
32	260	22,05	9,12	4787	31704
33	280	23,1	10,17	4770	33591
34	300	24,17	11,24	4436	32893
35	320	25,24	12,31	4588	36438
36	340	26,33	13,4	4010	33511
37	360	27,44	14,51	3469	30517
38	(363)	28,49	15,56	788	6920
39	380	28,55	15,62	2992	26256
40	400	29,65	16,72	3806	34252
41	420	30,78	17,85	2915	26902

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG44 inokulierten Probe, 1 Woche nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit		Peak-Größe	Peak-Fläche
		gemessen	berechnet		
1	60	13,12	0	6674	22698
2		13,24	0,12	595	2328
3		13,45	0,33	812	2764
4	70	13,5	0,38	6674	22853
5		13,75	0,63	1471	5808
6		13,79	0,67	5673	21456
7		13,87	0,75	797	3016
8	80	13,91	0,79	6952	23153
9		13,92	0,82	4090	15554
10	90	14,32	1,2	6523	21150
11	100	14,75	1,63	6992	25129
12		15,26	2,14	526	1928
13		15,32	2,2	3065	11370
14		15,46	2,34	829	3402
15		15,51	2,39	1331	5516
16		15,56	2,44	3740	15287
17	120	15,6	2,48	8158	30607
18		15,64	2,52	1140	4680
19		15,69	2,57	3188	13193
20		15,82	2,7	764	2421
21		16,42	3,3	1365	5095
22	140	16,46	3,4	7262	26369
23	160	17,42	4,3	6364	24204
24		17,59	4,57	1919	8431
25		17,65	4,63	1204	5440
26	180	18,36	5,24	7263	31398
27	190	18,85	5,73	6278	28836
28	200	19,33	6,31	6305	33660
29	220	20,35	7,23	5896	30988
30	240	21,35	8,23	6052	42581
31	260	22,41	9,29	5455	36628
32	280	23,48	10,36	5393	37767
33	300	24,57	11,45	5040	38813
34	320	25,67	12,55	5164	41681
35	340	26,77	13,65	4750	41242
36	360	27,91	14,79	3948	35494
37	(363)	28,52	15,43	2778	29399
38	380	29,03	15,91	3694	41514
39	400	30,16	17,04	4678	43231
40	420	31,32	18,2	3412	32966

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokulierten Probe, 2 Stunden nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit		Peak-Größe	Peak-Fläche
		gemessen	berechnet		
1	60	13,13	0,04	5207	17712
2		13,24	0,11	595	2328
3		13,47	0,34	655	2048
4	70	13,51	0,42	5515	17357
5		13,73	0,64	2059	8441
6		13,81	0,72	9312	38192
7		13,88	0,78	1317	5388
8		13,9	0,81	6936	28391
9	80	13,91	0,82	5560	17714
10		13,93	0,84	6340	25462
11	90	14,34	1,25	5001	15582
12	100	14,77	1,68	5530	19180
13		15,29	2,2	1217	5078
14		15,35	2,26	7112	29557
15		15,42	2,33	1278	5403
16		15,49	2,4	2531	10505
17		15,54	2,45	2614	10891
18		15,59	2,5	8283	35568
19	120	15,63	2,54	6604	24335
20		15,67	2,58	2426	10129
21		15,72	2,63	6897	29214
22		15,86	2,77	1748	6757
23		16,46	3,33	1093	3814
24	140	16,5	3,41	5739	20639
25	160	17,47	4,38	4846	18509
26		17,64	4,55	4339	19846
27		17,69	4,6	2869	13029
28	180	18,41	5,32	5660	24714
29	190	18,9	5,81	4722	22550
30	(199)	19,41	6,28	5329	27845
31	200	19,39	6,3	4845	27474
32	220	20,42	7,33	4539	24767
33	240	21,42	8,33	4630	33250
34	260	22,48	9,39	4018	28819
35	280	23,56	10,47	4056	30519
36	300	24,66	11,57	3729	29672
37	320	25,76	12,67	3943	32512
38	340	26,87	13,78	3540	31130
39	360	28,01	14,92	2984	27312
40	(363)	28,52	15,43	2778	29399
41	380	29,13	16,04	2636	30408
42	400	30,27	17,18	3376	31815
43	420	31,43	18,34	2525	23986

