

# Molekulare Analyse diazotropher Bakterien in Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*)

Doreen Fischer

September 2010

Helmholtz Zentrum München  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt  
Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Gutachter:	<b>Prof. Dr. Anton Hartmann</b>
2. Gutachter:	<b>Prof. Dr. Dirk Schüler</b>
Eingereicht am	16.09.2010
Tag der mündlichen Prüfung	28.03.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
2.1	<i>Saccharum officinarum</i> . . . . .	1
2.1.1	Bedeutung . . . . .	1
2.1.2	Historisches . . . . .	2
2.1.3	Beschreibung der Pflanze und Agronomie . . . . .	3
2.2	Biologische Stickstofffixierung . . . . .	5
2.2.1	Die Nitrogenase-Reaktion . . . . .	5
2.2.2	Landwirtschaftliche Bedeutung der Stickstofffixierung . . . . .	8
2.3	Diazotrophe Bakterien . . . . .	11
2.3.1	<i>Alpha-Proteobacteria</i> . . . . .	13
2.3.2	<i>Beta-Proteobacteria</i> . . . . .	16
2.4	Molekulare Analyse der Mikroflora . . . . .	18
2.5	Aufgabe- und Zielstellung dieser Arbeit . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	Probenmaterial . . . . .	22
3.1.1	Untersuchte Proben . . . . .	22
3.1.2	Inokulationsexperiment . . . . .	25
3.2	Extraktion von Nukleinsäuren . . . . .	26
3.3	Qualitative und quantitative Analyse des DNA/RNA-Gehaltes . . . . .	27
3.4	Reverse Transkription und Erzeugung von cDNA . . . . .	27
3.5	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	28
3.5.1	Gradienten-PCR . . . . .	30
3.5.2	Touch-Down-PCR . . . . .	31
3.5.3	Nested-PCR . . . . .	31
3.5.4	PCR für die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese . . . . .	31
3.5.5	Kolonie-PCR . . . . .	32
3.6	Aufreinigung von PCR-Produkten . . . . .	32
3.7	Horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese . . . . .	32
3.8	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse . . . . .	33
3.9	Klonierung von Gen-Fragmenten . . . . .	34
3.10	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	34

3.11	Sequenzierung von Gen-Fragmenten . . . . .	34
3.12	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) . . . . .	34
3.13	Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten . . . . .	36
3.14	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung . . . . .	37
3.14.1	CARD-FISH . . . . .	40
3.15	Detektion der stickstofffixierenden Bakterien mittels Immunofluoreszenz . . . . .	41
3.16	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1	Molekularbiologische Analyse . . . . .	44
4.1.1	Nukleinsäure-Extraktion . . . . .	44
4.1.2	Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	44
4.1.3	16S-rDNA Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (R-FLP) - Analyse der bei der Klonierung erhaltenen Insertionen . . . . .	46
4.2	Experimenteller Ablauf . . . . .	48
4.3	Phylogenetische Analyse der 16S-rRNA Gene der bakteriellen Gemein- schaft (Klonbank-Analysen) . . . . .	48
4.3.1	Phylogenetische Analyse der pflanzenassoziierten bakteriellen Ge- meinschaft im Tankversuch . . . . .	48
4.3.2	Phylogenetische Analyse der aktiven Pflanzen-assoziierter bak- teriellen Gemeinschaft im Gewächshausversuch . . . . .	60
4.3.3	Phylogenetische Analyse der Pflanzen-assoziierter bakteriellen Gemeinschaft im Feldversuch . . . . .	64
4.3.4	Rarefaction-Analyse der analysierten Proben . . . . .	80
4.4	16S-rRNA Analyse der bakteriellen Diversität ausgewählter diazotro- pher Bakterien . . . . .	84
4.4.1	Klondatenbank-Analysen der bakteriellen Diversität ausgewähl- ter diazotropher $\alpha$ - und $\beta$ -Proteobakterien . . . . .	84
4.4.2	Fingerprint-Analyse der 16S-rRNA . . . . .	97
4.5	Phylogenetische Analyse der <i>nifH</i> -cDNA in den Zuckerrohrpflanzen . .	100
4.5.1	<i>nifH</i> -Klondatenbank-Analysen . . . . .	100
4.5.2	Rarefaction-Analyse der <i>nifH</i> -Klondatenbanken . . . . .	107
4.6	Detektion und Lokalisierung Pflanzen-assoziierter Bakterien <i>in situ</i> . . . . .	109
4.6.1	Detektion und Lokalisierung Pflanzen-assoziierter Bakterien mittels FISH . . . . .	109
4.6.2	Detektion und Lokalisierung wurzelassoziierter Bakterien mittels CARD-FISH . . . . .	114

4.6.3	Detektion und Lokalisierung wurzellozozierter stickstofffixierender Bakterien mittels Immunofluoreszenz (Nitrogenase-Antikörper)	116
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>120</b>
5.1	Methodische Limitierungen und Problemlösung	120
5.1.1	Nukleinsäure-Extraktion	120
5.1.2	Reverse Transkription von RNA zu cDNA	123
5.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	124
5.1.4	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)	130
5.1.5	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	132
5.1.6	Catalyzed Reporter Deposition-FISH (CARD-FISH)	135
5.1.7	Detektion von Nitrogenase mittels Immunofluoreszenz	136
5.2	Besiedlung von Zuckerrohr mit Bakterien - bisherige Kenntnisse und neue Einsichten basierend auf molekularen Analysen dieser Arbeit	137
5.2.1	Molekulare Analyse der Diversität Zuckerrohr-assoziiierter diazotropher Bakterien	137
5.2.2	Etablierung der inokulierten Bakterien in Zuckerrohr	143
5.2.3	Vergleich der molekularbiologischen Analysen dieser Arbeit mit publizierten Daten ähnlicher Experimente	146
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>178</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>179</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	mikro (SI-Einheit)
a	Jahr
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
ca.	<i>circa</i>
CARD	Catalized Reporter-Deposition
CFU	Colony Forming Unit
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
Cy3	5, 5'-Disulfo-1, 1'-( $\gamma$ -carbopentynyl)-3, 3, 3', 3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N-hydroxysuccinimidester
d	Tag
Da	Dalton
DEPC	Diethyl dicarbonat
dest.	destilliert
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	absoluter Ethanol
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
Fluos	Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin
GC	mol% Guanin zu Cytosin
h	Stunde
H	Wasserstoff
ha	Hektar
$H_2O$	Wasser

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
Kan	Kanamycin
m	Meter, Masse
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	engl. messenger RNA
MQ	mehrfach destilliertes Wasser
N	Stickstoff
O	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OTU	Operational Taxonomic Unit
p.a.	<i>pro analysi</i> (Klassifikation der Reinheitsstufe von Chemikalien)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
POD	Meerrettich-Peroxidase
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
t	Tonne
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>N, N, N'N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tyramid-Signal-Amplifikation
U	Uracil
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl- $\beta$ -Galactosid
z.B.	zum Beispiel

## 2 Einleitung

### 2.1 *Saccharum officinarum*

#### 2.1.1 Bedeutung

Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) ist eine vornehmlich in den Subtropen und Tropen kultivierte Pflanze, die einen sehr hohen Zuckergehalt von 11-20 % in ihrem Mark speichern kann (LEXIKON, 2004). Dabei werden die bei der Photosynthese gewonnenen Monosaccharide Fruktose und Glukose in Disaccharide umgewandelt und gespeichert. Der nach der Ernte aus der Pflanze gewonnene Zuckersaft wird zur Herstellung von Speisezucker und in großem Maße für die Raffinierung von Bio-Ethanol genutzt. Beim klassischen Anbau von Zuckerrohr wird in den meisten Anbauländern eine große Menge an künstlichen, chemischen Düngern eingesetzt (bis zu 250 kg N/ha pro Jahr), da die verwendeten Zuckerrohr-Varietäten zum Einen sehr hohe Nährstoffansprüche stellen und zum Anderen sehr häufig auf kargen Böden kultiviert werden. Eine Ausnahme bildet dabei der Anbau in Brasilien, da hier Zuckerrohr-Varietäten mit relativ geringem Nährstoffbedarf angebaut werden. Daher ist hier die eingesetzte Menge an künstlichem Dünger mit ca. 60 kg N/ha bei der Pflanzung und 80-120 kg N/ha kurz vor der Reife geringer als in den meisten Anbaugebieten (REIS *et al.*, 2007; URQUIAGA *et al.*, 1992). Hierbei ist der Einfluss der Stickstoffdüngung sehr gering und zeigt nur bei Düngung direkt vor der Reifung der Pflanze positive Wirkung (CARNAUBA, 1990). Die Reduktion des Stickstoff-Düngers für die Produktion von Pflanzen wie Zuckerrohr, welche zur Produktion von Bio-Ethanol genutzt werden, repräsentiert den Schlüssel zu einer positiven Energiebilanz, da die Synthese synthetischen Düngers (Haber-Bosch-Verfahren) unter Nutzung von Erdgas abläuft. Die Energiebilanz stellt den Aufwand an Energie beim Anbau (inkl. Maschinen und Dünger) und der Prozessführung dem Gewinn an Energie in Form von z. B. Bioethanol gegenüber. Dabei ist der Anteil der biologischen Stickstofffixierung bei Zuckerrohr der höchste bei nicht zu der Familie *Fabaceae* gehörenden Pflanzen (REIS *et al.*, 2007). Langzeitstudien, die Messungen der Stickstoffbalance unter der Verwendung von modernen <sup>15</sup>N Isotopentechniken zum Inhalt haben, zeigten deutlich, dass bei bestimmten Zuckerrohr-Varietäten bis zu 70 % des Stickstoffs der Pflanze von Biologischer Stickstofffixierung (biological nitrogen fixation, BNF) stammen (URQUIAGA *et al.*, 1992). Die biologische Stickstofffixierung wird bei Zuckerrohr weltweit untersucht.

Um 1600 lag die Zuckerproduktion von Brasilien bei ca. 10000 t/a. Sie stieg bis Anfang 1900 nicht über 20000 t/a an (GALLOWAY, 1989). Um 1960 erreichte die Produktion 5 Mio t/a und stieg bis 1994 auf 10 Mio t/a an (BODDEY *et al.*, 2003). Die aktu-

elle weltweite Produktion von Saccharose liegt bei 120 Mio t/a, wobei 70 % davon aus Zuckerrohr stammen. Aus einer Tonne Zuckerrohr können 740 kg Zuckerrohrsaft gewonnen werden, aus dem sich 135 kg Saccharose gewinnen lassen. Die Saccharose kann in nachfolgenden Fermentationsschritten zu 70 l Ethanol pro Tonne Zuckerrohr verarbeitet werden. Durchschnittlich können pro Hektar Anbaufläche im Jahr 4000 l Ethanol gewonnen werden. Die Effizienz von Sonnenenergie zu Ethanol liegt bei 0,13 % ([www.en.wikipedia.org/wiki/Sugarcane](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Sugarcane)).

Brasilien ist der größte Produzent von Zuckerrohr weltweit. Eine detaillierte Übersicht zur weltweiten Produktion von Zuckerrohr im Jahr 2008 und zur Produktion von Bio-Ethanol (gesamt) ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tab. 1:** Weltweite Zuckerrohr- und Bio-Ethanolproduktion im Jahr 2008, Quellen: (<http://en.wikipedia.org/wiki/Sugarcane>) RFA, F.O. Licht 2008 Estimates, \*keine Angabe

Land	Produktion Zuckerrohr in Mio t	Menge Bio-Ethanol in Mio Gallonen
USA	28	9000,0
Brasilien	514	6472,2
EU	*	733,6
China	106	501,9
Kanada	*	237,7
andere	*	128,4
Thailand	64	89,8
Kolumbien	40	79,29
Indien	356	66,0
Australien	36	26,4

### 2.1.2 Historisches

Zuckerrohr ist eine ursprünglich in Neuguinea beheimatete Pflanze, die dort seit etwa 6000 v. Chr. angebaut wurde. Ab etwa 1000 v. Chr. wurde Zuckerrohr entlang der menschlichen Migrationsrouten nach Südostasien, Indien und dem östlichen Pazifik verbreitet. Im Laufe der Zeit wurde es vermutlich mit wildwachsendem Zuckerrohr von Indien und China gekreuzt, um dickere Stängel zu erhalten. Somit konnte die Ausbeute an Zuckerrohrsaft pro Pflanze erhöht werden. Die Ausbreitung von Zuckerrohr als Kulturpflanze in westlicher Richtung erfolgte in den Jahren 600-1400 n. Chr.. Während ihrer Eroberungszüge brachten die Araber das Zuckerrohr um 640 nach Ägypten, als sie in Gebiete um das Mittelmeer vorrückten, und trugen im Folgenden zur Verbreitung der Pflanze unter anderem in Syrien, auf Zypern und Kreta und in Spanien (um 715) bei. Um 1420 führten die Portugiesen die Pflanze in Madeira und bald darauf auf den Azoren, den Kanarischen Inseln und Westafrika ein. Christopher Kolumbus brachte Zuckerrohr 1493 in die heutige Dominikanische Republik, von wo aus es um

1520 nach Mittel- und Südamerika gelangte ([www.plantcultures.org/plants](http://www.plantcultures.org/plants)). Die erste Besiedlungs-Expedition 1532 brachte Zuckerrohr von Madeira nach Brasilien, die erste Zuckermühle wurde ein Jahr später in Sao Vincente im heutigen Staat Sao Paulo errichtet (MACHADO *et al.*, 1987).

Es wird vermutet, dass zunächst nur ein einziges Kultivar eingeführt wurde. Unter dem Namen *Creole* bzw. *Cana Criolla* wurde es in Lateinamerika bekannt. Dieses wurde mehr als 250 Jahre lang in der Neuen Welt angebaut, bis es Ende des 18. Jahrhunderts vom „edlen“ Kultivar *Otaheite* (Bourbon) abgelöst wurde ([www.nhm.ac.uk/jdsml/nature-online/seeds-of-trade](http://www.nhm.ac.uk/jdsml/nature-online/seeds-of-trade)). Mittlerweile existiert eine Reihe an kommerziellen infertilen Zuckerrohr-Hybriden, welche die ursprünglichen Varietäten längst verdrängt haben.

### 2.1.3 Beschreibung der Pflanze und Agronomie

Taxonomisch wird Zuckerrohr in die Familie der *Poaceae*, *Gramineae* (Süßgräser), in die Unterfamilie der *Panicoide*, eingeordnet. Zuckerrohrpflanzen erreichen eine Höhe von bis zu 6 m, einen Stängeldurchmesser von bis zu 5 cm (LEXIKON, 2004) und werden vornehmlich vegetativ vermehrt. Angebaute Pflanzen sind sog. Trispecies Hybride, sterile Varietäten, welche durch Kreuzung ertragsstarker und krankheitsresistenter Varietäten gewonnen wurden. Bekannte Krankheiten bei Zuckerrohr sind „Mottled Strip Disease“ hervorgerufen durch *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, „Leaf Scald“ (*Xanthomonas albilineans*), „Smut“ (*Ustilago scitaminea*), „Red Rot“ (*Collettrichum falcatum*), „Ratoon Stunting Disease“ (*Clavibacterium xyli*), „Rust“ (*Puccinia melanocephala*), „Yellow-Leaf Syndrome“ und „Sugarcane Mosaic Virus“. Manche der kommerziellen Hybride sind gegen Krankheiten resistent, wie z. B. SP70 4311 gegen die „Mottled Strip Disease“ (BODDEY *et al.*, 2003).

Bei dieser Tropenpflanze mit einem Wachstumsoptimum von 25 – 27 °C und einem hohen Wasserbedarf von 1200-1500 mm ([www.umweltlexikon-online.de](http://www.umweltlexikon-online.de)) handelt es sich um eine  $C_4$ -Pflanze mit einer sehr effizienten Nutzung der Sonnenenergie von 2 %.  $C_4$ -Pflanzen besitzen eine spezielle Adaption, um bei hohen Temperaturen effizient Photosynthese zu betreiben. Durch diese evolutionäre Anpassung ist es für die Pflanze möglich, dass - trotz geschlossener Stomata als Verdunstungsschutz - mittels Phosphoenolpyruvat(PEP)-Carboxylase geringste  $CO_2$ -Konzentrationen für die Photosynthese genutzt werden können. So können in einem tropischen Anbaugebiet auf einem Quadratmeter pro Erntezyklus 20 kg Biomasse gebildet werden.

Zuckerrohr wird heute insgesamt in etwa 110 Ländern weltweit kommerziell angebaut, Brasilien, Indien und China sind die Hauptproduzenten. Der Zuckerrohrsaft kann au-

ßer zur Bioethanol- und Saccharose-Gewinnung (durch Fermentation bzw. Konzentration) zur Herstellung von Cachaça, einem hochprozentigen Destillat aus fermentiertem Zuckerrohrsaft, verwendet werden. Die Melasse kann zur Herstellung von Rum genutzt werden. Zuckerrohr zählt zu den „umweltfreundlichsten“ Energiepflanzen, da zudem die Bagasse als Nebenprodukt der Zuckersaft-Gewinnung entsteht, welche vielfältig eingesetzt werden kann. Bagasse besteht zu 40-60 % aus Cellulose, zu 20-30 % aus Hemicellulose und zu 20 % aus Lignin ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)). Zum Einen wird dieses „Abfallprodukt“, welches zu einem Teil von 34 % bei der Presseextraktion entsteht, zur Energiegewinnung durch Verbrennung genutzt, zum Anderen lässt es sich durch seinen geringen Lignin-Anteil als Futtermittel bzw. zur umweltfreundlichen Herstellung von Papier und Pappe verwenden.

Trotz der Möglichkeit, Zuckerrohr über Samen zu vermehren, wird industriell vornehmlich die vegetative Vermehrung über Stecklinge genutzt. Hierbei werden Stängel durchtrennt, sodass mindestens ein Knoten pro Stück vorhanden ist. Die so gewonnenen Stecklinge werden in das jeweilige Feld gelegt und mit Boden bedeckt. Die nach entsprechendem Wachstum bis zu 6 m hohe Pflanze kann mehrmals geerntet (alle 3-6 Monate, insgesamt ca. 8 Mal pro Anbau) und bis zu 20 Jahre alt werden. Der Prozess der Reife, die Speicherung von Disacchariden im Mark des Zuckerrohrstängels, erfolgt in der Pflanze von unten nach oben. Daher ist der Zuckergehalt an der Basis der Pflanze am höchsten. Zur Ernte, welche nur in wohlhabenderen Ländern und gut befahrbaren Gebieten maschinell abläuft, wird der Stängel knapp über dem Erdboden abgeschnitten. Aus den im Boden verbleibenden Knoten der Stecklinge entwickeln sich neue Sprosse (sog. ratoons). Bei der manuellen Ernte werden kurz zuvor die trockenen Blätter der Pflanzen abgebrannt und damit z. B. giftige Schlangen getötet, welche den Arbeitern gefährlich werden könnten. Der wasserreiche Teil der Pflanze (Spross und Wurzel) bleibt unbeschädigt.

Abbildung 1 zeigt einen Wurzelstock einer Versuchspflanze. Darauf ist zu erkennen, dass sich die Wurzeln voneinander differenzieren lassen. Lange Wurzeln dienen dem Erreichen neuer Nährstoff- und Wasserquellen in größerer Entfernung. Alte Wurzeln (braune Wurzeln) sind scheinbar leblose Wurzelteile, die zum Transport der Nährstoffe und des Wassers dienen, an denen jedoch keine aktive Aufnahme und Abgabe von Substraten erfolgt. Weiße Wurzeln sind im Speziellen für die effiziente Wasseraufnahme zuständig. Diese Beschreibungen der verschiedenen Wurzeltypen finden sich in den Beschreibungen der Proben wieder. Abbildung 2 zeigt Blattscheiden einer Versuchspflanze aus dem Gewächshausversuch (Seropedica, RJ, Brasilien) im Jahr 2009.



**Abb. 1:** Wurzelstock einer Zuckerrohrpflanze des Tankversuchs, Fotografie von Dr. Thomas Hurek (Bremen)



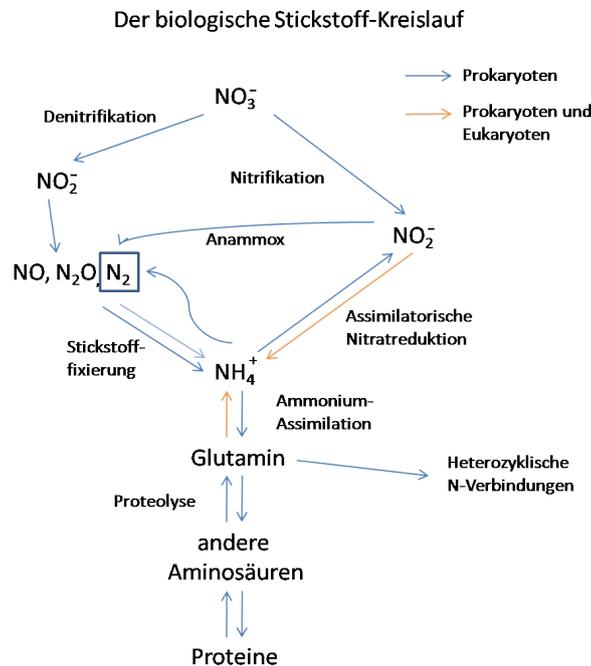
**Abb. 2:** Blätter der Blattscheide bei Zuckerrohr des Gewächshausversuchs, Seropedica, 2009, ca. 4 Wochen alte Pflanze

## 2.2 Biologische Stickstofffixierung

### 2.2.1 Die Nitrogenase-Reaktion

Stickstoff (N) ist ein Hauptelement aller Organismen und nimmt 6,25 % deren durchschnittlicher Trockenmasse ein. Eukaryoten ist es nicht möglich, Luftstickstoff ( $N_2$ ) zu fixieren. Diese Fähigkeit besitzen nur bestimmte Bakterien und Archaeen. Die Abbildung 3 zeigt die Stellung der biologischen Stickstofffixierung im Stickstoffkreislauf; neben den Redox-Reaktionen im Kreislauf zwischen Nitrat, Nitrit, Stickoxiden und Ammoniak kommt der biologischen Stickstofffixierung (biological nitrogen fixation, BNF) aus der Luft sehr große Bedeutung zu. Im Prozess der  $N_2$ -Fixierung wird primär molekularer Luftstickstoff zu Ammonium reduziert. Somit stehen verschiedene organische stickstoffhaltige Verbindungen für den Stoffwechsel von Eukaryoten zur Verfügung. Der

Anteil des Stickstoffs der Luft liegt bei 78,09 vol%. Jährlich beträgt die terrestrische BNF  $90 - 140 \times 10^{12}$  g, die marine ca.  $80 \times 10^{12}$  g (VITOUSEK *et al.*, 1997).



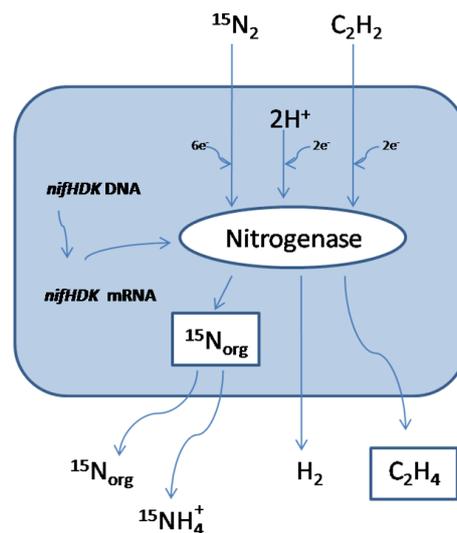
**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufs, nach BOTHE *et al.* (2007), modifiziert

Die Stickstoff-Fixierung bildet neben der Photosynthese als Energielieferant die Grundlage allen Lebens auf der Erde. Sie liefert die Basis-Komponente — fixierten Stickstoff in Form von Ammoniak — für im Wesentlichen zwei essenzielle Molekülgruppen: Nucleinsäuren und Proteine. Fixierter Stickstoff wird für die stickstoffhaltigen Heterozyklen und Basen der Nucleotide benötigt, die die grundlegenden codierenden Einheiten der DNA und RNA bilden. Unabdingbar ist er für die Bausteine der Proteine, die Aminosäuren, die den Stoffwechsel und Zellaufbau in der lebenden Zelle verrichten. Stickstoff ist zudem für Stützsubstanzen wie Chitin essentiell, welche aus Polymeren von N-Acetylglucosaminen bestehen.

Die Fixierung molekularen Stickstoffs wird von dem Enzym Nitrogenase katalysiert, dabei wird  $N_2$  zu  $NH_4^+$  reduziert. Derzeit sind vier Klassen an Nitrogenasen bekannt, drei miteinander nah verwandte, die nach dem jeweiligen Metallatom in ihrem Kofaktor und Reaktionszentrum benannt sind (Molybdän (Mo), Vanadium (Va) und Eisen (Fe)), und eine nur in *Streptomyces thermoautotrophicus* vorkommende (ST)-Nitrogenase (BOTHE *et al.*, 2007; GADKARI *et al.*, 1992). Dabei ist die Mo-Nitrogenase nach heutigem Wissensstand die am häufigsten vorkommende und effizienteste Nitrogenase. Die Nitrogenase-Reduktase (Fe-Protein) ist ein Homodimer mit einem 4Fe-4S-Cluster als

Interpeptid-Brücke, die Nitrogenase (MoFe-Protein) ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer. Jede  $\alpha$ -Untereinheit enthält einen MoFe-Kofaktor, jede  $\alpha\beta$ -Untereinheit ein P-Cluster an ihrer Berührungsfläche. Der MoFe-Kofaktor bildet die Substratbindungsstelle und den eigentlichen Reduktionsort. Die V-Nitrogenase konnte bisher in aeroben Bakterien (*A. vinelandii*, *A. chroococum*), phototrophen Bakterien (*Anabaena variabilis*) und Archaeen (*Methanosarcina barkeri*) nachgewiesen werden, das Gen für die Fe-Nitrogenase konnte aus *A. vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodospirillum rubrum* amplifiziert, kloniert und sequenziert werden (BOTHE *et al.*, 2007). Diese Nitrogenasen weisen neben der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusätzlich eine  $\delta$ -Untereinheit auf ( $\alpha_2\beta_2\delta_2$ -Komposition).

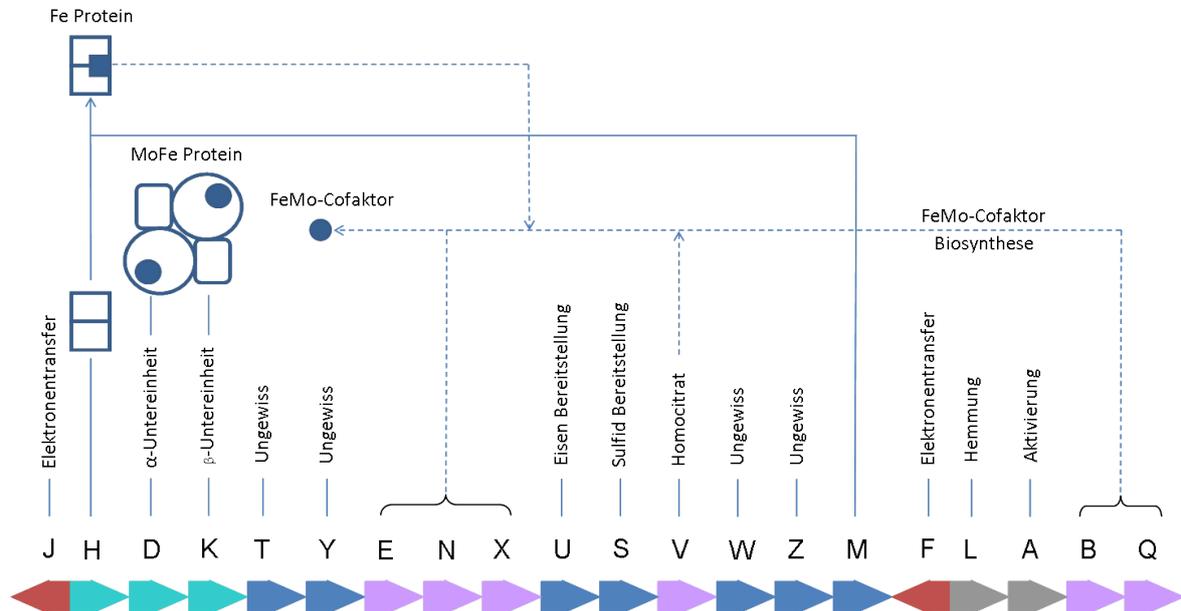
Eine weit verbreitete Methode der Messung der Stickstofffixierung ist die Acetylen-Reduktion (STEWART *et al.*, 1967). Dabei wird die Nitrogenase-abhängige Reduktion von Acetylen zu Ethylen gaschromatographisch bestimmt (siehe Abb. 4). So ist es möglich, die biologische Stickstofffixierung beispielsweise von Bakterienstämmen oder Boden- und Rhizosphärenproben zu analysieren.



**Abb. 4:** Schema der Stoffwechselwege bei der  $^{15}\text{N}_2$ -Fixierung und die Umwandlung von Acetylen zu Ethylen, aus BOTHE *et al.* (2007), modifiziert

In den frühen 80er Jahren wurde erstmals ein Gen-Cluster, welches für die Biogenese der Enzyme der Stickstofffixierung bei *Klebsiella pneumoniae* kodiert, analysiert (siehe Abb. 5, (RIEDEL *et al.*, 1979; BOTHE *et al.*, 2007)). Die Bezeichnung der Gene homologer Funktion werden seitdem für andere Diazotrophe eingesetzt, wie z. B. *nifH* (für das Fe-Protein) und *nifD/nifK*, die für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des MoFe-Protein kodieren (JACOBSON *et al.*, 1989). Der hohe Energieaufwand bei der BNF, die Sensitivität der Nitrogenase gegenüber Sauerstoff und die Heterometall-Ionen-Verfügbarkeit

benötigen eine gute Regulation. Hierbei wird zwischen zeitlichem und/oder räumlichem Schutz vor Sauerstoff und die Regulation über fixierten Stickstoff mit Hilfe der *nifLA* Regulationsgene unterschieden.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Anordnung der *nif*-Gene bei *Klebsiella pneumoniae*, aus BOTHE *et al.* (2007), modifiziert

## 2.2.2 Landwirtschaftliche Bedeutung der Stickstofffixierung

Bereits vor 2000 Jahren entwickelten die Römer eine Technik zur Ertragssteigerung ihrer Felderwirtschaft durch die Integration einer  $N_2$ -fixierenden Leguminose. Die Erforschung der Stickstoff-Fixierung und ihre Applikation in der Landwirtschaft finden seit mehreren Jahrhunderten statt. Um 1800 meinte man zu erkennen, worauf der positive Einfluss der Leguminosen zurückzuführen ist. Da Teile des gebundenen Stickstoffs in Form der Knöllchen im Boden verblieben und dort durch Mineralisierung der Überreste zur Verfügung gestellt wurden, käme es zum ertragssteigernden Einfluss der Leguminosen. Hellriegel und Wilfarth publizierten 1886 die ersten eindeutigen Untersuchungsergebnisse zur symbiontischen Stickstofffixierung durch Bakterien in Wurzelknöllchen von Leguminosen in *Pisum sativum* (Erbsen) (HELLRIEGEL, 1886). Zwei Jahre später beschrieb Beijerinck spirillenförmige, vermutlich stickstofffixierende Bakterien, welche er aus oberflächensterilisierten Wurzelknöllchen isoliert hat (BEIJERINCK, 1888). Bereits 1890 wurden Inokulationsexperimente mit diversen Bakterienisolaten von Leguminosen wie *Vicia faba* (Ackerbohne) und *Pisum sativum* (Erbsen) durchgeführt, bei denen die Bakterien erfolgreich zur Knöllchenbildung und Stickstofffixierung beitragen (BEIJERINCK, 1890; PRAZMOWSKI, 1891). Winogradsky beschrieb 1893 *Clostridium pasteurianum*, ein freilebendes stickstofffixierendes Bakterium (WINOGRADSKY,

1893). Nobbe und Hiltner zogen in einer klassischen Studie die Schlussfolgerung, dass: "...die Stickstoffassimilation mit der Bakteriodbildung (*Knöllchenbildung*) in Beziehung steht ..." (NOBBE und HILTNER, 1893). Diese Erkenntnisse führten im Laufe der folgenden Jahre zur Kommerzialisierung von Bakterieninokulationen für Leguminosen in Form von Inokulationspräparaten (z. B. „Nitragin“). 1910 meldeten die beiden Chemiker Fritz Haber und Carl Bosch ein Verfahren zur chemischen Ammoniaksynthese an (Haber-Bosch-Verfahren). Damit konnten aus abiotischem Stickstoff im industriellen Maßstab organische Verbindungen gewonnen werden. Bei diesem Verfahren wird unter Verwendung des Katalysators Eisen-(II/III)-Oxid  $Fe_3O_4$  Ammoniak gewonnen, das im Weiteren zu anderen Verbindungen wie Harnstoff oder im Ostwald-Verfahren zu Salpetersäure weiterverarbeitet werden kann. Da fixierter Stickstoff fast immer der limitierende Faktor in der Landwirtschaft ist, hat der massive Anstieg der synthetischen Stickstoff-Produktion in der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts und die Möglichkeit, ihn als Dünger nutzen zu können, zu einem deutlichen Anstieg der Nahrungsmittelproduktion geführt. Im Zusammenhang mit neuen Varietäten von Getreide („Green Revolution Crops“) kam es zu einer enormen Produktion an Nahrung, die die Menschheit vorher nicht kannte und welche die Produktionsseite der Ernährungskrise gelöst hat.

Leider hat die immense Applikation von synthetischem Stickstoff-Dünger viele negative Begleiterscheinungen. Die traditionelle Felderwirtschaft mit Leguminosen wurde zurückgedrängt. Das Resultat ist ein kontinuierlicher Verlust des Bodens an organischem Material, der die Wasserspeicherkapazität, die Lockerheit und die Eigenschaft, mikrobielle Gemeinschaften zu unterstützen, herabsetzt. Eine Überdüngung des Bodens mit Stickstoff führt letztlich zu einem induzierten Mangel an anderen Nährstoffen. So kann bestenfalls 50 % des eingebrachten Stickstoffs von Pflanzen überhaupt genutzt werden (ELMERICH und NEWTON, 2007). Der Rest wird ausgewaschen und gelangt über Bäche und Flüsse ins Meer. Die resultierende Eutrophierung kann sich negativ auf die Ökologie anderer Ökosysteme und der Lebewesen auswirken. Die Oxidation von Harnstoff und Ammoniak bewirkt eine Ansäuerung des Bodens. Die Emission von Stickoxiden durch die Aktivität von Mikroorganismen, welche mehr als 50 % bei auf die Bodenoberfläche ausgebrachtem Dünger einnehmen kann, trägt zu saurem Regen, damit zum Waldsterben und folglich zur Verringerung der Biodiversität bei. Dies gilt auch für die bei jeder Verbrennung entstehenden Stickoxide aus Industrie- und Fahrzeugabgasen. Stickoxide sind als Treibhausgase mit einem Treibhauspotential (GWP, Global Warming Potential) von 298 viel wirksamer als  $CO_2$ .

Manche der genannten Probleme könnten durch einen verbesserten Einsatz des aufgebrauchten Düngers behoben werden. Ein Ansatz ist die balancierte Ausbringung mehrerer Nährstoffe in verschiedenen kleinen Applikationen unter der Oberfläche des Ackerbodens. Ein anderer Ansatz beruht auf der Ausbringung von Hemmstoffen der Nitrifikation, welche die Umwandlung von Ammonium zu Nitrat stark verlangsamen und so

das Auswaschungsrisiko senken. Der dritte Ansatz wäre eine ausgedehnte Anwendung biologischer Stickstoff-Fixierung.

Zum Ablauf der biologischen Stickstofffixierung sind bestimmte Nährstoffe für die Bakterien essentiell. Zum Einen werden durch die stark energieaufwendige Reaktion energiereiche Kohlenstoffquellen benötigt, welche von den Pflanzen zur Verfügung gestellt werden müssen. Als Energiequelle für wurzellosoziierte diazotrophe Bakterien handelt es sich letztlich um Stoffwechselprodukte der Pflanze, die bei der Photosynthese gewonnen werden. Zum anderen gibt es limitierende Nährstoffe wie Molybdän, Eisen und Schwefel, welches in der biologischen Stickstofffixierung essentiell ist, da die Substratbindungsstelle der Nitrogenase aus Molybdän und Eisen besteht. Aus diesem Grund wurden Studien zur Effektivität der Düngung mit Molybdän durchgeführt (BODDEY *et al.*, 2003). Aus dieser Arbeit geht hervor, dass durch die Auswahl des Zuckerrohr-Kultivars und anschließende Bewässerung in Kombination mit Molybdän-Düngung eine hohe Steigerung der Biologischen Stickstofffixierung erwarten lässt. Vor allem durch das saure Milieu des Ultisol-Bodens, in welchem Molybdän schlecht verfügbar ist, ist eine Steigerung der BNF durch diese Applikation zu erwarten (BODDEY *et al.*, 2003). Untersuchungen zeigten, dass aus einer kombinierten Düngung mit Phosphat und Molybdän und Gießen der Pflanzen bis zu 150 kg N/ha durch BNF erzielt werden können (BODDEY *et al.*, 2001).

Bekannt ist, dass große und diverse Bakterien-Populationen mit Zuckerrohr assoziiert sind. Das hauptsächlich fixierende Bakterium bzw. ein Konsortium bestimmter Bakterien, welche wirklich für die hohe Biologische Stickstofffixierung in Zuckerrohr verantwortlich sind, ist bisher nicht bekannt (BODDEY *et al.*, 2003). Stickstofffixierende Bakterien können durch die Applikation von synthetischem Dünger stark beeinflusst werden. So konnten folgende Beobachtungen von PEDRAZA (2008) zusammengefasst werden: Um die Abundanz von *G. diazotrophicus* unter Einfluss von Stickstoffdüngung zu untersuchen wurden diverse Experimente durchgeführt. Bei Applikation von mehr als 200kgN/ha wurde eine Isolierungsfrequenz von 0–2% festgestellt, die bei Applikation von weniger als 120kgN/ha auf 70% anstieg (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993). Eine Studie zur Applikation mit mehr als 300 kgN/ha wurde von DOS REIS JUNIOR *et al.* (2000) durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Abundanz mancher Bakterien bei hohen Stickstoff-Applikationen nicht beeinflusst wird. So wird *Herbaspirillum* spp. in der Zuckerrohr-Varietät SP79 2312 nicht beeinflusst, die Abundanz von *G. diazotrophicus* verringerte sich jedoch durch die Stickstoff-Düngung. Eine Reduktion der Anzahl an *G. diazotrophicus* konnte in der Varietät SP70 1143 nicht beobachtet werden. Zudem konnte eine Reduktion der Zahl an *G. diazotrophicus* während der Reife- bzw. Erntezeit festgestellt werden, welche mit Trockenzeiten korrelierten (DOS REIS JUNIOR *et al.*, 2000; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2002a). Der erfolgreiche Einsatz von *G.*

*diazotrophicus* und *H. seropedicae* zur Einsparung synthetischen Stickstoffdüngers bei in Indien kommerziell genutztem Zuckerrohr wurde von MUTHUKUMARASAMY *et al.* (2006) beschrieben.

### 2.3 Diazotrophe Bakterien

Da der  $N_2$ -Fixierungsprozess wegen der sehr stabilen Dreifachbindung des Distickstoffs mit 946 Kilojoule pro Mol  $N_2$  besonders energieaufwendig ist, ist ein enger Kontakt mit der Wirtspflanze erforderlich, um ausreichende Substratversorgung der  $N_2$ -fixierenden Bakterien sicherzustellen. Die endophytische bzw. Wirts-assoziierte Lebensweise ist eine wichtige Voraussetzung hierfür. Zudem sind endophytische Mikroorganismen der Konkurrenz durch die zahlreiche Rhizosphärengemeinschaft nicht mehr ausgesetzt. Knöllchenbildung durch *Rhizobium* spp. in Leguminosen oder von *Frankia* sp. in der Actinorhiza-Symbiose stellen endophytische Assoziationen dar, die durch spezifische symbiotische Wechselwirkungen mit der Wirtspflanze hohe Effektivität erreicht haben. Aber auch von Pflanzen der Familie *Gramineae* konnten eine Vielzahl an endophytisch lebenden bzw. Pflanzen-assoziierten Bakterien isoliert und beschrieben werden.

Nach eingehenden Untersuchungen mittels  $^{15}N$ -Isotopenanalyse konnte bei der Zuckerrohr-Varietät Krakatau und den kommerziell erwerbbaaren Hybriden SP 70 1143 und CB 45 3 in einem dreijährigen Experiment sehr große Einträge via BNF gemessen werden (BODDEY *et al.*, 2003). Bei der normalerweise im kommerziellen Anbau von Zuckerrohr eingesetzten Düngung mit synthetischem Stickstoff wurde in mehreren, voneinander unabhängigen Versuchsansätzen ein negativer Einfluss auf diazotrophe Bakterien beobachtet (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1999; BODDEY *et al.*, 2003).

Nicht alle pflanzenwachstumsfördernde Effekte können jedoch auf die biologische Stickstofffixierung zurückgeführt werden. Wachstumsfördernde Effekte von Bakterien können ebenfalls durch die Ausscheidung von Pflanzenhormonen wie Indol-Essigsäure oder Gibberellin verursacht werden. Zudem kann eine biologische Kontrolle beispielsweise durch die Abwehr von Pflanzen-Pathogenen zu symbiontischen Interaktionen von Pflanzen und Bakterien führen. In dieser Arbeit wurde die diazotrophe Pflanzen-assoziierte Bakteriengemeinschaft von Zuckerrohr durch die Analyse der exprimierten *nifH*-Gene untersucht. Die meisten der bisher bekannten, mit Pflanzen der Familie *Gramineae* vergesellschafteten Bakterien gehören den  $\alpha$ - und  $\beta$ -*Proteobacteria* an. Im Folgenden wird ein Einblick über die bisher bekannten Informationen dieser Bakterien gegeben.

## Endophytisch lebende Bakterien

Endophytische Mikroorganismen besiedeln das Innere von Pflanzen, zum Teil intrazellulär, ohne Krankheiten bei den jeweiligen Wirtspflanzen auszulösen. In bestimmten Fällen kann es unter besonderen Bedingungen zur Erkrankung der Pflanze kommen (STONE *et al.*, 2000). Auch wenn diese Definition die Interaktion von Pilzen mit Pflanzen primär beschreibt, so ist sie ebenfalls auf die Pflanzen-Bakterien-Interaktionen übertragbar. Während negative Einflüsse wie makroskopisch auftretende Krankheitssymptome nicht nachweisbar sind, kann es zum positiven Einfluss, wie z. B. gesteigertem Wachstum und höherem Ertrag der Pflanze (plant growth promoting (rhizobacteria), PGP(R)), kommen. PGP-Bakterien konnten aus der Rhizosphäre fast aller Pflanzen isoliert werden (ROSENBLUETH und MARTINEZ-ROMERO, 2006; HALLMANN *et al.*, 2006). Dabei können die endophytischen Bakterien grob in ubiquitär auftretende und in wirtsspezifische Arten unterteilt werden. Wirtsspezifisch besiedelnde Arten beinhalten sowohl Organismen, die eine Vorliebe für eine gewisse Pflanzenart haben, als auch Organismen, die spezifisch nur eine einzige Art besiedeln. Hierbei sind spezielle Adaptionen der Wirts- und Besiedlungsorganismen zu beobachten, die sich nicht nur auf spezielle Arten beziehen, sondern zum Einen auf deren Varietäten und die zum Anderen spezifische Pflanzenorgane bzw. Wachstumsstadien betreffen können. Da ein Teil der Endophyten mit den bisher in der Mikrobiologie zur Verfügung stehenden Methoden nicht kultiviert werden kann, werden drei Methoden bei der Erforschung von Endophyten angewandt: 1. Oberflächensterilisierung der Wirtspflanze und anschließende Isolierung der Bakterien mit speziellen Medien; wenn sie nicht kultivierbar sind; 2. Nachweis und anschließende vergleichende Analyse der Sequenzen von Marker-Genen wie z. B. 16S-rRNA oder -DNA mittels PCR-Amplifikation und 3. *in situ*-Detektion mit z. B. immunologischen Methoden, phylogenetischen Oligonukleotid-Sonden im Rahmen der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (AMANN *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 2003), oder, falls Endophyten kultiviert wurden Fluoreszenz-Markierung (GFP, (ELBELTAGY *et al.*, 2001; TOMBOLINI *et al.*, 1999)) und anschließender mikroskopischer Detektion z. B. mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (SCHMID *et al.*, 2004). Sowohl eine erfolgreiche Isolierung aus oberflächensterilisiertem Material als auch ein PCR-Nachweis aus diesem Material reichen für eine eindeutige Charakterisierung einer endophytischen Kolonisierung nicht aus. Ein mikroskopischer *in situ* Nachweis ist daher unabdingbar.

Bei der Applikation mancher Pflanzen-assoziiertes Bakterien, Endophyten eingeschlossen, konnte eine Reduktion der Häufigkeit bzw. der Intensität phänotypischer Merkmale von Krankheiten festgestellt werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Biologische Kontrolle. Die involvierten Bakterien sind Antagonisten, die zu einer effizienten Reduktion der Population pathogener Bakterien bzw. Pilze und somit zur Reduzierung des Potentials Krankheiten auszulösen, führen (WELLER, 1988; COSTACURTA und VAN-

DERLEYDEN, 1995). Daneben ist die sogenannte induzierte systemische Resistenz (ISR) der Pflanze bekannt, bei der bakterielle Metabolite, die die Resistenz der Pflanze beeinflussen, eine große Rolle spielen. Elicitoren solcher Reaktionen sind Komponenten auf der Bakterienoberfläche, wie z. B. Lipo- und Exopolysaccharide und Flagellin. Auch bakterielle Signalmoleküle z. B. vom N-Acylhomoserinlacton Typ, die mit dem Phänomen des Quorum Sensing im Zusammenhang stehen, können eine ISR-ähnliche Reaktion auslösen (SCHUEGGER *et al.*, 2006). Dies ist für dikotyledone Pflanzen beschrieben, die Forschung bei Monokotyledonen steht noch am Anfang.

Sowohl Endophyten als auch Wurzel-assoziierte Bakterien sind in der Lage die Architektur des Wurzelsystems zu beeinflussen. Diese Form des PGPR-Effekts kann durch Produktion und Exkretion von Pflanzenhormonen wie Indol-Essigsäure (IAA), anderer Auxine oder Giberelline geschehen (COSTACURTA und VANDERLEYDEN, 1995).

Bisher ist der Nachweis einer aktiven  $N_2$ -Fixierung *in situ* (durch inokulierte Bakterien) nur in wenigen Fällen eindeutig gelungen, obwohl eine große Vielfalt  $N_2$ -fixierender Bakterien aus Zuckerrohr und anderen Gramineen isoliert und als Inokulate eingesetzt worden sind.

### 2.3.1 *Alpha-Proteobacteria*

*Rhizobium* spp. und *Bradyrhizobium* spp.

Rhizobien sind in der Lage, spezifische symbiontische Interaktionen mit Leguminosen einzugehen und in Knöllchen effektiv  $N_2$  zu fixieren. Darüber hinaus können Rhizobien als Endophyten verschiedene Monokotyledonen besiedeln (ROSENBLUETH und MARTINEZ-ROMERO, 2006; SCHLOTTER *et al.*, 1997; YANNI *et al.*, 1997). Bei wechselndem Anbau von Reis (geflutete Felder) und Klee (trockene Felder) mit dem knöllchenbildenden *Rhizobium leguminosorum* bv. *trifolii* wurden pflanzenwachstumsfördernde Effekte beobachtet; das stickstofffixierende Bakterium *R. leguminosorum* bv. *trifolii* geht mit den Reiswurzeln eine endophytische Beziehung ein (DAZZO und YANNI, 2006).

Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* sind ebenfalls in der Lage, symbiontische Beziehungen mit Leguminosen, wie z. B. *Glycine* spp. (*Bradyrhizobium japonicum*, FUHRMANNA und VASILASA (1993)), *Lupinus* spp. (*Bradyrhizobium lupinus*, BARRERA *et al.* (1997)), *Arachis hypogaea* (*Bradyrhizobium arachis*, GILLETTE und ELKAN (1996)) und *Aeschynomene* spp. (MOLOUBA *et al.*, 1999), einzugehen. Eine endophytische Besiedlung verschiedener Reis-Pflanzen (Wild- bzw. kommerziell angebauter Reis) durch *Bradyrhizobium* sp. konnte von TAN *et al.* (2001) beobachtet werden. *Bradyrhizobium betae* konnte als Endophyt der Zuckerrübe identifiziert werden (RIVAS *et al.*, 2004).

*Azospirillum* spp.

Die erste Charakterisierung des spirillenförmigen Bakteriums *Spirillum lipoferum* ist auf Beijerinck im Jahr 1923 zurückzuführen (BEIJERINCK, 1925), es sind jedoch keine Kulturen erhalten geblieben. Becking entdeckte *Spirillum lipoferum* im Jahr 1963 wieder und beschrieb dessen Fähigkeit in Reinkultur Stickstoff zu fixieren im Jahr 1982 (BECKING, 1963, 1982). In den 70er Jahren konnte die Arbeitsgruppe um Johanna Döbereiner regelmäßig Spirillen-artige Bakterien von Gräsern und Getreide, unter Nutzung von Malat-haltigem semisolidem Stickstoff-freiem Medium (NFb) isolieren (DÖBEREINER und DAY, 1976). Die Gattung *Azospirillum* wurde 1978 mit den Spezies *A. lipoferum* und *A. brasilense* beschrieben (TARRAND *et al.*, 1978). In den folgenden Jahren wurden *A. amazonense* (MAGALHAES *et al.*, 1983), *A. halopreferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (SLY und STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereinerae* (ECKERT *et al.*, 2001) und *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010) beschrieben. Die Taxonomie, Physiologie und Ökologie der Gattung *Azospirillum* wurden ausführlich beschrieben (STEENHOUDT und VANDERLEYDEN, 2000; HARTMANN und BALDANI, 2006). Die Spezies *A. brasilense* und *A. lipoferum* haben sich als effiziente Kolonisierer der Wurzeloberfläche von diversen Pflanzen gezeigt. ASSMUS *et al.* (1995) konnten die Kolonisierung von Weizenwurzeln durch *A. brasilense* Sp7 mit Hilfe von phylogenetischen Sonden und der FISH-Methode zeigen. Mit Hilfe von hochspezifischen Detektionsmethoden wie Stamm-spezifischen monoklonalen Antikörpern und Immunogoldfärbung war es möglich, die Besiedlung von *A. brasilense* Sp245 im Interzellularraum und in den Rinden-Zellen von Weizen zu lokalisieren (SCHLOTTER und HARTMANN, 1998; ROTHBALLER *et al.*, 2003). *A. brasilense* Sp7 konnte jedoch nur auf der Wurzeloberfläche gefunden werden (SCHLOTTER und HARTMANN, 1998). Die Besiedlung interner Gewebe kann von Bakterienstamm, Pflanzenspezies und anderen, nicht näher bekannten Faktoren abhängen (BASHAN und LEVANONY, 1990). *Azospirillum brasilense* ist jedoch nicht in der Lage, die inokulierte Pflanze systemisch zu besiedeln. Weltweit wurde bei Inokulationen mit *Azospirillum* im Feld ein signifikanter Anstieg der Ernte von 5-30 % nachgewiesen (DOBBELAERE *et al.*, 2001; OKON und LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Da die Böden wenig oder nicht mit Stickstoff gedüngt waren, geht man davon aus, dass der PGPR-Effekt teilweise auf Stickstofffixierung zurückzuführen ist. Zudem ist bei den inokulierten Pflanzen die Wurzelarchitektur durch von *Azospirillum* gebildete Phytohormone (OKON, 1994; DOBBELAERE und OKON, 2007), wie Auxine und Gibberelline, verändert. Dieses Phänomen der Pflanzenwachstumsförderung ist auch bei anderen PGPR bekannt. PGPR vergrößern die Wurzeloberfläche und damit die Fläche zur Besiedlung. Damit setzen sie die Pflanze in die Lage, mehr limitierte Nährstoffe und Wasser aufzunehmen. Auch eine  $N_2$ -Fixierung wird vermutet. Jedoch konnte bisher nur eine sehr geringe  $N_2$ -Fixierung

von *Azospirillum* an Wurzeln festgestellt werden (ROTHBALLER *et al.*, 2008).

*Gluconacetobacter* spp.

Die Isolierung eines neuen diazotrophen endophytisch lebenden Bakteriums gelang 1988 am EMBRAPA Agrobiologia (Seropedica, Rio de Janeiro, Brasilien) aus Stengel- und Wurzelproben von Zuckerrohr (CAVALCANTE und DOEBEREINER, 1988). Im darauffolgenden Jahr wurde es von GILLIS *et al.* (1989) als *Acetobacter diazotrophicus* beschrieben und später zu *Gluconacetobacter diazotrophicus* umbenannt (YAMADA *et al.*, 1997). Die Übertragung des Bakteriums findet hauptsächlich über die für die Pflanzung eingesetzten Stecklinge statt (REIS *et al.*, 1994), da *G. diazotrophicus* nicht im Boden überleben kann (BALDANI *et al.*, 1997). *G. diazotrophicus* gilt als echt endophytisch lebend, da es im Pflanzeninneren in Wurzeln, Stamm und Blättern von Zuckerrohr gefunden werden konnte. Lokalisiert wurde das Bakterium in den Xylem-Gefäßen (JAMES *et al.*, 1994, 2001; SEVILLA *et al.*, 2001) und im apoplastischen Raum (DONG *et al.*, 1994). Interessanterweise konnte *G. diazotrophicus* aus der rosa Zuckerrohrschmierlaus *Saccharicoccus sacchari* isoliert werden (ASHBOLT und INKERMAN, 1990), welche eine typische Krankheit des Zuckerrohrs verursacht. Die Spezies *Gluconacetobacter diazotrophicus* konnte ebenfalls in anderen tropischen Pflanzen wie Kaffee, Ananas, Süßkartoffel, Tee, Mango, Banane und diversen Gräsern gefunden werden (TAPIA-HERNANDEZ *et al.*, 2000; PAULA *et al.*, 1991; JIMENEZ-SALGADO *et al.*, 1997; LOGANATHAN *et al.*, 1999; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2002b). Mit *G. johannae* und *G. azotocaptans* wurden zwei weitere stickstofffixierende Arten aus Kaffee und Ananas isoliert und beschrieben, diese konnten jedoch nicht in Zuckerrohr gefunden werden (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 2001). Desweiteren wurden *Acetobacter peroxydans* (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2005), *Swaminathania salitolerans* (LOGANATHAN und NAIR, 2004) und *Acetobacter nitrogenifigens* (DUTTA und GACHHUI, 2006) als diazotrophe Vertreter beschrieben.

Auch bei einer hohen Konzentration von Nitrat fixiert *G. diazotrophicus* Stickstoff, da eine assimilatorische Nitrat-Reduktion fehlt. *G. diazotrophicus* scheidet das saccharolytische Enzym Levansucrase aus, welches Glukose zum Wachstum des Bakteriums und Fruktose für die Bildung des Exopolysaccharids Levan verfügbar macht. Vermutlich dient Levan zum Einen als klebrige Matrix, um die Kolonien des Bakteriums mit der Kolonisierungsfläche des Zuckerrohrs zu verbinden (REIS *et al.*, 2007), zum Anderen könnte durch Levan der Schutz der stickstofffixierenden Bakterien vor Sauerstoff gewährleistet werden. Abgesehen vom PGP-Effekt via BNF konnten FUENTES-RAMIREZ *et al.* (1993) die Bildung von Auxin *in vitro* nachweisen. Die Produktion eines Bakteriozins gegen *Xanthomonas albilineans*, dem Verursacher der Zuckerrohrkrankheit leaf scald (PINON *et al.*, 2002) und ein antagonistischer Effekt gegen *Collelotrichum*

*falcatum*, der Verursacher der Krankheit „Red Rot“ (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2002b) konnte gezeigt werden. Detaillierte Studien von SEVILLA *et al.* (2001) mit einer *Nif*-negativen Mutante von *G. diazotrophicus* PAL5 zeigten bei nicht limitierenden Stickstoffbedingungen einen nicht auf BNF beruhenden PGP-Effekt. Im Vergleich dazu konnte bei limitierenden Stickstoffbedingungen mit dem BNF Wildtyp-Stamm PAL5 via  $^{15}\text{N}$  Gas Inkooperation von  $^{15}\text{N}$  in der Biomasse der Pflanze gezeigt werden; dies belegt einen Transfer bakteriell fixierten Stickstoff zur Wirtspflanze. Weitere Inokulationsexperimente mit PAL5 mit Reis und Mais zeigten ähnliche Resultate. In beiden Pflanzen konnte eine Wachstumssteigerung erzielt werden, wobei die Besiedlung von Mais nur an der Wurzeloberfläche stattfand (REIS *et al.*, 2007; RIGGS *et al.*, 2001). Während hohe Stickstoffkonzentrationen die BNF nicht störten, konnte jedoch eine verringerte Besiedlung von *G. diazotrophicus* beobachtet werden (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1999).

In Studien der Gruppe um Prof. Dr. A. Hemerly (Universidade Federal do Rio de Janeiro) wird die Assoziation und Regulation von Zuckerrohr und dessen Endophyten untersucht. Kürzlich wurde das Proteom von *G. diazotrophicus*, kokultiviert mit Zuckerrohrpflänzchen, untersucht (DOS SANTOS *et al.*, 2010). Dabei wurden neben anderen ein Transkriptom-Elongationsfaktor (GreA), ein Chaperonin (GroEL) und Aussenmembran-Lipoprotein (Omp16) gefunden, welche schon im Zusammenhang mit anderen Pflanzen-Bakterien-Interaktionen beschrieben wurden. Dies lässt auf ein generelles Protein-Expressions-Muster bei Symbiosen schließen (DOS SANTOS *et al.*, 2010). DOS SANTOS *et al.* (2010) und VINAGRE *et al.* (2006) vermuten, dass die Pflanzen auf biotische Faktoren, d. h. bei endophytischen Bakterien ebenfalls, mit einer Abwehr reagieren, bis eine effiziente Assoziation zustande kommt. In einer Studie von BLANCO *et al.* (2005) konnten Glykoproteine aus Zuckerrohrstengeln aus dem Feldanbau isoliert werden. Einige dieser Proteine konnten an die Zellwand von *G. diazotrophicus* binden. Die Fähigkeit von Glykoproteinen, an spezifische Rezeptoren der bakteriellen Zellwand zu binden, lässt vermuten, dass es sich bei diesen Proteinen um Erkennungssensoren handelt, die die Kompatibilität von Endophyten überprüfen (PEDRAZA, 2008).

### 2.3.2 *Beta-Proteobacteria*

*Herbaspirillum* spp.

Die erste Art der Gattung *Herbaspirillum*, *H. seropedicae*, wurde 1986 beschrieben (BALDANI *et al.*, 1986a). Phylogenie, Physiologie und Ökologie der Gattung sind in SCHMID *et al.* (2006) zusammengefasst. Es konnte eine effektive endophytische Besiedlung von Zuckerrohr in Wurzel, Stamm und Blättern gezeigt werden (BALDANI *et al.*, 1996). Ferner wurde die Besiedlung der Wurzeln von 13 weiteren *Gramineae*,

aber auch des Sprosses von Mais und Reis beobachtet (JAMES und OLIVARES, 1997; OLIVARES *et al.*, 1996). *H. seropedicae* kann die Stickstofffixierung in einem weiten pH-Spektrum durchführen (5,3-8,0) (BALDANI *et al.*, 1986a). Die Inokulation von *Herbaspirillum* spp. führte, durch verstärkte Exsudation organischer Säuren aus den Wurzeln von Aluminium-toleranten Varietäten von Reis zu einem gesteigerten Wachstum und höherem Stickstoffgehalt (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Ein Beleg für die endophytische, diazotrophe Assoziation von *Herbaspirillum* mit Reis konnte durch Verwendung einer *nifH:GFP* Reporterfusion gefunden werden (ELBELTAGY *et al.*, 2001). *Herbaspirillum rubrisubalbicans* war im Zusammenhang mit der „Mottled Strip Disease“ als mild-pathogener Vertreter im Jahr 1972 beschrieben (HALE und WILKE, 1972) und im Jahr 1996 von *Pseudomonas* zu *Herbaspirillum* reklassifiziert worden (BALDANI *et al.*, 1996). Da bekannt ist, dass *H. rubrisubalbicans* ebenfalls Stickstoff fixiert und bei Koinokulation mit *H. seropedicae* keine phänotypischen Krankheitsmerkmale in resistenten Zuckerrohr-Varietäten hervorruft, ist es möglich, diese Art als PGP-Bakterium einzusetzen (OLIVARES *et al.*, 1997). Ein Großteil der kommerziellen Varietäten von Zuckerrohr ist resistent gegen die pathogene Wirkung von *H. rubrisubalbicans* (BODDEY *et al.*, 2003). *H. frisingense*, ein weiterer stickstofffixierender Vertreter, konnte von oberflächensterilisierten Wurzeln und Sprossen der  $C_4$ -Energie-Pflanzen *Pennisetum purpureum* in Brasilien und *Miscanthus sinensis* in Deutschland isoliert werden (KIRCHHOF *et al.*, 2001). *H. hiltneri* konnte von oberflächensterilisierten Wurzeln von Weizen (ROTHBALLER *et al.*, 2006) und *H. putei* aus Brunnenwasser isoliert werden (DING und YOKOTA, 2004), jedoch konnte bei beiden keine Stickstofffixierung unter Laborbedingungen gemessen werden. Die beiden Vertreter zeigen jedoch eine nahe Verwandtschaft zu *H. lusitanum*, welches von Knöllchen von *Phaseolus vulgaris* isoliert worden war und Stickstoff fixiert (VALVERDE *et al.*, 2003). Durch die Entwicklung eines FISH-basierten Detektionssystems unter Verwendung spezifischer phylogenetischer Oligonukleotid-Sonden auf Art-Ebene der Gattung *Herbaspirillum* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), ist die Unterscheidung verschiedener Arten in kurzer Zeit möglich. So konnten mehrere Bakterienisolate aus anderen Pflanzen wie Ananas, Banane und Reis als *Herbaspirillum* spp. identifiziert werden (MAGALHAES CRUZ *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 1999). Mit immunologischen Methoden, GFP-Markierung und FISH-Analyse konnte eine effiziente endophytische Kolonisierung der Wurzeln von *Miscanthus* und Weizen durch *H. frisingense* gezeigt werden (ROTHBALLER *et al.*, 2008).

*Burkholderia* spp.

