

***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**

Michael Heinz Rothballer

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institut für Bodenökologie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie an der
Ludwig-Maximilian-Universität München

Eingereicht am: **10. November 2003**

Tag der mündlichen Prüfung: **2. Februar 2004**

1. Gutachter: **Prof. Dr. Anton Hartmann**

2. Gutachter: **Prof. Dr. Jörg Overmann**

Für echte Freunde und wahre Liebe

PUBLIKATIONSLISTE

Rothballer, M., Schmid, M., and Hartmann, A. 2003. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis*, im Druck

Hartmann, A., Pukall, R., Rothballer, M., Gantner, S., Metz, S., Schloter, M., and Mogge, B. 2003. 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., Abbott, L., Werner, D., and Hampp, R. eds., Springer Verlag, eingereicht

Schmid, M., Rothballer, M., Aßmus, B., Hutzler, P., Schloter, M., and Hartmann, A. 2003. Detection of microbes by confocal laser scanning microscopy. In: *Molecular Microbial Ecology Manual II*, Kluwer Academic Publishers, eingereicht

Rothballer, M., Klein, I., Schmid, M., and Hartmann, A. Specific detection of new endophytic *Herbaspirillum* isolates in wheat roots by fluorescently labeled oligonucleotide probes and a *gfpmut3* marker gene. In Vorbereitung

Rothballer, M., Schmid, M., and Hartmann, A. Comparative *in situ* analysis of *ipdC-gfpmut3* promoter fusions of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245. In Vorbereitung

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	8
A.1. Aufbau der Wurzel.....	8
A.2. Pflanzen-Mikroorganismen Interaktion in der Rhizosphäre	10
A.2.1. Definition des Begriffs „Rhizosphäre“	10
A.2.2. Der Rhizosphäreneffekt.....	11
A.2.3. Bedeutung der bakteriellen Besiedlung für die Pflanze	12
A.3. Diazotrophe Endophyten als PGPRs an Weizenwurzeln	13
A.3.1. Die Gattung <i>Azospirillum</i>	13
A.3.1.1. <i>Azospirillum brasilense</i> – Stimulation des Pflanzenwachstums durch Phytohormone	14
A.3.1.2. PGPR-Effekt durch Produktion von IES.....	15
A.3.2. Die Gattung <i>Herbaspirillum</i>	17
A.4. Ziele dieser Arbeit.....	18
B. MATERIAL UND METHODEN	20
B.1. Kultivierung von Mikroorganismen.....	20
B.1.1. Bakterienstämme und Plasmide	20
B.1.2. Nährmedien	22
B.1.3. Hemmstoffe und Medienzusätze	24
B.1.4. Anzucht und Stammhaltung	24
B.2. Kultivierung von Weizenpflanzen	25
B.2.1. Verwendete Weizensorten.....	25
B.2.2. Weizen im monoxenisches System	26
B.2.2.1. Beschreibung des monoxenischen Systems	26
B.2.2.2. Samensterilisierung.....	26
B.2.3. Weizen im Bodensystem	27
B.3. Quantifizierung und Lokalisierung von Bakterien auf Wurzeln	28
B.3.1. Inokulation der Weizenkeimlinge	28
B.3.2. Wurzelerte und Bestimmung des Wurzelgewichts.....	28
B.3.3. Oberflächensterilisierung mit Chloramin T.....	29
B.3.4. Keimzahlbestimmung des inokulierten Wurzelmaterials	29
B.3.4.1. Plattenkoloniezählung	30
B.3.4.2. Most-Probable-Number(MPN)-Methode.....	30
B.3.4.3. Quantitativer Chemolumineszenz-ELISA.....	32
B.3.4.4. Zählung fluoreszenzmarkierter Zellen am Mikroskop	32
B.3.4.5. Bestimmung der Signifikanz anhand von U-Tests	33
B.3.5. Vorbereitung der Wurzeln zur mikroskopischen Detektion von Bakterien.....	34
B.3.5.1. Präparation von Wurzelschnitten	34
B.3.5.2. Wurzeln mit GFP-markierten Bakterien	35
B.4. Mikroskopische Methoden.....	35
B.4.1. Epifluoreszenzmikroskopie	35
B.4.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	36
B.4.2.1. Prinzip und Einsatzmöglichkeiten.....	36
B.4.2.2. Kenndaten des verwendeten CLSM.....	37
B.4.2.3. Einstellungen bei der Bildaufnahme	37
B.5. Molekulargenetische Methoden	38
B.5.1. Fluoreszierende <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
B.5.1.1. Konstruktion von rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden.....	39
B.5.1.2. Verwendete Oligonukleotidsonden	39
B.5.1.3. Einstellen der Konzentration von Oligonukleotidsonden.....	40
B.5.1.4. Zellfixierung mit Paraformaldehyd.....	40
B.5.1.5. Hybridisierung mit rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden	41
B.5.2. Isolierung von DNS.....	44
B.5.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS	44
B.5.2.2. Isolierungen chromosomaler DNS	44
B.5.3. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten	44
B.5.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS in wässriger Lösung	45
B.5.5. Enzymatische Modifikation von DNS.....	45
B.5.5.1. Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen.....	45
B.5.5.2. Dephosphorylierung linearer DNS-Moleküle	46

B.5.5.3. Ligation von DNS-Molekülen.....	46
B.5.6. Elektrophoretische Trennung von DNS-Fragmenten und Gelelution	46
B.5.6.1. Agarosegelelektrophorese	47
B.5.6.2. Anfärben und Dokumentation von Agarosegelen	47
B.5.6.3. Längenbestimmung von DNS-Fragmenten.....	48
B.5.6.4. Präparative DNS-Gelelektrophorese	48
B.5.7. Amplifikation von spezifischen DNS-Fragmenten durch PCR.....	48
B.5.7.1. PCR-Primer.....	48
B.5.7.2. DNS-Polymerasen.....	49
B.5.7.3. Standard-PCR.....	49
B.5.7.4. Kolonie-PCR.....	50
B.5.7.5. Aufreinigung von PCR-Produkten	51
B.5.7.6. Klonierung von PCR-Amplifikaten	51
B.5.8. DNS-Sequenzanalyse	51
B.5.8.1. Durchführung der Sequenzierungen.....	51
B.5.8.2. Auswertung von Sequenzdaten	52
B.5.9. DNS-DNS-Hybridisierung	52
B.5.10. DNS-Transfer in Gram-negative Bakterien.....	53
B.5.10.1. Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen nach Hanahan (1983, modif.).....	53
B.5.10.2. <i>E. coli</i> Elektroporation nach Dower et al. (1988).....	53
B.5.10.3. DNS-Transfer bei <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	54
B.5.10.4. DNS-Transfer durch Konjugation nach Kristensen <i>et al.</i> (1995, modifiziert)	54
B.5.10.5. DNS-Transfer durch Konjugation nach Vanstockem <i>et al.</i> (1988, modifiziert)	56
B.5.11. GFP-Markierung von Bakterienzellen	56
B.5.11.1. Allgemeine Vorgehensweise bei der Plasmidkonstruktion	56
B.5.11.2. Knock-out-Mutagenese durch „gene replacement“ Vektoren.....	57
B.5.11.3. Chromosomales „Tagging“ mittels mini-Tn5-Transposons.....	58
B.5.11.4. Markierung durch ein stabiles Plasmid mit konstitutiv exprimiertem <i>gfp</i> -Gen.....	59
B.5.11.5. Konstruktion von translationalen Promotorfusionen auf Plasmidebene	59
B.5.12. GFP-Expressionsanalysen in <i>A. brasilense</i>	59
B.6. Immunologische und zellbiologische Methoden.....	60
B.6.1. Monoklonale Antikörper	60
B.6.1.1. Auftauen von eingefrorenen Hybridoma-Zellkulturen.....	61
B.6.1.2. Gewinnung von Peritonealzellen	61
B.6.1.3. Kultivierung von Hybridomazellen.....	61
B.6.1.4. Gewinnung und Lagerung der monoklonalen Antikörper.....	62
B.6.1.5. Stammhaltung von Hybridoma-Zelllinien.....	62
B.6.2. Polyklonale Antikörper	63
B.6.2.1. Herstellung polyklonaler Antiseren	63
B.6.2.2. Protein A Aufreinigung.....	64
B.6.2.3. Affinitätsreinigung durch Inkubation mit Bakterien	65
B.6.2.4. Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration	66
B.6.2.5. Bestimmung von Detektionslimit und Kreuzreaktionen	66
B.6.3. Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA).....	66
B.6.3.1. ELISA mit ABTS.....	67
B.6.3.2. Chemolumineszenz-ELISA.....	68
B.6.3.3. Immunologische Fluoreszenzmarkierung	68
C. ERGEBNISSE.....	69
C.1. Stammspezifische Detektion von <i>A. brasilense</i> mit Antikörpern.....	69
C.1.1. Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen <i>A. brasilense</i> Sp245	69
C.1.2. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen <i>A. brasilense</i> Sp7	69
C.1.3. Einsatz der Antikörper an Reinkulturen und <i>in situ</i>	71
C.1.4. Einsatz im quantitativen ELISA.....	72
C.2. Quantifizierung von <i>A. brasilense</i> auf Weizenwurzeln.....	74
C.2.1. Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Oberflächensterilisierung der Weizenwurzeln.....	74
C.2.2. Wurzelbesiedlung im monoxenischen System	74
C.2.3. Wurzelbesiedlung im Bodensystem	77
C.3. PGPR-Effekt von <i>A. brasilense</i>	78
C.4. Lokalisierung der <i>A. brasilense</i> Stämme an der Wurzel	80
C.4.1. Detektion durch Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	80
C.4.2. Detektion von konstitutiv GFP-markierten <i>A. brasilense</i> Zellen	83

C.4.2.1. Fluoreszenzmarkierung durch <i>gfp</i> - und <i>rfp</i> -Reportergene	83
C.4.2.2. Einsatz der GFP-markierten <i>A. brasilense</i> Stämme als Inokulum	84
C.5. Herstellung von <i>gfp</i> -Reporterkonstrukten zur Expressionsanalyse des <i>ipdC</i> -Gens in <i>A. brasilense</i>	87
C.5.1. Konstruktion einer Knock-out-Mutation im <i>ipdC</i> -Gen	87
C.5.1.1. Amplifikation zweier <i>ipdC</i> -Fragmente mittels PCR	87
C.5.1.2. Konstruktion einer inaktivierten <i>ipdC</i> -Kassette	87
C.5.1.3. Konjugativer Transfer von pMR4 und Analyse der erzeugten Mutanten	88
C.5.2. Konstruktion und Analyse einer translationalen Fusion der <i>ipdC</i> -Promotorregion mit <i>gfp</i> auf Plasmidebene.....	91
C.5.2.1. Amplifikation der <i>ipdC</i> -Promotorregion durch PCR und Sequenzanalyse	91
C.5.2.2. Konstruktion von translationalen <i>ipdC</i> -Promotorfusionen.....	93
C.5.2.3. Expressionsanalyse der erzeugten <i>ipdC</i> -Promotorfusionen	96
C.5.2.4. Expression der <i>ipdC</i> -Promotorfusionen an der Wurzel.....	100
C.6. Identifizierung und Lokalisierung von <i>Herbaspirillum</i> sp. N3 in Weizenwurzeln	101
C.6.1. Phylogenetische Zuordnung der Isolate N3, N5 und N9.....	101
C.6.1.1. Sequenzierung der 16S rDNS und Vergleich mit <i>Herbaspirillum lusitanum</i>	101
C.6.1.2. Genotypischer Vergleich von Isolat N3 und <i>Herbaspirillum lusitanum</i> über DNS-DNS-Hybridisierung	102
C.6.2. FISH-Nachweis von <i>Herbaspirillum</i> sp. N3 in Weizenwurzeln	103
C.6.2.1. Konstruktion einer spezifischen Oligonukleotidsonde.....	103
C.6.2.2. Einsatz der Sonde zur Detektion von <i>Herbaspirillum</i> sp. N3 in Wurzelschnitten	104
C.6.3. Detektion von GFP-markierten <i>Herbaspirillum</i> sp. N3 Zellen	105
C.6.3.1. Erzeugen von konstitutiv <i>gfp</i> exprimierenden Transkonjuganden	105
C.6.3.2. Inokulation von Weizenwurzeln	105
D. DISKUSSION.....	107
D.1. Untersuchung der <i>A. brasilense</i> Besiedlung mit Antikörpern.....	107
D.2. Siedlungsdichte und PGPR-Effekt von <i>A. brasilense</i>	108
D.3. FISH und GFP-Markierung von <i>A. brasilense</i> für den Nachweis der endophytischen Besiedlung mit dem CLSM.....	111
D.4. Vergleich der verschiedenen Methoden zur GFP- und RFP-Markierung von <i>A. brasilense</i>	114
D.4.1. Eignung von <i>gfpmut3</i> , <i>gfp</i> (ASV) und <i>dsred</i> für den Einsatz in <i>A. brasilense</i>	114
D.4.2. Genomische GFP-Markierung durch Genaustausch	115
D.4.3. GFP-Markierung auf Plasmidebene	116
D.5. Die Expression von <i>ipdC</i> in den <i>A. brasilense</i> Stämmen Sp7 und Sp245.....	117
D.6. Phylogenie von <i>Herbaspirillum</i> sp. N3 und Besiedlungsverhalten bei Weizen.....	120
D.6.1. Phylogenetische Zuordnung von Isolat N3	120
D.6.2. Endophytische Besiedlung durch <i>Herbaspirillum</i> sp. N3	122
E. ZUSAMMENFASSUNG	124
F. LITERATUR.....	127
G. ANHANG.....	137
G.1. Konstruierte Plasmide, Mutanten und Transkonjuganden	137
G.2. Verwendete Primer.....	140
G.3. Sequenzdaten	140
G.3.1. Sequenzabschnitt <i>ipdC3</i> von Stamm Sp245.....	140
G.3.2. Sequenzabschnitt des Konstrukts <i>i7Pg</i> (ASV)	141
G.3.3. Sequenzabschnitt des Konstrukts <i>i7Pg</i> (<i>mut3</i>)T.....	141
G.3.4. Sequenzabschnitt des Konstrukts <i>i2Pg</i> (<i>mut3</i>)T.....	142
G.3.5. Sequenzabschnitt des Konstrukts <i>i2.2Pg</i> (<i>mut3</i>)T.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ap	Ampicillin
Ap ^R	Ampicillinresistenz
BP	Bandpass (Filtersatz für Fluoreszenzmikroskopie)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CFU	Colony Forming Unit
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindolocarbo cyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N-hydroxysuccinimidester
dem.	demineralisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH _{abs}	absoluter Ethanol
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
Gm	Gentamycin
Gm ^R	Gentamycinresistenz
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycinresistenz
LP	Langpass (Filtersatz für Fluoreszenzmikroskopie)
MCS	multiple cloning site
Nal	Nalidixinsäure
Nal ^R	Nalidixinsäureresistenz
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RLU	relative light units
RNS, RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ss	einzelsträngig
Tc	Tetracyclin
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid

A. EINLEITUNG

A.1. Aufbau der Wurzel

Die Wurzel muss eine Vielzahl verschiedener Aufgaben erfüllen, von denen die Vitalität der Pflanze maßgeblich beeinflusst wird. Als die zwei wichtigsten Funktionen werden die Verankerung der Pflanze im Boden und die Aufnahme von Wasser mit darin gelösten Nährsalzen wie NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ , K^+ , Ca^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} und verschiedenen Spurenelementen angesehen. Allerdings kommt es nicht nur zu einer Aufnahme von Mineralien durch die Wurzelepidermis, sondern es gelangen auch verschiedene Metabolite als Exsudate in den umgebenden Boden. Zu diesen Produkten zählen unter anderem Zucker, organische Säuren, Alkaloide, Phenole und verschiedene Phytohormone (wie z. B. Auxine). Synthesort eines Großteils dieser Substanzen sind vor allem die photosynthetisch aktiven Blätter, von wo diese Photoassimilate in die Wurzel transportiert werden (Strasburger *et al.*, 1991).

Der Aufbau der Wurzel lässt sich längs aufgrund fehlender Internodien und Knoten nur in wenige Abschnitte gliedern: Auf die schützende Calyptra (Wurzelhaube der Wurzelspitze), die aus verschleimten, abgestorbenen Zellen des Wurzelmeristems gebildet wird, folgt das Apikalmeristem und unmittelbar darauf der Ort der höchsten Zellteilungsrate in der Wurzel, der subapikale Vegetationspunkt. Eine Zone der vermehrten Zellteilung (Wachstumszone) und eine Zone, in der es zur Streckung der Wurzelzellen kommt (Streckungszone), schließen sich an. Mit der Bildung der Differenzierungs- oder Wurzelhaarzone erreicht die Wurzel ihren primären Zustand. Betrachtet man den Querschnitt einer Wurzel im Primärzustand, so wird sie nach außen durch die Rhizodermis, auch Wurzelepidermis genannt, abgeschlossen. Ausgehend von der Calyptra werden Wurzelspitze, Wachstums- und Streckungszone bis hin zu den Wurzelhaaren häufig von einer aus Polysacchariden bestehenden, sogenannten Mucigel-Schicht überzogen. Röhrenförmig ausgewachsene Rhizodermiszellen bilden die einzelligen Wurzelhaare, die zur Oberflächenvergrößerung der Wurzel und damit zu einer verbesserten Wasser- und Mineralienresorption führen. Wurzelhaare sind äußerst kurzlebig, wodurch bei wachsenden Pflanzen die Zone mit lebenden Wurzelhaaren meist nur 1-2cm lang ist. Die abgestorbenen Wurzelhaar-Rhizodermiszellen bilden die sogenannte Exodermis als neues Abschlussgewebe. Nach innen schließt sich an die Rhizodermis eine mehr oder weniger stark entwickelte Zellschicht an, die als Hypodermis bezeichnet wird, welche das Rindenparenchym umschließt. Die Rinden- oder Kortezellen fungieren besonders in den

ausdifferenzierten Teilen der Wurzel als Speichergewebe. Die dickwandigen Endodermiszellen bilden die Grenze zwischen Kortex und Zentralzylinder (s. Abbildung A.1), in dem die Festigungs- und Leitelemente der Wurzel zusammengefasst sind. Die äußerste Zelllage des Zentralzylinders in unmittelbarem Anschluss an die Endodermis besteht aus undifferenzierten Zellen und wird als Pericycl oder auch Pericambium bezeichnet. Die Mitte des Zentralzylinders wird von den toten Leitelementen des Xylems eingenommen, die für Wasser- und Ionentransport verantwortlich sind, während das für die Fernleitung von organischen Verbindungen zuständige Phloem zwischen den Xylemleisten angeordnet ist und aus lebenden, aber kernlosen Siebröhrengliedern besteht.

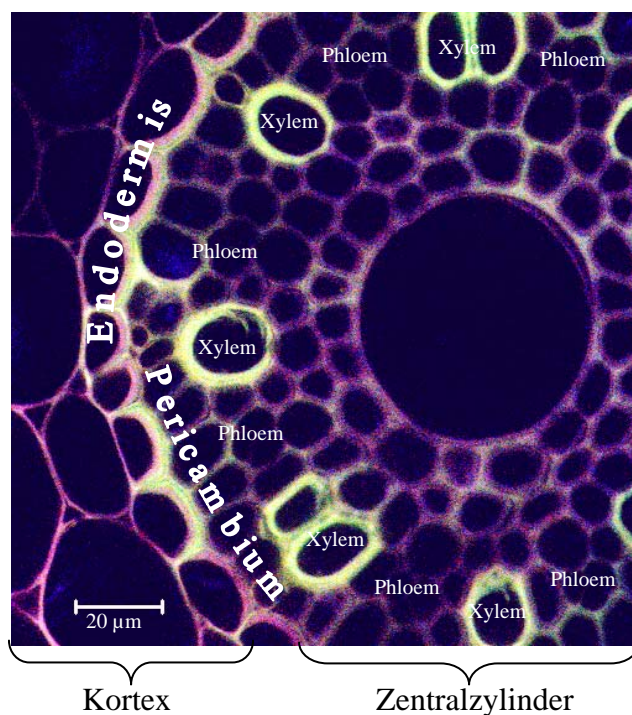


Abbildung A.1: Aufbau des Zentralzylinders einer Weizenwurzel. Autofluoreszenzaufnahme eines Querschnitts einer vier Wochen alten Weizenwurzel aus dem monoxenischen System. Gut zu erkennen, ist die dickwandige Endodermis, die den Zentralzylinder wasserdicht gegen den Kortex abschließt. Äußere Kortexzellen und Rhizodermis sind nicht zu sehen.

Schließlich sollte bei der Betrachtung des gesamten Wurzelsystems noch eine Unterscheidung in heterogenes und homogenes Wurzelwachstum vorgenommen werden. Bei heterogenen oder auch „allorhizen“ Wurzelsystemen wächst die Keimwurzel zur Primärwurzel heran, wobei sie als Pfahlwurzel vertikal in den Boden vordringt. Dabei kommt es zur Ausbildung von Sekundärwurzeln, welche im Pericambium angelegt werden, also endogenen Ursprungs sind. Diese Seitenwurzeln zeigen ein vom Schwerkraftvektor unabhängiges Wachstum, weshalb sie den Boden in alle Richtungen durchdringen können. Homogene oder auch

homorhize Systeme zeichnen sich durch eine Zahl mäßig verzweigter, ähnlich gestalteter und gleichrangiger Wurzeln aus, die meist alle sprossbürtig sind. Bei der sogenannten sekundären Homorhizie kommt es zum Verkümmern der Keimlingswurzel und zur Ausbildung zahlreicher gleichrangiger Wurzeln am untersten Sprossknoten.

Während z.B. die meisten Bäume eine allorhize Wurzelverzweigung aufweisen, ist Homorhizie vor allem charakteristisch für Cryptophyten (besonders Rhizompflanzen), Pteridophyten (Farnpflanzen) und alle Monokotyledonen (Einkeimblättrige Pflanzen), zu denen auch der in dieser Arbeit untersuchte Sommerweichweizen (*Triticum aestivum*) zählt (Strasburger *et al.*, 1991).

A.2. Pflanzen-Mikroorganismen Interaktion in der Rhizosphäre

A.2.1. Definition des Begriffs „Rhizosphäre“

Von entscheidender Bedeutung für die Pflanze ist die Schnittstelle von Wurzeln und Boden, die als Rhizosphäre bezeichnet wird. Hier kommt es nicht nur zur Aufnahme von Nährstoffen und Wasser, sondern auch zur Interaktion mit den im Boden lebenden Mikroorganismen. Lorenz Hiltner, Professor der Agronomie an der Technischen Universität in München, prägte diesen Begriff 1904, als er bei einer Tagung der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft die wichtige Rolle der mikrobiellen Aktivität in der „Rhizosphäre“ hervorhob. Dabei betonte er sowohl die Abhängigkeit der Pflanze von den förderlichen Bodenbakterien, als auch die anziehende Wirkung, die die Wurzelexsudate auf pathogene Organismen ausüben. Unter Rhizosphäre versteht man nach Hiltners Definition die eng begrenzte Bodenzone, die der Beeinflussung durch lebende Wurzeln unterliegt, was sich in einer Stimulation der mikrobiellen Aktivität durch die pflanzlichen Exsudate äußert (Hiltner, 1904). Seither wurde die Definition des Begriffs Rhizosphäre durch eine Reihe weiterer Bezeichnungen ergänzt. So wird mittlerweile eine Unterteilung in Endo- und Ectorhizosphäre vorgenommen (Belandreau and Knowles, 1978). Zur Endorhizosphäre gehören Kortex und

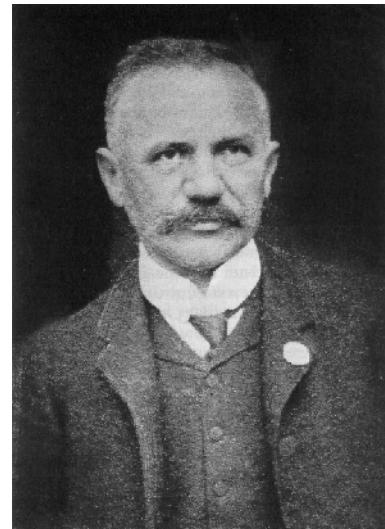


Abbildung A.2: Lorenz Hiltner, Professor der Agronomie an der Technischen Universität München, prägte den Begriff „Rhizosphäre“.

Rhizodermis mit Wurzelhaaren und der aufgelagerten Mucusschicht, während zur Ectorhizosphäre die wenigen Millimeter umgebender Boden zählen. Ergänzend bezeichnet der Begriff Rhizoplane den Grenzbereich zwischen Boden und Wurzel, was gleichzusetzen ist mit „Wurzeloberfläche“ und als Teil der Rhizosphäre angesehen werden kann (Clark, 1949).

A.2.2. Der Rhizosphäreneffekt

Entweder direkt oder zumindest indirekt ist Zusammensetzung und Zahl der Mikroorganismen in der Rhizosphäre von der Freisetzung organischer Substanzen durch die Pflanze abhängig (Rovira and Davey, 1974; Hale *et al.*, 1978). Diese Wurzelexsudate sind jedoch nicht die einzigen Substanzen, die bakterielles Wachstum auf Rhizoplane und in der Ectorhizosphäre fördern können. Die Ablösung von Wurzelmaterial, wie Wurzelhaube, Epidermiszellen oder Wurzelhaare, und die Diffusion von Inhaltsstoffen aus verletzten Wurzelzellen müssen ebenfalls als Einfluss nehmende Faktoren auf die mikrobielle Aktivität angesehen werden (Curl and Truelove, 1986). Die Abgabe dieser unterschiedlichen Substanzen in den umgebenden Boden ist wiederum abhängig vom Ernährungszustand und Entwicklungsstadium der Pflanze, sowie Bodenbeschaffenheit, Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert, Licht, u. v. m., wodurch die mikrobiellen Populationen einer starken Fluktuation unterworfen sind (Barclay and Crosse, 1974). Entscheidend ist jedoch, dass somit ein mit zunehmender Nähe zur Rhizoplane steigender Nährstoffgradient entsteht, der verantwortlich für den sogenannten Rhizosphäreneffekt ist. Darunter versteht man die quantitative Zunahme der mikrobiellen Besiedlung, sowie eine veränderte Zusammensetzung der Mikroflora im Einflussbereich der Wurzel im Vergleich zu Boden, welcher nicht mit lebenden Wurzeln in Kontakt steht. Die Ausscheidung von Exsudaten geschieht auch entlang der Wurzel nicht gleichmäßig. So werden besonders beim Austritt der endogen gebildeten Seitenwurzeln aus der Primärwurzel große Mengen organische Substanzen in die Ectorhizosphäre abgegeben, aber auch Wurzelhaare sind bevorzugte Stellen der Sekretion (Rovira and Davey, 1974). Deshalb kommt es in bestimmten Bereichen der Rhizosphäre zur Ausbildung von „hotspots“ der Bakterienkolonisierung.

A.2.3. Bedeutung der bakteriellen Besiedlung für die Pflanze

Die mikrobielle Kolonisierung der Rhizosphäre stellt nicht nur für Bakterien die Erschließung eines nährstoffreichen Habitats dar, sondern bietet auch der Pflanze eine Reihe von Vorteilen. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist die Hemmung bzw. Kontrolle des Wachstums von Krankheitserregern mit Hilfe natürlich vorkommender Mikroorganismen ohne den Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel. Dieser „Biocontrol“-Aktivität durch bestimmte Mikroorganismen liegen im Wesentlichen drei Wirkmechanismen zugrunde: Hemmung oder Eliminierung pathogener Keime durch die Produktion von Antibiotika bzw. fungizider Verbindungen, Verdrängung der Krankheitserreger durch Konkurrenz um vorhandene Nährstoffe und Stimulation systemischer Resistenzen in der Pflanze gegen auftretende Pathogene (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Van Loon *et al.*, 1998).

Darüber hinaus können sich Rhizosphärenbakterien auch durch die Produktion von Phytohormonen, sowie die Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit und der Wasseraufnahme förderlich auf das Pflanzenwachstum auswirken (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). Die Möglichkeiten zur Wechselwirkung zwischen Pflanze und Bakterien sind dabei mannigfaltig. So induziert beispielsweise die Interaktion von Rhizobien mit Leguminosenwurzeln die Bildung von Wurzelknöllchen, was zu einer Pflanzen-Mikroorganismen-Symbiose führt. Die in den Knöllchen ablaufende Stickstofffixierung durch den Rhizobium-Symbionten stellt dabei der Pflanze essentielle Stickstoffverbindungen zur Verfügung, während die Knöllchen der Wirtspflanze den Bakterien optimale Nährstoffversorgung und eine für die N₂-Fixierung erforderliche mikroaerobe Umgebung bieten (Werner, 1992). Obwohl z. B. Gräser keine solch spezialisierten symbiontischen Strukturen ausbilden, wurden auch hier diazotrophe (stickstofffixierende) Bakterien auf der Rhizoplane und im Inneren der Wurzel gefunden. In wirtschaftlich so bedeutenden Grasarten wie Mais, Reis, Zuckerrohr und Weizen wurde bereits eine intensive Kolonisierung mit einer Reihe von diazotrophen Spezies beschrieben, z. B. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (James *et al.*, 1994), *Herbaspirillum seropedicae* (James and Olivares, 1997), *Rhizobium leguminosarum* (Yanni *et al.*, 1997), *Azoarcus* sp. (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) und *Azospirillum* spp. (Patriquin and Döbereiner, 1978). Für bestimmte Zuckerrohrvarietäten konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass bei Pflanzen, die ohne nennenswerte Mengen von Stickstoffdünger angezogen wurden, ein erheblicher Teil des Stickstoffbedarfs über bakterielle N₂-Fixierung gedeckt wurde (Urquiaga *et al.*, 1992). Als weiteres Beispiel war es nach Inokulation verschiedener Getreidearten durch *Azospirillum* Spezies möglich, Korngröße und -anzahl der kolonisierten Pflanzen an unabhängigen Standorten in mehreren

Ländern zu steigern (Dobbelaere *et al.*, 2001). Dafür ist bei Azospirillen in erster Linie die Produktion des Phytohormons Indol-3-Essigsäure verantwortlich, wie in Punkt A.3.1.2 genauer ausgeführt wird. Bakterien, die auf diese Weise Wachstum, Ertrag und Resistenz der Pflanze fördern können, werden auch als „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR) bezeichnet.

Eine interessante Eigenschaft der genannten Organismen ist es, dass einige Stämme dazu befähigt sind auch das Innere der Wurzel zu besiedeln. Nach Hartmann *et al.* (2000) werden solche Bakterien als diazotrophe Endophyten bezeichnet, wenn sie die drei folgenden Kriterien erfüllen: es ist eine Isolation aus oberflächensterilisiertem Pflanzengewebe oder dem Pflanzeninneren möglich, über *in situ* Nachweisverfahren lässt sich eine inter- oder intrazellulär Lokalisierung zeigen, die Fähigkeit zur Stickstofffixierung kann durch Acetylenreduktion und/oder $^{15}\text{N}_2$ -Anreicherung nachgewiesen werden. Diese endophytische Lebensweise bietet einerseits den Vorteil eines geschützten Habitats ohne Konkurrenz mit anderen Spezies (Hartmann, 1989), andererseits ermöglicht die enge Assoziation mit dem Wurzelinneren einen effektiveren Austausch von Metaboliten (Patriquin *et al.*, 1983). Der Einsatz dieser PGPRs als eine umweltverträgliche Alternative für chemische Dünger und Pestizide ist in manchen Fällen bereits realisiert. *Rhizobium* enthaltende Produkte werden bereits seit langer Zeit vermarktet und es existieren wohl um die zwanzig Biocontrol-Produkte (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). Doch besonders bei den nicht eindeutig symbiontischen Spezies ist eine weitere Aufklärung der relevanten Faktoren bei der Wurzelkolonisierung erforderlich, um eine effektive Verwendung in der Landwirtschaft zu ermöglichen.

A.3. Diazotrophe Endophyten als PGPRs an Weizenwurzeln

A.3.1. Die Gattung *Azospirillum*

Bakterien der Gattung *Azospirillum* sind schon seit vielen Jahren als „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ bekannt (Kloepper *et al.*, 1991). Verschiedene Spezies konnten bereits von Pflanzenwurzeln an gemäßigten bis tropischen Standorten überall auf der Welt isoliert werden (Krieg and Döbereiner, 1986). Bis zum heutigen Tage sind sieben Spezies beschrieben: *Azospirillum lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A. largimobile* (früher *A. largomobile* und

Conglomeromonas largomobilis subsp. *largomobilis*, Ben Dekhil *et al.*, 1997), und *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001). Alle sind gram-negative Rhizosphärenbakterien und gehören zur phylogenetischen Gruppe der α -*Proteobacteria*. Gemein ist ihnen weiterhin eine hohe Motilität, was den Zellen die Möglichkeit gibt, sich verwertbaren Nahrungsquellen zu nähern. So zeigen Azospirillen positive Chemotaxis gegenüber organischen Säuren, Zuckern, Aminosäuren und aromatischen Verbindungen, was auch zu einer Migration in Richtung der durch die Pflanzenwurzel ausgeschiedenen Exsudate führt (Bashan, 1986). Ebenso zeigen Azospirillen eine gerichtete Bewegung zu Mikrohabitaten mit für die Stickstofffixierung optimaler Sauerstoffkonzentration. Dieses Verhalten wird Aerotaxis genannt (Zhulin *et al.*, 1996).

A.3.1.1. *Azospirillum brasilense* – Stimulation des Pflanzenwachstums durch Phytohormone

Besonders *A. brasilense* steht immer wieder im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses wegen seiner Eigenschaft, Wachstum und Ertrag von wirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen wie Mais und Weizen zu steigern (Dobbelaere *et al.*, 2001). Doch die Fähigkeit atmosphärischen Stickstoff fixieren zu können, scheint bei *A. brasilense* eine untergeordnete Rolle bei diesem stimulatorischen Effekt zu spielen (Patriquin *et al.*, 1983). Vielmehr sind morphologische Veränderungen der Wurzel ausschlaggebend, die zu einer Vergrößerung der Wurzeloberfläche führen und einer dadurch verbesserten Wasser- und Mineralienaufnahme (Okon and Kapulnik, 1986). Die Ursache für diese veränderte Wurzelmorphologie liegt in der Produktion des Auxins Indol-3-Essigsäure durch die siedelnden Azospirillen (Hartmann *et al.*, 1983a), wodurch es zur vermehrten Bildung von Wurzelhaaren (Hadas and Okon, 1987) und Seitenwurzeln (Barbieri *et al.*, 1986) kommt. In der Regel siedeln *A. brasilense* Zellen auf der Wurzeloberfläche eingebettet in die Mucigel-Schicht (Murthy and Ladha, 1987) in unterschiedlicher Anzahl in Abhängigkeit von der Wirtspflanze und dem kolonisierenden Stamm (O'Hara *et al.*, 1983). Zusätzlich wurden aber auch *A. brasilense* Zellen gefunden, die nicht nur in der Lage waren verletzte Wurzelzellen zu kolonisieren, sondern auch das Innere von intakten Wurzeln (Umalia-Garcia *et al.*, 1980). So konnte bei einem Vergleich der *A. brasilense* Stämme Sp245 und Sp7 gezeigt werden, dass Sp245 im Gegensatz zu Stamm Sp7 in der Lage ist, die Rhizodermis zu durchdringen und sich im Wurzelkortex zu etablieren (Schloter and Hartmann, 1998). Worauf diese Invasivität des Stammes Sp245 basiert, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Möglicherweise erfolgt das Eindringen über enzymatischen Abbau der Mittellamelle der pflanzlichen Zellwand. Eine geringe pectinolytische und zellulolytische

Aktivität konnte bereits bei allen *Azospirillum* Spezies festgestellt werden (Umali-Garcia *et al.*, 1980; Okon and Kapulnik, 1986), jedoch wurde bislang nur bei *A. irakense* ein Gen gefunden, das für eine Pectatlyase kodiert (Bekri *et al.*, 1999). Alternativ ist es ebenfalls denkbar, dass *A. brasilense* Zellen durch lysierte Wurzelhaare oder beschädigtes Wurzelgewebe z. B. an den Austrittsstellen von Seitenwurzeln eindringen (Umali-Garcia *et al.*, 1980).

A.3.1.2. PGPR-Effekt durch Produktion von IES

Bereits 1979 wurde von Tien *et al.* die Produktion von Auxin-, Cytokinin- und Gibberellin-ähnlichen Substanzen durch *A. brasilense* postuliert. Allerdings wird nur das Auxin Indol-3-Essigsäure (IES) von Kulturen im spätlogarithmischen Wachstumsstadium in erheblicher Menge produziert (Hartmann *et al.*, 1983a), während Cytokinine und Gibberelline nur in sehr alten Kulturen in geringer Konzentration nachgewiesen werden konnten. Um die bereits erwähnte wachstumsstimulierende Wirkung von IES für die Pflanze zu beweisen, wurde versucht Mutanten zu erzeugen, die nicht länger in der Lage waren, dieses Auxin zu produzieren. Tatsächlich konnten nach Tn5-Transposon-Mutagenese *Azospirillum* Mutanten mit stark verminderter IES-Synthese selektiert werden, die bei Kolonisierung von Wurzeln beinahe keinen Effekt mehr auf Zahl der Wurzelhaare und Länge der Seitenwurzeln hatten (Barbieri *et al.*, 1986). Jedoch war es bislang nicht möglich vollständige Null-Mutanten für die IES-Produktion zu selektieren. Auch bei einem nachgewiesenen Knock-out eines der Synthesegene für IES konnten noch geringe Mengen des Auxins detektiert werden (Hartmann and Zimmer, 1994). Deshalb liegt der Schluss nahe, dass entweder mehrere Kopien der für die IES-Synthese notwendigen Gene existieren, oder mindestens zwei Synthesewege. Tatsächlich wurde in nachfolgenden Arbeiten gezeigt, dass für *A. brasilense* wenigstens drei biochemische Wege für die Produktion von IES vorhanden sind. Für den Indol-3-Acetamid- und den Indol-3-Pyruvat-Weg ist Tryptophan der Vorläufer, doch es existiert auch ein Tryptophan unabhängiger Syntheseweg über Zwischenprodukte der Tryptophan-Biosynthese (Prinsen *et al.*, 1993). Innerhalb des Indol-3-Pyruvat-Weges stellt Indol-3-Pyruvat-Decarboxylase (IpdC) ein Schlüsselenzym in der Umsetzung von Indol-3-Pyruvat zu IES dar. Dabei kommt den Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin eine besondere Bedeutung zu, da sie neben dem Endprodukt IES (Vande Broek *et al.*, 1999) induzierend auf die Expression des *ipdC*-Gens wirken (s. Abbildung A.3).