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokulierten Probe, 6 Stunden nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Große	Peak-Fläche
1	60	13,11	0	3492	11744
2		13,34	0,12	595	2328
3		13,44	0,33	425	1382
4	70	13,49	0,38	3397	11322
5		13,73	0,62	1104	4719
6		13,78	0,67	3660	15516
7		13,86	0,75	564	2393
8		13,9	0,79	2688	11441
9	80	13,91	0,8	3347	11396
10		13,93	0,82	4136	17315
11	90	14,31	1,2	3118	10184
12	100	14,74	1,63	3286	11835
13		15,26	2,15	280	982
14		15,32	2,21	1997	7338
15		15,47	2,36	552	2380
16		15,51	2,4	715	3186
17		15,56	2,45	2183	9553
18		15,59	2,48	1230	4956
19	120	15,6	2,49	4174	15381
20		15,64	2,53	652	2814
21		15,69	2,58	1832	7897
22		15,83	2,72	427	2034
23		16,43	3,32	636	2376
24	140	16,47	3,36	3566	13221
25	160	17,44	4,33	3242	12257
26		17,61	4,5	1008	4993
27		17,67	4,65	727	3511
28	180	18,39	5,28	3309	15251
29	190	18,88	5,77	2974	14421
30	(199)	19,37	6,26	788	4532
31	200	19,39	6,28	2980	17142
32	220	20,4	7,29	2801	15487
33	240	21,41	8,3	2726	21016
34	260	22,47	9,36	2456	18151
35	280	23,55	10,44	2489	18932
36	300	24,66	11,55	2269	18972
37	320	25,76	12,65	2326	19872
38	340	26,88	13,77	2134	19773
39	360	28,03	14,92	1834	17104
40		28,52	15,42	2778	29399
41	380	29,16	16,05	1569	18101
42	400	30,31	17,2	2012	19059
43	420	31,49	18,38	1614	15492

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokulierten Probe, 24 Stunden nach der Inokulation.

Peak-Nr.	Fragmentgröße	Retentionszeit gemessen	Retentionszeit berechnet	Peak-Große	Peak-Fläche
1	60	13,22	0	1356	4235
2		13,24	0,12	595	2328
3		13,48	0,33	655	2048
4	70	13,61	0,39	1284	3839
5		13,85	0,63	731	2012
6		13,91	0,69	538	1619
7		13,97	0,75	280	868
8		14,02	0,8	581	1859
9	80	14,04	0,82	1300	3943
10		14,04	0,83	281	830
11	90	14,44	1,22	1227	3641
12	100	14,88	1,66	1347	4695
13		15,4	2,18	1225	3948
14		15,46	2,24	231	747
15		15,56	2,34	567	1916
16		15,62	2,4	635	2063
17		15,66	2,44	1003	3811
18		15,7	2,48	728	2402
19	120	15,74	2,52	1605	5771
20		15,84	2,62	204	614
21		15,97	2,75	310	1054
22		16,53	3,31	248	843
23		16,58	3,36	255	867
24	140	16,62	3,4	1421	4639
25	160	17,6	4,38	1301	4533
26		17,78	4,56	493	1737
27		17,83	4,61	415	1525
28	180	18,56	5,34	1511	5958
29	190	19,05	5,83	1289	5287
30	(199)	19,5	6,28	236	975
31	200	19,55	6,33	1392	5761
32	220	20,58	7,36	1164	5696
33	(238)	21,56	8,34	278	1469
34	240	21,61	8,39	1183	6319
35	260	22,68	9,46	1009	6814
36	280	23,77	10,55	1065	6964
37	300	24,88	11,66	1026	7128
38	320	26	12,78	1018	7731
39	340	27,13	13,91	913	7590
40	360	28,29	15,07	770	6607
41	(363)	28,52	15,44	2778	29399
42	380	29,44	16,22	683	7165
43	400	30,6	17,38	766	6503
44	420	31,79	18,57	572	5137

t-RF-Liste der mit dem AHL-produzierenden Wildtypstamm *Serratia liquefaciens* MG1 inokulierten Probe, 1 Woche nach der Inokulation.