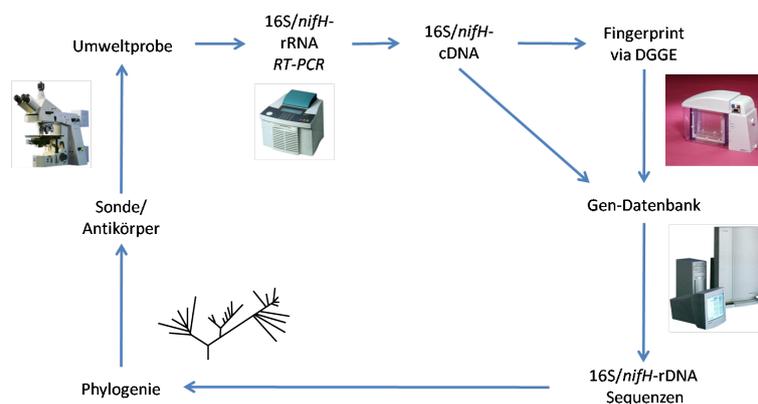
Die Gattung *Burkholderia* wurde im Jahr 1995 von Gillis *et al.* aus der Gattung *Pseudomonas* genommen und reklassifiziert. Es stellte sich heraus, dass viele der diazotrophen Bakterien-Isolate von oberflächensterilisierten Bananen und Ananaspflanzen aus Brasilien (MAGALHAES CRUZ *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 1999) und Mais und Kaffee

verschiedener klimatischer Bedingungen in Mexiko (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2001) dieser Gattung angehören. Die Identifizierung des aus Zuckerrohr aus Brasilien, Südafrika sowie von Mais und Teosinte aus Mexiko isolierten diazotrophen *Burkholderia tropica* erfolgte im Jahr 2004 (REIS *et al.*, 2004). *B. unamae* konnte als Endophyt von Teosinte beschrieben werden (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004). *Candidatus B. brasiliense* enthält das „Bakterium E“, welches aus Zuckerrohr, Süßkartoffel und Maniok isoliert wurde (Baldani V.L., persönl. Komm.). Knöllchenbildende diazotrophe *Burkholderia* spp. konnten aus den Leguminosen *Aspalathus carnoas* und *Machaerium lunatum* isoliert werden (MOULIN *et al.*, 2001). Diese als *B. tuberum* und *B. phymatum* bezeichneten Arten weisen außer dem *nif*-Gencluster das für die Knöllchenbildung verantwortliche *nodA*-Gen auf und werden als Beta-Rhizobia bezeichnet (VANDAMME *et al.*, 2002). In axenischen Systemen mit *Mimosarum* spp. konnte *B. phymatum* hoch-effiziente stickstofffixierende Knöllchen bilden (ELLIOTT *et al.*, 2007). *B. mimosarum* konnte aus den Knöllchen von *Mimosa* spp. isoliert werden (CHEN *et al.*, 2006). Unter der Vielzahl neu beschriebener *Burkholderia* spp. findet sich ein Vertreter, der als Endophyt in Sporen des arbuskulären Mykorrhiza-Pilz *Gigaspora margarita* vorkommt (JARGEAT *et al.*, 2004) und nachweislich das *nifH*-Gen besitzt. Bakterien der Gattung *Burkholderia* haben also durchaus ein bedeutendes und diversifiziertes Potential zur  $N_2$ -Fixierung in bestimmten Pflanzen.

## 2.4 Molekulare Analyse der Mikroflora

Die Kultivierung von Mikroben in künstlichen Medien unter Laborbedingungen und die Mikroskopie zur Identifizierung und Quantifizierung gehören zu den klassischen Methoden der Mikrobiologie. Seit Carl Woesses Arbeiten zur phylogenetischen Analyse (1987) gehören die molekularbiologischen Ansätze zur mikrobiellen Ökologie. Diese Techniken liefern Informationen zur Identifikation nicht kultivierter Mikroorganismen, zur biologischen Varietät, zur Zusammensetzung von bakteriellen Gemeinschaften und zu spezifischen Interaktionen von Mikroben untereinander und mit Pflanzen und Tieren. Viele dieser Methoden nutzen die Nukleinsäuren RNA und DNA, je nach Frage- und Zielstellung der Experimente. Durch den Vorteil ihrer vergleichsweise hohen Stabilität wird in den meisten Studien DNA als Zielobjekt eingesetzt; diese zeigt jedoch lediglich die Präsenz der Mikroorganismen in einem Habitat, da sie ebenfalls in nicht aktiven Bakterien vorhanden ist. Sie kann jedoch für die Untersuchung funktioneller Gene und damit möglicher biochemischer Prozesse verwendet werden (KANDELER *et al.*, 2006; ADAIR und SCHWARTZ, 2008; COELHO *et al.*, 2009). Der Nachweis der bei Weitem instabileren RNA steht jedoch für spezifische Funktionen exprimierter Gene (mRNA) und für Zellwachstum und Aktivität (rRNA) zur Verfügung. Da die

mRNA eine sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten bis zu Stunden aufweist (HAMBRAEUS *et al.*, 2003), ist mit einer Analyse der mRNA nur ein Schnappschuss der vorhandenen Expression funktioneller Gene möglich. Die rRNA hingegen ist für die Charakterisierung der Zusammensetzung einer bakteriellen Gemeinschaft gut geeignet. Die Kombination der Erkenntnisse von Genom, Transkriptom und Proteom bietet ein großes Potential für das Verständnis komplexer mikrobieller Systeme und ermöglicht synökologische Untersuchungen in komplexen mikrobiellen Ökosystemen und Mikroben-Pflanzen-Interaktionen. Als kombinierende Methodik zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften bietet sich der sog. *Full Cycle RNA Approach* (Abb. 6) an. Hierbei werden Nucleinsäuren von Umweltproben mittels Nucleinsäure-Extraktion, cDNA-Synthese, Amplifikation und Sequenzierung der 16S-rRNA und deren Gene bzw. anderer funktioneller Gene zur Erstellung von Klondatenbanken bearbeitet. Auf Basis der Klondatenbank kann die bakterielle Gemeinschaft phylogenetisch charakterisiert werden und spezifische Detektionssysteme entwickelt werden. Diese Detektionssysteme können sowohl PCR-basierend (spezifische Primer) als auch zur visuellen (mikroskopischen) Lokalisierung in der Umweltprobe (spezifische Sonden) geeignet sein und damit zielgerichtet bei der Umweltprobe eingesetzt werden. Zudem können Nucleinsäure-basierende Fingerprint-Analysen, wie z. B. Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) und terminale Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (tRFLP), zum Vergleich bakterieller Gemeinschaften verschiedener Umweltproben eingesetzt werden.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des *Full Cycle RNA Approach*

## 2.5 Aufgabe- und Zielstellung dieser Arbeit

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnten zahlreiche diazotrophe, mit Zuckerrohr assoziierte Bakterien isoliert und beschrieben werden (siehe 2.3). Unklar ist jedoch, welche bisher nicht kultivierten Bakterienarten für den großen Anteil der biologischen Stickstofffixierung in Zuckerrohr entscheidend sind, bzw. ob es sich um Konsortien von Bakterien aus unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen handelt. Bisher ist ein Großteil der Bakterien in ihrem jeweiligen Ökosystem mit den derzeit verfügbaren Methoden der Mikrobiologie nicht kultivierbar. In Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftlichen Forschungsinstitut EMBRAPA Agrobiologia in Seropedica (Rio de Janeiro, Brasilien) und der AG Allgemeine Mikrobiologie der Universität Bremen (Deutschland) sollte in einem DFG-geförderten Projekt die gesamte Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft assoziiert mit Zuckerrohr untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die aktive Pflanzen-assoziierte Bakteriengemeinschaft von Zuckerrohr mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden. Hierzu war geplant, mit dem bereits erwähnten *Full Cycle RNA Approach* Klondatenbanken zu erstellen und eingehend zu analysieren. Mit den gewonnenen Informationen sollten spezifische Nachweissysteme durch Entwicklung neuer Primer und Sonden auf Basis der 16S-rRNA und deren Gene erstellt werden, um in diesem Ökosystem wichtige Bakteriengruppen mittels PCR und FISH schnell nachweisen zu können. Ein besonderer Fokus sollte auf die vergleichende Fingerprint-Analyse mittels DGGE gelegt werden, um in den verschiedenen experimentellen Ansätzen abundante Bakterien zu finden. Methodisch sollte die Erstellung von 16S-rRNA Klondatenbanken auf Basis der DNA und der RNA, d. h. vorhandene und aktive Bakterien, miteinander verglichen werden.

Die verschiedenen experimentellen Ansätze gaben eine Reihe von Untersuchungsansätzen vor. Zum Einen sollte die abundanten Bakteriengemeinschaften der Zuckerrohr-Varietäten SP 70 1143, RB 72 454 und RB 82 5336 in einem nicht Stickstoff-gedüngten Tank-Experiment miteinander verglichen werden. Zum Anderen sollten die aktiven Bakteriengemeinschaften in Inokulations-Experimenten im Gewächshaus und auf dem Feld untersucht werden. Im Gewächshaus- und Feld-Experiment lag der Fokus auf der Detektion von fünf inokulierten diazotrophen Bakterienarten, um festzustellen, ob diese Bakterien nach der Inokulation die Pflanze endophytisch besiedeln, Pflanzen-assoziiert vorkommen oder nicht detektierbar sind. Eine hohe Stickstofffixierung via BNF erfolgt vermutlich in der vegetativen Wachstumsphase der Pflanze, daher wurde ein Fokus dieser Arbeit auf Pflanzen in dieser Phase gelegt. In einem mehrjährigen Feld-Experiment, in welchem Pflanzen in zwei verschiedenen Varianten mit einem Gemisch diazotropher Proteobakterien, isoliert aus Zuckerrohr, inokuliert worden sind, galt es, die Bakterien einige Zeit nach der Inokulation nachzuweisen bzw. bisher unbekannte Zuckerrohr-

assoziierte Bakterien molekularbiologisch zu identifizieren. Zudem sollten die beiden nicht-inokulierten Kontrollvarianten mit und ohne zusätzliche Stickstoffdüngung ebenfalls auf diazotrophe und abundante Bakteriengruppen untersucht werden. Da nicht bekannt ist, wo die biologische Stickstofffixierung in der Zuckerrohrpflanze abläuft, sollten verschiedene Wurzeltypen und die Blattscheide hinsichtlich ihrer aktiven stickstofffixierenden Bakteriengemeinschaften verglichen werden.

Für alle hier erwähnten experimentellen Ansätze galt es, bereits bekannte Pflanzen-assoziierte Bakterien mikroskopisch mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Immunofluoreszenz im Pflanzengewebe zu lokalisieren, um deren Kolonisierungsverhalten Pflanzen-assoziiert und endophytisch zu untersuchen. Zudem sollten mit Hilfe der gewonnenen phylogenetischen Datenbanken Oligonukleotid-Sonden entwickelt werden, um bisher unbekannte diazotrophe Pflanzen-assoziierte Bakterien lokalisieren zu können.

## 3 Material und Methoden

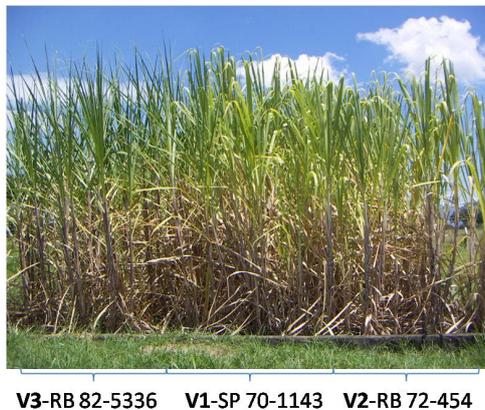
### 3.1 Probenmaterial

#### 3.1.1 Untersuchte Proben

Die während dieses Projekts bearbeiteten Pflanzenproben stammen vom Landwirtschaftlichen Forschungsinstitut EMBRAPA Agrobiologia in Seropedica (Rio de Janeiro, Brasilien). Im September 2006 wurden verschiedene Varietäten von *Saccharum officinarum* (SP70 1143, RB72454, RB82 5336 und RB86 7515) in Langzeitversuchen gepflanzt. Zum Anbau wurden Stecklinge (Sprossstücke aus dem unteren Bereich, die zwei oder mehr Knoten aufweisen) in Vertiefungen in Boden (Ultisol, Typ Hapludult, USDA-Bodenklassifikation (URQUIAGA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2003)) gelegt und mit Boden bedeckt. Die Pflanzen wurden nicht bzw. mit 120 kg/ha Harnstoff zur Zeit der Anpflanzung gedüngt. Alle 6 Monate erfolgte eine Ernte der Zuckerrohrpflanzen, bei der die Biomasse dicht über dem Boden abgeschlagen und entfernt wurde. Von den Varietäten SP70, RB72 und RB82 ist bekannt, dass der Anteil an BNF 58 – 60% beträgt (Reis, VM, persönliche Kommunikation).

#### Tank-Experiment

Die Varietäten SP70, RB72 und RB82 wurden in einem betonierten Tank (20 x 6 x 0,8 m; siehe Abb.7) kultiviert, der einen Austausch von Stickstoff mit dem umliegenden Boden verhindern soll. Dabei wurden die Varietäten in räumlich getrennten Parzellen angebaut.



**Abb. 7:** Bepflanzung des Versuchstanks im März 2007.

## Feld-Experiment

Die Zuckerrohr-Varietäten RB72 und RB86 wurden in sandigem Boden (Ultisol) auf dem Versuchsgut des EMBRAPA-Instituts in großen Parzellen angebaut (siehe Abb. 8). Die verschiedenen Behandlungen sollten einen Vergleich zwischen mit Bakteriengemisch (siehe Tab. 2) inokulierten, nicht inokulierten und gedüngten (120 kg/ha Urea) sowie nicht gedüngten Pflanzen ermöglichen. Die Inokulation (OD 0,8) erfolgte nach JAMES *et al.* (1994) und OLIVEIRA *et al.* (2002) flüssig (gesprüht) oder mittels Eintauchen in ein Gel mit dem Bakteriengemisch.



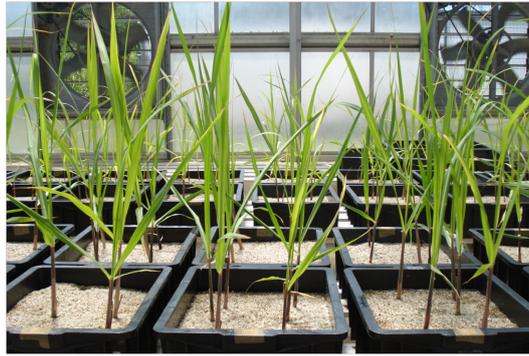
**Abb. 8:** Zuckerrohr-Versuchsfeld im Jahr 2009

**Tab. 2:** Verwendete Bakterienstämme für die Inokulation der Zuckerrohrstecklinge, †Nummer in der Bakterien-Stammsammlung vom EMBRAPA-Agrobiologia, Seropedica

Bakterium	Stamm	Bezeichnung †
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL-5	BR 11281
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HR 54	BR 11335
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC 103	BR 11504
<i>Azospirillum amazonense</i>	CBAMc	BR 11145
<i>Burkholderia tropica</i>	PPe 8	BR 11366

## Gewächshaus-Experiment

Anfang des Jahres 2009 wurden die Varietäten RB72 und RB86 mit dem Bakteriengemisch inokuliert (s. o.), in einem Sand-Teosint-Gemisch gepflanzt (6 Pflanzen pro Gefäß, siehe Abb. 9); zur Kontrolle wurden nicht inokulierte Pflanzen angesetzt. Nach ca. 4 Wochen Wachstum im Gewächshaus wurden die Pflanzen geerntet.



**Abb. 9:** Pflanzung des Gewächshausversuchs im März 2009. Die Varietäten RB72 und RB86 wurden 4 Wochen in einem Gewächshaus des Instituts Agrobiologia inkubiert.

## Probenahme

Die Probenahme von Wurzeln, Blattscheide und Spross der jeweiligen Versuche wurde jeweils im März der Jahre 2007-09 durchgeführt. Angaben zu den während des Projekts bearbeiteten Proben befinden sich in Tab. 3. Direkt nach dem Ausgraben der Wurzel wurden diese vorsichtig in Wasser gewaschen, um anhaftenden Boden bzw. Sand zu entfernen. Die verschiedenen Wurzelarten wurden separiert, die Proben in Teile mit einer Länge von max. 5 cm geschnitten, in Alufolie gewickelt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert. Danach wurden sie entweder anschließend weiterverarbeitet (siehe Kap. 3.2) oder bis zur Verarbeitung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Im Jahr 2007 wurde zusätzlich ein rötlich gefärbter Teil eines Stecklings der Varietät SP70 beprobt (Probe „Red Node“).

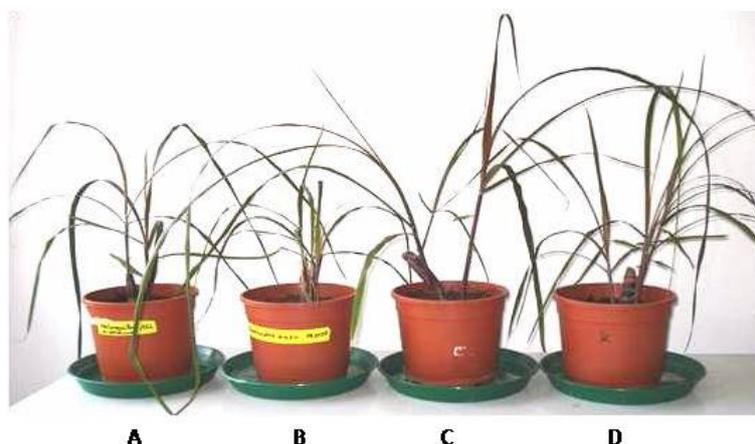
Von allen Proben wurden PFA- und Ethanol-Fixative hergestellt (siehe Kap. 3.14).

Tab. 3: Informationen zu den Proben

Varietät	Jahr	Inokulation	Düngung	Art	Herkunft
SP 70-1143	2007			Wurzel	Tank
SP 70-1143	2007			Steckling	Tank
RB 72-454	2007			Wurzel	Tank
RB 82-5336	2007			Wurzel	Tank
RB 86-7515	2008			Wurzel	Feld
RB 86-7515	2008	X		Wurzel	Feld
RB 86-7515	2008		X	Wurzel	Feld
RB 86-7515	2009	X		Wurzel	Gewächshaus
RB 86-7515	2009	X		Spross	Gewächshaus
RB 86-7515	2009			Wurzel	Gewächshaus
RB 86-7515	2009			Spross	Gewächshaus
RB 86-7515	2009			Wurzel	Feld
RB 86-7515	2009			Spross	Feld
RB 86-7515	2009	flüssig		Wurzel	Feld
RB 86-7515	2009	flüssig		Spross	Feld
RB 86-7515	2009	gel		Wurzel	Feld
RB 86-7515	2009	gel		Spross	Feld
RB 86-7515	2009		X	Wurzel	Feld
RB 86-7515	2009		X	Spross	Feld

### 3.1.2 Inokulationsexperiment

Für Vorversuche der Detektion der Kolonisierung mit diazotrophen Endophyten mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (siehe 3.14) wurden Zuckerrohrstecklinge (inokuliert bzw. nicht behandelt) aus dem Botanischen Garten München in Einheitserde Typ ED 73 Topferde (Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinnatal-Jossa, Deutschland) in Töpfe mit 20 cm Durchmesser gesetzt, bewässert und 4 Monate bei RT inkubiert (siehe Abb. 10). Die Inokulation erfolgte durch Benetzen der frischen Schnittfläche des Stecklings mit einer Bakteriensuspension (ÜN-Kulturen in NB No.4 (Fluka, Buchs, Deutschland), OD 0,8 in 1xPBS (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat, pH 7,4)) von *Herbaspirillum seropedicae* Z67 oder *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5. Zur Probenahme wurden ca. 5 cm lange Wurzelstücke in  $H_2O_{dest.}$  gewaschen und in PFA fixiert (siehe 3.14).



**Abb. 10:** Topfexperiment-Neuherberg; Inokulation mit *Saccharum officinarum*, A: *Herbaspirillum seropedicae* Z67, B: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5, C + D: Kontrollpflanzen ohne Inokulation

### 3.2 Extraktion von Nukleinsäuren

Für die Untersuchung mittels molekularbiologischer Methoden muss die in den Pflanzenproben vorhandene DNA und RNA extrahiert und von Proteinen (z. B. Nukleasen) und inhibierenden Stoffen wie Polyphenolen und Salzen befreit werden. Die Extraktion der in den Proben (Tab. 3) vorhandenen DNA erfolgte mit dem FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (Bio101, La Jolla, CA, USA) nach Herstellerprotokoll. Alternativ erfolgte die Extraktion der Nukleinsäuren modifiziert nach GRIFFITHS *et al.* (2000). Die im Folgenden beschriebenen Lösungen A, D und die Elutionslösung wurden zur Inhibierung von Ribonukleasen DEPC-behandelt, d.h. ÜN mit DEPC (Diethyldicarbonat) inkubiert und autoklaviert. Die bei  $-80\text{ °C}$  tiefgefrorenen Proben wurden in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörsern bzw. in einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) gemahlen. 500 mg des gefrorenen Pulvers wurden in ein „Lyse Matrix E Tube“ (BIO 101, La Jolla, CA, USA) gegeben und mit 250  $\mu\text{l}$  Lösung A1 (10 g CTAB, Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid), 4,09 g NaCl, *ad* 100 ml  $H_2O_{dest.}$ ), mit 250  $\mu\text{l}$  Lösung A2 (240 mM Kalium Phosphat Puffer pH 8,0) und 500  $\mu\text{l}$  Lösung B (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) pH 8, Roti<sup>®</sup>-P/C/I, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die Probe wurde für 30 sec bei der Geschwindigkeit 5,5 m/sec in einer „Fast Prep FP 120“ (Bio 101) homogenisiert, anschließend für 5 min bei 13.200 rpm und  $4\text{ °C}$  mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein steriles, nukleasefreies Reaktionsgefäß überführt, mit demselben Volumen der Lösung C (Chloroform : Isoamylalkohol 24:1, Roti<sup>®</sup>-C/I, Roth) versetzt und erneut für 5 min bei 13.200 rpm und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut in ein steriles, nukleasefreies Re-

aktionsgefäß überführt, mit dem doppelten Volumen an Lösung D (PEG (Polyethylen Glycol 8000 g/mol) 30 g, NaCl 9,36 g, *ad* 100 ml  $H_2O_{dest.}$ , DEPC-behandelt) versetzt und für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 1 ml Lösung E (70 % Ethanol mit  $H_2O_{dest.}$ , -20 °C) versetzt und 2 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mittels einer Vakuumzentrifuge „Speed Vac Concentrator“ (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) vorsichtig getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 30  $\mu$ l  $H_2O_{dest.}$  (DEPC-behandelt) gelöst und bei -80 °C gelagert oder sofort weiterbehandelt.

Nach der Extraktion wurde eine Separierung der RNA von der DNA mithilfe des All-Prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert, die RNA mit RNasin<sup>™</sup> (Ribonuclease Inhibitor, Promega, Madison, WI, USA) laut Herstellerprotokoll versetzt, einem DNA-Verdau mit RQ1 RNase-Free DNase (Promega) laut Herstellerprotokoll unterzogen und bei -80 °C gelagert, bzw. sofort eine cDNA-Synthese durchgeführt.

### 3.3 Qualitative und quantitative Analyse des DNA/RNA-Gehaltes

Zur Nukleinsäure-Bestimmung wurde ein Spektralphotometer NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Mögliche Verunreinigungen des DNA-Extraktes mit Proteinen oder RNA konnten durch Bestimmung der Extinktionsquotienten E260/E280 (Verunreinigung durch Proteine) und E260/E230 (Verunreinigung durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenole und aromatische Verbindungen) ermittelt werden. Für eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren sollten diese einen Wert zwischen 1,8 und 2,2 erreichen (MARMUR, 1961; SAMBROOK und FRITSCH, 1989). Zur qualitativen Bestimmung wurde die extrahierte RNA bzw. DNA außerdem der Agarose-Gel-Elektrophorese unterzogen (siehe 3.7).

### 3.4 Reverse Transkription und Erzeugung von cDNA

Die Transkription der RNA in cDNA mittels einer Zwei-Schritte-Reaktion (d.h. die Transkription und die darauffolgende PCR erfolgen zeitlich versetzt) erfolgte mit einem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden sogenannte Random-Primer (Promega) nach Herstellerprotokoll bzw. die spezifischen Primer 341f und 907r bzw. ZehrF und ZehrR (Tab. 4) eingesetzt.

### 3.5 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR, (MULLIS *et al.*, 1986; SAIKI *et al.*, 1988)) wurden Fragmente der 16S-rRNA Gene und der *nifH* Gene aus den extrahierten Umweltproben, von klonierten Genfragmenten und von Bakterien-Isolaten amplifiziert. Alle Amplifikationen wurden in einem Thermocycler „PEQStar 96 Universal“ (Peqlab Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) oder einem „Primus 96“ (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt, die eingesetzten Primer (Tab. 4) wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) und von Eurofins MWG Biotech synthetisiert. Zur Amplifikation wurde das Kit „TopTaq DNA Polymerase“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses Kit ermöglicht eine Primersequenz-unabhängige, voroptimierte PCR bei 60 °C Annealing-Temperatur, die bei Bedarf variiert werden kann. Durch den „TopTaq-Stabilisator“ ist es möglich, alle Reagenzien des Kits bei 4 °C zu lagern. Durch die Verwendung von „Coral Load“, welches 2 Farbstoffe beinhaltet (rot und orange) und zusätzlich als Ladepuffer fungiert, ist es möglich das PCR-Produkt direkt in die Geltaschen zu füllen ohne einen zusätzlichen Ladepuffer zum Beschweren der DNA zu verwenden (vgl. Kap. 3.7 und 3.8). Die im Kit mitgelieferte „Q-Solution“ wurde bei Vorhandensein von PCR-inhibierenden Substanzen, wie z. B. Huminsäuren und Proteine, eingesetzt. Die PCR wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, in Tab. 5 ist ein Reaktionsansatz für die PCR beschrieben.

**Tab. 4:** Verwendete Primer: † Bindungsposition im 16S-rRNA Gen von *E. coli* (BROSIUS *et al.*, 1981); F: Vorwärtsprimer; R: Rückwärtsprimer; IUPAC-IUB-Nomenklatur; \* Bindungsposition im *nifH*-Gen von *Trichodesmium thiebautii* (ZEHR und McREYNOLDS, 1989); # Nested PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Bindungsposition	Annealing-Temperatur	Referenz
27F	AGA-GTT-TGA-TCM-TGC-TCA-G	27 †	56, 5 °C	(LANE, 1991)
1492R	ACG-GYT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	1518 †	56, 5 °C	(WEISBURG <i>et al.</i> , 1991)
341F	CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG	341 †	56, 5 °C	(MUYZER <i>et al.</i> , 1996)
907R	CCG-TCA-ATT-CCT-TTA-AGT-TT	926 †	56, 5 °C	(MUYZER <i>et al.</i> , 1996)
M13F	TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AG	Klonierungsvektor	55, 0 °C	pCR <sup>®</sup> 2.1- TOPO TA Cloning Kit
M13R	CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC	Klonierungsvektor	55, 0 °C	pCR <sup>®</sup> 2.1- TOPO TA Cloning Kit
Zehr- <i>nifHF</i>	TGY-GAY-CCN-AAR-GCN-GA	115 *	55, 7 °C	(ZEHR und McREYNOLDS, 1989)
Zehr- <i>nifHR</i>	ADN-GCC-ATC-ATY-TCN-CC	457 *	55, 7 °C	(ZEHR und McREYNOLDS, 1989)
RoeschF	AAA-GGY-GGW-ATC-GGY-AAR-TCC-ACC-AC	34 *	55, 0 °C	(RÖSCH <i>et al.</i> , 2002)
RoeschR	TTG-TTS-GCS-GCR-TAC-ATS-GCC-ATC-AT	466 *	55, 0 °C	(RÖSCH <i>et al.</i> , 2002)
PolyF	TGC-GAY-CCS-AAR-GCB-GAC-TC	115 * #	55, 0 °C	(POLY <i>et al.</i> , 2001)
PolyR	ATS-GCC-ATC-ATY-TCR-CCG-GA	457 * #	55, 0 °C	(POLY <i>et al.</i> , 2001)
Roesch <i>nifHF</i>	ACC-CGC-CTG-ATC-CTG-CAC-GCC-AAG-G	136 * #	55, 0 °C	(ROESCH <i>et al.</i> , 2006)
Roesch <i>nifHR</i>	ACG-ATG-TAG-ATT-TCC-TGG-GCC-TTG-TT	427 * #	55, 0 °C	(ROESCH <i>et al.</i> , 2006)
UedaF	GCI-WTY-TAY-GGI-AAR-GGI-GG	19 *	58, 1 °C	(UEDA <i>et al.</i> , 1995)
UedaR	AAL-CCR-CCR-CAL-ACL-ACR-TC	407 *	58, 1 °C	(UEDA <i>et al.</i> , 1995)
WidmerF	GCN-WTN-TAY-GGN-AAR-GGN-GG	19 *	57, 2 °C	(WIDMER <i>et al.</i> , 1999)
WidmerR	GCR-TAN-ABN-GCC-ATC-ATY-TC	451 *	57, 2 °C	(WIDMER <i>et al.</i> , 1999)
GC-Klemme	CGC-CCG-GGG-CGC-GCC-CCG-GGC-GGG-GCC-GGG-GCA-CCG			(MUYZER <i>et al.</i> , 1993)

Jede PCR begann mit 5 min Denaturierung bei 94 °C. Darauf folgten die Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 1 min, Annealing bei der Primer-spezifischen Temperatur (Tab. 4) für 30-60 sec. Es folgte die Elongationsphase bei 72 °C, je nach Fragmentlänge für 30-60 sec. Als letzter Schritt wurde eine finale Elongation bei 72 °C für 10 min durchgeführt. Je nach Art und Konzentration der eingesetzten DNA wurde die Zyklenzahl zwischen 29 und 35 variiert.

**Tab. 5:** Reaktionsansatz für die PCR, F: Vorwärts(primer), R: Rückwärts(primer)

Reagenz	Volumen in $\mu$ l
PCR-Puffer (10x)	5
CoralLoad (10x)	5
Q-Solution	0-5
dNTPs (8 mM)	2-5
Primer F	0,2-2
Primer R	0,2-2
TopTaq	0,25
DNA	20-150 ng
$H_2O$ (NFW)	ad 50

## Varianten der PCR

### 3.5.1 Gradienten-PCR

Zur Optimierung einer PCR wurde eine Gradienten-PCR in einem „Primus 96 plus“ Cycler (Peqlab Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Nach RYCHLIK *et al.* (1990) ist die experimentelle Überprüfung und Optimierung der theoretisch bestimmten Annealing-Temperatur unabdingbar, da Temperaturen unter oder über dem Optimum zu unspezifischen Produkten führen und unter dem Optimum die Produktausbeute verringern können. Bei dem verwendeten Gerät konnten gleichzeitig 12 verschiedene Annealing-Temperaturen getestet werden, bei denen im selben PCR-Ansatz DNA der Zuckerrohrproben bzw. für die Amplifikation der *nifH*-Gene DNA von Bakterienreinkulturen mit *nifH*-Genen (Tab. 2) und ohne *nifH*-Gene (z. B. *E. coli* TOP 10) eingesetzt wurden. Die erhaltenen PCR-Produkte gaben dabei Aufschluss über Erfolg und Spezifität der jeweils eingesetzten Primerpaare und Annealingtemperaturen. Nach Ermittlung des spezifischen PCR-Programms für die 16S-rRNA und die *nifH*-Gene wurde dessen Spezifität durch Klonierung und Sequenzierung überprüft. Die Gradienten-PCR wurde eingesetzt, um aus unterschiedlichen Proben spezifische Produkte zu erhalten.

### 3.5.2 Touch-Down-PCR

Da trotz Optimierung durch Gradienten-PCR bei manchen Experimenten keine spezifische Bande amplifiziert werden konnte, wurde eine sog. Touch-Down-PCR durchgeführt. Diese PCR-Variante gliedert sich in zwei Abschnitte, A und B. Im PCR-Abschnitt A ist die gewählte Annealing-Temperatur höher als im Abschnitt B und wird pro Zyklus um 0,5 °C gesenkt, bis die Annealing-Temperatur von A der von B entspricht. Dadurch werden in den Anfangszyklen der PCR (A) eine unspezifische Anlagerung der Primer an die Ziel-DNA verhindert, so dass bei der eigentlichen Annealing-Temperatur (B) nur spezifische Gensequenzen amplifiziert werden (DON *et al.*, 1991). Hierbei wurden die Annealing-Temperaturen im 9 Zyklen langen Abschnitt A anfangs um 5 °C höher gewählt als im Abschnitt B (20 Zyklen).

### 3.5.3 Nested-PCR

Falls, wie bei den *nifH*-Genen, keine Amplifikation nach 3.5.1 und 3.5.2 direkt erzielt werden konnte, wurde eine sogenannte Nested-PCR (geschachtelte PCR) eingesetzt (Abb. 11). Das Prinzip der Nested-PCR beruht auf der Amplifikation eines DNA-Fragments, welches dann als Target für die zweite PCR fungiert. In dieser Arbeit wurde die Nested-PCR mit den Primern von POLY *et al.* (2001) und ROESCH *et al.* (2006) (Tab. 4) verwendet, welche in der Arbeit von ROESCH *et al.* (2006) beschrieben wurde. Bei beiden PCRs wurde mit 33 Zyklen gearbeitet.

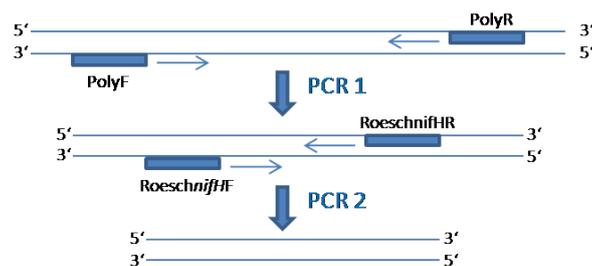


Abb. 11: Prinzip der Nested-PCR

### 3.5.4 PCR für die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese

Für die Amplifikation von DNA zur anschließenden Denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese (siehe 3.12) wurden zwei spezielle Primer (Primer 341F und Primer Zehr-*nifHF*, siehe Tab. 4) mit GC-Klemme entwickelt. Durch 5'-terminale Verlängerung des spezifischen Vorwärts-Primers mit Oligo-GC-Sequenzen wird die spätere Trennung der DNA-Fragmente in der DGGE aufgrund ihrer unterschiedlichen Basenzusammensetzung ermöglicht.

### 3.5.5 Kolonie-PCR

Für die Analyse der korrekten Insertionen bei Klonierungsexperimenten zur Überprüfung der Insert-Länge und für die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse (siehe 3.8) wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Zur Amplifikation wurden die Vektor-flankierenden Primer M13F und M13R (siehe 4) verwendet. Als Target wurde Zellmaterial von einer Agarplatte (siehe 3.9) mit sterilen Pipettenspitzen direkt in einen vorbereiteten Mastermix gegeben.

## 3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Weiterverwendung von PCR-Produkten zur Sequenzierung, Reamplifikation, Klonierung oder für den Einsatz in die RealTime-PCR muss die DNA von störenden Stoffen wie Primern, Salzen, Polymerasen, Glycerin und Farbstoffen getrennt werden. Bei der Aufreinigung wird die DNA reversibel an eine Silikamatrix gebunden. Ungebundene Komponenten wie nicht umgesetzte Primer, Nukleotide, Enzyme, Salze und Farbstoffe werden in einem ethanolhaltigen Puffer gelöst und durch Zentrifugation von der Matrix bzw. vom PCR-Produkt abgetrennt. Anschließend wird die DNA mittels Zentrifugation mit PCR- $H_2O$  von der Matrix gelöst. Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) mittels Tischzentrifuge laut Protokoll durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde in 15–50  $\mu$ l PCR- $H_2O$  aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 3.7 Horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese

Der Erfolg der DNA-Extraktion, PCR und Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Durch diese Methode lassen sich DNA-Fragmente zwischen 0 und 25 kb anhand ihrer Größe voneinander trennen und mit einer Färbung sichtbar machen. Anhand der Intensität der Banden kann mithilfe eines Markers eine Aussage über den DNA-Gehalt in der Probe getroffen werden. Extrahierte DNA (2–4  $\mu$ l) mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau in Glycerinlösung, 30 %, oder 6xLoading Dye, Fermentas) bzw. 5  $\mu$ l des PCR-Produktes wurde in die Taschen eines 1,2 % igen Agarose-Gels pipettiert. Pro Taschenreihe wurde ein Marker, 100 bp oder 1 kb Ladder (Generuler<sup>™</sup>, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) für die Fragmentlängenkontrolle und die Quantifizierung eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophorese-Kammer in 1xTAE Puffer (siehe Tab. 6) für 25 min bei 130 V.

**Tab. 6:** Zusammensetzung des TAE-Puffers

Reagenz	Menge
Trisbase	242,00 g
Essigsäure	57,10 ml
EDTA (0,5 M)	100,00 ml
$H_2O_{dest.}$	ad 1000 ml
ph	7,4

Die Gele wurden mit Ethidiumbromid ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ca. 20 min gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen mit bis zu 3 Molekülen pro 10 Basen. Dadurch verändert sich das Anregungsspektrum des Farbstoffes und durch Anregung mit ultraviolettem Licht wird die Fluoreszenzintensität stark erhöht. Die Gele wurden mit einer „Image System Felix 6000“ (mit DH-40/50, Biostep, Jahnsdorf, Deutschland)-Apparatur betrachtet, das Ergebnis wurde mit der Software „Argus X1“ fotografisch dokumentiert und das Foto mit der Software „Totallab 100“ bearbeitet.

Mit der Agarose-Gel-Elektrophorese ist es zudem möglich, die gewünschten Produkte von zusätzlichen PCR-Produkten zu trennen. Dafür wurde das Gel dicker gegossen und mit einem größerem Volumen an PCR-Produkt beladen, um die Ausbeute zu erhöhen. Nach der Elektrophorese wurde das Fragment der richtigen Länge mit „X-Tracta“ (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland) ausgestochen und einer Aufreinigung unterzogen (siehe 3.6).

### 3.8 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse

Durch die Anwendung von Restriktionsendonukleasen lassen sich DNA-Amplifikate analoger Gene von unterschiedlichen Organismen schnell untersuchen. Durch Schneiden an spezifischen Restriktionsschnittstellen wird die DNA in Fragmente geteilt, die nach der Auftrennung mit der horizontalen Agarose-Gel-Elektrophorese als charakteristische Bandenmuster zu erkennen sind. Zur Vorbereitung wurde eine PCR der Klon-Kolonien mit den M13 Promotorsequenzen als Target, die die *multiple cloning site* flankieren, durchgeführt (siehe 3.5 und 3.9). Je  $10\ \mu\text{l}$  des PCR-Produkts wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Msp I* und *Rsa I* (Fermentas) nach Herstellerprotokoll versetzt und ÜN bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde eine horizontale Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 3.7) mit einem 3 % igen Agarose-Gel bei 70 V durchgeführt.

### 3.9 Klonierung von Gen-Fragmenten

Um die Diversität an unterschiedlichen vorhandenen 16S-rRNA bzw. *nifH*-Genen der Proben zu vereinzeln, wurde die molekulare Klonierung verwendet. Hierfür wurden die amplifizierten (siehe 3.5) und aufgereinigten (siehe 3.6) DNA-Fragmente mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerprotokoll in den linear vorliegenden Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO ligiert und der rekombinante Vektor in *Escherichia coli* TOP10 Zellen transformiert. Die Inkubation ÜN bei 37 °C erfolgte unter Selektionsdruck (Kanamycin, 50µg/ml). Zur Überprüfung der korrekten Insertion wurde anschließend eine Kolonie-PCR (siehe 3.5.5) durchgeführt, im Folgenden wurden ausgewählte Plasmide isoliert (siehe 3.10).

### 3.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA der rekombinanten *E. coli*-Zellen wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit mittels Tischzentrifuge bzw. mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kit 96 (Macherey & Nagel) dem Herstellerprotokoll entsprechend extrahiert. Bei Extraktion mittels 96-Well-Platte wurden 4 ml ÜN-Kultur anstatt der empfohlenen 2 ml verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen.

### 3.11 Sequenzierung von Gen-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten nach der Aufreinigung (siehe 3.5 und 3.6) erfolgte mit dem BigDye Terminator (BDT) v3.1 Sequenzierkit (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerprotokoll mit einem DNA-Kapillarsequenzierautomaten ABI 3730 (Applied Biosystems) nach SANGER *et al.* (1977).

### 3.12 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Durch Einsatz weiterer molekularbiologischer Methoden wie DGGE und Sequenzierung können anhand der gewonnenen vervielfältigten DNA-Fragmente Bakterien identifiziert und phylogenetisch eingeordnet werden (WOESE, 1987). Durch die Methode der Denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) lassen sich DNA-Fragmente derselben Länge aufgrund ihrer verschiedenen Basenzusammensetzung und dem damit verbundenen spezifischen Schmelzverhalten des Fragments trennen. Diese Technik wird erfolgreich zur Identifikation von Sequenzunterschieden PCR-amplifizierter 16S-rRNA Genfragmente bei einer Vielzahl von Genen verschiedener Organismen ange-

wandt (MUYZER *et al.*, 1993; DEMBA DIALLO *et al.*, 2004). Die Trennung erfolgt in einem 6 % Polyacrylamidgel (Acrylamid-N,N-Methylbisacrylamid, 37:1, Roth, Karlsruhe, Deutschland), in das ein Gradient denaturierender Reagenzien (Formamid und Urea) gegossen wird. Das unterschiedliche Schmelzverhalten kommt durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen (Adenin und Thymin: 2, Cytosin und Guanin: 3) zustande, eine GC-reiche Sequenz schmilzt später auf als eine AT-reiche. Um ein vollständiges Aufschmelzen der DNA in Einzelstränge zu verhindern wird ein Primer eingesetzt, der eine GC-Klemme besitzt (3.5.4, Tab. 4). Mit dem so erhaltenen Bandenmuster kann die qualitative genetische Diversität der natürlichen bakteriellen Gemeinschaft ermittelt und durch Vergleiche der speziellen „Fingerabdrücke“ der Standorte verglichen werden (KANE *et al.*, 1993; MUYZER *et al.*, 1993; TESKE *et al.*, 1996).

Die DGGE wurde modifiziert nach MUYZER und SMALLA (1998) mit einem Formamid-Harnstoff-Gradienten von 40 bis 70% (100% Harnstoff = 0,625 mol, 100% Formamid = 40% (vol/vol)) durchgeführt. Pro 10 ml Lösung wurden 7  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 35  $\mu$ l APS (Ammonium-Persulfat, 10 %) zugegeben. Das Gel wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer peristaltischen Pumpe gegossen. Nach dem Aufbau des Gradienten wurde ein Kamm mit 32 Taschen eingesetzt. Das Gradientengel wurde mit 10 ml einer Lösung ohne denaturierende Substanzen (2 ml 1xTAE mit 8 ml 0 % Lösung, Tab. 7) überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit PCR-Produkten beladen. Die Menge der aufgetragenen PCR-Produkte variierte zwischen 5 – 25  $\mu$ l bei Umweltproben und 2 – 5  $\mu$ l bei Isolaten, um vergleichbare Bandenmuster zu erhalten. Für die Vergleichbarkeit einzelner Gele wurde ein laborinterner Standard aufgetragen (5  $\mu$ l), der aus den inokulierten Stämmen (Tab. 2) stammt.

**Tab. 7:** Reagenzien für ein Formamid-Urea-Gradienten-Gel

Reagenzien	0-prozentige Lösung	80-prozentige Lösung
Bis-Acrylamid (40 %)	22,5 ml	22,5 ml
TAE-Puffer (50x)	3 ml	3 ml
Formamid	-	48 ml
Urea	-	50,4 g
Auffüllen mit $H_2O_{dest. ad}$	150 ml	150 ml
Volumen [ml] für 40 %-ige Lösung	12 ml	12 ml
Volumen [ml] für 70 %-ige Lösung	3 ml	24 ml

Die Elektrophorese wurde für mindestens 20 Stunden bei 100 V und 60 °C (Laufpuffer 1xTAE, pH 8.3) in einer „Ingeny phorU-2“-Elektrophoresekammer (Ingeny, Leiden, Niederlande) durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Gel 30 min in SYBR Gold-Lösung (25  $\mu$ l SYBR Gold, in 250 ml 1xTAE, Molecular Probes, PoortGebouw, Leiden, Nie-

derlande) gefärbt, 10 min mit  $H_2O_{dest.}$  entfärbt und mit „Image System Felix 6000“ ausgewertet. Die Analyse des digitalen Bildes erfolgte mit der Software „Gelcompare 2.0“ (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien). Das Ausschneiden von Banden erfolgte mit einem sterilen Skalpell. Die Banden wurden in  $30 \mu\text{l}$  PCR- $H_2O$  zur Resuspension der DNA aus den Gelstückchen aufgenommen und zur Elution über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Bearbeitung (Reamplifikation, siehe 3.5) bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.13 Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software FinchTV 1.4 (Geospiza, Seattle, WA, USA, <http://www.geospiza.com>) korrektur gelesen und die Vektor- bzw. Primersequenzen abgeschnitten. Zum Erstellen der kompletten 16S-rDNA wurden die Teilsequenzen mit der Sequenzanalyse-Software SeqMan (Lasergene<sup>®</sup> v7.1, DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) zu Gesamtsequenzen zusammengefügt. Alle erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der online angebotenen Suchmaschine „BLAST“ (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (ALTSCHUL *et al.*, 1997) mit den in der Datenbank GeneBank vorhandenen Sequenzen verglichen. Zum Zusammenfassen mehrerer Sequenzen wurden diese in der Software BioEdit v7.0.5 ([www.mbio.ncsu.edu](http://www.mbio.ncsu.edu)) importiert und auf degenerierte Basen geprüft. Chimären wurden mit den online verfügbaren Programmen Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>, HUBER *et al.* (2004)), Pintail und Mallard ([www.bioinformatics-toolkit.org](http://www.bioinformatics-toolkit.org), ASHELFORD *et al.* (2005)) und Chimera Check von RDP ([www.rdp.cme.msu.edu](http://www.rdp.cme.msu.edu), COLE *et al.* (2003)) detektiert, überprüft und, falls erforderlich, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die phylogenetische Analyse der erhaltenen Sequenzdaten der 16S-rRNA und -DNA erfolgte zunächst mit dem Online-Tool „Classifier“ von RDP ((WANG *et al.*, 2007), <http://rdp.cme.msu.edu>), welches Sequenzen zw. 400 und 1500 bp bis zur Ebene der Gattung klassifiziert. Die Sequenzen wurden mit dem online verfügbaren Aligner von [www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de) (PRUESSE *et al.*, 2007) aligned und in das Softwarepaket ARB (LUDWIG *et al.*, 2004) mit der aktuellsten verfügbaren Datenbank der 16S-Gene (SILVA SSU 100, high quality, *Bacteria*-Sequenzen >1200 bp) importiert und das Alignment manuell korrigiert. Die Dendrogramme zur Rekonstruktion phylogenetischer Verwandtschaften wurden nach der Maximum-Parsimony- (FITCH, 1966), Neighbor-Joining- (SAITOU und NEI, 1987) und Maximum-Likelihood- (FELSENSTEIN, 1981) Methode erstellt. Alle Baumberechnungsverfahren waren im Programmpaket ARB implementiert. Die Matrix der paarweisen Distanzwerte diente als Grundlage zur Dendrogramm-Rekonstruktion nach der Neighbor-Joining-Methode (SAITOU und NEI, 1987). Mittels Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Analysen wurde

die Topologie der Dendrogramme überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

### 3.14 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ermöglicht es, Mikroorganismen kultivierungsunabhängig direkt in ihrem natürlichen Habitat zu lokalisieren und zu quantifizieren (AMANN *et al.*, 1995; WAGNER *et al.*, 2003; GIOVANNONI *et al.*, 1988). Als Zielmolekül dient die ribosomale RNA (16S und 23S), welche sich wegen ihrer funktionellen Konstanz, der hohen Kopienzahl und der Struktur mit unterschiedlich variablen und konservierten Bereichen ideal eignet und daher auch als phylogenetisches Markermolekül bezeichnet wird. Bei der Analyse von rRNA-Sequenzen wurden sogenannte Signatursequenzen entdeckt, kurze Oligonukleotide, die für eine Gruppe von Organismen einmalig sind (WOESE, 1987). Diese, gegen die ribosomale RNA gerichteten, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden werden eingesetzt und je nach Spezifität der Sonde wird eine Unterscheidung der Bakterien bis auf Artniveau ermöglicht.

Eine entsprechende Behandlung der Zellen (Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) oder 50 % Ethanol) sorgt für den Formerhalt der Zellen und damit für eine längere Haltbarkeit bei der Aufbewahrung. Hybridisiert wird mit Oligonukleotidsonden, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind (siehe Tab.8). Zudem inhibieren verschiedene Fixative Enzyme wie RNasen und verbessern die Bindung von spezifischen Sonden bzw. Farbstoffen. In dieser Arbeit wurden Pflanzenteile nach dem Reinigen mit  $H_2O$  schnellstmöglich in 4 % PFA fixiert, ÜN bei 4 °C inkubiert, zweimal mit 1xPBS gewaschen und in 1:1 EtOH:PBS bei -20 °C gelagert. Zusätzlich dazu wurden Pflanzenteile in 1:1 EtOH:PBS ÜN bei 4 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert. Da die Zugänglichkeit von endophytisch siedelnden Bakterien für 16S-rRNA gerichtete Oligonukleotid-Sonden jedoch begrenzt ist, erfolgte ebenfalls die Anfertigung von Wurzel- und Blattscheidenschnitten. Hierzu wurde ein Stück der in EtOH:PBS gelagerten fixierten Wurzel zwischen zwei kleine Styroporblöcke eingeklemmt und zusammengedrückt. Mit einer halbierten Rasierklinge wurden mehrere, zwischen 30 und 100  $\mu\text{m}$  dicke Quer- oder Längsschnitte von allen Teilen der fixierten Wurzel, der Spross-epidermis und der Blattscheide angefertigt. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnte an ungeschnittenen jungen Wurzelstücken durchgeführt werden. Die FISH-Analyse wurde modifiziert nach ASSMUS *et al.* (1995) durchgeführt. Nach der Dehydratisierung (Entwässerung des Gewebes, stufenweise mit 50 %, 80% und 96% Ethanol) wurden die Pflanzenschnitte in 2 ml Reaktionsgefäße mit 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer nach ROTHBALLER (2003) gegeben, in den je 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Sonde gemischt wurde. Verwendete Oligonukleotidsonden, ihre Spezifität und die für die Stringenz optimale Formamidkonzentration sind in Tabelle 8 aufgeführt. Erst nach

der Hybridisierung und einem stringenten Waschschrift der Fixative wurden die Proben auf Objektträger (Roth) gegeben, mit einem Tropfen Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) benetzt und mit einem Deckglas versehen.

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotidsonden

Sonde	Spezifität	Bindungsposition	Sequenz	% FA	Referenz
EUB-338 I	<i>Bacteria</i>	16S, 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	35	(AMANN <i>et al.</i> , 1990)
EUB-338-II	<i>Planctomycetales</i>	16S, 338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	35	(DAIMS <i>et al.</i> , 1999)
EUB-338-III	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	35	(DAIMS <i>et al.</i> , 1999)
NON-EUB		16S, 338-355	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	35	(NEEF, 1997)
ALF1b	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	16S, 19-35	CGT TCG YTC TGA GCC AG	20	(MANZ <i>et al.</i> , 1992)
ALF968	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	16S, 968-985	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	20	(WALLNER <i>et al.</i> , 1993)
BET-42a	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35	(MANZ <i>et al.</i> , 1992)
GAM-42a	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	23S, 338-355	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	(MANZ <i>et al.</i> , 1992)
Azoama-1250	<i>Azospirillum amazonense</i>	16S, 1250-1266	CAC GAG GTC GCT GCC C	60	(STOFFELS <i>et al.</i> , 2001)
Glac-1430	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	16S, 1430-1443	TTC GCT CAC CCG CT	35	(STOFFELS <i>et al.</i> , 2001)
Hsero-445	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	16S, 445-462	GCC AAA ACC GTT TCT TCC	35	(KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001)
Herb-1432	<i>Herbaspirillum</i>	16S, 1432-1449	CGG TTA GGC TAC CCA CTT	50	(KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001)
Burkho	<i>Burkholderia</i> spp.	16S	ACC CTC TGT TCC GAC CAT	30	(HOGARDT <i>et al.</i> , 2000)

Für die Präparation von Wurzelschnitten wurden diese jeweils in einen Tropfen  $H_2O_{dest.}$  auf einen Objektträger (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) bzw. in ein 2 ml Reaktionsgefäß von Eppendorf gelegt. Nach der Hybridisierung (s. o.) mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden konnten die auf der Wurzel siedelnden Zellen mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops (CLSM) detektiert werden.

### 3.14.1 CARD-FISH

Die Catalyzed Reporter-Deposition-FISH (CARD-FISH) ist eine Variante der FISH, bei der die Oligonukleotid-Sonden an ihrem 5'-Ende über eine Thioharnstoffbindung mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert sind, welche nach der Hybridisierung an die rRNA und Zugabe von fluorogen-markiertem Substrat (Tyramidderivate) fluoreszierende Farbstoffe akkumulieren und daher ein deutlich stärkeres Signal aufweisen als bei herkömmlicher FISH. Das Substrat wird umgesetzt, radikalisiert und es bindet vornehmlich an aromatische Aminosäuren in der Zelle. Durch die stetige Umsetzung durch das Enzym Peroxidase wird eine interne Amplifikation der Fluoreszenzintensität erzielt. Das Prinzip der CARD ist seit 1989 bekannt (BOBROW *et al.*, 1989), die CARD-FISH wird seit 1998 in der mikrobiellen Ökologie angewandt (WAGNER *et al.*, 1998; PERNTHALER *et al.*, 2002). Hierzu wurden Dünnschnitte von fixierten Pflanzenteilen (siehe 3.14) dehydratisiert und einer Lysozym- bzw. Achromtopetidasebehandlung (Carl Roth) nach Herstellerprotokoll unterzogen, um das Eindringen der durch die Konjugation mit der HRP wesentlich größeren Sonden in die Zellen zu ermöglichen. Nach dieser Vorbehandlung der Präparate wurden diese in 100  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (TRIS 0,1 M, NaCl 0,15 M, Blocking Reagent 0,5 %, Formamid 57 %) mit 20  $\mu$ l der Oligonukleotidsonde (POD-EUB-338 I, II, III, (PERNTHALER *et al.*, 2002; AMANN *et al.*, 1990; DAIMS *et al.*, 1999)) gegeben und für 30 min bei 35 °C hybridisiert. Anschließend wurden die Präparate für 10 min bei 35 °C gewaschen (Waschpuffer TRIS 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween20 0,05 %). Nach dem Entfernen nicht-hybridisierter Oligonukleotid-Sonden wurden die Präparate dreimal für 5 min in TNT-Waschpuffer geschwenkt, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Nach Herstellerangabe wurde die TSA Lösung zugegeben und für 10 min im Dunkeln inkubiert (NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, Boston, USA). Anschließend wurden die Präparate erneut dreimal für 5 min in TNT-Waschpuffer geschwenkt, um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen. Schließlich wurden die Präparate auf einen Standard-Objektträger gelegt, mit Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingebettet, mit einem Deckglas bedeckt und mikroskopiert.

### 3.15 Detektion der stickstofffixierenden Bakterien mittels Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenz eignet sich als eine hochspezifische Identifizierungsmethode, um je nach Spezifität des Antikörpers eine Unterscheidung der Mikroorganismen bis auf Art- bzw. Stammniveau zu treffen oder um spezielle Enzyme zu detektieren (SCHLOTER und HARTMANN, 1996; HARTMANN *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurden primäre polyklonale Antikörper eingesetzt, welche an die Nitrogenase Reduktase bzw. die Nitrogenase binden ( $\alpha - rR - nifH$  und  $\alpha - rR - nifDK$ ). Die Antikörper wurden aus Hase (Rabbit) *Mango* gewonnen und von Stefan Nordlund und Agneta Noren der Universität Uppsala zur Verfügung gestellt. Sekundäre Antikörper „Goat Antirabbit  $\alpha - arb$ “ mit Cy3-Markierung wurden von AbCam (Cambridge,UK) bezogen.

Wurzel-Dünnschnitte wurden aus PFA-fixierten Proben angefertigt (siehe 3.14) und bis zur weiteren Bearbeitung in 1xPBS gelagert. Als erstes wurden die Dünnschnitte in 1 ml Blockierlösung (3 % w/v BSA in 1xPBS) für 30 min bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Blockierlösung entfernt und 1 ml Waschpuffer (0,1 % BSA w/v in 1xPBS) und 0,2  $\mu$ l des primären Antikörpers (entspricht 1 : 5000 bei  $\alpha - rR - nifH$  und 1 : 7000 bei  $\alpha - rR - nifDK$ , persönl. Komm. Agneta Noren) zugegeben und bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nach dem Entfernen der Waschlösung mit dem primären Antikörper wurde 1 ml 3xWaschpuffer mit 0,5  $\mu$ l sekundärem Antikörper Antirabbit  $\alpha - arb$  zugegeben (1 : 2000) und bei gleichen Bedingungen für 45 min inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Schnitte mit 5xWaschpuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen und auf einen Objektträger mit Citifluor-AF1 eingebettet.

Als Positivkontrollen wurden die als Inokulate verwendeten Bakterienarten (siehe Tab. 9, oberer Teil) eingesetzt, nachdem sie auf NB-Medium (Nutrient Broth) bzw. dem speziellen stickstofffreien Medium gewachsen waren und anschließend einer PFA-Fixierung unterzogen wurden. Als Negativkontrolle wurden PFA-Fixative von den im unteren Teil der Tabelle aufgelisteten Bakterienstämme verwendet, da diese keine *nif*-Gene besitzen.

**Tab. 9:** Verwendete Bakterienstämme zur Überprüfung der Antikörper. Die Stämme wurden in Vollmedium (NB 4), die diazotrophen zusätzlich in Stickstofffreiem Medium angezogen.

Bakterium	Stammbezeichnung	Medium
<i>Azospirillum amazonense</i>	DSM 2787	LGI (Saccharose) (CAVALCANTE und DOEBEREINER, 1988)
<i>Burkholderia tropica</i>	PPe8	Nfb (Malat) (DÖBEREINER, 1995)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	DSM 5601	Nfb (Mannitol) (DÖBEREINER, 1995)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	LMG 2286	Nfb (Malat) (DÖBEREINER, 1995)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	LMG 2284	Nfb (Malat) (DÖBEREINER, 1995)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 <sup>T</sup>	
<i>Salmonella enterica</i>	DSM 10062	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071 <sup>T</sup>	

### 3.16 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Diese mikroskopische Technik unterscheidet sich in einigen wesentlichen Eigenschaften von der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie und zeichnet sich vor allem darin aus, 3-dimensionale Bilder von dickeren Objekten (größer als  $10\ \mu\text{m}$ ), wie beispielsweise von Wurzeln, zu erzeugen. Dabei werden Bildstapel zu einem 3D-Bild zusammengefügt, von denen nur das Licht aus der Fokusebene detektiert wird. Dadurch lässt sich die starke Autofluoreszenz von Pflanzengewebe minimieren. Bei einem Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) erfolgt die Fluoreszenzanregung einzelner Punkte eines Pflanzenschnittes mit Hilfe eines Lasers, welcher Licht einer definierten Wellenlänge (monochromatisches Licht) liefert. Durch einen Scan-Spiegel wird die Fokusebene Punkt für Punkt mit einem Laser abgetastet, wobei ein Strahlteiler verwendet wird, der das kurzwelligere Anregungslicht passieren lässt und die resultierende langwelligere Fluoreszenz umlenkt. Das Licht wird so auf eine konfokale Lochblende fokussiert, welches nur Strahlen von der Fokusebene die Blendenöffnung (pinhole) passieren können, während unfokussiertes Licht außerhalb der Fokusebene abgeblockt wird. So ist bis zu einer Tiefe von ungefähr  $40\ \mu\text{m}$  innerhalb des Präparats eine scharfe Abbildung der Fokusebenen ohne störendes Streulicht möglich. Die Signale, welche die Lochblende passieren, werden von einem Photomultiplier detektiert und als digitale Signale an einen Rechner weitergeleitet. Die einzelnen Bildpunkte werden hier zu einer zweidimensionalen Grauton-Aufnahme zusammengesetzt, die einen optischen Schnitt durch das Präparat in der Fokusebene darstellt. Mit Hilfe der Software Zeiss LSM Image

Browser Version 2.80 ist man in der Lage das entstandene Bild digital aufzubereiten und auszuwerten. In erster Linie werden dabei dem detektierten Grautonbild Farbk채n채le zugeordnet, welche die Wellenl채ngenspezifit채t der einzelnen Fluoreszenzsignale verdeutlichen sollen. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Bildern wurden den Fluorochromen Fluorescein (Fluos) und Cy3 ihre tats채chlichen Fluoreszenzfarben grюн bzw. rot zugeordnet, w채hrend die Cy5-Fluoreszenz blau dargestellt wurde, obwohl der Farbstoff im langwelligeren roten Bereich emittiert. Dies wurde aufgrund der besseren Unterscheidbarkeit der einzelnen Fluoreszenzsignale bei der gemeinsamen Darstellung als RGB (rot-grюн-blau)-Bilder vorgenommen. Mit Hilfe des CLSMs ist es mцglich, dreidimensionale Darstellung eines Objekts zu erzeugen, indem unter Ver채nderung der Fokusposition entlang der z-Achse in regelm채遝igen, definierten Abst채nden Aufnahmen von einem bestimmten xy-Bereich gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit betrug dieser Abstand  $1\ \mu\text{m}$ . Die so erzeugten optischen Schnitte (stacks) werden im Rechner zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefugt, das z. B. im sogenannten orthogonalen Darstellungsmodus ohne weitere Hilfsmittel betrachtet und analysiert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien und zur Visualisierung deren r채umlichen Verteilung im Wurzelraum ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510.meta, ZEISS, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einem Argon- und zwei Helium-Neon-Lasern verwendet. Ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat<sup>®</sup> 63x/1,2 W Korr mit 63facher Vergrцößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 stand fцr die Betrachtung biologischer Pr채parate in w채ssrigem Medium zur Verfцgung. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe der Software Zeiss LSM Image Browser Version 2.80.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekularbiologische Analyse

#### 4.1.1 Nukleinsäure-Extraktion

Die in dieser Arbeit extrahierten Nukleinsäuren wurden mit Hilfe der photometrischen Analyse mit einem Nanodrop<sup>®</sup>-Spektralphotometer (siehe Kap. 3.3) und der Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.7) untersucht. Bei der Extraktion der DNA konnte ein DNA-Gehalt zwischen 50 und 300 ng/ $\mu$ l gemessen werden. Bei der Extraktion der RNA konnte ein RNA-Gehalt von 30-150 ng/ $\mu$ l gemessen werden. Bei allen Extraktionen wurden Extinktionsquotienten von 1,7 bis 2,2 bei E260/E280 und E260/E230 gemessen. Somit konnte eine optimale molekularbiologische Analyse gewährleistet werden.