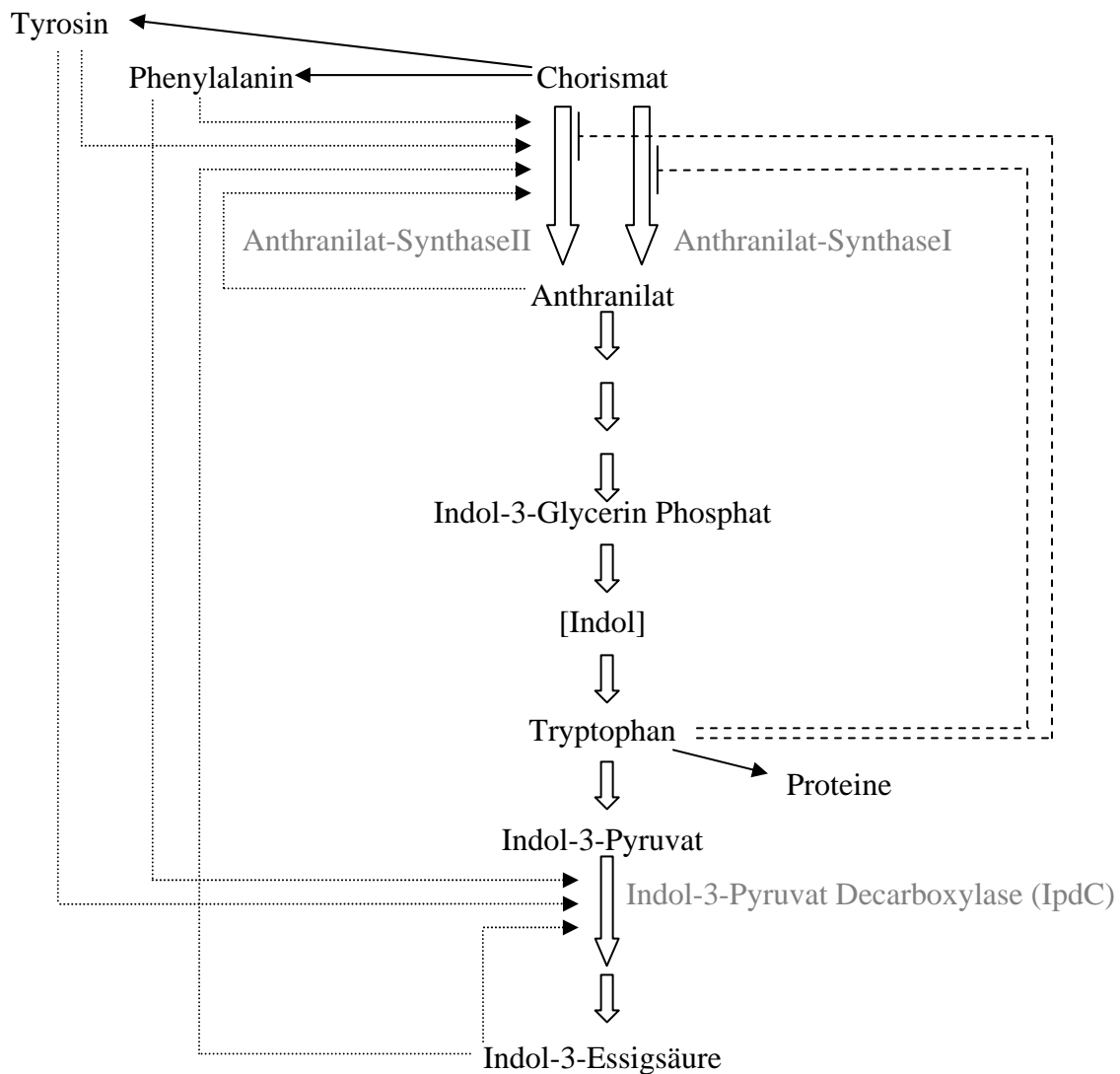


Abbildung A.3: Hypothetisches Modell des Indol-3-Pyruvat-Weges für die Biosynthese von IES bei *A. brasilense* nach Dosselaere, 2000. Die gepunkteten Pfeile bezeichnen die induzierende Wirkung der jeweiligen Verbindungen auf die enzymatische Umsetzung von Chorismat bzw. Indol-3-Pyruvat durch die entsprechenden Enzyme (grau). Die gestrichelten Linien stellen die Repression der Anthranilat-Synthase durch Tryptophan dar. Indol-3-Acetamid und Tryptophan unabhängiger Syntheseweg sind nicht gezeigt.

Eine weitere Frage in diesem Zusammenhang ist, weshalb *A. brasilense* IES produziert und unmittelbar ausscheidet. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Reduzierung von toxischen Konzentrationen von Tryptophan (Bar and Okon, 1992). Allerdings weist die Existenz eines Tryptophan unabhängigen IES-Syntheseweges auf eine weitergehende Bedeutung dieses Metabolits bei der Interaktion mit der Pflanze hin. So führt die Ausscheidung von IES durch wurzelkolonisierende *A. brasilense* Zellen einerseits zu einer vermehrten Wurzelverzweigung und damit zu einer erhöhten Wasser- und Nährstoffaufnahme durch die Pflanze. Andererseits bietet diese Oberflächenvergrößerung auch für das siedelnde Bakterium einen Vorteil, da dadurch mehr kolonisierbarer Lebensraum entsteht (Dosselaere,

2000). Damit handelt es sich bei der Produktion von IES durch Azospirillen um eine echte Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen. Es wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt, dass das *ipdC*-Gen von *A. brasilense* Zellen in der Rhizosphäre tatsächlich exprimiert wird.

A.3.2. Die Gattung *Herbaspirillum*

Im Gegensatz zu den Azospirillen gehören die Vertreter der Gattung *Herbaspirillum* der phylogenetischen Untergruppe der β -*Proteobacteria* an. Die als erste beschriebene Art, *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986a), wurde von Wurzeln verschiedener Getreidesorten isoliert. Nach Reklassifizierung folgte die ehemals *Pseudomonas rubrisubalbicans* benannte schwach pflanzenpathogene Art *H. rubrisubalbicans* (Baldani *et al.*, 1996). Die durch DNS-DNS- bzw. DNS-rRNS-Hybridisierung phylogenetisch zugeordnete Art *Herbaspirillum* Spezies 3 stellt insofern eine Ausnahme dar, als dass in diesem Fall im Gegensatz zu den bisher genannten Arten Hinweise für eine enge Assoziation mit der Wurzel fehlen und keine Stickstofffixierung nachgewiesen werden konnte (Baldani *et al.*, 1996). Die vierte Spezies der Gattung, *H. frisingense*, konnte aus *Miscanthus* spp., *Spartina spectinata* und *Pennisetum pupureum* isoliert werden (Kirchhof *et al.*, 2001). Die wurzelkolonisierenden *Herbaspirillum* spp. wurden sowohl auf der Wurzeloberfläche, als auch als Endophyten intra- oder interzellulär nachgewiesen (Olivares *et al.*, 1997). Dabei scheinen sie Pflanzen der Familie der *Gramineae* zu bevorzugen (Kirchhof *et al.*, 2001) und nur gelegentlich andere Pflanzenarten zu besiedeln (Baldani *et al.*, 1996). Nach Döbereiner *et al.* (1993) führt die enge Assoziation bei der endophytische Besiedlung durch Herbaspirillen zu einer Versorgung der Pflanze mit dem durch die Mikroorganismen fixierten Stickstoff. Der experimentelle Beweis für diese These konnte kürzlich durch Elbeltagy *et al.* (2001) bei Reis (*Oryza officinalis*) nach Inokulation mit *Herbaspirillum* sp. Stamm B501 erbracht werden.

Bisher einmalig ist die Isolierung einer *Herbaspirillum* Art aus den Wurzelknöllchen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), welche nach geno- und phänotypischen Merkmalen als neue Spezies innerhalb der Gattung angesehen werden muss. Die Autoren (Valverde *et al.*, in press) schlagen den Namen *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov. vor.

Die bislang neuste, allerdings noch nicht anerkannte Spezies der Gattung ist cand. „*Herbaspirillum chlorophenolicum*“ sp. nov. (Im *et al.*, eingereicht). Dieser Stamm wurde aus Flusssediment in der Nähe von Industrieanlagen in Korea isoliert und ist in der Lage 4-Chlorophenol abzubauen. Auch die Fähigkeit Luftstickstoff zu fixieren konnte nachgewiesen

werden. Aufgrund seiner morphologischen und physiologischen Eigenschaften wurde das Isolat zunächst der Spezies *Comamonas testosteroni* (Bae *et al.*, 1996) zugeordnet, phylogenetische Analysen auf der Basis von 16S rDNS Sequenzen, sowie DNS-DNS Hybridisierungen machten jedoch eine Reklassifizierung notwendig.

In der Diplomarbeit von Klein (2003) wurden die Bakterienstämme N3, N5 und N9 von oberflächensterilisierten Weizenwurzeln isoliert, die bei einer vergleichenden Analyse ihrer 16S rRNS kodierenden Gene eine hohe Ähnlichkeit zu *Herbaspirillum lusitanum* aufwiesen. Nach Inokulation von sterilisierten Weizenkeimlingen mit diesen Isolaten und Anzucht in einem sterilen Quarzsandsystem, konnten über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit einer Oligonukleotidsonde, spezifisch für die β -Untereinheit der *Proteobacteria*, positive Hybridisierungssignale innerhalb der Weizenwurzeln detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass auch diese Spezies zu einer endophytischen Kolonisierung von Weizenwurzeln fähig ist.

A.4. Ziele dieser Arbeit

Das in der Arbeit von Schloter und Hartmann (1998) gefundene unterschiedliche Kolonisierungspotential der *A. brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 konnte bisher hauptsächlich an einer brasilianischen Weizensorte mit immunologischen Methoden demonstriert werden. Bisher war jedoch nicht geklärt, in wie weit die endophytische Kolonisierung von Stamm Sp245 auf eine bestimmte Weizensorte beschränkt ist und ob diese endophytische Besiedlung Auswirkungen auf den wachstumsstimulierenden Effekt dieses Stammes aufweist. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit das Kolonisierungspotential der Stämme Sp7 und Sp245 an verschiedenen Sommerweizensorten (*Triticum aestivum*) untersucht werden. Es wurden moderne und ursprüngliche Weizensorten aus Deutschland mit einer brasilianischen und einer israelischen Sorte verglichen. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Quantifizierungsmethoden (Plattenkoloniezählung, MPN, quantitativer ELISA) vor und nach der Oberflächensterilisierung von Weizenwurzeln Aufschluss über die Zahl der siedelnden *A. brasilense* Zellen und Vorhandensein von Endophyten geben. Außerdem sollte durch Anzucht der mit unterschiedlichen *A. brasilense* inokulierten Weizenkultivare in landwirtschaftlichem Boden der PGPR-Effekt in Abhängigkeit von der endophytischen Kolonisierung untersucht werden.

Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit mit molekulargenetischen und mikroskopischen Methoden tiefergehende Erkenntnisse über die Lokalisierung vor allem der Endophyten innerhalb der Wurzel zu erlangen. Hierzu sollte zum einen die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der Zielzellen mit artspezifischen Oligonukleotidsonden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, durchgeführt werden. Von Stoffels *et al.* (2001) wurde die 16S rRNS gerichtete Sonde Abras1420 entwickelt, die einen speziesspezifischen Nachweis von *A. brasilense* ermöglicht. Außerdem sollten stammspezifische mono- und polyklonale Antikörper zu einer differenzierten Untersuchung der Wurzelbesiedlung durch die beiden Stämme Sp7 und Sp245 verwendet werden. Schließlich sollte durch eine Markierung der Zielzellen durch GFP (green fluorescent protein) eine unmittelbare Detektion der Azospirillen in und an der Wurzel ermöglicht werden. Zur Reduktion der störenden Hintergrundfluoreszenz und zur dreidimensionalen Darstellung des Kolonisierungsverhaltens der fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen wurde ein Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) verwendet.

Da die IES-Produktion für die *A. brasilense*-Wurzel-Interaktion eine bedeutende Rolle spielt, sollten ebenfalls die einflussnehmenden Faktoren bei der Expression des *ipdC*-Gens, eines Schlüsselenzyms bei der IES-Synthese, einer genaueren Untersuchung unterzogen werden. In der Arbeit von Dosselaere (2000) wurde bereits die Induzierbarkeit einer *ipdC-gusA*-Fusion in *A. brasilense* Sp245 durch Tryptophan, Phenylalanin und IES gezeigt. Deshalb sollte in dieser Arbeit ein Vergleich von *gfp*-Fusionen der Promotorregion des *ipdC*-Gens der *A. brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 durchgeführt und die *in situ* Expression in der Rhizoplane verfolgt werden.

Schließlich sollten die in der Diplomarbeit von Klein (2003) erhaltenen *Herbaspirillum* Isolate phylogenetisch genauer charakterisiert und deren Besiedlungsverhalten, ähnlich wie bei *A. brasilense*, mit FISH und *gfp*-Markierungen mikroskopisch mit Hilfe des CLSMs untersucht werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde entsalztes und filtriertes Wasser (H_2O_{reinst}) aus einer Reinstwasseranlage (Easypure™ UV/UF D8612-33, Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland) verwendet, für Medien zur Anzucht von Mikroorganismen oder Pflanzen wurde entionisiertes Wasser ($H_2O_{\text{dem.}}$) benutzt.

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von der Firma SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Deutschland) bezogen. Hitzestabile Lösungen, Puffer und Medien wurden mit einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven (Varioklav Typ 300 E bzw. Vapoklav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, München, Deutschland) für 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pa Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, MILLIPORE, Eschborn, Deutschland) und anschließend den autoklavierten Lösungen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die pH-Werte wurden, soweit nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl entsprechender Normalität eingestellt.

B.1. Kultivierung von Mikroorganismen

B.1.1. Bakterienstämme und Plasmide

Organismus	Relevante Angaben	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tc^R)</i>]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> MT102	Nal ^R	unveröffentlicht
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>recA thi pro leu hsdR^{M+} Cm^R</i>	Kessler <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	INVITROGEN, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> GeneHogs	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2 (Phage T1 Resistenz)</i>	INVITROGEN, Carlsbad, USA
<i>Ochrobactrum anthropi</i> 1a	DSMZ Nr. 14396	Holmes <i>et al.</i> , 1988
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Nal ^R 6; Typstamm, DSMZ Nr. 1690	Tarrand <i>et al.</i> , 1978

Organismus	Relevante Angaben	Referenz
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Nal ^R 6	Baldani <i>et al.</i> , 1987
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	DSMZ Nr. 1843	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp35	DSMZ Nr. 1844	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> JM6A2	DSMZ Nr. 1858	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp81	DSMZ Nr. 1859	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp75	DSMZ Nr. 2295	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> SpP2	DSMZ Nr. 2296	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> SpA2	DSMZ Nr. 2297	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Azospirillum brasilense</i> SpT60	DSMZ Nr. 2298	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Herbaspirillum lusitanum</i> P6-12	Typstamm	Valverde <i>et al.</i> , in press
N3, N5, N9	Isolate von oberflächensterilisierten Weizenwurzeln	Klein, 2003

Tabelle B.1: Verwendete Organismen

Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann and Low (1990)

Plasmid	Relevante Eigenschaften / Beschreibung	Referenz
pGEM-5Zf(+)	Ap ^R ; <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor	PROMEGA, Madison, USA
pCR [®] 2.1-TOPO	Ap ^R , Km ^R ; <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor	INVITROGEN, Carlsbad, USA
pCR [®] 4-TOPO	Ap ^R , Km ^R ; <i>lacZα-ccdB</i> , Klonierungsvektor	INVITROGEN, Carlsbad, USA
pRK600	Cm ^R ; <i>ColE1 oriV RP4 tra⁺ RP4 oriT</i> ; Helferplasmid für konjugativen Transfer	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pBBR1MCS-2	Km ^R ; <i>lacZα</i> , Klonierungsvektor	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pEX18Gm	Gm ^R , <i>oriT⁺</i> , <i>sacB⁺</i> , „gene replacement“ Vektor mit MCS von pUC18	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pJBA28	Ap ^R , Km ^R ; Trägerplasmid für mini-Tn5-Km- <i>P_{A1/04/03}-RBSII-gfpmut3-T₀-T₁</i>	Andersen <i>et al.</i> , 1998
pBAH7	Km ^R ; <i>P_{A1/04/03}-gfpmut3</i> in pBBR1MCS-2	Huber, unveröffentl.
pTn5-red	Ap ^R , Tc ^R ; pUTTc Trägerplasmid für mini-Tn5-Tc- <i>P_{lac}-dsred-T1-T2</i>	Hentzer <i>et al.</i> , 2002
pMH433	Gm ^R ; <i>P_{lac}-dsred</i> Kassette in pME6030TGm	Hentzer, unveröffentl.
pKR-C12	Gm ^R ; <i>P_{lasB±gfp}(ASV) P_{lac±lasR}</i> in pBBR1MCS-5	Riedel <i>et al.</i> , 2001

Tabelle B.2: Verwendete Plasmide

Die Abkürzungen für Geno- und Phänotyp entsprechen der Nomenklatur von Bachmann and Low (1990)

B.1.2. Nährmedien

Falls nicht anders vermerkt wurde zur Herstellung von Festmedien pro Liter Flüssigkeit 15g Agar eingewogen und im selben Gefäß autoklaviert. Die Zugabe von Hemmstoffen und Medienzusätze erfolgte bei Festmedien nach Abkühlung auf ca. 45°C, bei Flüssigmedium vor Inokulation.

NB (Nutrient Broth)-Medium:	Pepton	5,0g
(Nr. 4, Fluka, Buchs, Schweiz)	Fleischextrakt	3,0g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 7,0	

Zur Herstellung von 5%igen NB-Saccharose-Platten wurden zunächst 50g Saccharose in 100ml H₂O_{dem.} gelöst und getrennt möglichst kurz autoklaviert, da bei zu langem Erhitzen eine durch Karamellisierung hervorgerufene bräunliche Verfärbung der Zuckerlösung auftrat. Die Komponenten des NB-Mediums wurden nach obigen Angaben eingewogen, jedoch nur in 900ml H₂O_{dem.} aufgenommen und erst nach dem Autoklavieren mit der Saccharoselösung auf einen Liter aufgefüllt.

LB (Luria-Bertani)-Medium:	Caseinhydrolysat	10g
(nach Bertani, 1951, modifiziert)	Hefeextrakt	5g
	NaCl	4-5g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 7,4	

SOC-Medium:	Hefeextrakt	0,50g
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Caseinhydrolysat	2,00g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,20g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25g
	Glukose	0,36g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 7,0	

MMAB-Minimalmedium:	885ml H ₂ O _{dem.} (evtl. mit Agar) autoklavieren,	
(Vanstockem <i>et al.</i> , 1987)	danach steril zugeben:	
	K ₂ HPO ₄ (10% w/v)	30ml
	NaH ₂ PO ₄ (10% w/v)	10ml
	NH ₄ Cl (10% w/v)	10ml
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O (10% w/v)	3ml
	KCl (10% w/v)	1,5ml
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1% w/v)	1ml
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O (0,1% w/v)	5ml
	Na-Malat (10% w/v)	25ml
	Biotin (0,1% w/v)	5ml
	Spurenelementelösung (MMAB)	2ml

Spurenelementelösung (MMAB)	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03g
	H ₃ BO ₃	0,30g
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,20g
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,01g
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml

Zur Durchführung von Expressionsanalysen wurden Tyrosin- bzw. Phenylalanin-MMAB-Platten in einer Konzentration von 0,5mM hergestellt. Dazu wurden 785ml H₂O_{dem.} (bzw. 685ml bei Zugabe von sowohl Tyrosin als auch Phenylalanin) mit 15g Agar autoklaviert und nach Zugabe der einzelnen MMAB-Komponenten 100ml sterilfiltrierte Stammlösung der jeweiligen Aminosäure (5mM, Lösungsmittel H₂O_{dem.}) hinzugegeben.

NFb-Medium, semisolid: (Döbereiner, 1995)	D,L-Äpfelsäure	5,00g
	K ₂ HPO ₄	0,50g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20g
	NaCl	0,10g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,02g
	Spurenelementelösung (NFb)	2,00ml
	Bromthymolblau (0,5% Lösung in 0,2M KOH)	2,00ml
	Fe-EDTA (1,64% Lösung)	4,00ml
	Vitamin-Lösung	1,00ml
	Agar	1,75g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 6,8 mit KOH (1M) einstellen	
	Gesamten Ansatz in der Mikrowelle aufschmelzen, auf Kulturgefäße aufteilen und anschließend autoklavieren	

Spurenelementelösung (NFb)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,40g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12g
	H ₃ BO ₃	1,40g
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,20g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1,00g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml

Vitaminlösung (NFb)	Biotin	0,10g
	Pyridoxol-HCl	0,20g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml

B.1.3. Hemmstoffe und Medienzusätze

Zur Herstellung von Selektivmedien und zur Plasmidstabilisierung bei der Kultivierung plasmidhaltiger Bakterienstämme wurden die unten angegebenen Hemmstoffe in den entsprechenden Konzentrationen verwendet. Sofern nicht Ethanol oder Methanol als Lösungsmittel diente, wurden die Antibiotika sterilfiltriert und anschließend den autoklavierten Nährmedien zugegeben. IPTG und X-Gal wurden bei Bedarf in den entsprechenden Mengen auf den Festmedien ausplattiert.

Medienzusätze	Abkürzung	Wirkmechanismus	Lösungsmittel	Arbeitskonz.
Ampicillin	Ap	β -Lactam-Antibiotikum, Hemmung der Mureinbiosynthese	50% Ethanol	100 μ g/ml
Kanamycin	Km	Aminoglycosid, Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an 30S Untereinheit der Ribosomen	H ₂ O _{reinst}	50 μ g/ml
Nalidixinsäure	Nal	Chinolon-Antibiotikum, Hemmung der DNS-Replikation durch Bindung an Gyrase	H ₂ O _{reinst}	6 μ g/ml
Chloramphenicol	Cm	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an 50S Untereinheit der Ribosomen	Ethanol abs. oder Methanol	10 μ g/ml
Gentamycin	Gm	Aminoglycosid, Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an 30S Untereinheit der Ribosomen	H ₂ O _{reinst}	20 μ g/ml
Tetracyclin	Tc	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an 30S Untereinheit der Ribosomen	Ethanol abs. oder Methanol	5 μ g/ml oder 10 μ g/ml
Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid	IPTG	Induzierung des <i>lac</i> -Operons durch Bindung an <i>lac</i> -Repressor	50% Ethanol	0,24 μ g/ml (1mM)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid	X-Gal	Chromogenes Substrat für die β -Galactosidase	N,n-Dimethylformamid	40 μ g/ml

Tabelle B.3: Hemmstoffe und Medienzusätze

B.1.4. Anzucht und Stammhaltung

Das Überimpfen von Bakterienstämmen auf Festmedien und die Inokulation von Flüssigmedien wurde mit einer Impföse bzw. sterilen Zahnstochern, ausgehend von einer Einzelkolonie auf Platte durchgeführt. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:100 beimpft und zur besseren Belüftung im

Schikanekolben kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Brutschränken bzw. lufttemperierten Rundschüttlern bei 200rpm.

E. coli Stämme waren bis zu zwei Monate, Azospirillen bis zu vier Wochen von Agarplatten rekultivierbar, die bei 4°C gelagert wurden. Ausgehend von diesen Kulturen wurden Glycerinkulturen angelegt, die auch nach mehreren Jahren noch rekultiviert werden konnten. Für deren Herstellung wurden Einzelkolonien in 5ml selektivem Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. 1ml dieser Kulturen wurde mit 500µl 50%igem Glycerin versetzt und in ein *Kryoröhrchen* (NUNC, Roskilde, Dänemark) überführt. Die Lagerung erfolgte unmittelbar darauf bei –80°C, wobei das zugesetzte Glycerin die Bildung von Eiskristallen verhindert und dadurch die Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber tiefen Temperaturen gewährleistet.

B.2. Kultivierung von Weizenpflanzen

B.2.1. Verwendete Weizensorten

Im Folgenden sind die einzelnen Kultivare der verwendeten Sommerweizensorten der Art *Triticum aestivum* L. em. Fiori et P aufgelistet, sowie die entsprechenden Angaben über Herkunftsland, erstes Aussaat-Jahr (falls bekannt) und Stammsammlung, von der sie bezogen wurden.

Weizensorte	Herkunftsland	Stammsammlung
Naxos	Deutschland (1996)	IPK, Gatersleben, Deutschland
Nandu	Deutschland (1994)	IPK, Gatersleben, Deutschland
Erbachshofer	Deutschland (vor 1945)	IPK, Gatersleben, Deutschland
Atir	Israel	Jurkevitch, The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, Rehovot, Israel
PF839197	Brasilien	Mackay, Australian Agricultural Collection

Tabelle B.4: Verwendete Weizensorten

B.2.2. Weizen im monoxenischen System

B.2.2.1. Beschreibung des monoxenischen Systems

Bei der Anzucht von Weizenkeimlingen unter monoxenischen Bedingungen wurden die Wurzeln einer Pflanze in einem ansonsten keimfreien (axenischen) System mit einem definierten Bakterienstamm inokuliert. Hierzu wurde Kristallquarzsand (Dorsilit, Firma Sakret, Ottobrunn, Deutschland) der Korngröße Nr. 3 (\varnothing 2-3,5 mm) und Nr. 5 (\varnothing 1,0-2,5 mm) 3 bis 4 mal mit $H_2O_{dem.}$ gewaschen. Etwa 80g des groben Quarzsands wurden in Reagenzgläser (\varnothing 30 mm, Schott Glas, Mainz, Deutschland) gefüllt und mit ca. 20g des feinen Sands überschichtet. Die Reagenzgläser wurden mit Alu-Steck-Kappen (Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland) verschlossen und autoklaviert. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe von 10 ml Hoagland-Medium (Terry *et al.*, 1980) pro Reagenzglas.

Hoagland-Medium:	1000ml $H_2O_{dem.}$ autoklavieren, danach steril zugeben:
(Terry <i>et al.</i> , 1980)	KH_2PO_4 (1 M) 1ml
	K_2HPO_4 (1 M) 1ml
	$MgSO_4$ (2% w/v) 1ml
	$CaCl_2$ (1% w/v) 1ml
	$FeCl_3 \times 6 H_2O$ (0,1% w/v) 1ml
	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ (0,5% w/v) 1ml
	Spurenelementlösung SL-6 1ml

Die Anzucht der Pflanzen im monoxenischen System erfolgte in der Regel für 4 Wochen im Gewächshaus bei einer Tagestemperatur von 15-25°C und 10-15°C in der Nacht. Nach ca. einer Woche wurde das System durch ein zweites steriles Reagenzglas ergänzt, welches mit der Öffnung nach unten auf dem ersten mit Hilfe von *Parafilm*[®] (American National Can, Greenwich, USA) befestigt wurde. Dieses System ermöglichte den Pflanzen bis zu einer Höhe von etwa 30 cm zu wachsen.

B.2.2.2. Samensterilisierung

Zur Verwendung im monoxenischen System mussten die Samen der verschiedenen Weizensorten vor der Inokulation mit dem jeweiligen Bakterienstamm einer Oberflächensterilisierung unterzogen werden, um vorhandene Pilzsporen oder bakterielle Kontaminanten abzutöten. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur in einem kleinen Becherglas mit etwa 30 Samen pro Ansatz und jeweils 10ml der einzelnen Flüssigkeiten durchgeführt:

- Inkubation der Samen in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ mit 1% (v/v) Tween 20 für 2min auf einem Rundschüttler bei 150-200rpm
- Abgießen der Tweenlösung, Zugabe von 70% (v/v) Ethanol und Schütteln der Samen für 5min bei 150-200rpm
- Abschütten des Ethanols, 3 mal waschen mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$.
- Zugabe von Natrium-Hypochlorit-Lösung (6-14% aktives Chlor, Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland) und Inkubation für 20min unter leichtem Schütteln
- Verwerfen des Na-Hypochlorits und anschließende 5 mal mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ waschen
- Mit einer sterilen Pinzette werden jeweils 10 Samenkörner mit der Keimspalte nach unten auf NB-Agarplatten gesetzt und für 3 Tage bei 30°C oder 5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert

Nach dieser Zeit waren in der Regel etwa 30-70% der behandelten Samenkörner ausgekeimt, ohne dass eine sichtbare Kontamination auf den Agarplatten auftrat. Für den Fall, dass ein zu geringer Prozentsatz keimfreier Körner erzielt werden konnte, wurde das oben genannte Protokoll nach der ersten Sterilisierung mit Na-Hypochlorit und dem fünfmaligen Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ wie folgt ergänzt:

- Bedecken der Samen mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ und Quellen für 2-4h
- Verwerfen des $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ und Inkubation für 10-20min mit Na-Hypochlorit unter leichtem schütteln
- Abkippen des Na-Hypochlorits und Waschen der Samen 5 mal mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$.
- Überführen der Körner auf NB-Agarplatten, siehe oben

Durch dieses Aufquellen konnte die Zugänglichkeit der Kornoberfläche für die nachfolgende Behandlung mit Na-Hypochlorit verbessert und besonders bei stark mit Schimmelsporen belastetem Material dennoch eine weitgehende Oberflächensterilisierung erreicht werden.

B.2.3. Weizen im Bodensystem

Für die Kultivierung der Samen im unsterilen Bodensystem wurde ein sandiger, saurer (ca. pH 5) Boden aus der Nähe von Neumarkt in der Oberpfalz, Deutschland verwendet. Der Boden wurde gesiebt (<2mm) und durch Zugabe von 7g CaCO_3 pro kg Boden auf einen pH Wert von ca. 6 gebracht. Mit dieser Mischung wurden Töpfe mit einem Volumen von 400cm^3

befüllt. Samen der verschiedenen Weizensorten wurden auf einem befeuchtete Zellstofftuch in einer Petrischale drei Tage bei 30°C oder 4 bis 5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Wurzeln eine Länge von etwa 1 bis 2cm erreicht hatten. Danach erfolgte die Inokulation mit dem gewünschten Bakterienstamm (siehe B.3.1). Pro Topf wurde eine einzelne Pflanze im Gewächshaus für 4 bis 7 Wochen angezogen und mit 50ml H₂O_{dem.} zweimal in der Woche gegossen. Die Kultivierungsbedingungen entsprachen denen des monoxenischen Systems (s. B.2.2.1).

B.3. Quantifizierung und Lokalisierung von Bakterien auf Wurzeln

B.3.1. Inokulation der Weizenkeimlinge

Übernacht-Kulturen der jeweiligen Bakterienstämme wurden für 5min bei 5000g geerntet (Varifuge 3,2RS, Heraeus Sepatech, München, Deutschland) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal in 10ml 1x PBS-Lösung gewaschen und danach wiederum in 10ml PBS resuspendiert. Die Bestimmung der optische Dichte (OD_{nm}) erfolgte in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer (CE3021, Cecil, Cambridge, Großbritannien) bei einer Wellenlänge von 435 nm. Die gewaschene Bakterienkultur wurde mittels 1x PBS-Lösung bis zu einer OD von 0,7-0,8 (OD₄₃₅) verdünnt, was bei *A. brasilense* und *Herbaspirillum* sp. N3 einem durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen ermittelten Wert von etwa 10⁸ Zellen pro ml entsprach. Von dieser Zellsuspension wurden 40ml in eine sterile Petrischale gegeben und darin Weizenkeimlinge mit einer Wurzellänge von 1 bis 2cm für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die inokulierten Keimlinge jeweils mit einer sterilen Pipette in das monoxenische oder in das Bodensystem überführt.

B.3.2. Wurzelernte und Bestimmung des Wurzelgewichts

Nach 4 bis 7 Wochen wurden die Wurzeln geerntet. Hierzu wurden die Pflanzen unter Vermeidung von Verletzungen aus dem Quarzsand bzw. Boden entnommen und anhaftendes Material durch wiederholtes Waschen in 1xPBS, notfalls auch mit einer sterilen Pinzette entfernt. Die Abtrennung der Wurzeln vom Sprossansatz erfolgte mit einer mittels Ethanol

sterilisierten Schere. Zur späteren Anfertigung von Wurzelschnitten wurden einzelne Abschnitte der Wurzel abgetrennt und bis zur Präparation in 1x PBS-Lösung aufbewahrt. Wurzeln von drei Pflanzen wurden vereinigt, und für die Bestimmung des Trockengewichts zwei Tage bei 70°C getrocknet. Ebenso wurde mit den Sprossen der entsprechenden Pflanzen verfahren.

Sollte eine Quantifizierung der Besiedlung durch *A. brasilense* durchgeführt werden, so war eine Bestimmung des Wurzeltrockengewichts nicht möglich, da dabei die siedelnden Zellen weitgehend abgetötet worden wären. Deshalb wurde wiederum Wurzelmaterial von Pflanzen aus jeweils drei parallelen Ansätzen vereinigt, jedoch erfolgte nach dem Waschen der Wurzeln keine Trocknung, sondern anhaftende Wassertropfen wurden lediglich mit einem sterilen Zellstofftuch entfernt. Danach erfolgte die Bestimmung des Wurzelfrischgewichts mit einer Feinwaage.

B.3.3. Oberflächensterilisierung mit Chloramin T

Mindestens 200mg des frischen Wurzelmaterials wurden mit 10ml einer in H₂O_{dem.} gelösten 1%igen (w/v) Chloramin T Lösung für 10min oberflächensterilisiert (Baldani *et al.*, 1986b, modifiziert). Dabei wurden vor allem Zellen an gut zugänglichen Stellen an der Oberfläche abgetötet, während enger assoziierte oder endophytisch lebende Mikroorganismen überlebten. Nach der Sterilisierung wurde die Lösung abgekippt und die Wurzeln fünfmal mit steriler 1x PBS-Lösung gewaschen.

Weitere 200mg (oder mehr) Wurzelmaterial blieb unbehandelt, wurde aber ebenso 5x gewaschen, um eine Vergleichbarkeit der beiden Ansätze zu gewährleisten.

B.3.4. Keimzahlbestimmung des inokulierten Wurzelmaterials

Sowohl für oberflächensterilisierten als auch für unbehandelte Wurzeln wurde eine Bestimmung der Keimzahl durchgeführt, um einen ersten Hinweis auf eine mögliche endophytische Besiedlung zu erhalten. Je mehr Zellen des untersuchten Stamms als Endophyten im geschützten Inneren der Wurzel leben, desto höher sollten die Zellzahlen nach der Oberflächensterilisierung sein.

B.3.4.1. Plattenkoloniezählung

Zur Durchführung wurden zunächst Pistill und Mörser mit EtOH_{abs.} abgeflammt und wieder abgekühlt. Anschließend wurde pro 100mg Wurzelfrischgewicht 1ml 1x PBS zugegeben und das Wurzelmaterial solange zerrieben, bis sich die Suspension problemlos mit einer 1000µl Pipette aufziehen ließ. Für die Ermittlung der Keimzahl bei in Boden gewachsenen Wurzeln wurde das mit Chloramin T behandelte Wurzelmaterial mit sterilem 1xPBS bis zu einer Stufe von 10⁻⁴, das unbehandelte bis zu einer Stufe von 10⁻⁵ verdünnt. Entsprechend wurden beim monoxenischen System Verdünnungen bis 10⁻⁵ bei oberflächensterilisierten Wurzeln, und 10⁻⁷ bei unbehandelten hergestellt. Von jeweils vier aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden 100µl sechsfach auf NB- oder MMAB-Agarplatten aufgetropft und 2-3 Tage bei 37°C inkubiert.

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte beim monoxenischen System durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten (CFU) auf den NB- und MMAB-Agarplatten. Zur Ermittlung der Keimzahlen auf im Boden gewachsenen Wurzeln konnten NB-Platten nicht verwendet werden, da dieses Vollmedium das Wachstum einer zu große Anzahl verschiedener Mikroorganismen erlaubt, was eine Bestimmung der Azospirillenzahl unmöglich machte. Daher wurden MMAB-Platten verwendet, die zwar ebenfalls das Anwachsen anderer Bakterien als Azospirillen ermöglichen, jedoch in weit geringerer Anzahl. So wurden die CFUs auf MMAB-Platten mit Wurzelmaterial von nicht inokulierten Kontrollpflanzen ermittelt und von den CFUs auf Platten mit Material von *A. brasilense* inokulierten Pflanzen abgezogen. Der so berechnete Wert lieferte die ungefähre Zahl von *A. brasilense* Zellen auf im Boden gewachsenen Weizenwurzeln.

Generell wurden die Keimzahlen stets aus vereinigttem Wurzelmaterial von drei parallel angezogenen Weizenpflanzen ermittelt. Dabei wurden die CFUs der geringsten Verdünnungsstufe ausgezählt, bei der noch separat erfassbare Kolonien zu erkennen waren. Nach der Zählung der sechs parallel aufgetropften Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde der arithmetische Mittelwert gebildet, die zweifache Standardabweichung des Mittelwerts berechnet und die Werte graphisch dargestellt. Dabei liegt der wahre Wert für die bakterielle Keimzahl an der Wurzel mit 95,5% Wahrscheinlichkeit im angegebenen Bereich.

B.3.4.2. Most-Probable-Number(MPN)-Methode

Zusätzlich wurde die Zahl der epi- und endophytisch an der Wurzel siedelnden Azospirillen auch über die MPN-Methode bestimmt. Die Behandlung des Wurzelmaterials erfolgte analog

zu B.3.4.1, wobei die jeweiligen Verdünnungsstufen nicht auf Platten aufgetropft wurden, sondern in drei parallelen Ansätzen auf semisoliden NFB-Medium. Da das verwendete NFB-Medium selektiv für Azospirillen ist, konnte die Zahl besiedelnder *A. brasilense* Zellen auf Wurzeln aus Boden und monoxenischem System auf gleiche Weise ermittelt werden. Nach der Inkubation der inokulierten Kulturgefäße für 2-3 Tage bei 37°C galten jene Gefäße als bewachsen, bei denen sich wenige Millimeter unterhalb der Oberfläche des Mediums ein sogenanntes Pellikel ausbildete, was ein Charakteristikum für das diazotrophe Wachstum von Azospirillen in stickstofffreiem, semisoliden NFB-Medium darstellt. Zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl wurden Gefäße aus dem Bereich der sogenannten „Grenzverdünnung“ herangezogen. Dabei handelt es sich um drei aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen, bei denen die beimpften Kulturgefäße nicht durchwegs bewachsen sind. Beginnend bei der niedrigsten Stufe dieser Grenzverdünnung wurde die Anzahl der bewachsenen Gefäße erfasst, woraus bei drei Parallelansätzen eine dreistellige Stichzahl zwischen 000 und 333 resultiert. Aus der so ermittelten Stichzahl konnte aus Tabelle B.5 ein Wert abgelesen werden, der mit dem Verdünnungsfaktor der niedrigsten Stufe der Grenzverdünnung multipliziert die wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number) ergab.

Stichzahl	MPN	Stichzahl	MPN	Stichzahl	MPN	Stichzahl	MPN
000	<0,3	111	1,10	220	2,10	312	12,00
001	0,3	120	1,10	221	2,80	313	16,00
010	0,3	121	1,50	222	3,50	320	9,30
011	0,61	130	1,60	230	2,90	321	15,00
020	0,62	200	0,92	231	3,60	322	21,00
030	0,94	201	1,40	300	2,30	323	29,00
100	0,36	202	2,00	301	3,80	330	24,00
101	0,72	210	1,50	302	6,40	331	46,00
102	1,10	211	2,00	310	4,30	332	110,00
110	0,74	212	2,70	311	7,50	333	>110,00

Tabelle B.5: MPN-Tabelle für drei parallele Verdünnungsansätze nach McCrady (1915)

Nach deMan (1983) liegt die ermittelte Keimzahl mit 95% Wahrscheinlichkeit zwischen den Grenzwerten $10^{(n-x)}$ und $10^{(n+x)}$, wobei n der dekadische Logarithmus der ermittelten Keimzahl und x der dekadische Logarithmus des entsprechenden Konfidenzintervalls ist. Für drei Parallelansätze gilt: $x = 0,670$.

B.3.4.3. Quantitativer Chemolumineszenz-ELISA

Diese Methode zur Keimzahlbestimmung basiert auf dem unter B.6.3 beschriebenen „enzyme linked immuno-sorbent assay“ (ELISA), der es mit Hilfe hochaffiner, spezifischer Antikörpern erlaubt, Bakterienzellen quantitativ zu detektieren. Entscheidend hierbei ist, neben der spezifischen Bindung des primären Antikörpers, die Detektion mit Hilfe eines Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers. Dieses Enzym setzt bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol unter Lichtemission um, was in einem Luminometer dokumentiert werden kann (B.6.3.2). Beim Vergleich der Lichtemission der untersuchten Proben mit Bakteriensuspensionen definierter Konzentration, kann auf die Zellzahl der auf der Wurzel siedelnden Bakterien rückgeschlossen werden.