G.2 U-Test nach Whitney und Mann

Tabelle G.2a: U-Tabelle zur Auswertung; zweiseitiger Test: $\alpha=0,050$ (vgl. B.8.2);

n ₁	n ₂																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-																			
2	-	-																		
3	-	-	-																	
4	-	-	-	0																
5	-	-	0	1	2															
6	-	-	1	2	3	5														
7	-	-	1	3	5	6	8													
8	-	0	2	4	6	8	10	13												
9	-	0	2	4	7	10	12	15	17											
10	-	0	3	5	8	11	14	17	20	23										
11	-	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30									
12	-	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37								
13	-	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45							
14	-	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55						
15	-	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64					
16	-	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75				
17	-	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87			
18	-	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99		
19	-	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	
20	-	2	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127
21	-	3	8	15	22	29	36	43	50	58	65	73	80	88	96	103	111	119	126	134
22	-	3	9	16	23	30	38	45	53	61	69	77	85	93	101	109	117	125	133	141
23	-	3	9	17	24	32	40	48	56	64	73	81	89	98	106	115	123	132	140	149
24	-	3	10	17	25	33	42	50	59	67	76	85	94	102	111	120	129	138	147	156
25	-	3	10	18	27	35	44	53	62	71	80	89	98	107	117	126	135	145	154	163
26	-	4	11	19	28	37	46	55	64	74	83	93	102	112	122	132	141	151	161	171
27	-	4	11	20	29	38	48	57	67	77	87	97	107	117	127	137	147	158	168	178
28	-	4	12	21	30	40	50	60	70	80	90	101	111	122	132	143	154	164	175	186
29	-	4	13	22	32	42	52	62	73	83	94	105	116	127	138	149	160	171	182	193
30	-	5	13	23	33	43	54	65	76	87	98	109	120	131	143	154	166	177	189	200
31	-	5	14	24	34	44	56	67	78	90	101	113	125	136	148	160	172	184	196	208
32	-	5	14	24	35	46	58	69	81	93	105	117	129	141	153	166	178	190	203	215
33	-	5	15	25	37	48	60	72	84	96	108	121	133	146	159	171	184	197	210	222
34	-	5	15	26	38	50	62	74	87	99	112	125	138	151	164	177	190	203	217	230
35	-	6	16	27	39	51	64	77	89	103	116	129	142	156	169	183	196	210	224	237
36	-	6	16	28	40	53	66	79	92	106	119	133	147	161	174	188	202	216	231	245
37	-	6	17	29	41	55	68	81	95	109	123	137	151	165	180	194	209	223	238	252
38	-	6	17	30	43	56	70	84	98	112	127	141	156	170	185	200	215	230	245	259
39	0	7	18	31	44	58	72	86	101	115	130	145	160	175	190	206	221	236	252	267
40	0	7	18	31	45	59	74	89	103	119	134	149	165	180	196	211	227	243	258	274

Kapitel	Vergleich der	U ₁	U ₂	U _{Vers}	U _{Tab}	Ergebnis	Nullhypothese	Der Unterschied ist			
								signifikant	nicht signifikant		
C.2.1	Siedlungsdichte im AS										
		MG1: 6Stunden zu 1 Tag	20	4	4	5	$U_{Vers} < U_{Tab}$	abgelehnt	ja	nein	
		MG1: 1 Tag zu 1 Woche	18	6	6	5	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
		MG44: 6 Stunden zu 1 Tag	21	3	3	5	$U_{Vers} < U_{Tab}$	abgelehnt	ja	nein	
		MG44: 1 Tag zu 1 Woche	16	8	8	5	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
		MG1 zu MG44 (6 Stunden)	15	9	9	5	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
		MG1 zu MG44 (1 Tag)	18	6	6	5	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
		MG1 zu MG44 (1 Woche)	17	7	7	5	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
		C.2.2	Siedlungsdichte im BS								
				MG1: 6Stunden zu 1 Tag	14	2	2	3	$U_{Vers} < U_{Tab}$	abgelehnt	ja
MG1: 1 Tag zu 1 Woche	13			3	3	3	$U_{Vers} = U_{Tab}$	abgelehnt	ja	nein	
MG44: 6 Stunden zu 1 Tag	13			3	3	3	$U_{Vers} = U_{Tab}$	abgelehnt	ja	nein	
MG44: 1 Tag zu 1 Woche	15			1	1	3	$U_{Vers} < U_{Tab}$	abgelehnt	ja	nein	
MG1 zu MG44 (6 Stunden)	9			7	7	3	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
MG1 zu MG44 (1 Tag)	10			6	6	3	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	
MG1 zu MG44 (1 Woche)	9			7	7	3	$U_{Vers} > U_{Tab}$	nicht abgelehnt	nein	ja	