#### 4.1.2 Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion

##### 16S ribosomale Gene

Eine Überprüfung der in dieser Arbeit eingesetzten PCR-Primer für die 16S-rDNA, welche als universell publiziert sind und die Gesamtheit der Domäne *Bacteria* erfassen sollten, erfolgte mittels des Online-Tools probe match der RDP-Internetseite ([www.rdp.cme.msu.edu](http://www.rdp.cme.msu.edu)). Dazu wurden die Primersequenzen einzeln überprüft, um die Erfassung der verschiedenen Hauptentwicklungslinien zu analysieren. Diese wurden relativ gut abgedeckt, d. h. alle Hauptentwicklungslinien wurden erfasst, wenn auch nicht in vollem Umfang. Da bekannt ist, dass die meisten diazotrophen Pflanzen-assoziierten Bakterien, die bei Zuckerrohr bisher von Interesse waren, zur Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* gehören, wurde der Fokus der Analyse auf diese gelegt (Tab. 10). Hierbei ist gut zu erkennen, dass die bisher publizierten Primer nur einen Teil der mittlerweile bekannten Sequenzen erfassen. Während die Primer 341F bzw. 907R 68 % bzw. 32 % der Sequenzen erfassen, können die Primer 27F bzw. 1492R nur 14 % bzw. 7 % der in der Datenbank vorhandenen 16S-rDNA Sequenzen der *Proteobacteria* amplifizieren. Bei diesen Werten handelt es sich um die Analyse der genauen Primersequenz ohne Fehlpaarungen. Zudem kann mit dieser Software das Fehlen der Sequenz an dieser Stelle in der Datenbank nicht berücksichtigt werden. Die eigentliche Abdeckung der Domäne *Bacteria* mit den Primern ist demzufolge besser als anhand der Berechnung dieser Software festgestellt wurde. Die Erfassung der 16S-rRNA Gene verschiedener validierter Arten diazotropher Bakterien und der inokulierten Stämme wurde mit den besagten Primern mittels Amplifikation getestet. Mit allen getesteten Bakterienstämmen war die Amplifikation erfolgreich.

**Tab. 10:** Analyse der Primer mit Probematch, vorhandene Sequenzen von *Proteobacteria* in der RDP-Datenbank: 421706 F: Vorwärts(primer) R: Rückwärts(primer)

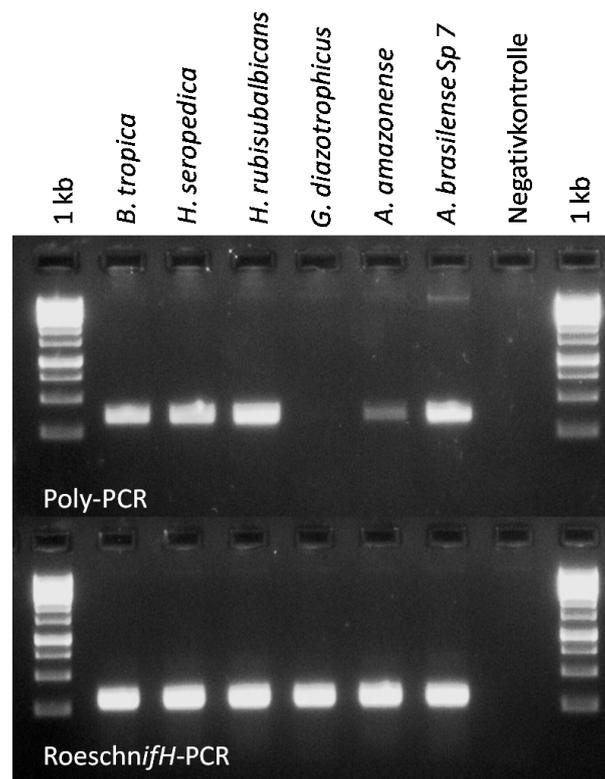
Primer	Erfasste <i>Proteobacteria</i>	in %
341F	285643	68 %
907R	133159	32 %
27F	57535	14 %
1492R	28858	7 %

### *nifH*-Gene

Die in der Tabelle 11 aufgelisteten Primer zur Erfassung der *nifH*-Gene wurden mit DNA der Bakterienstämme getestet, die zur Inokulation eingesetzt wurden (siehe Tab. 2). Die Überprüfung der eingesetzten Primer für die *nifH*-Gene erfolgte mit der Datenbank *nifH* database (www.es.ucsc.edu, 11 Mb file size, ARB, constructed from Swissprot entries, aligned by PFAM, Dezember 2007) in der Software ARB (Tabelle 11). Diese Primer erfassen ebenfalls bei Weitem nicht alle *nifH*-Sequenzen. Bei der Amplifikation der isolierten RNA verschiedener Zuckerrohr-Proben mit den *nifH*-Primerpaaren Rösch, Zehr, Ueda und Widmer (Tab 4), die nicht weiter verwendet wurden, lag der Anteil pflanzlicher Gene zwischen 92-100 %. Eine erfolgreiche Amplifikation der DNA aller inokulierten Bakterienstämme konnte mit der optimierten Nested-PCR unter Kombination der Primerpaare Poly und Roesch-*nifH* durchgeführt werden (Abb. 12, siehe Kap. 3.5.3). So konnte eine für die inokulierten Bakterienstämme überprüfte Analyse gewährleistet werden. Bei den in der Nested-PCR verwendeten Primern lag der Anteil amplifizierter pflanzlicher Gene bei unter 10 %.

**Tab. 11:** Überprüfung der Primer mit Match Probe (ARB) mit vorhandenen *nifH*-Sequenzen in der ARB-Datenbank. Die in die Nested-PCR eingesetzten Primer sind hervorgehoben. Anzahl der vorhandenen Sequenzen in der Datenbank: 14407; F: Vorwärts(primer) R: Rückwärts(primer)

Primer	Erfasste <i>Bacteria</i> in der <i>nifH</i> -Datenbank
Zehr <i>nifHF</i>	90
Zehr <i>nifHR</i>	3031
RoeschF	447
RoeschR	1538
<b>PolyF</b>	<b>62</b>
<b>PolyR</b>	<b>3351</b>
<b>Roesch<i>nifHF</i></b>	<b>88</b>
<b>Roesch<i>nifHR</i></b>	<b>120</b>
UedaF	197
UedaR	201
WidmerF	100
WidmerR	1698

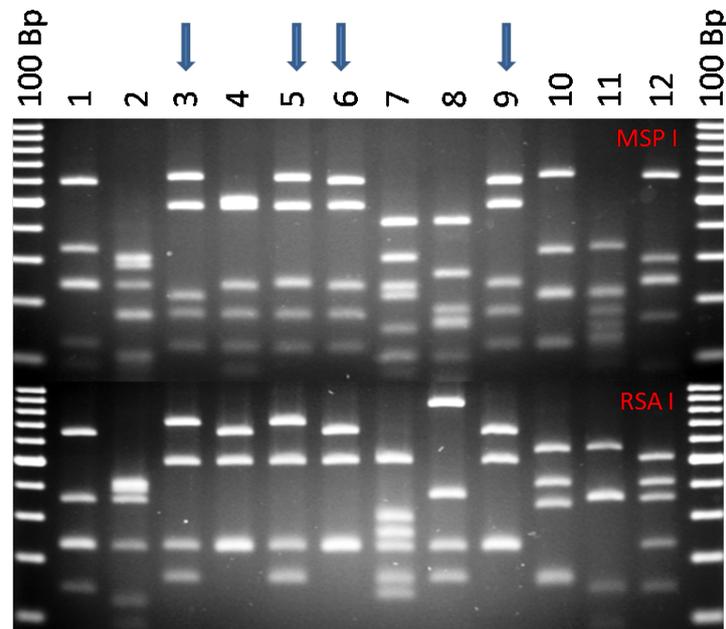


**Abb. 12:** Agarosegel der Nested-PCR, Amplifikate nach Anfärbung mit Ethidium-Bromid. Obere Zeile: Amplifikation der *nifH*-Gene der Stämme (*B. tropica* PPe 8, *H. seropedicae* HR 54, *H. rubrisubalbicans* HCC 103, *G. diazotrophicus* PAL 5, *A. amazonense* CBAMc, (Positivkontrolle der PCR *A. brasilense* Sp 7); 1. PCR) mit dem Poly-Primerpaar, untere Zeile: Amplifikation der *nifH*-Gene genannter Stämme mit dem RoeschnifH-Primerpaar aus den Amplifikaten der 1. PCR (2. PCR), Längenstandard: 1 kb Ladder (Generuler<sup>TM</sup>, Fermentas GmbH)

#### 4.1.3 16S-rDNA Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (R-FLP) - Analyse der bei der Klonierung erhaltenen Insertionen

Zur Überprüfung, ob die Insertionslänge des Vektors der klonierten 16S-rDNA Fragmente mit dem des eingesetzten PCR-Amplifikates übereinstimmt, wurde eine M13-Kolonie-PCR durchgeführt (siehe 3.5.5). Bei positivem Ergebnis wurde mit dem jeweiligen Amplifikat eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse durchgeführt. Zum Restriktionsverdau wurden die Endonukleasen *MSP I* und *RSA I* eingesetzt. Vorversuche zeigten optimale, vergleichbare Längenmuster mit 3-6 Banden, anhand deren eine Unterscheidung diverser Targets voneinander möglich war. Von einigen Klonen, welche Chloroplasten-Amplifikate inseriert hatten, wurde die Sequenz

der jeweiligen Amplifikate bestimmt, um ein aussagekräftiges Bandenmuster zu erhalten. Alle in dieser Arbeit klonierten PCR-Produkte der 16S-rDNA wurden auf diese Weise überprüft, um unerwünschte Ligationen, z. B. von PCR-Amplifikaten von Chloroplasten, auszuschließen. Abbildung 13 zeigt beispielhaft Bandenmuster von 12 in dieser Arbeit gewonnenen Klonen, es sind zwei solcher Muster gezeigt: Klone 3, 5 und 9 beispielsweise tragen Muster 1 für eine Chloroplasten-Sequenz, während Klon 6 Muster 2 und Klon 9 Muster 3 für eine Chloroplasten-Sequenz zeigt. Der Anteil der Chloroplasten-Sequenzen bei der amplifizierten 16S-rDNA lag zwischen 30 und 90 %. Bedingt durch die kurze Sequenzlänge wurden 16S-rRNA Fragmente nicht mit Hilfe der R-FLP-Analyse untersucht, da keine passenden Endonukleasen existieren, die für die kurzen Fragmente aussagekräftige Bandenmuster generiert haben. Zudem lag der Anteil der amplifizierten pflanzlichen Gene bei unter 15 %.



**Abb. 13:** Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus von 16S-rDNA. Agarosegel der R-FLP nach Anfärbung mit Ethidium-Bromid, die jeweiligen Proben 1-12 wurden mit den Enzymen *MSP I* (oben) und *RSA I* (unten) verdaut und zur Auswertung auf ein Agarosegel aufgetragen, Proben 3, 5, 6 und 9 wiesen typische Restriktionsmuster von Zuckerrohr-Plastiden auf, Längenstandard: 100 bp Ladder (Generuler<sup>TM</sup>, Fermentas GmbH)

## 4.2 Experimenteller Ablauf

Im September 2006 wurde ein Langzeitexperiment in einem sog. Versuchs-Tank in Seropedica (RJ, Brasilien) angesetzt. Hierzu wurden Stecklinge der Zuckerrohr-Varietäten SP70 1143, RB72 454 und RB82 5336 zur Bepflanzung in den Versuchs-Tank gelegt und mit Boden bedeckt. Der in den jeweiligen Experimenten verwendete Boden wurde nicht mit Stickstoff gedüngt. Ähnliche Versuche zur Analyse nicht Stickstoff-gedüngter Zuckerrohr-Pflanzen werden seit mehreren Jahren am EMBRAPA Agrobiologia durchgeführt; dieser Tank wurde daher niemals mit Stickstoff gedüngt. Bei dem verwendeten Boden handelt es sich um einen sauren Ultisol (Hapladult). Durch die Konstruktion des nach unten geschlossenen Tanks können externe Einflüsse, wie z. B. der Eintrag von Stickstoff durch Einfließen von Regenwasser aus benachbarten Feldern ausgeschlossen werden.

Parallel zu dem Experiment im Versuchs-Tank wurde auf dem Versuchsgelände des EMBRAPA ein Langzeitexperiment auf dem Feld gestartet, bei dem die Zuckerrohr-Varietäten RB86 und RB72 gepflanzt und halbjährlich geerntet wurden. Vier verschiedene Behandlungen wurden in Parzellen gepflanzt: nicht inokuliert (Kontrolle ohne Düngung) bzw. nicht inokuliert und mit 120 kg/ha Urea gedüngt und inokuliert mit dem Bakterien-Mix (flüssig oder Gel inokuliert). Von diesem Feld-Experiment wurden im März 2008 und 2009 Proben genommen und das Material sofort nach der Probenahme auf dem Feld in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Im Februar 2009 wurde ein Gewächshausversuch gestartet, bei dem Stecklinge der Zuckerrohr-Varietäten RB72 und RB86 mit dem Bakterienmix inokuliert worden waren und in einem gelüfteten Gewächshaus, in Töpfen mit jeweils 6 Stecklingen in einem Sand-Teosint-Gemisch, angezogen wurden (siehe Kap. 3.1.1). Für diese Arbeit wurde nur die Zuckerrohr-Varietät RB86 beprobt, um die Bakteriengemeinschaft inokulierter bzw. nicht inokulierter Kontrollpflanzen in Spross und Wurzel zu untersuchen.

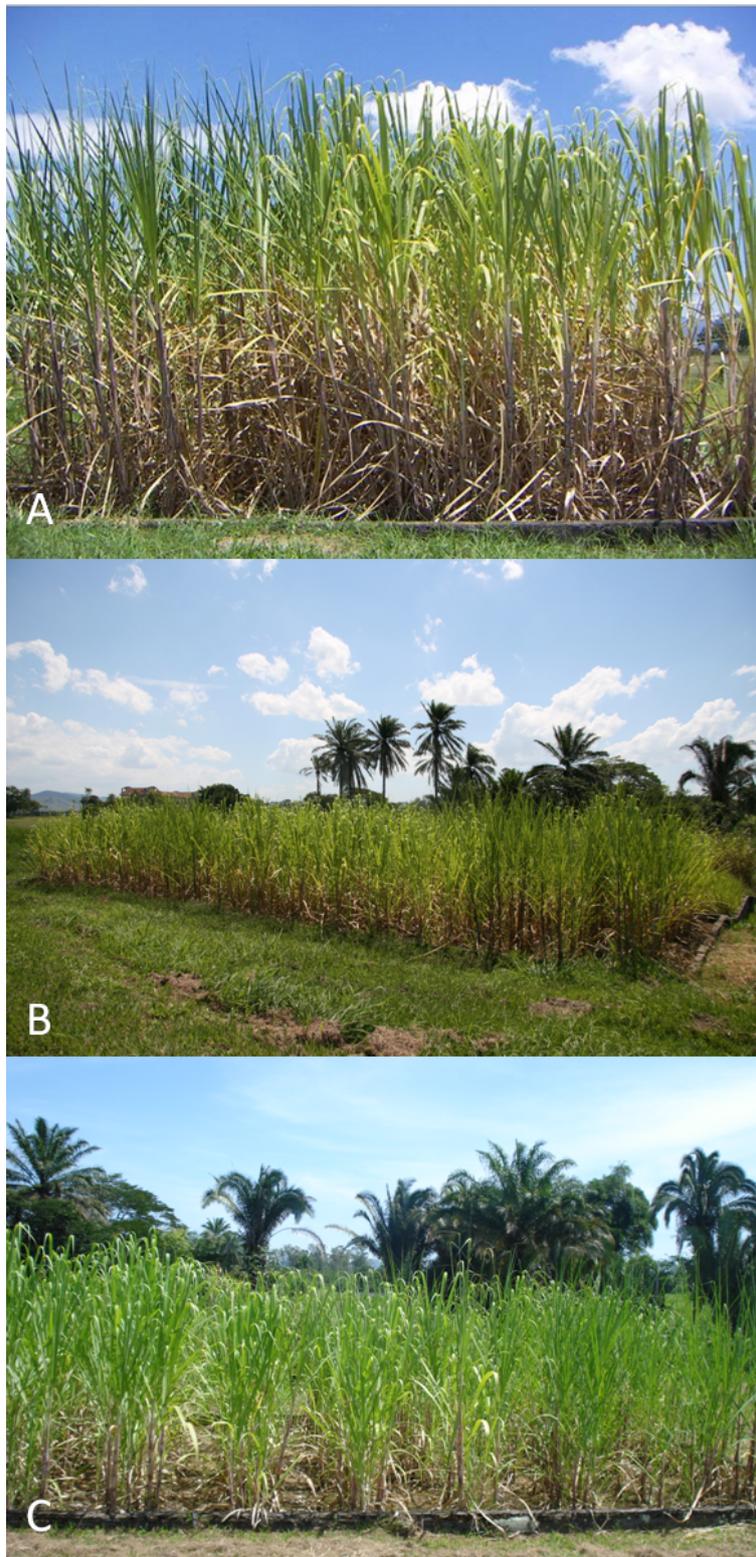
## 4.3 Phylogenetische Analyse der 16S-rRNA Gene der bakteriellen Gemeinschaft (Klonbank-Analysen)

### 4.3.1 Phylogenetische Analyse der pflanzenassoziierten bakteriellen Gemeinschaft im Tankversuch

Abbildung 14 zeigt die Bepflanzung des Versuchs-Tanks im März der Jahre 2007-2009. Kurz nach den jeweiligen Aufnahmen wurden die Pflanzen geerntet und für weitere Versuche Proben genommen. Im März 2007 wurden Proben genommen, um die wurzelassoziierten Bakterien-Gemeinschaften der einzelnen Varietäten zu untersuchen und

zu vergleichen. Im März 2008 und 2009 trat Staunässe im Tank auf, sodass das Pflanzenwachstum nicht optimal war. Daher wurden 2008 nur von einer Zuckerrohr-Varietät Proben genommen und analysiert. Im Jahr 2009 wurde der Tank für diese Arbeit nicht beprobt.

Von den im Rahmen des Tank-Versuchs gepflanzten Zuckerrohrvarietäten RB72, RB82 und SP70 wurden im Jahr 2007 nach 6-monatigem Wachstum Proben genommen und die bakterielle Gemeinschaft phylogenetisch untersucht. Hierzu wurden von allen 3 Varietäten Wurzelproben genommen, die in Tabelle 12 zusammengefasst sind. Nach der Extraktion der DNA und der Amplifikation der 16S-rRNA codierenden Gene wurden von jeder Probe 300 Klone gepickt und mittels RFLP überprüft. Ein hoher Anteil der erhaltenen Klone konnte nach Restriktion der jeweiligen Inserts Chloroplasten bzw. Plastiden zugeordnet werden. Diese wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



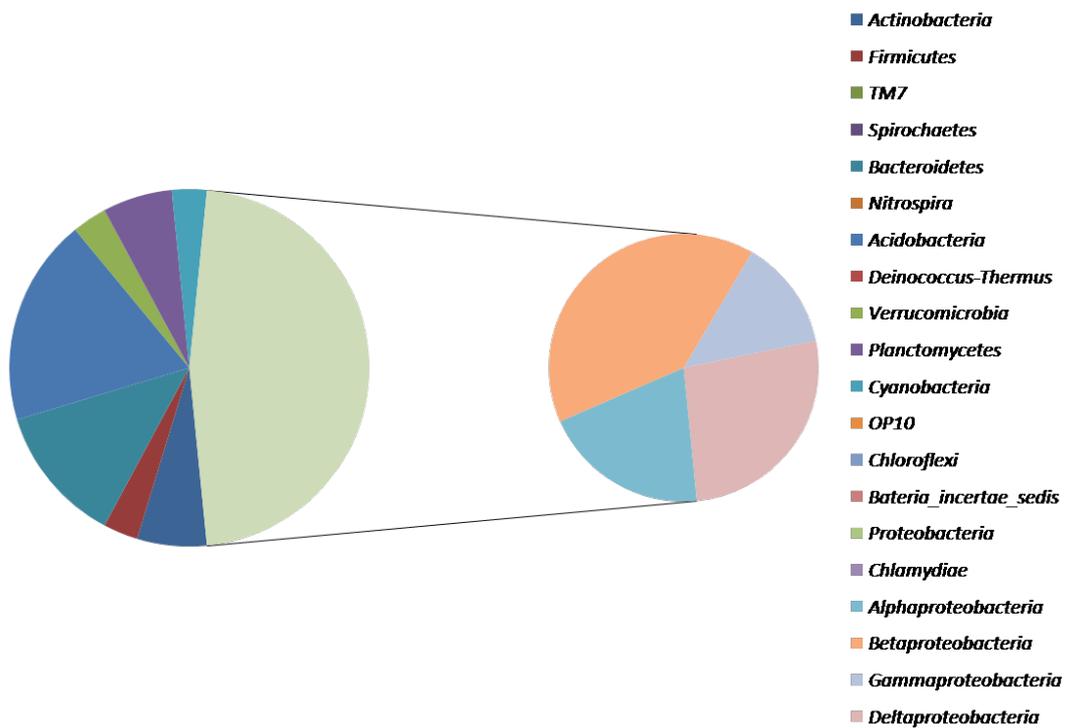
**Abb. 14:** Bepflanzung des Versuchs-Tanks in den Jahren 2007-2009. Fotografische Aufnahme des Versuchs-Tanks im März 2007 (A), 2008 (B) und 2009 (C).

**Tab. 12:** Vergleichende Analyse der Bakteriengemeinschaften des Tankversuchs 2007. Probenbeschreibung und Anzahl der verwertbaren Klone, †Probe aus dem Jahr 2008

Varietät	Beschreibung	Art der Nukleinsäure	Anzahl Sequenzen
SP70 1143	lange Wurzeln	DNA	158
SP70 1143	Red Node	DNA	151
SP70 1143	Red Node	RNA	184
RB82 5336	lange Wurzeln	DNA	101
RB72 454	braune Wurzeln	DNA	35
RB72 454 †	braune Wurzeln	DNA	127

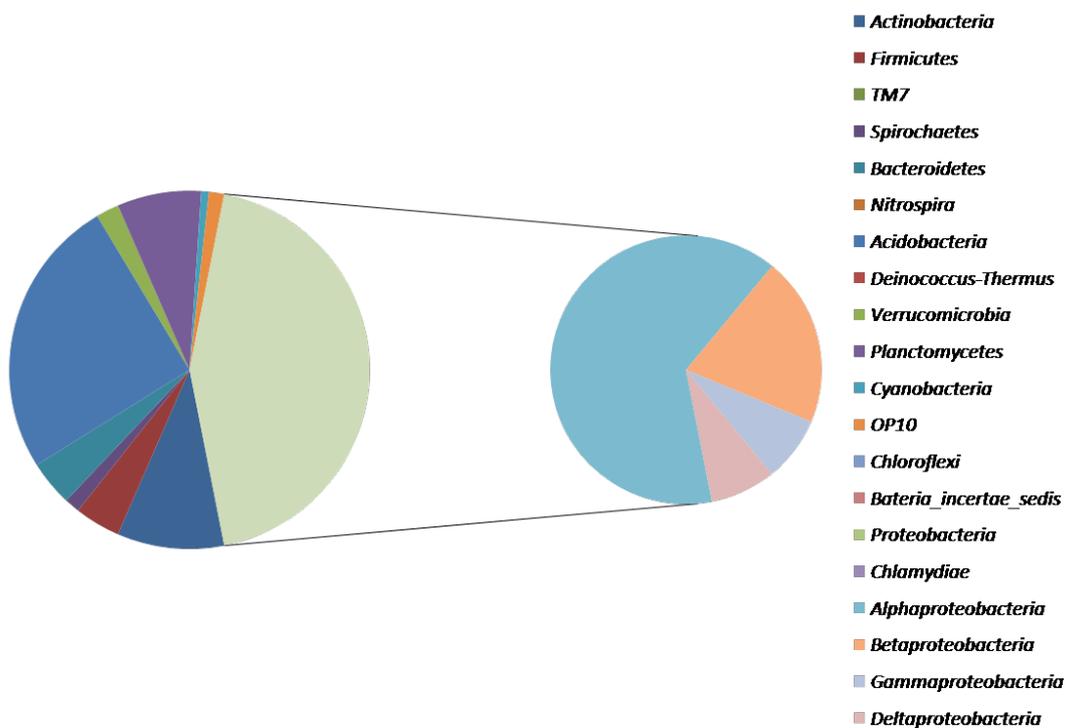
Von allen verbliebenen Klonen wurde die Sequenz der Insertionen mittels Sequenzierung nach SANGER *et al.* (1977) (siehe Kap. 3.11) bestimmt. Die Sequenzierung wurde aufgrund der Länge des Inserts mit 3 Sequenzierprimern durchgeführt. Dadurch war eine Überlappung der jeweilig erhaltenen Sequenzen gewährleistet. Dies diente einer möglichst fehlerlosen Sequenzierung. Die erhaltenen Teilsequenzen wurden korrektur gelesen und zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt. Die erhaltenen Gesamtsequenzen wurden mittels dem Online-Tool Classifier des Ribosomal Database Project (RDP) anhand ihrer phylogenetischen Zuordnung analysiert. Daraus ergaben sich die in den Abbildungen 15, 16 und 17 dargestellten Kreisdiagramme der Zusammensetzungen der jeweiligen bakteriellen Gemeinschaft der Rhizosphäre, welche wurzellosoziiert bzw. endophytisch bei den verschiedenen Varietäten des Versuchs-Tanks auftraten sowie die im Text beschriebenen Ergebnisse. Die Resultate der Rarefaction-Analysen sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

Bei der Varietät RB72 konnte selbst bei geringer Anzahl an Sequenzen (35), die nicht Plastiden von Zuckerrohr zugeordnet wurden, eine hohe Diversität (30 OTUs) festgestellt werden. Fast die Hälfte der Sequenzen wurde der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria*, der Rest wurde den Hauptentwicklungslinien der *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Planctomycetes* zugeordnet (Abb. 15). Bei den *Proteobacteria* wurden beispielsweise Sequenzen von der Familie *Oxalobacteraceae* in der Ordnung *Burkholderiales* detektiert (siehe Abb. 21).



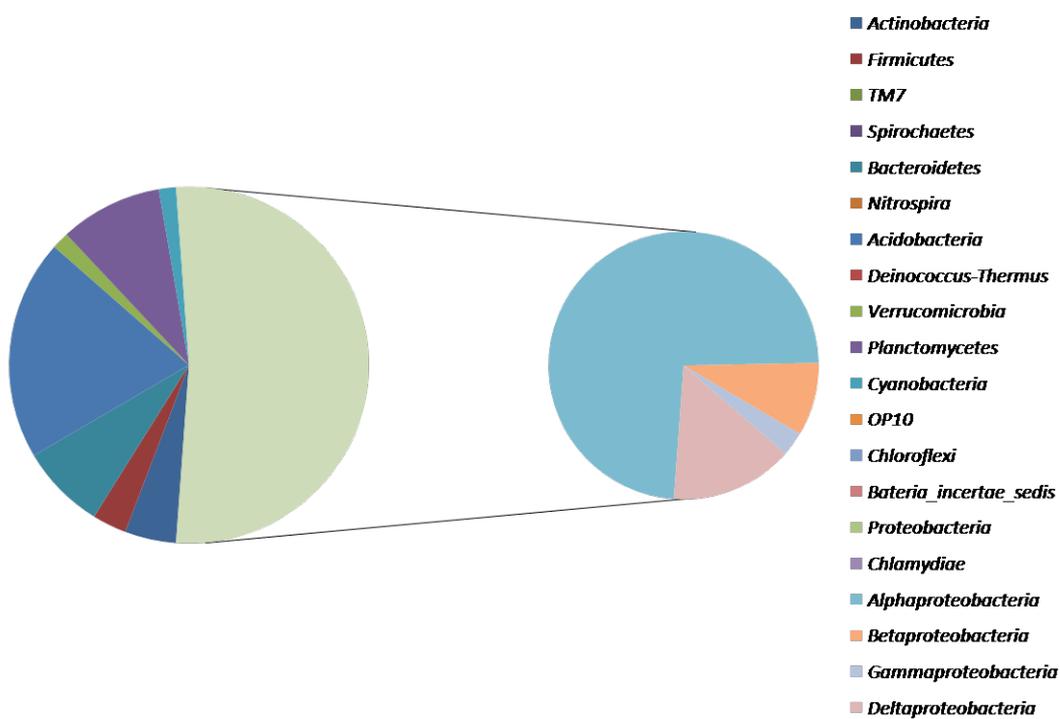
**Abb. 15:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft von Wurzeln der Varietät RB72 im Tank-Experiment im Jahr 2007 auf Basis der 16S-rDNA

Die Bakteriengemeinschaft der Rhizosphäre von SP70 weist ebenfalls eine große Diversität auf (122 OTUs). 40 % der 158 Sequenzen konnten der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* zugeordnet werden, innerhalb welcher der Anteil der  $\alpha$ -*Proteobacteria* sehr hoch war, die restlichen Sequenzen konnten den Hauptentwicklungslinien *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* und zu einem Großteil *Acidobacteria* und *Planctomycetes* zugeordnet werden (Abb. 16). Die Ordnung *Rhodospirillales* mit den Familien *Rhodospirillaceae* und *Acetobacteraceae* und die Ordnung *Burkholderiales* mit der Familie *Burkholderiaceae* wurden nachgewiesen. Zudem wurden die Gattungen *Bradyrhizobium* ( $\alpha$ -*Proteobacteria*) und *Ideonella* ( $\beta$ -*Proteobacteria*) gefunden. Es wurden jedoch keine Sequenzen der Familie *Oxalobacteraceae* detektiert (siehe Abb. 20 und 21).



**Abb. 16:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Wurzel der Varietät SP70 im Tank-Experiment im Jahr 2007 auf Basis der 16S-rDNA

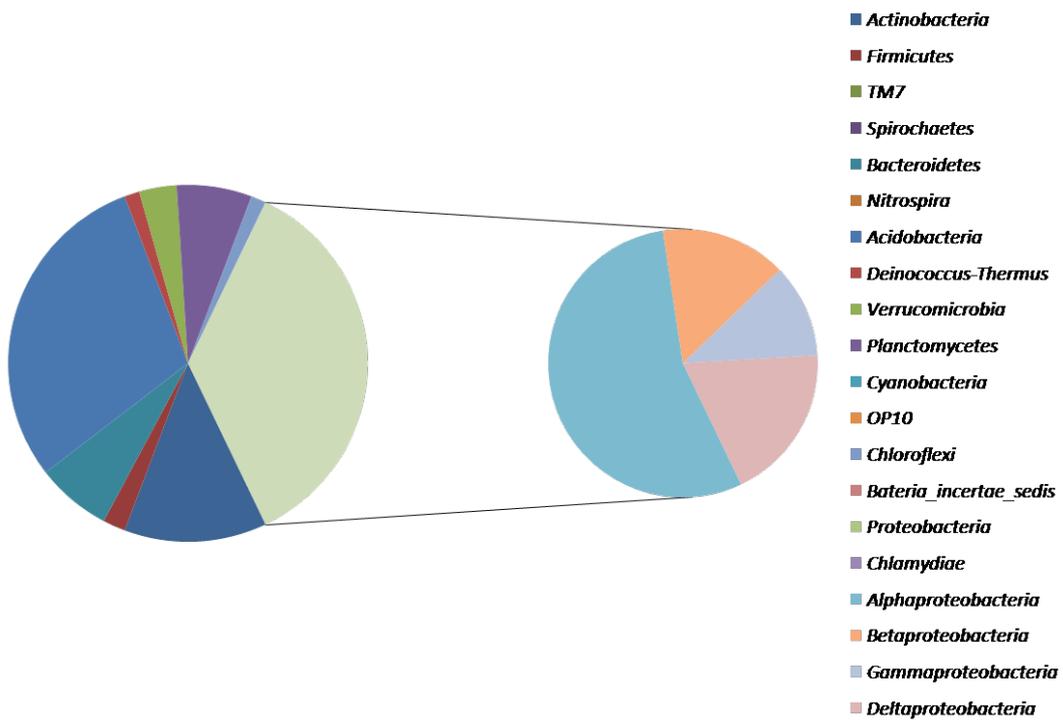
Die phylogenetische Analyse der 16S-rRNA Gene der isolierten DNA von Wurzeln der Zuckerrohr-Varietät RB82 zeigte ebenfalls, dass mehr als die Hälfte der erhaltenen Sequenzen der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* zuzuordnen sind (Abb. 17). Zu den Phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* und *Firmicutes* waren Sequenzen assoziiert. Fast 75 % aller Sequenzen, die der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* zugeordnet wurden, gehören zu den  $\alpha$ -*Proteobacteria*, wie z. B. zu den Ordnungen der *Rhodospirillales* oder *Rhizobiales* (*Bradyrhizobiaceae*). Vier der Sequenzen der  $\beta$ -*Proteobacteria* gehören zu der Ordnung *Burkholderiales* (siehe Abb. 21).



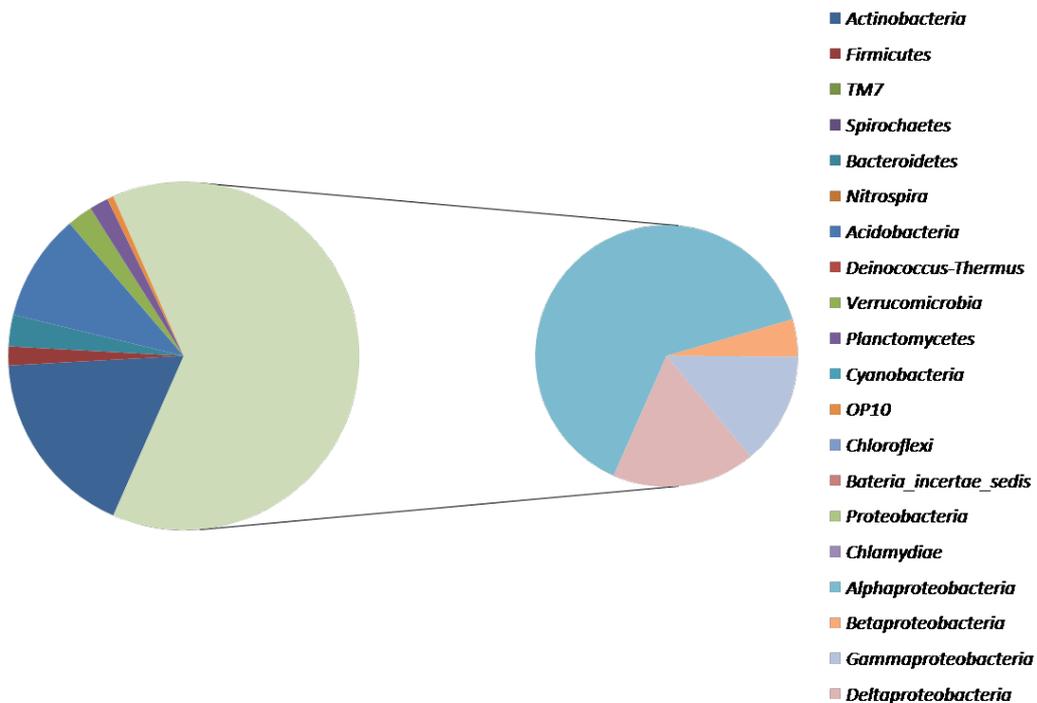
**Abb. 17:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Wurzel der Varietät RB82 im Tank-Experiment im Jahr 2007 auf Basis der 16S-rDNA

Abbildungen 18 und 19 zeigen die phylogenetische Zuordnung der erhaltenen Sequenzen der 16S-rDNA und der 16S-rRNA der Wurzelprobe „Red Node“, einer rötlich gefärbten Knospe an einem Zuckerrohrsteckling der Zuckerrohr-Varietät SP70. Während bei den 151 aus 16S-rDNA gewonnenen Sequenzen 121 OTUs gefunden wurden, so war die Diversität der 16S-rRNA bei 187 Sequenzen mit 104 OTUs geringer.

In beiden isolierten Nukleinsäuren konnten Sequenzen der Phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* und *Planctomycetes* gefunden werden. Die Phyla *Chloroflexi* und *Deinococcus-Thermus* wurden nur in den 16S-rDNA-Genbanken nachgewiesen. Die Ordnungen *Burkholderiales* und *Rhodospirillales* wurden sowohl in DNA als auch in RNA detektiert. Sequenzen der Familien *Acetobacteraceae*, *Rhodospirillaceae* und *Oxalobacteraceae* wurden nur in der DNA nachgewiesen. Sequenzen der Familie *Burkholderiaceae* wurden nicht detektiert. In den Sequenzen der 16S-rRNA waren die Familien *Acetobacteraceae*, *Rhodospirillaceae* und *Burkholderiaceae* nachweisbar, Sequenzen der Familie *Oxalobacteraceae* wurde nicht detektiert. In beiden Proben wurden Sequenzen der Familie *Bradyrhizobiaceae* gefunden (siehe Abb. 20 und 21). Interessanterweise war der Anteil der *Proteobacteria* an der 16S-rDNA deutlich geringer (ein Drittel) als bei Sequenzen der 16S-rRNA der aktiven *Proteobacteria* (zwei Drittel). Der Anteil der *Planctomycetes* und der *Actinobacteria* war dagegen bei den 16S-rDNA-Sequenzen deutlich höher als bei den 16S-rRNA Sequenzen.



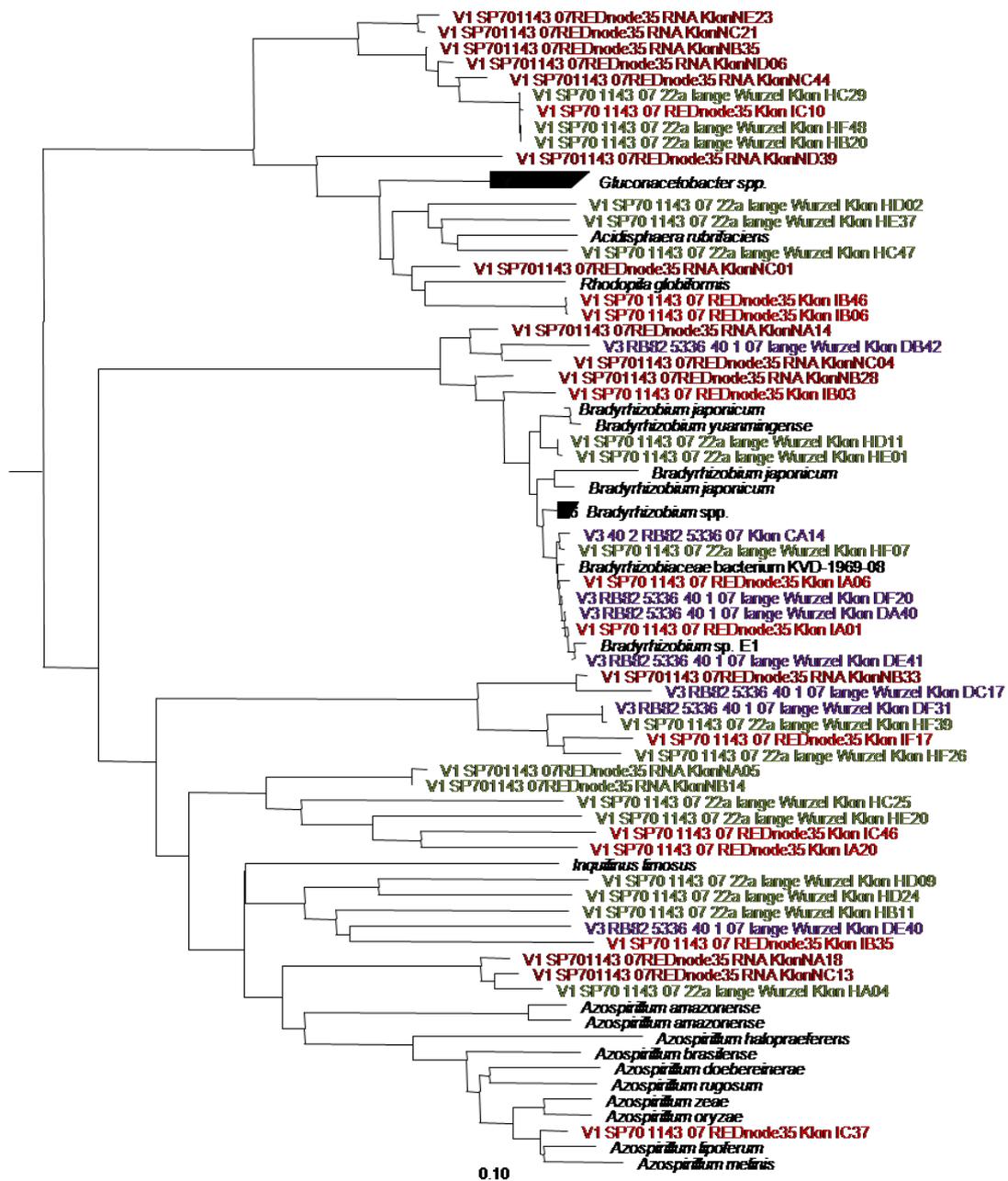
**Abb. 18:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Probe „Red Node“ der Varietät SP70 im Tank-Experiment im Jahr 2007 auf Basis der 16S-rDNA



**Abb. 19:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft der Probe „Red Node“ der Varietät SP70 im Tank-Experiment im Jahr 2007 auf Basis der 16S-rRNA

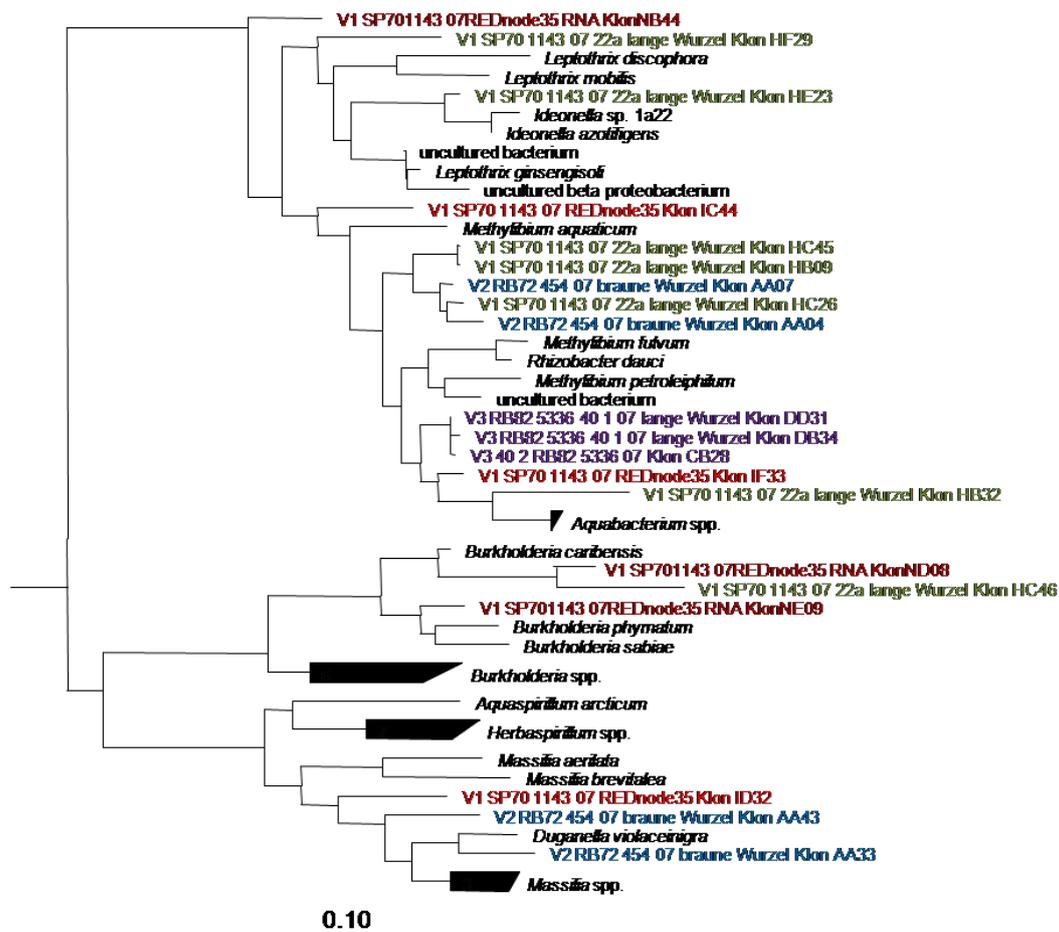
Die in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzdaten wurden, wie in Kapitel 3.13 beschrieben, in einen vorhandenen Datensatz „SSU Ref“ der Internetseite [www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de) eingefügt und mit den im Softwarepaket ARB implementierten Werkzeugen zur Sequenzanalyse analysiert (Abb. 20 und 21). Anhand dieser Dendrogramme sind die Verwandtschaftsverhältnisse der in dieser Arbeit erhaltenen und analysierten Sequenzdaten der 16S-rRNA Gene zu bereits beschriebenen Arten ersichtlich. So konnte überprüft werden, ob es sich bei den Sequenzen der Klonbanken um nahe Verwandte bereits beschriebener wichtiger diazotropher Bakterien, um ubiquitär im Boden vorkommende Bakterien oder unbekannte, d.h. um bisher nicht kultivierte und beschriebene Bakteriengattungen und -arten handelt.

Abbildung 20 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm von 16S-rRNA Gensequenzen validierter Arten der  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Mit der Ausnahme von *Bradyrhizobium* sp. E1 handelt es sich bei den in die Berechnung einbezogenen Sequenzen ausschließlich um Sequenzen der Typ-Stämme. Es konnten Sequenzen erhalten werden, die der Familie der *Acetobacteraceae* zugeordnet werden konnten. In den Klondatenbanken der Wurzelproben aus dem Tank-Experiment waren jedoch keine Sequenzen zu finden, die mit *Gluconacetobacter* spp. eng verwandt sind. Teile der Sequenzen, die von den Zuckerrohr-Varietäten SP70 (16S-rDNA und cDNA) und RB82 stammen, bilden Cluster der  $\alpha$ -*Proteobacteria*, zu denen keine nah verwandte, bisher beschriebene Art bekannt ist (NE23-HB20 und NB33-HF26). In den 16S-rRNA Gensequenzen aus Wurzeln der Varietät SP70 konnten nah verwandte Sequenzen zu Bakterienstamm *Acidisphaera rubifaciens* detektiert werden. In den Klondatenbanken des „Red Node“ konnten nah verwandte Sequenzen zu *Rhodopila globiformis* gefunden werden. Bei einem Großteil der 16S-rRNA Gensequenzen, die aus dem Tank-Experiment stammen und den  $\alpha$ -*Proteobacteria* zugeordnet werden konnten, konnte eine Zuordnung zur Gruppe der *Bradyrhizobia* erfolgen. Eine Sequenz von der isolierten DNA der Wurzel der Varietät SP70 stammend, konnte der Gattung *Azospirillum* zugeordnet werden. Aus allen Proben der Varietäten RB82 und SP70 konnten viele 16S-rRNA Gensequenzen isoliert werden, die keine nahe Verwandtschaft zu validierten Arten aufweisen (HD09-IB35). Sie konnten der Gruppe der *Rhodospirillaceae* (Nichtschwefelpurpurbakterien) zugeordnet werden und befinden sich phylogenetisch gesehen in der Nähe der Gattung *Inquilingus*. Die nächstverwandte beschriebene Bakterienart ist *Inquilingus limosus*.



**Abb. 20:** Phylogenetisches Dendrogramm der  $\alpha$ -Proteobacteria, Tankversuch. Grün: Sequenzen aus DNA von Wurzeln der Zuckerrohrvarietät SP70; Violett: aus der Varietät RB82; Blau: aus der Varietät RB72; Rot: Sequenzen aus der Probe „Red Node“ der Zuckerrohrvarietät SP70; Rot (aus der isolierten DNA), Hellrot (aus RNA). Maßstab: Sequenzdivergenz von 10 %

Abbildung 21 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der  $\beta$ -*Proteobacteria* und die in diese Entwicklungslinie fallenden Sequenzen des Tank-Experiments. Innerhalb der  $\beta$ -*Proteobacteria* konnten nah verwandte 16S-rRNA und -rDNA Sequenzen aus der Varietät SP70 zu *Leptothrix* sp. und *Ideonella* sp. detektiert werden. Aus der Wurzel der Varietäten SP70, RB82 und RB72 konnten Sequenzen generiert werden, welche mit *Methylibium* sp. nah verwandt sind. Diese Bakterien werden alle in *Burkholderiales* *Genera incertae sedis* eingeordnet, dies bedeutet, dass die phylogenetische Einordnung dieser Bakterienart innerhalb der Gattung *Burkholderia* nicht gesichert ist. Zwei der aus der RNA des „Red Node“ der Varietät SP70 und eine aus der DNA der Wurzel derselben Varietät stammenden Sequenzen konnten in die Gattung *Burkholderiales* in enger phylogenetischer Beziehung mit *B. caribensis* und *B. phymatum* eingeordnet, sie konnten jedoch nicht *Burkholderia tropica* zugeordnet werden. Keine der aus dem Tank-Experiment gewonnenen Sequenzen konnte der Gattung *Herbaspirillum* zugeordnet werden. Desweiteren konnten Sequenzen aus der Rhizosphäre der Varietäten SP70 und RB72 der Gruppe der *Oxalobacteraceae* zugeordnet werden, in welcher sie nahe Verwandtschaft zu *Massilia* sp. und *Duganella* sp. aufweisen.



**Abb. 21:** Phylogenetisches Dendrogramm der  $\beta$ -Proteobacteria, Tankversuch. Grün: Sequenzen aus DNA von Wurzeln der Zuckerrohrvarietät SP70; Violett: aus der Varietät RB82; Blau: aus der Varietät RB72; Rot: Sequenzen aus der Probe „Red Node“ der Zuckerrohrvarietät SP70; Rot (aus der isolierten DNA), Hellrot (aus RNA). Maßstab: Sequenzdivergenz von 10 %

#### 4.3.2 Phylogenetische Analyse der aktiven Pflanzen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft im Gewächshausversuch

Nach vierwöchigem Wachstum in einem Gewächshaus (siehe Kap. 3.1.1) wurden Zuckerrohrpflanzen der Varietät RB86 nach Inokulation mit dem Bakterien-Mix geerntet und die Gesamt-RNA der Wurzeln bzw. der Blattscheide extrahiert (siehe Kap. 3.2). Als Kontrolle dienten Zuckerrohrpflanzen derselben Varietät, welche unter denselben Bedingungen, jedoch ohne Inokulation, angezogen worden waren. Hierbei sollte u. a. geprüft werden, wie effektiv sich die inokulierten Bakterien etablieren.

Visuell unterschieden sich die Wurzeln der inokulierten Zuckerrohrpflanzen (links) von denen der Kontrollpflanzen (rechts) durch eine größere Anzahl an feinen Sekundärwurzeln, mit denen Nährstoffe von der Pflanze aufgenommen werden (Abb. 22). Die Sprosse der inokulierten Zuckerrohrpflanzen und der nicht inokulierten Kontrollpflanzen wiesen

keine sichtbaren Unterschiede auf (Abb. 9).



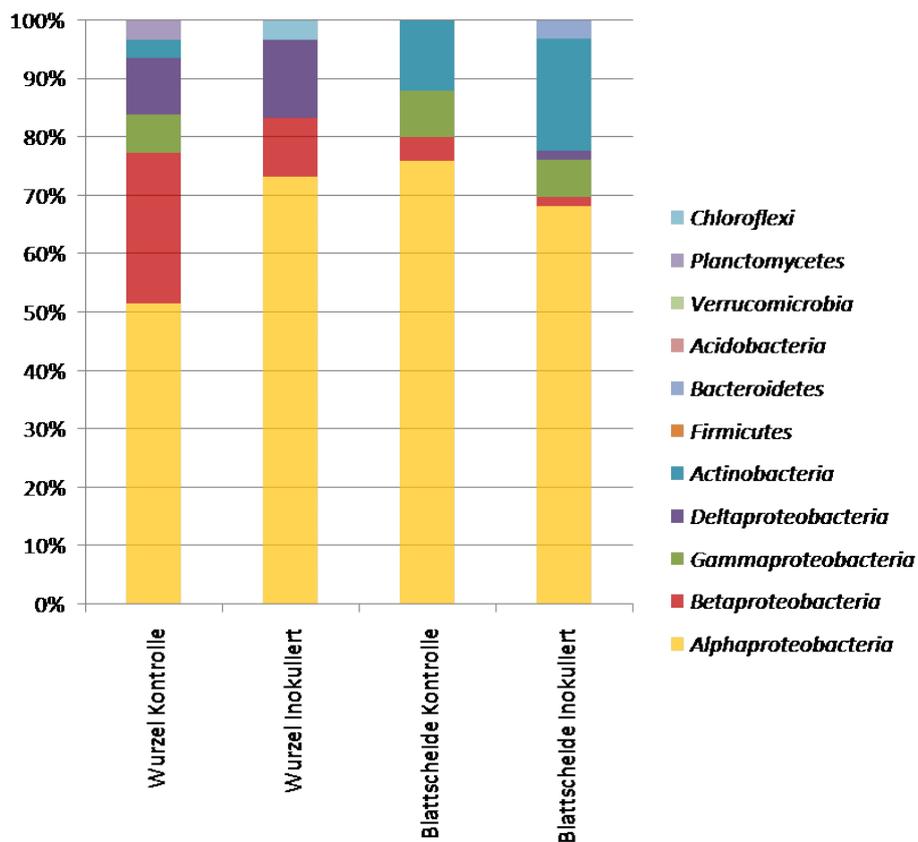
**Abb. 22:** Wurzeln der Zuckerrohr-Varietät RB86 des Gewächshausversuchs. Vergleich, links: inokulierte Pflanzen, rechts: nicht inokulierte Kontrollpflanze.

Die phylogenetische Analyse der generierten cDNA der 16S-rRNA zeigte Folgendes: Es konnten jeweils 31 (Wurzel Kontrolle), 30 (Wurzel inokuliert), 25 (Blattscheide Kontrolle) und 63 (Blattscheide inokuliert) Klone von den amplifizierten Gen-Fragmenten erhalten werden, deren Sequenz wie in Kapitel 3.11 nach SANGER *et al.* (1977) beschrieben, ermittelt wurde. Insgesamt war jedoch nur weniger als die Hälfte der Sequenzen der 16S-rDNA zuzuordnen. Bei der phylogenetischen Analyse konnten bei den aus isolierter RNA stammenden Sequenzen der Wurzel der Kontrollpflanze 15 OTUs und bei der inokulierten Pflanze 16 OTUs gefunden werden. In der aus der Blattscheide isolierten RNA der Kontroll-Pflanze konnten 7 OTUs gefunden werden, in der isolierten RNA der Blattscheide der inokulierten Pflanze dagegen 20 bakterielle OTUs (Abb. 41). Die restlichen Sequenzen stammten von pflanzlichen Nukleinsäuren.

Der Anteil der *Proteobacteria* lag zwischen 77 und 97 % der erhaltenen Sequenzen, wobei der überwiegende Anteil (51-76 %) den  $\alpha$ -*Proteobacteria* zuzuordnen war (Abb. 23). Der Anteil an  $\beta$ -*Proteobacteria* war in den Wurzeln tendenziell höher als im Spross. Im Spross wurden mehr Sequenzen des Phylum *Actinobacteria* detektiert, umgekehrt wurden in der Wurzel mehr  $\delta$ -*Proteobacteria* nachgewiesen.

In der Wurzel der Kontroll-Pflanze konnten Sequenzen der Ordnungen *Rhizobiales*, *Caulobacteriales*, *Rhodospirillales* und *Burkholderiales* detektiert werden. In der Wurzel

der inokulierten Pflanze konnten die Ordnungen *Burkholderiales* und *Rhizobiales* gefunden werden. Unter anderem konnten die Familien *Acetobacteraceae*, *Rhodospirillaceae* und *Bradyrhizobiaceae* gefunden werden. In den Blattscheiden der Kontrollpflanze wurden die Ordnungen *Actinomycetales*, *Enterobacteriales*, *Rhizobiales* und *Sphingomonales* gefunden. In den Blattscheiden der mit dem Bakterien-Mix inokulierten Pflanzen konnten z. B. *Bradyrhizobiaceae*, *Herbaspirillum* sp. und *Acetobacteraceae* detektiert werden (siehe Abb. 24).



**Abb. 23:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften der Varietät RB86 auf Basis der 16S-rRNA (Gewächshausversuch)

Die in diesem Experiment erhaltenen Sequenzdaten wurden ebenfalls einer vergleichenden Sequenzanalyse unterzogen und aus den erhaltenen Informationen ein phylogenetisches Dendrogramm erstellt (Abb. 24). Die Sequenzanalysen zeigten eine unterschiedliche Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in Wurzel und Spross. Ein Ziel war es, herauszufinden, ob man die inokulierten Bakterienspezies nach dem Wachstum der Pflanze mit den angewendeten molekularbiologischen Methoden nachweisen kann. Keine der aus DNA generierten Sequenzen konnte der Gattung *Burkholderia* zugeordnet werden. Aus cDNA generierte Sequenzen, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den in diesem Experiment inokulierten Arten *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *G. diazotrophicus* und *A. amazonense* aufweisen, wurden nachgewiesen. In der Wurzel der inokulierten Pflanzen konnten drei Sequenzen von *Azospirillum amazonense* gefunden werden. Weitere Sequenzen der Gattung *Azospirillum* konnten weder im Spross noch in den Wurzeln gefunden werden. Sequenzen aus dem Cluster der Gattung *Herbaspirillum* konnten sowohl im Spross als auch in der Wurzel der inokulierten Pflanze detektiert werden. Die aus dem Spross stammende Sequenz ist nah verwandt mit *H. rubrisubalbicans*, während die aus der Wurzel stammende nah zu *H. seropedicae* verwandt ist. Im Cluster der *Acetobacteraceae* finden sich einige Sequenzen, welche zumeist aus der isolierten RNA des Sprosses der inokulierten Pflanze stammen, selten von der Wurzel. Mehrere Sequenzen, die aus dem Spross stammen, gehören zur Gattung *Gluconacetobacter*, konnten jedoch nicht näher bestimmt werden und sind nicht mit dem inokulierten Stamm PAL 5 identisch. Auffällig ist eine Art Sub-Cluster, welches aus Sequenzen von Wurzelproben der Kontroll- und der inokulierten Pflanze gebildet wird (Sequenzen PE37-OD26). Dies könnte auf eine bisher unbekannte Bakterienspezies bzw. -gattung hinweisen. Vergleiche dieser Sequenzen mit der Datenbank BLAST zeigten nahe Verwandtschaft zu anderen Sequenzen von bisher nicht isolierten Bakterien (Übereinstimmung 99 %).

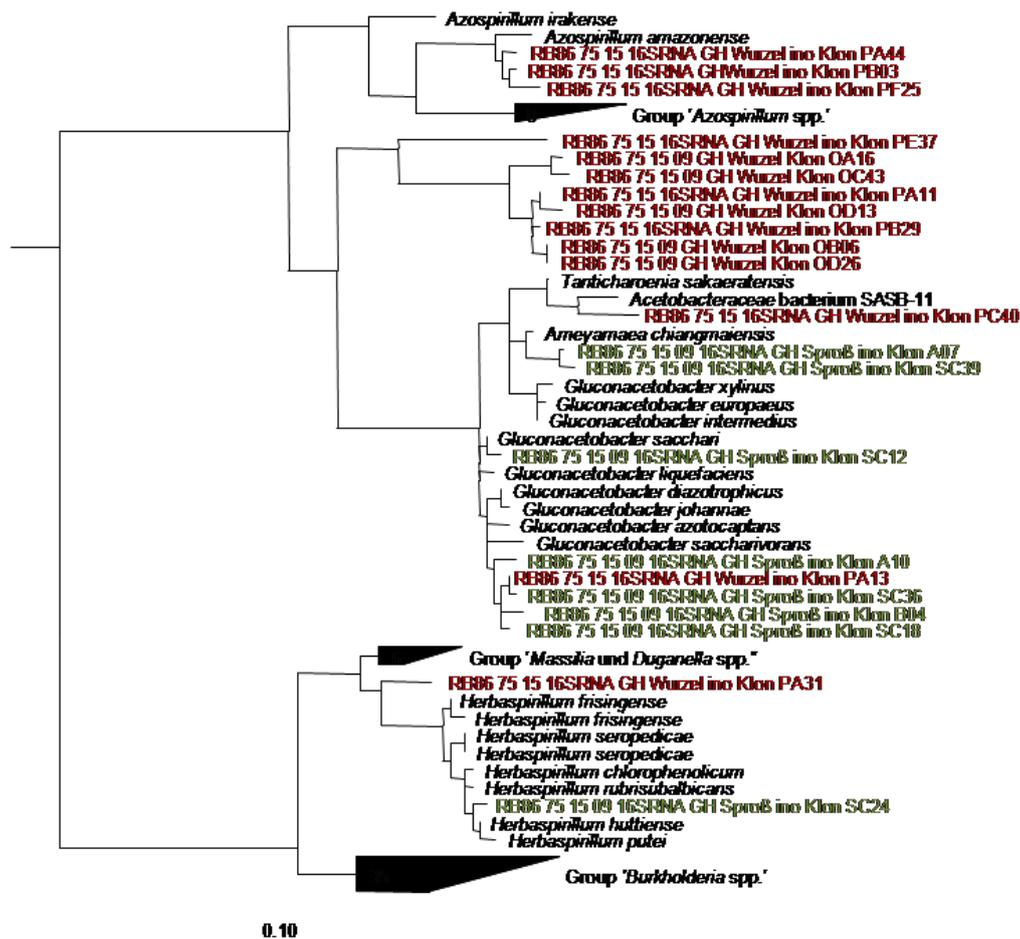


Abb. 24: Phylogenetisches Dendrogramm der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobacteria, Inokulations-Experiment im Gewächshaus braun: Sequenzen aus Wurzeln; grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

#### 4.3.3 Phylogenetische Analyse der Pflanzen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft im Feldversuch

##### Vergleichende phylogenetische Analyse der aktiven und der gesamten bakteriellen Gemeinschaft von Zuckerrohr im Feldversuch 2008

Im September 2006 wurde ein Feldversuch gestartet, der unter Anderem die Analyse der Pflanzen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft von zwei Zuckerrohr-Varietäten, RB72 und RB86, zum Inhalt hatte. Hier sollte die Kolonisierung und damit der Erfolg der Inokulation verschiedener diazotropher Bakterien über lange Zeit analysiert werden. Für diese Arbeit wurde die Zuckerrohr-Varietät RB86 im März 2008 und im Folgejahr 2009 beprobt und analysiert. Die Pflanzen wurden mit dem Gemisch der Bakterien Gel- oder flüssig inokuliert (siehe Kap. 3.1.1. Als Kontrollen wurden nicht inokulierte Pflanzen, welche mit Stickstoff gedüngt wurden (120 kg/ha) und nicht gedüngte Pflanzen auf demselben Feld angezogen (Abb. 25).