Hierzu wurden die Wurzeln wie oben beschrieben geerntet, die Hälfte einer Oberflächensterilisierung mit Chloramin T unterzogen und gründlich mit 1xPBS gewaschen. 1g Wurzelmaterial wurde mit 10ml sterilem 0,1%igem (w/v) Natriumcholat in einem abgeflamnten Mörser zerrieben bis sich die Suspension mit einer 1000µl Pipette problemlos aufziehen ließ. Danach wurden 0,25g Polyethylenglycol PEG1500 (BOEHRINGER, Mannheim, Deutschland) zugegeben, sowie 0,2g Chelating Resin (SIGMA, Steinheim, Deutschland) und bei 4°C für 2h gerührt. Anschließend wurde das Wurzelmaterial einer Ultraschallbehandlung mit 50W für 7min unterzogen, um die Bakterien von den Wurzeln abzutrennen. Die Suspension wurde durch einen 5µm Filter von den groben Partikeln getrennt und die extrahierten Bakterien bei 5000g für 10min geerntet. Um die natürlicherweise vorkommende Peroxidaseaktivität der Wurzelbestandteile zu eliminieren folgte eine Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung nach B.5.1.4. Schließlich wurden die Zellen in 1ml Carbonat-Puffer (50mM, pH 9,6) resuspendiert und nach Durchführung eines Chemolumineszenz-ELISAs im Luminometer (Dynatech ML 1000, DYNATECH, Denkendorf, Deutschland) detektiert. Um einer bestimmten Signalintensität die entsprechende Bakterienkonzentration zuzuordnen zu können, wurde auf die gleiche Mikrotiterplatte eine exponentielle Verdünnungsreihe einer ÜN gewachsenen, zweimal mit 1xPBS gewaschenen Referenzkultur des zu detektierenden Bakteriums in 1xPBS aufgetragen.

B.3.4.4. Zählung fluoreszenzmarkierter Zellen am Mikroskop

Um die Genauigkeit des quantitativen ELISAs zu testen, wurde mit dem gewonnenen, PFA-fixierten Zellextrakt eine FISH (B.5.1) durchgeführt, um die Zellen über fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden zu markieren. Anschließend wurden am Epifluoreszenzmikroskop 10µl der fluoreszenzmarkierten Zellsuspension auf einem Epoxyharz-beschichteten Objektträger

ausgezählt. Es wurden willkürlich 5 Stellen ausgewählt, bei denen jeweils die bakteriellen Fluoreszenzsignale erfasst wurden. Die quadratische Zählfläche wurde durch ein in das Okular eingesetztes Gitternetz definiert, welches bei 1000x Vergrößerung eine Fläche von $0,126 \times 0,126 \text{ mm}^2$ umfasst. Aus den fünf Zählungen wurde das arithmetische Mittel gebildet und die zweifache Standardabweichung des Mittelwerts berechnet. Diese Werte wurden dann mit folgender Formel auf Gesamtzellzahl / ml umgerechnet:

$$\mathbf{Gz} = \bar{\mathbf{x}} \cdot \frac{\mathbf{r}^2 \cdot \boldsymbol{\pi}}{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{V}_t$$

Gz = Gesamtzellzahl/ml

$\bar{\mathbf{x}}$ = Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus den fünf Zählungen

r = Radius des Probenfeldes auf dem Objektträger (3mm)

A = Zählfläche des Gitternetzes ($0,126 \times 0,126 \text{ mm}^2$)

\mathbf{V}_t = Verdünnungsfaktor der ausgezählten Zellsuspension bezogen auf 1ml (100)

B.3.4.5. Bestimmung der Signifikanz anhand von U-Tests

Der U-Test nach Whitney und Mann (Lozan und Kausch, 1998) wurde zur Beurteilung von Unterschieden in den ermittelten Zellzahlen hinsichtlich ihrer Signifikanz herangezogen. Voraussetzung hierfür war, dass die zu vergleichenden Wertegruppen stetig verteilt waren und die gleiche Form besaßen, sowie unabhängig voneinander gewonnen wurden und ordinalskaliert waren. Zunächst wurden alle Stichprobenwerte zur Ordinalskalierung in eine gemeinsame Reihenfolge gebracht, sortiert nach der Wertgröße, d.h. der kleinste Wert aus beiden Stichproben erhielt die Rangzahl 1, der nächst größere die Rangzahl 2 usw. Die Anzahl der einzelnen Stichproben von Wertegruppe A wurde mit n_1 bezeichnet, die Anzahl der Stichproben von Wertegruppe B mit n_2 . Anschließend wurden die Summen der Rangzahlen (R_A und R_B) je Wertegruppe A und B berechnet, sowie im weiteren daraus die Werte U_1 und U_2 nach folgenden Formeln:

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

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

Der kleinere der beiden Werte U_1 und U_2 wurde als U_{Vers} definiert und mit einem empirischen U_{Tab} -Wert in der folgenden U-Tabelle (Lozan und Kausch, 1998) abhängig von der Zahl der Stichproben verglichen:

$n_1 \backslash n_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-																			
2	-	-																		
3	-	-	-																	
4	-	-	-	0																
5	-	-	0	1	2															
6	-	-	1	2	3	5														
7	-	-	1	3	5	6	8													
8	-	0	2	4	6	8	10	13												
9	-	0	2	4	7	10	12	15	17											
10	-	0	3	5	8	11	14	17	20	23										
11	-	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30									
12	-	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37								
13	-	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45							
14	-	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55						
15	-	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64					
16	-	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75				
17	-	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87			
18	-	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99		
19	-	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	
20	-	2	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127

Tabelle B.6: U-Tabelle nach Lozan und Kausch (1998)

Ist $U_{\text{Vers}} > U_{\text{Tab}}$ kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Das bedeutet, dass kein biologischer Effekt erkennbar ist, also kein signifikanter Unterschied zwischen den gewählten Wertegruppen A und B nachweisbar ist.

Ist $U_{\text{Vers}} \leq U_{\text{Tab}}$ wird die Nullhypothese abgelehnt. Es liegt ein biologischer Effekt vor. Die Wertegruppen A und B unterscheiden sich signifikant.

B.3.5. Vorbereitung der Wurzeln zur mikroskopischen Detektion von Bakterien

B.3.5.1. Präparation von Wurzelschnitten

Grundsätzlich konnte die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auch an ungeschnittenen Wurzelstücken durchgeführt werden (s. B.5.1). Da die Zugänglichkeit von endophytisch siedelnden Bakterien für 16S rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden jedoch begrenzt ist, erfolgte ebenfalls die Anfertigung von Wurzelschnitten. Hierzu wurde ein kleiner Styroporblock in der Mitte eingeschnitten und dazwischen ein Stück der in 1x PBS aufbewahrten, frisch geernteten Wurzeln (s. B.3.2) eingeklemmt. Mit einer Rasierklinge wurden mehrere, zwischen 50 und 100µm dicke Quer- oder Längsschnitte von allen Teilen

der Wurzel angefertigt. Diese wurden jeweils in einen Tropfen H_2O_{reinst} auf einen Epoxyharzbeschichteten Objektträger mit 10 Aussparungen (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) gelegt. Die Schnitte wurden daraufhin bei 70°C für ca. 30 Minuten auf Objektträgern hitzefixiert. Im Anschluss an die PFA-Fixierung (s. B.5.1.4) wurden die Wurzelschnitte bei 4°C für maximal zwei Wochen aufbewahrt. Nach der Hybridisierung mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden konnten die auf der Wurzel siedelnden Zellen mit Hilfe eines Confocalen Laser Scanning Mikroskops (CLSM, s. B.4.2) detektiert werden.

B.3.5.2. Wurzeln mit GFP-markierten Bakterien

Die mit GFP-markierten Bakterienstämmen inokulierten Weizenpflanzen wurden wie in B.3.2 beschrieben geerntet und gewaschen. Zur mikroskopischen Auswertung des Kolonisierungsverhaltens der inokulierten Stämme wurden intakte Wurzelabschnitte auf Objektträger gelegt und, um Ausbleichen zu verhindern, mit Citifluor-AF1 (CITIFLUOR Ltd., London, GB) überschichtet. Um bei der Auswertung am CLSM das Verrutschen des verwendeten Deckglas aufgrund der Dicke des Präparats zu vermeiden, wurde es mit Klebestreifen oder Nagellack auf dem Objektträger befestigt.

B.4. Mikroskopische Methoden

B.4.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Die Detektion von Reinkulturen erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axioplan der Firma ZEISS (Oberkochen, Deutschland). Zur Auswertung wurde ein Ölimmersionsobjektiv (Plan-Neofluar, numerische Apertur 1,3) mit 100facher Vergrößerung verwendet. Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilberdampfampe erzeugt. Die verwendeten Fluoreszenzfiltersätze wurden von der Firma AFANALYSENTECHNIK (Tübingen, Deutschland) bezogen, ihre Kenndaten sind in nachfolgender Tabelle B.7 aufgeführt.

Fluorochrom	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter
Grüne Fluoreszenz; Fluorescein und GFP	HQ 480/40	Q 505LP	HQ 535/50
Orangerote Fluoreszenz; Cy3	HQ 535/50	Q 565LP	HQ 605/75

Tabelle B.7: Verwendete Fluoreszenzfiltersätze bei der Detektion verschiedener Fluorochrome im Epifluoreszenzmikroskop

B.4.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

B.4.2.1. Prinzip und Einsatzmöglichkeiten

Dieses mikroskopische Verfahren unterscheidet sich in einigen wesentlichen Eigenschaften von der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie, was vor allem bei der Betrachtung dickerer Objekte ($>10\mu\text{m}$) wie beispielsweise Wurzeln von entscheidender Bedeutung ist. Beim Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) erfolgt die Fluoreszenzanregung einzelner Punkte eines Präparats mit Hilfe eines Lasers, welcher Licht einer definierten Wellenlänge (monochromatisches Licht) liefert. Ein Scan-Spiegel ermöglicht ein sukzessives Abtasten des Objekts, wobei ein Strahlteiler, der das kurzwelligere Anregungslicht passieren lässt, die resultierende langwelligere Fluoreszenz umlenkt. Das Licht wird so auf eine konfokale Lochblende fokussiert, dass nur Strahlen von der Fokusebene die Blendenöffnung passieren können, während unfokussiertes Licht abgeblockt wird. So ist bis zu einer Tiefe von ungefähr $40\mu\text{m}$ innerhalb des Präparats eine scharfe Abbildung der Fokusebene ohne störendes Streulicht möglich. Die Lichtstrahlen, welche die Blende passieren, werden von einem Photomultiplier detektiert und als digitales 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 mitgelieferten Software ist man in der Lage das entstandene Bild digital aufzubereiten und auszuwerten. In erster Linie werden dabei dem detektierten Grautonbild Farbkanäle zugeordnet, die die Wellenlängenspezifität der einzelnen Fluoreszenzsignale verdeutlichen sollen. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Bildern wurden den Fluorochromen Fluorescein (Fluos) und Cy3 ihre tatsächlichen Fluoreszenzfarben grün bzw. rot zugeordnet, während die Cy5-Fluoreszenz blau dargestellt wurde, obwohl der Farbstoff im langwelligen roten Bereich emittiert. Dies wurde aufgrund der besseren Unterscheidbarkeit der einzelnen Fluoreszenzsignale bei der gemeinsamen Darstellung als RGB (rot-grün-blau)-Bilder vorgenommen.

Mit Hilfe des CLSMs ist es auch möglich, dreidimensionale Darstellung eines Objekts zu erzeugen, indem unter Veränderung der Fokusposition entlang der z-Achse in regelmäßigen, definierten Abständen Aufnahmen von einem bestimmten xy-Bereich gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit betrug dieser Abstand $1\mu\text{m}$. Die so erzeugten z-Stapel werden im Rechner zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt, das im sogenannten orthogonalen Darstellungsmodus auch ohne weitere Hilfsmittel betrachtet und analysiert werden kann.

Schließlich ist mittels CLSM auch eine Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen einer Reinkultur durchführbar. Da in den erzeugten monochromen Bilder unterschiedliche Helligkeiten der dokumentierten Signale in 256 Graustufen wiedergeben werden, kann über ein Histogramm die jeweilige Zahl der Pixel mit einem Grauwert einer bestimmten Helligkeitsstufe ermittelt werden. Somit ist es möglich, einen durchschnittlichen Grauwert für das jeweilige Bild zu errechnen, womit man ein Maß für die Stärke der Fluoreszenzsignale in der erfassten Fläche erhält.

B.4.2.2. Kenndaten des verwendeten CLSM

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) der Firma ZEISS (Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einem Argon- und zwei Helium-Neon-Lasern verwendet. Ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat[®] 63x/1,2 W Korr mit 63facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 war für die Betrachtung biologischer Präparate in wässrigem Medium erforderlich. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Software Zeiss LSM Image Browser Version 2.80. Alle weiteren Daten finden sich in Tabelle B.8.

Fluorochrom	Absorptions-maxima [nm]	Emission-maxima [nm]	Laser [nm]	Strahlteiler	Filter
GFP (red shifted)	498	516	Argon 488	NFT 490 HFT 488/543	BP 500-550
FLUOS	490, 494	520, 525	Argon 488	NFT 490 HFT 488/543	BP 500-550
Cy3	514, 552, 554	566, 570	Helium-Neon 543	HFT 488/543	LP 560
Cy5	649	666, 670	Helium-Neon 633	HFT UV/488 /543/633	LP 650

Tabelle B.8: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, sowie der entsprechenden Filtersätze und Laser bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

B.4.2.3. Einstellungen bei der Bildaufnahme

Zunächst war es vor einer Aufnahme mit dem CLSM notwendig eine Einstellung der konfokalen Lochblende vorzunehmen (meist 1 Airy Unit), sowie ein Über- oder Untersteuern der dokumentierten Fluoreszenzsignale durch die Optimierung von Kontrast und Helligkeit zu vermeiden. In der Normaleinstellung rasterte der Laserstrahl ein quadratisches Areal aus dem Sichtfeld mit 146µm Kantenlänge und setzte dieses in ein digitales Bild mit 512 x 512 Pixel um. Durch Verringerung der Kantenlänge dieses Ausschnitts ließ sich ein „digitales zoomen“

erreichen, was aufgrund der hohen Auflösung des verwendeten Objektivs eine weitere Vergrößerung des Bildes um den Faktor 2 ohne wesentlichen Qualitätsverlust erlaubte. Mit der „Average-Funktion“ war es außerdem möglich eine bestimmte Zahl von Wiederholungen der Rasterung bei der Bilderfassung durchzuführen und die erfassten Signalstärken zu mitteln, was zu einer „Glättung“ des Bildes führte.

B.5. Molekulargenetische Methoden

B.5.1. Fluoreszierende *in situ* Hybridisierung (FISH)

Diese Methode ermöglicht die phylogenetische Identifizierung und Quantifizierung einzelner Mikroorganismen direkt in ihrem Mikrohabitat, wobei als Zielmolekül der meisten Oligonukleotidsonden die ribosomale RNS dient. Dieses auch als molekularer Chronometer bezeichnete Molekül eignet sich wegen seiner funktionellen Konstanz, der hohen Kopienzahl und der Struktur mit konservierten und variablen Regionen besonders für phylogenetische Analysen. Die Oligonukleotide sind zu unterschiedlich konservierten Sequenzen der ribosomalen RNS komplementär, wodurch je nach Spezifität der Sonde eine Unterscheidung von Mikroorganismen bis auf Artniveau möglich ist.

Material

Carbonatpuffer:	NaHCO ₃ (1M)	84g
	Na ₂ CO ₃ (1M)	106g
	ad H ₂ O _{reinst}	1000ml
	pH 9,0	
10 x PBS (Stammlösung):	NaH ₂ PO ₄ (100mM)	12g
	Na ₂ HPO ₄ (100mM)	14,2g
	NaCl (1,3M)	76g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 7,2-7,4	
4% Paraformaldehydlösung:	45 ml H ₂ O _{reinst} auf 60-65°C erwärmen, dann zugeben:	
	Paraformaldehyd	2g
	10N NaOH	bis Lösung klar wird
	10xPBS	5ml
	pH 7,2-7,4	
	sterilfiltrieren mit 0,45µm Filter	
Lagerung bei 4°C für max. 1Woche		

0,5M EDTA-Lösung:	Na ₂ -Ethylendiamintetraacetat	186g
	NaOH Plättchen	20g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
	pH 8,0	

B.5.1.1. Konstruktion von rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Zur Entwicklung von spezifischen Oligonukleotidsonden wurde die Funktion „Probe-Design“ des ARB-Software-Pakets (Strunk and Ludwig, 1997) verwendet. Mit Hilfe der „Probe Match“ Funktion war es möglich, die Spezifität der Sonden gegenüber anderen Mikroorganismen der Datenbank zu überprüfen.

B.5.1.2. Verwendete Oligonukleotidsonden

In Tabelle B.9 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden aufgeführt. Die meisten Sonden kamen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen zum Einsatz. Eine Auflistung der verwendeten Fluorochrome, ihrer Anregungs- und Emissionswellenlängen findet sich in Tabelle B.8. Alle Oligonukleotidsonden mit den fluoreszierenden Farbstoffen Cy3, Cy5 und Fluorescein (Fluos) wurden von THERMO ELECTRON CORPORATION (Ulm, Deutschland) bezogen.

Sonde	Spezifität	Bindungs-Position ¹	Sondensequenz 5'-3'	% FA ²	Referenz
EUB338 I ³	<i>Bacteria</i> ohne <i>Planctomycetales</i> , <i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	var.	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338 II ³	<i>Planctomycetales</i>	16S, 338-355	GCA-GCC-ACC-CGT-AGG-TGT	var.	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338 III ³	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT-GCC-ACC-CGT-AGG-TGT	var.	Daims <i>et al.</i> , 1999
ALF1B	α - <i>Proteobacteria</i> , einige δ - <i>Proteobacteria</i> , <i>Spirochaeten</i>	16S, 19-35	CGT-TCG-YTC-TGA-GCC-AG	20	Manz <i>et al.</i> , 1992
BET42a	β - <i>Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	GCC-TTC-CCA-CTT-CGT-TT Kompetitor-Oligo: GCC-TTC-CCA-CAT-CGT-TT	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
Abras1420	<i>Azospirillum brasilense</i>	16S, 1420-1438	CCA-CCT-TCG-GGT-AAA-GCC-A Kompetitor-Oligo: CAC-CTT-CGG-GTA-AAA-CCA	45	Stoffels <i>et al.</i> , 2001
HERB 68	<i>Herbaspirillum</i>	16S, 68-85	AGC-AAG-CTC-CTA-TGC-TGC	35	Kirchhof <i>et al.</i> , 2001
HERB 1432	<i>Herbaspirillum</i>	16S, 1432-1449	CGG-TTA-GGC-TAC-CCA-CTT	35	Kirchhof <i>et al.</i> , 2001
Hfris445	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	16S, 445-462	TCC-AGA-ACC-GTT-TCT-TCC	50	Kirchhof <i>et al.</i> , 2001
Hsero445	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	16S, 445-462	GCC-AAA-ACC-GTT-TCT-TCC	35	Kirchhof <i>et al.</i> , 2001
HerbN3	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> , <i>Herbaspirillum</i> sp. N3	16S, 446-463	ACC-AAG-ACC-GTT-TCT-TCC	35	Diese Arbeit

Tabelle B.9: Verwendete rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden

¹ Position in der rRNS von *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981)

² verwendete Formamidkonzentration in Prozent (v/v) im Hybridisierungspuffer

³ EUB338I, II, III werden als äquimolare Mischung zur Detektion der Domäne *Bacteria* eingesetzt.

B.5.1.3. Einstellen der Konzentration von Oligonukleotidsonden

Die DNS- Konzentration der Oligonukleotidsonden pro ml Stammlösung wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden Cy3 und Cy5 markierte Sonden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, Fluos markierte in Carbonatpuffer gelöst und im Spektralphotometer (CE 3021, Cecil Instruments Limited, Cambridge, GB) in einer 1:200 Verdünnung vermessen. Das Absorptionsmaximum für DNS liegt bei 260nm, für die Farbstoffe siehe Tabelle B.8. Die Farbstoffmarkierungsrate konnte anhand des Quotienten aus Nukleotidabsorption (OD_{260}) und Farbstoffabsorption überprüft werden. Der ermittelte Wert war bei vollständiger Umsetzung gleich dem Quotienten der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ). Geht man von einer mittleren Länge von 18 Basen für die Oligonukleotide aus, ist dieser Wert bei Fluos markierten Sonden 2,5-3, bei Cy3 Markierung ca. 2 und bei Cy5 Markierung ca. 1. Die DNS-Konzentration von einzelsträngiger DNS in wässriger Lösung wurde näherungsweise nach folgender Formel berechnet (Cryer *et al.*, 1975):

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

Aus diesen Stammlösungen wurden Arbeitslösungen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ in den folgenden Konzentrationen hergestellt:

Cy3, Cy5 → **30 μg DNS/ml**

Fluos → **50 μg DNS/ml**

Stamm- und Arbeitslösungen wurden bei -20°C gelagert.

B.5.1.4. Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Paraformaldehyd (PFA) induziert die Quervernetzung der Zellwände, wodurch die Zellen bei der Lagerung über lange Zeiträume formstabil bleiben. Gram-negative Bakterien als Reinkulturen, Wurzelschnitten und ganze Wurzeln wurden mit einer 4%igen PFA-Lösung fixiert (Amann *et al.*, 1990, modifiziert). 2ml einer ÜN-Kultur wurden für 2-3min bei 8000rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 200 μl 1xPBS-Lösung resuspendiert, mit 600 μl 4% PFA-Lösung (Verhältnis PFA/PBS 3:1) vermischt und für mindestens 1h oder ÜN bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert, zweimal in 1xPBS gewaschen und in einer 1:1 PBS/ EtOH_{abs} Mischung bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

Grundsätzlich erfolgte die Fixierung von Wurzelschnitten und ganzen Wurzeln ebenfalls mit 4% Paraformaldehyd. Die nach B.3.5.1 präparierten Wurzelschnitte wurden nach der Hitzeimmobilisierung direkt auf dem Objektträger mit 10µl PFA überschichtet und in einem 50ml Probengefäß vor Verdunstung geschützt bei 4°C mindestens für 2h inkubiert. Danach wurde das PFA vorsichtig mit H₂O_{reinst} abgespült. Ähnlich wurde mit ganzen Wurzeln verfahren, wobei die Durchführung im ERG erfolgte und die Wurzel mit einer Pinzette in die verschiedenen Lösungen überführt wurden.

B.5.1.5. Hybridisierung mit rRNS gerichteten Oligonukleotidsonden

Für die Hybridisierung von Reinkulturen wurden je nach Zelldichte 1-3µl der fixierten Bakteriensuspension auf Epoxyharz-beschichtete Objektträger mit 6 bzw. 10 Aussparungen (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. Wurzelschnitte befanden sich bereits auf solchen Objektträgern und wurden im Folgenden wie Reinkulturen behandelt. Bei der FISH mit ganzen Wurzeln erfolgten alle Schritte außer dem stringenten Waschen im ERG.

Der Objektträger mit dem Probenmaterial bzw. die Wurzel wurde in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 80%, 100% v/v) für je 3-5min entwässert und anschließend luftgetrocknet. Bei der folgenden Hybridisierung wurde die Stringenz (Bindungsstärke) durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer eingestellt, wobei durch Schwächung der Wasserstoffbrücken zwischen DNS-Oligonukleotidsonde und rRNS die Bindungsstärke des Hybrids verringert wird. So erniedrigt die Zugabe von 1% Formamid zum Hybridisierungspuffer die Dissoziationstemperatur des Hybrids um ca. 0,5°C, d.h. also je mehr Formamid im Puffer enthalten ist, desto stringenter sind die Hybridisierungsbedingungen.

Die verwendete Formamidkonzentration war abhängig von der jeweils eingesetzten Oligonukleotidsonde und wurde empirisch ermittelt bzw. der entsprechenden Literatur entnommen. Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers war wie folgt:

Hybridisierungspuffer:	NaCl (5M)	360µl
	Tris/HCl (1M, pH 8,0)	40µl
	Formamid	siehe Tabelle B.10
	H ₂ O _{reinst}	siehe Tabelle B.10
	SDS (10% w/v)	2µl

Formamid [%]	Formamid [μ l]	H ₂ O _{reinst} [μ l]
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
55	1100	500
60	1200	400
65	1300	300
70	1400	200
75	1500	100
80	1600	0

Tabelle B.10: Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur

Zur Hybridisierung wurde auf jedes Feld mit Reinkulturen bzw. präparierten Wurzelquerschnitten eine Mischung von 1 μ l Sondenarbeitslösung (30 μ g/ml DNS) und 8 μ l Hybridisierungspuffer pipettiert. Ganze Wurzeln wurden im ERG mit einem geeigneten Vielfachen dieser Mischung bedeckt (meist 100-200 μ l). Zur Hybridisierung mit zwei Sonden bei derselben Formamidkonzentration wurde von der zweiten Sonde ebenfalls 1 μ l in denselben Reaktionsansatz gegeben. Für Sonden, die zur Einhaltung der Stringenz unterschiedliche Formamidkonzentrationen benötigen, wurde eine sukzessive Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde mit der Sonde begonnen, die eine höhere Formamidkonzentration benötigt. Nach Beendigung der Waschphase (siehe unten) und anschließender Lufttrocknung wurde eine zweite Hybridisierungsprozedur angeschlossen. Der mit Hybridisierungslösung bedeckte Objektträger wurde anschließend in ein 50ml Probengefäß überführt. Um ein Verdunsten der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde der Rest des hergestellten Hybridisierungspuffers auf ein Stück Zellstofftuch gegeben und ebenfalls in das Probengefäß überführt. Die Proben wurden für mindestens 1,5h bei 46°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung erfolgte ein stringenter Waschschrift, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Damit die Menge an toxischem Formamidabfall möglichst gering gehalten wurde, erfolgte die Einstellung der benötigten Stringenz durch Variation der NaCl-Konzentration im Waschpuffer. Ab 20% Formamid wurde zusätzlich zur Komplexierung störender zweiwertiger Kationen 500 μ l 0,5M Na-EDTA-Lösung zugegeben. Ab 65%

Formamid im Hybridisierungspuffer diene die Variation der Na-EDTA-Konzentration allein zur Einstellung der benötigten Stringenz.

Waschpuffer:	Tris/HCl (1M, pH 8,0)	1ml
	Na-EDTA (0,5M, pH 8,0)	500 μ l
	NaCl (5M)	siehe Tabelle B.11
	ad H ₂ O _{reinst}	50ml
	SDS (10% w/v)	50 μ l

Formamid im Hybridisierungspuffer [%]	NaCl [mol]	μ l NaCl [5 M] (von 20-65% FA Zugabe von 500 μ l 0,5M Na-EDTA)
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,014	40
65	0,010	-
70	0,007	350 μ l EDTA
75	0,005	250 μ l EDTA
80	0,0035	175 μ l EDTA

Tabelle B.11: NaCl-Konzentration im Waschpuffer bei 48°C Waschttemperatur

Die Objektträger wurden 10-15min im vorgewärmten Waschpuffer bei 48°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend vorsichtig in H₂O_{reinst} geschwenkt und luftgetrocknet. Ebenso wurde mit ganzen Wurzeln verfahren, welche anschließend auf einen Standard-Objektträger gelegt wurden.

Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu vermindern, wurden die fertigen Präparate in Citifluor-AF1 (CITIFLUOR Ltd., London, Großbritannien) eingebettet. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas versehen, das falls nötig mit einem Klebestreifen oder Nagellack fixiert wurde, und sofort ausgewertet.

B.5.2. Isolierung von DNS

B.5.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Hochwertiger Plasmid-DNS für präparative Zwecke (Sequenzierung und Klonierung) wurde mit Hilfe des kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits *NucleoSpin[®] Plasmid* der Firma MACHEREY & NAGEL (Düren, Deutschland) isoliert. Alle benötigten Puffer und Lösungen wurden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist der Zellaufschluss durch alkalische Lyse und die Aufreinigung der DNS mittels Säulenchromatographie. Dabei wird die Eigenschaft der DNS genutzt, an eine spezifisch dafür entwickelte Säulenmatrix zu binden. Die Präparation erfolgte nach Vorgabe des Herstellers gemäß beigefügtem Handbuch. Die isolierte Plasmid-DNS konnten in dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer oder in H₂O_{reinst} bei -20°C für mehrere Jahre gelagert werden.

B.5.2.2. Isolierungen chromosomaler DNS

Die Isolierung hochmolekularer DNS aus Reinkulturen wurde mit Hilfe des Isolierungskits *NucleoSpin[®] Tissue* der Firma MACHEREY & NAGEL durchgeführt und erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Puffer gemäß Herstellerangaben. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist ein Zellaufschluss mittels Proteinase K in SDS-Lösung und anschließender Aufreinigung der DNS analog zur Plasmidisolierung. Die eluierte DNS war in dem im Lieferumfang enthaltenen BE-Puffer bei 4°C für etwa 2-3 Monate haltbar.

B.5.3. Reinigung und Konzentrierung von DNS-Fragmenten

Reinigung, Aufkonzentrierung und Umpufferung von gelöster DNS nach enzymatischer Modifikation, sowie die Abtrennung amplifizierter PCR-Fragmente von den Agenzien der PCR-Reaktion und die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *NucleoSpin[®] Extract* Kit der Firma MACHEREY & NAGEL. Auch diese Methode beruht auf der Bindung der DNS an die Matrix der im Kit enthaltenen Chromatographiesäulen, wodurch eine Abtrennung von Verunreinigungen möglich wird. Alle benötigten Lösungen und das Arbeitsprotokoll sind im Kit enthalten.

B.5.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS in wässriger Lösung

Die zu vermessende DNS wurde in Quarzküvetten ($d = 10\text{mm}$, neoLab, München, Deutschland) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ verdünnt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260\text{nm}$ liegt, wurde die Absorption bei dieser Wellenlänge gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ im Spektralphotometer (CE 3021, CECIL INSTRUMENTS Ltd., Cambridge, Großbritannien) bestimmt. Außerdem wurde zur Reinheitskontrolle die Absorption auch bei $\lambda = 230\text{nm}$ und $\lambda = 280\text{nm}$ ermittelt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte gemäß der Formel (Clark and Swika, 1977):

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}/22 = \text{Konzentration (mg/ml)}$$

Meist ist die Näherung 1 OD_{260} entspricht $50\mu\text{g/ml}$ ausreichend (Cryer *et al.*, 1975), wodurch sich folgende vereinfachte Gleichung ergibt:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

Verunreinigungen der DNS mit Protein oder Phenol erhöhen die Absorption bei 280nm , Verunreinigungen mit RNS die Absorption bei 230nm . Für eine ausreichend reine DNS-Probe nimmt der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ einen Wert größer 2,0 und der Absorptionskoeffizient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ einen Wert größer 1,8 ein (Marmur, 1961; Sambrook *et al.*, 1989).

B.5.5. Enzymatische Modifikation von DNS

B.5.5.1. Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammen von der Firma MBI-FERMENTAS, Vilnius, Litauen. Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen sind der entsprechenden Produktbeschreibung des Herstellers zu entnehmen.

Für analytische Zwecke wurden $0,2$ bis $0,5\mu\text{g}$ DNS in einem Gesamtvolumen von $10\mu\text{l}$ mit 1 bis 5U Restriktionsendonuklease und entsprechendem Puffer für 4-16 Stunden bei der enzymespezifischen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Nach der enzymatischen Modifikation

wurde die DNS mit Auftragspuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel (s. B.5.6) aufgetragen.

Für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten für Klonierungen wurden 1 bis 5µg DNS in einem Gesamtvolumen von 20–50µl mit 5–10U Restriktionsendonuklease für mindestens 4 Stunden oder ÜN inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurde das Enzym entweder durch Hitze inaktiviert (nur bei thermolabilen Enzymen möglich) oder über eine präparative Agarosegelelektrophorese (s. B.5.6.4) von der DNS-Probe getrennt.

B.5.5.2. Dephosphorylierung linearer DNS-Moleküle

Die Abspaltung endständiger 5'-Phosphatgruppen verhindert die Religation von linearisierten Vektor-Molekülen. Die Dephosphorylierung wurde direkt nach dem Restriktionsverdau im selben Ansatz durchgeführt. Dabei wurde der Verdau mit 5µl des mitgelieferten 10x Puffers, 1U alkalischer Phosphatase aus Kälbermägen (MBI-FERMENTAS, Vilnius, Litauen) und dem entsprechenden Volumen H_2O_{reinst} auf 50µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 37°C für 30min inkubiert und schließlich das Enzym für 15min bei 85°C vollständig deaktiviert. Meist schloss sich eine präparative Gelelektrophorese (s. B.5.6.4) zur Aufreinigung und Auftrennung der erhaltenen Fragmente an.

B.5.5.3. Ligation von DNS-Molekülen

Zur Zirkularisierung linearisierter DNS-Fragmente, z.B. Vektor- und Insert-DNS, wurde die *T4-DNA-Ligase* (MBI-FERMENTAS, Vilnius, Litauen) mit dem zugehörigen Ligasepuffer verwendet. Hierbei wird die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien 3'-OH-Gruppe des einen und der 5'-OH-Gruppe des anderen DNS-Fragmentes katalysiert. Hierfür wurde etwa 50-400ng Vektor-DNS mit einem drei- bis vierfachen molaren Überschuss an Insert-DNS gemischt. Des Weiteren wurde 1/10 des Endvolumens 10x konzentrierter Ligasepuffer und je nach eingesetzter DNS-Menge 1-5U Ligase zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 4-16 Stunden bei 22°C inkubiert oder 2-3 Tage bei 4°C. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10min bei 65°C, was laut Herstellerangaben die Effizienz der nachfolgenden Transformation erhöht.

B.5.6. Elektrophoretische Trennung von DNS-Fragmenten und Gelelution

Die Geschwindigkeit, mit der lineare DNS-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern, ist innerhalb einer Agarosegelmatrix abhängig von ihrem Molekulargewicht.

In mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen ist es deshalb möglich, anhand von Fragmenten mit bekannter Größe (λ -Standard), die Länge von linearisierten, unbekanntem DNS-Fragmenten zu bestimmen. Nach Ausschneiden gewünschter Fragmente aus dem Gel und Auflösung der Gelmatrix können zudem bestimmte Fragmentgrößen präpariert werden.

Material

50x TAE-Puffer:	Tris-HCl (2M)	242g
	EDTA (0,1M)	37g
	H ₂ O _{dem.}	800ml
	pH 8,8 mit Eisessig	
	ad H ₂ O _{dem.}	1000ml
Ethidiumbromidlösung: (ROTH, Karlsruhe, Deutschland)	Ethidiumbromid (1% w/v)	50 μ l
	ad H ₂ O _{dem.}	500ml

B.5.6.1. Agarosegelelektrophorese

Es wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die durch Kochen in 1x TAE-Puffer gelöste 0,8–2%ige (w/v) Agarose wurde in die mit Klebeband abgedichteten Gelträger mit eingesetzten Probekämmen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt und vollständig mit Puffer bedeckt. Anschließend konnten die Kämme gezogen werden. Die DNS-Lösung wurde mit 1/6 des Endvolumens 6x *Loading Dye Solution* (MBI-FERMENTAS, Vilnius, Litauen) versetzt, in die Taschen des Gels gefüllt und bei 80–120mA elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker (Bromphenolblau, Xylen-Cyanol) kann der Lauf optisch mitverfolgt und dementsprechend abgebrochen werden. In einem 0,8%igen Agarosegel verhält sich Bromphenolblau wie ein DNS-Fragment von 300bp Größe, Xylen-Cyanol hingegen wie ein 4.000bp Fragment.

B.5.6.2. Anfärben und Dokumentation von Agarosegelen

Der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid ermöglicht die Detektion von DNS-Molekülen im Gel. Zur Anfärbung wurden Agarosegele nach der Elektrophorese 15–60min in die Ethidiumbromidlösung gelegt und anschließend in H₂O_{dem.} gewaschen. Die Detektion der DNS-Banden erfolgte unter UV-Licht bei $\lambda = 312\text{nm}$ am Transilluminator (VILBER LOURMAT, Marne La Vallée, Frankreich) und wurde mit einem Video-Dokumentationssystem (NTAS, Göttingen, Deutschland) fotografisch dokumentiert.

B.5.6.3. Längenbestimmung von DNS-Fragmenten

Die elektrophoretischen Laufstrecke von linearisierten DNS-Molekülen steht in linearer Beziehung zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Daher lässt sich durch Auftragen eines DNS-Längenstandards zusammen mit einer zu analysierenden DNS-Probe auf demselben Agarosegel die Größe unbekannter DNS-Fragmente ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Längenstandards verwendet: *GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder* und *GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder* (MBI-FERMENTAS, Vilnius, Litauen).

B.5.6.4. Präparative DNS-Gelelektrophorese

Die präparative DNS-Gelelektrophorese dient der Abtrennung von DNS-Fragmenten aus einem Gemisch von DNS-Banden unterschiedlicher Größe (z.B. Restriktionsansatz). Sie verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die unter B.5.6.1 beschriebene analytische Agarosegelelektrophorese. Um eine möglichst schonende Isolation des gewünschten DNS-Fragmentes zu erreichen, sind jedoch einige Besonderheiten zu beachten:

- Zur scharfen Abtrennung größerer DNS-Mengen wird die Gelelektrophorese mit geringerer Stromstärke (60–100mA) in frischem 1x TAE-Puffer durchgeführt
- Das Agarosegel nur kurz (10–15min) mit frischer Ethidiumbromidlösung färben
- Die zu isolierende DNS-Bande möglichst rasch im UV-Licht detektieren und den entsprechenden Gelbereich mit einem sauberen Skalpell ausschneiden
- Das Agarosestückchen in ein ERG überführen und nach B.5.3 eluieren

B.5.7. Amplifikation von spezifischen DNS-Fragmenten durch PCR

B.5.7.1. PCR-Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden bei THERMO ELECTRON CORPORATION (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotidprimer. Zur Bestimmung der Temperatur kann näherungsweise die „2+4“- Regel angewendet werden (Suggs *et al.*, 1981):

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

An die verwendeten Primer wurde häufig am 5'-Ende die Erkennungssequenzen eines bestimmten Restriktionsenzym angehängt. Um einen zuverlässigen Verdau der endständigen Restriktionsschnittstellen zu gewährleisten, war das Hinzufügen einiger weiterer Basen (meist

drei) am 5'-Ende der Primer notwendig. Sequenzen, angehängte Restriktionsschnittstellen und spezifische Annealing-Temperaturen sind im Anhang unter Punkt G.2 wiedergegeben.

Die lyophilisierte Primer-DNS wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst, so dass die Konzentration der gewonnenen Stammlösungen 100pmol/ μl betrug. Die daraus hergestellte Arbeitslösungen von 5pmol/ μl und die Primer-Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

B.5.7.2. DNS-Polymerasen

Für die PCR wurden folgende Polymerasen verwendet:

- *Herculase* Hotstart DNA Polymerase von STRATAGEN (La Jolla, USA)

Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus *Pfu* und *Taq* Polymerase, wobei erstere eine $3' \rightarrow 5'$ -Exonucleaseaktivität (Proofreading) aufweist. Diese Polymerasekombination eignet sich besonders für die Amplifikation von DNS mit niedriger Fehlerrate. Dabei wird erst durch die Denaturierung von an die Polymerase gekoppelten Antikörpern zu Beginn der PCR-Reaktion die volle Enzymaktivität hergestellt (Hotstart). Dadurch werden unspezifische Amplifikationen bei Raumtemperatur vor der ersten Denaturierung im PCR-Cycler verhindert.

- *Taq* DNA Polymerase von PROMEGA (Madison, Wisconsin, USA)

Diese DNS-Polymerase besitzt keine $3' \rightarrow 5'$ -Exonucleaseaktivität, wodurch die Replikation der Matrize zwar schneller erfolgen kann, jedoch auch mit einer höheren Fehlerrate. Sie eignet sich besonders zur Amplifikation von DNS-Fragmenten, die zur Klonierung mit dem *TOPO TA Cloning[®] Kit* bzw. *pGem-T Vector System* (s. B.5.7.6) vorgesehen sind, da die überhängenden A-Enden der PCR-Produkte, die bei der Ligation von entscheidender Bedeutung sind, nicht durch eine $3' \rightarrow 5'$ -Exonucleaseaktivität der Polymerase entfernt werden.

- *Taq* DNA Polymerase von MBI-FERMENTAS (Vilnius, Litauen)

Auch dieses Enzym weist keine $3' \rightarrow 5'$ -Exonucleaseaktivität auf, wird jedoch zusätzlich mit einem speziellen PCR Puffer geliefert, der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthält. Bei Verwendung dieses Puffers konnte in der Regel eine höhere Ausbeute und Spezifität des gewünschten PCR-Produkts erzielt werden als mit der entsprechenden *Taq* Polymerase von PROMEGA.