Tabelle G.2b: U-Test zur Bestimmung der Signifikanz zweier Stichproben. Das Verfahren zur Durchführung des U-Tests ist in Kapitel B.8 beschrieben. Inokulierte Rhizosphäre mit MG1 = *Serratia liquefaciens* MG1; MG44 = *Serratia liquefaciens* MG44; Zeitangabe nach der Inokulation; U_{Tab} = Wert der Tabelle G.2a entnommen; Verwendetes Pflanzensystem: AS = axenisches System; BS = Bodensystem.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all jenen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt mitzuwirken und für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Betreuung meiner Dissertation.
- Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Herrn Dr. Michael Schmid für seine Unterstützung und Hilfestellung bei großen und kleinen Problemen.
- Den Projektmitarbeitern für die guten und anregenden Diskussionen und den steten Wissensaustausch, besonders Herrn PD. Dr. Christian Langebartels (BIOP, GSF-Neuherberg) für die Bereitstellung der Klimakammern und Herrn PD. Dr. Leo Eberl (TU-München) für die Überlassung der Versuchstämme, sowie meinen ehemaligen Mitstreiterinnen Regina Schuegger und Anette Steidle für die gegenseitige Hilfe bei der Bewältigung anstehender Arbeiten.
- Meiner Diplomandin Christine Dürr für ihre Begeisterungsfähigkeit und ihrem Beitrag an den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Frank B. Dazzo (Michigan State University, USA) für die gute interkontinentale Zusammenarbeit bei der Analyse bakterieller Kommunikation.
- Den Teamkollegen unserer AG: Michael Rothballer, Draženka Selesi, Stefan Kutter, Susanne Stein, Linda Kinzel, Ilona Klein, Isabelle Pattis, Angelika Schulz und Dr. Bernhard Ruth für den guten Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung bei allen Höhen und Tiefen des Laboralltags.
- Herrn Dr. Peter Hutzler und Herrn Ernst Mannweiler (PATH, GSF-Neuherberg) für ihre Hilfe bei der Nutzung des konfokalen Laser Scanning Mikroskops.
- Herrn PD. Dr. Jerzy Adamski (IEG, GSF-Neuherberg) für die Bereitstellung des automatischen Sequenzierapparates zur Erstellung der t-RFLP-Analysen, sowie seinen Mitarbeitern für Hilfestellungen.
- Der Firma Beckmann für die schnelle und kostenlose Hilfe bei der Behebung technischer Probleme des Sequenzierers bei der t-RFLP-Analyse.
- Allen Mitarbeitern des Institutes und der GSF für jede Form ihrer Unterstützung besonders auf dem "kleinen Dienstweg".
- Und vor allem meinen Eltern, die mich in meinem bisherigen Lebensweg bestärkten.



Lebenslauf

(tabellarisch)

- 1970, 8.7. geboren in Ratingen
(Nordrhein-Westfalen)
- 1990, 28.5. Abitur am Gymnasium in Übach-Palenberg
(Nordrhein-Westfalen)
- 1990, 1.7. Bundeswehr
- 1991, 30.6.
- 1991, 1.10. Ausbildung zum Biologisch Technischen Assistenten
- 1993, 6.7. (BTA) an Rheinischen Akademie zu Köln
(Nordrhein-Westfalen)
- 1993, 1.10. Beginn des Hochschulstudiums der Biologie an der
Universität zu Köln (Nordrhein-Westfalen)
- 1995, 4.10. Vordiplom der Biologie
Beginn des Hauptstudiums
- 1996, 1.10. Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
(Baden-Württemberg)
- 1999, 15.4. Diplom der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität zu
Tübingen Titel der Diplomarbeit: "Identifizierung und
Charakterisierung von Benzol-toleranten Bakterien"
- 2000, 1.1. Beginn der Promotion in Biologie an der Ludwigs-
Maximilians-Universität zu München (Bayern) mit dem
Titel: "Mikrobielle Ökologie *N*-Acyl-L-Homoserinlacton-
produzierender Bakterien in der Rhizosphäre von
Tomatenpflanzen".
Die Arbeit wurde an der GSF - Forschungszentrum für
Umwelt und Gesundheit am Institut für Bodenökologie
angefertigt.