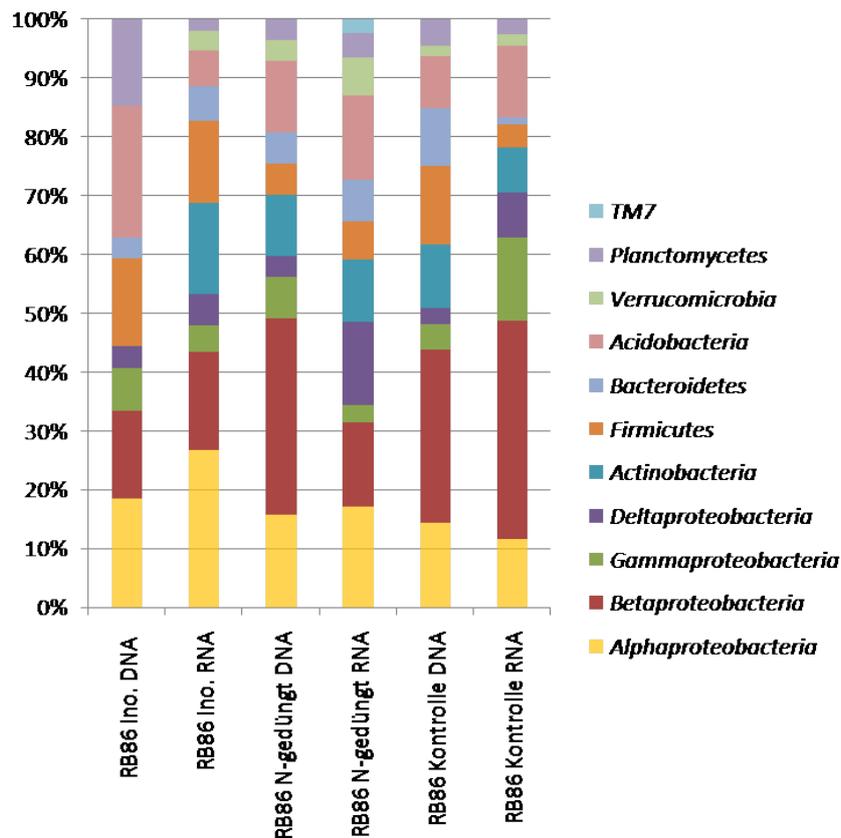


**Abb. 25:** Zuckerrohr-Versuchsfeld am EMBRAPA (Seropedica, RJ) im März 2008

Die 16S-rRNA Amplifikate der aus Wurzel- und Spross-Proben extrahierten RNA wurden nach der cDNA-Synthese kloniert und von jeder Probe 300 Klone gepickt und analysiert. Bedingt durch die Fragmentlänge des amplifizierten cDNA von 550 bp wurde keine vorherige Überprüfung der Inserts mittels RFLP durchgeführt. Die Anzahl der verwertbaren Sequenzen sind in der Tab. 13 aufgelistet. Die Anzahl der verwertbaren Sequenzen der jeweiligen Klondatenbanken differiert aufgrund der hohen Anzahl an klonierten Sequenzen, die Plastiden zugeordnet werden konnten und vor allem der geringen Anzahl an positiven 16S-rDNA Klonen, stark (Tab. 13). Die Auswertung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft der verschiedenen Behandlungen (inokuliert, gedüngt, nicht gedüngt) in Bezug auf die Phyla der Domäne *Bacteria* zeigt kaum Differenzen zwischen den Behandlungen und den DNA- bzw. RNA-Klonbanken (Abb. 26).

**Tab. 13:** Vergleichende Analyse der Bakteriengemeinschaften des Feldversuchs 2008, Probenbeschreibung und Anzahl der verwertbaren Klone der 16S-rDNA- und der 16S-rRNA Klondatenbanken

Behandlung	Anzahl Seq. 16S-rDNA	Anzahl Seq. 16S-rRNA
Kontrolle nicht gedüngt	112	156
Kontrolle gedüngt	57	169
inokuliert	27	150



**Abb. 26:** Vergleichende Analyse der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften des Feldversuchs im Jahr 2008 bezüglich ihrer phylogenetischen Zuordnung in die Hauptentwicklungslinien der Domäne *Bacteria*

Mit den erhaltenen Sequenzen wurden ebenfalls vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt und phylogenetische Dendrogramme mit dem Maximum-Likelihood Verfahren erstellt (Abb. 27, 30, 31, 28 und 29). Anhand dieser Abbildungen sind die Verwandtschaftsverhältnisse der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzdaten der 16S-rDNA zu bereits beschriebenen Arten ersichtlich. So konnte überprüft werden, ob es sich bei den Sequenzen der Klondatenbanken um nahe Verwandte bereits bekannter diazotropher Bakterien, ubiquitär im Boden vorkommende Bakterien oder unbekannte, d.h. bisher nicht kultivierte und beschriebene Bakterien handelt. Die Sequenzen wurden anhand der Art der Nukleinsäure, aus welcher sie amplifiziert wurden, farblich markiert.

Abbildung 27 zeigt das phylogenetische Dendrogramm der  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Aus den RNA-Klondatenbanken aller Pflanzenbehandlungen und aus der 16S-rDNA-Klondatenbank der nicht gedüngten Kontrollpflanze konnten Sequenzen detektiert werden, die phylogenetisch zu den  $\alpha$ -*Proteobacteria* gehören, jedoch keiner bekannten Gattung zugeordnet werden konnten. In Wurzeln der Pflanzen konnten jedoch keine Sequenzen von *Gluconacetobacter* sp. detektiert werden. Der inokulierte Bakterienstamm *Azospirillum amazonense* konnte in keiner der Proben detektiert werden; keine Sequenz konnte der Gattung *Azospirillum* zugeordnet werden.

Abbildung 28 zeigt das phylogenetische Dendrogramm der Gattung *Bradyrhizobium*. Vor allem in der RNA-Klondatenbank der inokulierten Zuckerrohrpflanze konnte *Bradyrhizobium* spp. mehrmals detektiert werden. Aber auch in den DNA-Klondatenbanken und bei allen Behandlungen wurden Sequenzen der Gattung *Bradyrhizobium* gefunden.

Abbildung 29 zeigt das phylogenetische Dendrogramm der Familie *Rhizobiales*. Bei allen der hier gezeigten validierten Arten handelt es sich um Bakterien, die in Symbiose mit verschiedenen Leguminosen leben können und Nodulationsgene besitzen. In den RNA- und DNA-Klondatenbanken aller Behandlungen konnten Sequenzen als Verwandte von *Labrys* sp., *Pseudolabrys* sp., *Rhodoblastus* sp., *Mesorhizobium* sp. und *Rhizobium* sp. detektiert werden.

Abbildung 30 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der *Burkholderiales*. 16S-rRNA Gensequenzen aller Behandlungen und beider Sorten von Nukleinsäuren sind im Cluster der Gattung *Burkholderia* zu finden. Es ist jedoch keine Sequenz von *B. tropica* detektiert worden. Vielmehr sind Sequenzen, die mit *B. mimosarum* und *B. nodosa* verwandt sind, vertreten. Außerdem wurden Sequenzen detektiert, die zwei neuen Clustern entsprechen könnten.

Abbildung 31 zeigt das phylogenetische Dendrogramm der Familie der *Oxalobacteraceae*. Als mit *Herbaspirillum* sp. nah verwandt, jedoch nicht mit dem inokulierten Stamm identisch, hat sich eine Sequenz aus der Rhizosphäre der inokulierten Pflanze gezeigt. Zudem konnten Sequenzen aus der 16S-rDNA Klondatenbank der nicht gedüngten Kontrollpflanze zur Gattung *Herbaspirillum* eingeordnet werden. 16S-rDNA-Sequenzen aus allen Behandlungen konnten als nah verwandt zur Gattung *Ralstonia* sp. eingeordnet werden. Ferner konnten Sequenzen aus 16S-rDNA- und 16S-cDNA-Klondatenbanken aller Behandlungen detektiert werden die zur Gattung *Duganella* sp. nah verwandt sind. Es konnten ebenfalls Sequenzen gefunden werden, die zu den Gattungen *Massilia* sp. und *Janthinobacterium* sp. zu rechnen sind.

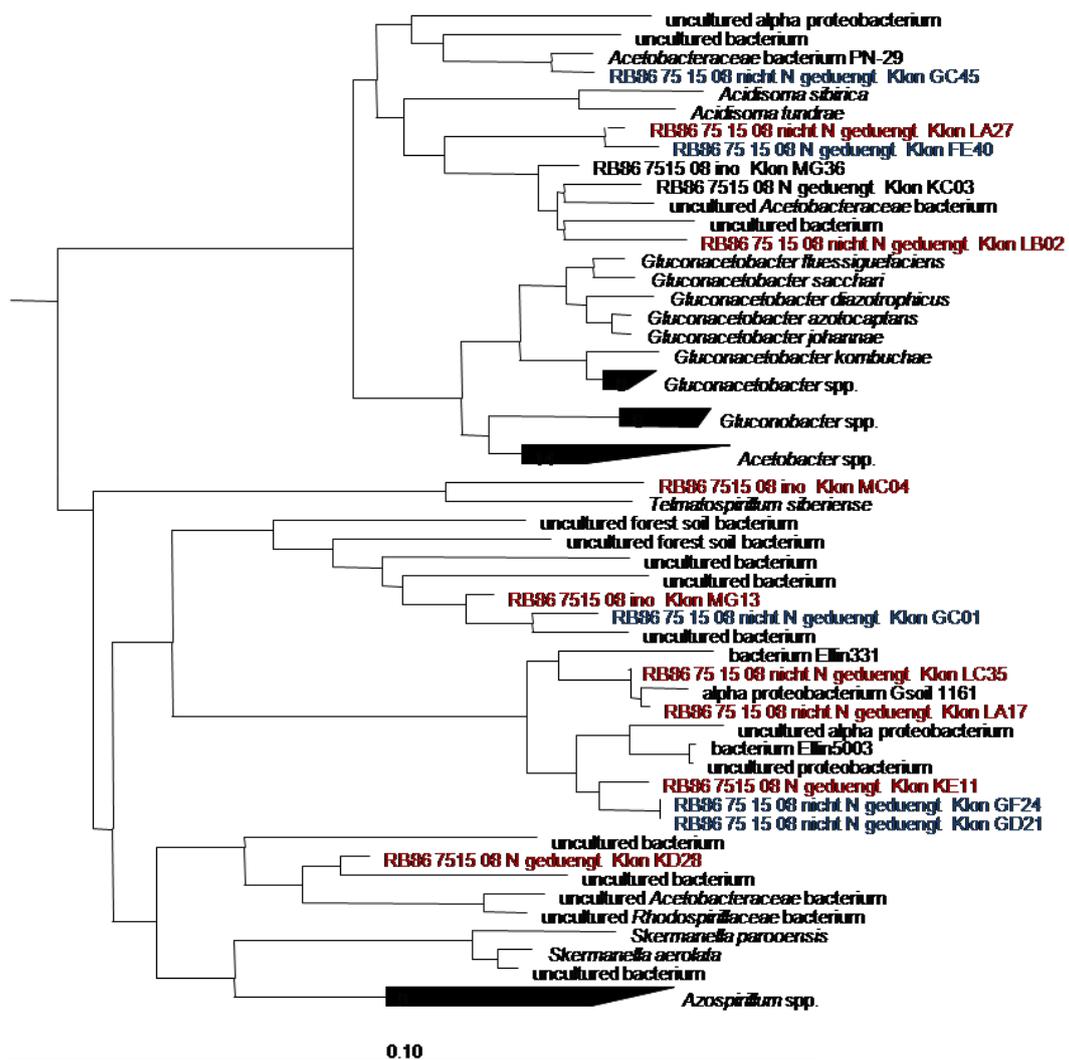


Abb. 27: Phylogenetisches Dendrogramm der  $\alpha$ -Proteobacteria, Feld-Experiment 2008. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

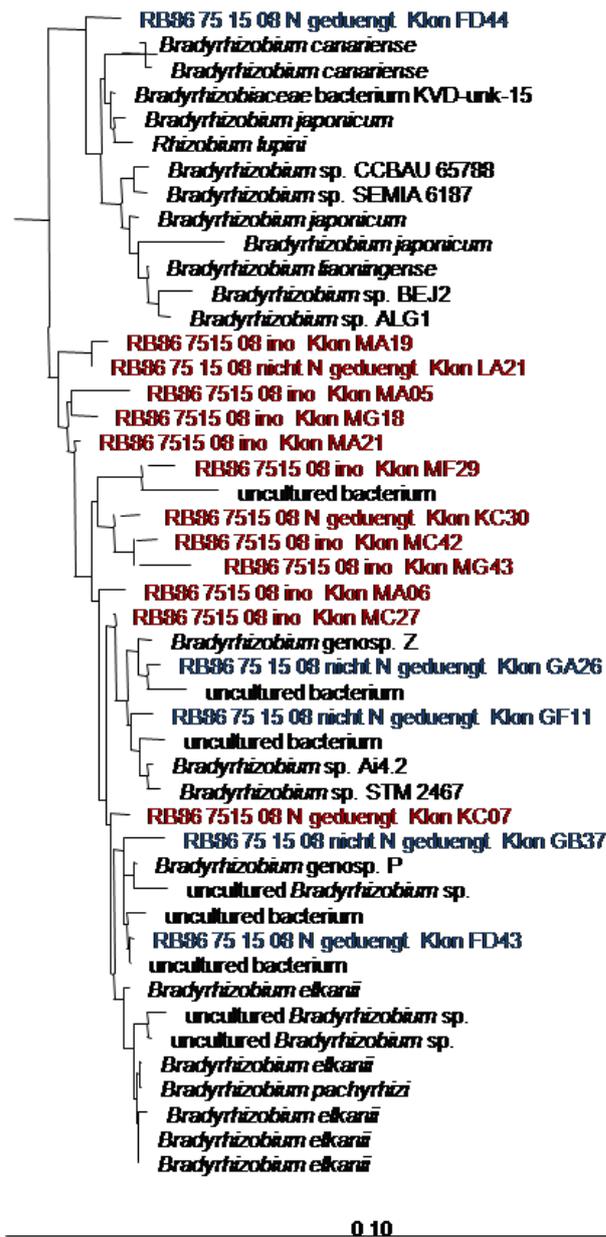


Abb. 28: Phylogenetisches Dendrogramm der *Bradyrhizobium*, Feld-Experiment 2008. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

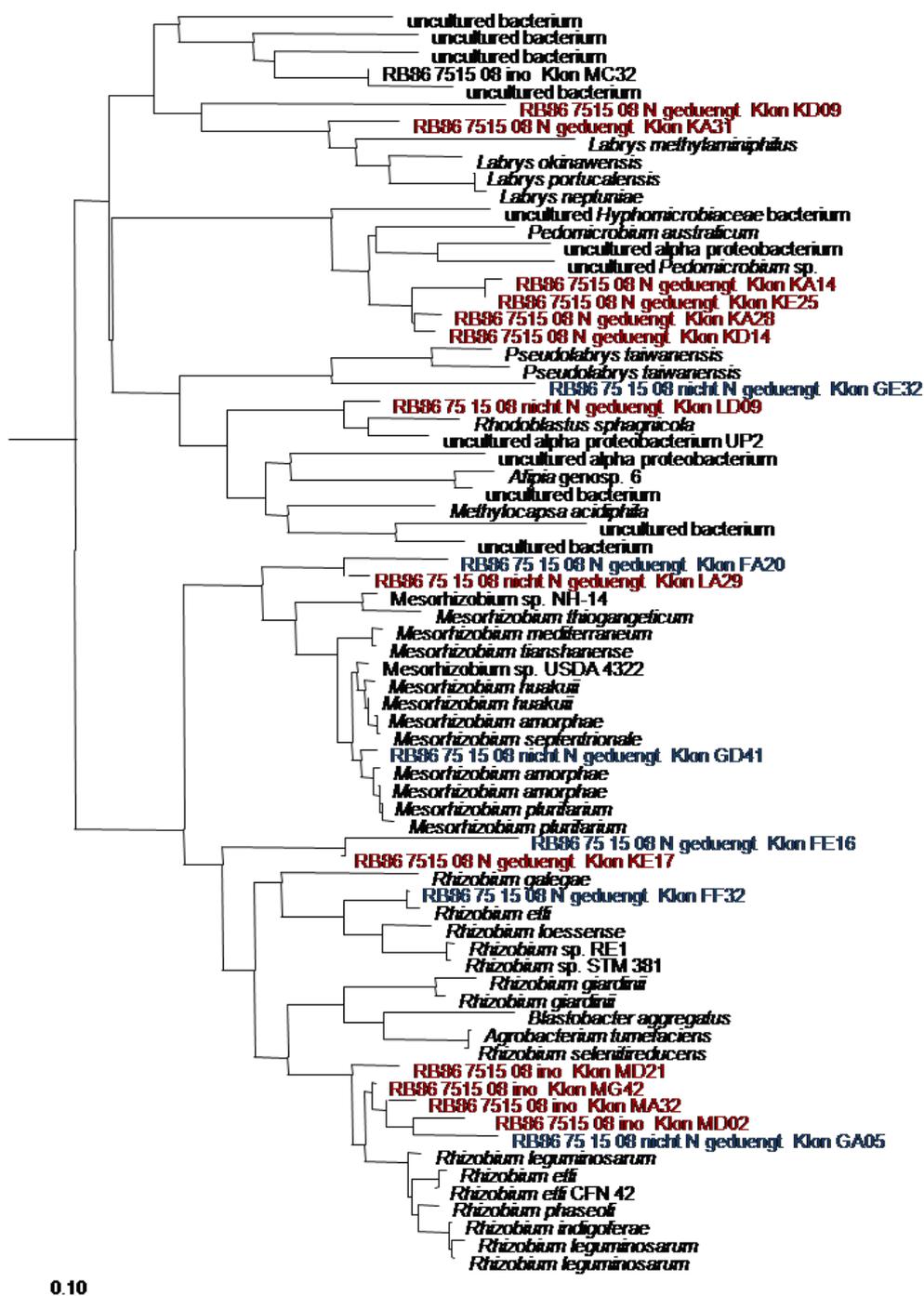


Abb. 29: Phylogenetisches Dendrogramm der *Rhizobiales*, Feld-Experiment 2008. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

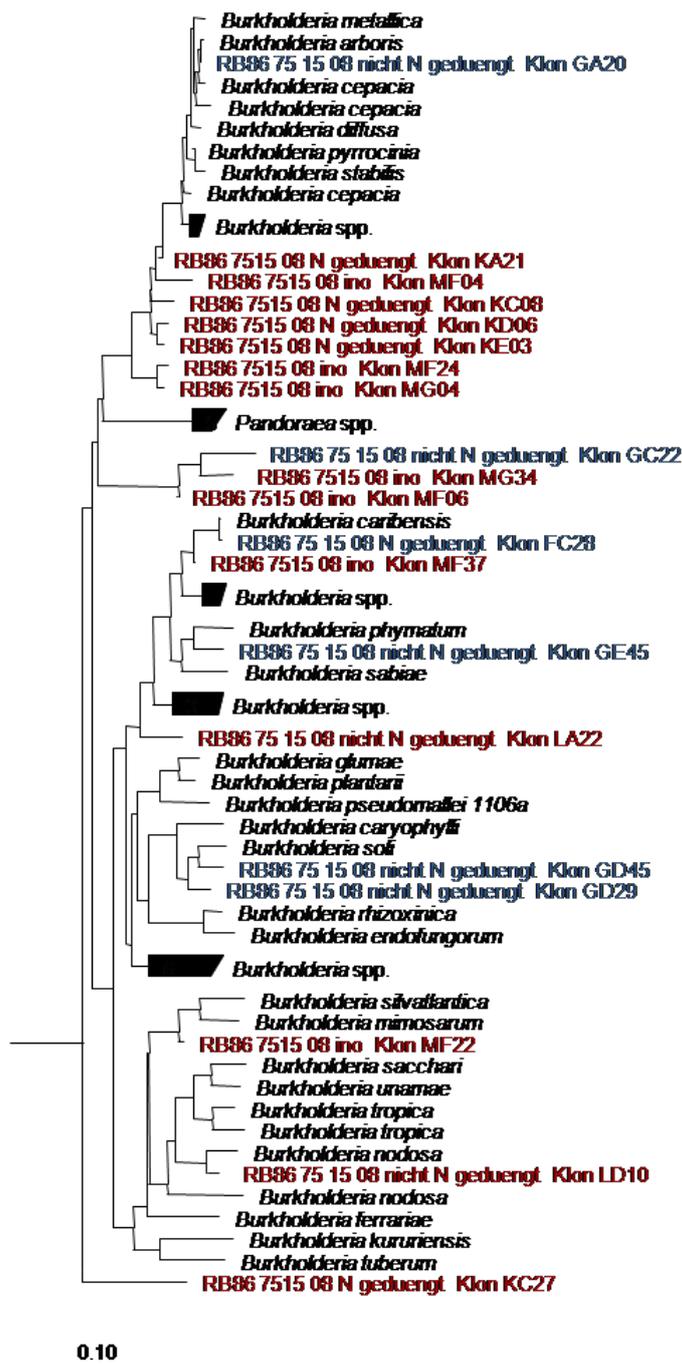


Abb. 30: Phylogenetisches Dendrogramm der *Burkholderiales*, Feld-Experiment 2008. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

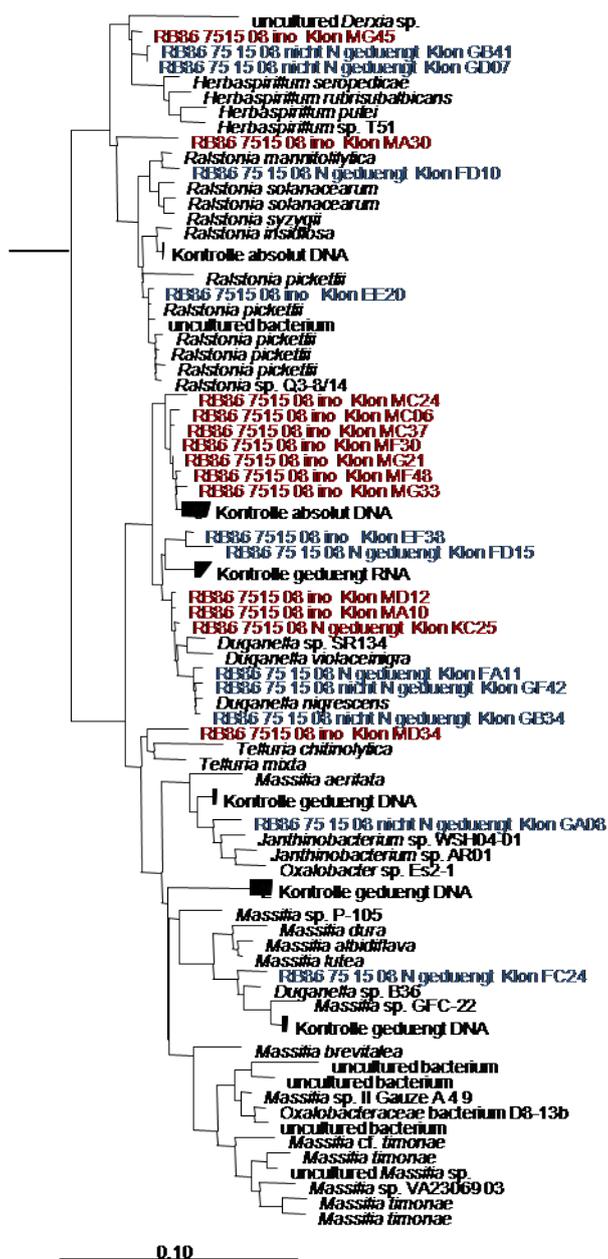


Abb. 31: Phylogenetisches Dendrogramm der *Oxalobacteraceae*, Feld-Experiment 2008. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

## Vergleichende phylogenetische Analyse der 16S-rRNA und der 16S-rDNA der Pflanzen-assoziierten bakteriellen Gemeinschaft im Feldversuch 2009

Im darauffolgenden Jahr 2009 wurden im März vom selben Feldversuch zusätzlich zu den Wurzeln auch die Sprosse (Blattscheiden) beprobt (Abb. 32). Von diesen Proben wurde nur die isolierte RNA amplifiziert und für weitere Analysen verwendet. Die Anzahl der verwertbaren Sequenzen sind in der Tab. 14 aufgelistet. Ein besonderer Fokus wurde auf die detaillierte und ausführliche Analyse der Proben der flüssig inokulierten Pflanzen und der Kontrollpflanzen ohne Düngung gelegt.



**Abb. 32:** Zuckerrohr-Versuchsfeld am EMBRAPA (Seropedica, RJ) im März 2009)

**Tab. 14:** Vergleichende Analyse der Bakteriengemeinschaften des Feldversuchs 2009, Probenbeschreibung und Anzahl der verwertbaren Klone der 16S-rRNA

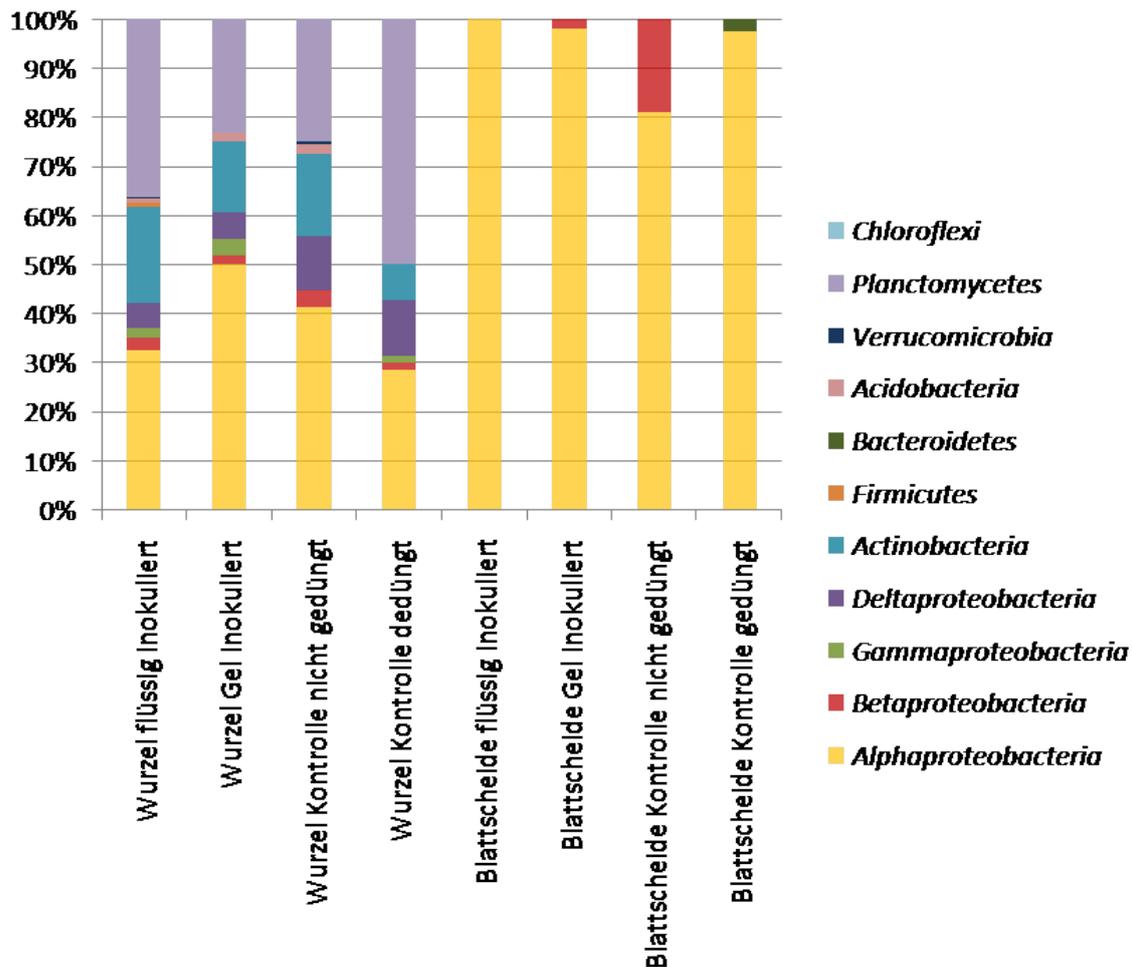
Behandlung	Anzahl Seq. Wurzel	Anzahl Seq. Spross
Kontrolle nicht gedüngt	154	21
Kontrolle gedüngt	79	38
inokuliert (flüssig)	295	118
inokuliert (Gel)	61	99

Abb. 33 zeigt eine schematische Darstellung der Zusammensetzung der aktiven Bakteriengemeinschaften. In der isolierten RNA der Wurzeln aller beprobten Pflanzen konnten die Hauptentwicklungslinien der *Planctomycetes*, *Actinobacteria* und *Acidobacteria* detektiert werden. Diese drei Phyla wurden in keiner amplifizierten 16S-rRNA

der Spross-bürtigen Proben gefunden. Sequenzen der Hauptentwicklungslinie *Actinobacteria* wurden der Ordnung *Actinomycetales* zugeordnet. Sequenzen, die zum Phylum *Planctomycetes* zugeordnet wurden, waren zur Gattung *Isosphaera* nah verwandt. Ebenso konnten Sequenzen der  $\gamma$ - und  $\delta$ -*Proteobacteria*, welche bekannte im Boden lebende und mit Wurzeln assoziierte Bakterien beinhalten, ausschließlich aus der isolierten RNA von Wurzeln isoliert werden. Sowohl die Sequenzen aus isolierter RNA von Spross-Proben waren ausschließlich Sequenzen der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* zuzuordnen, als auch der Großteil der aus der RNA der Wurzeln stammenden Sequenzen war der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* zugehörig. Den relativ gesehen größten Teil der Sequenzen nahmen Sequenzen der  $\alpha$ -*Proteobacteria* ein, im Fall der aus der RNA der Sprosse generierten Sequenzen gehörten über 97 % zu den  $\alpha$ -*Proteobacteria*.

Bei den aus der Blattscheide der Kontrollpflanze generierten 16S-rRNA Sequenzen handelt es sich um die Familien *Acetobacteraceae* ( $\alpha$ -*Proteobacteria*, Abb. 34 und 35) und *Burkholderiaceae* ( $\beta$ -*Proteobacteria*, Abb. 37). In der isolierten RNA der Blattscheide der Kontrollpflanze, welche von dem Stickstoff-gedüngten Feld stammte, wurden nur Sequenzen der Familie *Acetobacteraceae* detektiert. Somit wurden nah verwandte Sequenzen der inokulierten Bakterienarten ebenfalls in nicht inokulierten Blattscheiden gefunden. Aber auch in der isolierten RNA der Blattscheiden der inokulierten Pflanzen (flüssig und Gel) wurden fast ausschließlich Sequenzen der Familie *Acetobacteraceae* detektiert. Aus der 16S-rRNA der Blattscheiden der Gel-inokulierten Pflanze konnten zudem Sequenzen der Familie *Burkholderiaceae* amplifiziert werden.

Aus der RNA der Wurzeln der Kontrollpflanzen ohne Düngung wurden 16S-rRNA Sequenzen der Familien *Acetobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, der Ordnungen *Burkholderiaceae*, *Rhodospirillales* und ebenfalls der Familie *Oxalobacteraceae* erhalten. In isolierter RNA der Wurzel der Zuckerrohr-Pflanzen mit Stickstoffdüngung wurden Sequenzen der Familien *Acetobacteraceae*, *Burkholderiaceae* und *Rhodospirillaceae* detektiert, jedoch keine *Oxalobacteraceae*. Wurzelassoziierte Sequenzen der Familien *Acetobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhodospirillaceae* und *Oxalobacteraceae* wurden in den flüssig inokulierten Pflanzen detektiert. In der isolierten RNA der Wurzeln der Gel-inokulierten Pflanzen konnten dieselben Gruppen der *Bacteria* detektiert werden, mit Ausnahme der Familie *Oxalobacteraceae*. Zudem wurde hier ein zu *Leptothrix* spp. nah verwandtes Bakterium gefunden.



**Abb. 33:** Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften des Feldversuchs im Jahr 2009 auf Basis der 16S-rRNA

Zur detaillierten Analyse der detektierten Bakteriengemeinschaft wurden phylogenetische Dendrogramme generiert (Abb. 34, 35, 37 und 36). Abb. 34 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der Familie *Acetobacteraceae*. Es wurde festgestellt, dass fast alle nah verwandten Sequenzen des inokulierten Bakteriums *Gluconacetobacter diazotrophicus* in isolierter RNA der Spross-Proben nachgewiesen wurden, jedoch kaum in der RNA der Wurzeln (Abb. 34). Die meisten dieser Sequenzen stammen aus isolierter RNA der Blattscheiden inokulierter Pflanzen. Nah verwandte Sequenz zu *Asaia krungthepensis*, einem Pflanzen-assoziierten Essigsäure-Bakterium (YUKPHAN *et al.*, 2004), wurden in der isolierten RNA aller Spross-Proben nachgewiesen. Nah Verwandte von *Bradyrhizobium* spp. und *Azospirillum* spp. konnten in isolierter RNA aller Wurzel-Proben detektiert werden. *Herbaspirillum* sp. wurde nur in einem Fall detektiert, die RNA stammt von einer Wurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohr-Pflanze. Sequenzen der Gattung *Burkholderia* wurden in isolierter RNA vom Spross der nicht gedüngten Kontroll-Pflanze und in isolierter RNA vieler Wurzeln aller Behandlungen

und Kontrollen detektiert.

Abbildung 35 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm von *Gluconacetobacter* sp. in ihrem Verwandtschaftsverhältnis zu den in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen. Es konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen den 16S-rRNA Gensequenzen der validierten Art *Gluconacetobacter diazotrophicus* und einigen in dieser Arbeit generierten, phylogenetisch nah verwandten Sequenzen festgestellt werden, was auf die klare Identifizierung des inokulierten Bakterienstamms PAL 5 hinweist. Diese Sequenzen stammen fast ausschließlich aus den Sprossen inokulierter Pflanzen, nur eine einzige Sequenz stammt aus isolierter RNA eines Sprosses der Kontrollpflanzen.

Abbildung 36 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der Ordnung *Rhizobiales*. Mehrere Sequenzen der Klondatenbanken aller Wurzeln verschiedener Behandlungen und Kontrollen konnten in die Gattungen *Rhizobium* sp. und *Bradyrhizobium* sp. eingeordnet werden.

Abbildung 37 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der Ordnung *Burkholderiales*. RNA-Sequenzen der 16S-rRNA aus Wurzeln inokulierter Zuckerrohrpflanzen und der nicht gedüngten Kontrollpflanze konnten der Gattung *Burkholderia* zugeordnet werden. Zudem wurden weitere Verwandte anderer Bakteriengattungen der Ordnung *Burkholderiales* in den in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen detektiert. In dieser Bakterien-Ordnung ist die phylogenetische Einordnung auf Basis eines kurzen 16S-rRNA Fragmentes jedoch sehr schwierig.

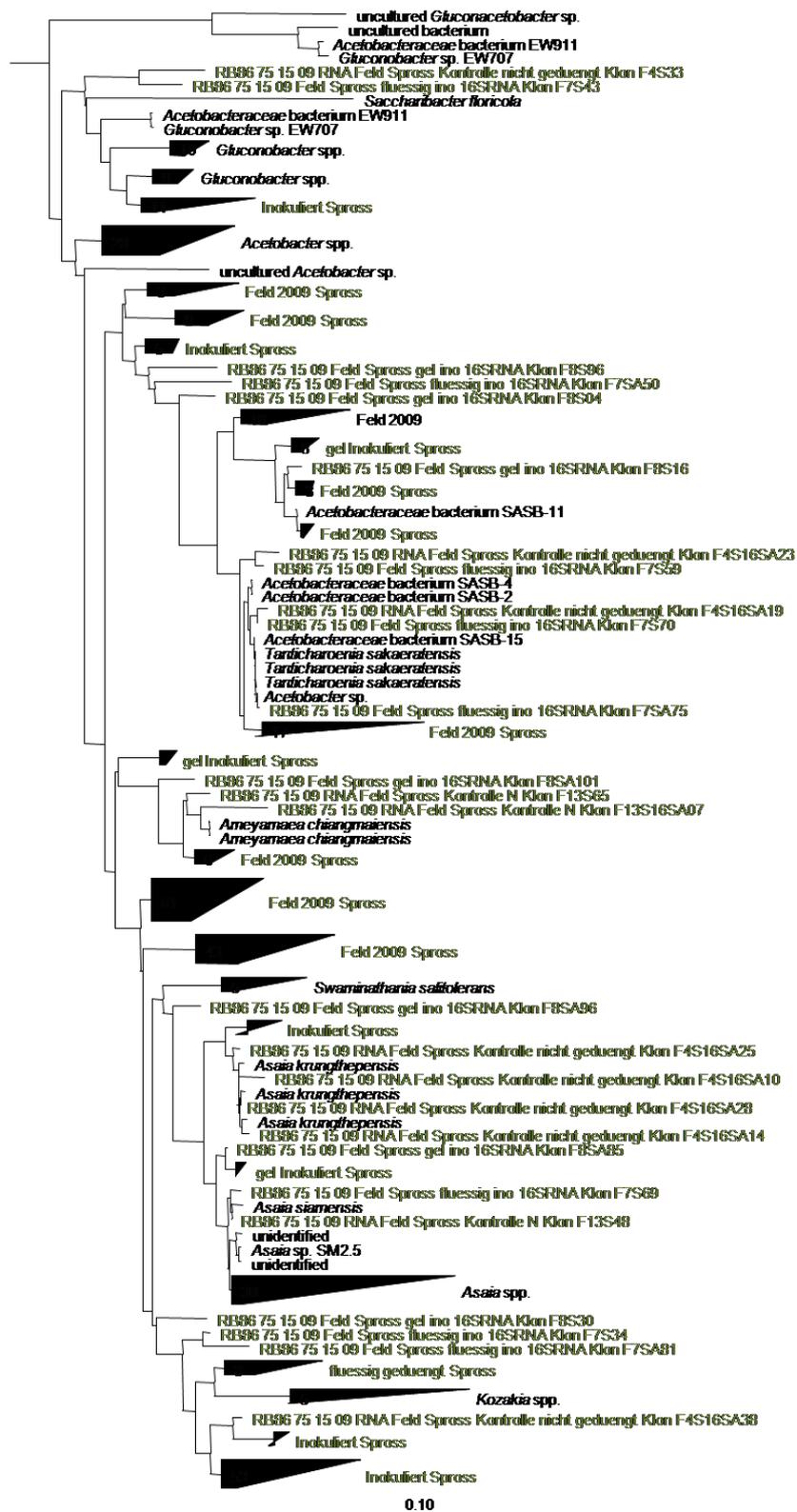


Abb. 34: Phylogenetisches Dendrogramm der *Acetobacteraceae*, Feld-Experiment 2009. Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %



Abb. 35: Phylogenetisches Dendrogramm der *Gluconacetobacter*, Feld-Experiment 2009. Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

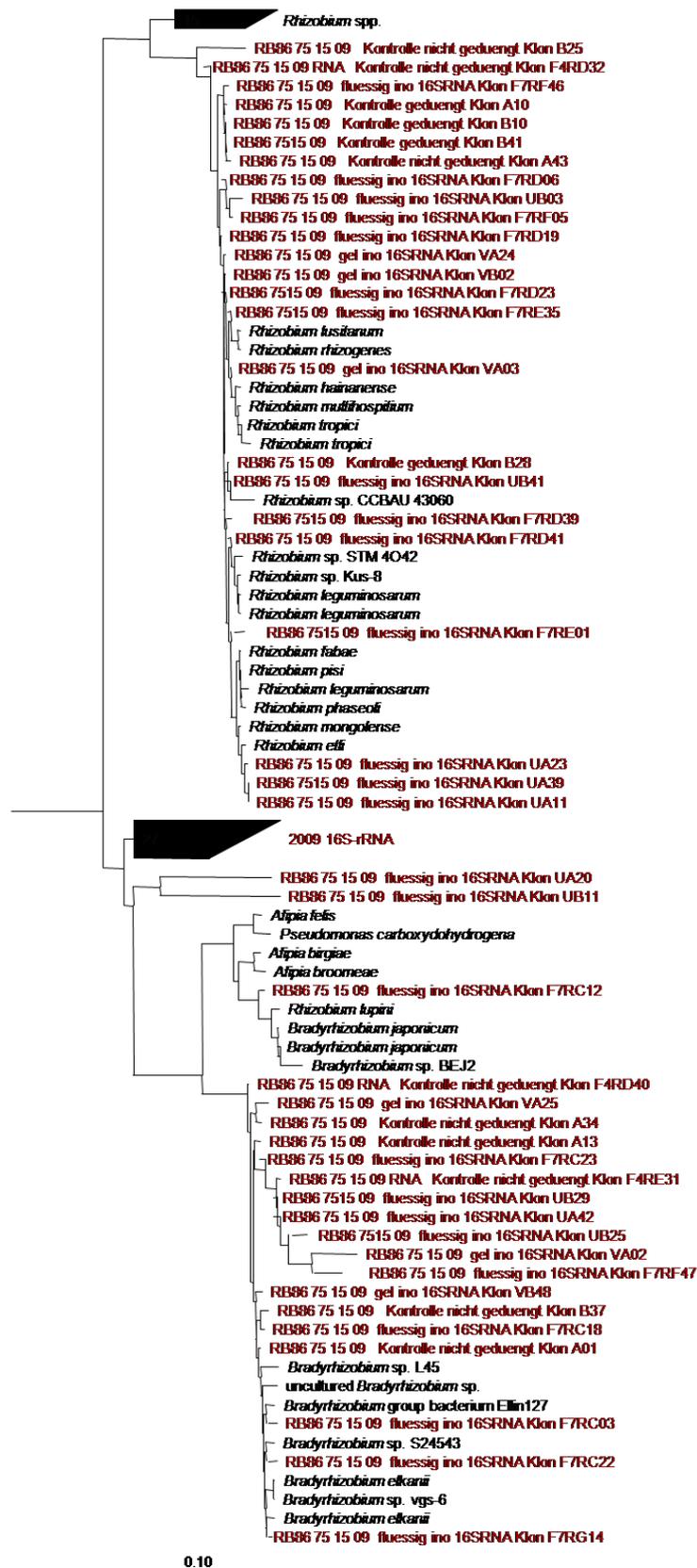


Abb. 36: Phylogenetisches Dendrogramm der *Rhizobiales*, Feld-Experiment 2009. Rot: Sequenzen aus Wurzeln. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

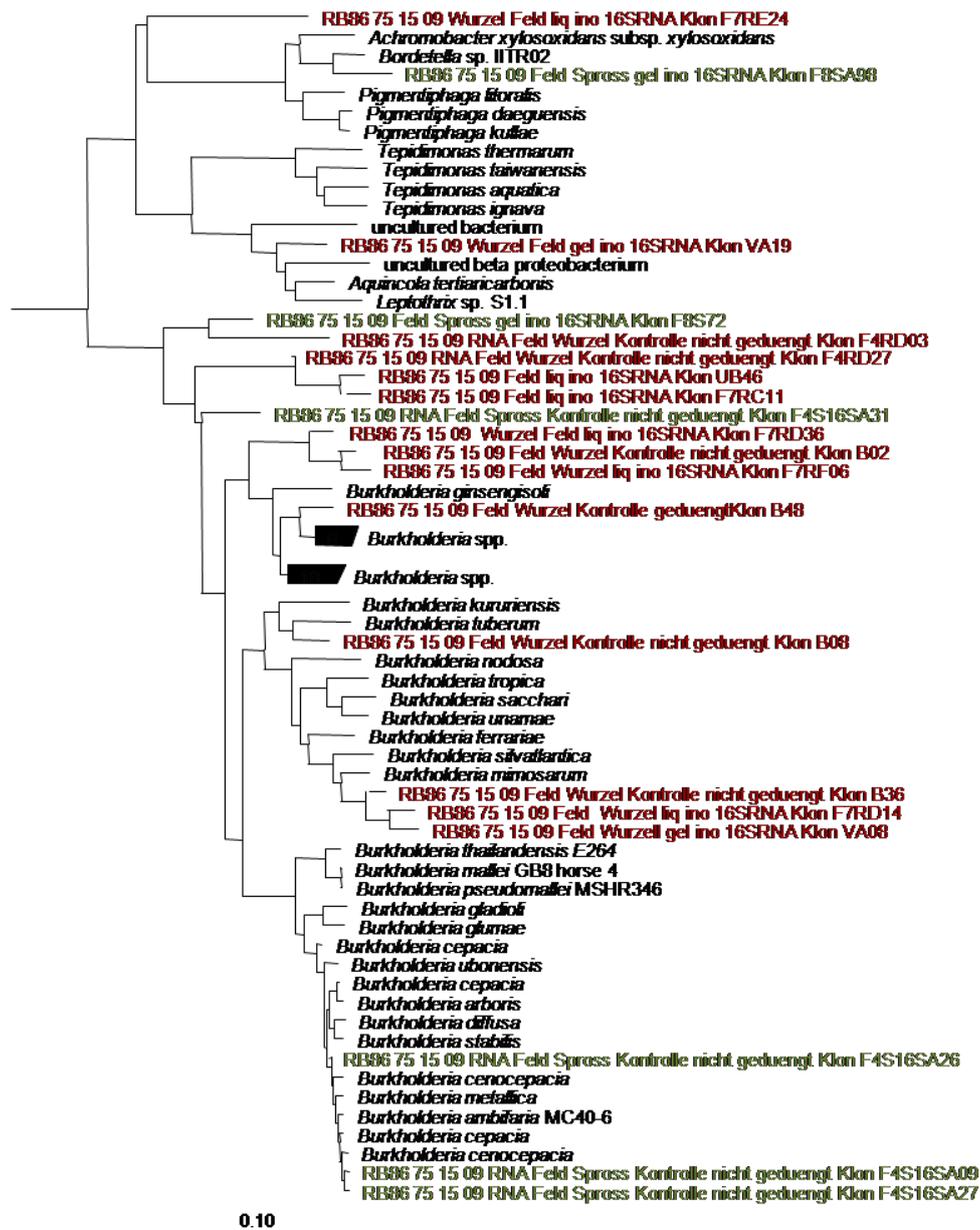


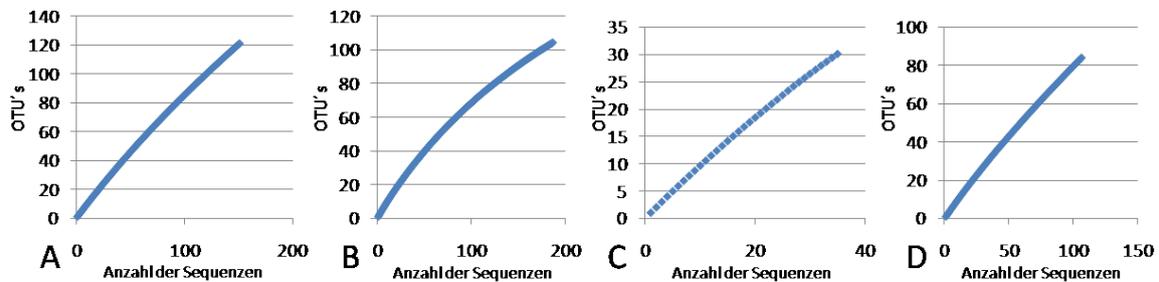
Abb. 37: Phylogenetisches Dendrogramm der *Burkholderiales*, Feld-Experiment 2009. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

#### 4.3.4 Rarefaction-Analyse der analysierten Proben

Zur Analyse der erhaltenen Klondatenbanken wurde eine Rarefaction-Analyse jeder Klondatenbank erstellt. Dies diente dazu, um abzuschätzen, ob ausreichend Klone sequenziert wurden, um eine treffende Aussage über die wirkliche Diversität im jeweiligen Habitat geben zu können. Nach dem Erstellen einer Distanz-Matrix wurde die Rarefaction mit dem Programm Dotur berechnet. Die gezeigten Graphen wurden mit dem 97 %-Wert der Distanzmatrix berechnet. Anhand der Graphen lässt sich zeigen, wie

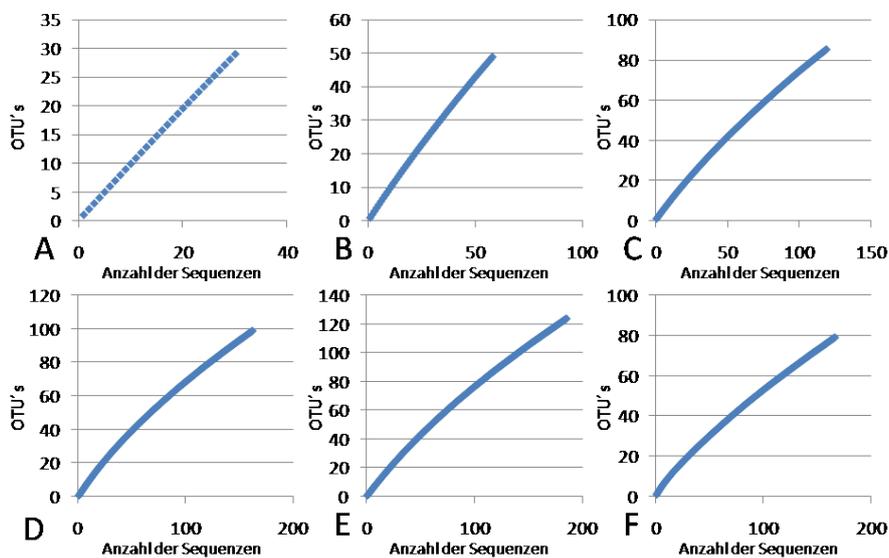
viele OTUs (Operational Taxonomic Unit) in der jeweiligen Probe mit den verwertbaren Sequenzen gefunden werden konnten. Eine Sättigung der entstandenen Kurve zeigt, dass genügend Sequenzen analysiert wurden, um die gesamte Diversität einer Probe zu erfassen.

Abbildung 38 zeigt die Rarefaction-Analysen der Klondatenbanken für die Wurzelproben des Tankversuchs im Jahr 2007 (siehe Kap. 4.3.1). Während bei den Klondatenbanken aus DNA der Varietäten SP70, RB72 und RB82 (A, C, D) nur eine jeweils fast lineare Steigung des Graphen zu sehen ist, deutet sich bei der RNA-Klondatenbank der Varietät SP70 (B) ein Übergang zur Sättigung des Graphen an. In allen vier Klondatenbanken sind jedoch große Lücken bei der Erfassung der Diversität vorhanden. Der Probenahmeumfang von 100-200 Sequenzen reicht also bei weitem nicht aus, um die bakterielle Diversität anhand der 16S-rRNA Gene zu erhalten.



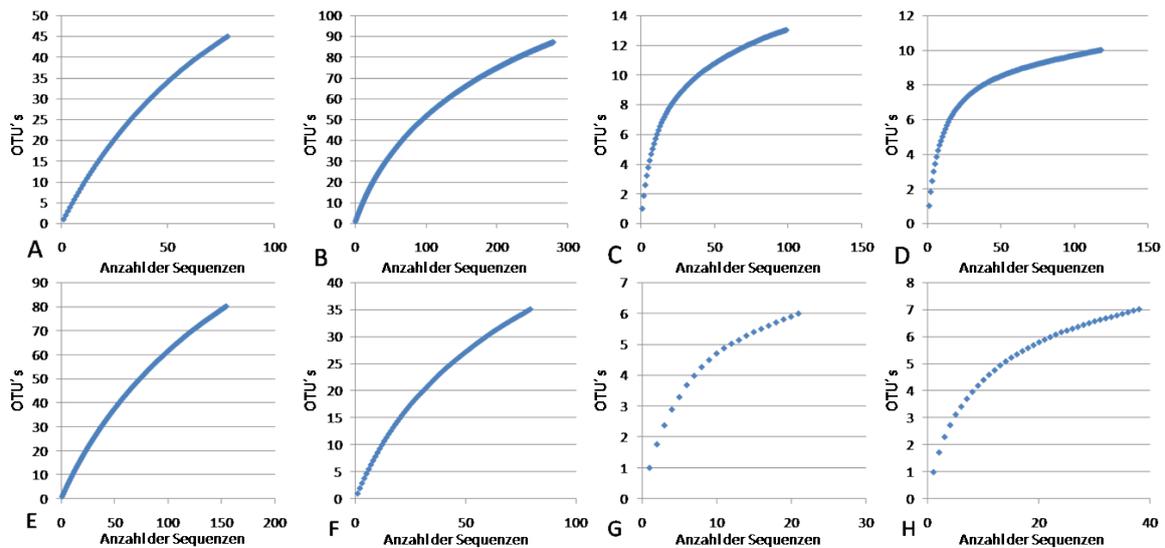
**Abb. 38:** Rarefaction-Analyse der 16S-rDNA-Klondatenbanken für die Wurzelproben des Tankversuchs 2007. A: 16S-rDNA-Klondatenbank der Probe „Red Node“ der Varietät SP70, B: 16S-rRNA Klondatenbank der Probe „Red Node“ der Varietät SP70, C: 16S-rDNA-Klondatenbank der Wurzeln von Varietät RB72, D: 16S-rDNA-Klondatenbank der Wurzeln von Varietät RB82

Abbildung 39 zeigt die Rarefaction-Analysen für die 16S-rDNA- und 16S-rRNA Klondatenbanken der Wurzelproben der Feldprobenahme 2008. Bei allen Datenbanken handelt es sich um amplifizierte rDNA bzw. rRNA aus Wurzelproben der Zuckerrohr-Varietät RB86 mit den verschiedenen Ansätzen inokuliert (A, D), Kontrolle gedüngt (B, E) und Kontrolle nicht gedüngt (C, F). Bei der Analyse wurde ersichtlich, dass weder bei der DNA-Sequenzierung der 16S-rRNA Gene noch bei der cDNA-Sequenzierung der 16S-rRNA eine Sättigung erreicht werden konnte. Die Graphen der 16S-rDNA-Klondatenbanken (A, B, C) zeigen eine lineare Steigung, während die der 16S-rRNA Klondatenbanken (D, E, F) ein leichtes Abbiegen zeigt, welches jedoch bei weitem keine Sättigung erreicht. Die Diversität ist deshalb nicht annähernd vollständig reflektiert.



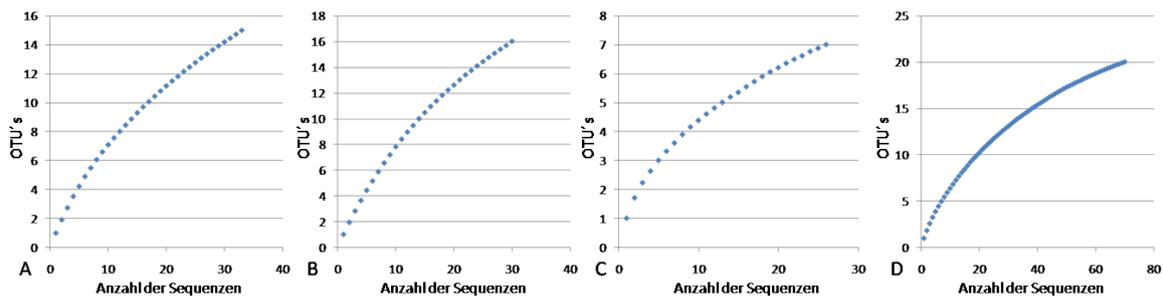
**Abb. 39:** Rarefaction-Analyse der 16S-rDNA-/rRNA-Klondatenbanken für die Wurzelproben des Feldversuchs 2008. A: 16S-rDNA-Klondatenbank der Wurzel-Probe der inokulierten Zuckerrohrpflanze der Varietät RB86, B: 16S-rDNA-Klondatenbank der Wurzel-Probe der gedüngten Kontrollpflanze der Varietät RB86, C: 16S-rDNA-Klondatenbank der Wurzel-Probe der nicht gedüngten Kontrollpflanze der Varietät RB86, D: 16S-rRNA Klondatenbank der Wurzel-Probe der inokulierten Zuckerrohrpflanze der Varietät RB86, E: 16S-rRNA Klondatenbank der Wurzel-Probe der gedüngten Kontrollpflanze der Varietät RB86, F: 16S-rRNA Klondatenbank der Wurzel-Probe der nicht gedüngten Kontrollpflanze der Varietät RB86

Die Rarefaction-Analysen der 16S-rRNA der Wurzel- und Sprossproben der Feldprobenahme 2009 lassen erkennen, dass bei den Klondatenbanken der Wurzelproben der Varietät RB86 (A, B, E, F) keine Sättigung erreicht werden konnte (Abb. 40), selbst bei einer Anzahl von fast 300 verwertbaren Klonsequenzen (B). Bei den Rarefaction-Analysen der Sprossproben (C, D, G, H) ist die Kurve jedoch weitgehend im Bereich der Sättigung. Vor allem bei der Blattscheide der flüssig-inokulierten Zuckerrohrpflanze (D) ist eine Sättigung bei mehr als 10 OTUs (bei mehr als 100 Sequenzen) erkennbar.



**Abb. 40:** Rarefaction-Analyse der 16S-rDNA-/rRNA-Klondatenbanken der Wurzel- und Sprossproben der Feldprobenahme 2009. A: Gel inokuliert (Wurzel), B: Flüssig inokuliert (Wurzel), C: Gel inokuliert (Blattscheide), D: Flüssig inokuliert (Blattscheide), E: Kontrolle nicht gedüngt (Wurzel), F: Kontrolle gedüngt (Wurzel), G: Kontrolle nicht gedüngt (Blattscheide), H: Kontrolle gedüngt (Blattscheide)

Die Rarefaction-Analyse der 16S-rRNA Klondatenbanken des Gewächshausversuchs im Jahr 2009 mit der Zuckerrohr-Varietät RB86 zeigt Abbildung 41. Während mit den gewonnenen Sequenzen (jeweils ca. 30) der Klondatenbanken der Wurzelproben keine Sättigung erreicht werden konnte (A, B), deutet sich bei den Graphen der Rarefaction-Analyse der Spross-Proben (C,D) mit ca. 30 bzw. 70 Sequenzen ein erster Übergang in eine Sättigung an. Offensichtlich war in den Blattscheidenproben die Diversität geringer als in den Wurzeln. Die bakterielle Diversität der inokulierten Pflanzen scheint vor allem in der Wurzel weitaus geringer als in den nicht inokulierten Kontrollpflanzen.



**Abb. 41:** Rarefaction-Analyse der 16S-rRNA des Gewächshausversuchs. A: inokuliert Wurzel, B: Kontrolle Wurzel C: inokuliert Blattscheide, D: Kontrolle Blattscheide

Zusammenfassend dargestellt war bei der 16S-rRNA Sequenz-Analyse der Wurzeln der verschiedenen Zuckerrohr-Varietäten mit den verschiedenen Behandlungen auch eine annähernde Sättigung nicht erreicht. Bei der 16S-rRNA Klonbanken-Überprüfung der Wurzel-Proben mittels Rarefaction war ebenfalls in keinem Fall eine Sättigung gegeben; jedoch konnte die Diversität besser erfasst werden als bei der 16S-rRNA Gen-Analyse der Wurzel-Proben. Die Rarefaction-Analyse der Blattscheiden zeigte zum Teil eine Sättigung, bei der alle in der 16S-rRNA Fraktion vorhandenen Organismen mittels Sequenz-Analyse erfasst werden konnten. Bei allen Rarefaction-Analysen der 16S-rRNA zeigte sich ein Übergang in die Sättigungs-Phase des Graphen zumindest andeutungsweise. Dies bedeutet, dass - erwartungsgemäß - nur ein Teil der vorhandenen Bakterien tatsächlich aktiv sind und eine effektive Proteinsynthese durchführt.

#### 4.4 16S-rRNA Analyse der bakteriellen Diversität ausgewählter diazotropher Bakterien

##### 4.4.1 Klondatenbank-Analysen der bakteriellen Diversität ausgewählter diazotropher $\alpha$ - und $\beta$ -Proteobakterien

Durch die Fokussierung auf diazotrophe Bakteriengruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -*Proteobacteria*, von denen in den Experimenten zahlreiche nah verwandte Sequenzen gewonnen wurden, war ein Vergleich des mehrjährigen Feldversuches sowie des Tank- und Gewächshaus-experiments möglich. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls festgestellt werden, inwiefern sich die inokulierten diazotrophen Bakterienstämme (siehe Tab. 2) Pflanzen-assoziiert etablieren konnten. Die in dieser Arbeit aus DNA und cDNA amplifizierten Sequenzen wurden ihrer Phylogenie entsprechend in Dendrogrammen zusammengefasst (siehe Kap. 3.13).

In der Abbildung 42 ist die enge phylogenetische Verwandtschaft der in dieser Arbeit gewonnenen 16S-rRNA Sequenzen der Gattung *Gluconacetobacter* gezeigt. Einige 16S-rRNA Sequenzen aus Blattscheiden inokulierter Pflanzen sind dem inokulierten Stamm

*G. diazotrophicus* PAL 5 sehr ähnlich. Diese Sequenzen werden somit als Hinweis auf die erfolgreiche Etablierung dieses Stammes in den Blattscheiden der Zuckerrohrpflanzen der Varietät RB86 75 15 des Feldversuchs gesehen. Jedoch ist auch eine Erfassung der autochthonen *G. diazotrophicus* nicht auszuschließen. Bemerkenswerterweise konnte dieser Stamm in Wurzeln der Zuckerrohrpflanzen des Feldversuchs nicht detektiert werden. In den Wurzel- und Sprossproben inokulierter Pflanzen des Gewächshausversuchs sowie in den Sprossproben von Pflanzen aller Behandlungen des Feldversuchs konnten 16S-rRNA Sequenzen von *Gluconacetobacter* sp. detektiert werden. Bei diesen Sequenzen ist die phylogenetische Zuordnung jedoch nicht bis zur Benennung der Bakterienart möglich, da die Sequenziergenauigkeit bei dem relativ kurzen 16S-rRNA Sequenzbereich, der zur Amplifikation der cDNA verwendet wurde, dies nicht erlaubt. Hierbei zeigen die 16S-Sequenzen des für die 16S-rRNA Klondatenbank verwendeten Fragments (ca. 550 bp, Primer 341F und 907R) von *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Typstamm, PAL 5), *G. diazotrophicus* (DNA des inokulierten Stammes, PAL 5) und *G. johannae* (Typstamm) jeweils einen Unterschied von einer Base zueinander. *G. azotocaptans* (Typstamm), *G. johannae* (Typstamm) und *G. diazotrophicus* (Typstamm) weisen jeweils zwei Basen Unterschied auf.