B.5.7.3. Standard-PCR

Für die Amplifikation von DNS-Fragmenten wurden die Thermocycler Primus 96 oder Primus 25 der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) eingesetzt. In der Regel wurden Ansätze mit jeweils 50 μl Gesamtvolumen verwendet.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:

10x Puffer (ohne MgCl ₂)	5µl
MgCl ₂ (25mM)	5µl
dNTP-Mix (8mM)	5µl
Template-DNS (100ng/µl)	1µl
Vor. und rück. Primer (5pmol/µl)	je 3µl
DNS-Polymerase (1U/µl)	0,5µl
H ₂ O _{reinst}	ad 50µl

PCR-Cycler Standardprogramm:

1x	Startdenaturierung	5min	94°C
34x	{	Denaturierung	30sec 94°C
		Annealing	30sec xx°C
		Elongation	45sec + 1sec/Zykl. 72°C
1x	Finale Elongation	7min	72°C

Der PCR-Reaktionsansatz und das verwendete Programm wurden je nach Template-DNS modifiziert. So verlängerte sich die Elongationszeit von 45sec bei Amplifikaten kleiner als 1kb bis auf 2,5min bei Amplifikaten mit einer Größe über 3kb. Außerdem führte auch die Variation der standardmäßig verwendeten MgCl₂-Konzentration neben einer für die jeweils verwendeten Primerpaare optimierten Annealing-Temperatur zu einer höheren Spezifität und besseren Ausbeute. Bei einigen Ansätzen war auch die Zugabe von 10% Glycerin oder DMSO erforderlich, um entweder überhaupt ein PCR-Produkt zu erhalten oder das Ergebnis entsprechend zu optimieren.

B.5.7.4. Kolonie-PCR

Meist diente die chromosomale DNS als Template für die PCR, doch in manchen Fällen wurden auch, um Zeit und Material zu sparen, die unbehandelten Bakterienzellen selbst dem PCR-Ansatz zugegeben. Dabei konnten entweder Zellen von einer frischen ÜN-Kultur auf Platte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, in 100µl H₂O_{reinst} suspendiert und davon 1-3µl eingesetzt werden, oder 1µl einer frischen, über Nacht gewachsenen Flüssigkultur. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Startdenaturierung auf 10 Minuten verlängert werden muss.

B.5.7.5. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Abtrennung von PCR-Reaktionsbestandteilen wie Primer und Puffer erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin[®] Extract* Kit (MACHEREY & NAGEL, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Bei Auftreten von unspezifischen PCR-Nebenprodukten wurde die Ziel-DNS vorher über ein präparatives Agarosegel (s. B.5.6.4) abgetrennt.

B.5.7.6. Klonierung von PCR-Amplifikaten

Zur Klonierung von gereinigten PCR-Amplifikaten in *E. coli* wurde das *TOPO TA Cloning[®] Kit* (INVITROGEN, Carlsbad, USA) mit chemokompetenten *E. coli* TOP10 Zellen verwendet. Der im Kit enthaltene linearisierte Klonierungsvektor *pCR[®]2.1-TOPO* trägt an den 3'-Enden ein überhängendes T. Die *Taq*-Polymerase weist eine Template unabhängige terminale Transferaseaktivität auf, durch die einzelsträngige A-Überhänge an die 3'-Enden der PCR-Produkte angehängt werden, was bei der Ligation durch die kovalent an den Klonierungsvektor gebundene Topoisomerase ausgenützt wird. Das Arbeitsprotokoll ist im Kit enthalten.

Alternativ wurde das *pGem-T Vector System* von PROMEGA (Madison, Wisconsin, USA) verwendet, das prinzipiell ebenso wie das Topo-System funktioniert, mit dem Unterschied, dass die Ligation in den *pGem-5Zf(+)*-Vektor nicht über eine Topoisomerase erfolgt, sondern mittels einer herkömmlichen T4-Ligase.

200 bis 500µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten (100mg/l Ampicillin) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Da der verwendete Vektor eine blau/weiß Selektion von positiven Klonen ermöglicht, wurden die LB-Platten vorher mit 40µl X-Gal Lösung (s. B.1.3) beschichtet. Am folgenden Tag wurden weiße Kolonien gepickt und durch Präparation der Plasmid-DNS und Verdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen der Klonierungserfolg überprüft.

B.5.8. DNS-Sequenzanalyse

B.5.8.1. Durchführung der Sequenzierungen

Die Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten oder Plasmid-DNS wurde von der Firma SEQUISERVE (Vaterstetten, Deutschland) mit dem Sequenzierautomaten ABI Prism 377-DNA-Sequencer durchgeführt. Zur Kontrolle von konstruierten Plasmiden wurden jeweils die entsprechenden spezifischen Primer verwendet, wie im Anhang unter Punkt G.2

aufgeführt. Für die Amplifizierung und Sequenzierung von 16S rDNS für phylogenetische Analysen wurden folgenden Primer verwendet:

Name	5'-3' Sequenz	Bindungsposition in 16S rDNS von <i>E. coli</i> (Brosius, 1981)
616-V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	8-27
630-R	CAK AAA GGA GGT GAT CC	1528-1544
608-V	CCG CAC AAG CGG TGG	931-945
612-RII	GTA AGG TTY TNC GCG T	969-984

Tabelle B.12: Verwendete Primer zur Sequenzierung der 16S rDNS

B.5.8.2. Auswertung von Sequenzdaten

Zur Suche nach Homologien mit bereits bekannten Sequenzabschnitten wurde die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) angebotene Suchmaschine BLAST (Altschul *et al.*, 1997) verwendet.

Für die phylogenetische Analyse von 16S rDNS Sequenzen war es zunächst erforderlich, sie korrekt auszurichten (*alignment*). Dies erfolgte durch Verwendung des „alignment tools“ *Fast Aligner VI.03* des ARB Programms. Dabei wurden phylogenetisch bereits analysierte Sequenzen mit den neuen Sequenzen verglichen und homologe Positionen untereinander angeordnet. Als Referenz zur Positionsangabe innerhalb der 16S rDNS diente die Sequenz von *E. coli*. Alle Sequenzen wurden anhand der mitgelieferten Sequenzmuster korrekturgelesen und das korrekte Alignment überprüft. Anschließend erfolgte mit Hilfe der ARB-Software der Vergleich der beiden Sequenzen durch das Erstellen von Distanzmatrices, oder die Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume nach der *Maximum-Likelihood*-Methode (Felsenstein, 1981).

B.5.9. DNS-DNS-Hybridisierung

Diese Methode diente zum genotypischen Vergleich zweier Bakterienstämme und sollte klären, ob diese zu derselben Art gehören oder nicht. Dazu wurden die beiden Stämme in Vorkulturen ÜN angezogen und mittels FISH mikroskopisch auf kontaminationsfreies Wachstum geprüft. Ausgehend von diesen Vorkulturen wurde etwa 3-4g Zellmaterial produziert, durch Zentrifugation (25min, 5000g) geerntet und nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS in 10ml 50% Isopropanol aufgenommen. Alle weiteren Schritte wurden durch die DSMZ (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Frenchpress (Thermo Spectronic, Dreieich, Deutschland) woran sich eine Aufreinigung der DNS über Chromatographie mit Hydroxyapatit nach Cashion *et al.* (1977) anschloss. DNS-DNS-Hybridisierung wurde wie von De Ley *et al.* (1970) beschrieben durchgeführt, mit den Modifikationen von Huss *et al.* (1983) und Escara and Hutton (1980). Hierzu wurde ein Spektralphotometer Model 2600 ausgestattet mit einem Thermoprogrammer Model 2527 und einem Plotter (Gilford Instrument Laboratories, Waltham, USA) verwendet. Renaturierungsraten wurden mit Hilfe des Programms TRANSFER.BAS von Jahnke (1992) berechnet.

B.5.10.DNS-Transfer in Gram-negative Bakterien

B.5.10.1. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen nach Hanahan (1983, modif.)

- 1,5l LB-Medium in 3l Schikanekolben mit einer Übernachtskultur des Empfängerstammes (z.B. *E. coli* XL1-Blue) 1:1000 beimpfen
- Inkubation bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7

Alle folgenden Schritte werden auf Eis bzw. im Kühlraum durchgeführt:

- Abkühlen der Kultur für 15min im Eis/Wasser-Bad
- Ernten der Zellen durch Zentrifugation für 15min mit 5000rpm bei 4°C
- Waschen der Zellen mit 1l eiskaltem H₂O_{reinst}
- Erneute Zentrifugation für 15min bei 4°C mit 5000rpm
- Waschen der Zellen mit 50ml eiskalter, 10%iger Glycerinlösung
- Erneute Zentrifugation für 15min bei 4°C mit 5000rpm
- Nach sofortigem Dekantieren des Überstands, Abschätzen des Pelletvolumens und Resuspension der Zellen im gleichen Volumen eiskaltem, 10%igen Glycerin (ca. 2ml)
- Aliquotieren (z. B. 60µl) und Lagerung bei -40 bis -80°C

B.5.10.2. *E. coli* Elektroporation nach Dower *et al.* (1988)

Durch einen kurzen Hochspannungsimpuls kann eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht werden, die eine Transformation von Plasmid-DNS in die Zelle ermöglicht. DNS-Lösungen mit hohem Salzgehalt (z. B. Ligationsansätze) wurden vor der Elektroporation einer 30-60 minütigen Tropfendialyse (Nitrocellulosemembran der Porengröße 0,025µm, MILLIPORE, Eschborn, Deutschland) gegen H₂O_{reinst} unterzogen. Bei schwierigen Transformationen wurden wegen ihrer höheren Transformationseffizienz elektrokompetente *E. coli* GeneHogs

der Firma INVITROGEN (Carlsbad, USA) verwendet. Das Transformationsprotokoll war jedoch im Wesentlichen identisch:

- Auftauen der aliquotierten elektrokompetenten *E. coli* Zellen auf Eis
- Zugabe der salzfreien DNS-Lösung (100-500ng), vorsichtig mischen (nicht mit Pipette aufziehen!), 15-30min auf Eis inkubieren
- DNS-Zellsuspension luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2mm, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) überführen
- Küvette sorgfältig trocknen und möglichst rasch in die Halterung des Elektroporationsgerätes (*Gene Pulser*TM, BIO-RAD, München, Deutschland) stellen
- Anlegen einer elektrischen Spannung (Spannung 2,5kV, Kapazität 25 μ F, Widerstand 200 Ω), die Zeit bis zur Entladung liegt für *E. coli* zwischen 4,5 und 5,5msec
- Unmittelbare Zugabe von 1ml (bzw. 250 μ l bei GeneHogs) SOC-Medium und Überführung des Elektroporationsansatzes in ein frisches ERG
- Inkubation bei 37°C und 250rpm für 60min zur phänotypischen Expression
- Ausplattieren von 100-500 μ l auf selektive Nährmedien und Inkubation bei 37°C ÜN

B.5.10.3. DNS-Transfer bei *E. coli* durch Hitzeschock

Hierzu wurden chemokompetenten *E. coli* TOP10 Zellen (INVITROGEN, Carlsbad, USA) verwendet. Die Durchführung entsprach im Wesentlichen dem Protokoll der Elektroporation. Allerdings wurde die Perforation der Zellhülle in diesem Fall nicht durch einen Elektroimpuls hervorgerufen, sondern indem die eisgekühlte DNS-Zellsuspension für 30sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt wurde. Danach wurden 250 μ l SOC-Medium zugegeben und weiter verfahren wie oben angegeben.

B.5.10.4. DNS-Transfer durch Konjugation nach Kristensen *et al.* (1995, modifiziert)

Außer durch Elektroporation und Hitzeschock können Plasmide auch durch Konjugation mit einer hohen Transferrate in Zielbakterien überführt werden, wobei die Art des Plasmids, Eigenschaften von Donor- bzw. Empfängerorganismen und Reaktionsbedingungen die Übertragungsrate entscheidend beeinflussen (Stotzky *et al.*, 1990). Dabei kommt es in Gegenwart eines Helferplasmids pRK600 (Figurski *et al.*, 1979) zu einer Übertragung der Plasmid-DNS von einem Donor- in einen Rezipientenstamm. Auf festen Oberflächen kann man häufig eine zusätzliche Erhöhung der Transferrate um einige Größenordnungen im Vergleich zu Flüssigmedien beobachten (Bradley *et al.*, 1980; 1982). Zur Verdeutlichung siehe Abbildung B.1.

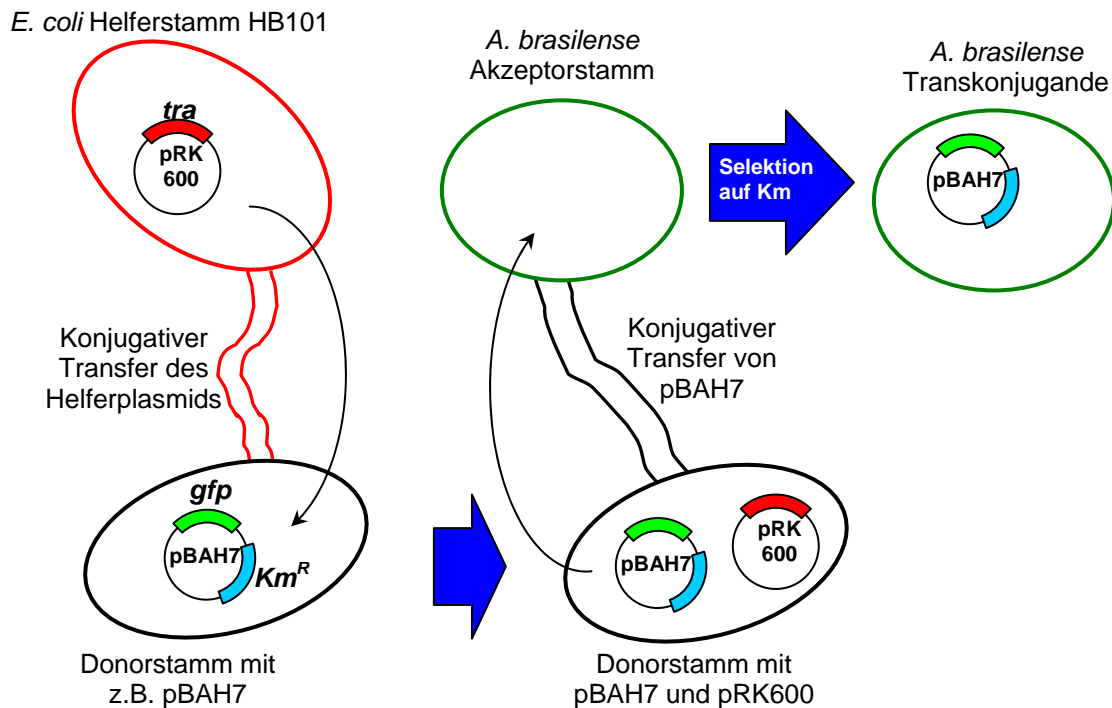


Abbildung B.1: Schematische Darstellung des konjugativen Transfers in einem triparentalen Ansatz. Als Beispiel wurde die Übertragung von Plasmid pBAH7 in *A. brasilense* gewählt. (*tra*) Transferegene; (*gfp*) green fluorescent protein; (Km^R) Kanamycinresistenzkassette.

In vorliegender Arbeit wurde der konjugative Transfer in der Regel in einem triparentalen Konjugationsansatz auf einer festen Agaroberfläche durchgeführt (Kristensen *et al.*, 1995, modifiziert) und diente zur Übertragung von Plasmid-DNS in Azospirillen bzw. Herbaspirillen. Zur Selektion dieser Spezies wurden MMAB-Agarplatten verwendet, denen $6\mu\text{g/ml}$ Nalidixinsäure zugesetzt wurde und abhängig vom übertragenen Plasmid ein weiteres Antibiotikum, das die Selektion der Transkonjuganten erlaubte. Besondere Bedeutung kam vor allem beim Arbeiten mit Azospirillen dem Mischungsverhältnis von Donor/Helfer und Rezipient zu (Vanstockem *et al.*, 1988). Mit *A. brasilense* als Empfängerorganismus wurde meist ein Verhältnis Donor : Helfer : Rezipient von 1 : 1 : 5 gewählt und nach folgendem Protokoll verfahren:

- Donor, Rezipient und Helferstamm (*E. coli* HB101 mit pRK600) werden ÜN einzeln in selektivem LB-Medium angezogen
- Je 1ml Kultur von Donor und Helfer werden bei 5000g für 3min geerntet
- Vorsichtiges Resuspendieren der Zellen in je 1ml NB-Medium
- Erneute Zentrifugation bei 5000g für 3min
- Nach Dekantieren des Überstandes aufnehmen der Zellen in je 250 μl NB-Medium
- 250 μl Donor zum Helferstamm pipettieren und 30min bei RT inkubieren

- Kurz vor Ende der Inkubationszeit 5ml Kultur des Rezipienten für 3min bei 5000g ernten und falls er mit Antibiotikum angezogen wurde wie oben mit 1ml NB-Medium waschen
- Anschließend Rezipienten in 250µl NB-Medium aufnehmen
- Das Donor/Helfer-Gemisch (500µl) mit dem Rezipienten (250µl) mischen; aus dieser Endmischung 15 Tropfen (je 50µl) auf eine NB-Agarplatte aufbringen und mindestens 4 Stunden oder über Nacht bei 30°C inkubieren
- 1ml 1xPBS auf die Platte aufbringen, Zellmaterial mit einem Drygalski-Spatel resuspendieren und in ein frisches ERG überführen, Vorgang wiederholen
- 50-500µl Zellsuspension auf Selektivplatten ausplattieren und ÜN bei 37°C inkubieren

B.5.10.5. DNS-Transfer durch Konjugation nach Vanstockem *et al.* (1988, modifiziert)

Um besonders bei der Knock-out-Mutagenese eine noch höhere Transferrate zu erreichen wurde das oben beschriebene Standardprotokoll modifiziert. Zunächst wurden 5ml Übernachtkultur des (falls nötig gewaschenen) Rezipientenstammes mithilfe einer Vakuumpumpe auf einen Polyethersulfon-Filter (MILLIPORE, Eschborn, Deutschland) gesaugt, der Filter mit den Zellen nach oben auf eine NB-Agarplatte gelegt und 2 Stunden bei 30°C vorinkubiert. Eine halbe Stunde vor Ablauf dieser Zeit folgten Zellernte, Waschen und Mischung von Donor und Helfer, wie unter Punkt B.5.10.4 beschrieben. Der Filter wurde von der Agarplatte genommen und die 500µl Donor/Helfer-Zellsuspension mit der Vakuumpumpe auf denselben Filter gesaugt. Dieser wurde erneut auf die NB-Agarplatte gelegt und für 4 Stunden oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Resuspension und Ausplattieren der Zellen erfolgten nach obigem Protokoll.

B.5.11. GFP-Markierung von Bakterienzellen

B.5.11.1. Allgemeine Vorgehensweise bei der Plasmidkonstruktion

Allen Konstruktionen ging eine theoretische Planung der einzelnen Klonierungsschritte über das Programm *Clone Manager* Version 5.02 (SCIENTIFIC & EDUCATIONAL SOFTWARE, Durham, USA) voraus. Mit dieser Software ist es möglich mit Hilfe bekannter Insert- und Vektorsequenzen „in silico“ Restriktionen und Ligationen durchzuführen, sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme anzeigen zu lassen. Nachdem auf diese Weise ein geeigneter Klonierungsweg gefunden war, folgte die Anzucht der Zellen, welche die als Vektor verwendeten Plasmide bzw. die auf dem Plasmid enthaltene Insert-DNS trugen, in LB-Flüssigmedium über Nacht unter den jeweilig erforderlichen selektiven Bedingungen

(B.1). Nach B.5.2.1 wurde die Plasmid-DNS isoliert und in präparativem Maßstab mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (B.5.5.1). Es folgte die Auftrennung der entstandenen Fragmente über präparative Agarosegelelektrophorese, das Ausschneiden der gewünschten Fragmentgrößen aus dem Gel und das Eluieren der DNS (B.5.6.4). Mit der so gewonnenen aufgereinigten Vektor- und Insert-DNS konnte die Ligation nach B.5.5.3 durchgeführt werden, woran sich der Transfer der ligierten Produkte in kompetente *E. coli* Zellen durch Elektroporation (B.5.10.2) bzw. Hitzeschock (B.5.10.3) anschloss. Durch Restriktionsanalyse wurde das Vorhandensein des gewünschten Inserts kontrolliert.

B.5.11.2. Knock-out-Mutagenese durch „gene replacement“ Vektoren

Nach Hoang *et al.* (1998) sollten einige grundlegende Voraussetzungen erfüllt sein, um einen „gene replacement“ Vektor in einem bestimmten Organismus einsetzen zu können:

Erstens sollte der Vektor einen Antibiotikumsresistenzmarker tragen, der eine Selektion auf ein Antibiotikum erlaubt, gegen das keine intrinsische Resistenzen im Zielbakterium auftreten. Deshalb wurde für das „gene replacement“ in *A. brasilense* im Rahmen dieser Arbeit ein pEX18-Vektor mit einem Resistenzmarker für Gentamycin verwendet.

Zweitens darf der Vektor im Zielbakterium nicht replizieren (→Suizid-Vektor), wodurch das Wachstum auf Medien mit den entsprechenden Antibiotika nur möglich wird, wenn durch homologe Rekombination das Plasmid ins Genom integriert wurde. Der auf dem *E. coli* Plasmid R6K basierende pEX18Gm Vektor besitzt einen *pir*-abhängigen Replikationsursprung, wodurch er nur in Mikroorganismen replizieren kann, welche dieses Genprodukt *in trans* exprimieren. Bei allen Bakterien, denen dieses Protein fehlt, ist das Plasmid als Suizid-Vektoren einsetzbar.

Drittens sollte eine Möglichkeit zur Selektion der echten Knock-out-Mutanten von den häufiger vorkommenden Merodiploiden vorhanden sein. Dies wird durch das ebenfalls auf pEX18Gm kodierte Gen *sacB* ermöglicht. Das *Bacillus subtilis sacB*-Gen kodiert für das Enzym Lävansucrase, das durch Hydrolyse von Saccharose und Polymerisierung der Fructosereste Lävansynthetisiert (Dedonder, 1966). Dies führt bei Saccharose sensitiven Bakterienstämmen zum Zelltod. Dadurch ist eine Selektion der echten Knock-out-Mutanten durch Wachstum auf saccharosehaltigen Agarplatten möglich.

Zur Erzeugung von Knock-out-Mutanten in Azospirillen wurden zunächst zwei Fragmente des Zielgens durch PCR amplifiziert, und das PCR-Produkt mit dem *TOPO TA Cloning*[®] Kit (s. B.5.7.6) in einen *pCR*[®]2.1-*TOPO* Vektor kloniert. Ausgehend von diesen beiden Konstrukten erfolgte zunächst die Klonierung des strangaufwärts gelegenen Fragments des

Zielgens in den „gene replacement“ Vektor pEX18Gm. Daraufhin wurde in gleicher Leserichtung eine DNS-Kassette bestehend aus einem Antibiotikamarker (Neomycin-3'-Phosphotransferase) sowie einem Reporter-gen (*gfp*) eingefügt. Zuletzt erfolgte die gerichtete Klonierung des weiter strangabwärts gelegenen zweiten Fragments des Zielgens. Das konstruierte Plasmid wurde mittels konjugativem Transfer in einem triparentalen Konjugationsansatz (s. B.5.10.5) in das Zielbakterium überführt. Nach dem Mechanismus der homologen Rekombination erfolgte dort zunächst die Paarung der in pEX18Gm klonierten Fragmente des Zielgens mit den homologen Regionen im Genom, gefolgt von einem „Cross-over“, das zu einer Insertion des gesamten Plasmids innerhalb des Zielgens führte. Die resultierenden Mutanten wurden durch Ausplattieren auf kanamycinhaltigen MMAB-Nalidixinsäure-Agarplatten selektiert. Durch anschließendes Überimpfen auf Agarplatten mit 5% Saccharose sollten nur diejenigen Zellen überleben, bei denen durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis das *sacB*-Gen zusammen mit dem Gentamycinresistenzmarker und den restlichen Abschnitten von pEX18Gm aus dem Genom entfernt wurde. Die resultierenden Mutanten sollten allein die konstruierte DNS-Kassette im Zielgen tragen, wodurch enthaltene genetische Marker in Abhängigkeit vom entsprechenden Promotor des defekten Gens exprimiert werden.

B.5.11.3. Chromosomales „Tagging“ mittels mini-Tn5-Transposons

Um eine ungerichtete, chromosomale Markierung durch *gfp*- und *rfp*-Reporter-gene zu erreichen wurde über konjugativen Transfer in einem triparentalen Ansatz (B.5.10.4) pUT-Vektoren (pJBA28, pTn5-red) in die Zielzelle überführt, auf denen mini-Tn5-Derivate lokalisiert waren. Diese Transposons beinhalten einen Antibiotikumsselektionsmarker und ein konstitutiv exprimiertes Reporter-gen. Die verwendeten pUT-Replikons basieren letztlich ebenso auf dem Plasmid R6K und weisen daher einen *pir*-abhängigen Replikationsursprung auf. Somit konnten die Vektoren nach dem Transfer in die *Azospirillum* bzw. *Herbaspirillum*-Zielzellen nicht replizieren. Durch die Aktivität der plasmidkodierte Transposase kam es nach dem Transfer des Trägerplasmids zur Transposition des mini-Tn5-Derivats in das Genom des Zielbakteriums. Anschließend war durch Ausplattieren des Konjugationsansatzes auf MMAB-Agarplatten mit Nalidixinsäure und einem entsprechenden weiteren Antibiotikum eine Selektion der Insertionsmutanten möglich. Bei diesen wurde die Aktivität der Reporter-gene mikroskopisch überprüft. Das so erfolgte Markieren der Zellen bezeichnet man auch als chromosomales „Tagging“.

B.5.11.4. Markierung durch ein stabiles Plasmid mit konstitutiv exprimiertem *gfp*-Gen

Alternativ zur oben beschriebenen Methode kann ein *gfp*- bzw. *rfp*-Markergen auch auf einem replizierbaren und ohne Antibiotikadruck stabilen Plasmid in die Zielzelle überführt werden. Hierzu musste ein Plasmid mit einem konstitutiv exprimierten Reportergen verwendet werden, welches auch ohne Anwesenheit eines entsprechenden Antibiotikums bei jeder Zellteilung repliziert und mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Tochterzellen weitergegeben wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Übertragung des *gfp*mut3-Markergens das Plasmid pBAH7 verwendet, das auf dem ColE1 verwandten Replikon pBBR1MCS-2 basiert, von dem bekannt war, dass es in einer großen Zahl verschiedener Bodenmikroorganismen repliziert (Kovach *et al.*, 1995), wie z. B. *Acetobacter xylinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*. Das Gen *dsred* wurde auf dem Plasmid pMH433 in die Zielzellen übertragen. Der zugrundeliegende Vektor pME6030 geht auf eine Kombination des *Pseudomonas* Basisreplikon pVS1 mit dem *E. coli* Plasmid p15A zurück, was Replizierbarkeit und hohe Stabilität in verschieden, pflanzenassoziierten Bakterien gewährleistet (Heeb *et al.*, 2000).

B.5.11.5. Konstruktion von translationalen Promotorfusionen auf Plasmidebene

Translationale Promotorfusionen auf stabilen Plasmiden stellen eine weitere Möglichkeit zur Durchführung von Expressionsanalysen dar. Hierzu wurde ähnlich wie unter B.5.11.4 beschrieben ein ohne Selektionsdruck stabiles Plasmid gewählt, in das ein promotorloses *gfp*-Gen kloniert wurde. Mittels PCR wurde die untersuchte *ipdC*-Promotorregion aus der chromosomalen DNS des Zielbakteriums amplifiziert und über artifizielle Restriktionsschnittstellen (B.5.7) so mit dem *gfp*-Gen ligiert, dass das Startcodon des eigentlich im Wildtyp folgenden Gens nun durch das Startcodon des *gfp*-Gens ersetzt wurde. Dieses Konstrukt wurde wieder über triparentale Konjugation in das Zielbakterium transferiert. Durch das auf beschriebene Weise erreichte beibehalten des Wildtyp-Leserahmens kann eine zusätzlich Verstärkung der Expression des Markergens in Abhängigkeit von der Induktion durch den jeweils vorgeschalteten Promotor erreicht werden.

B.5.12. GFP-Expressionsanalysen in *A. brasilense*

Um die Expression des fusionierten *gfp*-Gens in Abhängigkeit vom vorgeschalteten *ipdC*-Promotor zu untersuchen wurden die erzeugten *A. brasilense* Transkonjuganden auf MMAB-

und NB-Agarplatten angezogen, sowie auf MMAB-Agarplatten mit 0,5mM Tyrosin, Phenylalanin oder beiden Aminosäuren (s. B.1.2). Nach Dosselaere (2000) sollte durch die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, die unter anderen auch im NB-Medium enthalten sind, eine Induktion des *ipdC*-Promotors im Vergleich zu Kulturen, die auf reinem MMAB-Medium gewachsen waren, zu erkennen sein. Um den Zeitpunkt der optimalen GFP-Akkumulation für eine Fluoreszenzdetektion zu ermitteln, wurden die Kulturen einen Tag, eine Woche und zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Nach diesen Inkubationszeiten wurden die Kulturen von der Platte mit 2ml 1xPBS resuspendiert und die OD_{436nm} photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10⁹ Zellen pro ml verdünnt, davon 5µl auf eine Aussparung eines Epoxyharz-beschichteten Objektträgers getropft und luftgetrocknet. Es folgte die Analyse der Kulturen am CLSM. Dazu wurden von jeder aufgetropften Probe 6 Bilder mit den gleichen Einstellungen (s. B.4.2.3) gemacht. Über ein Histogramm (s. B.4.2.1) konnte die mittlere Intensität der Fluoreszenz im erfassten Bildbereich berechnet werden. Aus den resultierenden 6 Werten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt und graphisch dargestellt.

Bei einer Kantenlänge des Bildrahmens von 146µm, einer aufgetropften Zellzahl von ca. 5x10⁶ und einem Radius r des Probenfeldes auf dem Objektträger von 3mm lässt sich nach der folgenden Formel die erfasste Zellzahl pro Bild errechnen:

$$\text{Erfasste Zellzahl} = \frac{\text{Aufgetropfte Zellzahl} \cdot \text{Fläche Bildrahmen}}{r^2 \cdot \pi (\text{Fläche des Probenfeldes})}$$

Es ergibt sich ein Wert von ca. 4000 Zellen pro Bild, von denen bei jeder Messung die Fluoreszenzintensität ermittelt wurde.

B.6. Immunologische und zellbiologische Methoden

B.6.1. Monoklonale Antikörper

Wird eine antikörperproduzierende Zelle (B-Lymphocyten) einer immunisierten Maus mit einer Mausmyelomzelle (Tumorzelle eines B-Lymphocyten) fusioniert, so lassen sich durch die entstandenen, sich potentiell unbegrenzt teilenden Hybridzellen große Mengen spezifischer und homogener Antikörper produzieren. Hierzu werden nach der Fusion der beiden Zelltypen die gewünschten Hybridklone selektiert, die anschließend beim Wachstum in entsprechenden Kulturmedien Antikörper gegen das jeweilige Antigen sezerniert, mit dem

die Maus immunisiert wurde. Diese Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde erstmals von Köhler und Milstein 1975 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper von verschiedenen in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zelllinien auf ihre Eignung zur Detektion von *Azospirillum brasilense* getestet. Dabei wurde auf Hybridoma-Zelllinien zurückgegriffen, die in vorangegangenen Arbeiten hergestellt und charakterisiert wurden (Schloter *et al.*, 1994; Schloter and Hartmann, 1996).

B.6.1.1. Auftauen von eingefrorenen Hybridoma-Zellkulturen

Die in Kryoampullen (CryoTube™, NUNC, Roskilde, Dänemark) bei -196°C aufbewahrten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Anschließend wurden sie in ein vorgekühltes steriles Zentrifugationsgefäß überführt und langsam, tropfenweise zunächst 3ml serumhaltiges Medium (B.6.1.3) zugegeben, danach etwas zügiger weitere 7ml. Nach Zentrifugation mit 200g für 10min bei 4°C und vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 36ml serumhaltigem Medium mit dem Wachstumsfaktor-Zusatz HFCS (Konzentration nach Empfehlung des Herstellers; ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Mannheim, Deutschland) aufgenommen.

B.6.1.2. Gewinnung von Peritonealzellen

Eine ungefähr zwei Monate alte Maus (BALB/c, weiblich) wurde mit Ether getötet und das Bauchfell abgezogen. Zur Gewinnung der Peritonealzellen (auch Feederzellen) wurde in die Bauchhöhle 8,5ml steriles, gekühltes, mit 10U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin versetztes 1xPBS injiziert. Die im Puffer suspendierten Feederzellen wurden wieder durch die Spritze aus der Bauchhöhle gesaugt, zentrifugiert (200g, 10 min, 4°C), das resultierende Pellet in 15ml serumhaltigem Medium (B.6.1.3) aufgenommen und je 50 μl auf Mikrotiterplatten (NUNC, Roskilde, Dänemark) verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert bis zur Zugabe der Hybridoma-Zelllinien.

B.6.1.3. Kultivierung von Hybridomazellen

Die aufgetauten und gewaschenen Zellen wurden auf 2-3 Mikrotiterplatten mit 50 μl Peritonealzellen (B.6.1.2) pro Kavität aufgeteilt und bei 37°C und 5% CO_2 angezogen. Täglich erfolgte eine mikroskopische Überprüfung des kontaminationsfreien Wachstums der Hybridklone. Außerdem wurde jeden Tag 100 μl des Mediums durch frisches ersetzt. Nach 2-4 Tagen wurden die herangewachsenen Klone auf Antikörperproduktion getestet, indem eine entsprechende Menge Zellkulturüberstand im ELISA (B.6.3) eingesetzt wurde. Bei einem positiven Ergebnis wurden die Zellen zunächst durch Auf- und Abpipettieren von den

Wänden der Kavitäten gelöst. Daraufhin wurden in eine neue Mikrotiterplatte mit 200µl frischem Medium pro Kavität je 15µl Zellsuspension gegeben. Diese Platte diente als Reserve im Falle eventueller Kontaminationen bei der Überführung der Zellen in die Zellkulturflaschen. Für die weitere Inkubation der Zellkulturen wurden insgesamt 12ml Zellsuspension aus den Mikrotiterplatten auf zwei 50ml-Zellkulturflaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark) aufgeteilt und weitere 6ml Zellkulturmedium zugegeben. Die Kulturen mussten je nach Wachstum täglich oder alle zwei Tage geteilt und mit gleichem Volumen frischen, serumhaltigen Mediums aufgefüllt werden.

Zellkulturmedium, serumhaltig:	RPMI 1640	400ml
	Fötale Kälberserum	40ml
	Basal Medium Supplement	40ml
	Medium M 199	20ml
	Glutamin (40mg/ml)	5ml
	Arginin (10mg/ml)	5ml
	Natriumpyruvat (10mg/ml)	5ml
	Nicht essentielle Aminosäuren	5ml
	TTI ¹	15ml

(¹= Thyroglobulin, Transferrin, Insulin je 5mg/ml), alle Substanzen von BIOCHROM (Berlin, Deutschland), außer Arg und TTI von SIGMA (Steinheim, Deutschland)

B.6.1.4. Gewinnung und Lagerung der monoklonalen Antikörper

Um den antikörperhaltigen Zellkulturüberstand von den Hybridomazellen zu trennen, wurden die Kulturen je nach benötigter Antikörpermenge nach 1-2 Wochen Inkubation mit 200g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den Antikörpern wurde abgenommen, zur Konservierung mit 0,02% Natriumazid versetzt und bei 4°C in sterilen Glasgefäßen gelagert. Falls nötig wurden die Antikörper vor der Verwendung im ELISA noch über eine Protein A Säule (BIORAD, München, Deutschland) aufgereinigt (B.6.2.2).

B.6.1.5. Stammhaltung von Hybridoma-Zelllinien

Die auf Wachstum und Antikörperproduktion getesteten Zelllinien wurden zur Stammhaltung wiederum in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Hybridomazellen aus dem Zellkulturmedium abzentrifugiert (200g, 10min, 4°C) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde vorsichtig in Einfriermedium (7% Dimethylsulfoxid in fötalem Kälberserum) resuspendiert, auf vorgekühlte Kryoampullen verteilt (5x10⁶ Zellen pro Ampulle) und sofort auf Eis gestellt. Nach 48 Stunden bei -80°C wurden die Ampullen schließlich in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Kontrolle wurde jeweils nach drei Tagen eine Ampulle aufgetaut und auf Reinheit und Vitalität der enthaltenen Zellkulturen überprüft. Die Zelllinien wurden bis zu diesem Vitalitätstest zur Sicherheit weiter in Kultur gehalten.

B.6.2. Polyklonale Antikörper

Werden einem Versuchstier abgetötete Bakterien einer bestimmten Art injiziert, so erfolgt eine Immunantwort, bei der Antikörper gegen Oberflächenproteine des jeweiligen Bakterienstamms gebildet werden. Diese Reaktion beruht im Wesentlichen auf der spezifischen Bindung der eingeschleusten Bakterienproteine durch modifizierte Immunglobuline an der Oberfläche von B-Lymphozyten. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird internalisiert, es erfolgt Antigenprozessierung und Präsentation der Antigene auf der Außenseite der Zelle. Dort binden T-Helferzellen an die präsentierten Antigene, wodurch es zur Produktion von Interleukinen kommt, die schließlich zu einer Differenzierung der B-Lymphozyten in Plasma- und Memoryzellen führen. Die Plasmazellen sezernieren große Mengen von Antikörpern gegen jeweils ein Antigen des injizierten Bakterienstammes, wobei aber diese durch verschiedene Plasmazellen gebildeten polyklonalen Antikörper im Gegensatz zu den vorher beschriebenen monoklonalen unterschiedliche Spezifitäten gegen die Fremdantigene aufweisen. Memoryzellen sind wesentlich langlebiger als Plasmazellen und tragen das prozessierte Antigen weiterhin auf der Zelloberfläche. Durch das auf diese primäre Immunisierung folgende „Boosten“, darunter versteht man eine Reihe von kurz aufeinanderfolgenden weiteren Immunisierungen mit dem gleichen Bakterienstamm, wird das Immunsystem des Versuchstieres stetig weiter aktiviert. Diese sekundäre Immunantwort erhöht den Antikörpertiter im Blut so weit, dass die gewünschten Antikörper schließlich aus dem Serum des Tiers gewonnen werden können.

B.6.2.1. Herstellung polyklonaler Antiseren

Eine 10ml ÜN-Kultur des Zielbakteriums wurde mit 5000g für 10min abzentrifugiert, im gleichen Volumen 1xPBS resuspendiert, in eine Petrischale überführt und für 30min durch UV-Bestrahlung abgetötet. Die Zellen wurden wiederum geerntet, in 2ml 1xPBS aufgenommen, in ein ERG übertragen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der Bestimmung des Zell-Feuchtgewichts wurden 5mg Bakterien-Feuchtgewicht in 2ml 1xPBS aufgenommen und diese Suspension in einer sterilen Spritze aufgezogen. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde bei der ersten Injektion noch 5% *Freund's Adjuvant complete* zugegeben. Diese Mischung wurde subkutan auf mehrere Stellen verteilt einem New Zealand Kaninchen (weiblich, Alter ca. 6 Monate) injiziert, wobei insgesamt 5 Immunisierungen etwa alle 2 Wochen vorgenommen wurden. 5 Tage nach der 4. Immunisierung erfolgte eine Entnahme von 5ml Kontrollblut aus der Ohrvene des Kaninchens, um den Antikörpertiter zu bestimmen. Das Blut wurde ÜN bei 4°C in einem

sterilen Glasgefäß gelagert, wodurch sich das Hämatokrit (die zellulären Bestandteile des Blutes) absetzt und durch die Gerinnung das Fibrinogen aus dem Blutplasma entfernt wird. Das so gewonnene Serum konnte danach in zwei mit 3% (w/v) BSA in 1xPBS blockierten ERGs überführt werden, wobei das Hämatokrit im Glasgefäß verblieb. Mittels ELISA (B.6.3) wurde Spezifität und Titer der Antikörper überprüft.

5 Tage nach der letzten Immunisierung erfolgte das Ausbluten des narkotisierten Versuchstieres durch Herzpunktion, wodurch zwischen 50 und 100ml Blut gewonnen wurden. Nach der Koagulation bei 4°C ÜN in einem sterilen Glaszylinder, wurde das Serum entnommen und durch Zentrifugation (1000g, 10min) in sterilen Glaszentrifugenröhrchen oder blockierten (3% BSA) Kunststoff-Probengefäßen von verbliebenen Blutzellen getrennt. Das resultierende Antiserum wurde auf sterile Glasampullen aufgeteilt und bei -20°C bis zur weiteren Behandlung gelagert.

B.6.2.2. Protein A Aufreinigung

Die erhaltenen polyklonalen Antikörper wurden zunächst über Protein A Adsorption aufgereinigt. Hierzu wurde eine Protein A Säule von BIORAD (Econo-Pac® Protein A Cartridge, München, Deutschland) verwendet, wobei die Eigenschaft von Protein A (ein Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus*) ausgenutzt wird, das Fc-Fragment von Typ G Immunglobulinen zu binden (Flatten, 1996). Während des Durchflusses durch die Protein A enthaltende Säule werden IgG Antikörper unter pH-neutralen Bedingungen gebunden, während IgM, IgA, IgD und IgE, sowie andere Serumproteine ausgespült werden. Wird der pH erniedrigt, so lassen sich die nun von den übrigen Immunglobulinen abgetrennten IgG Antikörper von der Säule eluieren.

Material

Phosphat-Puffer: Na_2HPO_4 (1M) und NaH_2PO_4 (1M) auf pH 7,0 titrieren

Glycin-Puffer:

Glycin	0,37g
ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$	50ml
pH 3,0 (mit HCl)	

Durchführung

- Äquilibration der Protein A Säule mit Phosphat-Puffer für 10min bei einem Durchfluss von 2ml/min mittels Schlauchpumpe (ISMATECSA, Glattbrugg, Schweiz)
- OD_{280} des nachgeschalteten Photometer (BUCHLI, Knauer, Schweiz) auf Null stellen

- Aufzureinigendes Serum 1:100 in Phosphat-Puffer verdünnen und ca. 20ml mit 0,5ml/min durch die Säule laufen lassen
- Mit 2ml/min Phosphat-Puffer spülen bis die OD₂₈₀ am Photometer konstant beinahe bei Null liegt
- Elution der gebundenen IgG Antikörper mit 2ml/min Glycin-Puffer
- Kontrolle des Eluats mit Hilfe des Photometers; sobald eine OD-Erhöhung die Antikörperfraktion anzeigt, wird das Eluat in einem sterilen Glasgefäß aufgefangen
- Äquilibration der Säule mit 10ml Phosphat-Puffer
- Falls Erforderlich die eluierte Antikörperlösung auf pH 7,0 bringen
- Mit 0,02% Natriumazid versetzen und bei 4°C lagern

Sollten monoklonale Antikörper aufgereinigt werden, so wurde ebenfalls nach obigem Protokoll verfahren mit geringfügigen Änderungen: In 38ml des Zellkulturüberstands, der die monoklonalen Antikörper enthielt, wurden 7g NaCl gelöst (3M). Diese Lösung wurde sterilfiltriert und erst dann auf die Säule aufgetragen.

Nach jeweils ca. 10 Läufen musste die Protein A Säule regeneriert werden:

- 10ml 50% (v/v) Methanol mit 1ml/min durch die Säule laufen lassen
- Anschließend 10ml 0,1M NaOH mit derselben Geschwindigkeit
- Äquilibration der Säule mit 20ml Phosphat-Puffer

B.6.2.3. Affinitätsreinigung durch Inkubation mit Bakterien

Da die polyklonalen Antikörper nach der Protein A Reinigung noch nicht spezifisch für die Detektion einer bestimmten Bakterienspezies war, wurde das Antiserum mit Bakterienzellen inkubiert, bei denen eine unerwünschte Kreuzreaktion auftrat. Dabei band der unspezifische Anteil an die Oberflächenproteine der Bakterienzellen, wodurch eine Abtrennung mittels Zentrifugation möglich war. Alle folgenden Schritte werden in sterilen Glasgefäßen oder mit 3% (w/v) BSA blockierten, sterilen Kunststoffgefäßen durchgeführt:

- Abzentrifugieren (5000g, 10min) einer 500ml ÜN-Kultur der jeweiligen Bakterienstämme
- Zweimaliges Waschen mit sterilem 1xPBS
- Aufnehmen der Zellen in 5ml 1xPBS
- Inkubation von 200µl des Antiserums mit dieser Suspension für 2 Stunden unter leichtem Rühren bei RT
- Abzentrifugieren der Zellen bei 1800g für 10min, Überstand in neues Gefäß überführen, nochmals zentrifugieren
- 0,02% Natriumazid zugeben und bei 4°C lagern

B.6.2.4. Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration

Die Antikörperkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt, wobei eine OD von 1 etwa 0,8mg Antikörper pro ml Lösungsmittel entsprach. Um die optimale Konzentration zur Detektion des gewünschten Bakteriums zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Antikörpers zusammen mit dem phylogenetisch entfernten Bodenbakterium *Ochrobactrum anthropi* 1a als Negativkontrolle in einem ELISA getestet. Als optimale Konzentration galt jene Verdünnung, bei der die Signalstärke beim Zielbakterium im Vergleich zur Negativkontrolle am höchsten war.

B.6.2.5. Bestimmung von Detektionslimit und Kreuzreaktionen

Es wurden exponentielle Verdünnungen einer ÜN-Kultur des Zielbakteriums hergestellt, ausgehend von einer Anfangskonzentration von 10^8 Zellen/ml. Bei dem mit optimaler Antikörperkonzentration durchgeführten ELISA galt die geringste Bakterienkonzentration als Detektionslimit, bei der noch ein von der Negativkontrolle (*O. anthropi*) unterscheidbares Signal auftrat.

Noch vorhandene Kreuzreaktionen bzw. die Spezifität der erhaltenen polyklonalen Antikörper wurden mittels ELISA mit einer breiten Auswahl von unterschiedlich nah verwandten Bakterienstämmen bei der optimalen Antikörperkonzentration getestet.

B.6.3. Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA)

Mit entsprechenden spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörpern war es mit Hilfe des ELISAs möglich eine Identifizierung und Quantifizierung von Bakterienstämmen vorzunehmen. Hierzu wurde zunächst das zu detektierende Antigen in einer Mikrotiterplatte über Polylysin an der Kunststoffoberfläche immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch BSA, worauf die spezifischen Antikörper dann im Überschuss zugegeben wurden. Das unmittelbar folgende Waschen der Platte entfernte ungebundene Antikörper. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mit einem zweiten Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt war, welches entweder ein Farbstoff- oder ein Chemolumineszenzsubstrat umsetzen kann. Da die Stärke des resultierenden Signals in proportionalem Zusammenhang mit der Menge der gebundenen Antikörper steht, gab die Intensität des Farb- bzw. Lumineszenzsignals Auskunft über die Zahl der vorhandenen Zielzellen.

B.6.3.1. ELISA mit ABTS

Die Detektion der Zielzellen mit dem Farbsubstrat 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline]-Sulfonsäure (ABTS, ROCHE, Mannheim, Deutschland) erfolgte in durchsichtigen 96er Vinylplatten (COSTAR, Cambridge, USA).

Material

Blockierlösung:	3% (w/v) BSA in 1xPBS
Waschlösung:	0,1% (w/v) BSA in 0,1xPBS
Detektionslösung:	Anti-mouse (monoklonale Antikörper) oder Anti-rabbit (polyklonale) IgG Peroxidase linked (AMERSHAM, Freiburg, Deutschland), 1:450 in Waschlösung verdünnt
ABTS-Gebrauchslösung:	1mg ABTS-Substrat pro ml ABTS-Puffer (ROCHE)
Bakteriensuspension:	ÜN-Kultur des Zielbakteriums bei 5000g für 5min ernten, in 1xPBS resuspendieren und OD ₄₃₆ auf einen Wert zwischen 0,7 und 0,9 einstellen (ca. 10 ⁸ Zellen/ml)

Durchführung

- Pro Kavität 50µl Poly-L-Lysin pipettieren und für 20min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Platte ausschlagen und 150µl pro Kavität 1xPBS zugeben
- Platte ausschlagen, 50µl pro Kavität Bakteriensuspension zugeben und für 30min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Platte ausschlagen, 200µl pro Kavität Blockierlösung zugeben und für 30min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Platte ausschlagen, 50µl pro Kavität spezifische Antikörper in zugeben und für 30min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Platte ausschlagen und 150µl pro Kavität Waschlösung zugeben, diesen Vorgang noch 2 mal wiederholen
- Platte ausschlagen, 50µl pro Kavität Detektionslösung zugeben und für 45min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Platte ausschlagen und 150µl pro Kavität Waschlösung zugeben, diesen Vorgang noch 4 mal wiederholen
- Platte ausschlagen, 100µl pro Kavität ABTS-Gebrauchslösung zugeben und für 10min bei RT inkubieren

- Der Farbumschlag erfolgt von schwach grün zu dunkelgrün und kann, falls erforderlich, durch eine Absorptionsmessung bei 405nm genau bestimmt werden; in der Regel reicht aber eine optische Auswertung ohne Hilfsmittel aus.

B.6.3.2. Chemolumineszenz-ELISA

Prinzipiell erfolgte diese Variante nach dem gleichen Protokoll wie der ELISA mit ABTS. Allerdings wurde hier als Substrat Luminol (BOEHRINGER, Mannheim, Deutschland) zugegeben, das in dem mitgelieferten H₂O₂-haltigen Puffer durch die an die Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert wird, was zur Lichtemission führt. Deshalb wurde die Detektion auch nicht in durchsichtigen Mikrotiterplatten, sondern in weißen FluoroNUNCTM-Mikrotiterplatten (NUNC, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Wegen der größeren Kavitäten wurde jeweils die doppelte Menge Wasch- und Blockierlösung zugegeben. Die Lichtemission wurde nach 5, 10 und 15min in einem Luminometer (ML 1000, DYNATECH, Denkendorf, Deutschland) gemessen und der Messdurchgang mit den höchsten Werten zur Auswertung herangezogen.

B.6.3.3. Immunologische Fluoreszenzmarkierung

Die Detektion von auf Wurzeln siedelnden Bakterien oder Reinkulturen mittels Antikörper verlief nach dem gleichem Prinzip wie der unter B.6.3.1 beschriebene ELISA. Die Markierung wurde an PFA-fixierten (B.5.1.4) Reinkulturen, bzw. ganzen Wurzeln oder Wurzelschnitten auf einem Glasobjektträger durchgeführt. Dabei wurden von Wasch- und Blockierlösung jeweils 50ml in ein entsprechendes Probengefäß gegeben, in das die Objektträger eingetaucht bzw. in dem sie inkubiert wurden. Die Antikörperlösungen wurden stets nur tropfenweise über die Probe gegeben und zum Schutz vor Austrocknung mit einem feuchten Zellstofftuch in einem 50ml Probengefäß inkubiert. Zur Detektion wurde ein sekundärer Anti-mouse (monoklonal) oder Anti-rabbit (polyklonal) Antikörper verwendet, an den die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa FluorTM (rot) oder Oregon Green[®] (grün, MOLECULAR PROBES, Eugene, USA) gekoppelt waren. Dadurch war es möglich, die spezifisch fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen mittels eines Epifluoreszenzmikroskops oder am CLSM zu visualisieren.

C. ERGEBNISSE

C.1. Stammspezifischen Detektion von *A. brasilense* mit Antikörpern

C.1.1. Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen *A. brasilense* Sp245

Wie in Punkt B.6.1 beschrieben wurden die Hybridomazelllinien, die die monoklonalen Antikörper (mAk) Mipe 3-1.1, 3-1.4, 3-1.7, 3-1.11 und 3-1.12 (Schloter and Hartmann, 1996) produzieren, aufgetaut und in Mikrotiterplatten mit peritonealen Feederzellen überführt. Bereits bei der ersten mikroskopischen Kontrolle konnten in der Mikrotiterplatte für mAk 3-1.1 keine lebenden Zellen identifiziert werden. Dies bestätigte sich bei der weiteren Inkubation der Mikrotiterplatte für zwei Tage, in denen keinerlei Wachstum auftrat. Die anderen Zelllinien zeigten rasche Zellteilungen und wurden nach 4 Tagen auf Antikörperproduktion getestet. Dabei wurde in dem ABTS-ELISA (B.6.3.1) als Antigen *A. brasilense* Sp245 verwendet, als Negativkontrolle *A. brasilense* Sp7 mit dem Zellkulturüberstand der verschiedenen Zelllinien und als Positivkontrolle *Ochrobactrum anthropi* 1a mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper für diese Spezies (LPS mAk 2.11, Lebuhn *et al.*, 2000). Es konnte neben der Positivkontrolle jeweils nur bei mAk 3-1.11 ein stark positives Signal detektiert werden, wobei bei keinem der mAks eine Bindung an Stamm Sp7 festgestellt werden konnte. Deshalb wurde nur die entsprechende Zelllinie 3-1.11 in Zellkulturflaschen überführt und weiter inkubiert. Täglich erfolgte das Aufteilen der Zellen auf die doppelte Anzahl Flaschen und Auffüllen mit gleichem Volumen frischen Mediums, bis etwa ein halber Liter Zellkulturüberstand geerntet werden konnte. Der so gewonnene Überstand wurde wie oben im ELISA gegen *A. brasilense* Sp245 getestet, was erneut in einem stark positiven Signal resultierte.

C.1.2. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen *A. brasilense* Sp7

Für eine Detektion von *A. brasilense* Sp7 wurden polyklonale Antikörper (pAk) durch Immunisierung eines Kaninchens erzeugt (B.6.2.1). Vor der ersten Immunisierung wurde dem Versuchstier 5ml Blut entnommen und nach Inkubation bei 4°C und Abzentrifugieren der

verbliebenen zellulären Blutbestandteile das so erhaltene Serum bei 4°C in einem sterilen Glasgefäß aufbewahrt. 5 Tage nach der 4. Immunisierung wurden erneut 5ml Kontrollblut entnommen, aus dem 2ml Serum gewonnen werden konnten. Um das Vorhandensein und den Titer der polyklonalen Antikörper zu ermitteln, wurde das Serum in verschiedenen Verdünnungen in einem ELISA gegen *A. brasilense* Sp7 getestet. Dabei diente als Positivkontrolle *O. anthropi* 1a mit entsprechend spezifischem mAk, als Negativkontrolle wurden gleiche Verdünnungen des vor der Immunisierung entnommenen Serums verwendet. Der durchgeführte ABTS-ELISA (B.6.3.1) ergab bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:1000 mit Waschlösung ein ebenso starkes Signal wie bei der Positivkontrolle. Jedoch konnte auch bei dem vor der Immunisierung entnommenen Serum noch eine leichte unspezifische Bindung an *A. brasilense* Sp7 bis zu einer Verdünnung von 1:100 festgestellt werden. Bei einer 1000fachen Verdünnung war diese unspezifische Bindung jedoch nicht mehr zu erkennen, was auf eine ausreichende Produktion von spezifischen pAks gegen die injizierten bakteriellen Antigene hindeutete. Deshalb erfolgte planungsgemäß die letzte Immunisierung und 5 Tage später das Ausbluten des narkotisierten Versuchstiers. Es konnten ca. 130ml Blut gewonnen werden, was nach Abtrennung von Hämatokrit und Fibrinogen etwa 50ml Serum ergab. Von diesem wurden Aliquots zu 3ml in sterilen Glasgefäßen bei -20°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Um die erhaltenen pAks spezifisch für die Detektion von *A. brasilense* Sp7 zu machen, wurden 3ml des Serums zunächst mit Hilfe einer Protein A Säule (B.6.2.2) von allen unspezifisch bindenden Anteilen befreit. Danach mussten noch diejenigen Antikörper aus dem Serum entfernt werden, die neben Stamm Sp7 auch noch an Oberflächenproteine anderer *Azospirillum* Stämme, besonders Stamm Sp245 binden konnten. Hierzu wurde wie in B.6.2.3 beschrieben eine Inkubation der pAks mit einer ÜN-Kultur von *A. brasilense* Sp245 durchgeführt. Anschließend folgte ein ABTS-ELISA mit verschiedenen *A. brasilense* Stämmen, um die Spezifität der pAks zu testen (s. Tabelle C.1). Dabei konnte bei einer Verdünnung des aufgereinigten Serums von 1:100 für den Stamm SpP2 ein ebenso starkes Signal wie für Sp7 festgestellt werden und für die Stämme JM6A2 und SpT60 ein nur wenig schwächeres. Bei allen anderen getesteten Stämme, unter anderem auch Sp245, konnte keinerlei Bindung der pAks bei einer 1:100 Verdünnung detektiert werden. Da dies besonders für die Differenzierung der Stämme Sp7 und Sp245 entscheidend war, konnten die pAks nach diesem Schritt als ausreichend rein für die stammspezifische Detektion von Sp7 angesehen werden. Da bei Einsatz der pAks unverdünnt oder in zehnfacher Verdünnung noch ein, wenn auch schwacher Farbumschlag bei Sp245 festgestellt werden konnte, wurde eine hundertfache

Verdünnung für die weitere Anwendung der pAks im ELISA eingesetzt. Im folgenden werden diese aufgereinigten, polyklonalen Antikörper zur spezifischen Detektion von *A. brasilense* Sp7 als pAk Sp7 bezeichnet.

Stamm	unverdünnt	1:10	1:100
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	+++++	++++	+++
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	++++	++	-
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp35	+++	++	-
<i>Azospirillum brasilense</i> JM6A2	++++	+++	++
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp81	+++	++	-
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp75	+++	++	-
<i>Azospirillum brasilense</i> SpP2	+++++	++++	+++
<i>Azospirillum brasilense</i> SpA2	+++	+	-
<i>Azospirillum brasilense</i> SpT60	++++	+++	++
<i>Ochrobactrum anthropi</i> 1a	++	+	-

Tabelle C.1: Relative Signalstärke des ABTS-ELISAs zur Überprüfung der Spezifität von pAk Sp7. +++++ steht für einen Farbton, der ebenso dunkel war, wie das Referenzsignal von *O. anthropi* 1a mit entsprechendem mAk. – steht für einen Farbton, der nicht vom ABTS-Substrat in wässriger Lösung unterscheidbar war. Die relativen Signalstärken sind angegeben beim Einsatz des aufgereinigten Serums unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 mit Waschlösung.

C.1.3. Einsatz der Antikörper an Reinkulturen und *in situ*

Der pAk Sp7 wurde auf die Einsetzbarkeit für die Fluoreszenzmarkierung von Reinkulturen des Bakterienstammes und *in situ* auf der Wurzel, wie in Punkt B.6.3.3 beschrieben, getestet. Es wurden mit dem jeweiligen Stamm inokulierte Weizenpflanzen der Sorte Naxos nach ca. drei Wochen Wachstum im monoxenischen System verwendet (B.2.2). Die stammspezifische immunologische Detektion von Sp7 Reinkulturen war problemlos durchführbar und wurde mittels CLSM dokumentiert (s. Abbildung C.1, Bild A). Auch die Fluoreszenzmarkierung von an der Wurzeloberfläche siedelnden *A. brasilense* Sp7 Zellen lieferte ein klar von der Autofluoreszenz der Wurzel unterscheidbares Signal (s. Abbildung C.1, Bild C).

Problematischer gestaltete sich der Einsatz des mAk gegen Sp245. Bei der Anwendung an Sp245 inokulierten Wurzeln war es nicht möglich fluoreszenzmarkierte Zellen mikroskopisch zu identifizieren. Eine parallel durchgeführte FISH mit der speziesspezifischen Sonde Abras1420 (Stoffels *et al.*, 2001) lieferte jedoch zahlreiche Fluoreszenzsignale, was eindeutig auf eine Besiedlung der Rhizosphäre durch den inokulierten Stamm *A. brasilense* Sp245 hinwies. Die Durchführung einer immunologischen Fluoreszenzmarkierung einer Sp245 Reinkultur lieferte schließlich einen Hinweis darauf, dass das Antigen für mAk 3-1.11 ein Protein der *A. brasilense* Sp245 Geißel war (s. Abbildung C.1, Bild B). Da *A. brasilense* seine

Geißel bei der Besiedlung der Wurzel nach einiger Zeit verliert, ließ sich dadurch die schlechte Detektierbarkeit an der Wurzel erklären.

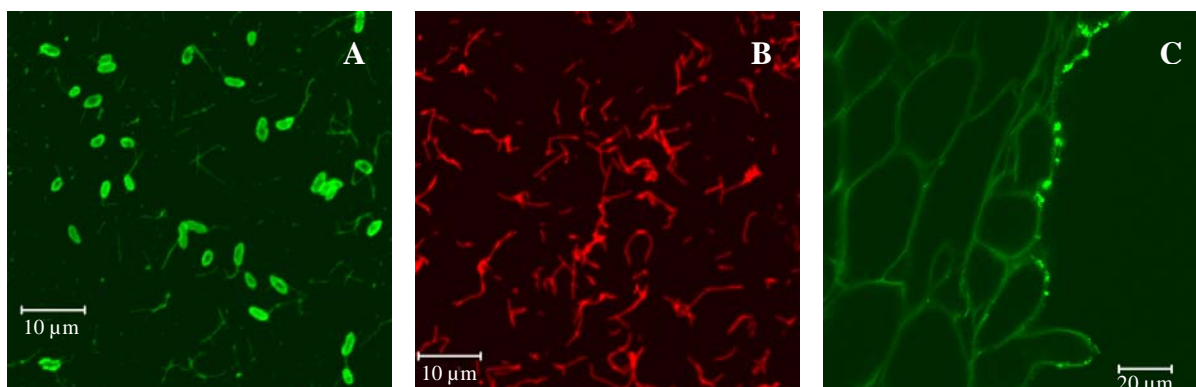


Abbildung C.1: Immunologische Fluoreszenzmarkierung der *A. brasilense* Stämme Sp7 und Sp245.

- (A) *A. brasilense* Sp7 Reinkultur markiert mit pAK Sp7 und einem sekundären Anti-rabbit-Antikörper gekoppelt mit Oregon Green[®]. Deutlich ist der sogenannte „Halo-Effekt“ zu erkennen, der durch die Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper auf der Zelloberfläche zustande kommt. Außerdem werden die Bakteriengeißeln durch die Antikörpermarkierung ebenfalls sichtbar.
- (B) *A. brasilense* Sp245 Reinkultur markiert mit mAk 3-1.11 und einem sekundären Anti-mouse-Antikörper gekoppelt mit Alexa Fluor[™]. Es sind keine individuellen Zellen zu sehen (vgl. Bild A). Fluoreszenzmarkierte fadenförmige Strukturen lassen darauf schließen, dass der monoklonale Antikörper ausschließlich an ein Epitop der Bakteriengeißel bindet.
- (C) Detektion von *A. brasilense* Sp7 auf der Wurzeloberfläche einer 3 Wochen alten Naxos Weizenpflanze aus dem monoxenischen System mit pAK Sp7 und einem sekundären Anti-rabbit-Antikörper gekoppelt mit Oregon Green[®].

C.1.4. Einsatz im quantitativen ELISA

Um die Einsatzmöglichkeiten der gewonnenen Antikörper auch für die Quantifizierung von siedelnden *A. brasilense* Zellen auf Wurzeln zu untersuchen, wurden mehrere quantitative Chemolumineszenz-ELISA durchgeführt (B.3.4.3). Von 1g Wurzelmaterial von drei Wochen alter Naxos Weizenpflanzen aus dem monoxenischen System, inokuliert mit dem jeweiligen *A. brasilense* Stamm, wurden die siedelnden Zellen extrahiert. Dieses Extrakt wurde zusammen mit einer dezimalen Verdünnungsreihe einer ÜN-Kultur von Stamm Sp7 bzw. Sp245 im ELISA eingesetzt und die Chemolumineszenz mithilfe eines Luminometers detektiert. Auch hierbei zeigte sich die limitierte Anwendbarkeit von mAk 3-1.11. In keinem der durchgeführten ELISAs lieferte mAk 3-1.11 ein verwertbares Lumineszenzsignal, das Rückschlüsse auf die im Wurzelextrakt enthaltene Zellzahl zuließ. Auch dies wäre durch eine ausschließlichen Bindung des mAks an ein Epitop der Bakteriengeißel erklärbar.

Beim ELISA mit dem pAk gegen Stamm Sp7 war es möglich die Zahl von *A. brasilense* Sp7 Zellen im Wurzelextrakt mit Hilfe einer ermittelten Eichkurve (s. Abbildung C.2) zu bestimmen. Die Messpunkte der Eichkurve setzten sich aus dem Mittelwert von vier

parallelen Messungen zusammen, die für jede Verdünnungsstufe der Sp7 ÜN-Kultur durchgeführt wurden. Die zweifache Standardabweichung des Mittelwerts wurde in der Grafik mitangegeben. Nach vier parallelen Messungen der Relative Light Units (RLU) für den Wurzelextrakt konnte dem berechneten Mittelwert der RLU eine Zellzahl von ca. $3 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$ Zellen pro ml Wurzelextrakt bzw. pro g Wurzelmaterial zugeordnet werden.

Um die Genauigkeit der Methode zu überprüfen wurden die *A. brasilense* Zellen im Wurzelextrakt über die FISH-Methode mit der Oligonukleotidsonde Abras1420 fluoreszenzmarkiert und anschließend am Mikroskop ausgezählt. Der nach Punkt B.3.4.4 ermittelte Wert von $1,9 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$ Zellen pro g Wurzel lag klar über dem durch den quantitativen ELISA bestimmten Wert, selbst wenn der relativ hohe Fehler der Zählung miteinbezogen wurde. Somit erwies sich die Methode des quantitativen ELISAs unter den gegebenen Umständen als ungeeignet für die Quantifizierung von *A. brasilense* und machte den Einsatz anderer Methoden notwendig.

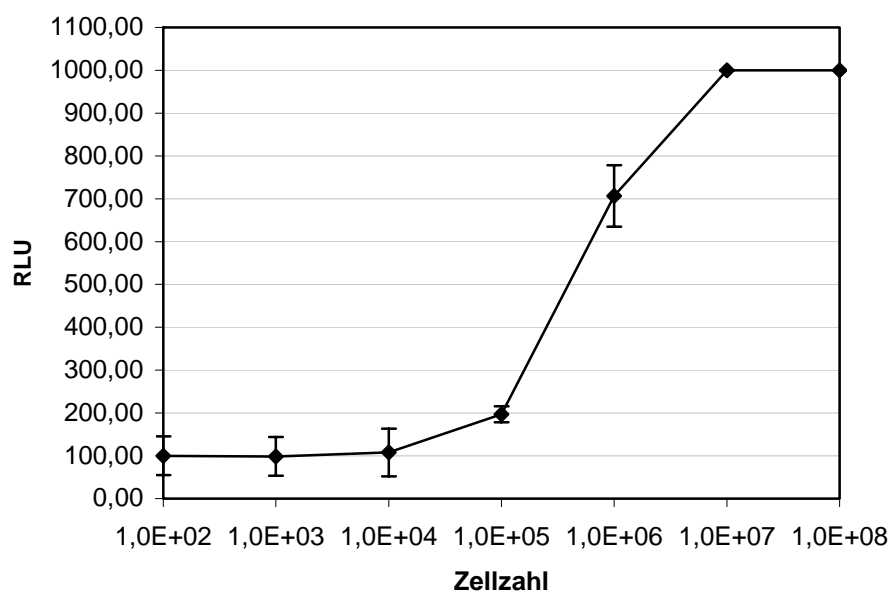


Abbildung C.2: Eichkurve für die Zuordnung der Relative Light Units (RLU) zur Zellzahl beim quantitativen ELISA. Bestimmt wurde die Lichtemission einer logarithmischen Verdünnung einer ÜN-Kultur von *A. brasilense* Sp7 nach einem Chemolumineszenz-ELISA mit dem pAk gegen Stamm Sp7. Die Zellzahl versteht sich als Zellzahl pro ml. Liest man an der Y-Achse den ermittelten Wert für die RLU des Wurzelextrakts ab, so lässt sich die entsprechende Zellzahl / ml zuordnen. Bei etwa 100 RLU bedingt die Hintergrundlumineszenz die Messgrenze nach unten, eine RLU von über 1000 kann von dem verwendeten Luminometer nicht mehr erfasst werden, wodurch die obere Messgrenze festgelegt ist.

C.2. Quantifizierung von *A. brasilense* auf Weizenwurzeln

C.2.1. Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Oberflächensterilisierung der Weizenwurzeln

Die Wurzeln von jeweils sechs vier Wochen alten Weizenpflanzen der Sorten Naxos aus dem monoxenischen System inokuliert mit entweder Stamm Sp7 oder Sp245 wurden geerntet und in vier gleiche Teile aufgeteilt. Der erste Teil der Wurzeln verblieb unbehandelt, der zweite Teil wurde 7 Minuten mit 1% (w/v) Chloramin T behandelt (s. B.3.3), der dritte 14 Minuten und der vierte 21 Minuten. Anschließend wurde das Wurzelmaterial gewaschen, gemörsert und verschiedene Verdünnungen auf NfB semisolidem Medium aufgetropft. Nach der Inkubation der inokulierten Kulturgefäße wurden über die MPN-Methode (s. B.3.4.2) die Keimzahlen bestimmt. Bei den 7 Minuten oberflächensterilisierten Wurzeln ließ sich im Vergleich zu den unbehandelten Wurzeln bei beiden Stämmen nur eine Keimzahlreduktion um den Faktor 10 feststellen, während bei den 14 Minuten in Chloramin T inkubierten Wurzeln nur noch in der niedrigsten Verdünnungsstufe bakterielles Wachstum zu erkennen war. Daher wurde eine Zeit von 10 Minuten für die Oberflächensterilisierung als optimal angenommen. Um dies zu überprüfen wurden erneut Weizensamen der Sorte Naxos mit beiden *Azospirillum*-Stämmen inokuliert und im monoxenischen System für vier Wochen angezogen. Nach dem Ernten wurden die Wurzeln wieder in vier gleiche Teile aufgeteilt. Wiederum blieb der erste Teil unbehandelt, während der zweite Teil 10 Minuten mit 2%igem (w/v) Chloramin T behandelt wurde, der dritte mit 1%igem (w/v) und der vierte mit 0,5%igem (w/v). Dabei ergab sich bei einer Konzentration von 10g Chloramin T pro Liter (1%) und einer Inkubationszeit von 10 Minuten eine Reduktion der Keimzahl um den Faktor 100-1000, während bei der 0,5%igen (w/v) Lösung nur eine zehnfache Reduktion zu erkennen war. Bei der Behandlung mit 2% Chloramin T konnte wiederum nur noch in der niedrigsten Verdünnungsstufe Bakterienwachstum festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Oberflächensterilisierungen eine Konzentration von 1% (w/v) Chloramin T und eine Inkubationszeit von 10 Minuten gewählt.

C.2.2. Wurzelbesiedlung im monoxenischen System

Zur Quantifizierung der Wurzelkolonisierung durch die beiden *A. brasilense* Stämme wurden fünf verschiedene Weizensorten zunächst im monoxenischen System untersucht. Dabei

handelte es sich um zwei moderne Hohertragssorten aus Deutschland mit der Bezeichnung Naxos und Nandu, sowie die Sorte Erbachshofer, die in Deutschland bereits vor 1945 angebaut wurde. Des weiteren wurden die Sorten Atir aus Israel und PF839197 aus Brasilien miteinbezogen (genauerer siehe Tabelle B.4).

Jeweils drei Parallelen von den nach Punkt B.2.2.2 oberflächensterilisierten Weizensamen wurden mit *A. brasilense* Sp7 oder Sp245 inokuliert (B.3.1) und für 4 Wochen im monoxenischen System angezogen. Außerdem wurden nicht inokulierte Kontrollpflanzen mitkultiviert. Nach der Ernte der Pflanzen und Bestimmung des Wurzelgewichts (B.3.2) konnte kein wachstumsstimulierender Effekt bei den inokulierten Pflanzen gegenüber den nicht inokulierten Kontrollen gefunden werden. Mit der Hälfte des Wurzelmaterials erfolgte die Oberflächensterilisierung mit Chloramin T (B.3.3), während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach dem Mörsern der Wurzeln und Anlegen von Verdünnungsreihen wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf NB- und MMAB-Agarplatten, sowie semisolidem NfB-Medium aufgetropft (B.3.4). Schließlich wurden die Keimzahlen über das Auszählen der CFU auf Platte (B.3.4.1) bzw. bei den NfB enthaltenden Kulturgefäßen über die MPN-Methode (B.3.4.2) bestimmt. Das Ergebnis für die Zellzahlbestimmung nach dem Platten-Auszählverfahren findet sich in Abbildung C.3, die MPN-Ergebnisse sind in Abbildung C.4 dargestellt. Die Bewertung von signifikanten Unterschieden dieser und aller folgenden Zahlenwerte erfolgte anhand von U-Tests nach B.3.4.5.

Bei den nicht inokulierten Kontrollpflanzen konnten jeweils keinerlei bakterielles Wachstum festgestellt werden, was ein Verfälschen der Ergebnisse durch Kontaminationen ausschließt. Die bestimmten CFU von NB- und MMAB-Platten unterschieden sich nicht voneinander, weshalb eine gemeinsame Darstellungsweise gewählt wurde. Bei der Auszählung ergab sich mit 2×10^8 die höchste Zellzahl für die brasilianischen Weizenwurzeln (PF839197) inokuliert mit Stamm Sp245. Gleichzeitig konnte ohne Oberflächensterilisierung beim brasilianischen Weizen als einziges eine signifikant geringere Zellzahl von Stamm Sp7 im Vergleich zu Sp245 festgestellt werden. Bei allen anderen untersuchten Sorten unterschieden sich die Zellzahlen der beiden Stämme nicht signifikant voneinander. Während allerdings die Zellzahlen der Sorten Naxos, PF839197 und Nandu bei etwa 10^8 Zellen pro Gramm Wurzelmaterial lagen, waren bei den Sorten Atir und Erbachshofer nur Werte um 2×10^7 zu ermitteln. Nach der Oberflächensterilisierung ergab sich eine Keimzahlreduktion zwischen 1×10^2 und 5×10^3 . Bei fast allen Kultivaren war eine meist um den Faktor 10 stärkere Reduktion der Zellzahlen bei Stamm Sp245 zu detektieren. Eine Ausnahme bildete wiederum PF839197, bei dem die CFU für beide Stämme gleichermaßen bei 2×10^5 lagen.

Plattenauszahlung

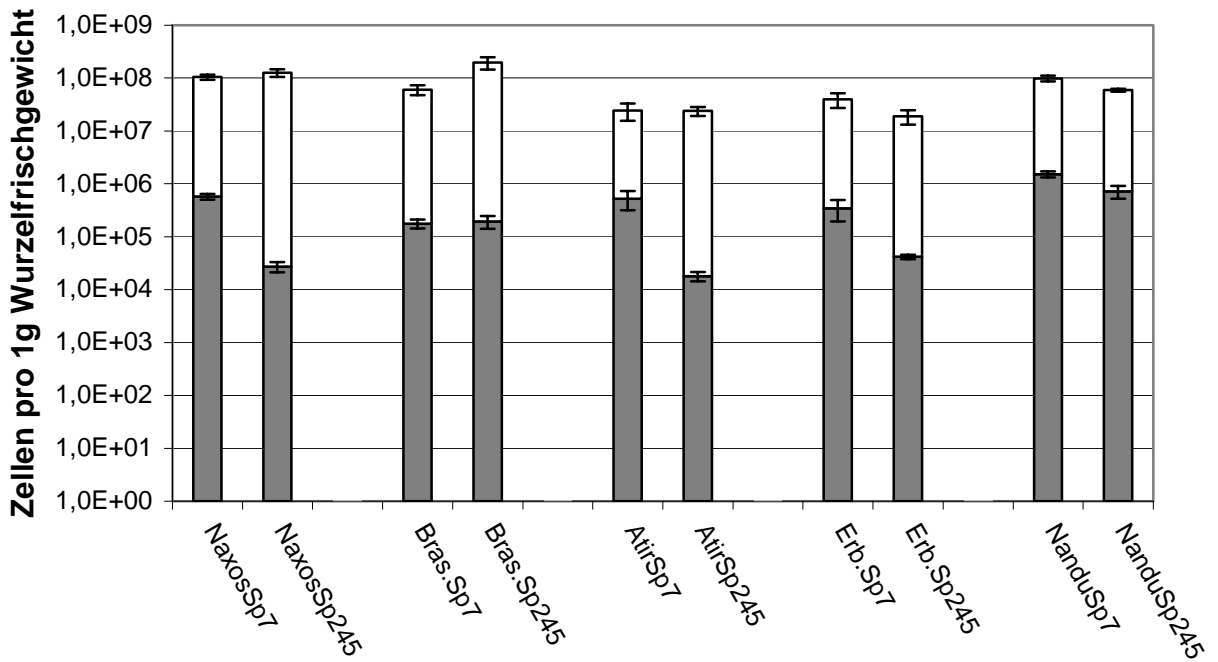


Abbildung C.3: Quantifizierung der Wurzelkolonisierung durch *A. brasilense* Sp7 und Sp245 im monoxenischen System mittels Platten-Auszähl-Verfahren. Logarithmisch dargestellt ist die Zellzahl pro g Wurzelfrischgewicht jeweils ohne (weißer Balken) und mit (dunkelgrauer Balken) vorangegangener Oberflächensterilisierung der Wurzeln. Untersucht wurden die Sorten Naxos, PF839197 (Bras.), Atir, Erbachshofer (Erb.) und Nandu. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus sechs parallelen Zählungen an.

MPN

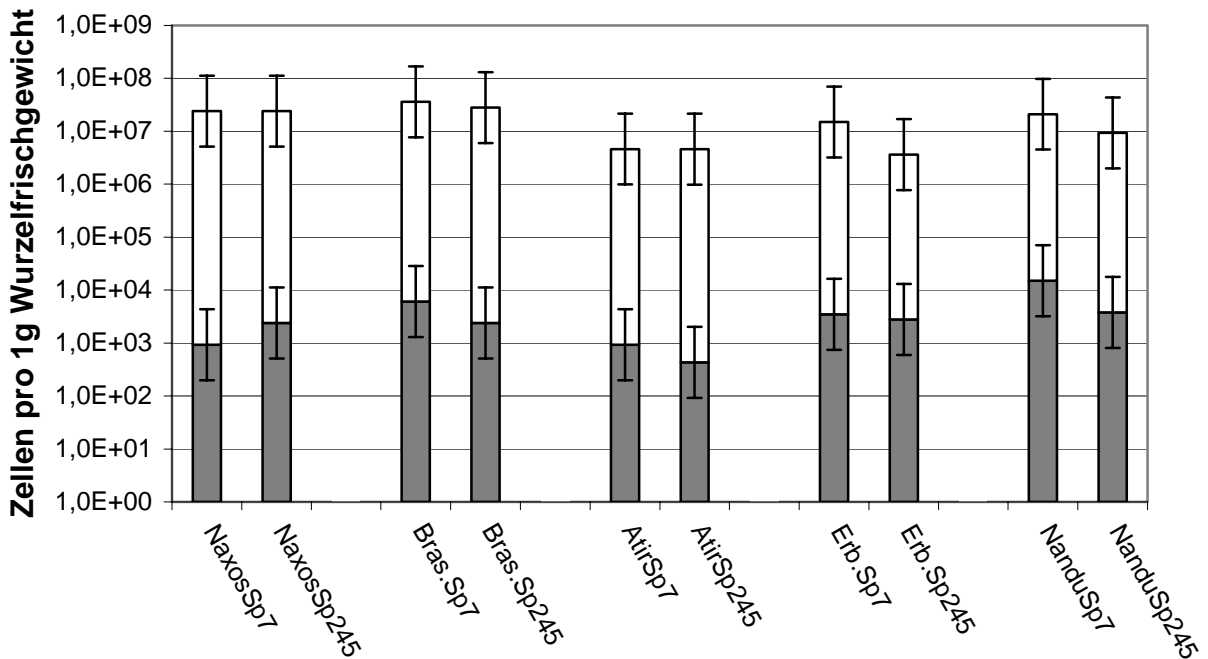


Abbildung C.4: Quantifizierung der Wurzelkolonisierung durch *A. brasilense* Sp7 und Sp245 im monoxenischen System mittels MPN-Methode. Darstellungsweise wie oben. Die Fehlerbalken bezeichnen das Konfidenzintervall für drei parallele Ansätze.