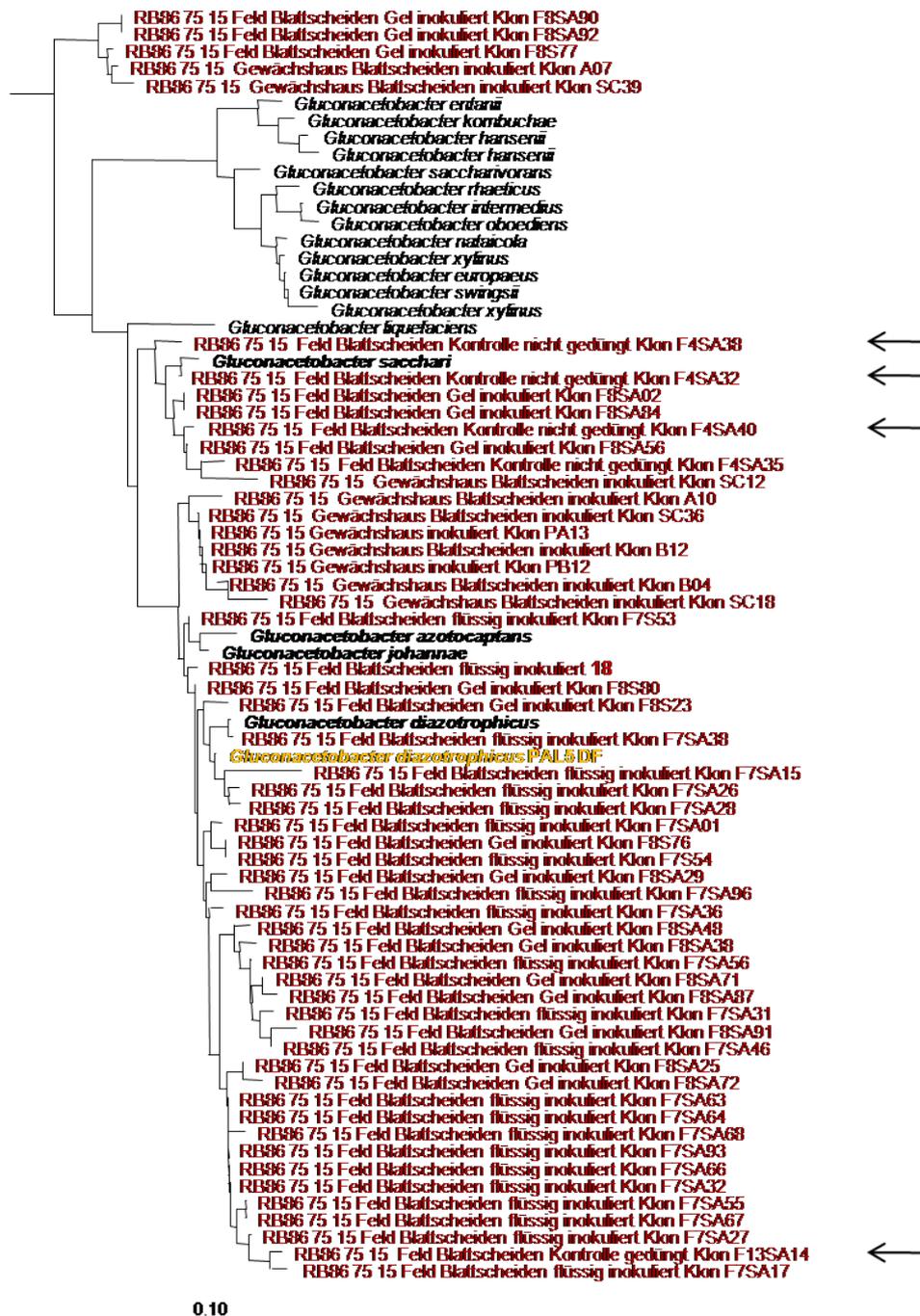


Abb. 42: Phylogenetisches Dendrogramm aller erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen der Gattung *Gluconacetobacter*. Rot: Sequenzen aus RNA; Orange: Sequenz des inokulierten Stammes PAL 5. Pfeile: Sequenzen aus nicht inokulierten Pflanzen. Hervorgehobene Zahl: Anzahl der identischen Sequenzen an dieser Position. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

In Wurzeln von Zuckerrohrpflanzen des Tank- und des Feldexperiments konnten einige Sequenzen nachgewiesen werden, die eng verwandt mit *Bradyrhizobium japonicum* sind (Abb. 43). Dabei handelt es sich um aus DNA und aus rRNA erhaltenen 16S-rRNA Sequenzen.

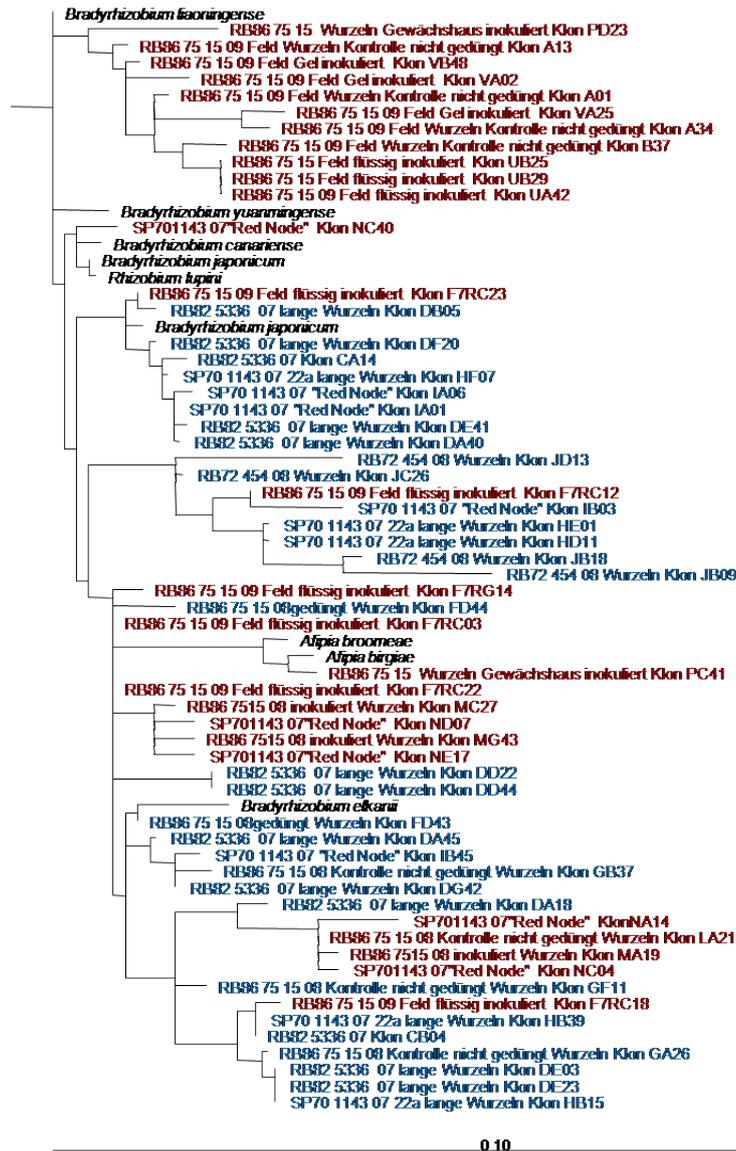


Abb. 43: Phylogenetisches Dendrogramm der erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen von *Bradyrhizobium* spp.. Rot: Sequenzen aus rRNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen, phylogenetisch zur Gattung *Bradyrhizobium* gehörenden Sequenzen wurden mit 16S-rDNA Sequenzen verglichen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Esperanza Martinez (Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca) durch kultivierungsabhängige und anschließende molekularbiologische Verfahren erhalten wurden. Die Sequenzen stammen von Bakterienreinkulturen aus dem Boden des tropischen Regenwald in der Nähe von Los Tuxtlas in Mexiko. Bodenproben des Waldes wurden als Inokulat für zwei axenisch angezogene Leguminosen (*Macroptilium atropurpureum* (Purpurbohne) und *Vigna unguiculata* (Augenbohne)) verwendet. Aus den Leguminosen, die bei dieser Methode als Bakterien-“Falle“ dienen, wurden zahlreiche Bakterien der Gattung *Bradyrhizobium* isoliert. Einige der Isolate stammen aus Boden eines agronomisch genutzten Gebietes, in dem in wechselnder Fruchtfolge Mais und Bohnen angebaut wurden. Momentan werden Experimente durchgeführt, mit denen die Besiedlung der verschiedenen erhaltenen Bakterienisolate an bzw. in Mais analysiert werden soll.

Beim Vergleich der 16S-rRNA Sequenzen dieser Arbeit und der durch Reisolierung erhaltenen Sequenzen konnten enge Verwandtschaften der Sequenzen zueinander festgestellt werden. Zahlreiche 16S-rDNA Sequenzen dieser Arbeit weisen zu mehreren Sequenzen aus Mexiko sehr enge Verwandtschaft auf (Abb. 44). Die phylogenetische Zuordnung der Sequenzen lässt sich jedoch nicht bis zur Spezies-Ebene durchführen. Einige der 16S-rRNA Sequenzen bilden eng verwandte Gen-Cluster, in denen keine bisher bekannten valid beschriebenen Arten vorhanden sind (Abb. 44, unterhalb der Sequenzen *Bradyrhizobium japonicum* und *B. liaoningense*). Dies könnte auf die Entdeckung bisher unbekannter Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* hinweisen. Zu *Afipia* spp. nah verwandte 16S-rRNA Sequenzen konnten ebenfalls detektiert werden (Abb. 44). In dieser Abbildung findet sich ebenfalls eine große Zahl an Sequenzen, die keinem bisher bekannten Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* zugeordnet werden konnten.

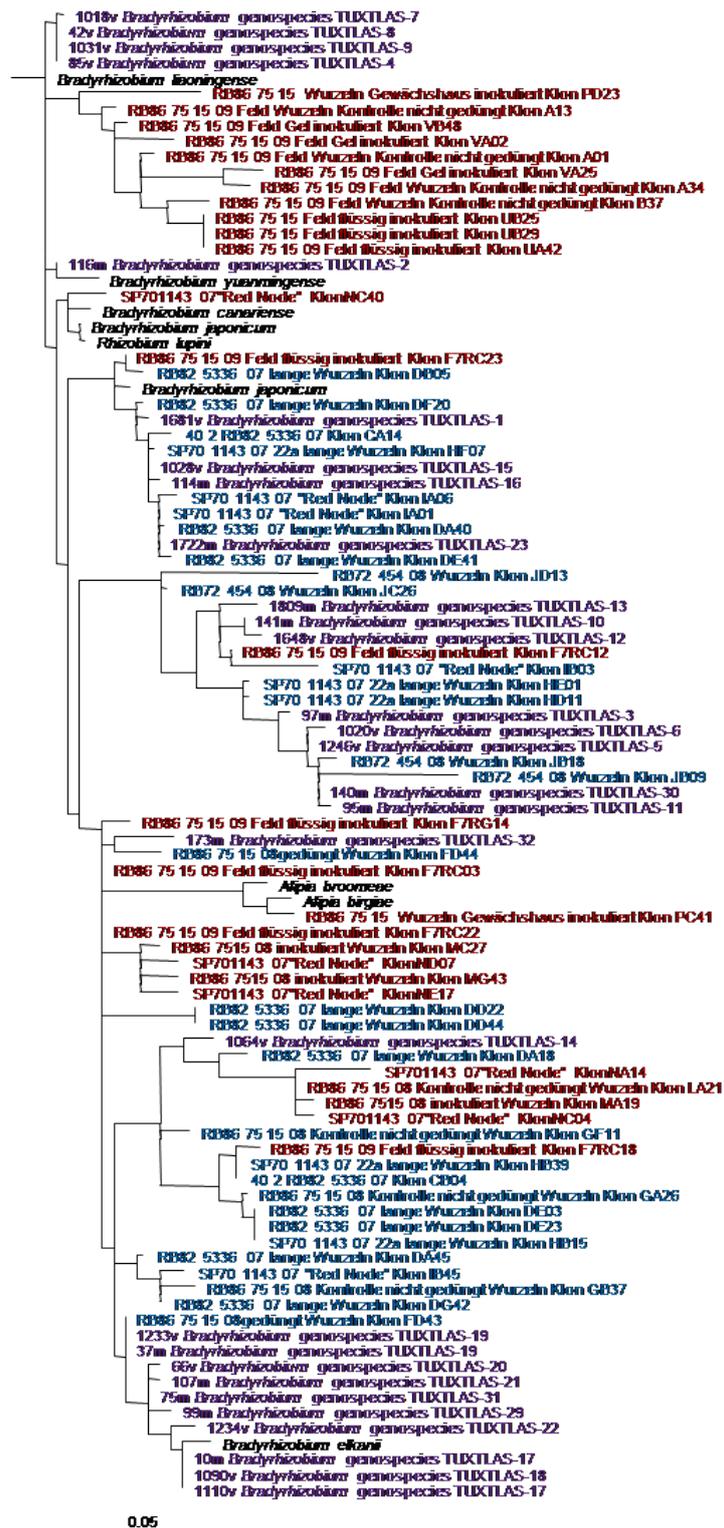
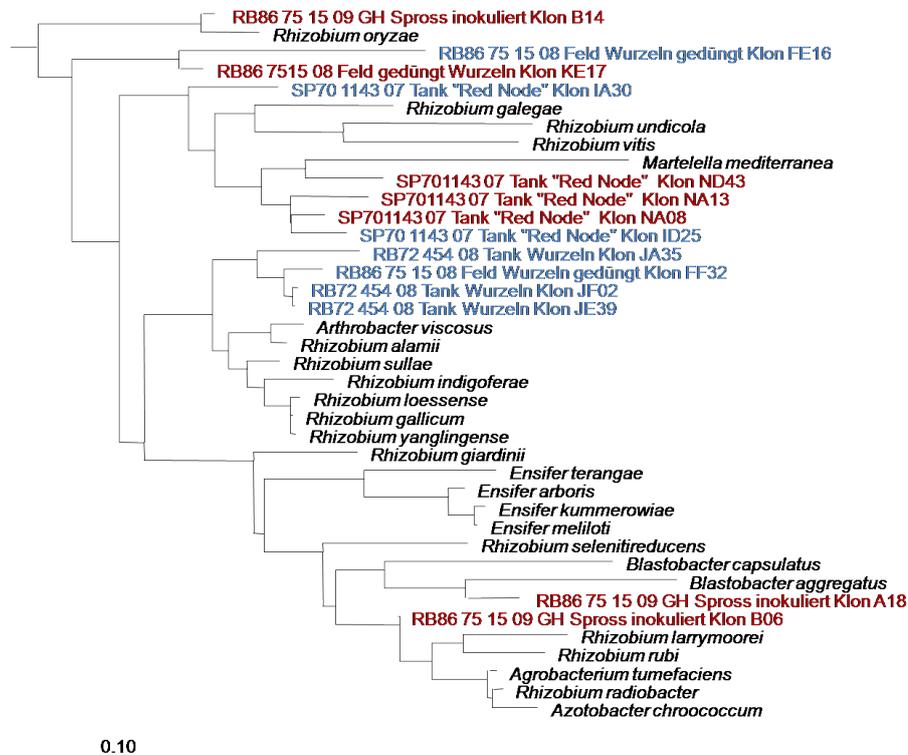


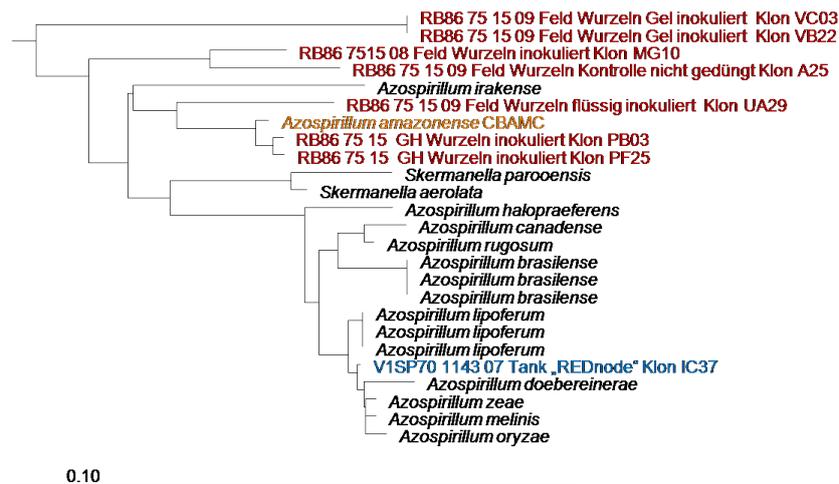
Abb. 44: Phylogenetisches Dendrogramm der 16S-rRNA Sequenzen der Gattung *Bradyrhizobium*. Schwarz: Sequenzen stammen von Typstämmen, Violett gekennzeichnete von Bakterienreinkulturen (Esperanza Martinez) aus folgenden Leguminosen: m - *Macroptilium atropurpureum* (Purpurbohne); v - *Vigna unguiculata* (Augenbohne). Blau (DNA) und Rot (RNA): Sequenzen aus Zuckerrohrwurzeln dieser Arbeit. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Zu *Rhizobium* spp. nah verwandten, in dieser Arbeit erhaltenen, 16S-rDNA und -cDNA Sequenzen zeigt die Abb. 45. Durch die relativ hohe Sequenzdivergenz zwischen den bisher bekannten Arten von *Rhizobium* und den in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen, handelt es sich vermutlich um bisher unbekannte Bakterienarten der Gattung *Rhizobium*. Bemerkenswert ist vor allem ein Cluster von 16S-rRNA und 16S-rDNA Sequenzen der Probe „Red Node“, welche die Knospe für einen neuen Spross bildet. In Blattscheiden inokulierter Pflanzen des Gewächshausversuchs konnten nah zu *Agrobacterium tumefaciens* bzw. *Rhizobium oryzae* verwandte 16S-rRNA Sequenzen nachgewiesen werden. Bei den anderen Sequenzen handelt es sich um 16S-rDNA und -cDNA Sequenzen der Wurzeln gedüngter und nicht gedüngter Pflanzen des Tank- bzw. des Feldversuchs.



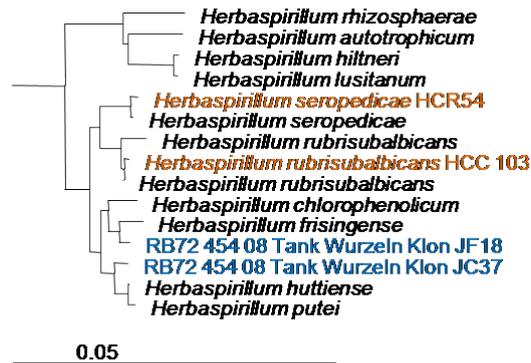
**Abb. 45:** Phylogenetisches Dendrogramm der erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen von *Rhizobium* spp.. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Abbildung 46 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft der Gattung *Azospirillum* mit den in dieser Arbeit erhaltenen, eng verwandten Sequenzen. Lediglich beim Modellversuch des Gewächshausexperiments konnte der inokulierte Bakterienstamm *Azospirillum amazonense* CBAMc in Wurzeln inokulierter Pflanzen nachgewiesen werden. Im Feldexperiment konnten Sequenzen der Gattung *Azospirillum* in Wurzeln inokulierter bzw. nicht gedüngter Pflanzen detektiert werden, die jedoch nicht zu einer der bereits bekannten Arten zugeordnet werden können.



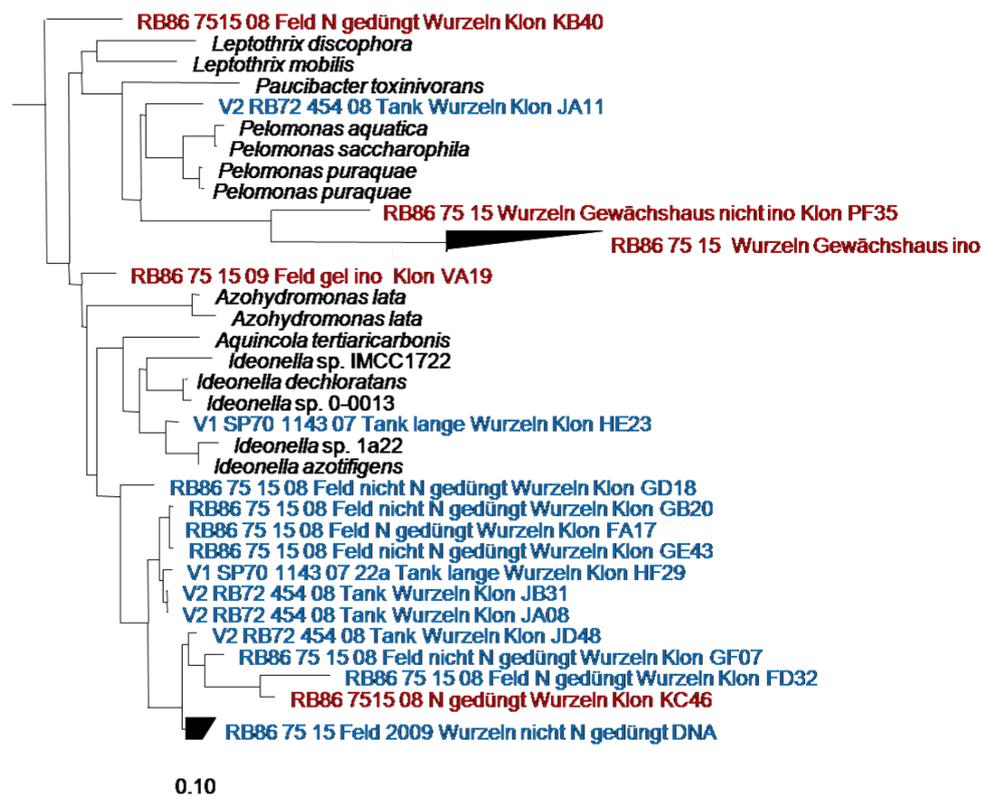
**Abb. 46:** Phylogenetisches Dendrogramm aller erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen der Gattung *Azospirillum*. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA; Orange: Sequenz des inokulierten Stammes CBAMc. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Das phylogenetische Dendrogramm aller erhaltenen Sequenzen der 16S-rRNA/DNA der Gattung *Herbaspirillum* zeigt, dass die inokulierten Bakterienstämme *H. seropedicae* HCR 54 und *H. rubrisubalbicans* HCC 103 in dieser Arbeit nicht detektiert werden konnten (Abb. 47). In Wurzeln der Zuckerrohrvarietät RB72 454 des Tank-Experiments konnten nah zu *H. frisingense* und *H. huttiense* verwandte 16S-rDNA-Sequenzen erhalten werden.



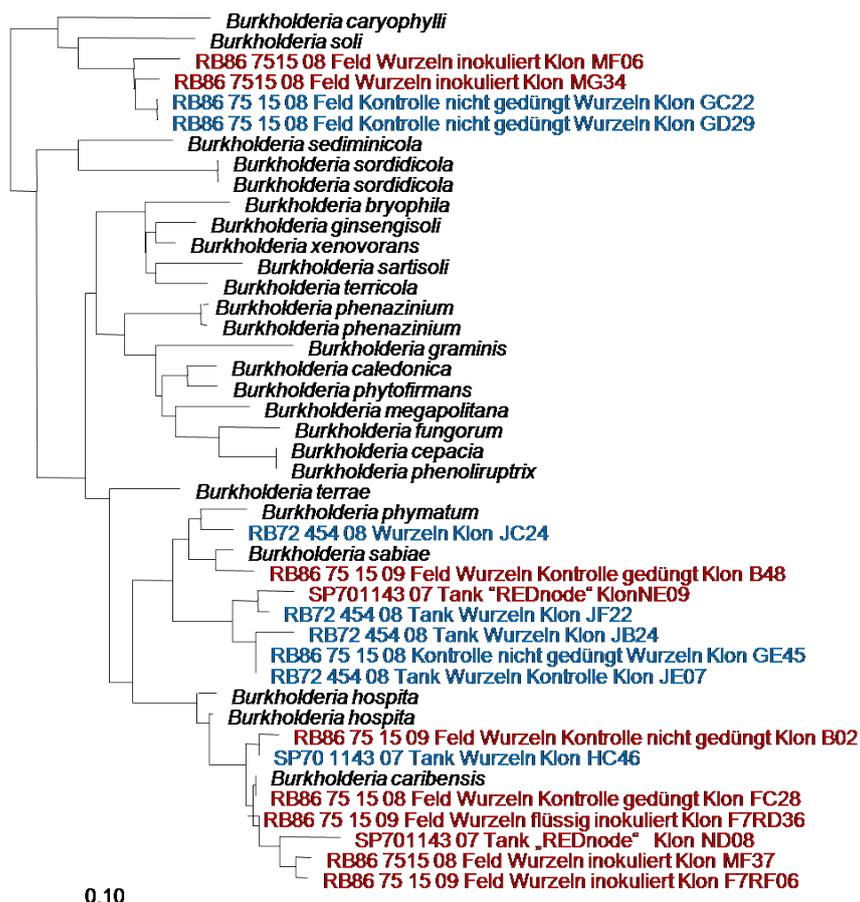
**Abb. 47:** Phylogenetisches Dendrogramm aller erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen der Gattung *Herbaspirillum*. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA; Orange: Sequenz der inokulierten Stämme HRC 54 und HCC 103. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

Die phylogenetische Verwandtschaft einiger  $\beta$ -*Proteobacteria* ist im Dendrogramm der Abbildung 48 dargestellt. In dieser Arbeit wurden einige 16S-rDNA und -cDNA-Sequenzen detektiert, die zu keiner bisher bekannten Bakterienart bzw. Gattung zugeordnet werden konnten. Einige, zu *Paucibacter toxinivorans* und *Pelomonas* spp. verwandte 16S-rRNA Sequenzen konnten in Wurzeln der Zuckerrohrvarietät RB86 7515 des Gewächshausversuchs nachgewiesen werden. Diese Sequenzen bilden ein bisher unbekanntes Cluster. Sowohl aus dem Feld- als auch aus dem Tankversuch konnten aus Wurzeln nicht gedüngter Pflanzen nah miteinander verwandte 16S-rDNA-Sequenzen erhalten werden, die scheinbar ein weiteres, bisher unbekanntes Cluster bilden. Als nächstverwandte Bakterien konnten *Azohydromonas lata* und *Ideonella* spp. identifiziert werden. In Wurzelproben gedüngter Pflanzen des Feldversuchs konnte eine 16S-rRNA Sequenz erhalten werden, die ebenfalls zu diesem bisher unbekanntem Cluster eingeordnet werden konnte. In Blattscheiden konnten diese Sequenzen jedoch nicht detektiert werden.



**Abb. 48:** Phylogenetisches Dendrogramm ausgewählter 16S-rRNA/DNA Sequenzen von *Pelomonas* und *Ideonella* verwandten  $\beta$ -*Proteobacteria*. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA; Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die phylogenetische Verwandtschaft der in dieser Arbeit erhaltenen 16S-rRNA Sequenzen in der Gattung *Burkholderia*. Der inokulierte Bakterienstamm *Burkholderia tropica* PPe 8 konnte in keiner der untersuchten Proben detektiert werden. Somit ist keine Etablierung des inokulierten Stammes sichtbar. Es konnten jedoch viele zur Gattung *Burkholderia* gehörende Sequenzen in allen Proben nachgewiesen werden. So konnten in Wurzeln inokulierter bzw. nicht gedüngter Pflanzen eng mit *B. soli*, *B. silvatlantica* und *B. plantarii* verwandte 16S-rRNA Sequenzen gefunden werden. Nah mit *B. phymatum* und *B. caribensis* verwandte 16S-rRNA Sequenzen konnten ebenfalls in Wurzeln inokulierter, nicht gedüngter, aber auch gedüngter Pflanzen des Feld- und des Tank-Experiments nachgewiesen werden. Es konnten jedoch auch Sequenzen gefunden werden, die mit keiner der bisher beschriebenen Arten eng verwandt sind. In Blattscheiden konnten keine Sequenzen der Gattung *Burkholderia* detektiert werden.



**Abb. 49:** Phylogenetisches Dendrogramm der erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen der *Burkholderia* spp., Teil 1. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA; Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

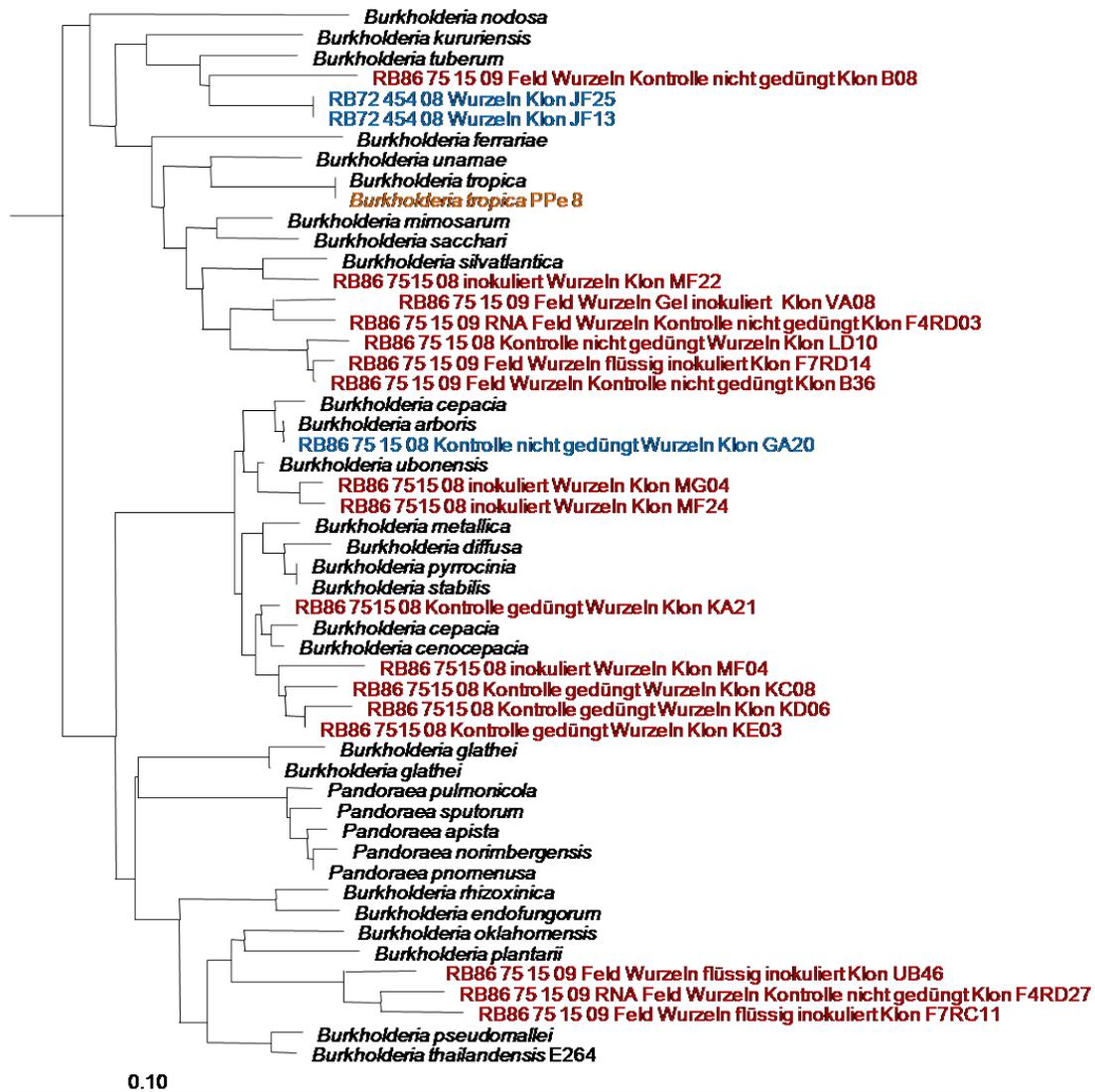
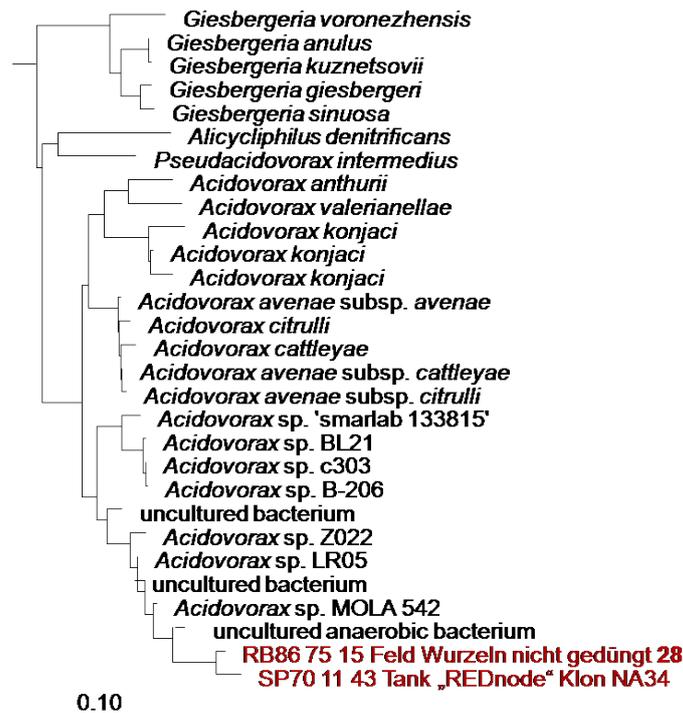


Abb. 50: Phylogenetisches Dendrogramm der erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen der *Burkholderia* spp., Teil 2. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA; Orange: Sequenz des inokulierten Stammes PPe 8. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

Eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu *Acidovorax* sp. konnten vor allem Sequenzen der 16S-rRNA von Wurzeln der Zuckerrohrvarietät RB86 7515 eines nicht gedüngten Feldes zeigen. Einige Vertreter der Gattung *Acidovorax* sind bekannt, Stickstoff zu fixieren. Eine 16S-rRNA Sequenz der Probe „Red Node“ konnte ebenfalls zu *Acidovorax* sp. geordnet werden.



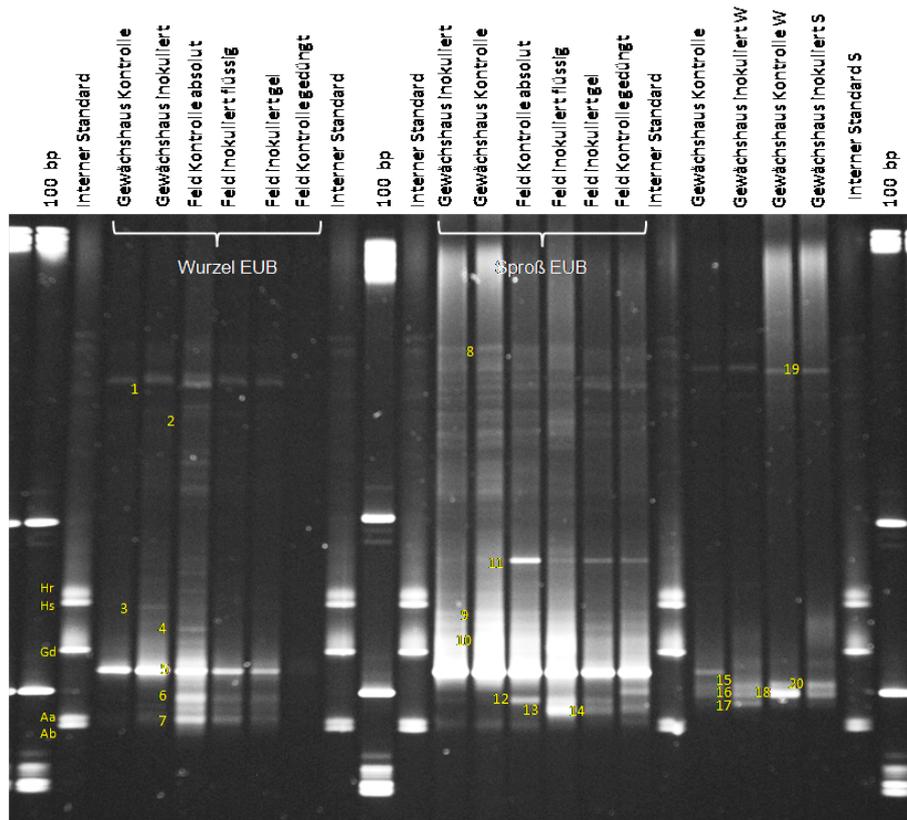
**Abb. 51:** Phylogenetisches Dendrogramm der erhaltenen 16S-rRNA/DNA Sequenzen von *Acidovorax* spp.. Rot: Sequenzen aus RNA; Blau: Sequenzen aus DNA. Die hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen der Probe. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

#### 4.4.2 Fingerprint-Analyse der 16S-rRNA

Um die Diversität der aktiven Bakteriengemeinschaft von Wurzel- und Spross-Proben der Zuckerrohr-Varietät RB86 auf der Basis der 16S-rRNA zu vergleichen, wurden die jeweiligen Amplifikate über ein Denaturierendes Gradienten-Gel aufgetrennt und die resultierenden Bandenmuster analysiert. Dabei wurden zur Amplifikation der Sequenzen der Domäne *Bacteria* die spezifischen Primer 341F und 907R eingesetzt. Zusätzlich wurde der Rückwärtsprimer ALF968R, welcher die Entwicklungslinie der  $\alpha$ -*Proteobacteria* abdecken sollte, mit dem Primer 341F kombiniert eingesetzt. Der Primer 341F wurde am 5'-Ende mit einer sogenannten GC-Klemme versehen, welche das gleichmäßige Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges im Gel garantieren sollte (siehe Kap. 3.5.4). Zur besseren Zuordnung wurde ein selbst hergestellter Standard aufgetragen, welcher die unter Verwendung derselben Amplifikationsprimer gewonnenen DNA-Fragmente der DNA der inokulierten Bakterienstämme enthielt. Zur Identifikation von Bakterienspezies in den aufgetragenen Proben wurden einzelne Banden ausgeschnitten und nach weiteren Behandlungen von beiden Sequenzenden ausgehend sequenziert. Es wurden nur Sequenzen einer genauen Sequenzanalyse unterzogen, die nach Vergleich mit verfügbaren Datenbanken (BLAST, RDP) identische Ergebnisse lieferten.

Abbildung 52 zeigt das resultierende DGGE-Gel, in welchem die Amplifikate der *Bacteria* nach ihrem spezifischen Schmelzverhalten aufgetrennt sind. Ausgeschnittene Banden sind nummeriert und die zugehörigen Ergebnisse des Vergleichs mit der BLAST-Datenbank in Tab. 15 aufgelistet. Links und rechts der Spuren, in denen die Amplifikate der Wurzel- und Sprossproben aufgetragen wurden, befinden sich die Spuren mit dem internen Standard, welcher Amplifikate der inokulierten Bakterienstämme enthält. Auf der linken Seite des Gels (Spuren 3-8) befinden sich die cDNA-Amplifikate von 16S-rRNA Genen von Wurzelproben des Gewächshausversuchs und des Feldversuchs des Jahres 2009. Beim Vergleich der Bandenmuster scheint die bakterielle Diversität der inokulierten Pflanze des Gewächshaus-Versuchs größer als die der Kontrollpflanze. Bei der inokulierten Pflanze sind sechs Banden zu erkennen, bei der Kontrollpflanze drei. Bei den vom Feld stammenden Wurzelproben scheint die Wurzel der nicht gedüngten Kontrollpflanze die größte Diversität im Vergleich zu den inokulierten Pflanzen aufzuweisen. Bei der Wurzel der Kontrollpflanze sind 21 Banden zu erkennen, bei den Inokulationen 7 (flüssig) und 5 (Gel). Distinkte, klar separierte Banden konnten nach deren Sequenzierung und phylogenetischer Analyse nur als amplifizierte pflanzliche RNA identifiziert werden (vergl. Bande 1 bis 4, 8 bis 10, 20). Durch das Auftreten starker, von pflanzlicher cDNA stammender Banden, welche die für die Analyse der bakteriellen Diversität interessanten Banden durch ihre Dominanz überdecken, konnte die DGGE nicht weiter als Methode zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft assozi-

iert mit Zuckerrohr verwendet werden. Die sequenzierten Banden der Wurzel-Proben zeigen eine Dominanz einer Spezies der Gattung *Bradyrhizobium* in Höhe der Bande 5. Bande 6 konnte der Gattung *Rhodoplanes* sp. zugeordnet werden und war nur bei den Proben, die vom Feldversuch stammten, zu sehen. Bande 7 konnte der Gattung *Actinobacter* zugeordnet werden und war ebenfalls nur bei isolierter RNA von Wurzeln des Feldversuchs erkennbar.



**Abb. 52:** Fingerprint-Analyse via DGGE der *Bacteria* auf Basis der 16S-rRNA. Interner Standard: *H. rubrisubalbicans* HCC 103, *H. seropedicae* HR 54, *G. diazotrophicus* PAL 5, *A. amazonense* CBAMc, (Positivkontrolle der PCR *A. brasilense* Sp 7), Im linken Abschnitt sind Amplifikate der Wurzeln, im mittleren Abschnitt der Sprosse aufgetragen. Im rechten Abschnitt sind die amplifizierten 16S-rRNA Genfragmente der  $\alpha$ -*Proteobacteria* aufgetragen, die Proben stammen aus dem Gewächshausversuch. Die Zahlen der ausgeschnittenen Bande stehen jeweils links von der Spur.

Bei den in der Mitte des Gels aufgetragenen Amplifikaten (Spuren 12-17) handelt es sich um die 16S-rRNA Amplifikate der *Bacteria* der Spross-Proben von Zuckerrohrpflanzen des Gewächshaus- und Feld-Versuchs. Die Bandenmuster der inokulierten Pflanze und der Kontrollpflanze des Gewächshausversuchs ähneln einander sehr und weisen bis auf eine Bande (in Höhe der ausgeschnittenen Bande 12) keine Unterschiede auf. Auch die Bandenmuster der 16S-rRNA Amplifikate der Spross-Proben des Feldversuchs

ähneln sich untereinander, unterscheiden sich jedoch von denen der Gewächshauspflanzen. In Höhe der sequenzierten Bande 11 sind bei den Spross-Proben des Feldversuchs deutlich dominante Banden zu sehen, welche in denen des Gewächshaus-Experiments weniger ausgeprägt sind. Eine Sequenz konnte der Gattung *Burkholderia* an dieser Stelle zugeordnet werden. Die Bande 12, welche in der isolierten RNA der Spross-Proben der Kontroll-Pflanze des Gewächshaus-Versuchs, den inokulierten Pflanzen des Feldversuchs sowie in der gedüngten Kontrollpflanze erkennbar ist, konnte der Gattung *Acidomonas* zugeordnet werden. Die Banden 13 und 14, welche auf derselben Höhe liegen, konnten *Gluconacetobacter* sp. zugeordnet werden und waren in der isolierten RNA der Spross-Proben der inokulierten Pflanzen des Feldversuchs deutlich zu erkennen. Im rechten Abschnitt sind zum Vergleich die Amplifikate der 16S-rRNA Gene der  $\alpha$ -*Proteobacteria* der isolierten RNA der Zuckerrohr-Pflanzen aus dem Gewächshaus-Versuch (Spuren 19-22) aufgetragen. Deutlich zu sehen ist, dass der gewählte Gradient für das gewählte Fragment der  $\alpha$ -*Proteobacteria* weniger geeignet ist als für das der *Bacteria*. In der RNA der Wurzeln der inokulierten Gewächshaus-Pflanze konnte eine Sequenz von *Azospirillum amazonense* nachgewiesen werden (Bande 17), die in den anderen Spuren nicht zu erkennen ist. In der isolierten RNA der Sprossproben der aus dem Gewächshausversuch stammenden Zuckerrohrpflanzen konnte eine dominante Bande der Gattung *Rhizobium* identifiziert werden.

**Tab. 15:** Ergebnisse der BLAST-Analyse der sequenzierten Banden (DGGE) der *Proteobacteria*

Bande	Organismus
5	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
6	<i>Rhodoplanes</i> sp.
7	<i>Actinobacter</i> sp.
11	<i>Burkholderia</i> sp.
12	<i>Acidomonas</i> sp.
13	<i>Gluconacetobacter</i> sp.
14	<i>Gluconacetobacter</i> sp.
15	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
16	<i>Rhizobiales</i>
17	<i>Azospirillum amazonense</i>
18	<i>Methylobacter</i> sp.
19	<i>Rhizobium</i> sp.

Das Auftreten einer stark dominanten Bande in Wurzel- und Sprossproben erschwert die Auswertung der Fingerprint-Analyse mittels DGGE, da weniger dominante Banden nicht mehr erkennbar sind. Aus diesem Grund konnte die Analyse der bakteriellen Diversität assoziiert mit Zuckerrohr nicht weiter verwendet werden.

## 4.5 Phylogenetische Analyse der *nifH*-cDNA in den Zuckerrohrpflanzen

Um die Diversität der mit Zuckerrohr assoziierten Bakterien hinsichtlich ihrer Aktivität besser analysieren zu können, wurde ein entscheidendes funktionelles Gen der N<sub>2</sub>-Fixierung bzw. dessen Expression untersucht. Dazu wurde das Gen *nifH* zur Analyse ausgewählt. Dieses Gen kodiert für die Nitrogenase Reduktase (sog. Fe-Protein) und wird daher bei aktiver Stickstofffixierung exprimiert. Vor allem von Bakterien der Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* ist eine große Anzahl an *nifH*-Sequenzen bereits bekannt und konnte somit zur vergleichenden Analyse verwendet werden.

### 4.5.1 *nifH*-Klondatenbank-Analysen

Zur Analyse der mit Zuckerrohr assoziierten, aktiv stickstofffixierenden Bakterien wurde eine Nested PCR (siehe Kap. 3.5.3) der cDNA eingesetzt. Alle im März 2009 genommenen Proben der Zuckerrohr-Wurzeln und -Blattscheiden wurden analysiert. In der ersten PCR der Nested PCR wurden die Primer PolyF und PolyR (siehe Tab. 4) verwendet. In der zweiten PCR wurde das Amplifikat der ersten PCR als Template verwendet und die Primer Roesch*nifHF* und Roesch*nifHR* (siehe Tab. 4) verwendet. Anschließend wurden die so erhaltenen *nifH*-Genfragmente kloniert (siehe Kap. 3.9) und sequenziert (siehe Kap. 3.11). Die Vektor-Sequenz wurde entfernt und die Sequenzen mittels BLAST-Analyse phylogenetisch zugeordnet. Zudem wurden die Sequenzen in eine *nifH*-Gendatenbank der Internetseite <http://www.es.ucsc.edu/www-zehr/research/pubs/> im Programm ARB eingefügt (siehe Kap. 3.13) und anhand der phylogenetischen Verwandtschaft eingeordnet. Anhand dieser Daten konnten phylogenetische Dendrogramme erstellt und die Rarefaction der einzelnen Proben berechnet werden. Zur besseren Einsicht über die erhaltene Diversität der aktiv stickstofffixierenden Bakterien wurde die Anzahl der Sequenzen der untersuchten Proben und deren phylogenetische Zugehörigkeit in Abbildung 53 zusammengefasst.

In allen untersuchten Wurzel- und Sprossproben von Zuckerrohr, außer der nicht inokulierten Kontrollpflanze des Gewächshausversuchs, konnten *nifH*-Sequenzen nachgewiesen werden, welche mit den *nifH*-Sequenzen von *Herbaspirillum* sp., *Ideonella* sp. und *Azohydromonas* sp. nah verwandt sind, jedoch zu keiner bekannten Art geordnet werden können. *NifH*-Sequenzen des Bakteriums *Burkholderia tropica* konnten in vornehmlich in Wurzelproben detektiert werden, seltener im Spross. Sie konnten beispielsweise in Wurzeln der flüssig inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden. In Pflanzen des gedüngten Feldes konnten sie in den Blattscheiden, in den Wurzeln jedoch nicht detektiert werden. Zu den *nifH*-Sequenzen von *Bradyrhizobium* sp. nah verwandte Se-

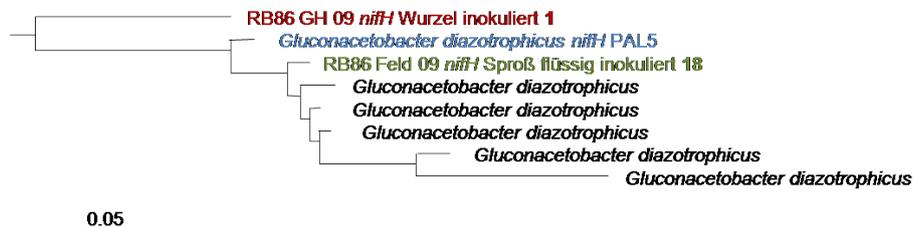
quenzen konnten als sehr dominant in allen Wurzelproben des Feldes nachgewiesen werden. Zu diesen Sequenzen gehört die *nifH*-Sequenz von *Azospirillum amazonense* ebenfalls. *NifH*-Sequenzen von *Rhizobium* sp. konnten ausschließlich in Blattscheiden des Feldversuchs gefunden werden, jedoch nicht in der Blattscheide der gedüngten, nicht inokulierten Pflanze. Sequenzen der *nifH*-Gene von *Azospirillum brasilense* konnten in Blattscheiden und Wurzeln der Gel inokulierten Pflanzen sowie in Wurzeln nicht gedüngter Pflanzen des Feldversuchs und Wurzeln inokulierter Gewächshauspflanzen gefunden werden. *NifH*-Sequenzen von *Gluconacetobacter diazotrophicus* konnten fast ausschließlich und sehr dominant in Blattscheiden einer flüssig inokulierten Pflanze detektiert werden. Zudem konnte eine einzige *nifH*-Sequenz von *G. diazotrophicus* in der RNA der Wurzeln inokulierter Gewächshauspflanzen detektiert werden.

	Feld Blattscheide Gel Inokuliert	Feld Blattscheide flüssig Inokuliert	Feld Blattscheide gedüngt	Feld Blattscheide nicht gedüngt	GH Blattscheide nicht Inokuliert	GH Blattscheide Inokuliert	Feld Wurzel Gel Inokuliert	Feld Wurzel flüssig Inokuliert	Feld Wurzel gedüngt	Feld Wurzel nicht gedüngt	GH Wurzel nicht Inokuliert	GH Wurzel Inokuliert
<i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Ideonella</i> sp., <i>Azohydromonas</i> sp.	36	21	38	41	51	33	4	1	4	3		18
<i>Xanthobacter</i> sp.							1			1		2
<i>Burkholderia tropica</i>				3		3		9		6	42	15
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1						18	22	10	5		
<i>Azospira</i> sp.						1						
<i>Methylocapsa</i> sp.									1	9		
<i>Rhizobium</i> sp.	1	9		4								
<i>Azospirillum brasilense</i>	2						5			4		1
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>		18										1
Anzahl der Sequenzen	40	48	38	48	51	37	28	32	15	28	42	37

**Abb. 53:** Übersicht über die Diversität der *nifH*-Sequenzen aus der cDNA der Zuckerrohrproben des Feld- und Gewächshausversuchs im Jahr 2009

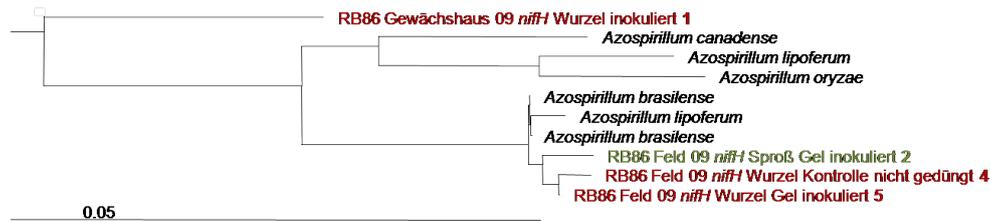
Mit Hilfe der Software ARB wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der *nifH*-Sequenzen zueinander analysiert und Dendrogramme mittels Neighbour-Joining Verfahren generiert. Für übersichtliche Darstellungen wurden identische Sequenzen zu einer Sequenz zusammengefasst und die Anzahl der Sequenzen gekennzeichnet.

Abbildung 54 zeigt die Einordnung der in dieser Arbeit erhaltenen, nah zu *Gluconacetobacter diazotrophicus* verwandten *nifH*-Sequenzen. In den Wurzeln der inokulierten Zuckerrohrpflanzen des Gewächshausversuchs konnte eine nah verwandte *nifH*-Sequenz gefunden werden. In den Blattscheiden der flüssig inokulierten Pflanzen des Feldversuchs konnten 18 nah mit *G. diazotrophicus* verwandte *nifH*-Sequenzen detektiert werden.



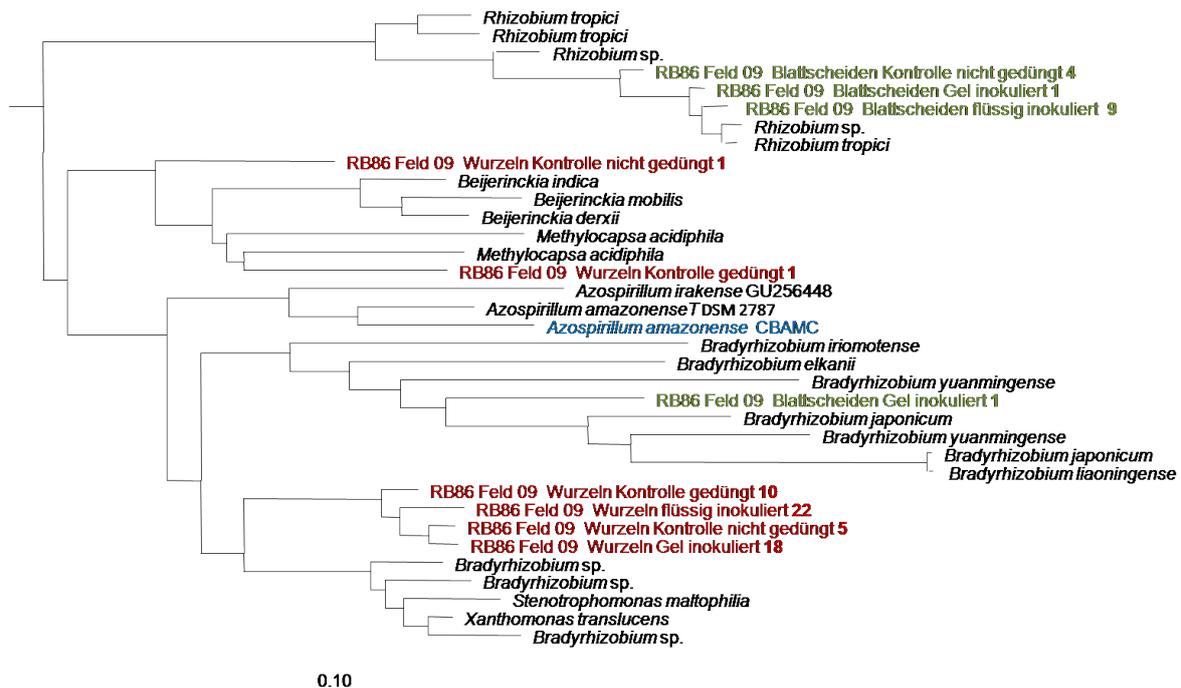
**Abb. 54:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-mRNA von *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden; Orange: *nifH*-Sequenz des inokulierten Stammes PAL 5. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

Die Abbildung 55 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-Sequenzen verschiedener Arten der Gattung *Azospirillum* und deren Verwandtschaftsbeziehung zu den in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen. Eine *nifH*-mRNA-Sequenz der Wurzeln inokulierter Pflanzen aus dem Gewächshaus konnte *Azospirillum* zugeordnet werden. Eng mit dem *nifH*-Gen von *A. brasilense* verwandte Sequenzen konnten in Blattscheiden Gel-inokulierter Pflanzen des Feldversuchs und in Wurzeln dieser Pflanzen sowie in nicht gedüngten Kontrollpflanzen gefunden werden.



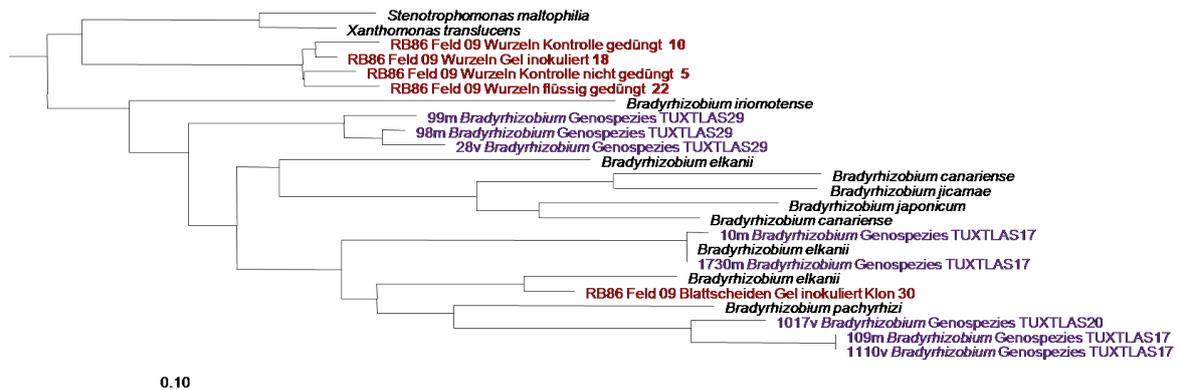
**Abb. 55:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-mRNA von *Azospirillum* spp.. Hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

Zu den *nifH*-mRNA-Sequenzen von *Rhizobium* spp. verwandte Sequenzen konnten in Blattscheiden nicht gedüngter Zuckerrohrpflanzen detektiert werden (Abb. 56). Die *nifH*-Sequenz des inokulierten Stammes *Azospirillum amazonense* CBAMc, welche nah verwandt mit denen der *Bradyrhizobium* spp. ist, konnte nicht detektiert werden. In den Wurzelproben aller untersuchten Behandlungen des Feldversuchs konnten zahlreiche *nifH*-Sequenzen detektiert werden, die eng mit den Sequenzen von *Bradyrhizobium* spp. verwandt sind.



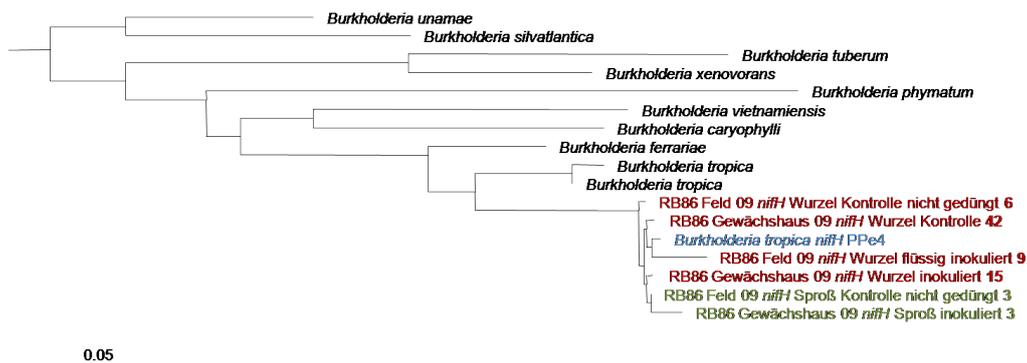
**Abb. 56:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-mRNA-Sequenzen *Rhizobium*, *Azospirillum* und *Bradyrhizobium* spp.. Hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

Die Analyse der *nifH*-Sequenzen zeigt ebenfalls enge Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den *nifH*-Sequenzen dieser und des Reisolierungs-Projekts in Mexiko (siehe Kap. 4.4.1). Anhand der *nifH*-Sequenzen lassen sich durch die kurze Sequenzlänge jedoch keine genauen phylogenetischen Zuordnungen unterhalb der Gattungsebene treffen (Abb. 57).



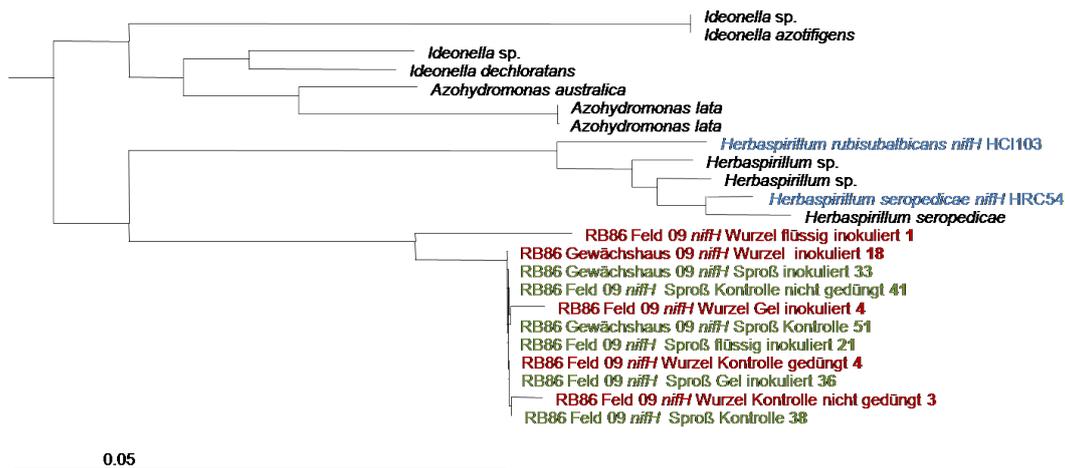
**Abb. 57:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-rRNA der Gattung *Bradyrhizobium*. Schwarz: Sequenzen stammen von in der Datenbank vorhandenen *nifH*-Sequenzen, Violett gekennzeichnete von Bakterienreinkulturen (Esperanza Martinez) aus folgenden Leguminosen: m - *Macroptilium atropurpureum* (Purpurbohne); v - *Vigna unguiculata* (Augenbohne). Rot (RNA): Sequenzen aus Zuckerrohrproben dieser Arbeit. Hervorgehobene Zahlen: Anzahl der in dieser Arbeit erhaltenen, identischen *nifH*-Sequenzen einer Probe. Maßstab: Sequenzunterschied von 10 %

In der Abbildung 58 zeigt ein phylogenetisches Dendrogramm die Verwandtschaft in dieser Arbeit erhaltener *nifH*-Sequenzen zu denen bereits bekannter *nifH*-Sequenzen der Gattung *Burkholderia*. Sowohl in RNA von Wurzeln und Blattscheiden vom Feldversuch konnten in inokulierten sowie nicht inokulierten Pflanzen eng zu PPe 8 verwandte Sequenzen gefunden werden. Ebenfalls konnte in der RNA von Wurzeln und Blattscheiden aus dem Gewächshaus stammender Pflanzen sehr eng mit der *nifH*-Sequenz des inokulierten Bakterienstamms verwandte Sequenzen nachgewiesen werden.



**Abb. 58:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-mRNA von *Burkholderia* spp.. Hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden; Orange: *nifH*-Sequenz des inokulierten Stammes PPe 8. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

Ein phylogenetisches Dendrogramm bekannter *nifH*-Sequenzen einiger  $\beta$ -*Proteobacteria* zeigt die Abbildung 59. Hierbei ist gut zu erkennen, dass die *nifH*-Sequenzen der inokulierten Bakterienstämme nicht mit denen in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen identisch sind. Es wurden jedoch zahlreiche *nifH*-Sequenzen diverser Proben aus Wurzeln und Blattscheiden aller Behandlungen und beider Versuche gefunden, die ein neues Cluster bilden.