Bei der Keimzahlermittlung über die MPN-Methode ergab sich insgesamt eine geringere Zellzahl pro Gramm Wurzelfrischgewicht. Bei der Gesamtkeimzahl ohne Oberflächensterilisierung betrug dieser Unterschied meist etwa 50%, wobei analog zur Plattenkoloniezählung auch mit der MPN-Methode für die Sorten Naxos, PF839197 und Nandu etwa fünfmal höhere Keimzahlen gefunden wurden, als für Atir und Erbachshofer. Die Oberflächensterilisierung führte zu einer Keimzahlreduktion um 5×10^3 bis 1×10^4 Zellen. Die ermittelten Zellzahlen nach der Oberflächensterilisierung lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden *A. brasilense* Stämmen erkennen.

C.2.3. Wurzelbesiedlung im Bodensystem

Für die Bestimmung der Azospirillenzahl an Wurzeln von in Boden gewachsenen Weizenpflanzen wurden die Sorten Naxos, PF839197 und Atir verwendet, da bei diesen im monoxenischen System die größten Unterschiede bei der Quantifizierung aufgetreten waren. Die Keimzahlen wurden nach 4 Wochen Wachstum der Pflanzen im Gewächshaus über das Platten-Auszähl-Verfahren bestimmt wie in Punkt B.3.4.1 beschrieben, da sich diese Methode beim

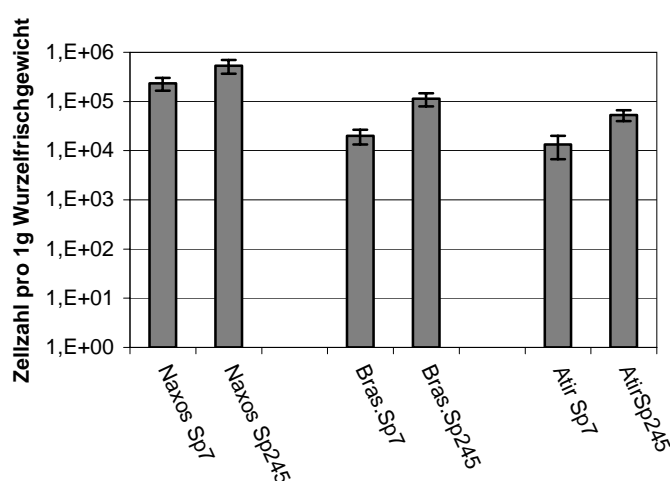


Abbildung C.5: Quantifizierung der Besiedlung von Weizenwurzeln der Sorte Naxos, PF839197 (Bras.) und Atir durch *A. brasilense* Sp7 und Sp245 im Bodensystem mittels Platten-Auszähl-Verfahren. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus drei parallelen Zählungen an.

monoxenischen System als zuverlässiger als die Bestimmung über die MPN-Tabelle erwiesen hatte. Nach 7 Wochen änderten sich die Zahlen nicht signifikant. Die ermittelten Werte lagen zwischen 2×10^4 und 5×10^5 , wobei die Zellzahlen bei dem Kultivar Naxos am höchsten lagen, während bei der Sorte Atir die niedrigsten Zahlen zu finden waren. Außerdem ließ sich eine etwas höhere Anzahl von Zellen des Stammes Sp245 bei allen drei Kultivaren detektieren (Abbildung C.5).

Nach der Oberflächensterilisierung mit Chloramin T konnten mit dieser Methode keine verlässlichen Daten gewonnen werden, da die Zellzahlen unterhalb des Detektionslimits von ca. 10^3 Zellen pro g Wurzelfrischgewicht lagen.

C.3. PGPR-Effekt von *A. brasilense*

Um das Trockengewicht von Spross und Wurzeln pro Pflanze zu ermitteln, wurden jeweils drei Pflanzen der Sorten Naxos, Atir und PF839197 in Freilandboden im Gewächshaus angezogen und nach 4 bzw. 7 Wochen geerntet. Die Wurzeln wurden vom Spross getrennt und das Gewicht des getrockneten Pflanzenmaterials separat bestimmt (B.3.2). Es wurden mit Stamm Sp7 bzw. Sp245 inokulierte Pflanzen, sowie nicht inokulierte Kontrollpflanzen untersucht. Dabei ergab sich nach 4 Wochen weder eine signifikante Erhöhung des Spross- noch des Wurzelgewichts bei den inokulierten Pflanzen. Bei der brasilianischen Weizensorte wurde sogar ein höheres Wurzelgewicht bei der nicht inokulierten Kontrollpflanze im Vergleich zu sowohl Sp7 als auch Sp245 inokuliertem Weizen festgestellt. Bei der Sorte Atir war lediglich das Wurzelgewicht der Sp7 inokulierten Pflanzen niedriger als das der Kontrollpflanzen.

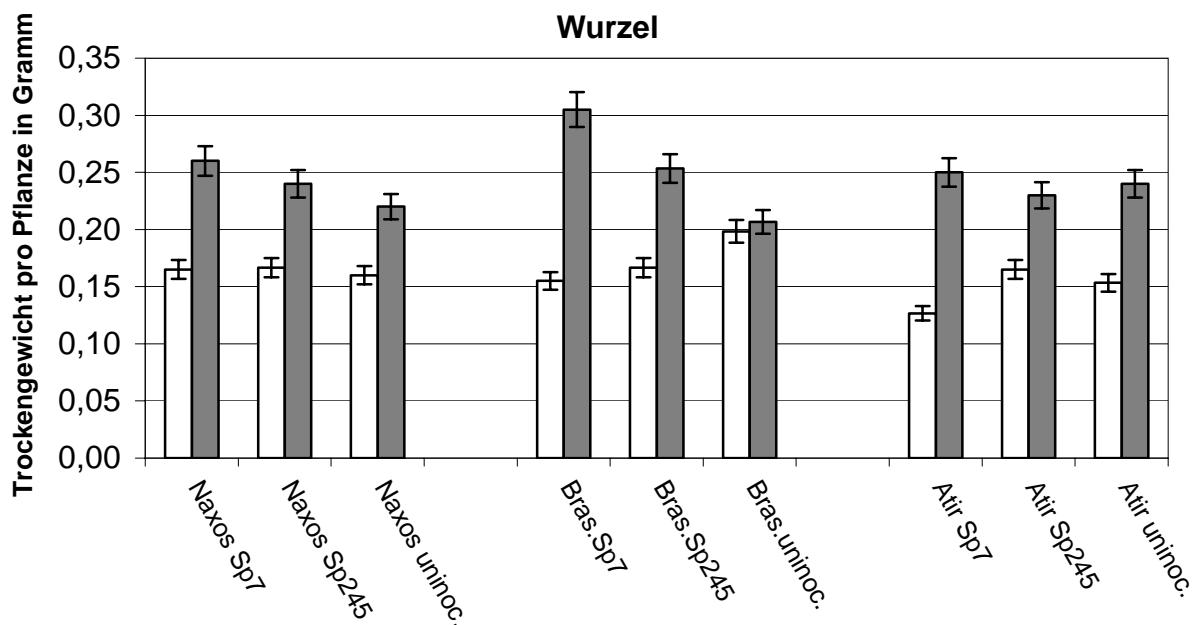


Abbildung C.6: Wurzel-trockengewicht pro Pflanze der Sorten Naxos, PF839197 (Bras.) und Atir inokuliert mit Stamm Sp7 oder Sp245 bzw. ohne Inokulum. Die weißen Balken geben die Werte nach 4 Wochen an, die dunkelgrauen nach sieben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert für 6 parallele Messungen dar.

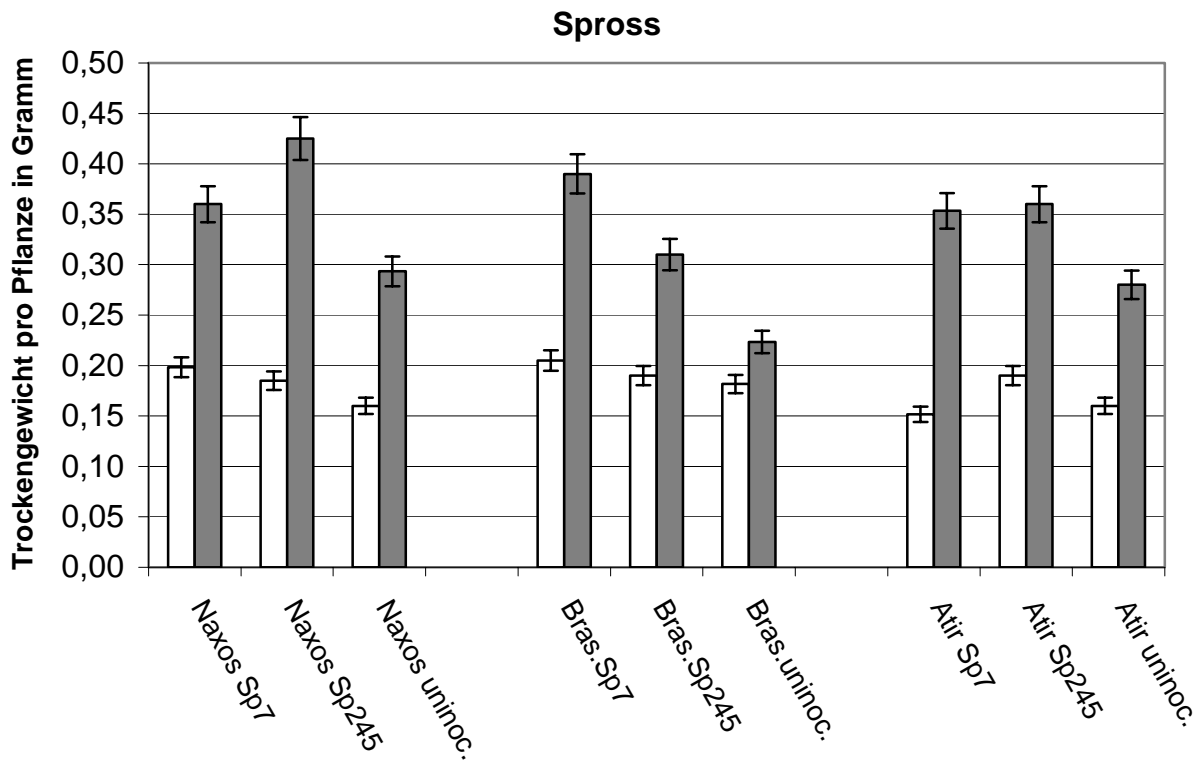


Abbildung C.7: Sprosstrockengewicht pro Pflanze für die Sorten Naxos, PF839197 (Bras.) und Atir jeweils inokuliert mit Stamm Sp7 oder Sp245, sowie eine nicht inokulierte Kontrolle. Darstellungsweise wie oben.

Nach 7 Wochen konnte ein signifikanter wachstumsstimulierender Effekt durch die inokulierten Azospirillen nachgewiesen werden. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei der Sorte PF839197 (brasilianisch), bei der sich für Sp7 inokulierte Pflanzen eine Steigerung des Wurzelgewichts im Vergleich zu den nicht inokulierten um bis zu 50% ergab (Abbildung C.6). Die mit Stamm Sp245 inokulierten Pflanzen der gleichen Sorte zeigten ein um 25% höheres Wurzelgewicht als die Kontrolle. Bei der Sorte Naxos ließ sich ebenfalls bei Pflanzen, welche mit Stamm Sp7 inokuliert worden waren, das höchste Wurzelgewicht feststellen. Hier belief sich der wachstumsstimulierende Effekt auf 20% (Sp7) bzw. 10% (Sp245) im Vergleich zur Kontrolle. Anders verhielt es sich bei dem israelischen Weizenkultivar Atir, wo sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wurzelgewicht von inokulierten und nicht inokulierten Pflanzen zeigen ließ.

Beim Trockengewicht des Sprosses (Abbildung C.7) ergab sich mit einigen Unterschieden ein ähnliches Bild wie beim Wurzelgewicht. In diesem Fall wurde allerdings das größte Sprossgewicht bei der Sorte Naxos inokuliert mit Stamm Sp245 gefunden (siehe auch Abbildung C.8), wobei die Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolle bei 45% lag. Bei

den mit Stamm Sp7 inokulierten Pflanzen der Sorte Naxos konnte noch ein 25%ige Erhöhung des Trockengewichts nachgewiesen werden. Bei dem Kultivar PF839197 war zwar das Gesamtgewicht pro Spross geringer als bei Naxos, jedoch konnte bei Pflanzen, die mit Stamm Sp7 inokuliert worden waren, eine bis zu 70%ige Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolle registriert werden. Auch bei den Pflanzen inokuliert mit Stamm Sp245 betrug die Gewichtszunahme noch knapp 40% im Vergleich zum Kontrollgewicht. Somit war der wachstumsstimulierende Effekt bei der brasilianischen Weizensorte sowohl für Wurzel als auch Spross am stärksten ausgeprägt. Bei der Sorte Atir schließlich, wirkte sich beim Sprossgewicht die Azospirilleninokulation im Vergleich zu den anderen Kultivaren am geringsten aus. Mit etwa 25% im Vergleich zur Kontrolle war zwar bei beiden Stämmen anders als beim Wurzelgewicht ein stimulierender Effekt zu erkennen, dennoch lag dieser Wert deutlich unterhalb dem der meisten anderen Kultivare.



Abbildung C.8: Naxos Weizenpflanzen in Freilandboden inokuliert mit *A. brasilense* Stamm Sp7 und Sp245, sowie ohne Inokulum. Der Unterschied in der Sprosslänge zwischen inokulierten und nicht inokulierten Pflanzen ist deutlich erkennbar.

C.4. Lokalisierung der *A. brasilense* Stämme an der Wurzel

C.4.1. Detektion durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Um eine genauere Analyse des Besiedlungsverhaltens der beiden Stämme durchzuführen, wurden 4 Wochen alte Weizenpflanzen der Sorten Naxos, PF839197 und Atir aus dem monoxenischen System mit Stamm Sp7 oder Sp245 als Inokulum geerntet, gewaschen und von verschiedenen Bereichen der Wurzel Schnitte angefertigt (B.3.5.1). Diese wurden PFA-fixiert (B.5.1.4), die siedelnden Azospirillen mittels FISH markiert (B.5.1.5) und mittels CLSM detektiert (B.4.2). Hierzu diente die fluoreszenzmarkierte, speziesspezifische

Oligonukleotidsonde Abras1420 in Kombination mit dem Sondengemisch EUB338-mix, mit dem sich die meisten bekannten Mikroorganismen der Domäne *Bacteria* detektieren lassen. Beide Stämme wurden in großer Zahl an der Oberfläche von Hauptwurzel, Seitenwurzel und Wurzelhaaren gefunden. In allen drei Weizenkultivaren war die Siedlungsdichte an den älteren, basalen Teilen der Wurzel am höchsten und nahm in Richtung des apikalen Endes leicht ab. Im Gegensatz zu *A. brasilense* Sp7 (Abbildung C.9, Bild D) konnte Stamm Sp245 nicht nur auf der Wurzeloberfläche detektiert werden, sondern wurde auch interzellulär und intrazellulär in den äußeren Kortexschichten gefunden (Abbildung C.9, Bild C). Im Zentralzylinder konnte bei keinem der Schnitte *Azospirillum*-Zellen entdeckt werden. Diese endophytisch siedelnden Zellen von Stamm Sp245 konnten etwa in jedem 8. Wurzelschnitt nachgewiesen werden. Es existierten keine erfassbaren Unterschiede zwischen den drei Weizensorten.

Ebenso wurden Pflanzen aus dem Bodensystem untersucht. Dabei ergab sich eine wesentlich geringere Besiedlungsdichte als im monoxenischen System (vgl. C.2.3). Die inokulierten *Azospirillen* mussten mit anderen Rhizosphärenbakterien um Nahrung und Siedlungsraum an der Wurzel konkurrieren. Diese Nahrungskonkurrenten wurden durch die Sonde EUB338-mix erfasst und machten meist mehr als die Hälfte der gesamten Rhizosphärenpopulation aus. Dementsprechend seltener konnte auch Stamm Sp245 im Inneren der Wurzel detektiert werden. Nur etwa in jedem 20. untersuchten Schnitt wurden endophytische Zellen im Wurzelkortex nachgewiesen (Abbildung C.9, Bild A), während bei Stamm Sp7 keine Endophyten zu finden waren (Abbildung C.9, Bild B). Auch im Boden existierten keine Unterschiede in der Besiedlung der einzelnen Kultivare.

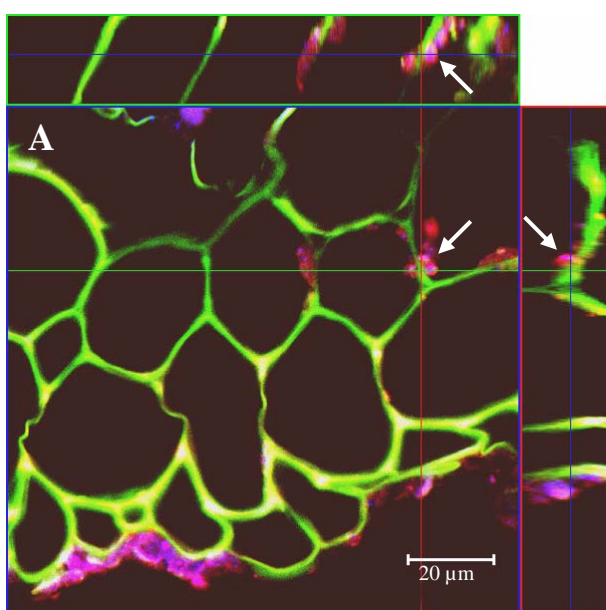
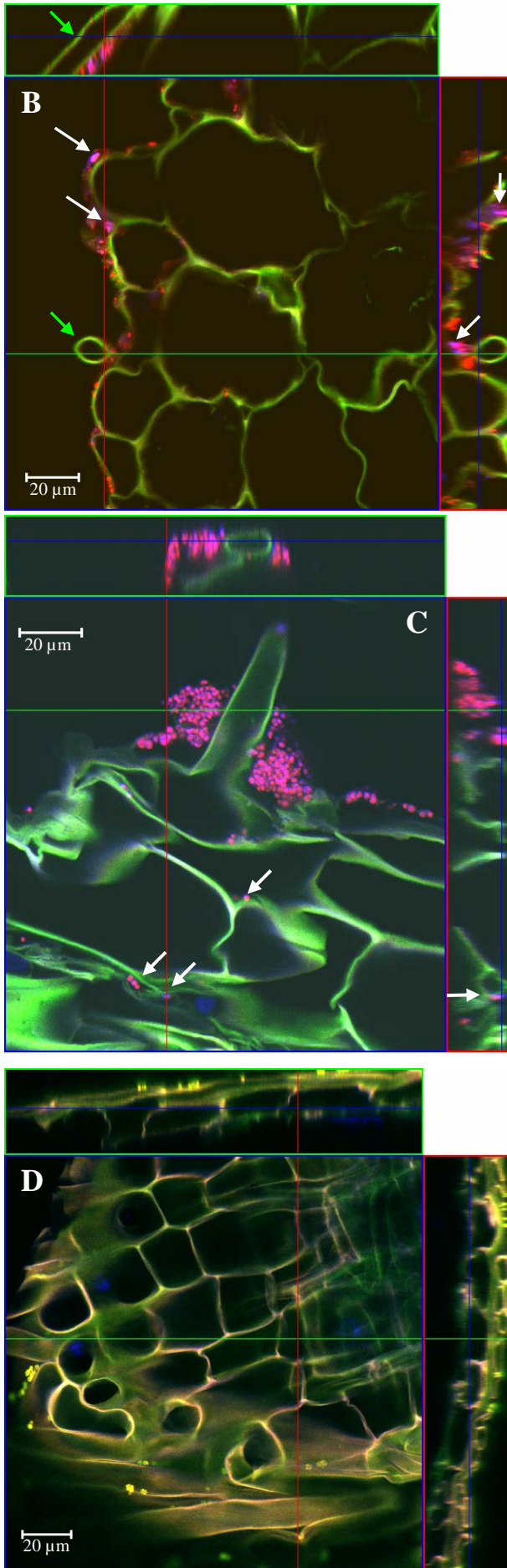


Abbildung C.9: Detektion von FISH-markierten *A. brasilense* Zellen des Stammes Sp7 und Sp245 an Wurzelschnitten mittels CLSM. Alle Bilder stammen von Wurzeln, die nach 4 Wochen geerntet wurden. Gezeigt sind orthogonale Ansichten von dreidimensionalen, konfokalen Bildern aus einem z-Stapel von xy-Scans. Im blau umrahmten Hauptfenster ist ein repräsentatives Bild aus einem solchen z-Stapel zu sehen. Die roten und grünen Linien repräsentieren vertikale optische Schnitte durch diese Bildstapel, wobei die so entstandene Seitenansicht jeweils in den entsprechend farbig umrahmten Seitenfenstern dargestellt ist. In dieser Seitenansicht wiederum, zeigt die blaue Linie die Position des Hauptbildes innerhalb des z-Stapels an.

(A) Radialschnitt aus der Wurzelhaarzone des brasilianischen Weizens PF839197, angezogen im Bodensystem und inokuliert mit *A. brasilense* Stamm Sp245. *Azospirillum*-Zellen sind in der Farbe magenta abgebildet, was aus der



Kombination der beiden Fluoreszenzsignale von EUB338-mix markiert mit Cy3 (rot) und Abras1420 markiert mit Cy5 (blau) resultiert. Zahlreiche Sp245 Zellen sind auf der Wurzeloberfläche zu sehen. Die Pfeile verweisen auf positive Hybridisierungssignale innerhalb des Wurzelkortexes.

- (B) Radialschnitt aus der Wurzelhaarzone des brasilianischen Weizenkultivars PF839197 angezogen auf Boden, inokuliert mit Stamm Sp7. Mehrere *A. brasilense* Zellen, identifizierbar durch die Farbe magenta (Eub338-mix Cy3 und Abras1420 Cy5, angezeigt durch weiße Pfeile), sind auf der Wurzeloberfläche erkennbar, aber keine im Inneren. Außerdem sind einige andere Rhizosphärenbakterien in rot (EUB338-mix Cy3) dargestellt. Die grüne Linie repräsentiert einen optischen Schnitt durch ein Wurzelhaar, auf dessen Oberfläche in der grün umrahmten Seitenansicht einige *A. brasilense* Sp7 Zellen zu sehen sind (grüner Pfeil).
- (C) Längsschnitt aus der Wurzelhaarzone einer monoxenisch angezogenen Weizenpflanze der Sorte Naxos, inokuliert mit *A. brasilense* Stamm Sp245. Endophyten sind durch Pfeile markiert. Die Hybridisierung erfolgte mit den Sonden Eub338-mix (Cy3) und Abras1420 (Cy5). In der grün umrahmten Seitenansicht ist ein optischer Schnitt durch ein Wurzelhaar zu sehen, dessen Oberfläche dicht von *A. brasilense* kolonisiert wird.
- (D) Längsschnitt der Wurzelhaarzone einer Naxos Weizenpflanze aus dem monoxenischen System, inokuliert mit *A. brasilense* Stamm Sp7. Die Hybridisierung wurde mit den Sonden EUB338-mix (FITC) und Abras1420 (Cy3) durchgeführt, was in Kombination ein gelbes Signal für *A. brasilense* Zellen ergibt. Charakteristisch für Stamm Sp7 ist die starke Kolonisierung der Wurzeloberfläche und das Fehlen von Zellen im Inneren der Wurzel, was besonders in den Seitenansichten deutlich wird. Das Hauptfenster zeigt nicht kolonisierte Wurzelzellen des Kortex und einige *A. brasilense* Sp7 Zellen, die die Oberfläche von Wurzelhaaren kolonisieren.

C.4.2. Detektion von konstitutiv GFP-markierten *A. brasilense* Zellen

C.4.2.1. Fluoreszenzmarkierung durch *gfp*- und *rfp*-Reportergene

Um die Darstellung von *A. brasilense* Zellen in intaktem Wurzelgewebe zu ermöglichen ohne vorher Schnitte anfertigen zu müssen, oder die Wurzel anderweitig physikalisch oder chemisch zu behandeln, wurde versucht beide Stämme mit einem konstitutiv exprimierten *gfp*- bzw. *rfp*-Gen zu markieren. Zunächst wurde mit dem Plasmid pJBA28, das auf einem mini-Tn5-Transposon neben der stabilen Variante mut3 des *gfp*-Gens eine Kanamycin-Resistenzkassette für die Selektion der Transkonjuganden trägt, ein chromosomales Tagging nach Punkt B.5.11.3 versucht. Ebenso wurde mit dem Plasmid pTn5-red verfahren, bei dem das mini-Tn5-Transposon ein *dsred*-Gen unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *lac* Promotors von *E. coli* beinhaltet. In diesem Fall erfolgte die Selektion über Tetracyclin.

Nach dem konjugativen Transfer von Plasmid pJBA28 in *A. brasilense* Sp7 und Sp245 ließen sich zwar kanamycinresistente Transkonjuganden selektieren, jedoch wiesen diese keine detektierbare GFP-Fluoreszenz auf. Dies ließ darauf schließen, dass *gfp* in *A. brasilense* chromosomal nicht stark genug exprimiert wird, um eine sichtbare Fluoreszenz zu erzeugen. Mit Plasmid pTn5-red konnten nach dem konjugativen Transfer keine tetracyclinresistenten Transkonjuganden selektiert werden.

Daher wurde auf eine chromosomale Markierung der Azospirillen verzichtet und stattdessen das Plasmid pBAH7 basierend auf dem Vektor pBBR1MCS-2 eingesetzt, von dem bekannt war, dass in einer Reihe von Bodenorganismen eine Replikation erfolgt, weshalb dieser Vektor für eine Markierung der Zielzellen auf Plasmidebene verwendbar war. Auch dieses Plasmid trug ein konstitutiv exprimiertes *gfp*mut3 Gen, sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette. Des Weiteren wurde das Plasmid pMH433 verwendet, welches eine Gentamycin-Resistenz trägt und ein *rfp*-Gen für eine rote Fluoreszenzmarkierung. Nach Punkt B.5.11.4 wurden die Plasmide in beide *A. brasilense* Stämme übertragen und Transkonjuganden über kanamycin- bzw. gentamycinhaltige MMAB-Nalidixinsäure-Platten selektiert. Anschließend wurde bei allen resistenten Klonen die Stärke der *gfp*- bzw. *rfp*-Fluoreszenz mikroskopisch überprüft. In diesem Fall ergab sich für die GFP-markierten Stämme nach ca. 2 Tagen eine intensive grüne Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm. Diese verstärkte sich noch bei Lagerung der Platten bei 4°C. Bei den Transkonjuganden, die das Plasmid pMH433 enthielten, war keine rote Fluoreszenz festzustellen, obwohl eine Resistenz gegen Gentamycin, welche auf demselben Plasmid kodiert war, auftrat. Deshalb wurde nicht weiter versucht, *A. brasilense* mit RFP zu markieren.

Durch das Anziehen der GFP-markierten Transkonjuganden auf antibiotikafreiem Medium wurde die Stabilität des Plasmids pBAH7 ohne Antibiotikaselektionsdruck getestet. Dabei ergab sich, dass nach etwa hundert Generationen auf Platte immer noch ca. 50% der Zellen eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Daher wurden die erzeugten GFP-markierten Azospirillen als geeignet für die Inokulation von Wurzeln angesehen. Sie wurden als Sp7 *gfpmut3* und Sp245 *gfpmut3* bezeichnet.

C.4.2.2. Einsatz der GFP-markierten *A. brasilense* Stämme als Inokulum

Mit diesen beiden Stämmen wurden ausgekeimte, oberflächensterilisierte Samen der Sorten Naxos, PF839197 und Atir beimpft und im monoxenischen oder Bodensystem für 4 Wochen angezogen. Nach dieser Zeit wurden die Wurzeln geerntet (B.3.5.2), ohne weiter Behandlung auf einen Objektträger gelegt und mittels CLSM untersucht. Im Bodensystem konnten keine GFP-markierten Zellen detektiert werden, was unter anderem auch an der intensiven grünen Autofluoreszenz von Bodenpartikeln an der Wurzeloberfläche lag. Im monoxenischen System war die Detektion der GFP-markierten Zellen problemlos möglich. Dabei ergab sich ähnlich wie bei der FISH-Detektion eine relativ gleichmäßige Verteilung beider Stämme auf der Wurzeloberfläche, mit einer leicht verringerten Siedlungsdichte in Richtung des apikalen Endes. Wiederum konnten die GFP-markierten Zellen auf Hauptwurzel, Seitenwurzeln und Wurzelhaaren aller drei Kultivare gleichermaßen detektiert werden. Die unbehandelten Wurzeln zeigten eine schwächere Autofluoreszenz als nach der PFA-Fixierung, weshalb mit dem CLSM eine Penetrationstiefe von mehr als 40µm erreicht werden konnte. Dadurch und durch die intensive GFP-Fluoreszenz war es möglich, eine Lokalisierung von Stamm Sp245 (Abbildung C.10, Bild A, C, E, G, H) im Inneren von intakten Kortezellen nachzuweisen. Stamm Sp7 konnte analog zu den mit der FISH-Untersuchung erzielten Ergebnissen nur an der Wurzeloberfläche gefunden werden (Abbildung C.10, Bild B, D, F). Somit konnte schließlich der Beweis erbracht werden, dass bei allen drei Weizenkultivaren Stamm Sp245 die Fähigkeit besitzt, Zellen des Wurzelkortexes zu besiedeln, während dies Stamm Sp7 nicht möglich ist.

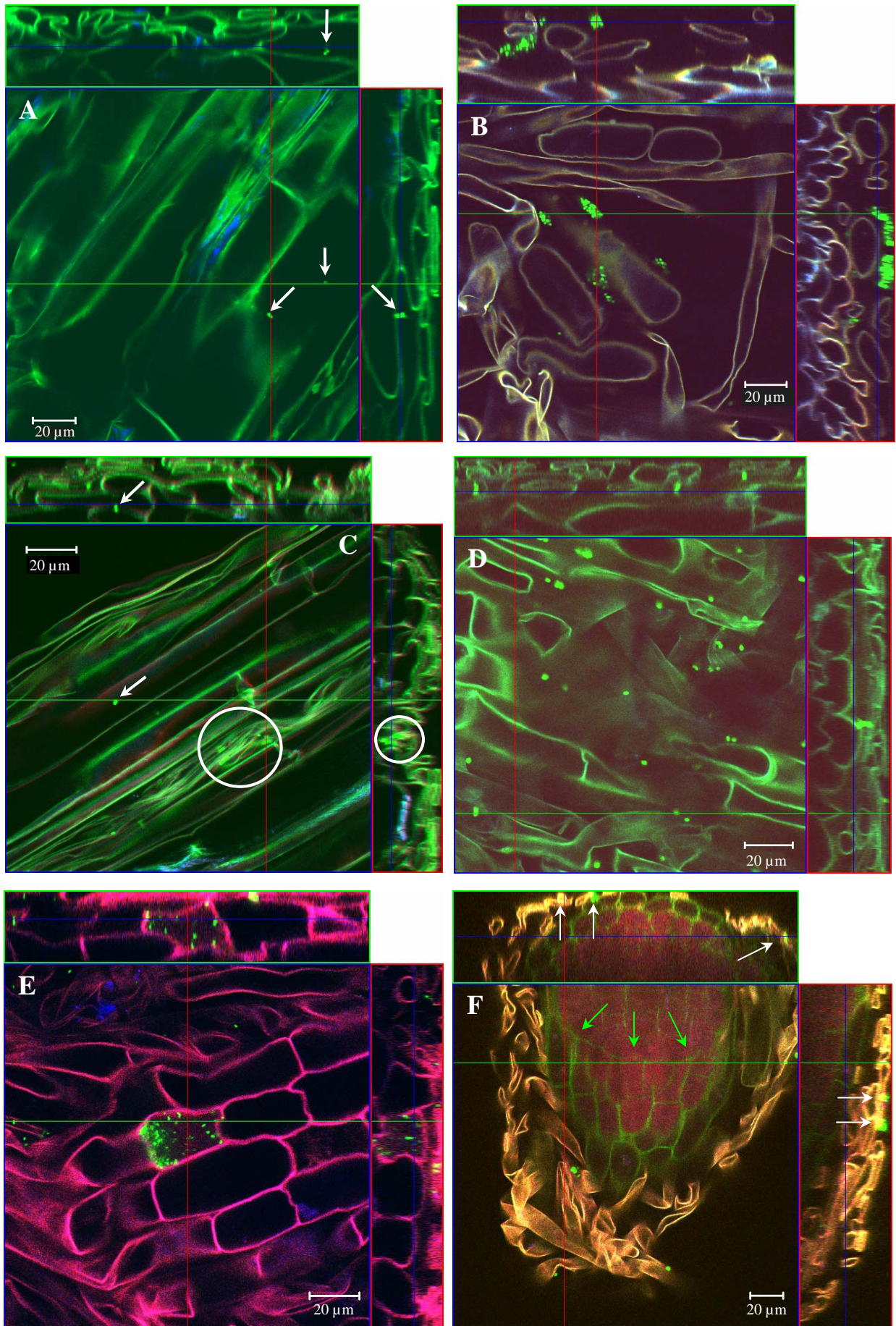


Abbildung C.10: Fortsetzung und Erklärung siehe nächste Seite

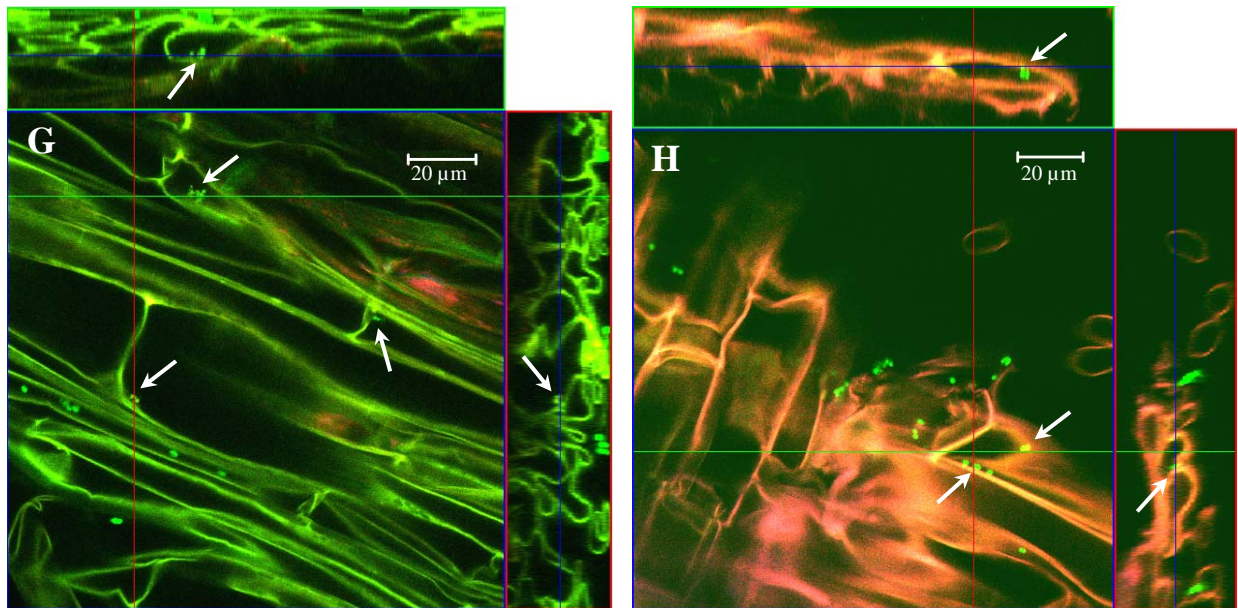


Abbildung C.10 (Fortsetzung von voriger Seite): Lokalisierung der GFP-markierten *A. brasilense* Stämme Sp7 *gfpmut3* und Sp245 *gfpmut3* an 4 Wochen alten, ungeschnittenen Weizenwurzeln aus dem monoxenischen System durch „optisches Schneiden“ mit dem CLSM. Zur Erklärung der orthogonalen Darstellungsweise siehe Abbildung C.9.

- (A) Basaler Teil einer Atir Weizenwurzel inokuliert mit *A. brasilense* Sp245 *gfpmut3*. Mehrere GFP-fluoreszierende Zellen (grün) sind auf der Oberfläche zu sehen, aber auch im Inneren einer Wurzelzelle lassen sich positive Signale finden (angezeigt durch weiße Pfeile). In der Seitenansicht ist jeweils eine der beiden im Hauptfenster sichtbaren Zellen abgebildet.
- (B) Basaler Teil einer Atir Weizenwurzel inokuliert mit *A. brasilense* Sp7 *gfpmut3*. Es sind GFP-fluoreszierende Zellen in Haupt- und Seitenfenstern gezeigt, die in großer Zahl die Oberfläche eines Wurzelhaares besiedeln. Im Wurzelinneren sind keine Signale zu erkennen.
- (C) Wurzelhaarzone einer Naxos Weizenpflanze mit Stamm Sp245 *gfpmut3* als Inokulum. Der weiße Pfeil markiert eine endophytisch siedelnde *A. brasilense* Zelle sowohl im Haupt- als auch im Seitenfenster. Der weiße Kreis umschließt einige Zellen, die bei der Betrachtung des Hauptfensters leicht für Endophyten gehalten werden könnten, da das dargestellte Bild einen relativ weit im Inneren gelegenen Bereich der Wurzel zeigt. In der Seitenansicht wird jedoch deutlich, dass die eingekreisten Zellen die Wurzeloberfläche im tiefsten Punkt einer Falte besiedeln.
- (D) Wurzelhaarzone einer Naxos Weizenpflanze, die mit Stamm Sp7 *gfpmut3* inokuliert wurde. Im Hauptfenster sind zahlreiche *A. brasilense* Zellen zu sehen, die die Wurzeloberfläche kolonisieren. In der Seitenansicht wird wiederum deutlich, dass sich diese Kolonisierung auf die Oberfläche der Wurzel und der Wurzelhaare beschränkt.
- (E) Wurzelhaarzone einer brasilianischen Weizenpflanze (PF839197) mit Stamm Sp245 *gfpmut3* als Inokulum. Deutlich ist ein einzelne, komplett besiedelte Rhizodermiszelle im Hauptfenster und beiden Seitenansichten zu sehen. Eine Analyse aller Bilder des z-Stapels ergab, dass es sich um eine optisch intakt erscheinende Wurzelzelle handelte.
- (F) Aufnahme der Wurzelspitze einer brasilianischen Weizenpflanze (PF839197) inokuliert mit Sp7 *gfpmut3*. Die siedelnden Zellen sind in den Seitenfenstern mit weißen Pfeilen markiert. Gut ist im Hauptfenster die Calyptra zu erkennen, die optisch abgegrenzt vom restlichen Wurzelgewebe erscheint (grüne Pfeile).
- (G) Wurzelhaarzone einer Weizenpflanze der Sorte Atir inokuliert mit Stamm Sp245 *gfpmut3*. Die weißen Pfeile zeigen mehrere GFP-markierte *A. brasilense* Zellen im Inneren von intakten Wurzelzellen an. In den Seitenfenstern sind neben Endophyten auch epiphytisch siedelnde Zellen zu sehen.
- (H) Austrittsstelle einer Seitenwurzel bei einer Naxos Weizenpflanze inokuliert mit Stamm Sp245 *gfpmut3*. Deutlich ist eine große Zahl von endo- und epiphytisch siedelnden Zellen an der Austrittsstelle der Seitenwurzel zu sehen. Endophyten sind in Haupt- und Seitenansicht durch weiße Pfeile markiert.

C.5. Herstellung von *gfp*-Reporterkonstrukten zur Expressionsanalyse des *ipdC*-Gens in *A. brasilense*

Im Folgenden wurde anhand von Reporterkonstrukten eine Untersuchung der *ipdC*-Expression vorgenommen. Hierbei handelt es sich um ein Gen, das für die Indol-3'-Pyruvatdecarboxylase kodiert, welche ein Schlüsselenzym bei der Bildung von IES (s. A.3.1.2) darstellt. Zunächst sollte das *ipdC*-Gen mit Hilfe des „gene replacement“ Vektors pEX18Gm (s. B.5.11.2) inaktiviert werden. Dies wurde durch das Einfügen einer Knock-out-Kassette bestehend aus dem Gen *gfp*(ASV) und einem Kanamycinresistenzmarker über homologe Rekombination versucht. Nach einer erfolgreichen Knock-out-Mutagenese sollte das promotorlose *gfp*-Gen in Abhängigkeit vom *ipdC*-Promotor exprimiert werden.

C.5.1. Konstruktion einer Knock-out-Mutation im *ipdC*-Gen

C.5.1.1. Amplifikation zweier *ipdC*-Fragmente mittels PCR

Anhand der Sequenzdaten, die bereits von *A. brasilense* Stamm Sp7 zur Verfügung standen (Zimmer *et al.*, 1998), wurden zwei Primerpaare mit artifiziellen Restriktionsschnittstellen konstruiert (B.5.7.1). Mit den Primern *ipdC2EcoRI* und *ipdC3SacI* ließ sich durch PCR (B.5.7.3) das Fragment *ipdC3* (ca. 900bp) amplifizieren, während das Primerpaar *ipdC4PstI* und *ipdC5HindIII* zur Amplifikation von Fragment *ipdC4* (ca. 800bp) eingesetzt wurde (für Primerbindungsstellen siehe auch Abbildung C.13). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Sequenzdaten von Stamm Sp245 zur Verfügung standen und deshalb davon ausgegangen wurde, dass die *ipdC*-Gene von Stamm Sp7 und Sp245 identisch waren, wurde für die PCR nur chromosomale Template-DNS von Stamm Sp7 verwendet. Im Folgenden wurde dementsprechend auch nur ein Suizid-Plasmid mit den DNS-Amplifikaten von Stamm Sp7 für die Knock-out-Mutagenese in beiden Stämmen eingesetzt.

C.5.1.2. Konstruktion einer inaktivierten *ipdC*-Kassette

Für eine allgemeine Beschreibung des Vorgehens bei der Plasmidkonstruktion siehe B.5.11.1. Der erste Konstruktionsschritt war die Klonierung der beiden *ipdC*-Fragmente aus C.5.1.1 mittels *TOPO TA Cloning*[®] Kit (B.5.7.6) in einen *pCR*[®]4-*TOPO* Vektor, woraus die Plasmide pTopo-*ipdC3* und pTopo-*ipdC4* resultierten. Außerdem wurde mit den Primerpaaren *gfpAsv*-vor (SacI Schnittstelle) und *gfpAsv*-rev (KpnI Schnittstelle) aus pKR-C12 (Riedel *et al.*, 2001, siehe Tabelle B.2) das promotorlose Gen *gfp*(ASV) amplifiziert (ca. 750bp) und via TA-Klonierung in einen *pGem-T* Vektor übertragen (B.5.7.6), was pGemMR4 ergab. Als

nächster Schritt wurde das Fragment *ipdC3* aus dem Topo-Vektor ausgeschnitten, und über die Schnittstellen *EcoRI* und *SacI* gerichtet in den „gene replacement“ Vektor pEX18Gm (Hoang, *et al.*, 1998) kloniert. Das entstandene Konstrukt wurde als pMR1 bezeichnet. Über die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *HindIII* erfolgte nun die gerichtete Klonierung des zweiten *ipdC*-Fragments (*ipdC4*) in pMR1, was Plasmids pMR2 ergab. Aus dem Vektor pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BglIII* und *NsiI* die Kanamycinresistenzkassette (Neomycin-3'-Phosphotransferase, *npt*) ausgeschnitten und in das mit *BamHI* und *PstI* linearisierte Plasmid pMR2 ligiert. Dies war möglich, da die Enzyme *BamHI* und *BglIII*, ebenso wie *PstI* und *NsiI* beim Verdau zueinander kompatible, überhängende Enden produzieren. Bei der Ligation gehen die Schnittstellen verloren. Das erzeugte Konstrukt wurde pMR3 genannt. Es schloss sich die Klonierung des *gfp(ASV)*-Gens in pMR3 über die Schnittstellen *SacI* und *KpnI* an, was in pMR4 resultierte.

Das so erzeugte Knock-out-Plasmid pMR4 trug nun neben Gentamycinresistenzgen (Gentamycin-Acetyltransferase, *aacC1*) und dem Gen für die Lävansucrase (*sacB*) des pEX18Gm Vektors, als Insert eine *gfp-npt*-Kassette flankiert von den beiden homologen Regionen des *ipdC*-Gens. Dabei wurde durch das gerichtete Klonieren in allen Schritten sichergestellt, dass die einzelnen DNS-Abschnitte in der gleichen Leserichtung eingefügt wurden. Eine graphische Zusammenfassung aller Konstruktionsschritte zeigt Abbildung C.11.

C.5.1.3. Konjugativer Transfer von pMR4 und Analyse der erzeugten Mutanten

Das Plasmid pMR4 wurde aufgrund der höheren Transferrate durch Konjugation nach Vanstockem *et al.* (1988, modifiziert, siehe B.5.10.5) auf Polyethersulfon-Filtern in *A. brasilense* Sp7 und Sp245 übertragen. Zur Selektion der Azospirillen gegen *E. coli* wurde dem Mineralsalzmedium MMAB (Vanstockem *et al.*, 1987) Nalidixinsäure in einer Konzentration von 6µg/ml zugesetzt, da die Azospirillen eine schwache intrinsische Resistenz gegen dieses Antibiotikum aufwiesen. Das MMAB-Medium ohne Zusatz ließ noch ein geringes Wachstum von *E. coli* zu, in Kombination mit Nalidixinsäure wurden jedoch die Bildung von *E. coli* Kolonien vollständig unterdrückt. Die Selektion der merodiploiden *Azospirillum*-Mutanten (s. B.5.11.2) gegenüber den wildtypischen Zellen erfolgte durch Zugabe von Kanamycin zu den MMAB-Nalidixinsäure-Agarplatten. Von Stamm Sp7 und Sp245 wurden jeweils 4 der resultierenden kanamycinresistenten Kolonien auf NB-Medium mit Gentamycin überimpft. Dadurch konnte das Vorhandensein der Gm-Resistenzkassette überprüft werden, die auf Plasmid pMR4 kodiert war und bei merodiploiden Mutanten auf genomischer Ebene exprimiert werden müsste.

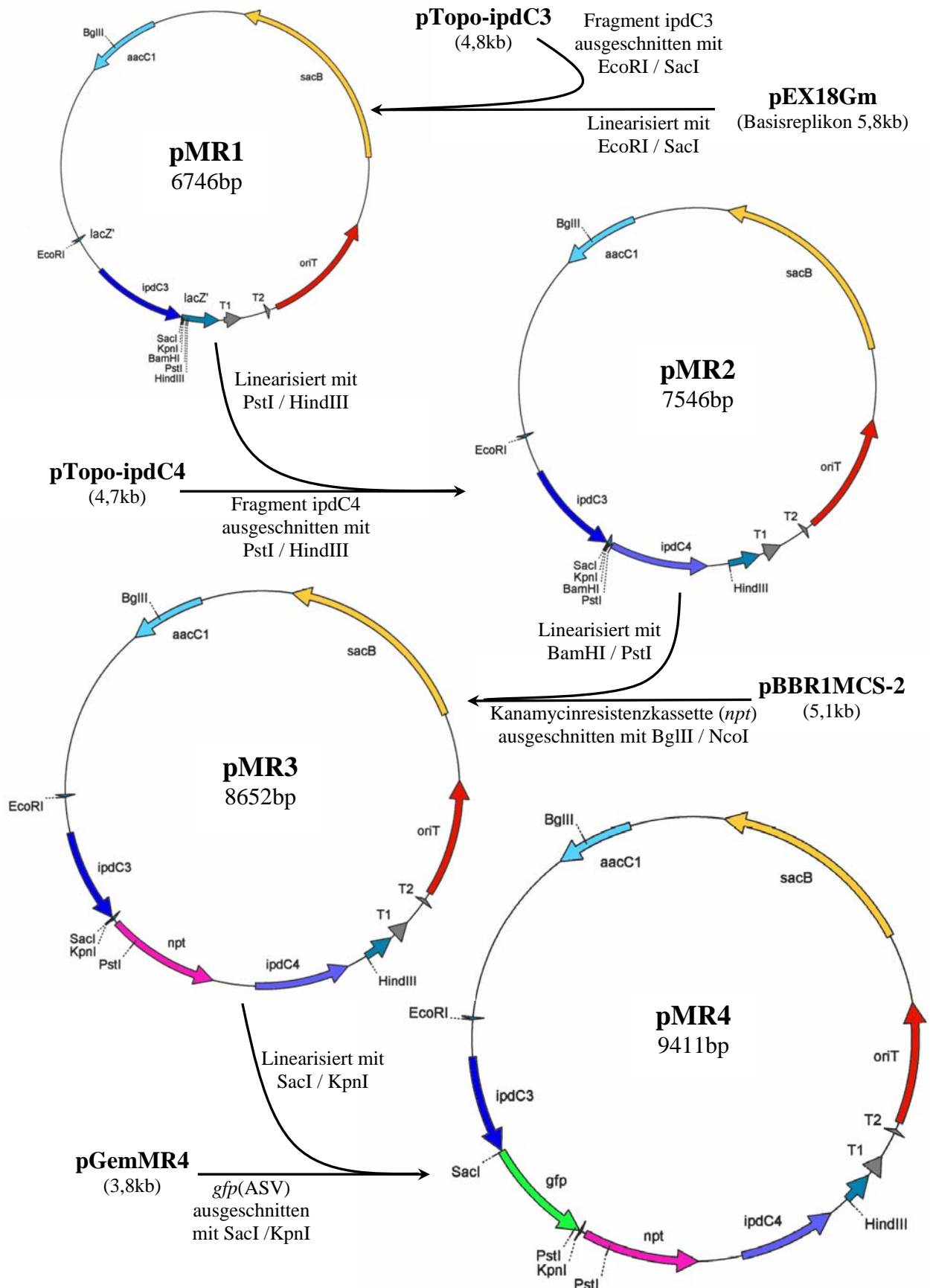


Abbildung C.11: Konstruktion von pMR4

(*oriT*) origin of transfer, (*sacB*) Lävansucrase, (*aacC1*) Gentamycin-Acetyltransferase, Gm^R (ipdC3) ipdC Fragment 3, (*gfp*) green fluorescent protein instabile Variante ASV, (*npt*) Neomycin-3'-Phosphotransferase, Km^R, (ipdC4) ipdC Fragment 4, (*lacZ'*) Teilabschnitt des inaktiven *lacZ*-Gens für die Bildung der β -Galactosidase, (T1,T2) Transkriptionsterminatoren

Erwartungsgemäß zeigten die untersuchten Mutanten eine Resistenz gegen Gentamycin. Außerdem sollte durch das Anwachsen auf NB-Medium durch die enthaltenen Aminosäuren eine maximale Induktion des *ipdC*-Promotors und damit eine stärkst mögliche Expression des *gfp*(ASV)-Gens erreicht werden (Dosselaere, 2000). Bei der anschließenden Überprüfung mittels Epifluoreszenzmikroskop konnte jedoch weder bei den Sp7- noch bei den Sp245-Mutanten eine GFP-Fluoreszenz festgestellt werden. Um zu ermitteln, ob das *gfp*-Gen auch wirklich im Genom nachweisbar war, wurde von beiden Stämmen jeweils ein merodiploider Klon ausgewählt und als Sp7 MR4Mero bzw. Sp245 MR4Mero bezeichnet. Von diesen wurde die genomische DNS isoliert (B.5.2.2) und als Template in einer PCR (B.5.7.3) mit den Primern *ipdC2*-EcoRI und *gfpAsv*-rev eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein PCR-

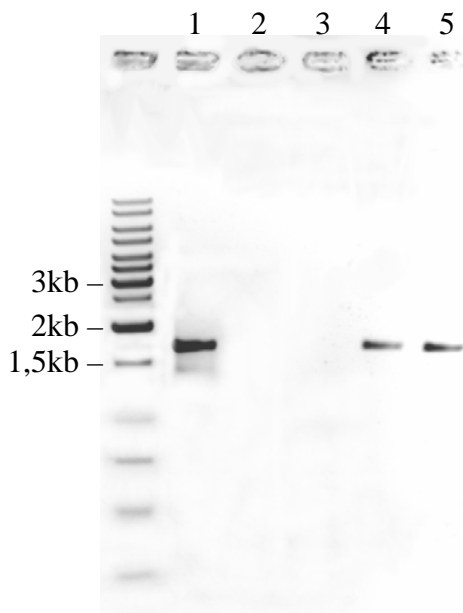


Abbildung C.12: Agarosegelefoto einer PCR mit den Primern *ipdC2*-EcoRI und *gfpAsv*-rev und verschiedener Template-DNS:

- Spur 1: pMR4 Plasmid-DNS
- Spur 2: Sp7 Wildtyp genomische DNS
- Spur 3: Sp245 Wildtyp genomische DNS
- Spur 4: Sp7 MR4Mero genomische DNS
- Spur 5: Sp245 MR4Mero genomische DNS

Ansatz mit genomischer DNS der beiden Wildtypen aufgetragen, als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit Plasmid-DNS von pMR4. Das Ergebnis zeigt Abbildung C.12. Bei der Positivkontrolle in Spur 1 mit pMR4 als Template ist eine Bande von etwa 1,7kb zu sehen, was exakt dem Plasmidabschnitt bestehend aus Fragment *ipdC3* (900bp) und dem Gen *gfp*(ASV) (750bp) entspricht, der durch die eingesetzte Primerkombination amplifiziert werden sollte. Wie die Spuren 2 und 3 zeigen, konnte dieses Fragment mit der Wildtyp-DNS von Stamm Sp7 und Sp245 als Template nicht amplifiziert werden, da die Bindungsstelle von Primer *gfpAsv*-rev fehlt. Beim Einsatz von genomischer DNS aus den beiden Mutanten Sp7 MR4Mero und Sp245 MR4Mero wurde dagegen ein Amplifikat erzielt (Spur 4 und 5), was eindeutig auf das Vorhandensein des *gfp*(ASV)-Gens im Genom der Zielorganismen hinweist.

Die merodiploiden Mutanten wurden schließlich auf NB-Platten mit Nalidixinsäure, Kanamycin, und 5% Saccharose überimpft, um eine Selektion von echten Knock-out-Mutanten zu ermöglichen. Da diese ihre Gentamycinresistenzkassette zusammen mit dem *sacB*-Gen durch eine zweite homologe Rekombination verlieren, wurden die Mutanten nach der Saccharose-Selektion auf ihre Fähigkeit zum Wachstum auf gentamycinhaltigen NB-Agarplatten getestet. Dabei wurde keine Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum

festgestellt, was darauf schließen lässt, dass die Expression von *sacB* (s. B.5.11.2) bei der Anwesenheit von Saccharose für Azospirillen nicht letal wirkt.

Da somit weder ein Knock-out von Gen *ipdC*, noch eine für die mikroskopische Detektion ausreichende *gfp*-Expression auf genomischer Ebene erzielt werden konnte, wurde im Folgenden eine Analyse des *ipdC*-Gens auf Plasmidebene angestrebt.

C.5.2. Konstruktion und Analyse einer translationalen Fusion der *ipdC*-Promotorregion mit *gfp* auf Plasmidebene

C.5.2.1. Amplifikation der *ipdC*-Promotorregion durch PCR und Sequenzanalyse

Nach bereits veröffentlichten Sequenzdaten von *A. brasilense* Sp7 (NCBI Accession Number X99587, Zimmer *et al.*, 1998) wurden zunächst die Primer *ipdC*-P-ApaI und *ipdC*-P-NcoI kreiert (genaue Daten siehe G.2), die eine Amplifikation der *ipdC*-Promotorregion ermöglichen sollten. Über entsprechende Modifikation der Primer konnte am 5'-Ende des Amplifikats die Restriktionsschnittstelle ApaI und am 3'-Ende NcoI angefügt werden. Als Template für die PCR (B.5.7) diente genomische DNS aus *A. brasilense* Sp7 bzw. Sp245. Dabei ließ sich bei Verwendung von Template-DNS aus Stamm Sp7 ein als *i7P* bezeichnetes Fragment von ca. 170bp amplifizieren, das der aufgrund der Sequenzdaten erwarteten Größe entsprach. Bei Verwendung von DNS aus Stamm Sp245 war es nicht möglich ein Amplifikat vergleichbarer Größe zu erhalten, sondern nur ein etwa 150bp größeres Fragment. Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich hierbei um ein Insertion handelte, wurde mit Hilfe des Primerpaares *ipdC*2-EcoRI und *ipdC*3-SacI der Abschnitt *ipdC*3 von Stamm Sp245, welcher auch die *ipdC*-Promotorregion umfasst (s. Abbildung C.13), amplifiziert und anschließend einer Sequenzanalyse (B.5.8) unterzogen. Bei einem Vergleich der Sequenzen stellte sich heraus, dass die Sp7 Promotorregion bis auf wenige Basen identisch mit einem etwa 140bp messenden Abschnitt unmittelbar strangaufwärts des *ipdC*-Startcodons war. Weiter strangaufwärts schloss sich jedoch bei Stamm Sp245 eine 150bp lange Insertion an, die bei Stamm Sp7 fehlte. Darauf folgte wiederum strangaufwärts eine weitgehend homologe Region von etwa 30bp bis zum Beginn des Promotors des in umgekehrter Leserichtung exprimierten *gltX* Gens. Ein Alignment der homologen Sequenzen der Promotorregion von Stamm Sp7 und Sp245 findet sich in Abbildung C.14.

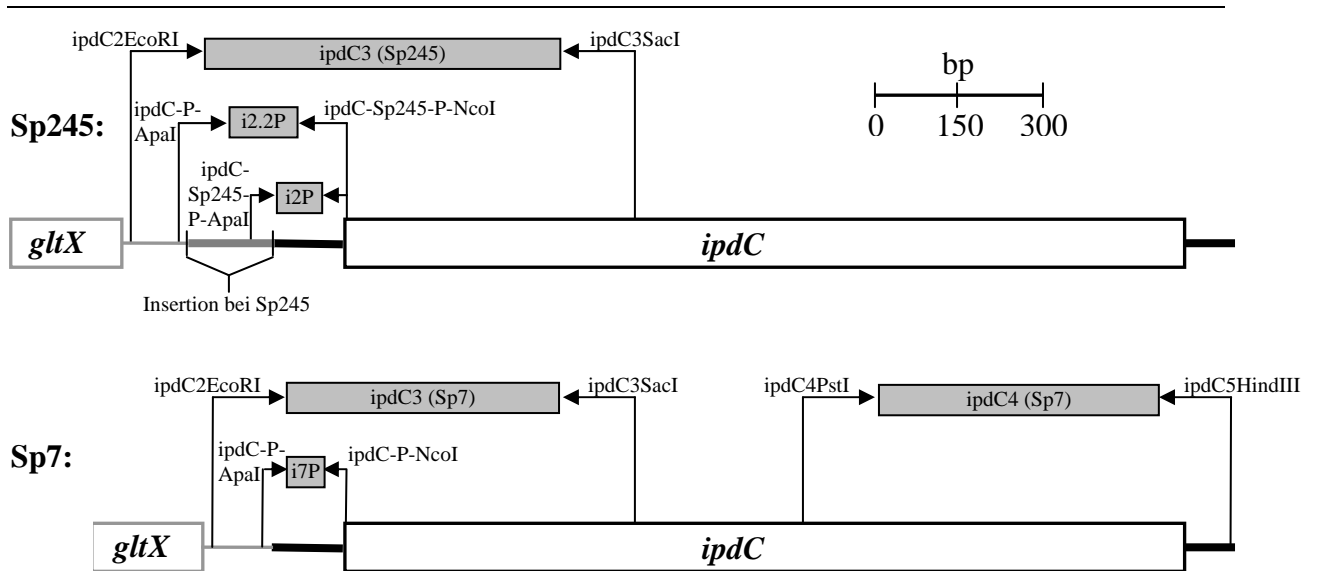


Abbildung C.13: Primerbindungsstellen und Amplifikate (grau unterlegt) in *ipdC*-Gen und Promotorregion der *A. brasilense* Stämme Sp245 (oben) und Sp7 (unten).

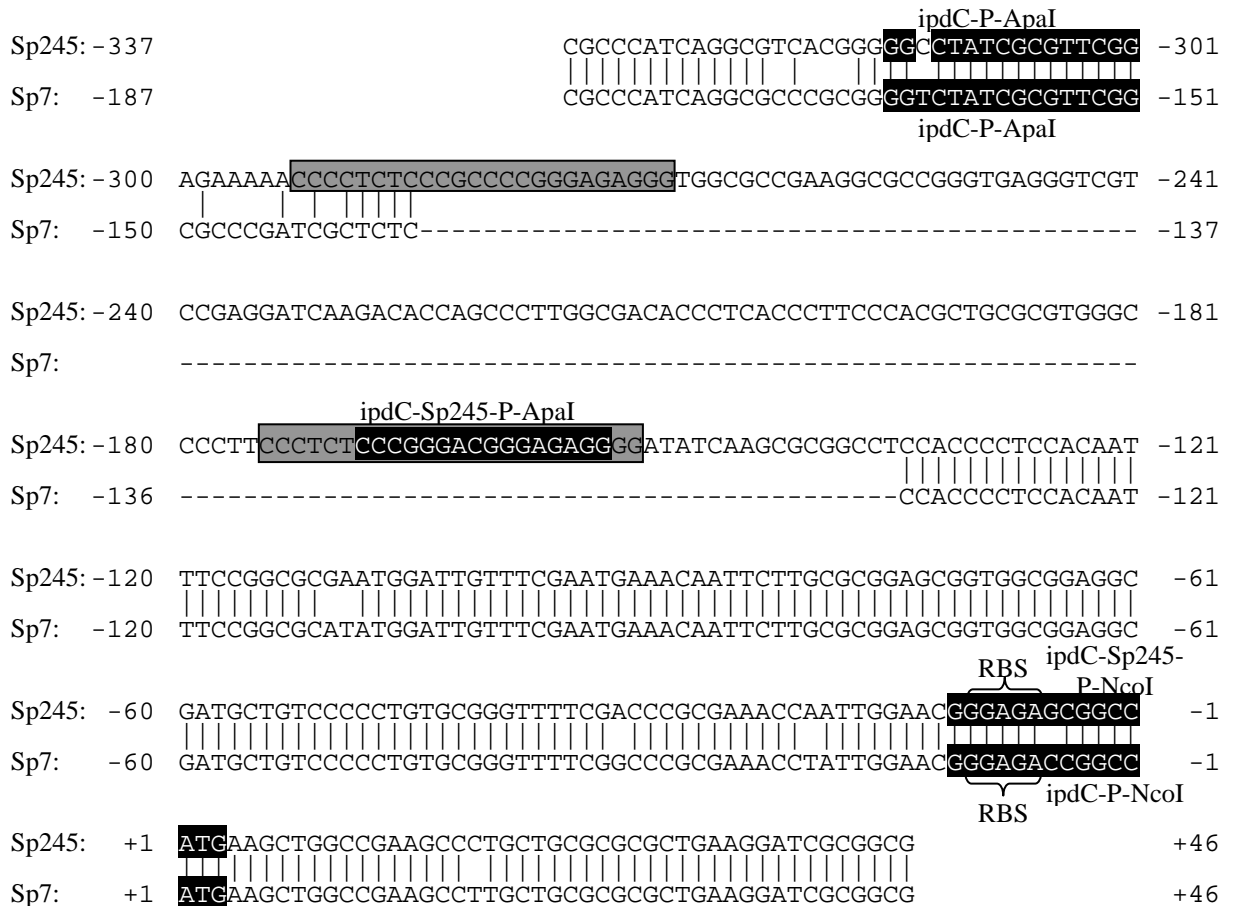


Abbildung C.14: Sequenzalignment der Promotorregionen des *ipdC*-Gens von Stamm Sp245 und Sp7. Primerbindungsstellen sind schwarz unterlegt. Zwischen Position -136 und -287 bezogen auf das Startcodon ist bei Stamm Sp245 eine 151bp messende Insertion zu finden, die bei Stamm Sp7 nicht auftritt. Grau markiert sind zwei zueinander komplementäre Sequenzen innerhalb dieser Insertion. Die Sequenzdaten von Sp245 stammen von der Sequenzierung des Fragments ipdC3, die gesamte Sequenz ist dem Anhang (G.3.1) zu entnehmen. Die Sequenzdaten von Stamm Sp7 sind aus der Publikation von Zimmer *et al.* (1998), NCBI Accession Number X99587.

Da sich die Frage stellte welche Bedeutung dieser Insertion bei der Expression des *ipdC*-Gens zukommt, wurden zwei unterschiedliche Sp245 Promotorfusionen hergestellt. Dafür war es zunächst erforderlich anhand der gewonnenen Sequenzdaten ein neues Primerpaar zu konstruieren, das als *ipdC*-Sp245-P-ApaI und *ipdC*-Sp245-P-NcoI bezeichnet wurde. Dabei wurde die Bindungsstelle von Primer *ipdC*-Sp245-P-ApaI so gewählt, dass nur die mit Stamm Sp7 weitgehend homologe Region des Promotors von Stamm Sp245 amplifiziert wurde, die Insertion jedoch fehlte. Das resultierende Fragment *i2P* maß ebenfalls etwa 170bp. Des Weiteren konnte mit Hilfe des Primerpaares *ipdC*-P-ApaI und *ipdC*-Sp245-P-NcoI eine etwa 320bp langes Amplifikat erzeugt werden, das die Bezeichnung *i2.2P* trug. Dieses enthielt die gesamte bei Stamm Sp245 auftretende Insertion.

C.5.2.2. Konstruktion von translationalen *ipdC*-Promotorfusionen

Das Fragmente *i7P* wurde über TA-Klonierung (B.5.7.6) in einen *pCR2.1-TOPO* Vektor überführt. Aus diesem wurde das Fragment mit den Restriktionsendonukleasen ApaI und NcoI ausgeschnitten (B.5.5.1) und in den Vektor pGemMR4, der mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffnet worden war, ligiert. Das Konstrukt pGemMR4 wurde aufgrund der günstigen Lage der Restriktionsschnittstellen gewählt. Es entstand Plasmid pGem-*i7P*. Die Sp7 Promotorregion sollte nun mit einer instabilen Variante des *gfp*-Gens, *gfp*(ASV), fusioniert werden. Hierzu wurde das *gfp*(ASV)-Gen mit den Enzymen KpnI und PagI aus pGemMR4 ausgeschnitten, während Plasmid pGem-*i7P* mit NcoI und KpnI geöffnet wurde. Die Schnittstellen NcoI und PagI wurden gewählt, da bei einem Restriktionsverdau mit diesen beiden Enzymen kompatible überhängende Enden entstehen. Dadurch war eine Ligation des 3'-Endes von Fragment *i7P* mit dem 5'-Ende von *gfp*(ASV) möglich, wobei das Startcodon des *gfp*-Gens an die Stelle des *ipdC*-Startcodons tritt. Dies wird auch eine translationale Fusion genannt. Diese Fusion, bezeichnet als *i7Pg*(ASV), wurde über ApaI und KpnI in den Vektor pBBR1MCS-2 kloniert, woraus Plasmid pBBR-*i7Pg*(ASV) resultierte.

In dem pBBR-Vektor war es möglich das Konstrukt via konjugativem Transfer (B.5.10.4) in *A. brasilense* Sp7 zu übertragen. Die Selektion der Transkonjuganden erfolgte auf kanamycinhaltigen MMAB-Nalidixinsäure-Platten. Anschließend wurde eine Einzelkolonie der Transkonjuganden, die als Sp7 *iPg*(ASV) bezeichnet wurde, auf NB-Medium überimpft, um die Expression des *gfp*(ASV) Gens zu induzieren (s. C.5.1.3). Es zeigte sich jedoch bei einer mikroskopischen Untersuchung der Stämme, dass bei keiner der Transkonjuganden eine ausreichende Signalstärke der GFP-Fluoreszenz für die mikroskopische Visualisierung

erreicht wurde. Da dies möglicherweise an der verwendeten instabilen Variante des *gfp*-Gens lag, wurde die Konstruktion noch einmal mit der stabileren Variante *gfpmut3* wiederholt.

Dazu wurde über PCR mit den Primern *gfpAsv-vor* und *gfpMut3-rev* das Gen *gfpmut3* aus pBAH7 amplifiziert und über TA-Klonierung in einen *pCR2.1-TOPO* Vektor übertragen. Ausgehend von dem Konstrukt pGem-i7P wurde analog zum oben beschriebenen Konstruktionsweg eine translationale Fusion des *ipdC*-Promotors mit *gfpmut3* hergestellt. Das entstandene Plasmid wurde pGem-i7Pg(mut3) benannt. Um polare Effekte auf die Promotorfusion bei der Transkription auf dem pBBR-Vektor auszuschließen, wurde an das 5'-Ende der *ipdC*-Promotorregion noch ein Transkriptionsterminator ligiert. Dieser sollte verhindern, dass bei der Transkription der auf dem Plasmid pBBR1MCS-2 kodierten Gene die strangabwärts gelegene *ipdC*-Promotorfusion mittranskribiert wurde und somit keine Abhängigkeit der *gfp*-Expression vom *ipdC*-Promotor auftrat. Zunächst wurden deshalb die Transkriptionsterminatoren T1-T2 aus pEX18Gm mittels PCR über die Primer T1T2-ApaI und T1T2-SacI amplifiziert und in einen *pCR2.1-TOPO* Vektor überführt. Von dort wurde das Fragment über die Schnittstellen ApaI in pGem-i7Pg(mut3) kloniert und die korrekte Orientierung über Restriktionsanalysen überprüft. Es entstand pGem-i7Pg(mut3)T. Über die SacI Schnittstelle wurde das Konstrukt i7Pg(mut3)T in pBBR1MCS-2 kloniert, wobei auf eine Orientierung entgegengesetzt zur Leserichtung der Kanamycinresistenzkassette geachtet wurde. Auch dies sollte polare Effekte verhindern. Das Konstrukt trug die Bezeichnung pBBR-i7Pg(mut3)T-rev.

Ebenso wurde mit der Promotorregion i2P von Stamm Sp245 verfahren, jedoch wurde hier aufgrund der Ergebnisse mit i7Pg(ASV) auf die Herstellung einer Fusion mit *gfp*(ASV) verzichtet und nur die stabile Variante *gfpmut3* eingesetzt. Entsprechend wurde das Endkonstrukt pBBR-i2Pg(mut3)T-rev benannt.

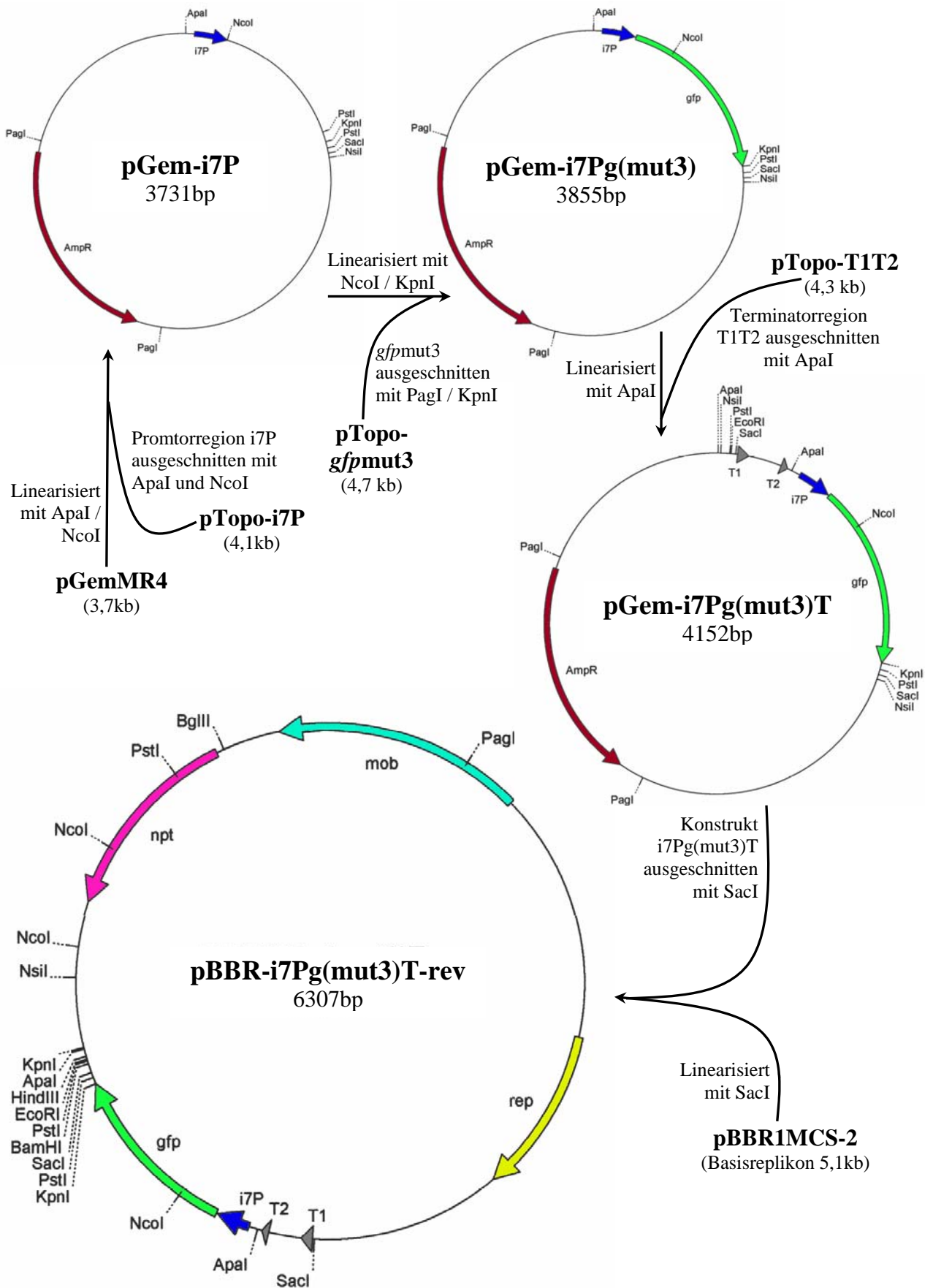


Abbildung C.15: Konstruktion einer translationalen Promotorfusion mit dem Gen *gfpmut3* am Beispiel von *i7P*. Klonierung von Fragment *i2P* erfolgte analog. (Ap^R) Ampicillin-Resistenzkassette, (*i7P*) Promotorregion von Stamm Sp7, (*gfp*) green fluorescent protein stabile Variante *mut3*, (T1T2) Transkriptionsterminatoren, (*rep*) Replikationsursprung, (*mob*) Gen zur Plasmid-Mobilisierung, (*npt*) Neomycin-3'-Phosphotransferase, Km^R

Bei der Herstellung der Fusion von Fragment i2.2P mit *gfpmut3* konnte die *ApaI* Schnittstelle nicht verwendet werden, da das Amplifikat selbst die Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym beinhaltet. Deshalb wurde i2.2P nach der TA-Klonierung in den *pCR2.1-TOPO* Vektor mit *EcoRI* und *NcoI* ausgeschnitten und anschließend in das Konstrukt pGem-i7Pg(mut3)T ligiert. Dabei wurden das bereits enthaltene Fragment i7P, sowie der Transkriptionsterminator und ein Teil des *gfp*-Gens aus dem Konstrukt entfernt und durch i2.2P ersetzt. pGem-i7Pg(mut3)T wurde gewählt, da die Lage der Restriktionsschnittstellen eine problemlose Klonierung aller

Fragmente ermöglichte. Das *gfpmut3*-Gen wurde analog zu Fragment i2P kloniert, was pGem-i2.2Pg(mut3) ergab. Der Transkriptionsterminator wurde über eine *EcoRI* Schnittstelle eingefügt, da *ApaI* wie bereits erwähnt nicht verwendbar war. Aus dem resultierenden Plasmid pGem-i2.2Pg(mut3)T wurde schließlich das Konstrukt i2.2Pg(mut3)T über eine *SacI* Schnittstelle in pBBR1MCS-2 umkloniert, was Konstrukt pBBR-i2.2Pg(mut3)T-rev ergab. Auch in diesem Fall wurde auf eine Orientierung wie bei pBBR-i7Pg(mut3)T-rev geachtet.

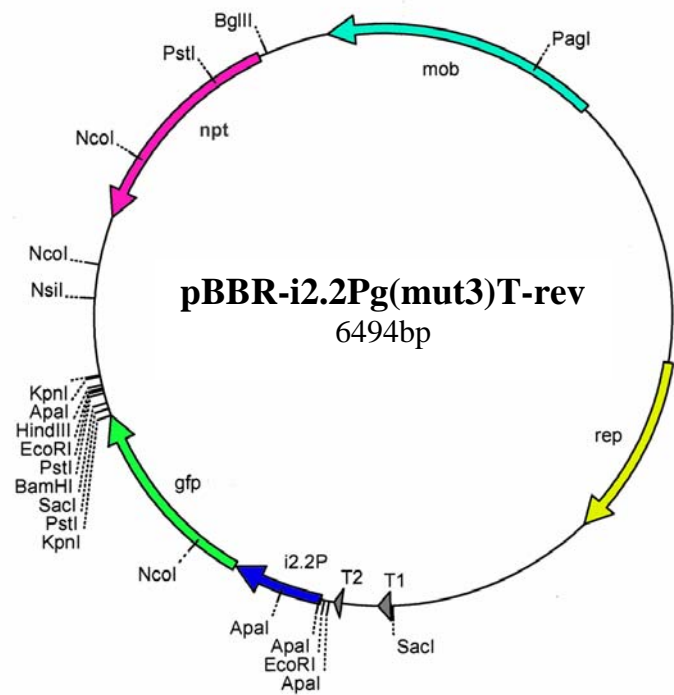


Abbildung C.16: Vektor pBBR1MCS-2 mit dem Insert i2.2Pg(mut3)T in reverser Orientierung zur Leserichtung der Kanamycinresistenzkassette (*npt*). Abkürzungen siehe Abbildung C.15.

Zur Überprüfung der korrekten Abfolge und Sequenz aller Fragmente wurden die jeweiligen Inserts der Endkonstrukte sequenziert (siehe G.3) und mit den über das Programm *Clone Manager* (B.5.11.1) ermittelten Sequenzdaten verglichen. Alle Konstrukte wiesen die erwartete Sequenz auf.

C.5.2.3. Expressionsanalyse der erzeugten *ipdC*-Promotorfusionen

Die drei Konstrukte wurden durch Konjugation (B.5.10.4) in *A. brasilense* Sp7 bzw. Sp245 übertragen. Selektiert wurde wiederum durch kanamycinhaltige MMAB-Nalidixinsäure-Agarplatten. Transkonjuganden wurden jeweils als Sp7 i7Pg(mut3)T-rev, Sp245 i2Pg(mut3)T-rev bzw. Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev bezeichnet. Zur Kontrolle wurde eine FISH

(B.5.1) mit speziesspezifischen Oligonukleotidsonden durchgeführt, wobei alle Stämme als *A. brasilense* identifiziert werden konnten. Die Stämme wurden wie unter B.5.12 beschrieben auf NB- und MMAB-Agarplatten ausgestrichen. Außerdem wurde zusätzlich MMAB-Platten verwendet, denen entweder 0,5mM Phenylalanin, Tyrosin oder beide Aminosäuren zugesetzt worden waren. Nach dem Anwachsen wurde Sp7 i7Pg(mut3)T-rev und Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev noch einen Tag bei 4°C gelagert, danach resuspendiert, auf eine einheitliche Zelldichte eingestellt und am CLSM vermessen (s. B.5.12). Stamm Sp245 i2Pg(mut3)T-rev wurde vor der Vermessung für 2 Wochen bei 4°C gelagert, da erst nach dieser Zeit eine erfassbare Fluoreszenzintensität erreicht war. Um einflussnehmenden Faktoren der Aminosäurezugabe abschätzen zu können, die nicht auf Induktion oder Repression des *ipdC*-Promotors zurückzuführen waren, wurden die Transkonjuganden Sp7 pBAH7 und Sp245 pBAH7 ebenfalls auf den jeweiligen Medien angezogen und anschließend die Fluoreszenzintensität vermessen. Die Signifikanz wurde durch U-Tests (B.3.4.5) überprüft.