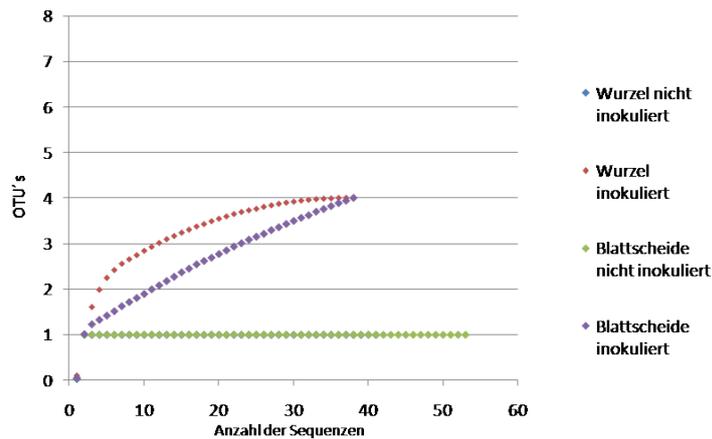


**Abb. 59:** Phylogenetisches Dendrogramm der *nifH*-mRNA-Sequenzen des *Ideonella-Azohydromonas-Herbaspirillum*-Clusters. Hervorgehobene Zahl zeigt die Anzahl identischer Sequenzen. Rot: Sequenzen aus Wurzeln; Grün: Sequenzen aus Blattscheiden. Maßstab: Sequenzunterschied von 5 %

#### 4.5.2 Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klondatenbanken

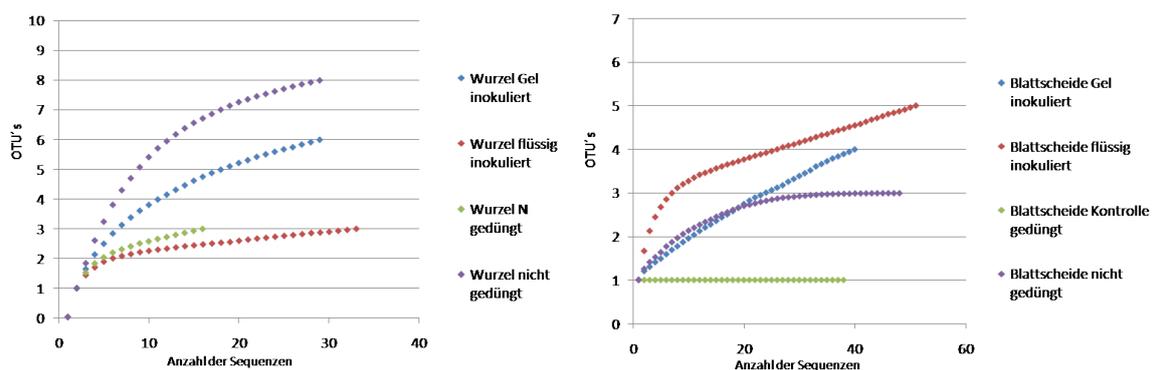
Mit den erhaltenen *nifH*-mRNA-Sequenzen wurden Distanzmatrizen im Programm ARB berechnet, die Rarefaction-Analysen mit dem Programm Dotur durchgeführt und graphisch dargestellt. Aufgrund der gewählten Berechnungsmethode schwanken die in den Diagrammen eingesetzten Divergenzwerte zur Berechnung der OTUs zwischen 93 und 99 %.

Die Abbildung 60 zeigt die Rarefaction-Analysen der *nifH*-mRNA-Klondatenbanken des Gewächshausexperiments. Die Sättigung der Rarefaction ist bei den nicht inokulierten Proben (Wurzel und Spross) bei einer OTU gegeben. Die Rarefaction-Graphen der inokulierten Pflanzen gehen in eine Sättigung über.



**Abb. 60:** Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klondatenbanken des Gewächshaus-Experiments im Jahr 2009.

Die Abbildung 61 zeigt die Rarefaction-Analysen der aus dem Feldexperiment im Jahr 2009 gewonnenen *nifH*-Klondatenbanken. A zeigt die Rarefaction der *nifH*-Sequenzen aus cDNA von Wurzelproben, welche bei allen untersuchten Proben in eine Sättigung übergeht. B zeigt die Rarefaction der *nifH*-Sequenzen aus cDNA von Blattscheiden. Während die Rarefaction der nicht inokulierten Pflanzen bereits gesättigt ist, so ist die Sättigung bei den *nifH*-Klondatenbanken inokulierter Pflanzen nicht erreicht. Bemerkenswerterweise wies die *nifH*-Klondatenbank der gedüngten Kontrollpflanzen (grüne Rauten) die geringste Diversität in Wurzeln und Blattscheiden auf. Die höchste Diversität zeigte die *nifH*-Klondatenbank der Wurzeln der nicht gedüngten Pflanzen (violette Rauten).



**Abb. 61:** Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klondatenbanken des Feldexperiments im Jahr 2009. A: Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klondatenbanken der Wurzelproben, B: Rarefaction-Analyse der *nifH*-Klondatenbanken der Sprossproben

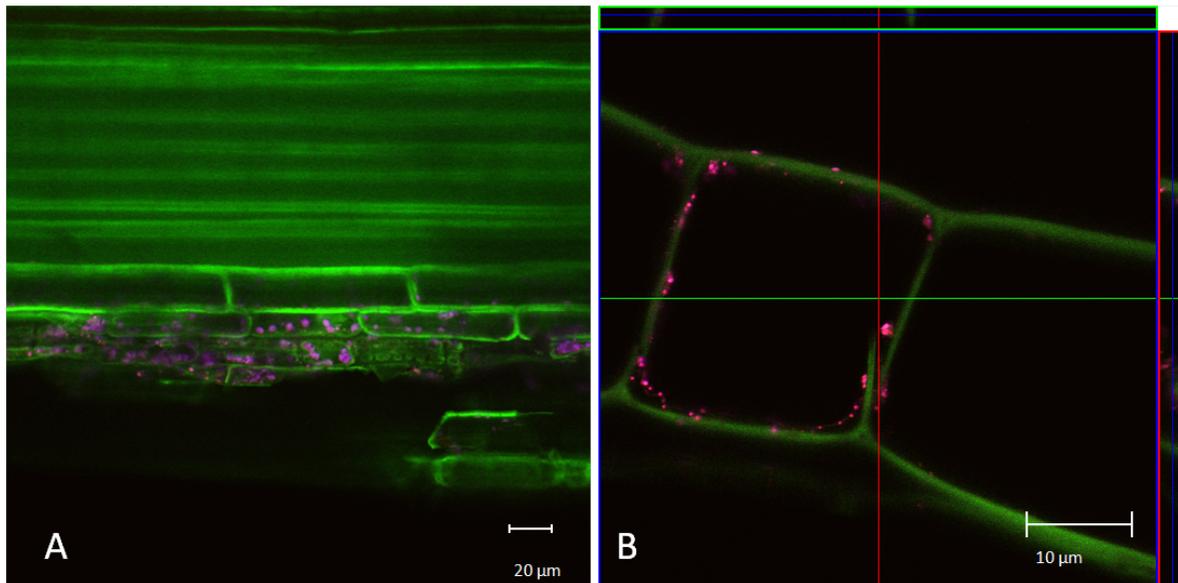
## 4.6 Detektion und Lokalisierung Pflanzen-assoziiierter Bakterien *in situ*

### 4.6.1 Detektion und Lokalisierung Pflanzen-assoziiierter Bakterien mittels FISH

Zur Untersuchung der Besiedlung von Zuckerrohr und des Kolonisierungsverhaltens diazotropher und anderer Pflanzen-assoziiierter Bakterien wurde die Methode der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung angewendet (siehe Kap. 3.14). Mittels FISH ist es möglich, bei Verwendung geeigneter mikroskopischer Techniken Bakterien zu detektieren und eine Aussage über deren Lokalisierung im Pflanzengewebe zu treffen. Fixierte Wurzelstücke von Zuckerrohr wurden nach Größe separiert. Dünne Wurzeln konnten ohne weitere präparative Schritte hybridisiert und anschließend mikroskopiert werden, von dickeren Wurzelteilen wurden Längs- und Quer-Schnitte angefertigt. Bei der Untersuchung der Blattscheide von Zuckerrohr wurden fixierte Teile in 1xPBS in etwa 3x5 mm große Teile geschnitten und mit einer sterilen Rasierklinge in der Mitte des Parenchyms getrennt, anschließend hybridisiert und mikroskopiert. Zusätzlich wurden Querschnitte angefertigt (siehe Kap. 3.14). Die Analyse erfolgte an einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM, siehe Kap. 3.16). Durch Überlagerung der Aufnahmen mit roter (Cy3) und grüner (Fluos) Fluoreszenz erscheinen die Bakterien orange-gelb, mit roter (Cy3) und blauer (Cy5) Fluoreszenz erscheinen sie pink-violett.

Wurzel und Spross-Proben verschiedener Versuchsansätze wurden zum Test mit den Oligonukleotidsonden EUB-338, I, II, III-Fluos und ALF-968-Cy3 bzw. BET-42a-Cy3 (mit GAM-42a-Kompetitor) hybridisiert. Nach erfolgreicher Detektion von Bakterien wurde einem hierarchischen Sondenkonzept folgend mit Gattungs- und Art-spezifischen Sonden gearbeitet. Als Kontrolle wurden alle Proben einer „Hybridisierung“ ohne Sonde und einer Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde NON-EUB, welche nicht an bakterielle rRNA bindet, unterzogen (siehe Abb. 62). Dies diente zum Einen dazu, abzuschätzen, in welchem Bereich des Spektrums die Proben starke oder schwache Autofluoreszenz zeigten. Zum Anderen diente es dazu, Effekte abzuschätzen, inwieweit die Hybridisierungsprozedur die vorhandene Autofluoreszenz noch verstärkt. Das Oligonukleotid NON-EUB-338 I trägt die komplementäre Sequenz zur EUB-338 I Oligonukleotidsonde, dies bedeutet, dass sie nicht an die rRNA bindet. Sie wird daher als Kontrolle für unspezifische Bindungen eingesetzt. So konnten unspezifische Hybridisierungen weitgehend ausgeschlossen werden. In Abb. 62 A ist eine Hybridisierung mit dem Oligonukleotid NON EUB-338 I-Cy3 gezeigt. Zu sehen ist ein Längsschnitt einer Zuckerrohrwurzel, in welchem Signale im Cy3- und Cy5-Kanal zu erkennen sind, die auf eine endophytische Kolonisierung hinweisen. Da die Bakterien jedoch keine Autofluoreszenz aufweisen und vergleichbare Signale auch im Cy5-Kanal detektiert wurden, deutet

dies auf autofluoreszente Partikel der Pflanze hin. In Abb. 62 B ist ein Ausschnitt aus einem mit dem Oligonukleotid EUB-338, I, II, III-Cy3 hybridisierten Längsdünnschnitt einer Zuckerrohrwurzel gezeigt. In der mittleren Zelle sind deutlich Signale aus dem Cy3- und Cy5-Kanal zu erkennen, die die Form und Größe von Bakterien besitzen. Da jedoch nicht mit einem Cy5-Oligonukleotid gearbeitet worden war, handelt es sich hier um Artefakte.



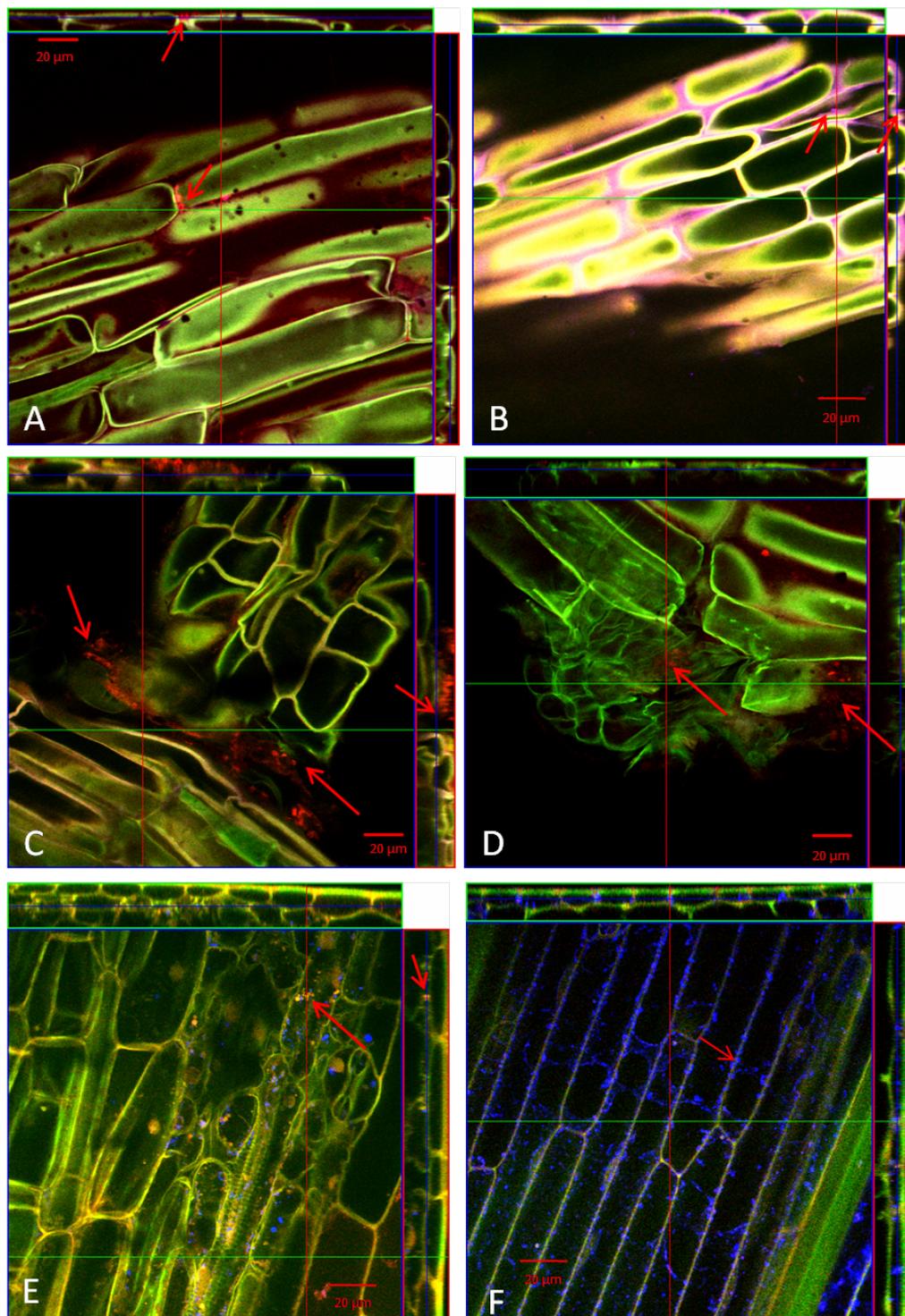
**Abb. 62:** FISH von Längs-Schnitten einer Zuckerrohrwurzel. A Ausschnitt eines Längsschnittes der Zuckerrohrwurzel, hybridisiert mit der Oligonukleotidsonde NON-EUB-Cy3 ; B Dreidimensionale Orthogonalansicht eines Bildes aus einem z-Stapel eines Längsschnittes, hybridisiert mit der Oligonukleotidsonde EUB-I, II, III-Cy3. Grüne und rote Linien repräsentieren vertikale optische Schnitte durch den Bildstapel, die in den entsprechend farbig umrandeten Seitenansichten dargestellt sind.

Bei der FISH-Analyse der Proben aus dem Gewächshausversuch wurden die Oligonukleotidsonden EUB-338, I, II, II-Fluos und ALF-968-Cy3 bzw. BET-42a-Cy3 zur Detektion wurzelassoziiierter Bakterien eingesetzt. Dies war für die Detektion oberflächenassoziiierter Bakterien erfolgreich. Daher wurden, dem hierarchischen Sondenkonzept folgend, in nachfolgenden Versuchen Oligonukleotidsonden eingesetzt, die eine abgestufte Spezifität aufweisen (Abb. 63). Alle Abbildungen in Abb. 63 zeigen dreidimensionale Orthogonalansichten von Bildern aus z-Stapeln von Längsschnitten. Abb. 63 A zeigt einen Bildausschnitt der Wurzeloberfläche einer inokulierten Pflanze, welche mit den Oligonukleotidsonden BET-42a-Fluos (mit GAM-42a-Kompetitor) und Burkho-Cy3 hybridisiert wurde. Zwischen den Wurzelrindenzellen konnte eine Besiedlung durch *Burkholderia* sp. lokalisiert werden (siehe Pfeil). In Abb. 63 B ist ein Bildausschnitt der Wurzeloberfläche einer Kontrollpflanze gezeigt, welche mit den Sonden ALF-968-Cy5 und Glac-1430-Cy3 hybridisiert wurde. An der Wurzelrinde konnte eine Besiedlung von *Gluconacetobacter diazotrophicus* detektiert werden. Abb. 63 C und

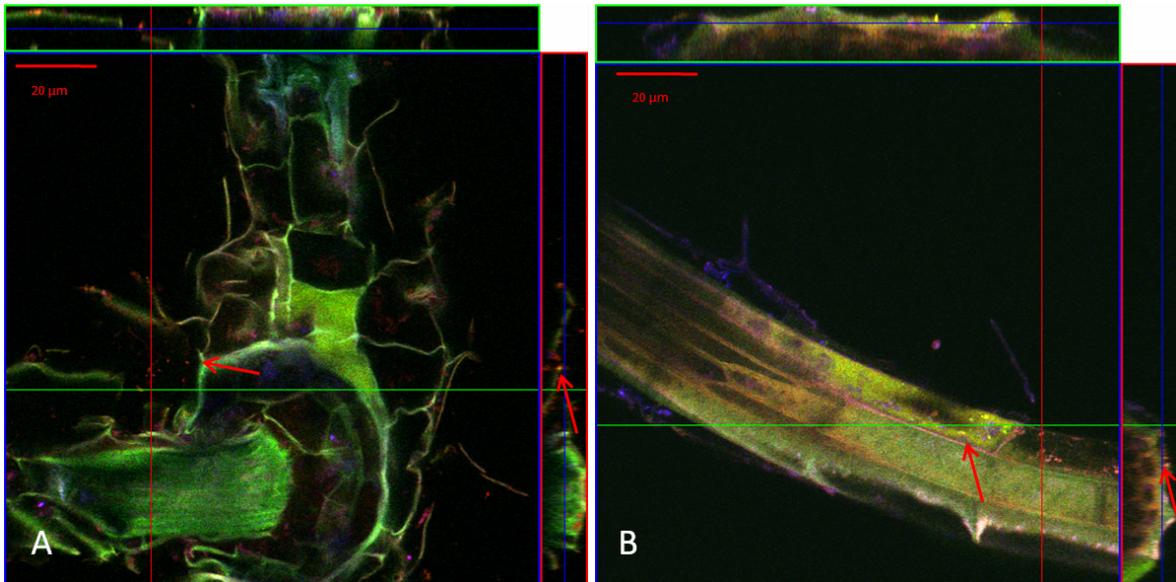
D zeigen Bildausschnitte von Wurzeln nicht inokulierter Kontrollpflanzen mit einer bereits entwickelten Seitenwurzel (C) bzw. einer frisch durchbrechenden Seitenwurzel (D). Bei beiden Hybridisierungen wurden die Sonden ALF968-Fluos und Glac1430-Cy3 verwendet, wobei die Signale der Fluorescein markierten Sonde im grünen Kanal sehr schwach waren. Daher ist nicht sicher, ob es sich bei den detektierten Signalen um *G. diazotrophicus* oder z. B. um Artefakte handelt. Die äußere Form der Signale deuten durch die Ähnlichkeit zu Bakterienreinkulturen, dass hier eine Besiedlung der Wurzeloberfläche an der Achsel der Seitenwurzel stattfindet. Zudem konnte an diesen Stellen keine Autofluoreszenz im Cy5-Kanal detektiert werden. Die Abb. 63 E zeigt eine Bildausschnitt des Parenchyms eines Blattes an der Blattscheide einer Kontrollpflanze, welches mit den Oligonukleotidsonden BET-42a-Fluos (mit GAM-42a-Kompetitor) und Hsero-445-Cy3 hybridisiert wurde. Anhand der roten Pfeile ist eine mögliche Kolonisierung durch *H. seropedicae* (gelbe Kolonien) zu erkennen. Die Methode FISH bei der Blattscheide zu verwenden stellte sich durch die große Zahl an autofluoreszierenden Partikel als sehr schwierig dar. Dies ist in Abb. 63 F gezeigt, in welcher ein Blatt an der Blattscheide einer inokulierten Pflanze mit den Oligonukleotidsonden ALF-968-Fluos und Azoama-1250-Cy3 hybridisiert wurde. Zu erkennen waren autofluoreszente Partikel im Cy5-Kanal in der Größe und Form von Bakterien, es wurde jedoch keine Cy5-Markierung eingesetzt.

In der Abbildung 64 sind repräsentative Bildausschnitte FISH-behandelter Wurzeln des Feldversuchs in dreidimensionaler Orthogonalansicht eines Bildes aus einem z-Stapel dargestellt. Bei Abbildung 64 A handelt es sich um eine Achsel einer Seitenwurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohrpflanze, welche mit den Oligonukleotidsonden ALF968-Cy3 und EUB-Fluos hybridisiert wurde. In einer die Wurzel umgebenden Matrix konnten Signale im Cy3-Kanal detektiert werden (siehe Pfeile), bei denen es sich vermutlich um Vertreter der Hauptentwicklungslinie der  $\alpha$ -*Proteobacteria* handelt. In der Abb. 64 B wird ein Bildausschnitt einer dünnen Wurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohrpflanze gezeigt, welche mit den Oligonukleotidsonden BET42-Cy3 und EUB-Fluos hybridisiert wurde. An der Wurzeloberfläche ist eine Besiedlung durch gelb markierte Bakterien zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um  $\beta$ -*Proteobacteria* handelt (siehe Pfeile). Die Hybridisierung war von fixierten Pflanzenteilen wenig erfolgreich; bei den hier gezeigten Bildern handelt es sich um die einzigen, in welchen nur wenig störende Autofluoreszenzsignale der Pflanze zu sehen waren. Die lehmig-sandige anhaftende Matrix, welche durch die Wasch- und Hybridisierschritte nicht ganz entfernt werden konnte, zeigte störende Autofluoreszenz-Signale im Cy3- und Cy5-Kanal. Daher wurde eine detaillierte Analyse mit Gattungs- und Artspezifischen Oligonukleotidsonden nicht durchgeführt.

Bei der FISH-Analyse konnte nur vereinzelt eine mögliche endophytische Besiedlung der Zuckerrohrpflanzen belegt werden. Alle lokalisierten Zellen befanden sich an der Außenseite der Wurzelrindenzellen bzw. zwischen ihnen. In der Abb. 63 E könnte es sich zwar um Bakterienkolonien handeln, dies ist jedoch wegen der starken Autofluoreszenz fraglich.



**Abb. 63:** FISH von Längs-Dünnschnitten von Wurzel und Spross der Varietät RB86 des Gewächshausversuchs. Dreidimensionale Orthogonalansichten eines Bildes aus einem z-Stapel eines Längsschnittes. A: Bildausschnitt der Wurzeloberfläche einer inokulierten Pflanze, hybridisiert mit den Oligonukleotidsonden BET42-Fluos und Burkho Cy3; B Bildausschnitt der Wurzeloberfläche einer Kontrollpflanze, hybridisiert mit ALF968-Cy5 und Glac1430-Cy3; C und D: Wurzeloberflächen nicht inokulierter Kontrollpflanzen, hybridisiert mit den Oligonukleotidsonden ALF968-Fluos und Glac1430-Cy3; E: Bildausschnitt des Parenchyms eines Blattes nah der Blattscheide, hybridisiert mit den Oligonukleotidsonden BET42-Fluos (mit GAM-42a-Kompetitor) und Hsero445-Cy3; F: Blatt einer inokulierten Pflanze nah der Blattscheide, hybridisiert mit den Oligonukleotidsonden ALF968-Fluos und Azoama1250-Cy3.

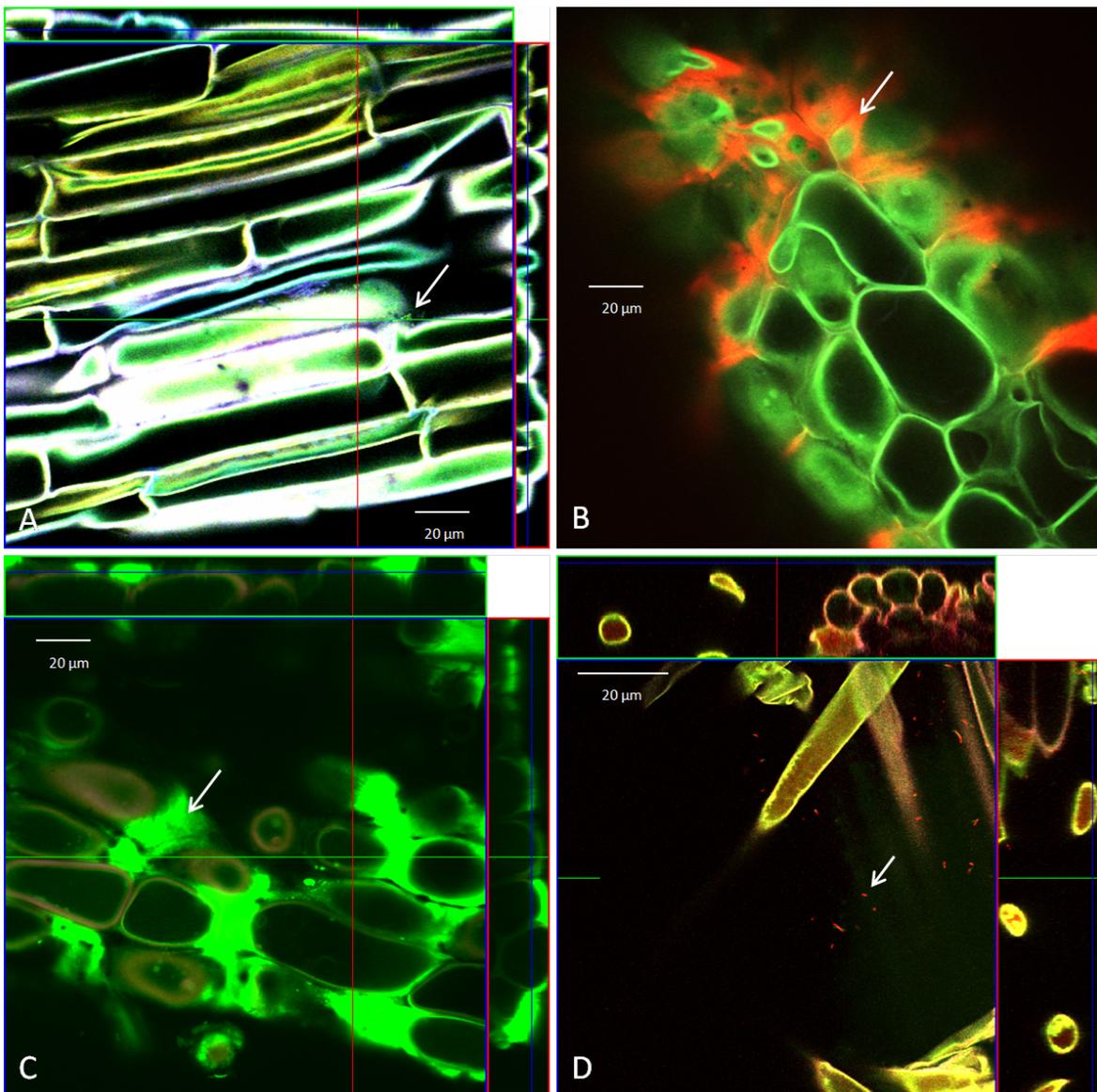


**Abb. 64:** FISH von Längs-Dünnschnitten der Wurzel von RB86 des Feldversuchs. Dreidimensionale Orthogonalansicht eines Bildes aus einem z-Stapel eines Längsschnittes. A: Wurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohrpflanze, mit den Oligonukleotidsonden ALF968-Cy3 und EUB Mix-Fluos hybridisiert; B: dünne Seitenwurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohrpflanze mit den Oligonukleotidsonden BET42-Cy3 (mit GAM-42a-Kompetitor) und EUB Mix-Fluos hybridisiert

#### 4.6.2 Detektion und Lokalisierung wurzelassoziierter Bakterien mittels CARD-FISH

Zur Untersuchung des Kolonisierungsverhalten diazotropher Pflanzen-assoziiierter Bakterien wurde auch die Catalyzed Reporter Deposition-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (CARD-FISH) als Methode getestet. Aufgrund der Signalverstärkung durch die verwendeten, mit Meerrettich-Peroxidase markierten Sonden kommt es zu einer Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes in der Zielzelle, weshalb diese ein deutlicheres Signal abgeben. Bei Anwendung der CARD-FISH bei fixierten Bakterien-Reinkulturen war dies erfolgreich. Bei der Anwendung an Wurzeln bzw. Schnitten von Wurzeln war dies durch eine starke Autofluoreszenz nicht erfolgreich (Abb. 65). Bei allen Abbildungen außer in Abbildung 65 B handelt es sich um Orthogonalansichten eines Bildes aus einem z-Stapel eines Längs- bzw. Querschnittes. In der Abbildung 65 A ist die Färbung der Wurzeloberfläche und von assoziierten Bakterien mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff Syto81 gezeigt, durch die Fluoreszenz des Farbstoffes im Cy3 und Fluos-Kanal erscheinen die Bakterien gelb. Eine Besiedlung der Wurzelrindenoberfläche ist durch gelb-grün erscheinende Bakterien zu erkennen (siehe Pfeil). Dieses Signal kommt durch die Überlagerung der Emission des Syto81 in den Kanälen Cy3 und Fluos zustande. Zudem kann hier eine starke Färbung der Pflanzenzellwände beobachtet werden, welche eine weitere Verwendung eines solchen Farbstoffes, beispielsweise als Referenz,

ausschloss. In Abbildung 65 B ist die Verwendung der CARD-FISH bei der Wurzeloberfläche von Zuckerrohr gezeigt. Hier wurde mit dem Oligonukleotid EUB I-POD hybridisiert und anschließend das Cy3-Substrat eingesetzt. Eine extreme Autofluoreszenz der Wurzeloberfläche durch Cy3 ist zu erkennen. Bakterien konnten nicht detektiert werden. Abbildung 65 C zeigt die Hybridisierung der Wurzeloberfläche von Zuckerrohr mit dem Oligonukleotid EUB I-POD unter Zugabe von Fluorescein-Substrat. Hier ist eine extreme Fluoreszenz der Wurzeloberfläche zu sehen; Bakterien konnten nicht detektiert werden. Zum Vergleich wurde eine PFA-fixierte Gerstenwurzel aus einem axenischen System, inokuliert mit *Acidovorax* sp. mit dem gattungsspezifischen Oligonukleotid ACISP-145 Cy3 (Schmid M., unveröffentlicht) und EUB I-POD hybridisiert und mit dem Fluos-Substrat gefärbt (Abb. 65 D). Die dünne Wurzel zeigt eine starke Fluoreszenz im Fluos-Kanal, welche bei der Anwendung der FISH nicht vorkommt. Zudem weisen die Zellen von *Acidovorax* sp. eine gute Hybridisierung des Cy3-markierten FISH-Oligonukleotids auf, die signalverstärkende Wirkung der CARD-FISH ist nicht zu erkennen, ein Fluos-Signal der CARD-FISH-behandelten Bakterien ist kaum wahrnehmbar. Aus diesen Gründen wurde die Methode der CARD-FISH an Zuckerrohrwurzeln nicht weiter verwendet.

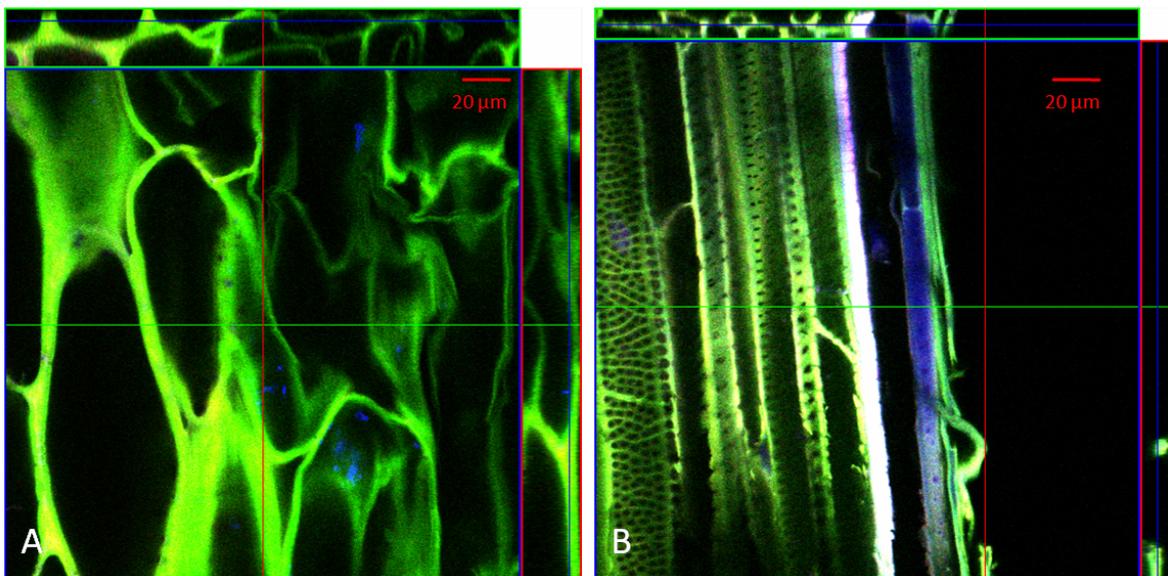


**Abb. 65:** CARD-FISH von Längs-Dünnschnitten einer Wurzel von Zuckerrohr. A Färbung der PFA-fixierten Zuckerrohrwurzeln mit Syto81; B hybridisiert mit der Sonde POD EUB (Cy3); C hybridisiert mit der Sonde POD EUB (Fluos), starke unspezifische Fluoreszenz; D hybridisiert mit der Sonde POD EUB (Cy3); C Gerstenwurzel eines axenischen Systems mit *Acidovorax* sp., hybridisiert mit dem gattungsspezifischen Oligonukleotid ACISP-145 Cy3 und der Sonde POD EUB (Fluos)

#### 4.6.3 Detektion und Lokalisierung wurzelassoziierter stickstofffixierender Bakterien mittels Immunofluoreszenz (Nitrogenase-Antikörper)

Die Detektion wurzelassoziierter stickstofffixierender Bakterien mit der Methode der Immunofluoreszenz mit Nitrogenase-spezifischen Antikörpern wurde an diversen Zuckerrohrproben angewandt. In dieser Arbeit wurden dazu zwei primäre Antikörper zur spezifischen Detektion eingesetzt, welche an den *nifDK*- bzw. an den *nifH*-Teil des Enzym-Komplexes binden. Somit ist eine spezifische Detektion diazotropher Bakte-

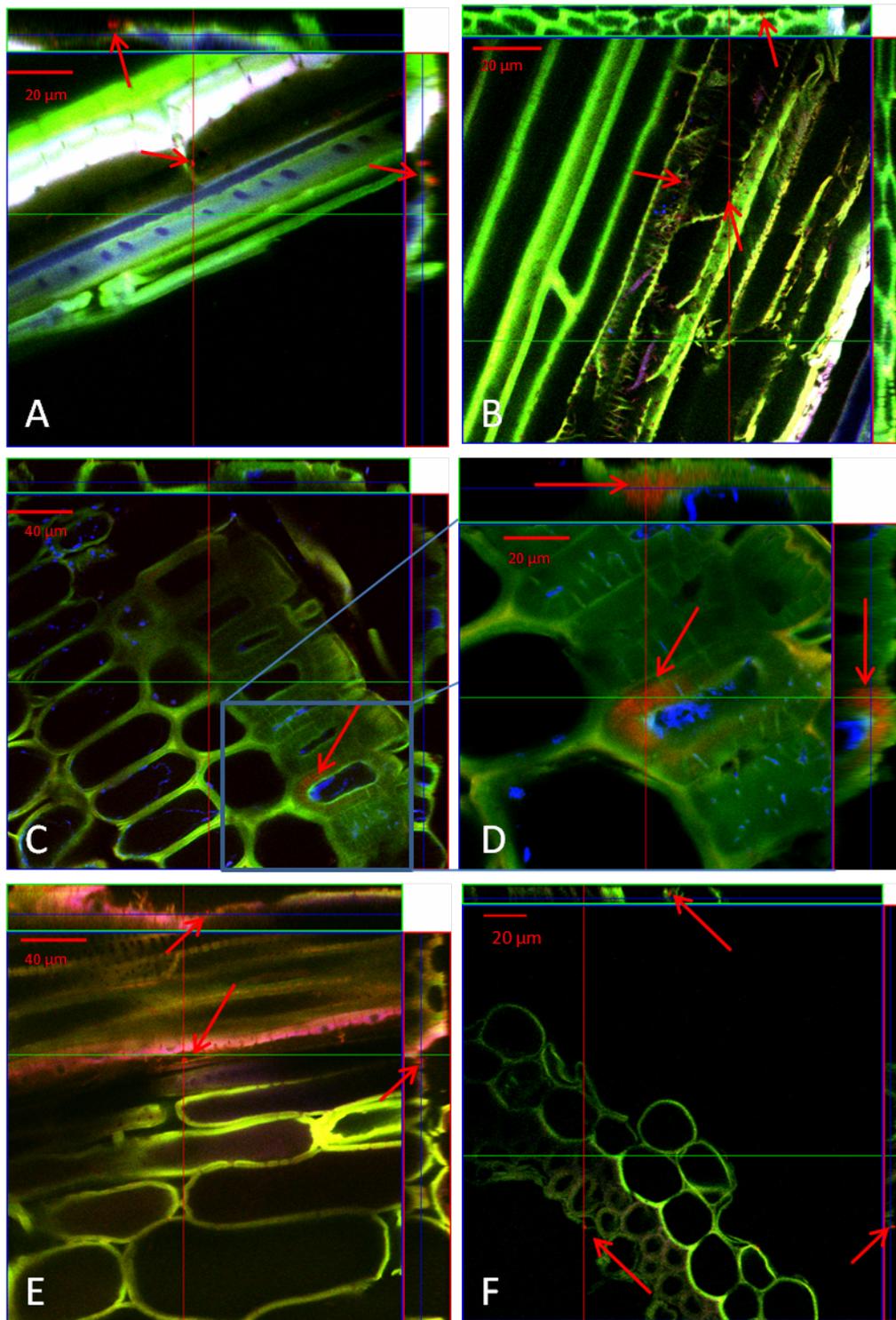
rien, die die Nitrogenase besitzen, möglich. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde ein sekundärer Antikörper gewählt, welcher an ein Epitop des von Hasen stammenden primären Antikörper bindet und mit Cy3 gekoppelt ist (AntiRabbit-Cy3). Die Antikörper  $\alpha$ -rR-*nifH*,  $\alpha$ -rR-*nifDK* und AntiRabbit-Cy3 wurden mit Bakterienreinkulturen auf ihre Einsetzbarkeit bei der Detektion von Bakterien getestet. Dazu wurden die Bakterienstämme (Tabelle 9) unter stickstofffixierenden Bedingungen (bei diazotrophen Bakterien) angezogen, fixiert und mit den Antikörpern behandelt. Als Kontrolle diente ein Experiment, bei dem nur mit den sekundären Antikörpern gearbeitet wurde. Der Test mit stickstofffixierenden Bakterienstämmen war weder erfolgreich, wenn diese im stickstofffreien Medium angezogen wurden, noch wenn diese im Vollmedium mit Stickstoffquelle inkubiert wurden. Der Test mit Bakterienstämmen, welche keine Nitrogenase besitzen, ergab ebenfalls keine Antikörper-Detektion. Als weitere negative Kontrolle der Methode der Immunofluoreszenz wurden PFA-fixierte Schnitte von Wurzel und Spross von Zuckerrohr ohne Antikörper bzw. nach Behandlung nur mit dem Sekundär-Antikörper untersucht. Diese Kontrollen sicherten die Spezifität der Methode, da bei keiner der untersuchten Proben unspezifische Signale im Cy3-Kanal detektiert werden konnten (Abb. 66). Abbildung 66 A zeigt einen Schnitt einer Blattscheide einer Zuckerrohrpflanze, welche nicht gedüngt und nicht inokuliert wurde. Abbildung 66 B zeigt einen Schnitt der Wurzel einer Zuckerrohrpflanze, welche mit dem Bakteriengemisch flüssig inokuliert wurde. In beiden Abbildungen, welche repräsentativ für mehrere methodische Kontrollen gezeigt werden, sind keine Signale im Cy3-Kanal zu sehen, die auf unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers hinweisen.



**Abb. 66:** Kontrollversuche zur Immunofluoreszenz-Detektion. A Querschnitt einer Blattscheide, B Längsschnitt einer Wurzel, nur mit dem sekundären Antikörper AntiRabbit-Cy3 behandelt

Bei den in der Abb. 67 gezeigten Bildern handelt es sich um Orthogonalansichten aus einem z-Stapel. Alle verwendeten Präparate wurden PFA-fixiert und mit einer Rasierklinge in dünne Segmente geschnitten. Abb. 67 A zeigt einen Längsschnitt der Wurzel einer flüssig inokulierten Zuckerrohrpflanze, die mit dem Antikörper  $\alpha$ -AB-*nifH* behandelt wurde, der an das Fe-Protein der Nitrogenase bindet. Gut zu erkennen sind rot gefärbte diazotrophe Bakterien, welche sich in den Gefäßleitbahnen des Wurzelsystems befinden (siehe Pfeile). Abb. 67 B zeigt ebenfalls einen Längsschnitt der Wurzel einer flüssig inokulierten Pflanze, welche mit dem Antikörper  $\alpha$ -AB-*nifDK* behandelt wurde, der an das MoFe-Protein der Nitrogenase bindet. Hier sind offensichtlich Cy3-Antikörper-markierte Objekte im Gefäßleitsystem der Wurzel zu erkennen (siehe Pfeile). Abb. 67 C und D zeigen einen Querschnitt einer Blattscheide von einer Zuckerrohrpflanze behandelt mit dem Antikörper  $\alpha$ -AB-*nifDK*, welche weder gedüngt noch inokuliert war. Zu sehen ist eine Ansammlung von Cy3-Markierungen, die auf Vorhandensein von Nitrogenase in den äußeren Parenchymzellen (siehe Pfeile) hinweisen kann, deren Zellwände durch Verholzung und Kieselsäureeinlagerungen verdickt sind. Dies könnte auf eine endophytische Besiedlung der Zuckerrohrpflanze durch stickstofffixierende Bakterien an dieser Stelle hindeuten. Bei dieser Probe konnten keine weiteren Signale detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Antikörper nicht unspezifisch an Strukturen der Pflanze gebunden haben. Abbildung 67 E zeigt einen Bildausschnitt eines Längsdünnschnittes einer Zuckerrohrwurzel, welcher mit dem Antikörper  $\alpha$ -AB-*nifH* behandelt wurde. Die Pflanze war nicht gedüngt und nicht inokuliert. Zu sehen sind Signale im Cy3-Kanal, die auf eine massive Besiedlung des Leitgefäßsystems durch stickstofffixierende Bakterien hinweisen könnten (siehe Pfeile). Abbildung 67 F zeigt einen mit beiden Primär-Antikörpern detektierten Querschnitt einer Wurzel einer Kontrollpflanze des Gewächshausversuchs. Es konnten Signale im Cy3-Kanal an bzw. in verdickten Stützzellen gefunden werden (siehe Pfeile).

Mit der Methode der Immunofluoreszenz konnten zwar Cy3-Markierungen in Zuckerrohrwurzeln und der -blattscheiden gezeigt werden, die auf das Vorhandensein von Nitrogenase-Antigen hinweisen. Da aber die Kontrollen mit fixierten, stickstofffixierenden Bakterienreinkulturen keinen positiven Nitrogenasennachweis ergaben, ist dies nicht als eindeutiger Nachweis von stickstofffixierenden Bakterien in Zuckerrohr zu werten.



**Abb. 67:** Detektion wurzellozierter diazotropher Bakterien mittels Immunofluoreszenz (Cy3-markierter sekundärer Antikörper Anti-Rabbit). A, B Ausschnitt aus einem Dünnschnitt einer Wurzel einer inokulierten Zuckerrühpflanze, mit (A)  $\alpha$ -AB-*nifH* und (B)  $\alpha$ -AB-*nifDK* behandelt; C, D Ausschnitt aus einem Dünnschnitt eines Blattes einer nicht gedüngten Zuckerrühpflanze, behandelt mit  $\alpha$ -AB-*nifDK*; E Ausschnitt eines Wurzelquerschnittes einer nicht gedüngten Kontrollpflanze, mit  $\alpha$ -AB-*nifH* behandelt; F Ausschnitt eines Querschnittes einer Blattscheide einer Kontrollpflanze des Gewächshausversuchs, behandelt mit  $\alpha$ -AB-*nifDK* und  $\alpha$ -AB-*nifH*

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodische Limitierungen und Problemlösung

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind mit diversen Problemen behaftet, die bei der Auswertung und Bewertung der Ergebnisse diskutiert werden müssen, um die Genauigkeit und Aussagekraft der Analysen beurteilen zu können. In diesem Teil der Diskussion werden die verwendeten Methoden nach beschrieben und in dieser Arbeit auftretenden Problemen analysiert.

#### 5.1.1 Nukleinsäure-Extraktion

Die Methoden zur RNA- und DNA-Isolierung von Pflanzen-assoziierten Bakterien aus solch komplexen Habitaten wie Zuckerrohr sind mit verschiedensten Problemen behaftet. Ziel ist es, Nukleinsäuren in geeigneter Qualität und Quantität zu erhalten. Eine Kontamination durch Fremd-Nukleinsäuren kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, da die beprobten Pflanzenteile mit Leitungswasser abgespült wurden, um anhaftenden Boden, Sand oder andere Partikel zu entfernen. Diese Art der Kontamination ist jedoch relativ gering einzuschätzen und sollte für alle verarbeiteten Proben vergleichbar sein.

Problematisch ist die Extraktion bei beiden Arten von Nukleinsäuren, um eine hohe Qualität in Reinheit und Funktionalität zu gewährleisten. Die nachweisbare genetische Diversität einer Umweltprobe ist stark von der Ausbeute der Nukleinsäure-Extraktion und daher wesentlich von der angewendeten Methode abhängig. Eine optimale Extraktion der Nukleinsäuren ist daher absolut notwendig, um mit nachfolgenden molekularbiologischen Methoden die jeweilige Probe umfassend analysieren zu können. Für die Extraktion kommen sowohl schonende Methoden, wie Lysozym- und SDS-Behandlung als auch aggressive Methoden wie Phenol-Chloroform-Extraktion und der Einsatz von Silica-Perlen unter starkem Schütteln der Probe zur Zerschlagung von Zellstrukturen zum Einsatz. Bei der Analyse mittels DGGE können beispielsweise je nach gewähltem Extraktionsprotokoll unterschiedliche Bandenmuster derselben Probe auftreten (LIESACK *et al.*, 1997). Die unterschiedliche Ausprägung der Bandenmuster hat z. B. die Ursache in der stark unterschiedlichen Isolierbarkeit von Nukleinsäuren aus Gram-positiven Bakterien (MARTENS, 2001). Aufgrund der gegenüber Gram-negativen Bakterien viel massiveren Zellwand empfiehlt sich die Anwendung eines eher aggressiven Protokolls, um die Nukleinsäuren in entsprechender Qualität und Quantität für nachfolgende Analysen zur Verfügung zu stellen. Wird ein zu mildes Protokoll angewendet, ist es möglich, dass vorwiegend Nukleinsäuren von Gram-negativen Bakterien,

jedoch nicht von Gram-positiven isoliert werden. Somit kann durch die folgenden Analysen ein verschobenes Bild der eigentlichen bakteriellen Diversität die Folge sein. Die in dieser Arbeit gestellten Ziele beinhalten zudem eine weitere Schwierigkeit. Es sollten vornehmlich Pflanzen-assoziierte Bakterien untersucht werden. In diesem Fall ist jedoch immer mit einer Ko-Isolierung pflanzlicher Nukleinsäuren zu rechnen. Um dies zu minimieren musste zunächst ein optimales Protokoll erarbeitet werden. Die Zellen des Zuckerrohrs mussten aufgeschlossen werden, um die Nukleinsäuren endophytisch lebender Bakterien mit den folgenden Analysen detektieren zu können. Die starke Beanspruchung der Nukleinsäuren durch z. B. Scherkräfte, die beim Zellaufschluß mit Silica-Perlen und dem darauf folgenden Schütteln auftreten, können die Nukleinsäuren zu stark fragmentieren, was sich negativ auf die Amplifizierbarkeit auswirkt (LEFF *et al.*, 1995). In diesem Fall können Nukleinsäuren einiger Bakterien durch Sequenzanalysen nicht analysiert werden. Hydrodynamisches Scheren kann von Vorteil sein, da lange Fragmente chromosomaler DNA zerkleinert werden. Nach der Entwicklung des FastPrep (Savant, Bio 101) wurde eine schnelle und effiziente Methode entwickelt, um DNA aus Boden direkt zu extrahieren (BORNEMAN *et al.*, 1996) und auch RNA direkt und schonend zu extrahieren (BORNEMAN und TRIPLETT, 1997). Ein mittlerweile weit verbreitetes Prinzip der Nukleinsäure-Extraktion ist die Kombination aus enzymatischer bzw. chemischer Lyse der Zellen und starkem Schütteln mit diversen Matrices. Dieses entwickelte Protokoll eignet sich für die Isolierung von Nukleinsäuren Boden-assoziiierter Bakterien. Griffiths *et al.* entwickelten 2000 ein Protokoll für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Umweltproben, welches die Ko-Extraktion inhibierender Substanzen, wie Huminstoffe, minimiert.

Bei der anschließenden Nukleinsäure-Amplifikation kann ebenfalls eine Reihe von Schwierigkeiten auftreten, wie z. B. eine Inhibierung der PCR durch Huminstoffe (TEBBE und VAHJEN, 1993). Dieses Problem kann durch eine Reinigung der Nukleinsäure-Extrakte durch eine Gel-Elektrophorese unter Verwendung von Low-Melting-Agarose oder andere Methoden wie Reinigung über eine Silica-Matrix vermieden werden (HARRY *et al.*, 1999; MILLER, 2001). Um der Inhibierung durch Huminstoffe entgegenzuwirken, welche gerade in den Nukleinsäuren der Wurzelproben von Zuckerrohr gehäuft auftraten, wurde bei jeder Extraktion eine Reinigung über eine Säulenmatrix durchgeführt. Bei Vorversuchen, beispielsweise mit TRIzol<sup>®</sup> Max<sup>™</sup> Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen), zeigte sich eine sehr starke Kontamination der Extrakte mit PCR-inhibierenden Stoffen, z. B. durch eine dunkle Färbung der fertigen Extrakte (HARRY *et al.*, 1999). Um aus diesen DNA/RNA-Extrakten positive Ergebnisse erzielen zu können, mussten diese stark verdünnt werden. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da eine starke Verdünnung dazu führt, weniger häufige DNA/RNA-Fragmente nicht amplifizieren zu können. Ein aussagekräftiges Abbild der tatsächlichen Diversität an

Zuckerrohr-assoziierten Bakterien würde in solchen Ansätzen nicht erhalten werden können. In dieser Arbeit führten Verdünnungen der Extrakte zudem zur vermehrten Amplifikation der stark abundanten pflanzlichen DNA. Daher wurde die an die klassische Extraktion (GRIFFITHS *et al.*, 2000) angelehnte, jedoch modifizierte Methode mit der anschließenden Reinigung durch das AllPrep DNA/RNA Mini Kit angewendet.

Die Bestimmung der Qualität und Quantität der isolierten Nukleinsäuren kann mit verschiedenen Fehlern behaftet sein. Abhängig vom pH-Wert und Salzgehalt der verwendeten Elutionslösung kann der Extinktionskoeffizient von OD260:280 (siehe Kap. 3.3) bei Extraktion derselben Proben Werte zwischen 1,5 und 2,2 aufweisen und die errechnete Konzentration an Nukleinsäuren damit um 25 % schwanken (WILFINGER *et al.*, 1997). Während dieser Arbeit ergaben sich jedoch keine Probleme durch falsche Messwerte des Spektralphotometers.

Die Ausbeute der in dieser Arbeit extrahierten RNA war gering, die Reinheit jedoch hoch (siehe Kap. 4.1.1). Alternative Methoden der RNA-Extraktion, Transkription und Quantifizierung extrem geringer Mengen an RNA zeigten TOPPING *et al.* (2009) und PETERS *et al.* (1999). Diese wurden durch den in dieser Arbeit erfolgreichen Einsatz des modifizierten Extraktionsprotokolls jedoch nicht verwendet. Bei der cDNA-Synthese ergibt sich durch die RT-PCR (reverse Transkription der RNA zu cDNA) bereits ein zweiter Schritt für eventuelle Verfälschung der bakteriellen Diversität. Je nach eingesetzten PCR-Primern kommt es so eventuell zur ungewollten Vorauswahl spezifischer Bakterien. Daher wurde die cDNA-Synthese in dieser Arbeit mit sogenannten Random-Primern durchgeführt, um diese Verzerrung gering zu halten.

Bei der Extraktion bakterieller Nukleinsäuren aus Pflanzen werden stets Nukleinsäuren der Pflanze mit extrahiert. Durch diese Koextraktion und der folgenden PCR kann es zu einer störenden Fehlamplifizierung pflanzlicher Nukleinsäuren kommen. Insbesondere macht die Amplifikation der 16S-rDNA aus Organellen Probleme und kann das Bild der Diversität verfälschen. Diese Fragmente müssen bei den folgenden Analysen ausgeschlossen werden, da sie nicht von den zu untersuchenden Pflanzen-assoziierten Bakterien stammen. Dies stellte während dieser Arbeit zunächst ein großes Problem dar, welches vor allem bei der Analyse der DNA auftrat. Bei der Analyse der RNA wurde dieses Problem vermieden, da der Anteil pflanzlicher RNA bei der Analyse der RNA-Extrakte unter 15 % lag.

Alternativ könnte das Problem modifiziert z. B. mit der von Botero veröffentlichten Methode der Nukleinsäure-Extraktion behoben werden, bei der nur RNA extrahiert und weiter verwendet wird (BOTERO *et al.*, 2005). In diesem Artikel wurde zudem eine gute Möglichkeit beschrieben, eine Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch die Nutzung spezieller Primer bei der reversen Transkription zu vermeiden. Hierbei wird

ein poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende der RNA-Fragmente angehängt und durch den Einsatz einer speziellen Polymerase können dann die synthetisierten Fragmente direkt amplifiziert und kloniert werden. Mittels Matrices mit Oligo dTTPs können zunächst die vorhandenen pflanzlichen RNA-Fragmente entfernt und danach mit der publizierten Methode weitergearbeitet werden. Eine Methode, Ribosomen direkt zu isolieren zeigten FELSKE *et al.* (1996). Mittlerweile wurde eine neue Methode veröffentlicht, bakterielle RNA aus Pflanzen zu extrahieren (SCHENK *et al.*, 2008). Diese Möglichkeiten der Analyse wurden jedoch nicht getestet.

Bei der Extraktion von Nucleinsäuren wurden alle in dieser Arbeit bearbeiteten Proben möglichst mit dem gleichen Protokoll behandelt und die isolierten Nucleinsäuren entsprechend mit den gleichen Methoden weiter bearbeitet. Bei Beginn des Projektes wurde das Pflanzenmaterial mit dem Mörser vergleichsweise nicht so stark zerkleinert als bei allen anderen Proben, die mit dem genannten Extraktionsprotokoll nach GRIFFITHS *et al.* (2000) bearbeitet wurden. Der systematische Fehler durch die Scherkräfte ist bei allen Proben identisch, da immer mit gleichen Parametern gearbeitet wurde; er kann somit für die Analyse vernachlässigt werden. Da alle Proben tiefgekühlt bearbeitet wurden und die Zeit bis zum Kühlen bei der Probenahme nie länger als 10 min betrug, ist eine Verschiebung der Population durch sich vermehrende Bakterien oder den Abbau von Nucleinsäuren auszuschließen. Da die Proben umgehend eingefroren wurden, kann eine Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft durch die Lagerung ebenfalls ausgeschlossen werden (ROESCH *et al.*, 2009). Jedoch konnten Studien die Reduktion des DNA-Gehaltes durch Einfrieren der Probe zeigen (HAJDUK, 1999; GIACOMAZZI *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang vergleichen GIACOMAZZI *et al.* (2005) verschiedene Techniken der Extraktion. Bei der Extraktion bakterieller Nucleinsäuren aus tierischem Gewebe sollte keine mechanische Lyse der Zellen eingesetzt werden, da sich durch diese die Ausbeute an bakterieller DNA verringert. Die mechanische Lyse war jedoch in dieser Arbeit unabdingbar, um die zum Teil durch Kieselsäure und Lignin verstärkten pflanzlichen Zellwände aufzuschließen.

### 5.1.2 Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Bei der Transkription von RNA aus komplexen Proben können rRNA-Fragmente, welche wegen ihrer Strukturfunktion in der Zelle eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweisen, nicht in einem kompletten Fragment umgeschrieben werden. Durch die Transkription mit spezifischen Primern wird eine Vorauswahl der RNA eines Habitats getroffen (siehe Kap. 5.1.3). Dies kann von Vorteil sein, wenn durch die Primerwahl unerwünschte RNA, wie z. B. pflanzliche RNA, ausgeschlossen werden kann. In dieser Arbeit wurden sog. Randomprimer verwendet, welche aus Hexameren verschiedener

Sequenzen bestehen. Somit kann die gesamte RNA einer komplexen Umweltprobe in cDNA transkribiert werden. Messenger-RNA wie z. B. die mRNA von *nifH*, hat eine sehr kurze Halbwertszeit. So ist es möglich, dass ein großer Teil der mRNA bereits bei der Extraktion degradiert wird und für weitere Analysen nicht mehr zur Verfügung steht.

### 5.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

#### Spezifität der Primer

Beim Einsatz „universeller“ Primer zur Amplifikation von ribosomaler RNA bzw. von rRNA kodierenden Genen, wie bei den beschriebenen Primern 27F, 341F, 907R und 1492R, welche einen Großteil der Domäne *Bacteria* erfassen, sollte die Effizienz der Amplifikation theoretisch bei allen in den Proben vorhandenen Bakterien gleich sein. Dies ist jedoch aus verschiedenen Gründen in der Praxis nicht der Fall. Dies macht die Untersuchung der Zusammensetzung der Bakterienpopulation und der tatsächlichen Abundanz von Spezies in einer Umweltprobe sehr schwierig. Durch qualitativ unterschiedliche Zugänglichkeit und Bindungsstellen der Primer (beispielsweise durch unterschiedlich ausgeprägte Sekundärstrukturen) oder durch Rehybridisierung der DNA erfolgt eine Amplifizierung von Templates verschiedener Spezies nicht gleich effizient (PALLANSCH *et al.*, 1990; REYSENBACH *et al.*, 1992; FARRELLY *et al.*, 1995; SUZUKI und GIOVANNONI, 1996; GONZALEZ und MORAN, 1997; POLZ und CAVANAUGH, 1998; ISHII und FUKUI, 2001). Auch die Heterogenität der 16S-rRNA kodierenden Gene können die Ursache sein (WINTZINGERODE *et al.*, 1997). Ein spezifisches Primersystem kann nur so gut sein, wie die Datenbank, aus der es generiert wurde (AMANN *et al.*, 1997). Deshalb muss diese mit den ständig erweiterten und öffentlich verfügbaren Datenbanken abgeglichen und aktualisiert werden (AMANN und LUDWIG, 2000). Die bekannten Sequenzen der öffentlichen Datenbanken reflektieren jedoch nicht vollständig die in den jeweiligen Untersuchungsproben vorkommenden 16S-rRNA Sequenzen (HEUER *et al.*, 1997), da die Diversität sehr hoch ist und zudem noch unbekannte Sequenzen zu erwarten sind. Die Überprüfung der Primer mittels online verfügbaren Datenbanken wie z. B. Probe Match (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch>) führte zu den in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnissen. Da diese Primer vor mittlerweile 15 und 20 Jahren entwickelt wurden, ist die Abdeckung der 16S-rDNA der Domäne *Bacteria* erwartungsgemäß nicht ausreichend. Der Primer ALF968, dessen Sequenz ausschließlich  $\alpha$ -*Proteobacteria* erfassen sollte, erfasst zu 14 % Sequenzen andere Klassen der *Proteobacteria* und Phyla (siehe Kap. 5.1.5). Ein Vergleich mit in aktuellen Datenbanken abgelegten Sequenzen und gegebenenfalls eine Evaluierung des Primersystems wäre daher nötig. Eine Evaluierung der Primersysteme wurde jedoch in dieser Arbeit

nicht durchgeführt.

Die Optimierung der Amplifikation der 16S-rRNA mit Primersystemen, die möglichst das komplette Gen erfassen, wie 27F und 1492R war in dieser Arbeit bei der Anwendung der hier aufgeführten Techniken und PCR-Varianten nicht erfolgreich. Dies kann beispielsweise auf die Sekundärstruktur der 16S-rRNA zurückzuführen sein, welche eine Transkription langer Sequenzfragmente in cDNA verhindert. Daher wurde die cDNA der 16S-rRNA codierenden Gene mit den Primern 341F und 907R durchgeführt. Dies führte allerdings wegen der verminderten Länge von 566 bp zu einer verringerten phylogenetischen Auflösung.

Die Überprüfung der eingesetzten Primer für die *nifH*-Gene erfolgte mit der Datenbank *nifH* database (<http://www.es.ucsc.edu/~wwwzehr/research/database/>) (ARB, constructed from Swissprot entries, Aligned by PFAM, Updated December 2007). Die in der Tabelle 10 und die in die Nested-PCR eingesetzten Primer zur Erfassung der *nifH*-Gendiversität wurden mit DNA der Bakterienstämme getestet, die ebenfalls für die Inokulationsexperimente eingesetzt wurden. Bei allen Bakterienstämmen konnte eine erfolgreiche Amplifikation der *nifH*-Gene durchgeführt werden (siehe Abb. 12). So konnte eine optimale Analyse zur Untersuchung der inokulierten Bakterien gewährleistet werden. Allerdings ist nicht getestet worden, ob bei gleichzeitiger Anwesenheit aller fünf Bakterienstämme die Amplifikation gleichmäßig stark wäre. Bekannt ist, dass durch das Vermischen von Proben die detektierte Diversität verringert wird (ZHANG und GANT, 2005). Dies kann in diesem kleinen Maßstab der Fall sein. Sequenzen, an denen Primer besser binden, werden bevorzugt amplifiziert und verfälschen so die Diversität einer Probe.

In dieser Arbeit konnte mit den *nifH*-Primerpaaren von Rösch, Zehr, Ueda und Widmer (siehe Tab. 4) nur „unspezifische“ Amplifikate gewonnen werden, die Genen der Zuckerrohrpflanzen entsprachen. Dies wurde bei der Sequenzierung nach Klonierung der erhaltenen Fragmente gefunden. Die Amplifikate zeigten bei der horizontalen Agarose-Gel-Elektrophorese jedoch eine korrekte DNA-Fragment-Länge an. Dieses Beispiel zeigt, dass eine Nachsequenzierung bei der PCR erhaltener Amplifikate gerade bei Untersuchungen in der mikrobiellen Ökologie sehr wichtig ist. Diese unspezifische Amplifizierung wird durch die hohe Degenerierung der Primer und damit durch den Mangel an Spezifität verursacht (MEYERHANS *et al.*, 1990; POUSSIER *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 1985; WATKINS und SANTALUCIA, 2005). Eine höhere Spezifität der PCR-Ergebnisse konnte auch mit einer Touch Down PCR nicht erreicht werden. Deshalb wurde die Nested-PCR aus den Primerpaaren Poly und Roesch eingesetzt, bei der spezifisch nur *nifH*-Gene amplifiziert wurden. Aus den genannten Gründen kann jedoch eine Verzerrung der Amplifikation nicht ausgeschlossen werden. Zudem erhöht sich bei dieser

Variante der PCR die Zyklenzahl und damit steigt die Fehlerrate durch den Einbau falscher Nukleotide während der Amplifikation durch die *Taq*-Polymerase an (TINDALL und KUNKEL, 1988; BARNES, 1992).

Der Einsatz degenerierter Primer im gewählten Primersystem der Nested-PCR stellt zwar in dieser Arbeit keine Beschränkung der Spezifität dar, jedoch kann es bei der Auftrennung mittels DGGE bei einer besonders hohen Auflösung zur Bildung von Mehrfachbanden kommen (KOWALCHUK *et al.*, 1999), die bei einer Cluster-Analyse als verschiedene Sequenzen berechnet werden. Zudem kann es vermehrt zu einer scheinbaren Verschiebung in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft kommen und ein wirklich repräsentatives Bild der bakteriellen Gemeinschaft kann nur sehr bedingt wiedergegeben werden.

Der Einsatz LNA-substituierte Primer (locked nucleic acids) bei der RT-PCR und für die Amplifikation geringer Targetmengen ist für *nifH*-Gene erprobt worden (BURBANO *et al.*, 2010). Locked nucleic acids sind DNA-Analoga, in welchen der Furanosering des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA chemisch blockiert ist. Das Integrieren der LNA-Basen bewirkt eine konformative Änderung der lokalen Helix (KAUR *et al.*, 2006). Bei den von BURBANO *et al.* (2010) beschriebenen Experimenten konnte bei der Amplifikation von *nifH*-Genen von Reis- und Zuckerrohr-assoziierten Bakterien die Spezifität der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) um das 26-fache erhöht werden. Beim Einsatz der LNA-Primer in die generelle PCR wurde jedoch die Spezifität gesenkt. Ein anderer Lösungsansatz um die Amplifikation pflanzlicher DNA zu verringern könnte die suicide polymerase endonuclease restriction (GREEN und MINZ, 2005) sein, bei welcher die unerwünschten DNA-Fragmente eliminiert werden und die wenigen Ziel-Targets amplifiziert werden (sog. suicide PCR).

Um die Diversität der *nifH*-Gene mehrerer Bakterienarten in einer hochkomplexen Umweltprobe amplifizieren zu können, müssen degenerierte Primer eingesetzt werden, die eine Verzerrung des PCR-Ergebnisses hervorrufen können. In dieser Arbeit wurden daher keine streng quantitativen Analysen durchgeführt, exprimierte *nifH*-Gene wurden „qualitativ“ amplifiziert und sequenziert. Die Proben wurden jedoch alle gleich behandelt, so dass der Amplifikations-Fehler vergleichbar sein dürfte.

Durch die fehlende 3'-5' Exonukleaseaktivität (Proof-Reading) der eingesetzten *Taq*-Polymerase kann es zum Einbau falscher Basen während der PCR kommen. Bei der nachfolgenden Analyse mittels DGGE sind Mutationen als sichtbare Mehrfachbanden zu erwarten. Damit kann es zur Überschätzung der Diversität der Bakteriengemeinschaft kommen. In einer Studie von ECKERT und KUNKEL (1991) wurde eine Wahrscheinlichkeit von 1:5411 für den Einbau falscher Nukleotide ermittelt, die bei der DGGE bei hoher Sensitivität der Trennung als Mehrfachbanden sichtbar wären. Die

phylogenetische Analyse der Sequenzen wird dadurch ebenfalls eingeschränkt. Gerade bei kurzen Sequenzen kann dies zu einer falschen Zuordnung im Stammbaum führen.

Dem Temperatur-Zeit-Zyklus-Programm der PCR kommt große Bedeutung zu, um die Bildung von Artefakten, Amplifizierung von nicht erwünschten Produkten und Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern und trotzdem genug Produkt zu gewinnen, um einen sicheren Nachweis zu erhalten. Um allgemeine Störungen der PCR-Reaktion wie Inhibition durch Huminsäuren auszuschließen und die Amplifizierbarkeit der Proben sicherzustellen, wurden alle Proben zuerst in eine „universelle“ PCR (16S-rRNA Gene aller *Bacteria*) eingesetzt. Falls diese erfolgreich war, wurde die Amplifikation der *nifH*-Gene durchgeführt.

### Optimierung der Annealing-Temperatur

Ein positives Amplifikationsergebnis muss nicht unbedingt das Vorhandensein der zu untersuchenden phylogenetischen Gruppen bedeuten, da falsch positive Amplifikate auftreten können. Eine korrekt positive Amplifikation ist abhängig von der Spezifität der eingesetzten Primer und von dem verwendeten Amplifikationsprogramm, insbesondere von der gewählten Annealing-Temperatur. Diese ist jedoch nicht nur von der Anzahl an G und C bzw. A und T abhängig sondern auch von deren Anordnung innerhalb der Sequenz. In Anlehnung an BRESLAUER *et al.* (1986) kann die Berechnung die nearest neighbour-Methode angewandt werden, die mit vielen Sequenzanalyse-Programmen möglich ist. In dieser Arbeit wurde die optimale Annealing-Temperatur experimentell mit Hilfe von Temperaturgradienten der Annealing-Temperatur bestimmt, in die mehrere Umweltproben und Templates von Zielorganismen eingesetzt wurden. Die höchste Temperatur, bei der bei allen getesteten Proben für einen eindeutigen Nachweis ausreichend PCR-Amplifikate bei der Agarose-Gelelektrophorese erkennbar war, wurde als optimale Annealing-Temperatur für das spezifische PCR-Programm genutzt und mittels Sequenzierung der Amplifikate überprüft. Bei der Auswahl des spezifischen PCR-Programmes wurden Bakterien negativer Kontrollgruppen eingesetzt wie z. B. DNA von *E. coli* bei der *nifH*-PCR, um die Spezifität der Bedingungen nachweisen bzw. erhöhen zu können. Bei einer zu geringen Spezifität der PCR wurde ein sog. Touch Down der Annealing-Temperatur verwendet. Durch die hohe Temperatur zu Beginn binden die Primer sehr spezifisch nur an das gewünschte Fragment. Ein negativer Befund muss nicht auf das Fehlen der gesuchten DNA in der Probe zurückzuführen sein, da z. B. die Template-Menge im PCR-Ansatz einfach zu gering sein kann. Zur Lösung dieses Problems wurde die sog. Nested-PCR angewandt, bei der man ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert, um dann das gewünschte Fragment mit Hilfe von innerhalb dieses Fragments liegenden spezifischen Sequenzen und entsprechenden Primern das PCR-Produkt zu reamplifizieren (siehe Abb. 12). Zudem können Orga-

nismen der nachzuweisenden Gruppe existieren, die an der Bindungsstelle des jeweilig eingesetzten Primers Basenfehlpaarungen und Punktmutationen aufweisen.

Um die Spezifität des jeweiligen PCR-Nachweises zu zeigen, ist eine Sequenzierung der entstandenen PCR-Produkte unumgänglich. Dabei spielen Sequenzabweichungen im Bereich der ersten drei 3'-terminalen Basen des Primers eine große Rolle (SOMMER und TAUTZ, 1989; KWOK *et al.*, 1994). Die Amplifikation wird jedoch nicht beeinflusst, wenn deren Position am 5'-Ende des Primers liegt und die Annealing-Temperatur zu wenig stringent gewählt wurde (HEUER *et al.*, 1997). Durch den Einsatz einer Negativ-Kontrolle konnte eine Kontamination durch Fremd-DNA ausgeschlossen werden (Amplifikationsansatz ohne DNA). Der Erfolg der Amplifikation jeder PCR wurde mit einer sog. Positiv-Kontrolle überprüft, d.h. der Amplifikation eines spezifischen Gens oder Genfragments unter Verwendung von aus Referenzstämmen stammenden Nukleinsäuren. Um eine Inhibition der PCR durch z. B. Huminstoffe (s. o.) zu unterbinden, wurde BSA (Bovine Serum Albumine) als Additiv in der PCR eingesetzt (FINCKH und ROLFS, 1995). BSA stabilisiert die Enzymaktivität der Polymerase (INNIS und GELFAND, 1994), verbessert den Amplifikationsprozess und damit die Produktausbeute. Die genaue Wirkungsweise des Proteins ist jedoch nicht bekannt (FINCKH und ROLFS, 1995). Die *Taq*-Polymerase hat die Eigenschaft, strangunabhängig einen unspezifischen 5'-terminalen Überhang am amplifizierten DNA-Fragment zu bilden. Da man für die Insertion eines Fragmentes mittels T-Vektorklonierung einen A-Überhang benötigt, ist es möglich, dass nur jedes 4. Fragment ligiert wurde, wenn der Anteil eines A-Überhangs 25 % beträgt. Zudem wird dieser Überhang sehr schnell abgebaut. Die Generierung der A-Überhänge wurde in Vorversuchen getestet, der Ansatz wurde wegen unzureichenden Klonier-Resultaten jedoch nicht durchgeführt.

### DNA-Färbung in der Agarose-Gel-Elektrophorese

In dieser Arbeit wurden PCR-Amplifikate nach horizontaler Agarose-Gel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidium-Bromid und UV-Bestrahlung ausgeschnitten, eluiert und sequenziert. Die Verwendung DNA-interkalierender Farbstoffe in Kombination mit UV-Licht ist wegen Strangbrüchen durch die UV-Strahlung und wegen anderen Schädigungen für die Weiterbearbeitung der Amplifikate relativ ungeeignet. Zur Vermeidung der Schädigung der DNA wurde daher die Intensität der UV-Bestrahlung reduziert und die Gele dem UV-Licht nur kurz ausgesetzt. Geeigneter ist die Verwendung eines Farbstoffs, dessen Nachweis kein UV-Licht benötigt, wie z. B. Kristallviolett. Auf diese Weise können UV-Schäden an der DNA wie Depurinierung, Bildung von Basendimeren und Strangbrüchen vermieden werden (FLORES *et al.*, 1992).

### DNA-Sequenzierung aus komplexen Proben

Bei der Sequenzierung von DNA aus Umweltproben können diverse Probleme auftreten.

Eine direkte Sequenzierung eines DNA-Fragments aus einer Umweltprobe, welches mit spezifischen Primern amplifiziert wurde, ist oft nicht möglich, da mehrere unterschiedliche Sequenzen der Zielgruppe als DNA in der Umweltprobe vorliegen. Dadurch kommt es zu Überlagerungen der Chromatogramme. Andererseits kann eine direkte Sequenzierung den Hinweis geben, dass eventuell nur ein bestimmtes Gen in einer hochkomplexen Umweltprobe vorhanden ist, sollte die Sequenz keine Überlagerung aufweisen. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten von klonierten DNA-Fragmenten oder von Bakterien-Isolaten gestaltet sich viel einfacher und genauer als die von Umweltproben. Ein weiteres Beispiel sind klonierte DGGE-Banden, da ein *E. coli*-Klon unter optimalen Bedingungen nur ein Insert in einem Plasmid trägt und so keine Überlagerungen bei der Sequenzierung entstehen können. Bei Nutzung des Sequenzier-Primers M13F kann die gesamte Sequenz des Inserts bestimmt werden, da die Ansatzstelle des Primers flankierend der multiple cloning site (mcs) des Vektors liegt. Durch die Anzucht der Klone lässt sich die Menge an DNA beliebig vergrößern.

Eine Chimärbildung durch Hybridisierung homologer Sequenzen verschiedener Arten bzw. Mutationen (KOPCZYNSKI *et al.*, 1994; LIESACK *et al.*, 1991) während der PCR und durch Fehlamplifikationen kann zu einer Veränderung und damit verbundenen Verfälschung der Diversität führen. Dasselbe gilt für die Ausbildung von Heteroduplex-DNA-Fragmenten (MYERS *et al.*, 1989; JENSEN und STRAUS, 1993), welche sich durch Fehlhybridisierung verschiedener PCR-Produkte bilden und eine geringere Schmelztemperatur aufweisen. Das Vorkommen von Chimären von ca. 5% der 16S-rRNA Gene in öffentlichen Datenbanken wurde von ASHELFORD *et al.* (2005) und HUBER *et al.* (2004) beschrieben und eine frei zugängliche Software zum Erkennen und Eliminieren dieser zur Verfügung gestellt. Eine Überprüfung der erhaltenen Sequenzdaten auf das Vorhandensein von Chimären ist unabdingbar. Dazu stehen diverse Web-basierte Hilfsprogramme zur Verfügung wie z. B. „Chimera Check“ der RDP-Internetseite (MAIDAK *et al.*, 1997). Der Anteil an Chimären von amplifizierten 16S-rRNA Genen lag in einer Studie von CHOI *et al.* (1994) bei 8,6 %. Laut WANG und WANG (1996) führt eine Verlängerung der Elongationszeit zu weniger Fehlhybridisierungsvorgängen. In dieser Arbeit wurden mit den in Kap. 3.13 beschriebenen Programmen Chimären gesucht und eliminiert. Mit diesen Programmen lassen sich Sequenzen mit einer Länge von weniger als 600 bp jedoch nicht analysieren.

Der Einsatz neuerer molekulargenetischer Techniken wie die „shot gun“-Sequenzierung hat die mikrobielle Ökologie revolutioniert, da keine PCR eingesetzt wird und so die Gesamtzahl an Verfälschungen der Diversität minimiert werden konnte (SCHLÜTER *et al.*, 2008). Dies ist auch der Fall bei Genomsequenzierungen (REINHARDT *et al.*, 2009; WOYKE *et al.*, 2009). Durch den Einsatz von „deep sequencing“ mit Hilfe der 454 Pyro-Sequenzierung oder anderer Hochdurchsatzsequenzierern kann eine wesentlich

bessere Abdeckung der in hochkomplexen Proben vorhandenen bakteriellen Diversität erreicht werden.

#### 5.1.4 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Durch die Methode der DGGE können DNA-Fragmente derselben Länge anhand ihrer Sequenz in einem kontinuierlichen Formamid-Harnstoff-Gradienten-Gel in einer hochauflösenden Gelmatrix aufgetrennt werden (MUYZER *et al.*, 1993). Eine GC-Klemme am 5'-Ende des Primers 341F verhindert das vollständige Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges und ermöglicht durch Stabilisieren des Laufverhaltens eine klare Auftrennung der Banden. Durch die zusätzliche GC-Sequenz wird der Primer um eine Nonsense-Sequenz 5'-terminal verlängert. Das heißt, große Teile des Oligonukleotids werden gar nicht für die eigentliche Amplifikation genutzt. Dies kann zu unspezifischen Hybridisierungen und folglich Amplifizierungen und damit zu unerwünschten Mehrfachbanden führen (NÜBEL *et al.*, 1996). Eine interessante Studie zum Vergleich mehrerer Primer-Paare der Domäne *Bacteria* für die DGGE-PCR veröffentlichten SANCHEZ *et al.* (2007). Das Primersystem, mit welchem in der Studie die meisten Banden insgesamt sowie per Spur aufgetrennt werden konnten, wurde in dieser Arbeit verwendet. Die Grenze der Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels DGGE liegt laut NÜBEL *et al.* (1996) und KOWALCHUK *et al.* (1997) bei einer Base Sequenzunterschied. BUCHHOLZ-CLEVEN *et al.* (1997) und VALLAEYS *et al.* (1997) konnten jedoch Sequenzen mit Unterschieden von 2 oder 3 Basen nicht im Gel trennen. Die mittels DGGE zu trennende maximale Fragmentgröße liegt laut NOLLAU und WAGENER (1997) bei ca. 1000 bp. Je größer das Fragment, desto exakter ist die phylogenetische Einordnung nach Sequenzierung der Banden. Da sich jedoch mit zunehmender Länge und der damit verbundenen steigenden Anzahl an Schmelzdomänen die Qualität der Auftrennung verringert, wurde in dieser Arbeit mit Fragmenten von 550 bp Länge gearbeitet. Durch die Untersuchung der erhaltenen PCR-Produkte nach Analyse mittels DGGE kann die Artenzusammensetzung einer Probe wie oben beschrieben durch Verschiebung verfälscht werden, z. B. durch die gewählten Extraktionsmethoden, Primersysteme und Gradienten. Sichtbare Banden bei der DGGE liegen einem Anteil von mind. 1 % der amplifizierten Sequenz eines einzelnen Organismus in der Originalprobe zugrunde (MUYZER *et al.*, 1993; POLZ und CAVANAUGH, 1998; MURRAY *et al.*, 1996). Die 16S-rRNA Gene von weniger stark repräsentierten Arten werden nicht ausreichend amplifiziert, um bei der Analyse berücksichtigt werden zu können. So kann die Abundanz der gesuchten diazotrophen Bakterien in der Probe verfälscht dargestellt werden, da durch eine quantitativ schlechte Amplifizierung die Detektionsgrenze der DGGE nicht erreicht wurde oder die Bandenintensität durch eine hohe Amplifizierungsrate unproportional hohe Abundanz zeigt. Zu einer Überschätzung der bakteriellen Diversität in Umweltproben

nach Analyse durch DGGE kann es durch verschiedene Gründe wie z. B. Mikroheterogenität durch Mutationen verschiedener Genkopien der 16S-rRNA Genfragmente kommen (FARRELLY *et al.*, 1995; NÜBEL *et al.*, 1996). Auch die unterschiedliche Anzahl an ribosomalen Operonen der 16S-rRNA Gene mit bis zu 15 Kopien pro Zelle (KÜNDIG *et al.*, 1995; RAINEY *et al.*, 1996; KLAPPENBACH *et al.*, 2000) kann durch daraus resultierende vermehrte Reamplifikation zu einer Überschätzung der Diversität führen, wobei die Zahl der Kopien mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert ist (KLAPPENBACH *et al.*, 2000). Wie bereits erwähnt, kann es aus verschiedenen Gründen zur Verfälschung der eigentlichen Diversität kommen. Bei der DGGE konnte von BUCHHOLZ-CLEVEN *et al.* (1997) gezeigt werden, dass DNA-Fragmente gleicher Länge mit unterschiedlicher Sequenz ein gleiches Laufverhalten zeigen können und daher verschiedene DNA-Fragmente in derselben Bande erscheinen können. Sicherheit gibt nur eine Sequenzierung der Banden nach deren Isolierung und Klonierung aus den entsprechenden Gelen. Dies ist jedoch nicht einfach umzusetzen. Durch Ko-Migration von fremden DNA-Fragmenten ist es nur schwer möglich, Banden auszuschneiden, zu reamplifizieren und zu klonieren, da Versuche in dieser Arbeit wie auch bereits publizierte Ergebnisse gezeigt haben, dass viele verschiedene DNA-Fragmente, die nicht sichtbar auf derselben Höhe mit der Bande liegen, ebenfalls erfasst werden (GAFAN und SPRATT, 2005). Die Autoren konnten aus einer ausgeschnittenen Bande bereits bis zu 10 Banden in einem fokussierten Gradienten von 50-55 % detektieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ausgeschnittene DGGE-Banden reamplifiziert und erneut auf ein Gel aufgetragen, ausgeschnitten und danach erst von beiden Enden sequenziert. Nur wenn beide Sequenzen einer Bande gleich waren und nach Analyse mit dem online verfügbaren Tool BLAST identische Ergebnisse zeigten, wurden sie in die folgenden Auswertungen mit einbezogen.

Entscheidend für die Auftrennung der DNA-Stränge in einem Gel ist der Gradient der denaturierenden Reagenzien. In dieser Arbeit wurde nach Vorversuchen mit einem 20-70 % Gradienten ein 40-70 % Gradient gewählt, da die Banden so eindeutig und weiter voneinander getrennt wurden ohne Informationsverluste bei einer Clusteranalyse zu erleiden. Bei einem 20-70 % Gradienten waren deutlich weniger Banden zu erkennen; diese waren zudem unscharf und lagen enger zusammen (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Gradient von 20-70 % hat gegenüber dem mit 40-70 % den Vorteil, dass länger und kürzer laufende Banden deutlicher aufgetrennt werden. Da diese Banden bei den Vorversuchen jedoch nur sehr unscharf und kontrastarm zu erkennen waren, ergab sich kein Vorteil aus der Nutzung eines 20-70 % Gradienten. Vermutlich hätten diese Banden eine Clusteranalyse verfälscht. Vergleiche zwischen verschiedenen Gradienten und die sich damit ändernden Bandenintensitäten wurden von COCOLIN *et al.* (2001) gezeigt. Auch die Spannung und die Laufzeit haben Einfluss auf die Qualität des Gels.

Wie MUYZER und SMALLA (1998) und Vorversuche gezeigt haben, befinden sich nach der hier gewählten Laufzeit von zwanzig Stunden bei einer angelegten Spannung von 100 V alle Banden an ihrer endgültigen Position.

Mittels Clusteranalyse können Bandenmuster von DGGE-Bildern miteinander verglichen und aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Bandenmuster in einem Baum graphisch dargestellt werden. Durch die erhaltene Topologie des Dendrogramms kann man die Ähnlichkeit der Spuren untereinander ablesen und damit Aussagen über die Bakteriengemeinschaften treffen. Für eine Clusteranalyse müssen links und rechts der zu untersuchenden Spuren DNA-Standards mit aufgetragen werden, die bestenfalls 2 Banden oder mehr aufweisen sollen. Durch diese externen Standards kann der möglicherweise auftretende sog. smile-Effekt mit der Software heraus gerechnet werden. In dieser Arbeit konnte wegen der einzeln auftretenden starken Banden und vielen kaum erkennbaren Banden keine aussagekräftige Cluster-Analyse durchgeführt werden. Die Möglichkeit, diese durchzuführen, bestünde darin, die starke Bande durch die Wahl der Gradienten zu eliminieren. So könnte jedoch ebenfalls keine aussagekräftige Analyse erfolgen, da die Ergebnisse wahrscheinlich verfälscht würden.

### 5.1.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist eine weit verbreitete Methode, die Identität kultivierter und vor allem nicht kultivierbarer Bakterien, die Abundanz aktiver Bakterien in verschiedenen Umwelthabitaten und das Besiedlungsverhalten von Bakterien an Pflanzen zu untersuchen. Hierbei kann jedoch eine Reihe von Problemen auftreten. Es gibt eine Vielzahl von erprobten und publizierten Oligonukleotidsonden, die für spezielle Bakterienklassen spezifisch sind (HARTMANN und SCHMID, 2007). Durch die stark ansteigende Anzahl an Sequenzdaten bedarf es jedoch einer stetigen Überprüfung der Sondenspezifität und gegebenenfalls einer Neuevaluierung. So wurden z. B. viele Bakterien durch die 1990 publizierte Sonde EUB-338, die den Hauptentwicklungsordnungen der *Plancomycetales* und *Verrucomicrobiales* zugeordnet werden, nicht erfasst. Daher wurden zwei weitere Varianten entwickelt, die dann in Kombination mit der vorhandenen Sonde EUB-338 fast alle Vertreter der Domäne *Bacteria* erfassten (DAIMS *et al.*, 1999). Ein spezifisches Oligonukleotid kann nur so gut sein wie die Datenbank, aus der es generiert wurde (AMANN *et al.*, 1997). Die Sonden EUB-338 und ALF-1b (siehe Tab. 8) wurden beispielsweise 1990 und 1992 mit dem damals aktuellen Sequenzdatensatz entworfen und publiziert. Heute liegt uns jedoch ein wesentlich umfassenderer Datensatz vor, mit denen Sonden entworfen und geprüft werden können. So erfasst die Sequenz des Oligonukleotids ALF-1b nur zu 54 % *α-Proteobacteria*, die Sequenz des Oligonukleotids ALF-968 zumindest zu 84 % *α-Proteobacteria* (überprüft mit dem Online-Tool Probe

Match von RDP). Die restlichen Sequenzen stammen aus anderen Phyla und Klassen der *Proteobacteria*.

Zum Testen der Methode an Zuckerrohrproben war die Qualität der verwendeten Sonden in dieser Arbeit jedoch ausreichend. Mittels der FISH Methode konnte eine endophytische Besiedlung der Zuckerrohrpflanzen jedoch nur sehr beschränkt nachgewiesen werden. Dies lag zum Einen an der starken Autofluoreszenz der Pflanzengewebe von Zuckerrohr, die eine Bewertung auftretender Fluoreszenzsignale kaum durchführbar machte. Beim Einsatz axenischer Inokulationsexperimente mit Quarzsand als Strukturmatrix und von sehr jungen Pflanzen treten beispielsweise kaum Probleme bei der Untersuchung der Pflanzen auf bakterielle Besiedlung auf. Bei dieser Methode ist keine autofluoreszente, mit diversen Partikeln durchsetzte Bodenmatrix vorhanden, die an der Wurzel bindet. So können die Bakterien an der Wurzeloberfläche relativ einfach detektiert werden. Bei einem solchen axenischen System ist das Problem des Entfernens wurzelassoziiierter Bakterien zudem geringer. Bei einem Freiland-Versuch mit realem Boden muss dieser durch Abspülen vor der Fixierung entfernt werden. So können Bakterien der Rhizosphäre, die vermutlich einen Einfluss auf die zu untersuchende Pflanze haben, fälschlicherweise entfernt werden. Zum Anderen ist es bei adultem Pflanzenmaterial möglich, dass die relativ großen pflanzlichen Zellen durch das Schneiden der Pflanzengewebe geöffnet und eventuell vorhandene endophytische Bakterien bei diversen Waschschrritten entfernt werden. Zudem ist eine unspezifische Bindung der verwendeten Sonden an Pflanzengewebe möglich, so dass nicht ausreichend Sonden im Inneren des Pflanzengewebes vorhanden sind, um bakterielle Signale detektieren zu können.

Ein weiterer Punkt sind die im Vergleich zu axenischen Systemen bzw. Bakterienreinkulturen stark abgeschwächten Fluoreszenz-Signale, welche Bakterien bei Verwendung der FISH in pflanzlichen Proben abgeben. Dies könnte fälschlicherweise als eine Art Hintergrund detektiert worden sein. Sehr hell fluoreszierende Signale weisen eher auf Artefakte der FISH als auf bakterielle Besiedlung hin. Bei der Verwendung der FISH in axenischen Systemen mit jungen Pflanzen ergibt sich ein einfacheres, übersichtlicheres Bild als bei komplexen Umweltproben mit adulten Pflanzen.

Ein weiteres Problem besteht vermutlich in der kurzen Hybridierungszeit und der Größe der markierten Oligonukleotide. Bei der Analyse diverser Wurzeln von Zuckerrohr mittels FISH konnte eine weitgehend endophytische Besiedlung nicht gezeigt werden; Signale an der Rhizodermis konnten jedoch detektiert werden. So scheint das markierte Oligonukleotid aufgrund der komplexen, verstärkten Gewebestruktur der Pflanze nicht in diese eindringen zu können und bis zu dem Target zu gelangen. Im Gegensatz zu den nichtverholzten relativ jungen Wurzeln anderer Pflanzen wie Gerste, Weizen und Mais in axenischen Systemen konnte bei Zuckerrohr eine Verstärkung der Zellwände bei

kleinsten Wurzeln beobachtet werden. So könnte die hochkomplexe Cellulose-Lignin-Struktur dafür verantwortlich sein, dass die Sonden nicht in die Zellen bzw. nicht in den apoplastischen Raum eindringen konnten. Diese Struktur könnte für die starke Autofluoreszenz bei Zuckerrohr verantwortlich sein. Der Grund könnte zudem bei der Fixierung des Gewebes mit PFA liegen, welches im Pflanzengewebe vorhandene Proteine miteinander vernetzt und so für die bleibende Stabilität der Probe sorgt. Versuche mit DNA-interkalierenden Farbstoffen wie Syto81 (Abb. 65 A) bestätigen die Vermutung, dass die Farbstoffe nicht ausreichend tief in das pflanzliche Gewebe eindringen konnten. Bei der Färbung mit dieser Art von Farbstoffen konnte ebenfalls ausschließlich eine bakterielle Besiedlung der Rhizodermis nachgewiesen werden. Andere Arten der Fixierung wie zum Beispiel mit Ethanol oder GDA (Glutardialdehyd) konnten in Vorversuchen ebenfalls keine überzeugenden Ergebnisse liefern und führten zu einer stärkeren Autofluoreszenz des Pflanzengewebes. Eine Verlängerung der Hybridisierungszeit um mehrere Stunden könnte bei diesem Problem hilfreich sein. Bei dieser Variante ist es jedoch möglich, dass durch die lange Inkubationszeit die Sonden geschädigt werden. Die Voraussetzung für das Eindringen der Sonden in pflanzliches Gewebe ist der Schritt der Dehydratisierung des Pflanzengewebes. Eine komplette Dehydratisierung von Wurzeln des Zuckerrohrs hatte jedoch einen massiven Strukturverlust zur Folge. Es ist deshalb möglich, dass fehlende osmotische Wirkungen durch verbliebenes Wasser bzw. Ethanol-PBS ebenfalls einen Grund für das nicht weitreichende Eindringen der Oligonukleotide in die Pflanzen und Bakterienzellen darstellen. Zudem kann die elektrische Ladung der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden beim Penetrieren der Zellen problematisch sein. Eine Lösung könnte die Verwendung von PNA-Sonden darstellen, welche statt des Phosphat-Desoxyribose-Rückgrats nicht geladene Pseudopeptide verwenden (DEMIDOV, 2003).

Diazotrophe Bakterien könnten im Zuckerrohrgewebe einen sogenannten Formwechsel durchlaufen haben, bei dem die bakterielle Zellwand nicht mehr vorhanden ist und der Zellinhalt nur noch durch die Zellmembran von der Umgebung abgetrennt ist. In den Bakterienzellen von *Azoarcus* sp. BH72 werden z. B. sogenannte Diazosomen gebildet, Membranstrukturen, an denen die Stickstofffixierung abläuft (HUREK *et al.*, 1995). Eine Fixierung solcher Zellen ist vermutlich nur durch zusätzliche osmotischen Schutz während der Fixierung möglich, um so das Lysieren der Zellen zu verhindern. Das osmotische Potential in Zuckerrohr ist durch die Speicherung und den Transport von Zucker relativ hoch. Bei diesen postulierten zellwandlosen endophytischen Bakterienformen könnte der immunologische Nachweis der Nitrogenase möglich sein, der in regulären Zellen nicht möglich ist (siehe Kap. 5.1.7).

### 5.1.6 Catalyzed Reporter Deposition-FISH (CARD-FISH)

Die Methode der CARD-FISH konnte in dieser Arbeit nicht zur erfolgreichen Lokalisierung von Bakterien in Pflanzengewebschnitten verwendet werden. Ein großes Problem stellte die unspezifische Bindung des Fluorescein- bzw. Cy3-markierten Tyramids an die Wurzeloberfläche und an Pflanzenzellen im Allgemeinen dar (siehe Abb. 65). Eine starke Fluoreszenz der Wurzeloberfläche ist zu erkennen, welche den Einsatz der CARD-FISH bei der Detektion von Bakterien in diesem Pflanzenmaterial nicht durchführbar macht. Desweiteren wurden die Durchlassöffnungen im Gefäßsystem der Pflanzen unspezifisch gefärbt und geben ein Signal ab, welches dem der Bakterien in Größe und Form sehr ähnlich ist. Dass es sich hierbei nicht um Bakterien handelt, konnte nur durch die extrem regelmäßige Anordnung der Signale festgestellt werden, die untypisch für Bakterien ist.

Zum einen könnten diese Probleme der Anwendung der CARD-FISH bei pflanzlichen Geweben auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass das Substrat mit der Meerrettich-Peroxidase umgesetzt wird, welche an die Oligonukleotidsonde gekoppelt ist und nach der Radikalisierung unspezifisch an pflanzliche Zellen bindet. Peroxidasen sind weit verbreitete Enzyme bei Pflanzen, wo sie wichtige Rollen beim Wachstum, der Zelldifferenzierung und bei Entwicklungsprozessen spielen (YOSHIDA *et al.*, 2003). So lässt sich vermuten, dass eine Vielzahl von Peroxidasen auf der Wurzeloberfläche zu finden sind, welche das fluoreszierende Tyramid umgesetzt und somit unspezifische Signale verursacht haben. Eine andere Möglichkeit ist, dass die eingesetzten Oligonukleotidsonden unspezifisch an das Pflanzenmaterial gebunden haben. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde vor der Hybridisierung mehrmals eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA als Blockierungslösung durchgeführt. Unspezifische Oligonukleotid-Anlagerungen können ebenfalls mit Lachsspermien-DNA abgefangen werden. Dies führte jedoch nicht zum Erfolg.

Zudem könnte die semi-verholzte Struktur des Pflanzenmaterials ein störender Faktor sein. Selbst sehr junge Wurzeln von Zuckerrohr haben eine feste Struktur, im Gegensatz zu vergleichbaren Pflanzen wie Mais. Die Ablagerungen der Zellwände könnten zu unspezifischen Bindungen und Ansammlung des Substrates geführt haben. Einen Hinweis auf dieses Problem gab der Test der Hybridisierung mit POD-Sonden bei PFA-fixierten Wurzeln von Gerste, welche in einem axenischen System mit *Acidovorax* sp. gezogen wurden (Abb. 65). Hier ist ebenfalls eine Autofluoreszenz des Pflanzenmaterials zu erkennen, während die Signale der Bakterien sehr schwach sind. Eine Ursache der Nicht-Detektierbarkeit kann die nicht vorhandene Permeabilität für die recht großen, mit Peroxidase markierten Oligonukleotide im Vergleich zu fluoreszenzmarkierten Sonden sein.

Ebenso können alle im Kap. 5.1.5 aufgeführten Probleme auch bei der CARD-FISH auftreten.

### 5.1.7 Detektion von Nitrogenase mittels Immunofluoreszenz

Bei der Detektion von Bakterien mittels Immunofluoreszenz werden meist Antikörper eingesetzt, die an Epitope der Zelloberfläche binden (ASSMUS *et al.*, 1997; SCHLOTER und HARTMANN, 1998). In dieser Arbeit wurden jedoch Antikörper eingesetzt, die an Epitope der Nitrogenase-Reduktase-Komplexe binden, welche sich im Zellinneren befinden. So ist es möglich, dass die Penetration der Antikörper in die Zellen als Voraussetzung des immunologischen Nachweises eingeschränkt ist. Selbst bei den im Vorversuch zur Kontrolle verwendeten aktiv stickstofffixierenden Bakterienreinkulturen konnte nach Fixierung der Zellen keine Fluoreszenz detektiert werden, obwohl verschiedene Methoden der Fixierung getestet worden waren. Möglicherweise sind die Bedingungen für die Bakterien in Zuckerrohr so weitgehend unterschiedlich zu den Laborkulturen, dass diese unterschiedliche Reaktion eventuell erklärbar wäre. Eine erfolgreiche positive Kontrolle der Methode mittels Zielorganismus ist jedoch essentiell für den Einsatz der Methode. Daher wird die mögliche Detektion von Nitrogenase-positiven Bakterienzellen in Zuckerrohr mittels Immunofluoreszenz bei der Diskussion der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

## 5.2 Besiedlung von Zuckerrohr mit Bakterien - bisherige Kenntnisse und neue Einsichten basierend auf molekularen Analysen dieser Arbeit

Die Auswertung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann durch verschiedene Gründe nur eingeschränkt erfolgen. Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener experimenteller Versuchsansätze, fehlender Wiederholungen mit Parallelproben vergleichbaren Pflanzenmaterials und der teils geringen Zahl an Sequenzen pro Klondatenbank ist keine statistische Absicherung der Daten gewährleistet. Durch den Vergleich der zahlreich durchgeführten singulären Analysen der bakteriellen Diversität von Pflanzen in verschiedenen Systemen können jedoch Folgerungen aus den gefundenen Übereinstimmungen getroffen werden. Außerdem erlauben diese Analysen einen Einblick in eine bisher nicht bekannte bakterielle Diversität. So kann eine unterschiedliche Verteilung der Spezies in singulären Pflanzen (im Vergleich zu anderen einzelnen Pflanzen, wie von RAMETTE *et al.* (2005) beschrieben) problematisch sein. Die Analyse der Diversität weist durch die meist nicht erreichte Rarefaction große Lücken auf. Aus diesen Gründen sollen die hier untersuchten Proben nur Schlaglichter werfen. Ein Anspruch auf Vollständigkeit kann nicht erhoben werden. Bei den erhaltenen Daten handelt es sich um einen Einblick in die vorhandene bakterielle Diversität und nicht um eine umfassende Analyse der gesamten Diversität (siehe Kap. 5.1). Durch die bereits erwähnten Probleme bei der Lokalisierung endophytischer Bakterien mittels Detektion *in situ* wurden diese Versuche bei der Diskussion nicht berücksichtigt (siehe Kap. 5.1.5).

### 5.2.1 Molekulare Analyse der Diversität Zuckerrohr-assoziiertes diazotropher Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Einblick in die bakterielle Diversität assoziiert mit Zuckerrohr, basierend auf molekularbiologischen Methoden, gegeben werden. Eine Vielzahl an Sequenzen aus der Rhizosphäre konnte anhand verschiedener experimenteller Ansätze erhalten werden. Den höchsten Anteil der Sequenzen, welche bei den verschiedenen Ansätzen in dieser Arbeit erhalten werden konnte, gehört zu der Hauptentwicklungslinie *Proteobacteria*. Hinweise auf unterschiedliche Zusammensetzungen der bakteriellen Gemeinschaft assoziiert mit Zuckerrohr in Abhängigkeit von der Zuckerrohr-Varietät konnten gefunden werden (siehe Kap. 4.3.1). Der direkte Vergleich der 16S-rRNA Sequenzen aus RNA bzw. DNA zeigte keine aussagekräftigen Unterschiede zwischen den untersuchten Nukleinsäuren (siehe Abb. 26), wobei die stark unterschiedliche Anzahl der Sequenzen in den jeweiligen Datenbanken berücksichtigt werden muss.

Die phylogenetische Zuordnung von Sequenzen einiger Phyla konnte aus mehreren

Gründen nicht näher bestimmt werden. Bei den Hauptentwicklungslinien *Planctomyces*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria* und *Chloroflexi* ist die phylogenetische Zuordnung der 16S-rRNA Sequenzen diffizil, da eine Vielzahl der publizierten Sequenzen von nichtkultivierten Bakterien stammen. Im Vergleich zur Hauptentwicklungslinie der *Proteobacteria* sind in diesen Phyla weniger valid beschriebene Arten vorhanden. Im Bereich der Zuckerrohrwurzeln konnten zudem viele Sequenzen von Bakterien detektiert werden, die in Böden und im Wasser gefunden wurden, wie  $\delta$ -*Proteobacteria*, *Planctomyces* und *Actinobacteria*. Sie können aus anhaftenden Bodenpartikeln stammen bzw. in der Rhizosphäre angereichert sein. Ihre Rolle bei der Besiedlung der Zuckerrohrpflanzen ist unbekannt. Durch die hier verwendeten Methoden der Probenbearbeitung kann wegen der fehlenden Oberflächensterilisierung des Pflanzengewebes keine Aussage über die Art der Assoziation mit Zuckerrohr getroffen werden.

16S-rRNA Sequenzen der Hauptentwicklungslinien *Chloroflexi*, *Spirochaetes* und *Actinobacteria* konnten ausschließlich in Nukleinsäure-Extrakten von Zuckerrohrwurzeln detektiert werden. 16S-rRNA Sequenzen des Clusters TK10 der *Chloroflexi* konnten nur in unterirdischen Pflanzenteilen nicht gedüngter Zuckerrohrpflanzen detektiert werden. In Nukleinsäure-Extrakten unterirdischer Pflanzenteile konnten 16S-rRNA Sequenzen nachgewiesen werden, welche zum *Conexibacteraceae-Patulibacter*-Cluster der Hauptentwicklungslinie *Actinobacteria* gehören. Im Phylum *Planctomyces* wurden einige zu *Isosphaera*, *Gemmata* und *Singulisphaera* verwandte 16S-rRNA Sequenzen gefunden. In den genannten Bakteriengruppen existieren einige Bakterienarten, welche meist in Böden, limnischen Habitaten und Abwässern gefunden wurden. Interaktionen mit Pflanzen sind bisher nicht bekannt.

Die Zusammensetzung und Aktivität von stickstofffixierenden Bakterien kann durch die Applikation von synthetischem Dünger stark beeinflusst werden. So konnten die in der Einleitung bereits erwähnten, von Pedraza (2008) zusammengefassten Beobachtungen in dieser Arbeit zum Teil bestätigt werden. Während in der Zusammenfassung von Pedraza ausschließlich der Einfluss des Düngers auf *Herbaspirillum* und *Glucanacetobacter* diskutiert wird, konnten in dieser Arbeit Hinweise gefunden werden, dass beispielsweise Bakterien der Gruppe TK10 (wie oben beschrieben), *Azospirillum brasilense* und verschiedene Arten der Gattung *Burkholderia* durch die Düngung beeinflusst werden. Einige der in dieser Arbeit detektierten Bakterienstämme wie z. B. *B. soli*, *B. silvatlantica* und *B. plantarii* konnten ausschließlich in nicht gedüngten Pflanzen gefunden werden. Dies bestätigt entsprechende Beobachtungen von PEDRAZA (2008); KOLB und MARTIN (1988); JAGNOW (1983).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Stickstofffixierung durch den Nachweis von *nifH*-mRNA in einigen Gattungen bzw. Arten von Bakterien nachgewiesen werden, welche

entweder noch nie in Zusammenhang mit Zuckerrohr beschrieben wurden (z. B. Gattungen *Bradyrhizobium* und *Rhizobium*) oder deren Rolle bei der BNF in Zuckerrohr bis zum heutigen Zeitpunkt unklar ist (z. B. *Burkholderia tropica*). Es wurden einige Studien veröffentlicht, bei denen zwar stickstofffixierende Bakterien von Zuckerrohr isoliert wurden, bei denen jedoch keine Angabe zur Anzahl der fixierenden Bakterien assoziiert mit der Pflanze und zur Aktivität bezüglich der BNF gemacht wurde (BODDEY *et al.*, 2003). Stämme der Gattungen *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Derxia*, *Enterobacter* und *Erwinia* konnten nach 2-3 Anreicherungszyklen in stickstofffreiem, semi-soliden Medium aus der Rhizosphäre bzw. Rhizoplane von Zuckerrohr isoliert werden. Johanna Döbereiner konnte um 1958 das stickstofffixierende Bakterium *Bejerrinckia fluminensis* von der Wurzeloberfläche von Zuckerrohr isolieren (DÖBEREINER und RUSCHEL, 1958). Die Gattungen *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Derxia*, *Enterobacter* und *Erwinia* konnten in dieser Arbeit ebenfalls mittels Sequenzanalyse in den 16S-rRNA Klondatenbanken detektiert werden, traten jedoch nicht dominant auf.

Bakterien der Gattung *Derxia* konnten als positiver Einfluss auf das Wachstum von Zuckerrohrpflanzen von SOUTO und DÖBEREINER (1967) beobachtet werden, die Untersuchungen bezüglich dieser Bakteriengattung wurden jedoch nicht weitergeführt (BODDEY *et al.*, 2003). Bei Spezies der Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* konnten *nifH*-Gene nachgewiesen werden (DING *et al.*, 2005). *Paenibacillus azotofixans*, ein gram-positives stickstofffixierendes Bakterium, wurde in der Rhizosphäre von Gräsern wie Weizen und Zuckerrohr gefunden; ein entsprechender „rhizosphere effect“ wurde bei Weizen gezeigt (ROSADO *et al.*, 1998; VON DER WEID *et al.*, 2002).

### *α-Proteobacteria*

Bei der phylogenetischen Analyse der 16S-rRNA in Zuckerrohrwurzeln des Feldversuchs konnte ein neues Bakterien-Cluster entdeckt werden, welches eng mit *Azospirillum* spp. verwandt zu sein scheint (siehe Abb. 20 und 46). Bei der phylogenetischen Analyse der *nifH*-Gene der Wurzeln und Blattscheiden von Zuckerrohr des Feldexperiments konnten ferner Sequenzen von *Azospirillum brasilense* detektiert werden. Die entsprechenden Pflanzen sind nicht gedüngt worden. Dies könnte ein Hinweis auf die Beeinflussung der Besiedlung mit diazotrophen Bakterien durch Dünger sein.

Man vermutet, dass es spezifische Pflanzen-Bakterien-Assoziationen gibt, bei denen die Besiedlung vom Kultivar der Pflanze oder vom Bakterienstamm abhängig ist. Inokulationsexperimente verschiedener Getreidepflanzen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ivo Baldani zeigten, dass es innerhalb einer Bakterienart bei verschiedenen Stämmen zu einem unterschiedlichen Kolonisierungsverhalten kommen kann. So konnte eine Kolonisierung mit *Azospirillum brasilense* Sp245, welcher das Innere der Pflanze besiedeln kann, eine Ertragssteigerung von Zuckerrohr bewirken. Stamm Sp7, welcher nur die

Oberfläche von Wurzeln besiedeln kann und nicht ins Pflanzeninnere eindringt, konnte im Gegensatz dazu keine Ertragsteigerung bewirken (BALDANI *et al.*, 1986a, 1983, 1986b). *Azospirillum* spp. ist in der Lage, Pflanzenwachstums-regulierende Substanzen auszuschcheiden, vornehmlich Auxine, welches die Zahl der Seitenwurzeln erhöht und die Wurzelhaare verlängert. Somit kann eine bessere Nährstoff- und Wasseraufnahme erfolgen (STEENHOUDT und VANDERLEYDEN, 2000). Da *Azospirillum brasilense* nur eine sehr geringe Menge  $NH_4^+$  ausscheidet, profitiert die Pflanze vom BNF dieses Organismus wahrscheinlich nur nach einer Bakterienlyse (BOTHE *et al.*, 2007). Die aktive biologische Stickstofffixierung konnte jedoch in dieser Arbeit durch den Nachweis von *nifH*-mRNA gezeigt werden.

Die 16S-rRNA Sequenzanalyse von RNA aus Blattscheiden verschiedener Pflanzenbehandlungen des Feldexperiments zeigten eng zu *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *G. saccharii* und *G. liquefaciens* verwandte Sequenzen (Abb. 42). Dies könnte Hinweise auf neue, bisher unbekannte Arten der Gattung *Gluconacetobacter* geben. Mit *G. johannae* und *G. azotocaptans* eng verwandte 16S-rRNA Sequenzen konnten ebenfalls detektiert werden. Die 16S-rRNA Sequenzen dieser beiden Bakterienarten sind einander jedoch sehr ähnlich. Aufgrund dieser Tatsache ist eine genaue Zuordnung nicht möglich. Diese stickstofffixierenden Arten konnten somit in dieser Arbeit zum ersten Mal in Zuckerrohr nachgewiesen worden sein (vgl. FUENTES-RAMIREZ *et al.* (2001)). Die Detektion der *nifH*-Gene von *G. azotocaptans* und *G. johannae* ist jedoch nicht gesichert, da bisher keine Sequenzinformationen der *nifH*-Gene dieser Arten an der in dieser Arbeit sequenzierten Position verfügbar ist.

Sowohl in der phylogenetischen Analyse der 16S-rRNA als auch der *nifH*-mRNA-Sequenzen verschiedener Wurzelproben konnten zahlreiche Sequenzen von *Bradyrhizobium* sp. detektiert werden. Hier konnten sowohl nah zu *Bradyrhizobium japonicum* verwandte Sequenzen als auch bisher unbekannte Cluster gefunden werden. cDNA-Sequenzen (16S-rRNA und *nifH*) der Gattung *Rhizobium* konnten ebenfalls zahlreich in Spross- und Wurzelproben aller Behandlungen detektiert werden. Die hohe Anzahl der nachgewiesenen *nifH*-Sequenzen lässt auf einen großen Einfluss der Gattung *Bradyrhizobium* bei der BNF in Zuckerrohrwurzeln schließen. Der Vergleich der Sequenzen mit den aus dem mexikanischen Regenwald gewonnenen Sequenzen (16S-rRNA und *nifH*, Abb. 44 und 57) deutet auf enge phylogenetische Verwandtschaft der tropischen Bakterien-Genospezies hin. *NifH*-mRNA-Sequenzen von *Rhizobium* sp. konnten ausschließlich im Spross von nicht gedüngtem Zuckerrohr detektiert werden, was auf eine effektive BNF in der Pflanze schließen lässt. Als *Bradyrhizobium* wurden früher u. a. Bakterien gruppiert, die sehr langsam wachsen. Dies spiegelt sich z. B. in der Anzahl der ribosomalen Operone wider, von denen *Bradyrhizobium* lediglich eins besitzt. In diesem Zusammenhang spricht man in der Ökologie in sog. K-Strategen, welche nur

langsam wachsen (KASAHARA und HATTORI, 1991; KÜNDIG *et al.*, 1995).

### *β-Proteobacteria*

16S-rRNA Sequenzen der Gattung *Herbaspirillum* konnten ausschließlich in der DNA aus Wurzeln der Varietät RB72 454 aus dem Tank-Experiment nachgewiesen werden. Bei den detektierten DNA-Sequenzen handelt es sich offensichtlich nicht um eng mit den inokulierten Stämmen verwandte Bakterien, sondern um eng mit *H. frisingense* und *H. puttei* verwandte Bakteriengruppe. Dies gibt zudem einen Hinweis darauf, dass *Herbaspirillum* spp. die Zuckerrohr-Varietät RB86 7515 nicht besiedeln konnten. Von dieser Varietät sind weitaus mehr Sequenzen in den Klondatenbanken vorhanden als von der Varietät RB72, jedoch konnte die Gattung *Herbaspirillum*, welche systemische Besiedler enthält, nicht detektiert werden. Bei den entsprechenden Proben konnte jedoch keine Sättigung der Diversitäts-Analyse erreicht werden. Somit wäre es möglich, dass die Sequenzen der Gattung *Herbaspirillum* vorhanden sind, jedoch von den in dieser Arbeit verwendeten Analysen in komplexen Proben nicht erfasst wurden.

Bei der phylogenetischen Analyse der *nifH*- und der 16S-rRNA Klondatenbanken wurden eine große Zahl an Sequenzen gefunden, die der Hauptentwicklungslinie der *β-Proteobacteria* zugeordnet werden können, jedoch mit keinen bisher beschriebenen Arten verwandt sind (Abb. 48). Die nächstverwandten bekannten Gattungen sind *Ideonella*, *Leptotrix*, *Azohydromonas* und *Herbaspirillum*. Im Gegensatz zu anderen, hier untersuchten Bakterien konnten diese Sequenzen sowohl in den Blattscheiden- als auch in den Wurzelproben nachgewiesen werden. Die Gattungen *Ideonella* und *Azohydromonas* beinhalten stickstofffixierende Bakterienarten wie *Ideonella azotoficans* (NOAR und BUCKLEY, 2009) und *Azohydromonas lata* (XIE und YOKOTA, 2005). Die große Zahl an detektierten *nifH*- und 16S-Sequenzen zeigt, dass diese Bakterien eine Schlüsselrolle in der aktiven Biologischen Stickstofffixierung in Zuckerrohr tragen könnten.

Es konnten zudem nah mit den Gattungen *Massilia*, *Duganella* und *Janthinobacterium* verwandte 16S-rRNA Sequenzen detektiert werden. In diesen Gattungen sind jedoch bisher keine stickstofffixierenden Bakterien bekannt. Möglicherweise tragen diese Bakterien durch Exkretion von Phytohormonen zur Förderung des Pflanzenwachstums bei. *Massilia* sp. ist bekannt, N-acyl Homoserinlacton (AHL) zu produzieren (D'ANGELO PICARD *et al.*, 2005). AHL-Moleküle sind als mögliche Pflanzenwachstumsstimulatoren erkannt worden (SCHUHEGGER *et al.*, 2006).

Die Gattung *Burkholderia* weist eine große Anzahl Pflanzen-assoziiierter stickstofffixierender Bakterienarten auf (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2001). Neben eine Reihe von Gras-assoziierten konnten zwei Leguminosen-assoziierte Bakterienarten phylogenetisch der Gattung *Burkholderia* zugeordnet werden (*B. tuberum* und *B. phymatum*, VANDAMME *et al.* (2002)), die in der Lage sind in Wurzelknöllchen  $N_2$  zu fixieren.

Sie werden deshalb zu den  $\beta$ -Rhizobien gezählt (VANDAMME *et al.*, 2002). Während *B. tropica* vorwiegend in Assoziation mit Mais gefunden wurde, so konnte *B. unamae* vorwiegend mit Zuckerrohr assoziiert nachgewiesen werden (PERIN *et al.*, 2006). OLIVARES *et al.* (1993) fanden eine ungleichmäßige Verteilung von Bakterien des *Burkholderia cepacia* Komplexes in einzelnen Pflanzen. Vermutlich können komplexe Gemeinschaften des *B. cepacia*-Komplexes und nah verwandte Stämme in großen Populationen koexistieren, die Verteilung und Zusammensetzung dieser Bakterien kann aber in einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich sein (RAMETTE *et al.*, 2005). Zahlreiche *nifH*-mRNA-Sequenzen sind phylogenetisch eng verwandt zu der *nifH*-Sequenz des inokulierten Stammes *Burkholderia tropica* PPe8. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf die wichtige Rolle der Gattung *Burkholderia* bei der Biologischen Stickstofffixierung. Eine große Zahl an 16S-rRNA Sequenzen verschiedener Wurzelproben konnten der Gattung *Burkholderia* zugeordnet werden. Eng verwandte Sequenzen zu *B. soli*, *B. plantarii* und *B. silvatlantica* konnten ausschließlich in 16S-rRNA Sequenzen aus nicht gedüngten Pflanzen nachgewiesen werden. Möglicherweise kommt die Assoziation der Bakterien mit Zuckerrohr nur ohne Düngerzugabe zustande. Zu *B. cepacia*, einem stickstofffixierenden Bakterium, und zu *B. caribensis* konnten nah verwandte Sequenzen in den DNA/RNA-Extrakten von Wurzeln des Tank- und Gewächshausexperiments nachgewiesen werden. In der cDNA der Probe „Red Node“ und der Wurzeln gedüngter, nicht inokulierter Pflanzen konnten eng mit *B. phymatum* verwandte Sequenzen detektiert werden. Die Besiedlung dieser Knospe („Red Node“) durch *B. phymatum* könnte ein guter Ausgangspunkt für die Besiedlung der ganzen Zuckerrohrpflanze darstellen. *B. phymatum* wurde ursprünglich als sog.  $\beta$ -Rhizobium aus *Mimosa lunatum* isoliert (VANDAMME *et al.*, 2002), welches Knöllchen bilden und Stickstoff fixieren kann (TALBI *et al.*, 2010). Bei *Burkholderia* handelt es sich um eine Bakteriengattung von sog. r-Strategen, d.h. nach einer längeren Zeit der Überdauerung können die Organismen wieder schnell wachsen und Stoffwechsel betreiben, gegebenenfalls, um sich gegen andere Organismen schnell zu etablieren. Ein Merkmal dieser Strategie ist das Vorkommen von multiplen Operonen, wie im Fall von *B. tropica* und *Azospirillum brasilense* (MARTINEZ-AGUILAR *et al.*, 2008; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 1999; KLAPPENBACH *et al.*, 2000).

In einer Wurzelprobe des Feldexperiments konnte eine 16S-rRNA Sequenz detektiert werden, die eng mit *Acidovorax* verwandt ist. In dieser Probe konnte die Sequenz sehr häufig (28) kloniert und sequenziert werden. Eine zu diesen Sequenzen ebenfalls sehr ähnliche Sequenz konnte in der RNA der Probe „Red Node“ detektiert werden. In dieser Bakteriengruppe befinden sich stickstofffixierende Arten wie z. B. *Pseudacidovorax intermedius* (KÄMPFER *et al.*, 2008), aber auch pflanzenpathogene Bakterien.

### 5.2.2 Etablierung der inokulierten Bakterien in Zuckerrohr

Zusammenfassend können bezüglich der molekularbiologischen Untersuchungen der inokulierten Bakterien - des Gemischs aus fünf diazotrophen Bakterienstämmen (Tab. 2) - in der Zuckerrohr-Varietät RB86 folgende Schlussfolgerungen zur Etablierung der Inokulate getroffen werden:

#### *Gluconacetobacter diazotrophicus*

16S-rRNA Sequenzen von *Gluconacetobacter diazotrophicus* konnte mit sehr hoher Abundanz in allen untersuchten Blattscheiden der Zuckerrohr-Varietät RB86 nachgewiesen werden. Der inokulierte Bakterienstamm *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 konnte mit Hilfe der 16S-rRNA Sequenz in Blattscheiden der flüssig und Gel inokulierten Zuckerrohrpflanzen der Varietät RB86 des Feldversuchs häufig detektiert werden. In nicht inokulierten Kontrollpflanzen des Feldversuchs sowie in Pflanzen des Gewächshausversuchs konnte er jedoch nur selten bzw. nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich konnte sich der Stamm PAL 5 im Freilandversuch im Spross etablieren, im Gewächshaus jedoch nicht. Durch die geringen Divergenzen der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen 16S-rRNA Sequenzen zu der 16S-rDNA Sequenz des Stammes PAL 5 werden die detektierten 16S-rRNA Sequenzen als Hinweis auf die erfolgreiche Etablierung des inokulierten Stammes gedeutet (siehe Kap. 4.4.1). Die Besiedlung der Pflanzen mit autochthonen *G. diazotrophicus* wird hierbei aus genannten Gründen nicht ausgeschlossen.

Die aktive Fixierung des Luftstickstoffs konnte über die Expression der *nifH*-Gene im Feldversuch bei flüssig inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden. Die in den Blattscheiden detektierten *nifH*-mRNA-Sequenzen von *G. diazotrophicus* waren mit einem Anteil von 37,5 % die zweitdominantesten Sequenzen in dieser RNA-Probe. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Abundanz des Bakteriums hin, welches jedoch nicht notwendigerweise Stickstoff fixiert. Trotz Einsatz der Nested-PCR konnte eine Expression der *nifH*-Gene von *G. diazotrophicus* nur in einer einzigen Probe des Feldexperiments detektiert werden. Im Fall dieses Bakteriums muss jedoch auf die Ergebnisse des Tests der Nested-PCR mit der DNA von Bakterienreinkulturen hingewiesen werden: Bei allen anderen inokulierten Bakterienstämmen konnten bereits mit dem ersten Primerpaar Amplifikate gewonnen werden, bei *G. diazotrophicus* jedoch nicht. Das könnte auf eine Sequenzabweichung in einem Primer zur *nifH*-Gensequenz von *G. diazotrophicus* hinweisen. So könnte die relativ einfach durchzuführende *nifH*-PCR mit DNA von Bakterienreinkulturen ein positives Ergebnis zeigen, während die PCR einer Umweltprobe kein positives Ergebnis zeigt. Eventuell könnten zum raschen Nachweis des *nifH*-Gens von *G. diazotrophicus* neue Primer aus den öffentlichen Datenbanken gene-

riert werden, um die aktive Stickstofffixierung in Zuckerrohr-Proben zu testen. Dieses Bakterium scheint sehr gut an die endophytische Lebensweise in Zuckerrohr angepasst zu sein.

Die Assoziation von *G. diazotrophicus* und Zuckerrohr gilt durch ihre mittlerweile eingehende Untersuchung als Modellsystem einer Assoziation einer Monokotyledone mit einem diazotrophen Bakterium (PEDRAZA, 2008). Die ertragssteigernde Wirkung des *Gluconacetobacter diazotrophicus* auf Zuckerrohr durch BNF konnte durch Inokulationsexperimente eines Feldversuchs nachgewiesen werden. Hierbei wurden *G. diazotrophicus* bzw. dessen *nifH*-negative Mutante inokuliert. Eine Erhöhung der frischen Biomasse des Stängels um 40 % und der Trockenmasse der Blätter um 42 % konnten bei Inokulation des Wildtyps verglichen mit der Mutante gemessen werden. Damit ist die BNF in Zuckerrohr durch *Gluconacetobacter diazotrophicus* der einzige PGP-Effekt (der in dieser Arbeit zur Inokulation verwendeten Bakterien), der in einem Feldexperiment nachgewiesen wurde (BODDEY *et al.*, 2003; SEVILLA *et al.*, 2001). Zudem wurde mit diesem Feldversuch der direkte Nachweis der Pflanzenförderung durch BNF gezeigt (SEVILLA *et al.*, 2001).

Mittels Immunocapture Technik, Elisa und PCR konnten große Populationen von *G. diazotrophicus* in Boden und Pflanzengewebe in Brasilien und Australien nachgewiesen werden (BODDEY *et al.*, 2000; BALDANI und BALDANI, 2005). Zudem zeigten Laborversuche, dass *G. diazotrophicus* 40 % des Stickstoffs für eine Hefe zur Verfügung stellen konnte (COJHO *et al.*, 1993). Unbekannt ist, welche Form des organischen Stickstoffs fixiert und abgegeben wurde. In einer Studie von ADRIANO-ANAYA *et al.* (2006) konnte in einem Gewächshausversuch gezeigt werden, dass stickstofffixierende Bakterien auf verschiedene Pflanzen unterschiedliche Auswirkungen haben. So wurde nach der Inokulation von *G. diazotrophicus* auf Hirse eine Ertragssteigerung beobachtet, bei der Inokulation von *G. diazotrophicus* auf Mais konnte jedoch kein Einfluss festgestellt werden. Eine Studie von MUNOZ-ROJAS *et al.* (2005) konnte antagonistische Effekte des Stammes von *G. diazotrophicus* PAL5 gegen verschiedene, phylogenetisch sehr nah verwandte Bakterienstämme zeigen. Diese Antagonismen zeigte der Stamm gegen andere Vertreter der *Acetobacteraceae* und phylogenetisch entfernte Bakterien nicht. Zwischen phylogenetisch nicht miteinander verwandten Bakterienstämmen wie *Pedobacter* sp. und *Pseudomonas* sp. konnten ebenfalls starke Antagonismen beobachtet werden (GARBEVA und DE BOER, 2009). Interaktionen (positive und negative) spielen bei der Etablierung und Wirkung von inokulierten Bakterien sicher eine wichtige Rolle (GARBEVA und DE BOER, 2009).

### ***Azospirillum amazonense***

16S-rRNA Sequenzen des inokulierten Bakterienstamms *Azospirillum amazonense* CB-

AMc konnten lediglich in Wurzeln inokulierter Pflanzen des Gewächshausexperiments detektiert werden, nicht im Feldexperiment. Ein Hinweis auf BNF des Stamms wurde nicht gefunden. Die geringe Zahl der nachgewiesenen Sequenzen deutet auf eine sehr geringe Abundanz des Bakteriums hin.

### ***Burkholderia tropica***

*NifH*-Sequenzen des inokulierten Bakterienstamms *Burkholderia tropica* PPe 8 konnten in großer Zahl in den Wurzeln und Blattscheiden inokulierter Pflanzen des Feld- und Gewächshausversuchs nachgewiesen werden, die Sequenzen der 16S-rRNA jedoch nicht. *NifH*-Sequenzen von *B. tropica* traten auch in nicht inokulierten Pflanzen sehr häufig auf. Zum Einen könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass *B. tropica* in der für die Experimente genutzten Umwelt vorkommt und sich ohne Inokulation in Konkurrenz mit anderen Bakterienstämmen besser etablieren kann. Zum Anderen ist nicht sicher, ob die detektierten *nifH*-Sequenzen ausschließlich von dem inokulierten Bakterienstamm PPe 8 stammen, oder ob es sich nicht um andere, zu *B. tropica* PPe 8 nah verwandte Bakterien handelt. In diesem Fall scheint eine Inokulation der Zuckerrohr-Varietät RB86 in dem gewählten Anbaugebiet nicht notwendig bzw. sinnvoll zu sein.

### ***Herbaspirillum* spp.**

Die inokulierten Stämme der Gattung *Herbaspirillum* konnten mit Hilfe der molekularbiologischen Analyse weder in den Klondatenbanken der 16S-rRNA Sequenzen noch der *nifH*-Klondatenbanken detektiert werden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die inokulierten Spezies die gewählte Zuckerrohr-Varietät RB86 nicht besiedeln und dass die verwendeten Bakterienstämme bei der Zuckerrohr-Varietät RB86 nicht zur Inokulation geeignet sind. *Herbaspirillum* spp. sind als aggressive Besiedler des Wurzelinnern bekannt, sie etablieren sich nicht nur in der Wurzelrinde und dem Gefäßsystem sondern systemisch in der gesamten Pflanze (ROTHBALLER *et al.*, 2008; SCHMID *et al.*, 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zu anderen Studien *Herbaspirillum* spp. kein effektiver Kolonisierer der hier untersuchten Zuckerrohr-Varietäten zu sein scheint. Da der Fokus der Untersuchungen auf der Varietät RB86 lag, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es sich hierbei um eine wirtsspezifische Interaktion handelt, sodass die inokulierten Stämme der Gattung *Herbaspirillum* andere Zuckerrohr-Varietäten bevorzugen und die Varietät RB86 nicht besiedeln. In einer Studie über die Besiedlung von Zuckerrohr-Stecklingen mit den in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämmen von OLIVEIRA *et al.* (2009) konnte eine rasche und aggressive Besiedlung der Wurzeln mit den *Herbaspirillum*-Stämmen mittels FISH und MPN durchaus nachgewiesen werden. Hier handelt es sich jedoch zum Einen um ein *in vitro* System, welches zudem nur über 72 h analysiert wurde, zum Anderen wurde ausschließlich die Varietät SP70 verwendet. In einer Studie über die Isolierung der Bakterien mittels speziellen

Nährmedien konnten die beiden Spezies *Herbaspirillum rubrisubalbicans* und *H. seropedicae* in einer großen Zahl in Zuckerrohr nachgewiesen werden (OLIVARES *et al.*, 1996). Leider geht die verwendete Zuckerrohr-Varietät aus der Studie nicht hervor, meist wurde jedoch mit der Varietät SP70 gearbeitet. Im Rahmen der Doktorarbeit von Fabio L. Olivares (1993) konnte die Kolonisierung des Xylem von Zuckerrohr durch *Herbaspirillum* gezeigt werden.

### 5.2.3 Vergleich der molekularbiologischen Analysen dieser Arbeit mit publizierten Daten ähnlicher Experimente

REIS *et al.* (2008) untersuchten den Effekt der Mischinokulation auf die Entwicklung von Zuckerrohrpflanzen in einem Gewächshaus-Experiment mit den Zuckerrohr-Varietäten RB86 7515 (und RB72 454), die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, unter ähnlichen Bedingungen. Bei der Varietät RB72 konnte die Inokulation mit dem Bakteriengemisch im Vergleich zu den Kontrollen und Inokulation der Pflanzen mit einzelnen Bakterienstämmen die höchste Ertragssteigerung der Biomasse von Wurzel und Spross bewirken. Lediglich die Stickstoffakkumulation der Wurzel konnte mittels Düngung am meisten gesteigert werden (siehe Tab. 1 in (REIS *et al.*, 2008)). Die Zuckerrohr-Varietät RB86 zeigte ebenfalls eine Zunahme der Biomasse durch die Inokulation des Bakterien-Gemisches, jedoch war die Steigerung im Vergleich zu einzeln inokulierten Bakterienstämmen bzw. gedüngten Pflanzen nicht so deutlich wie bei der Varietät RB72 (siehe Tab. 2 in (REIS *et al.*, 2008)).

REIS *et al.* (2008) untersuchten auch die Feld-Experiments an den Standorten Usina Santa Cruz und Usina Sapucaia, Campos de Goytacazes. Bei den Feld-Experimenten konnten durch die Inokulation des Bakteriengemisches folgende Ergebnisse erzielt werden: Die Trockenmasse der Varietät RB72 konnte durch die Inokulation nicht gesteigert werden, die der Varietät RB86 konnte gesteigert werden. Am Standort Usina Sapucaia, Campos de Goytacazes, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Vor allem im ersten Jahr nach der Anpflanzung führte Inokulation der Varietät RB86 zu wachstumsfördernden Effekten.

In der Publikation von DA SILVA *et al.* (2009) wurden Pflanzen des untersuchten EMBRAPA-Feldes im Jahr 2007 beprobt. Es konnten signifikante wachstumsfördernde Effekte des Inokulums mit dem in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Gemischs gezeigt werden. Hier wurden dieselben Zuckerrohr-Varietäten, RB72 und RB86, wie in dieser Arbeit, auf dem Versuchsfeld des EMBRAPA (Seropedica, RJ, Brasilien) mit den in Kap. 3.1.1 beschriebenen Behandlungen angebaut und nach 6, 9 und 11 Monaten geerntet und untersucht.

In diesen Studien wurden keine Messungen der Stickstofffixierungen durchgeführt, so

dass unklar ist, auf welche Art die Steigerung der Pflanzenwachstums-fördernden Effekte durch die Inokulation zurückzuführen ist. Demzufolge ist unklar, ob die Effekte auf die Stickstofffixierung der inokulierten Bakterien zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei den inokulierten Bakterienstämmen vermutlich nicht um die dominant in Zuckerrohr stickstofffixierenden Stämme handelt, bzw. dass, im Fall von *Gluconacetobacter diazotrophicus* und *Burkholderia tropica*, sie unabhängig von der Inokulation aktiv Stickstoff fixieren.

## 6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über die Zusammensetzung der bakteriellen Diversität assoziiert mit Zuckerrohr gewonnen werden. Zudem konnte ein Einblick in die Phylogenie aktiv stickstofffixierender endophytischer und in der Rhizosphäre vorkommender Bakterien erhalten werden. Dies schafft die Grundlagen zur Antwort auf die Frage: Welche Bakterienart bzw. welche Bakterien-Konsortien sind aktiv für die hohe Biologische Stickstofffixierung in Zuckerrohr verantwortlich?

Mit den hier dargestellten Ergebnissen kann detailliert an der Identifikation der stickstofffixierenden Bakterien weiter geforscht werden. Mit Hilfe der optimierten Methoden des Full-Cycle-RNA-Approach können Proben von Zuckerrohrgewebe unkompliziert analysiert werden. Weiterführende Diversitäts-Analysen sind unbedingt notwendig und können mit der Methode des Deep Sequencing durchgeführt werden. Durch die Analyse der cDNA können in kurzer Zeit Sequenzen der dominanten und der aktiv stickstofffixierenden Bakterien erhalten werden. Die Entwicklung Gattungs-, Art- und Gen-Cluster-spezifischer Primer ermöglicht hierbei Nukleinsäure-Extrakte direkt auf das Vorkommen der diazotrophen Bakterien zu analysieren.

Für den Einsatz von PGP-Bakterien an Nutzpflanzen sollten weitere Feldexperimente mit häufig angebauten oder neu gewonnenen Zuckerrohrhybriden durchgeführt und molekularbiologisch analysiert werden. Im Vergleich der molekularbiologischen Analysen mit den Daten der Biomasse konnten Ergebnisse erhalten werden, welche auf einen positiven Einfluss des Inokulums auf die hier untersuchte Varietät RB86 zeigt. Daher sollten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen in einem identischen experimentellen Ansatz weiterführend untersucht werden. Ein besonderer Fokus sollte auf die Wechselwirkungen der inokulierten Bakterienstämme untereinander gelegt werden. Die hier erzielten Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche bakterielle Besiedlung verschiedener Zuckerrohr-Varietäten hin, so dass die Effizienz des Inokulums bei verschiedenen Zuckerrohr-Varietäten weiter untersucht werden sollte. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen stammen von einem einzigen Standort. Daher ist es wichtig, die experimentellen Ansätze in anderen Standorten (Böden) durchzuführen. Wie in dieser Arbeit sollten dafür verschiedene Wachstumsstadien der Zuckerrohrpflanzen untersucht werden. Dabei ist eine parallele Erfassung der Stickstofffixierung (z. B. mit der natural abundance Technik) sehr wichtig.

In verschiedenen Bakteriengruppen konnten Sequenzen detektiert werden, die auf bisher unkultivierte Bakterien hinweisen, welche vermutlich einen großen Einfluss auf Zuckerrohr haben. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten können zur Entwicklung spezifischer Nachweissysteme genutzt werden, die bei Kultivierungsversuchen

schnelle und effiziente molekularbiologische Überprüfungsmethoden darstellen. Für die Kultivierung bisher unbekannter diazotropher Pflanzen-assoziiierter Bakterien sollten neue Ansätze entwickelt werden. Während Variationen beispielsweise des pH-Wertes, der Kohlenstoffquellen und Effektoren bisher bekannter stickstofffreier Medien zur Anzucht wie z. B. NFb (TARRAND *et al.*, 1978) und JNFb (OLIVARES *et al.*, 1996) sicher essentiell für die Entdeckung neuer Bakterienarten sind, so sollten auch andere Faktoren mit einbezogen werden. In dieser Arbeit wurden viele zur Gattung *Bradyrhizobium* nah verwandte Sequenzen assoziiert mit Zuckerrohr detektiert. Bei *Bradyrhizobium japonicum* handelt es sich beispielsweise um eine sehr langsam wachsende Bakterienart (JORDAN, 1982) mit nur einem einzigen 16S-rRNA Operon (KÜNDIG *et al.*, 1995), sodass die Inkubationsbedingungen zur Isolierung unbekannter *Bradyrhizobium* spp. entsprechend durch Hemmung anderer schnellwachsender Bakterien angepasst werden könnte. Die Methode der Gewinnung von Bakterienisolaten mit Hilfe von sog. Fängerpflanzen hat sich in der Arbeitsgruppe von Dr. Esperanza Martinez als sehr effiziente Methode herausgestellt. Axenisch wachsende Leguminosen-Pflanzen könnten als Fängerpflanzen für *Bradyrhizobium* aus Zuckerrohr fungieren, so dass *Bradyrhizobium* selektiv in den Knöllchen angereichert wird. Dieser Ansatz könnte ebenfalls für die in den Blattscheiden detektierten *Rhizobium* spp. eingesetzt werden. Mögliche Effektoren wären Vitamine oder Lumichrom, von denen bekannt ist, dass sie das Wachstum von Rhizobien stimulieren.

## 7 Zusammenfassung

Zuckerrohr (*Saccharum officinarum* L.) gehört zu den bedeutendsten Agrarpflanzen für die Erzeugung erneuerbarer Energien. In Brasilien spielt der Anbau von Zuckerrohr eine wesentliche Rolle bei der Gewinnung von Bio-Ethanol, um fossile Brennstoffe in Verbrennungsmotoren weitgehend zu ersetzen. Zu diesem Zweck müssen unter anderem die Kosten für Produktion minimiert und die Umweltverträglichkeit optimiert werden. Ein wichtiger Weg, um enorme Mengen an sonst notwendigem synthetischen Stickstoff-Dünger zu vermeiden, ist die Nutzung der Biologischen Stickstoff-Fixierung (BNF) durch Bakterien. In manchen Zuckerrohr-Varietäten besteht der Anteil des gebundenen Stickstoffes an der pflanzlichen Biomasse bis zu 70 % aus der BNF. Hierbei handelt es sich um einen sehr hohen Wert für eine monokotyledone Pflanze, welcher nur mit dem bei Leguminosen vergleichbar ist, die mit symbiontischen, diazotrophen Rhizobiaceen vergesellschaftet sind. Die für die BNF in Zuckerrohr verantwortlichen diazotrophen Bakterien und die dazugehörigen Mechanismen sind nach derzeitigem Wissensstand nicht geklärt. Da bei einer endophytischen Kolonisierung von einer engen Kooperation auszugehen ist, werden v.a. endophytische diazotrophe Bakterien als Kandidaten für eine neuartige  $N_2$ -fixierende Symbiose in Zuckerrohr gesucht.

Bisher sind zahlreiche endophytische diazotrophe Bakterien aus Zuckerrohr mit kultivierungsabhängigen Methoden angereichert, isoliert und charakterisiert worden. Es ist jedoch fraglich, ob damit die effektiven  $N_2$ -fixierenden Bakterien von Zuckerrohr entdeckt wurden. Es sind keine Untersuchungen veröffentlicht, bei denen kultivierungsunabhängige molekulare Methoden zur Charakterisierung der aktiven, diazotrophen Bakteriengemeinschaft assoziiert mit auf dem Feld angebauten Zuckerrohr eingesetzt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden optimiert, um DNA und RNA (rRNA und *nifH*-mRNA) aus Zuckerrohrpflanzen vom Feld zu isolieren und eine RT-PCR anwenden zu können. Im Rahmen des Feldexperiments (2008/2009) am EMBRAPA/CNPAB in Seropedica (Rio de Janeiro, Brasilien) wurde u.a. auch ein vom CNPAB entwickelter Inokulum-Mix, welcher die Stämme *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* und *H. rubrisubalbicans* enthält, an der Zuckerrohr-Varietät RB867515 untersucht. Dabei wurden nach zwei- und dreijährigem Anbau Proben von Wurzel und Spross genommen und phylogenetische Analysen basierend auf Sequenzanalysen der 16S-rDNA und der 16S-rRNA sowie des *nifH*-Transkriptoms durchgeführt. Außerdem wurden Pflanzen in einem Gewächshausexperiment untersucht, um das Kolonisierungsverhalten und die aktive Stickstofffixierung der inokulierten Bakterienstämme zu analysieren.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte der Erfolg der Inokulation abgeschätzt und

ein Einblick in die Diversität der Zuckerrohr-assoziierten Bakterien gewonnen werden. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der 16S-rRNA Gendatenbanken lassen darauf schließen, dass *G. diazotrophicus* die Stängel und *B. tropica* die Wurzeln nach der Inokulation erfolgreich besiedeln können. Die Besiedlung durch *Herbaspirillum* spp., welche in anderen Zuckerrohr-Varietäten dominant verläuft, konnte in der Varietät RB867515 kaum nachgewiesen werden. Während *Herbaspirillum seropedicae* fast ausschließlich in der Wurzel detektiert werden konnte, so wurde *H. rubrisubalbicans* ausschließlich im Spross der Pflanzen nachgewiesen. Die Analyse der Expression der *nifH*-Gene zeigte sich als essentiell für Charakterisierung der aktiven Bakteriengemeinschaften. Durch den Vergleich der phylogenetischen Datenbanken konnten für die in dieser Arbeit gewählten Ansätze verschiedene ökologische Strategien entdeckt werden. Zudem konnte die Expression der 16S-rRNA und *nifH*-Gene anderer, bisher nicht mit Zuckerrohr in Verbindung gebrachter Bakterien wie *Ideonella* sp. und *Bradyrhizobium* sp. und bisher unbekannte Alpha- und Beta-*Proteobacteria* nachgewiesen werden. Um sich diese bisher unkultivierten stickstofffixierenden Bakterien und ihre Pflanzen-fördernden Eigenschaften zukünftig zu Nutze machen zu können, ist der Einsatz von molekularbiologisch gestützter Kultivierung ein vielversprechender Ansatz.

## 8 Literatur

ADAIR, K., und E. SCHWARTZ, **2008** Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of Northern Arizona, USA. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 420–426.

ADRIANO-ANAYA, M., M. SALVADOR-FIGUEROA, J. OCAMPO, und I. GARCIA-ROMERA, **2006** Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 879–886.

ALTSCHUL, S., T. MADDEN, A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, *et al.*, **1997** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**: 3389–3402.

AMANN, R., F.-O. GLÖCKNER, und A. NEEF, **1997** Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews* **20**: 191–200.

AMANN, R., und W. LUDWIG, **2000** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 555–565.

AMANN, R. I., L. KRUMHOLZ, und D. A. STAHL, **1990** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**: 762–770.

AMANN, R. I., W. LUDWIG, und K. H. SCHLEIFER, **1995** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143–169.

ASHBOLT, N. J., und P. A. INKERMAN, **1990** Acetic Acid Bacterial Biota of the Pink Sugar Cane Mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and Its Environs. *Appl Environ Microbiol* **56**: 707–712.

ASHELFORD, K. E., N. A. CHUZHANOVA, J. C. FRY, A. J. JONES, und A. J. WEIGHTMAN, **2005** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7724–7736.

ASSMUS, B., P. HUTZLER, G. KIRCHHOF, R. AMANN, J. R. LAWRENCE, *et al.*, **1995** *In situ* Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1013–1019.

- ASSMUS, B., M. SCHLOTTER, G. KIRCHHOF, P. HUTZLER, und A. HARTMANN, **1997** Improved *In Situ* Tracking of Rhizosphere Bacteria Using Dual Staining with Fluorescence-Labeled Antibodies and rRNA-Targeted Oligonucleotides. *Microb Ecol* **33**: 32–40.
- BALDANI, J. I., und V. L. BALDANI, **2005** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **77**: 549–579.
- BALDANI, J. I., V. L. D. BALDANI, L. SELDIN, und J. DÖBEREINER, **1986a** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 86–93.
- BALDANI, J. I., L. CARUSO, V. L. D. BALDANI, S. R. GOI, und J. DÖBEREINER, **1997** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 911–922.
- BALDANI, J. I., B. POT, G. KIRCHHOF, E. FALSEN, V. L. BALDANI, *et al.*, **1996** Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 802–810.
- BALDANI, V. L. D., M. A. D. B. ALVAREZ, J. I. BALDANI, und J. DÖBEREINER, **1986b** Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* **90**: 35–46.
- BALDANI, V. L. D., J. I. BALDANI, und J. DÖBEREINER, **1983** Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can J Microbiol* **29**: 924–929.
- BARNES, W. M., **1992** The fidelity of *Taq* polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**: 29–35.
- BARRERA, L. L., M. E. TRUJILLO, M. GOODFELLOW, F. J. GARCIA, I. HERNANDEZ-LUCAS, *et al.*, **1997** Biodiversity of Bradyrhizobia Nodulating *Lupinus* spp. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1086–1091.
- BASHAN, Y., und H. LEVANONY, **1990** Current status of *Azospirillum* inoculation technology. *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol* **36**: 591–607.
- BECKING, J. H., **1963** Fixation of molecular nitrogen by an aerobic vibrio or spirillum. *Antonie van Leeuwenhoek* **29**: 326.

- BECKING, J. H., **1982** *Azospirillum lipoferum*, a reappraisal. Klingmüller W (ed) *Azospirillum*, genetics, physiology, ecology, vol Experientia Suppl. 42. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland : 130–149.
- BEIJERINCK, M. W., **1888** Bot Ztg **46**: 725–735,741–750,757–790,797–804.
- BEIJERINCK, M. W., **1890** Bot Ztg **48**: 837–843.
- BEIJERINCK, M. W., **1925** Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann? Zentralbl Bakteriol II Abt **63**: 353–357.
- BLANCO, Y., M. ARROYO, M. E. LEGAZ, und C. VICENTE, **2005** Isolation from *Gluconacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors for sugarcane glycoproteins, which act as recognition factors. J Chromatography A 1093 **A 1093**: 204–211.
- BOBROW, M. N., T. D. HARRIS, K. J. SHAUGHNESSY, und G. J. LITT, **1989** Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Methods **125**: 279–285.
- BODDEY, R. M., J. C. POLIDORO, A. S. RESENDE, B. J. ALVES, und S. URQUIAGA, **2001** Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and other grasses. Aust J Plant Physiol **28**: 889–895.
- BODDEY, R. M., L. G. D. SILVA, V. M. REIS, B. J. R. ALVES, und S. URQUIAGA, **2000** Assessment of bacterial nitrogen fixation in grass species. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. W., Horizon Scientific Press : 705–726.
- BODDEY, R. M., S. URQUIAGA, B. J. ALVES, und V. M. REIS, **2003** Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant and Soil **252**: 139–149.
- BORNEMAN, J., P. W. SKROCH, K. M. O’SULLIVAN, J. A. PALUS, N. G. RUMJANEK, *et al.*, **1996** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl Environ Microbiol **62**: 1935–1943.
- BORNEMAN, J., und E. W. TRIPLETT, **1997** Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. Soil Biology and Biochemistry **29**: 1621–1624.
- BOTERO, L. M., S. D’IMPERIO, M. BURR, T. R. MCDERMOTT, M. YOUNG, *et al.*, **2005** Poly(A) polymerase modification and reverse transcriptase PCR amplification of environmental RNA. Appl Environ Microbiol **71**: 1267–1275.

- BOTHE, H., S. J. FERGUSON, and W. E. NEWTON, **2007** Biology of the Nitrogen Cycle. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier .
- BRESLAUER, K. J., R. FRANK, H. BLÖCKER, and L. A. MARKY, **1986** Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**: 3746–3750.
- BROSIUS, J., T. J. DULL, D. D. SLEETER, and H. F. NOLLER, **1981** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J Mol Biol **148**: 107–127.
- BUCHHOLZ-CLEVEN, B. E. E., B. RATTUNDE, and K. L. STRAUB, **1997** Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. Syst Appl Microbiol **20**: 301–309.
- BURBANO, C. S., B. REINHOLD-HUREK, and T. HUREK, **2010** LNA-substituted degenerate primers improve detection of nitrogenase gene transcription in environmental samples. Environmental Microbiology Reports : 251–257.
- CABALLERO-MELLADO, J., L. LOPEZ-REYES, and R. BUSTILLOS-CRISTALES, **1999** Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters **178**: 283–288.
- CABALLERO-MELLADO, J., L. MARTINEZ-AGUILAR, G. PAREDES-VALDEZ, and P. E.-D. L. SANTOS, **2004** *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. Int J Syst Evol Microbiol **54**: 1165–1172.
- CARNAUBA, B., **1990** O nitrogenio e a cana-de-acucar. STAB Acucar Alcool e Subprodutos **8**: 24–41.
- CAVALCANTE, V. A., and J. DOEBEREINER, **1988** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil **108**: 23–31.
- CHEN, W. M., E. K. JAMES, T. COENYE, J. H. CHOU, E. BARRIOS, *et al.*, **2006** *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. from Taiwan and South America. Int J Syst Evol Microbiol **56**: 1847–1851.
- CHOI, B. K., B. J. PASTER, F. E. DEWHIRST, and U. B. GOBEL, **1994** Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. Infect Immun **62**: 1889–1895.
- COCOLIN, L., M. MANZANO, C. CANTONI, and G. COMI, **2001** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region To Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages. Appl Environ Microbiol **67**: 5113–5121.

- COELHO, M. R. R., I. E. MARRIEL, S. N. JENKINS, C. V. LANYON, L. SELDIN, *et al.*, **2009** Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology* **42**: 48–53.
- COJHO, E., V. M. REIS, A. C. SCHENBERG, und J. DÖBEREINER, **1993** Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 341–346.
- COLE, J. R., B. CHAI, T. L. MARSH, R. J. FARRIS, Q. WANG, *et al.*, **2003** The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl Acids Res* **31**: 442–443.
- COSTACURTA, A., und J. VANDERLEYDEN, **1995** Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **21**: 1–18.
- DA SILVA, M. F., P. J. DE OLIVEIRA, G. R. XAVIER, N. G. RUMJANEK, und V. M. REIS, **2009** Inoculantes formulados com polimeros e bacterias endofiticas para a cultura da cana-de-acucar. *Pesq agropec bras, Brasilia* **44**: 1437–1443.
- DAIMS, H., A. BRUHL, R. AMANN, K. H. SCHLEIFER, und M. WAGNER, **1999** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434–444.
- D'ANGELO PICARD, C., D. FAURE, I. PENOT, und Y. DESSAUX, **2005** Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and -degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environ Microbiol* **7**: 1796–1808.
- DAZZO, F. B., und Y. G. YANNI, **2006** The natural *Rhizobium*, cereal crop association as an example of plant-bacteria interaction. Uphoff N, Ball AS, Fernandes E, Herren H, Husson O, Laing M, Palm C, Pretty J, Sanchez P (eds) *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Taylor & Francis Group, CRC Press, London : 109–126.
- DÖBEREINER, J., **1995** Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil . *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* : 134–141.
- DÖBEREINER, J., und J. M. DAY, **1976** Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Newton WE, Nyman CJ (eds) *Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation*. Washington State University Press, Pullman, WA : 518–538.

- DÖBEREINER, J., und A. P. RUSCHEL, **1958** Uma nova especie de Beijerinckia. *Revista de Biologia* **1**: 261–272.
- DEMBA DIALLO, M., A. WILLEMS, N. VLOEMANS, S. COUSIN, T. T. VANDEKERCKHOVE, *et al.*, **2004** Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ Microbiol* **6**: 400–415.
- DEMIDOV, V., **2003** PNA and LNA throw light on DNA. *Trends Biotechnol* **21**: 4–7.
- DING, L., und A. YOKOTA, **2004** Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2223–2230.
- DING, Y., J. WANG, Y. LIU, und S. CHEN, **2005** Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 1271–1281.
- DOBBELAERE, S., A. CROONENBORGH, T. AMBER, D. PTACEK, J. VANDERLEYDEN, *et al.*, **2001** Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Austr J Plant Physiol* **28**: 871–879.
- DOBBELAERE, S., und Y. OKON, **2007** The plant growth-promoting effect and plant responses. Elmerich C, Newton WE (eds) *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht, The Netherlands : 145–170.
- DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER, und J. S. MATTICK, **1991** Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**: 4008.
- DONG, Z., M. J. CANNY, M. E. MCCULLY, M. R. ROBOREDO, C. F. CABADILLA, *et al.*, **1994** A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). *Plant Physiol* **105**: 1139–1147.
- DOS REIS JUNIOR, F., V. REIS, S. URQUIAGA, und J. DÖBEREINER, **2000** Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil* **219**: 153–159.

- DOS SANTOS, M. F., V. L. M. DE PADUA, E. D. NOGUEIRA, A. S. HEMERLY, and G. B. DOMONT, **2010** Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *Journal of Proteomics* **73**: 917–931.
- DUTTA, D., and R. GACHHUI, **2006** Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1899–1903.
- ECKERT, B., O. WEBER, G. KIRCHHOF, A. HALBRITTER, M. STOFFELS, *et al.*, **2001** *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C(4)-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 17–26.
- ECKERT, K. A., and T. A. KUNKEL, **1991** DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Research* **1**: 17–24.
- ELBELTAGY, A., K. NISHIOKA, T. SATO, H. SUZUKI, B. YE, *et al.*, **2001** Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5285–5293.
- ELLIOTT, G. N., W. M. CHEN, J. H. CHOU, H. C. WANG, S. Y. SHEU, *et al.*, **2007** *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol* **173**: 168–180.
- ELMERICH, C., and W. E. E. NEWTON, **2007** Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, preface. Springer, Dordrecht, The Netherlands : XIII.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., R. BUSTILLOS-CRISTALES, and J. CABALLERO-MELLADO, **2001** *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2790–2798.
- FARRELLY, V., F. RAINEY, and E. STACKEBRANDT, **1995** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2798–2801.
- FELSENSTEIN, J., **1981** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368–376.
- FELSKE, A., B. ENGELEN, U. NUBEL, and H. BACKHAUS, **1996** Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4162–4167.
- FINCKH, U., and A. ROLFS, **1995** PCR Optimization Strategies. PCR Application Manual Boehringer GmbH, Mannheim, Deutschland : 36.

- FITCH, W. M., **1966** An improved method of testing for evolutionary homology. *Journal of Molecular Biology* **16**: 9–16.
- FLORES, N., F. VALE, F. BOLIVAR, und E. MERINO, **1992** Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. *Biotechniques* **13**: 203–205.
- FUENTES-RAMIREZ, L., R. BUSTILLOS-CRISTALES, A. TAPIA-HERNANDEZ, T. JIMENEZ-SALGADO, E. WANG, *et al.*, **2001** Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1305–1314.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E., J. CABALLERO-MELLADO, J. SEPULVEDA, und E. MARTINEZ-ROMERO, **1999** Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology* **29**: 117–128.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E., T. JIMENEZ-SALGADO, I. R. ABARCA-OCAMPO, und J. CABALLERO-MELLADO, **1993** *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* **154**: 145–150.
- FUHRMANN, J. J., und B. L. VASILASA, **1993** Field response of the Glycine-bradyrhizobium symbiosis to modified early-nodule occupancy. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 1203–1209.
- GADKARI, D., G. MORSDORF, und O. MEYER, **1992** Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N<sub>2</sub>-fixing system. *J Bacteriol* **174**: 6840–6843.
- GAFAN, G. P., und D. A. SPRATT, **2005** Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE)–an attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 303–307.
- GALLOWAY, J. H., **1989** *The Sugar Cane Industry: An Historical Geography from its Origins to 1914*. Cambridge Univ Press, UK .
- GARBEVA, P., und W. DE BOER, **2009** Interspecific Interactions between Carbon-limited Soil Bacteria Affect Behavior and Gene Expression. *Microb Ecol* **58**: 36–46.
- GIACOMAZZI, S., F. LEROI, und J.-J. JOFFRAUD, **2005** Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 1230–1238.

- GILLETTE, W. K., und G. H. ELKAN, **1996** *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. Strain NC92 Contains Two *nodD* Genes Involved in the Repression of *nodA* and a *nolA* Gene Required for the Efficient Nodulation of Host Plants. *Journal of Bacteriology* **178**: 2757–2766.
- GILLIS, M., K. KERSTERS, B. HOSTE, D. JANSSENS, R. M. KROPPESTEDT, *et al.*, **1989** *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 361–364.
- GIOVANNONI, S. J., E. F. DELONG, G. J. OLSEN, und N. R. PACE, **1988** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* **170**: 720–6.
- GONZALEZ, J., und M. MORAN, **1997** Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4237–4242.
- GREEN, S. J., und D. MINZ, **2005** Suicide Polymerase Endonuclease Restriction, a Novel Technique for Enhancing PCR Amplification of Minor DNA Templates. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4721–4727.
- GRIFFITHS, R. I., A. S. WHITELEY, A. G. O'DONNELL, und M. J. BAILEY, **2000** Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5488–5491.
- GYANESHWAR, P., E. K. JAMES, P. M. REDDY, und J. K. LADHA, **2002** *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist* **154**: 131–145.
- HAJDUK, E., **1999** Changes in some enzyme activities and DNA content in frozen stored and freeze-dried bovine thymus. *Food Chemistry* **66**: 235–239.
- HALE, C. N., und J. P. WILKE, **1972** A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. *N Z J Agric Res* **15**: 448–456.
- HALLMANN, J., G. BERG, und B. SCHULZ, **2006** Isolation procedures for endophytic microorganisms. Schulz B, Boyle C, Sieber TN (eds) *Microbial Root Endophytes/Soil Biology*, Springer, Berlin, Heidelberg **9**: 299–319.
- HAMBRAEUS, G., C. VON WACHENFELDT, und L. HEDERSTEDT, **2003** Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* **269**: 706–714.

- HARRY, M., B. GAMBIER, Y. BOUREZGUI, und E. GARNIER-SILLAM, **1999** Evaluation of purification procedures for DNA extracted from rich organic samples: interference with humic substances. *Analisis* **27**: 439–441.
- HARTMANN, A., und J. I. BALDANI, **2006** The Genus *Azospirillum*. *Prokaryotes* **5**: 115–140.
- HARTMANN, A., R. PUKALL, M. ROTHBALLER, S. GANTNER, S. METZ, *et al.*, **2004** Microbial community analysis in the rhizosphere by *in situ* and *ex situ* application of molecular probing, biomarker and cultivation techniques. In: *Plant Surface Microbiology*. Varma, A und Abbott, L und Werner, D und Hampp, R (Eds) : 449–469.
- HARTMANN, A., und M. SCHMID, **2007** Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Technique for the Investigation of the structure and Function of Microbial Communities. *Microbes for Human Life*, Editor Chauhan, A. K., Kharkwal, H. and Ajit Varma, Uttar Pradesh, India **58**.
- HELLRIEGEL, H., **1886** Z. Ver. Rübenzuckerind. D. Reiches **36**: 863–877.
- HEUER, H., M. KRSEK, P. BAKER, K. SMALLA, und E. WELLINGTON, **1997** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3233–3241.
- HOGARDT, M., K. TREBESIUS, A. M. GEIGER, H. M., J. ROSENECKER, *et al.*, **2000** Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **38**: 818–825.
- HUBER, T., G. FAULKNER, und P. HUGENHOLTZ, **2004** Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317–2319.
- HUREK, T., M. VAN MONTAGU, E. KELLENBERGER, und B. REINHOLD-HUREK, **1995** Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp, BH72. *Molecular Microbiology* **18**: 225–236.
- INNIS, M. A., und D. H. GELFAND, **1994** Optimization of PCRs. *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, San Diego, London : 3–12.
- ISHII, K., und M. FUKUI, **2001** Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3753–3755.

- JACOBSON, M. R., K. E. BRIGLE, L. T. BENNETT, R. A. SETTERQUIST, M. S. WILSON, *et al.*, **1989** Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **171**: 1017–1027.
- JAGNOW, G., **1983** Nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) Activity in Roots of Non-Cultivated and Cereal Plants: Influence of Nitrogen Fertilizer on Populations and Activity of Nitrogen-Fixing Bacteria. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **146**: 217–227.
- JAMES, E. K., und F. L. OLIVARES, **1997** Infection and colonization of sugarcane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* **17**: 77–119.
- JAMES, E. K., F. L. OLIVARES, A. L. DE OLIVEIRA, J. DOS REIS, F. B., L. G. DA SILVA, *et al.*, **2001** Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* **52**: 747–760.
- JAMES, E. K., V. M. REIS, F. L. OLIVARES, J. I. BALDANI, und J. DOEBEREINER, **1994** Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* **45(275)**: 757–766.
- JARGEAT, P., C. COSSEAU, B. OLA'H, A. JAUNEAU, P. BONFANTE, *et al.*, **2004** Isolation, Free-Living Capacities, and Genome Structure of *Candidatus Glomeribacter gigasporarum*, the Endocellular Bacterium of the Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita*. *J Bacteriol* **186**: 6876–6884.
- JENSEN, M. A., und N. STRAUS, **1993** Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl* **3**: 186–v194.
- JIMENEZ-SALGADO, T., L. FUENTES-RAMIREZ, A. TAPIA-HERNANDEZ, M. MASCARUA-ESPARZA, E. MARTINEZ-ROMERO, *et al.*, **1997** *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3676–3683.
- JORDAN, D. C., **1982** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 136–139.
- KANDELER, E., K. DEIGLMAYR, D. TSCHERKO, D. BRU, und L. PHILIPPOT, **2006** Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5957–5962.

- KANE, M. D., L. K. POULSEN, und D. A. STAHL, **1993** Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **59**: 682–696.
- KASAHARA, Y., und T. HATTORI, **1991** Analysis of bacterial populations in a grassland soil according to rates of development on solid media. *FEMS Microbiology Letters* **86**: 95–102.
- KAUR, H., A. ARORA, J. WENGEL, und S. MAITI, **2006** Thermodynamic, Counterion, and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes. *Biochemistry* **45**: 7347–7355.
- KHAMMAS, K. M., E. AGERON, P. A. GRIMONT, und P. KAISER, **1989** *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol* **140**: 679–693.
- KIRCHHOF, G., B. ECKERT, M. STOFFELS, J. BALDANI, V. REIS, *et al.*, **2001** *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 157–168.
- KLAPPENBACH, J. A., J. M. DUNBAR, und T. M. SCHMIDT, **2000** rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1328–1333.
- KÄMPFER, P., K. THUMMES, H.-I. CHU, C.-C. TAN, A. B. ARUN, *et al.*, **2008** *Pseudacidovorax intermedius* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing betaproteobacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 491–495.
- KÜNDIG, C., C. BECK, H. HENNECKE, und M. GOTTFERT, **1995** A single rRNA gene region in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **177**: 5151–5154.
- KOLB, W., und P. MARTIN, **1988** Influence of nitrogen on the number of N<sub>2</sub>-fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **20**: 221–225.
- KOPCZYNSKI, E. D., M. M. BATESON, und D. M. WARD, **1994** Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **60**: 746–8.
- KOWALCHUK, G. A., Z. S. NAOUMENKO, P. J. DERIKX, A. FELSKE, J. R. STEPHEN, *et al.*, **1999** Molecular analysis of ammonia-oxidizing *Bacteria* of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. *Appl Environ Microbiol* **65**: 396–403.

- KOWALCHUK, G. A., J. R. STEPHEN, W. DE BOER, J. I. PROSSER, T. M. EMBLEY, *et al.*, **1997** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments . *Appl Environ Microbiol* **63**: 1489–1497.
- KWOK, S., S. Y. CHANG, J. J. SNINSKY, und A. WANG, **1994** A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods Appl* **3**: S39–547.
- LANE, D. J., **1991** *16S/23S rRNA sequencing*. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester.
- LAVRINENKO, K., E. CHERNOUSOVA, E. GRIDNEVA, G. DUBININA, V. AKIMOV, *et al.*, **2010** *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol* .
- LEFF, L. G., J. R. DANA, J. V. MCARTHUR, und L. J. SHIMKETS, **1995** Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Env Microb* **61**: 1141–1143.
- LEXIKON, D. B. I. F. B., **2004** Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 1 Auflage, Elsevier GmbH München .
- LIESACK, W., P. H. JANSSEN, F. RAINEY, N. L. WARD-RAINEY, und E. STACKEBRANDT, **1997** Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *Modern soil microbiology*, New York: Marcel Dekker Inc : 375–439.
- LIESACK, W., H. WEYLAND, und E. STACKEBRANDT, **1991** Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb Ecol* **21**: 191–198.
- LOGANATHAN, P., und S. NAIR, **2004** *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1185–1190.
- LOGANATHAN, P., R. SUNITA, A. K. PARIDA, und S. NAIR, **1999** Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *Journal of Applied Microbiology* **87**: 167–172.
- LUDWIG, W., O. STRUNK, R. WESTRAM, L. RICHTER, H. MEIER, *et al.*, **2004** ARB: a software environment for sequence data. *Nucl Acids Res* **32**: 1363–1371.

MACHADO, G. R., W. DA SILVA, und J. E. IRVINE, **1987** Sugar cane breeding in Brazil: the Copersucar Program. Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop, Cooperativa de Produtores de Cana, Acucar e Alcool do Estado de Sao Paulo Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil : 215–232.

MAGALHAES, F. M., J. I. BALDANI, S. SOUTO, J. R. KUYKENDALL, und J. DÖBEREINER, **1983** A new acidtolerant *Azospirillum* species. An Acad Bras Cienc **55**: 417–430.

MAGALHAES CRUZ, L., E. M. DE SOUZA, O. B. WEBER, J. I. BALDANI, J. DOBEREINER, *et al.*, **2001** 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Appl Environ Microbiol **67**: 2375–2379.

MAIDAK, B. L., G. J. OLSEN, N. LARSEN, R. OVERBEEK, M. J. MCCAUGHEY, *et al.*, **1997** The RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Research **25**: 109–110.

MANZ, W., R. AMANN, W. LUDWIG, M. WAGNER, und K.-H. SCHLEIFER, **1992** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *proteobacteria* : problems and solutions. Systematic and Applied Microbiology **15**: 593–600.

MARMUR, J., **1961** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology **3**: 208–218.

MARTENS, T., **2001** Diversität und Aktivität von heterotrophem Bakterioplankton im Wattenmeer während eines Tidenzyklus. Diplomarbeit Carl-von-Ossietzky-Universität .

MARTIN, F. H., M. M. CASTRO, F. ABOUL-ELA, und J. TINOCO, I., **1985** Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. Nucleic Acids Res **13**: 8927–8938.

MARTINEZ-AGUILAR, L., R. DIAZ, J. J. PENA-CABRIALES, P. ESTRADA-DE LOS SANTOS, M. F. DUNN, *et al.*, **2008** Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. Appl Environ Microbiol **74**: 4574–4579.

MEYERHANS, A., J.-P. VARTANIAN, und S. WAIN-HOBSON, **1990** DNA recombination during PCR. Nucl Acids Res **18**: 1687–1691.

MILLER, D. N., **2001** Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. Journal of Microbiological Methods **44**: 49–58.

- MOLOUBA, F., J. LORQUIN, A. WILLEMS, B. HOSTE, E. GIRAUD, *et al.*, **1999** Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. Are Specific to Stem-Nodulated Species and Form a Separate 16S Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Group. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3084–3094.
- MOULIN, L., A. MUNIVE, B. DREYFUS, und C. BOIVIN-MASSON, **2001** Nodulation of legumes by members of the [beta]-subclass of *Proteobacteria*. *Nature* **411**: 948–950.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. T. HORN, *et al.*, **1986** Specific Enzymatic Amplification of DNA *In vitro* - the Polymerase Chain-Reaction. Cold Spring Harbor **51**: 263–273.
- MUNOZ-ROJAS, J., L. E. FUENTES-RAMIREZ, und J. CABALLERO-MELLADO, **2005** Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *Microb Ecol* **54**: 57–66.
- MURRAY, A. E., J. T. HOLLIBAUGH, und C. ORREGO, **1996** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2676–2680.
- MUTHUKUMARASAMY, R., I. CLEENWERCK, G. REVATHI, M. VADIVELU, D. JANSSENS, *et al.*, **2005** Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 277–286.
- MUTHUKUMARASAMY, R., M. GOVINDARAJAN, M. VADIVELU, und G. REVATHI, **2006** N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research* **161**: 238–245.
- MUTHUKUMARASAMY, R., G. REVATHI, und P. LOGANATHAN, **2002a** Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant and Soil* **243**: 91–102.
- MUTHUKUMARASAMY, R., G. REVATHI, S. SESHADRI, und C. LAKSHMINARSIMHAN, **2002b** *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science* **83**: 137–145.
- MUYZER, G., E. C. DE WAAL, und A. G. UITTERLINDEN, **1993** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695–700.

- MUYZER, G., H. S., T. A., and W. C., **1996** Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16 S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular FEMS Microbiol Ecol Manual* **3.4.4.**: 1–23.
- MUYZER, G., und K. SMALLA, **1998** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127–141.
- MYERS, R. M., V. C. SHEFFIELD, und D. R. COX, **1989** Mutation detection by PCR, GC-clamps, and denaturing gradient gel electrophoresis. *PCR-Technology-Principles and Applications for DNA amplification*, H. A. Erlich (ed.), Stockton Press, New York : 71.
- NÜBEL, U., B. ENGELN, A. FELSKE, J. SNAIDR, A. WIESHUBER, *et al.*, **1996** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**: 5636–5643.
- NEEF, A., **1997** Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. PhD Thesis Technische Universität München, Munich, Germany .
- NOAR, J. D., und D. H. BUCKLEY, **2009** *Ideonella azotifigens* sp. nov., an aerobic diazotroph of the *Betaproteobacteria* isolated from grass rhizosphere soil, and emended description of the genus *Ideonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1941–1946.
- NOBBE, F., und L. HILTNER, **1893** *Landw Versuchsstat* **42**: 459–478.
- NOLLAU, P., und C. WAGENER, **1997** Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* **43**: 1114–1128.
- OKON, Y., **1994** *Azospirillum*-plant associations. *Azospirillum*-plant associations, CRC Press, Boca-Raton, Florida .
- OKON, Y., und C. LABANDERA-GONZALEZ, **1994** Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years world-wide field inoculation. *Soil Biol Biochem* **26**: 1591–1601.
- OLIVARES, F. L., J. I. BALDANI, V. M. REIS, J. I. BALDANI, und J. DOEBEREINER, **1996** Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. *Biol Fertil Soils* **21**: 197–200.
- OLIVARES, F. L., E. K. JAMES, J. I. BALDANI, und J. DÖBEREINER, **1997** Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol* **135**: 723–737.

- OLIVARES, F. L., E. K. JAMES, V. M. REIS, I. J. BALDANI, und J. DÖBEREINER, **1993** Colonizacao do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-acucar. *Fitopatol Bras* **18**: 313.
- OLIVEIRA, A. L. M., M. STOFFELS, M. SCHMID, V. M. REIS, J. I. BALDANI, *et al.*, **2009** Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* **45**: 106–113.
- OLIVEIRA, A. L. M., S. URQUIAGA, J. DÖBEREINER, und J. I. BALDANI, **2002** The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil* **242**: 205–215.
- OLIVEIRA, A. L. M. D., E. D. L. CANUTO, V. M. REIS, und J. I. BALDANI, **2003** Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* **34**: 59–61.
- PALLANSCH, L., H. BESWICK, J. TALIAN, und P. ZELENKA, **1990** Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **185**: 57–62.
- PAULA, M. A., V. M. REIS, und J. DÖBEREINER, **1991** Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol Fert Soils* **11**: 111–115.
- PEDRAZA, R. O., **2008** Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **125**: 25–35.
- PERIN, L., L. MARTINEZ-AGUILAR, R. CASTRO-GONZALEZ, P. ESTRADA-DE LOS SANTOS, T. CABELLOS-AVELAR, *et al.*, **2006** Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3103–3110.
- PERNTHALER, A., J. PERNTHALER, und R. AMANN, **2002** Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3094–3101.
- PETERS, D. G., A. B. KASSAM, H. YONAS, E. H. O'HARE, R. E. FERRELL, *et al.*, **1999** Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-lite. *Nucleic Acids Res* **27**: e39.

- PINON, D., M. CASAS, M. BLANCH, B. FONTANIELLA, Y. BLANCO, *et al.*, **2002** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology* **153**: 345–351.
- POLY, F., L. J. MONROZIER, and R. BALLY, **2001** Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* **152**: 95–103.
- POLZ, M. F., and C. M. CAVANAUGH, **1998** Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3724–3730.
- POUSSIER, S., J. J. CHERON, A. COUTEAU, and J. LUISETTI, **2002** Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *J Microbiol Methods* **51**: 349–359.
- PRAZMOWSKI, A., **1891** *Landw Versuchsstat* **38**: 5–62.
- PRUESSE, E., C. QUAST, K. KNITTEL, B. M. FUCHS, W. LUDWIG, *et al.*, **2007** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucl Acids Res* **35**: 7188–7196.
- RAINEY, F. A., N. L. WARD-RAINEY, P. H. JANSSEN, H. HIPPE, and E. STACKEBRANDT, **1996** *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* **142** ( Pt 8): 2087–2095.
- RAMETTE, A., J. J. LIPUMA, and J. M. TIEDJE, **2005** Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1193–1201.
- REINHARDT, J. A., D. A. BALTRUS, M. T. NISHIMURA, W. R. JECK, C. D. JONES, *et al.*, **2009** De novo assembly using low-coverage short read sequence data from the rice pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*. *Genome Res* **19**: 294–305.
- REINHOLD, B., T. HUREK, I. FENDRIK, B. POT, M. GILLIS, *et al.*, **1987** *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int J Syst Bacteriol* **37**: 43–51.
- REIS, V., S. LEE, and C. KENNEDY, **2007** Biological nitrogen fixation in sugarcane. Elmerich C, Newton WE (eds) *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht, The Netherlands : 213–232.
- REIS, V. M., P. ESTRADA-DE LOS SANTOS, S. TENORIO-SALGADO, J. VOGEL, M. STOFFELS, *et al.*, **2004** *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2155–2162.

- REIS, V. M., F. L. OLIVARES, and J. DOEBEREINER, **1994** Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *In* *Nodd Journal of Microbiology & Biotechnology* **10**: 401–405.
- REIS, V. M., S. URQUIAGAI, W. PEREIRA, G. HIPOLITO, J. C. DE BARROS, *et al.*, **2008** Reposta de duas variedades de cana-de-acucar a inoculacao com bacterias diazotroficas. *Anais do 9o Congresso Nacional da STAB Maceia: Universidade Federal de Alagoas* **1**: 681–686.
- REYSENBACH, A. L., L. J. GIVER, G. S. WICKHAM, and N. R. PACE, **1992** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3417–3418.
- RIEDEL, G. E., F. M. AUSUBEL, and F. C. CANNON, **1979** Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 2866–2870.
- RIGGS, P. J., M. K. CHELIUS, A. INIGUEZ, S. M. KAEPLER, and E. W. TRIPLETT, **2001** Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Austr J Plant Physiol* **28**: 829–836.
- RIVAS, R., A. WILLEMS, J. L. PALOMO, P. GARCIA-BENAVIDES, P. F. MATEOS, *et al.*, **2004** *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumourlike deformations. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1271–1275.
- ROESCH, L. F. W., G. CASELLA, O. SIMELL, J. KRISCHER, C. H. WASSERFALL, *et al.*, **2009** Influence of fecal sample storage on bacterial community diversity. *Open Microbiol J* **3**: 40–46.
- ROESCH, L. F. W., F. L. OLIVARES, L. M. P. PASSAGLIA, P. A. SELBACH, E. L. S. D. SA, *et al.*, **2006** Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**: 967–974.
- ROSADO, A. S., F. S. AZEVEDO, D. W. CRUZ, J. D. VAN ELSAS, and L. SELDIN, **1998** Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. *J Appl Microbiol* **84**: 216–226.
- ROSENBLUETH, M., and E. MARTINEZ-ROMERO, **2006** Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 827–837.

- ROTHBALLER, M., **2003** In situ Lokalisierung, PGPR-Effekt und Regulation des *ipdC*-Gens der *Azospirillum brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 bei verschiedenen Weizensorten, sowie endophytische Kolonisierung durch *Herbaspirillum* sp. N3. Dissertation .
- ROTHBALLER, M., B. ECKERT, M. SCHMID, A. FEKETE, M. SCHLOTTER, *et al.*, **2008** Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. FEMS Microbiol Ecol **66**: 85–95.
- ROTHBALLER, M., M. SCHMID, und A. HARTMANN, **2003** *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. Symbiosis **34**: 261–279.
- ROTHBALLER, M., M. SCHMID, I. KLEIN, A. GATTINGER, S. GRUNDMANN, *et al.*, **2006** *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. Int J Syst Evol Microbiol **56**: 1341–1348.
- RÖSCH, C., A. MERGEL, und H. BOTHE, **2002** Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. Appl Environ Microbiol **68**: 3818–3829.
- RYCHLIK, W., W. J. SPENCER, und R. E. RHOADS, **1990** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acids Res **18**: 6409–6412.
- SAIKI, R. K., D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, *et al.*, **1988** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487–491.
- SAITOU, N., und M. NEI, **1987** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **4**: 406–425.
- SAMBROOK, J., und E. FRITSCH, **1989** *Molecular cloning: A laboratory manual*.. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2 edition.
- SANCHEZ, O., J. M. GASOL, R. MASSANA, J. MAS, und C. PEDROS-ALIO, **2007** Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. Appl Environ Microbiol **73**: 5962–5967.
- SANGER, F., S. NICKLEN, und A. R. COULSON, **1977** DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**: 5463–5467.

- SCHENK, A., H. WEINGART, und M. S. ULLRICH, **2008** Extraction of high-quality bacterial RNA from infected leaf tissue for bacterial *in planta* gene expression analysis by multiplexed fluorescent Northern hybridization. *Mol Plant Pathol* **9**: 227–235.
- SCHLOTER, M., und A. HARTMANN, **1996** Production and Characterization of Strain-Specific Monoclonal Antibodies against Outer Membrane Components of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Hybridoma* **15**: 225–232.
- SCHLOTER, M., und A. HARTMANN, **1998** Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studies with strainspecific monoclonal antibodies. *Symbiosis* **25**: 159–179.
- SCHLOTER, M., W. WIEHE, B. ASSMUS, H. STEINDL, H. BECKE, *et al.*, **1997** Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2038–2046.
- SCHLÜTER, A., T. BEKEL, N. N. DIAZ, M. DONDRUP, R. EICHENLAUB, *et al.*, **2008** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* **136**: 77–90.
- SCHMID, M., J. I. BALDANI, und A. HARTMANN, **2006** The Genus *Herbaspirillum*. *Prokaryotes* **5**: 141–150.
- SCHMID, M., M. ROTHBALLER, B. ASSMUS, P. HUTZLER, M. SCHLOTER, *et al.*, **2004** Detection of microbes by confocal laser scanning microscopy. Kowalchuk GA, de Bruijn FH, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD (eds) *Molecular FEMS Microbiol Ecol Manual II*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands **2**: 875–910.
- SCHUHEGGER, R., A. IHRING, S. GANTNER, G. BAHNWEG, C. KNAPPE, *et al.*, **2006** Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* **29**: 909–918.
- SEVILLA, M., R. H. BURRIS, N. GUNAPALA, und C. KENNEDY, **2001** Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *Nif*- mutants strains. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 358–366.
- SLY, L. I., und E. STACKEBRANDT, **1999** Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 541–544.

- SOMMER, R., und D. TAUTZ, **1989** Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Res* **17**: 6749.
- SOUTO, S. M., und J. DÖBEREINER, **1967** Fixacao de nitrogenio atmosferico por *Beijerinckia* na rizosfera do capim elefante *Pennisetum purpureum* elefante de pinda. Congresso Brasileiro de Ciancia do Solo, 11, Brasilia, DF, Brasil : 32–34.
- STEENHOUDT, O., und J. VANDERLEYDEN, **2000** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 487–506.
- STEWART, W. D., G. P. FITZGERALD, und R. H. BURRIS, **1967** *In situ* studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**: 2071–2078.
- STOFFELS, M., T. CASTELLANOS, und A. HARTMANN, **2001** Design and Application of New 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-Cluster. *Systematic and Applied Microbiology* **24**: 83–97.
- STONE, J., C. BACON, und J. WHITE, J.F., **2000** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial Endophytes*, C. W Bacon, and J F White (eds) Marcel Dekker, New York : 3–30.
- SUZUKI, M., und S. GIOVANNONI, **1996** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625–630.
- TALBI, C., M. J. DELGADO, L. GIRARD, A. RAMIREZ-TRUJILLO, J. CABALLERO-MELLADO, *et al.*, **2010** *Burkholderia phymatum* Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soils. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4587–4591.
- TAN, Z., T. HUREK, P. VINUESA, P. MÜLLER, J. K. LADHA, *et al.*, **2001** Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3655–3664.
- TAPIA-HERNANDEZ, A., M. R. BUSTILLOS-CRISTALES, T. JIMENEZ-SALGADO, J. CABALLERO-MELLADO, und L. E. FUENTES-RAMIREZ, **2000** Natural Endophytic Occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple Plants. *Microb Ecol* **39**: 49–55.

- TARRAND, J. J., N. R. KRIEG, and J. DOBEREINER, **1978** A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* **24**: 967–980.
- TEBBE, C. C., and W. VAHJEN, **1993** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2657–2665.
- TESKE, A., P. SIGALEVICH, Y. COHEN, and G. MUYZER, **1996** Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4210–4215.
- TINDALL, K. R., and T. A. KUNKEL, **1988** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008–6013.
- TOMBOLINI, R., D. J. VAN DER GAAG, B. GERHARDSON, and J. K. JANSSON, **1999** Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3674–3680.
- TOPPING, J. R., H. SCHNERR, J. HAINES, M. SCOTT, M. J. CARTER, *et al.*, **2009** Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *J Virol Methods* **156**: 89–95.
- UEDA, T., Y. SUGA, N. YAHIRO, and T. MATSUGUCHI, **1995** Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol* **177**: 1414–1417.
- URQUIAGA, S., K. H. CRUZ, and R. M. BODDEY, **1992** Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. *Soil Sci Soc Am J* **56**: 105–114.
- VALLAEYS, T., E. TOPP, G. MUYZER, V. MACHERET, G. LAGUERRE, *et al.*, **1997** Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in *rhizobia* and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 279–285.

- VALVERDE, A., E. VELAZQUEZ, C. GUTIERREZ, E. CERVANTES, A. VENTOSA, *et al.*, **2003** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1979–1983.
- VANDAMME, P., J. GORIS, W.-M. CHEN, P. DE VOS, und A. WILLEMS, **2002** *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 507–512.
- VINAGRE, F., C. VARGAS, K. SCHWARCZ, J. CAVALCANTE, E. M. NOGUEIRA, *et al.*, **2006** *SHR5*: a novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* **57**: 559–569.
- VITOUSEK, P. M., J. D. ABER, R. W. HOWARTH, G. E. LIKENS, P. A. MATSON, *et al.*, **1997** Human Alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* **7**: 737–750.
- VON DER WEID, I., G. F. DUARTE, J. D. VAN ELSAS, und L. SELDIN, **2002** *Pae-nibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int J Syst Evolut Microbiol* **52**: 2147–2153.
- WAGNER, M., M. HORN, und H. DAIMS, **2003** Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **6**: 302–309.
- WAGNER, M., M. SCHMID, S. JURETSCHKO, K.-H. TREBESIUS, A. BUBERT, *et al.*, **1998** *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 159–168.
- WALLNER, G., R. AMANN, und W. BEISKER, **1993** Optimizing fluorescent *in situ* hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136–143.
- WANG, G. C., und Y. WANG, **1996** The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* **142** ( Pt 5): 1107–1114.
- WANG, Q., G. M. GARRITY, J. M. TIEDJE, und J. R. COLE, **2007** Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5261–5267.
- WATKINS, NORMAN E., J., und J. SANTALUCIA, JOHN, **2005** Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes. *Nucl Acids Res* **33**: 6258–6267.

- WEBER, O. B., V. L. BALDANI, K. TEIXEIRA, G. KIRCHHOF, J. I. BALDANI, *et al.*, **1999** Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* **210**: 103–113.
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNS, D. A. PELLETIER, und D. J. LANE, **1991** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697–703.
- WELLER, D. M., **1988** Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 379–407.
- WIDMER, F., B. T. SHAFFER, L. A. PORTEOUS, und R. J. SEIDLER, **1999** Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol* **65**: 374–380.
- WILFINGER, W. W., K. MACKEY, und P. CHOMCZYNSKI, **1997** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**: 474–481.
- WINOGRADSKY, S., **1893** *Comp rend Acad Sci* **116**: 1385–1388.
- WINTZINGERODE, F. V., U. B. GÖBEL, und E. STACKEBRANDT, **1997** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213–229.
- WOESE, C. R., **1987** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221–271.
- WOYKE, T., G. XIE, A. COPELAND, J. M. GONZALEZ, C. HAN, *et al.*, **2009** Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One* **4**: e5299.
- XIE, C.-H., und A. YOKOTA, **2005** Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2419–2425.
- YAMADA, Y., K. HOSHINO, und T. ISHIKAWA, **1997** The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 1244–1251.
- YANNI, Y. G., R. Y. RIZK, V. CORICH, A. SQUARTINI, K. NINKE, *et al.*, **1997** Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of potential to promote rice growth. *Plant Soil* **194**: 99–114.
- YOSHIDA, K., P. KAOTHEN, T. MATSUI, und A. KAWAOKA, **2003** Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 665–670.

YUKPHAN, P., W. POTACHAROEN, S. TANASUPAWAT, M. TANTICHAROEN, und Y. YAMADA, **2004** *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Int J Syst Evol Microbiol **54**: 313–316.

ZEHR, J. P., und L. A. MCREYNOLDS, **1989** Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Appl Environ Microbiol **55**: 2522–2526.

ZHANG, S.-D., und T. W. GANT, **2005** Effect of pooling samples on the efficiency of comparative studies using microarrays. Bioinformatics **21**: 4378–4383.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Prof. Dr. Anton Hartmann, für die Bereitstellung des überaus spannenden Themas dieser Doktorarbeit, sowie für die interessanten Gespräche, die Unterstützung bei Problemen und das freundliche Arbeitsklima in der Gruppe.

Prof. Dr. Dirk Schüler für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit und allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung des DFG-Projekts.

Dr. Michael Schmid für die Hilfe und Unterstützung bei der Arbeit und für die schönen und lustigen Abende.

Prof. Dr. Ivo Baldani, Dr. Veronica Massena Reis, Jean L. Simões-Araújo, Luc Rouws, William, Livia und allen anderen der Arbeitsgruppen des EMBRAPA in Seropédica (RJ, Brasilien) für die überaus freundliche Zusammenarbeit. Besonderen Dank an Prof. Dr. Robert „Bob“ Boddey für die überaus lustigen, offenen und interessanten Abende und die unkomplizierte Rettung bei „kleinen“ Problemen.

Dr. Michael Rothballer für die hilfreichen Diskussionen, Ratschläge und die Tomaten.

Angelika Schulz, für ihre liebevolle, ausdauernde Hilfe bei vielen Dingen im Labor, sowie ihre ansteckende gute Laune.

Barbara Pfitzner für ihre wieder und wieder verlängerte Hilfe im Labor ebenso wie im Büro. In diesem Sinne lieben Dank an sie, Linda Kinzel und Andreas Hofmann für die tolle Arbeitsatmosphäre und für den großen Spaß im kleinen Büro. Dank an Tina Riedel, Angelika Krug und Elisabeth Altmaier für die schöne Zeit.

Der Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen und dem IBOE für die nette Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt gilt mein tiefer Dank meinem Freund Andi, meiner Familie und meinen Freunden. Danke für Eure Geduld und die unschätzbare Unterstützung.

## 10 Lebenslauf

- Juli 2006 – Dez. 2009      Promotion an der Ludwig Maximilians Universität München  
und am Helmholtz Zentrum München  
Abteilung Mikrogen-Pflanzen-Interaktionen  
Thema: Molekulare Analyse diazotropher Bakterien  
in Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*)
- Juni 2003 – Juni 2006      Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
AG Biologie geologischer Prozesse  
Thema: Untersuchungen zur Funktion und Diversität  
mariner Myxobakterien
- Juni 2006                      Diplom (Note 1)
- Fächer im Hauptstudium*  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Ökologie und Botanik
- Okt. 2000 – Juni 2003      Grundstudium der Biologie auf Diplom  
an der Universität Regensburg
- Schulbildung 1991 – 2000    Gymnasium Albert Schweitzer Limbach-Oberfrohna  
(Leistungskurse Biologie und Deutsch)
- Juni 2000                      Abitur (Durchschnittsnote 1,7)