Dabei ergab sich für das Konstrukt Sp7 i7Pg(mut3)T-rev die stärkste Induktion der Promotoraktivität beim Anwachsen auf MMAB-Medium mit Phenylalanin und auf NB-Medium. Ebenfalls eine signifikante induzierende Wirkung war durch Tyrosin bzw. einer Kombination von Phenylalanin und Tyrosin festzustellen. Eine auf reinem MMAB-Medium angewachsene Kultur des Stammes Sp7 i7Pg(mut3)T-rev zeigte im Vergleich zum Wachstum auf phenylalaninhaltigen MMAB-Agarplatten eine etwa dreimal schwächere Fluoreszenzintensität. Allerdings war auch bei der Transkonjugande Sp7 pBAH7 (mit konstitutiv exprimiertem *gfp*mut3) die geringste Fluoreszenzintensität bei Kulturen festzustellen, die auf reinem MMAB-Medium angezogen worden waren. Besonders beim Wachstum auf NB-Medium war eine deutlich verstärkte Fluoreszenz der Kulturen zu erkennen. Da aber zumindest bei Phenylalanin der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Kulturen von MMAB-Medium mit und ohne Aminosäure nicht so deutlich war wie bei Stamm Sp7 i7Pg(mut3)T-rev, kann in diesem Fall dennoch von einer induzierenden Wirkung ausgegangen werden. Die genauen Daten lassen sich Abbildung C.17 entnehmen.

Weit deutlicher war die induzierende Wirkung der Aminosäuren bei Stamm Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev. Hier betrug die relative Fluoreszenz auf reinem MMAB-Medium nur 7% der stärksten Fluoreszenzintensität auf MMAB-Medium mit Tyrosin. Insgesamt lagen die gemessenen Fluoreszenzintensität bei Stamm Sp7 i7Pg(mut3)T-rev rund 30% höher als bei Stamm Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev.

Das Konstrukt i2Pg(mut3)T-rev schließlich zeigte die geringste Fluoreszenzintensität. Zwar ließ sich ein geringfügiger induzierender Effekt durch die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin feststellen, jedoch lag die Fluoreszenzintensität bei Stamm Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev zwei- bis viermal höher. Allein die Fluoreszenz von auf reinem MMAB-Medium angewachsenen Kulturen war bei Stamm i2Pg(mut3)T-rev stärker ausgeprägt. Somit wurde gezeigt, dass die gesamte Promotorregion von Stamm Sp245, wie sie in Konstrukt i2.2Pg(mut3)T-rev vorhanden ist, inklusive der bei Stamm Sp7 fehlenden Insertion für eine maximale Promotoraktivität bei *A. brasilense* Sp245 notwendig ist. Bei der Transkonjugande Sp245 pBAH7 war keine signifikante Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Anwachsen auf einem bestimmten Medium zu beobachten. Für die zusammenfassende graphische Darstellung dieser Ergebnisse siehe Abbildung C.18.

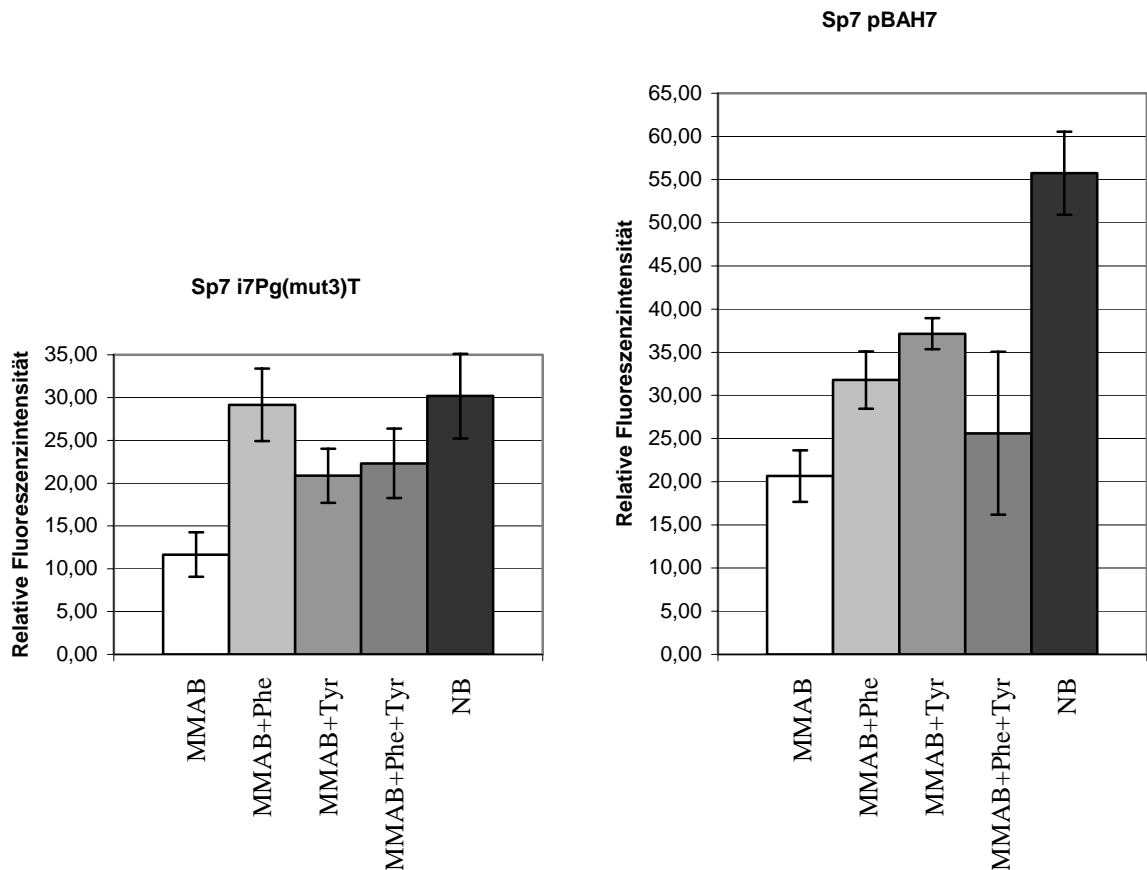


Abbildung C.17: Graphische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität der Sp7 Promotorfusion und der Transkonjugande Sp7 pBAH7 (mit konstitutiv exprimiertem *gfp*mut3) nach der Kultivierung auf verschiedenen Medien. Mit dem CLSM wurde 6 Mal von jeweils etwa 4000 Zellen eine Aufnahme gemacht und über ein Histogramm die Fluoreszenzintensität pro Bild bestimmt. Aus den so gewonnenen Zahlenwerten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die zweifache Standardabweichung (angegeben durch Fehlerbalken) berechnet.

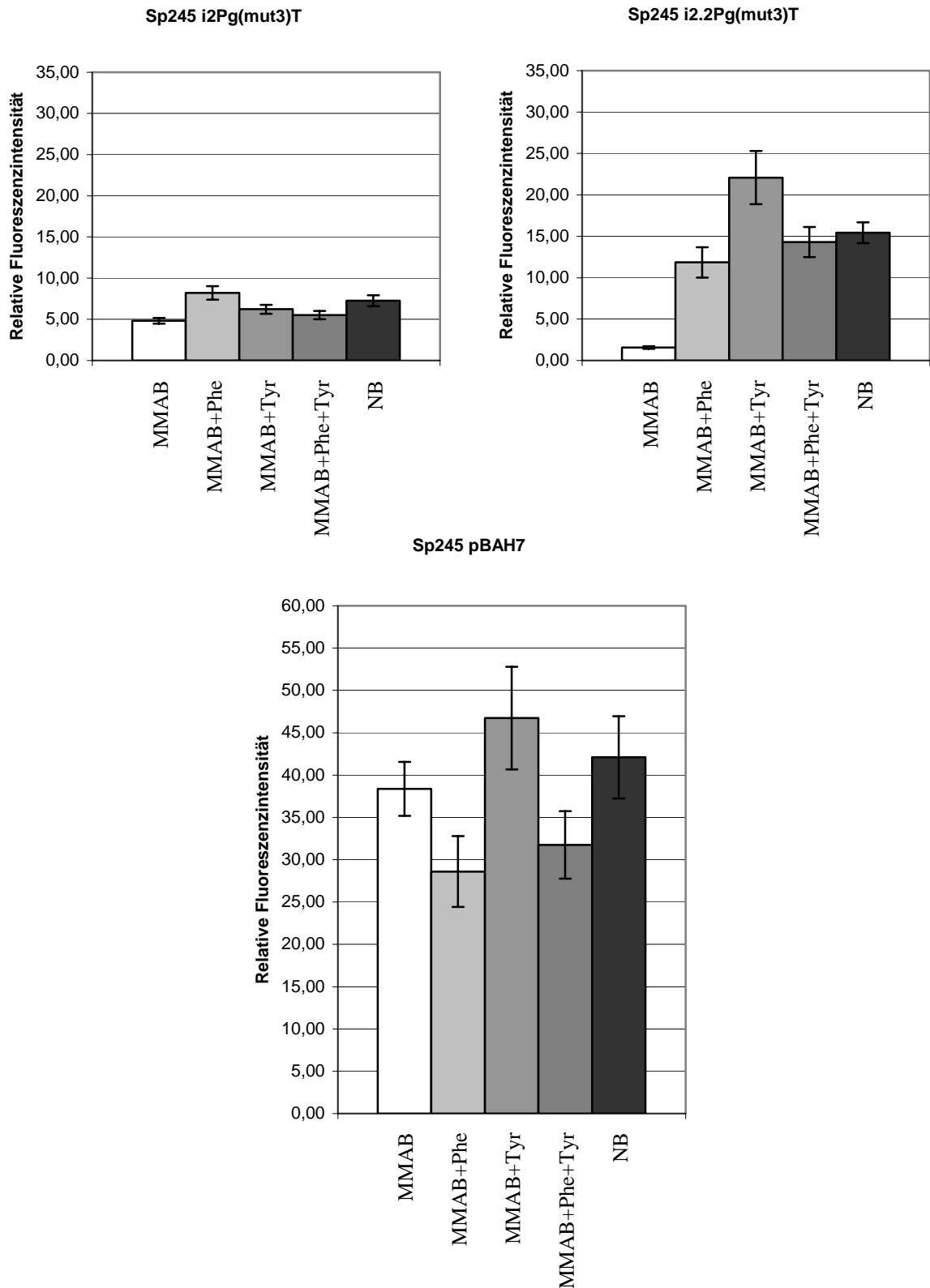


Abbildung C.18: Graphische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität der beiden Sp245 Promotorfusionen und der Transkonjugante Sp245 pBAH7 (mit konstitutiv exprimiertem *gfpmut3*) nach der Kultivierung auf verschiedenen Medien. Mit dem CLSM wurde 6 Mal von jeweils etwa 4000 Zellen eine Aufnahme gemacht und über ein Histogramm die Fluoreszenzintensität pro Bild bestimmt. Aus den so gewonnenen Zahlenwerten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die zweifache Standardabweichung (angegeben durch Fehlerbalken) berechnet.

C.5.2.4. Expression der *ipdC*-Promotorfusionen an der Wurzel

Die verschiedenen Transkonjuganden wurden ebenfalls als Reporterkonstrukte auf Wurzeln der Sorte PF839197 eingesetzt. Bei Sp7 *i7Pg(mut3)T-rev* ergab sich im Vergleich zu Sp7 *pBAH7* keinerlei Unterschied in Verteilung und Fluoreszenzstärke der *A. brasilense* Zellen (siehe Abbildung C.19, Bild A). Die GFP-Fluoreszenz von Stamm Sp245 *i2Pg(mut3)T-rev* war auf Wurzeln für einen Nachweis nicht intensiv genug, eine Besiedlung konnte jedoch über FISH mit der Sonde *Abras1420* bestätigt werden (siehe Abbildung C.19, Bild B). Stamm Sp245 *i2.2Pg(mut3)T-rev* ließ sich sehr schwach und vereinzelt über die gesamte Wurzel verteilt detektieren (siehe Abbildung C.19, Bild C). Allerdings konnte bei keinem der erzeugten Konstrukte eine eindeutig verstärkte Expression an bestimmten Wurzelteilen nachgewiesen werden.

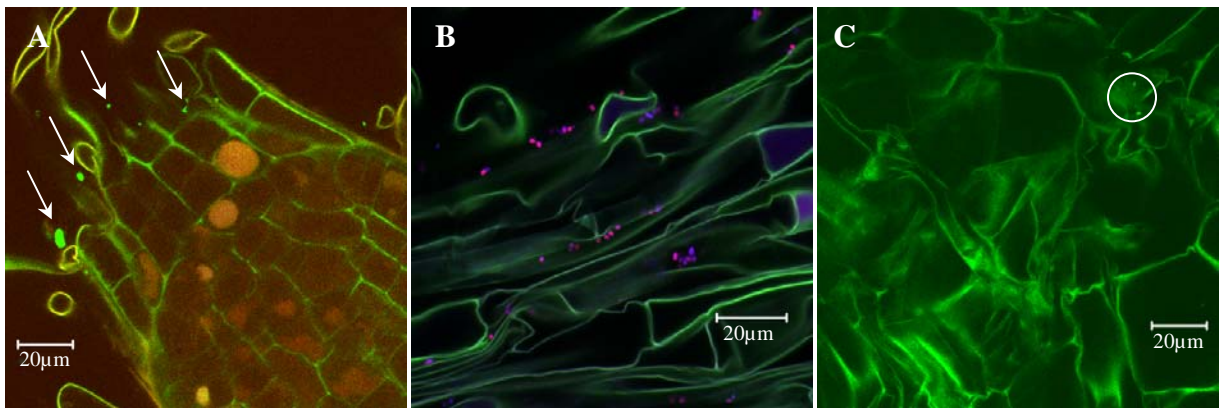


Abbildung C.19: Beispiele für die Besiedlung der brasilianischen Weizensorte im monoxenischen System durch die verschiedenen *A. brasilense* Transkonjuganden:

- (A) Zahlreiche stark fluoreszierende Zellen von Transkonjugande Sp7 *i7Pg(mut3)T-rev* an einer Wurzelspitze.
- (B) Nachweis von Transkonjugande Sp245 *i2Pg(mut3)T-rev* (magenta) auf Wurzeln durch FISH mit den Sonden *Abras1420* (Cy5) und *EUB338-Mix* (Cy3). Die GFP-Fluoreszenz war bei diesen Zellen so schwach ausgeprägt, dass sie vor dem autofluoreszenten Hintergrund der Wurzel nicht zu sehen waren.
- (C) Beispielhafte Aufnahme des vereinzelt Auftretens von schwach fluoreszierenden Zellen der Transkonjugande Sp245 *i2.2Pg(mut3)T-rev* (weißer Kreis).

C.6. Identifizierung und Lokalisierung von *Herbaspirillum* sp. N3 in Weizenwurzeln

In einer parallel zur vorliegenden Dissertation angefertigten Diplomarbeit von Klein (2003) konnten 3 Stämme (N3, N5, N9) von oberflächensterilisierten Weizenwurzeln isoliert werden, bei denen sich nach phylogenetischer Analyse der 16S rDNS mit dem ARB Software-Paket eine hohe Sequenzhomologie zu *Herbaspirillum lusitanum* ergab. Da die isolierten Stämme bei Reinokulationsversuchen als Endophyten innerhalb von Weizenwurzeln der Sorte Naxos detektiert werden konnten, sollte das Besiedlungsverhalten dieser Isolate genauer untersucht werden. Hierzu sollte die Methoden Anwendung finden, die bereits bei der Untersuchung von *Azospirillum brasilense* erfolgreich zum Einsatz gekommen waren. Einerseits sollte ein speziesspezifische Oligonukleotidsonde zum Nachweis der Isolate mittels FISH konstruiert werden, andererseits eine *gfp*-Markierungen der Stämme zur mikroskopischen Detektion mittels CLSM erfolgen. Da die phylogenetische Analyse der drei Isolate bisher nur anhand von etwa 1300bp der 16S rDNS durchgeführt worden war, wurde zunächst die gesamte 16S rDNS der Stämme sequenziert und analysiert. Außerdem sollte durch DNS-DNS-Hybridisierung die Zugehörigkeit der Isolate zur Spezies *H. lusitanum* überprüft werden.

C.6.1. Phylogenetische Zuordnung der Isolate N3, N5 und N9

C.6.1.1. Sequenzierung der 16S rDNS und Vergleich mit *Herbaspirillum lusitanum*

Mit Hilfe der Primer 616-V und 630-R wurde die 16S rDNS von allen drei Stämmen (N3, N5, N9) mittels PCR (B.5.7) amplifiziert und anschließend 1478bp zwischen *E. coli* Position 37 und 1523 sequenziert (B.5.8.1). Dabei ergab sich, dass die Sequenzen der drei Stämme N3, N5 und N9 vollkommen identisch waren. Da in der Arbeit von Klein (2003) Reinokulierungsexperimente bei Weizen mit Isolat N3 durchgeführt wurden, beschränkten sich im Folgenden die Untersuchungen auf diesen Stamm. Nach dem Alignment der Sequenzdaten und der Berechnung einer Distanzmatrix unter Verwendung des ARB Programms (Strunk and Ludwig, 1997) ergab sich mit 99,9% die höchste Sequenzhomologie zu *Herbaspirillum lusitanum*. Bei einer vergleichenden Kontrolle stellte sich heraus, dass der einzige Unterschied der beiden Sequenzen in einer einzelnen Base bestand, die bei der Sequenzierung von *H. lusitanum* nicht eindeutig festgelegt werden konnte. Daher trug die in der NCBI-Datenbank abgelegte Sequenz an dieser Stelle ein N, was bei einem Vergleich mit den Isolaten N3, N5, N9 durch die ARB-Software als Unterschied gewertet wurde.

	<i>Escherichia coli</i> , AB035923	<i>Azospirillum brasilense</i> , Z29617	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> , AF137508	<i>Herbaspirillum frisingense</i> , AJ238359	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> , Y10146	<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> , AB094401	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> , AF543312	<i>Herbaspirillum</i> sp. N3,N5, N9
<i>Escherichia coli</i> , AB035923	100 %							
<i>Azospirillum brasilense</i> , Z29617	80,1 %	100 %						
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> , AF137508	82,2 %	80,8 %	100%					
<i>Herbaspirillum frisingense</i> , AJ238359	83,6 %	80,6 %	98,9 %	100%				
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> , Y10146	82,3 %	80,7 %	99,2 %	98,9 %	100%			
<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i> , AB094401	82,7 %	80,6 %	98,8 %	98,9 %	98,5 %	100 %		
<i>Herbaspirillum lusitanum</i> , AF543312	83,0 %	80,4 %	97,0 %	97,4 %	97,4 %	97,6 %	100 %	
<i>Herbaspirillum</i> sp. N3,N5, N9	82,6 %	80,3 %	97,0 %	97,3 %	97,6 %	97,6 %	99,9 %	100 %

Tabelle C.2: Distanzmatrix der 16S rDNS-Sequenzen verschiedener Bakterienstämme im Vergleich zu den Isolaten N3, N5 und N9. Hinter den Stämmen ist die „Accession Number“ der Sequenzdaten in der NCBI-Genbank angegeben.

C.6.1.2. Genotypischer Vergleich von Isolat N3 und *Herbaspirillum lusitanum* über DNS-DNS-Hybridisierung

Bei der unter B.5.9 beschriebenen Methode der DNS-DNS-Hybridisierung ergab sich für *H. lusitanum* Typstamm und *Herbaspirillum* sp. Isolat N3 eine DNS-DNS-Übereinstimmung von 25%. Daher kann trotz der weitgehend identischen 16S rDNS nicht davon ausgegangen werden, dass die beiden Stämme zur selben Art gehören. Die Zugehörigkeit zur Gattung *Herbaspirillum* kann jedoch aufgrund der Ergebnisse der 16S rDNS und der DNS-DNS-Hybridisierung als erwiesen angesehen werden. Im Weiteren wird Isolat N3 als *Herbaspirillum* sp. N3 bezeichnet.

C.6.2. FISH-Nachweis von *Herbaspirillum* sp. N3 in Weizenwurzeln

C.6.2.1. Konstruktion einer spezifischen Oligonukleotidsonde

Für eine spezifische Detektion von *Herbaspirillum* sp. N3 auf und innerhalb von Wurzeln wurde anhand der Sequenzdaten und mit Hilfe der Funktion *Probe Design* und *Probe Match* des ARB Softwarepakets (Strunk and Ludwig, 1997) eine 16S rRNS gerichtete Gensonde konstruiert. Mit dieser als HerbN3 (siehe auch B.5.1.2) bezeichneten Sonde wurden mehrere Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit Formamidkonzentrationen von 20% bis 70% in 5% Schritten durchgeführt (B.5.1.5), wobei *Herbaspirillum frisingense* und *H. seropedicae* als Negativkontrollen dienten. Hierbei war es möglich, ab einer Formamidkonzentration von 25% eine ausschließliche Fluoreszenzmarkierung der Spezies *H. lusitanum* und *Herbaspirillum* sp. N3 zu erreichen, ohne dass ein sichtbares Signal bei den anderen *Herbaspirillum* Arten detektierbar war. Da der Einsatz der Sonde auch bei höheren Stringenzen im Hybridisierungspuffer noch in einer vergleichbar starken Fluoreszenzmarkierung der Zielzellen resultierte, wurde die Sonde HerbN3 bei allen folgenden Anwendungen bei einer Formamidkonzentration von 35% eingesetzt, um eine spezifische Detektion sicherzustellen.

Sondensequenz:	5' -ACCAAGACCGTTTCTTCC-3'
Sondenbindungsstelle:	5' -GGAAGAAACGGTCTTGGT-3'
<i>Herbaspirillum</i> sp. N3	-----
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	-----
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-----u====C-
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	-----uC===A-
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	-----GG=A=C-
and. <i>Herbaspirillum chlorophenicum</i>	-----TGCA=C-

Abbildung C.20: Vergleich der Sequenzen aller *Herbaspirillum* Spezies im Bereich der Bindungsstelle der Sonde HerbN3. Der Sequenzvergleich wurde mit allen im Datensatz des ARB-Programms (Stand 2003) vorhandenen Arten durchgeführt. Dabei waren *H. lusitanum* und *Herbaspirillum* sp. N3 die einzigen Spezies, bei der keine Fehlpaarungen mit der Sonde auftraten. Von allen Nicht-Ziel-Organismen war *H. seropedicae* mit 2 Basenfehlpaarungen die Art mit der höchsten Sequenzhomologie zur untersuchten *Herbaspirillum* sp. N3 16S rDNS Region.

Die von Kirchhof *et al.* (2001) entwickelten gattungsspezifischen Sonden HERB 68 und HERB 1432 weisen sowohl bei *H. lusitanum* als auch bei *Herbaspirillum* sp. N3 zwei zentrale Basenfehlpaarungen auf und konnten deshalb für eine Detektion der beiden Stämme nicht verwendet werden.

C.6.2.2. Einsatz der Sonde zur Detektion von *Herbaspirillum* sp. N3 in Wurzelschnitten

Sterilisierte Weizenkeimlinge (B.2.2.2) der Sorte Naxos wurden mit *Herbaspirillum* sp. N3 inokuliert und für 3 Wochen im monoxenischen System (B.2.2.1) angezogen. Danach wurden die Wurzeln geerntet und nach Punkt B.3.5.1 Schnitte angefertigt. Diese wurden PFA-fixiert, über FISH (B.5.1.5) mit den Sonden HerbN3 (Cy3 markiert) und Eub338-mix (Cy5 markiert) fluoreszenzmarkiert und schließlich mittels CLSM (B.4.2) detektiert.

Herbaspirillum sp. N3 konnte wiederholt auf der Oberfläche und im Inneren von Weizenwurzeln identifiziert werden. Dabei war besonders eine interzelluläre Lokalisierung der Zellen festzustellen, wie dies bereits in der Arbeit von Klein (2003) gefunden worden war. Diesmal konnte die Detektion jedoch mit einer spezifischen Sonde erfolgen.

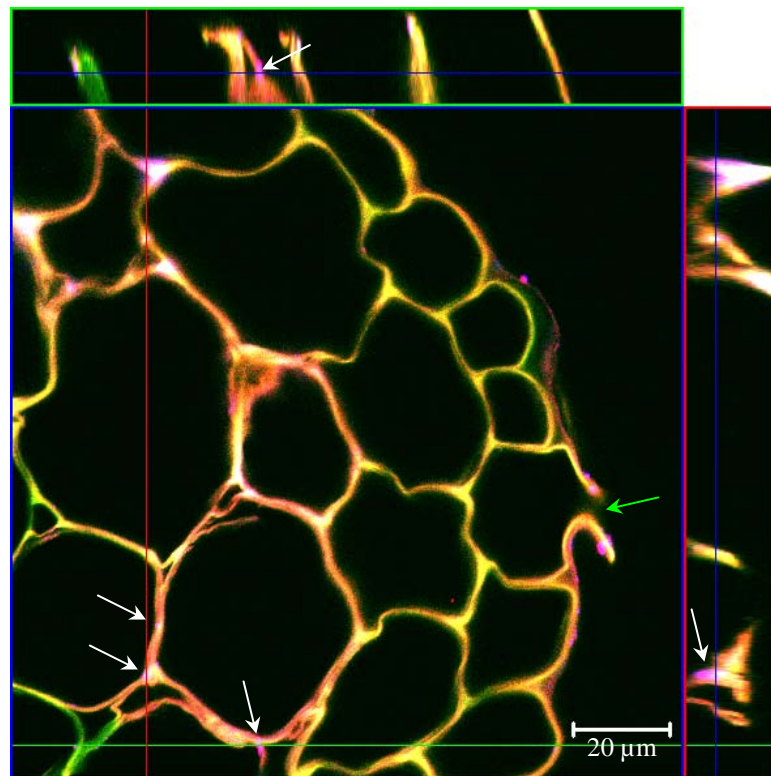


Abbildung C.21: Orthogonale Ansicht (siehe Abbildung C.9) eines Schnitts durch die Wurzelhaarzone einer 3 Wochen alten Naxos Weizenpflanze aus dem monoxenischen System, inokuliert mit *Herbaspirillum* sp. N3. Die Detektion erfolgte mit Sonde HerbN3 (Cy3 markiert) und Eub338-mix (Cy5 markiert). Ein positives Hybridisierungssignal beider Sonden ist in magenta dargestellt. Die weißen Pfeile markieren detektierte *Herbaspirillum* sp. N3 Zellen innerhalb der Wurzel in Haupt- und Seitenfenstern. Die Zellen sind dort interzellulär lokalisiert. Der grüne Pfeil markiert die Austrittsstelle eines Wurzelhaares aus einer Rhizodermiszelle. An der Wurzeloberfläche sind zahlreiche positive Fluoreszenzsignale zu erkennen.

C.6.3. Detektion von GFP-markierten *Herbaspirillum* sp. N3 Zellen

C.6.3.1. Erzeugen von konstitutiv *gfp* exprimierenden Transkonjuganden

Nach dem erfolgreichen Einsatz von Plasmid pBAH7 zur GFP-Markierung von *A. brasilense*, sollte dasselbe Konstrukt ebenfalls zur Erzeugung einer *Herbaspirillum* sp. N3 Transkonjugande verwendet werden, bei der *gfp* auf Plasmidebene konstitutiv exprimiert wird. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass auch bei *Herbaspirillum* sp. N3 eine schwache intrinsische Resistenz gegen das Antibiotikum Nalidixinsäure vorhanden und ebenso ein rasches Wachstum auf MMAB-Medium zu verzeichnen war, konnten MMAB-Nalidixinsäure-Agarplatten versetzt mit Kanamycin wie bei *A. brasilense* zur Selektion der Transkonjuganden verwendet werden. Die Übertragung des Plasmids pBAH7 erfolgte durch Konjugation in einem triparentalen Ansatz (B.5.10.4). Transkonjuganden wurden am Mikroskop auf ihre GFP-Fluoreszenz hin untersucht. Alle erzielten Transkonjuganden wiesen eine starke Fluoreszenz auf und auch nach 100 Generationen auf Agarplatten ohne Antibiotikaselektion waren noch über 50% fluoreszent. Eine transkonjugante Kolonie wurde ausgewählt, über FISH mit der speziespezifischen Sonde Hlus446 auf ihre Reinheit überprüft und als *Herbaspirillum* sp. N3 *gfp*mut3 bezeichnet. Dieser Stamm wurde zur Inokulation von Weizenpflanzen eingesetzt.

C.6.3.2. Inokulation von Weizenwurzeln

Das Beimpfen von oberflächensterilisierten Weizenkeimlingen der Sorte Naxos erfolgte wie unter Punkt B.3.1 beschrieben. Diese wurden für drei Wochen im monoxenischen System angezogen, danach geerntet und einzelne, intakte Wurzelabschnitte mittels CLSM (B.4.2) untersucht. Analog zur Detektion von FISH-markierten Zellen waren die GFP-markierten Bakterien sowohl an der Wurzeloberfläche, wie auch im Inneren der Wurzel zu finden. Oft war *Herbaspirillum* sp. N3 *gfp*mut3 interzellulär lokalisiert, allerdings waren auch Signale im intrazellulären Bereich zu erkennen (s. Abbildung C.22).

Mit Hilfe der FISH-Methode und dem Einsatz von GFP-markierten Zellen war es somit möglich, die Fähigkeit von *Herbaspirillum* sp. N3 nachzuweisen, Weizenwurzeln der Sorte Naxos endophytisch zu kolonisieren.

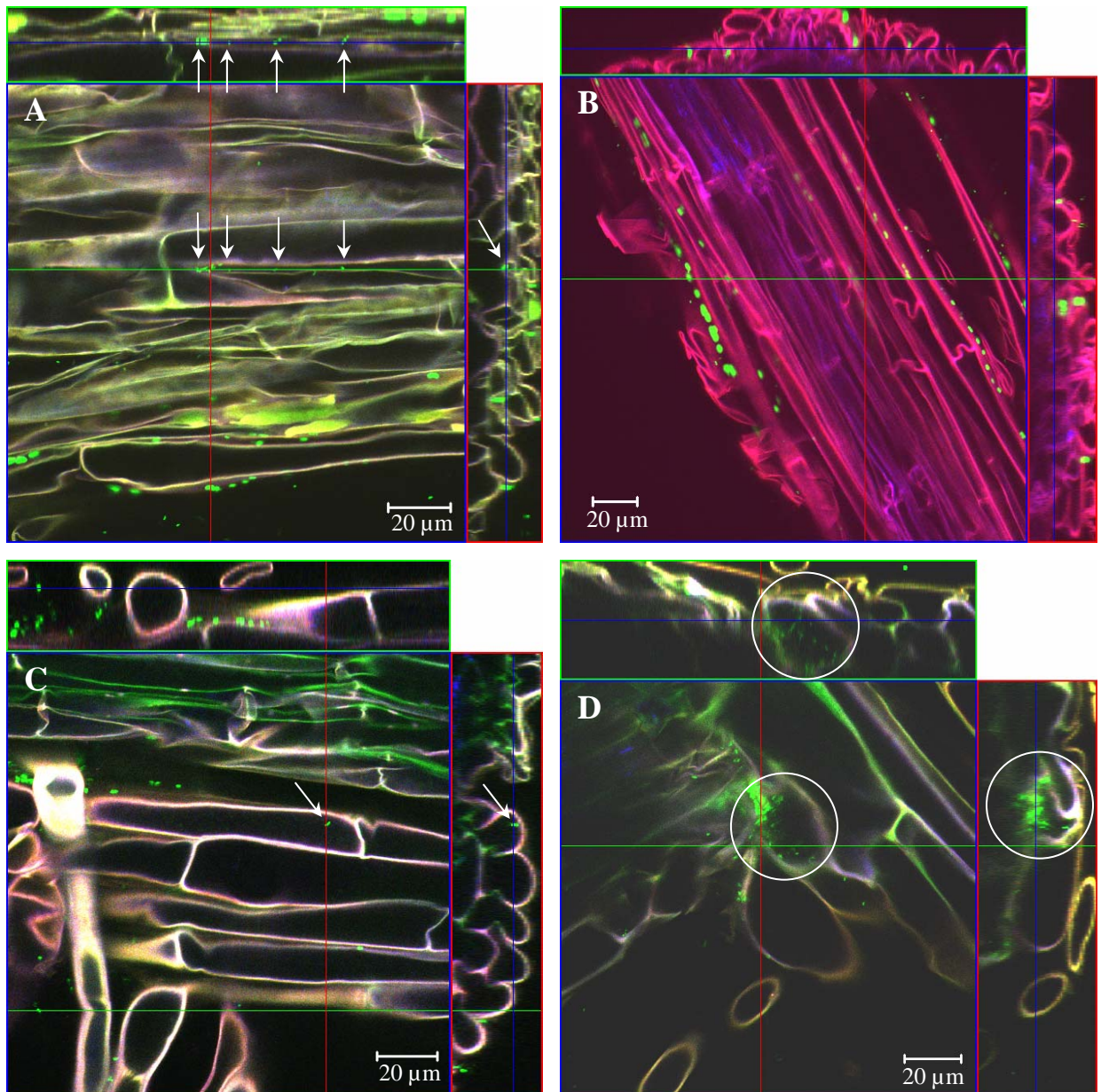


Abbildung C.22: Orthogonale optische Schnitte (s. Abbildung C.9) durch intakte Weizenwurzeln der Sorte Naxos nach drei Wochen Wachstum im monoxenischen System und *Herbaspirillum* sp. N3 *gfpmut3* als Inokulum. Die Aufnahmen stammen ausnahmslos aus der Wurzelhaarzone.

- (A) Besiedlung eines Interzellularraums: Die weißen Pfeile zeigen die endophytisch siedelnden Zellen in Haupt- und Seitenfenster an. An der Oberfläche ist eine ausgeprägte Kolonisierung zu erkennen.
- (B) Oberflächenkolonisierung: Charakteristisch ist das „perlschnurartige“ Besiedeln von Oberflächenfalten.
- (C) Intrazelluläre Detektion: Der weiße Pfeil zeigt ein GFP-Signal im Inneren einer intakten Wurzelzelle an.
- (D) Endophytische Besiedlung ganzer Wurzelzellen (angezeigt durch weiße Kreise in allen drei Fenstern) am Austrittspunkt einer Seitenwurzel.

D. DISKUSSION

D.1. Untersuchung der *A. brasilense* Besiedlung mit Antikörpern

In der vorliegenden Arbeit sollte Lokalisierung und Quantifizierung der bakteriellen Besiedlung auch durch monoklonale (mAk) bzw. polyklonale (pAk) Antikörper erfolgen. Verschiedene monoklonale Antikörper spezifisch für *A. brasilense* Stamm Sp245 wurden bereits in der Arbeit von Schloter *et al.* (1994) vorgestellt und nach Immunglobulinklassen und Bindungseigenschaften eingeteilt (Schloter and Hartmann, 1996). Der Einsatz bei der stammspezifischen Identifizierung beschränkte sich auf mAk 3-1.11, da sich keine der anderen Zelllinien nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff rekultivieren ließ. Dieser monoklonale Antikörper gehört zur Immunglobulinklasse Ig G₃ und bindet an ein für Stamm Sp245 spezifisches Oberflächenprotein (Schloter and Hartmann, 1996). Die Verwendung von mAk 3-1.11 zur Detektion von Reinkulturen im ELISA lieferte auch bei allen durchgeführten Versuchen ein eindeutig positives Signal. Bei der Markierung von *A. brasilense* Sp245 mit mAk 3-1.11 und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper auf Wurzeln war es jedoch nicht möglich, eine verwertbare Signalstärke zu erreichen. Dementsprechend konnte auch keine Quantifizierung der siedelnden Azospirillen vorgenommen werden. Eine mikroskopische Betrachtung einer mittels mAk 3-1.11 und eines Sekundärantikörper fluoreszenzmarkierten Reinkultur von *A. brasilense* Sp245 ließ letztlich darauf schließen, dass der monoklonale Antikörper an ein Epitop des polaren Flagellums bindet. Dies ist eine Erklärung für die erheblich eingeschränkte Einsetzbarkeit des Antikörpers zur *in situ* Detektion und Quantifizierung der *A. brasilense* Zellen, da das polare Flagellum nach der Verankerung der Zellen an der Wurzel möglicherweise abgeworfen oder für die Antikörper unzugänglich wurde (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). In Reinkulturen war das polare Flagellum noch vorhanden und demnach konnte bei frisch angewachsenen Zellen ohne Schwierigkeiten eine Bindung des Antikörpers erfolgen, was die nachfolgende Detektion im ELISA ermöglichte.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörper pAk Sp7 waren zur *in situ* Identifizierung des *A. brasilense* Stamms Sp7 sehr gut geeignet. Die Markierung von kolonisierenden Sp7 Zellen an der Wurzeloberfläche mit Hilfe dieser Antikörper konnte demonstriert werden (s. Abbildung C.1, Bild C). Auch im weiteren Verlauf der Arbeit wurde pAk Sp7 wiederholt zur Identifizierung von *A. brasilense* Sp7 Mutanten oder Transformanden

eingesetzt. Bei der Verwendung der polyklonalen Antikörper zur Quantifizierung der Wurzelkolonisierung durch Stamm Sp7 wurde zwar im quantitativen ELISA ein Signal detektiert, jedoch lag die über Referenzverdünnungen einer Sp7 Reinkultur zugeordnete Zellzahl um etwa einen Faktor 100 unterhalb der Keimzahl, die über eine Zählung von FISH-markierten Zellen in der beim quantitativen ELISA eingesetzten Zellsuspension ermittelt wurde. In der Arbeit von Schlöter und Hartmann (1998) wurden hochspezifische monoklonale Antikörper für die Quantifizierung von Azospirillen auf Weizenwurzeln eingesetzt. Dabei wurden für Stamm Sp7 Zellzahlen von 10^7 und mehr pro Gramm Wurzelgewicht ermittelt. Da dieser Wert wesentlich näher an den durch die FISH-Zählung gewonnenen Zahlen lag, wurde die Annahmen bestätigt, dass pAk Sp7 zwar für *in situ* Lokalisierung und Identifizierung von Stamm Sp7 hinreichende Bindungseigenschaften aufwies, jedoch für den Einsatz im quantitativen ELISA ungeeignet war. Da der wesentliche Vorteil bei der Verwendung von Antikörpern bei der *in situ* Lokalisierung jedoch die Stammspezifität ist, eine differentielle Markierung der Stämme Sp7 und Sp245 jedoch nicht möglich war, wurden die Untersuchungen zur Lokalisierung der Azospirillen in dieser Arbeit mittels FISH und stammspezifischen GFP-Markierungen durchgeführt.

D.2. Siedlungsdichte und PGPR-Effekt von *A. brasilense*

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die vergleichende Quantifizierung der *A. brasilense* Stämme Sp7 und Sp245 nach Inokulation von verschiedenen Weizensorten. Deshalb wurden die Weizenkultivare PF839197 (Brasilien), Atir (Israel), Naxos (Deutschland, modern), Nandu (Deutschland, modern) und Erbachshofer (Deutschland, vor 1945) zunächst hinsichtlich Kolonisierungsverhalten und Besiedlungsdichte der beiden *A. brasilense* Stämme untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Fähigkeit zur endophytische Besiedlung durch Stamm Sp245 im Vergleich zu Stamm Sp7. Schlöter und Hartmann (1998) konnten eine endophytische Kolonisierung nur für den Stamm Sp245 bei dem auf Lößboden angezogenen brasilianischen Weizenkultivar PF879197 nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Stamm Sp7 oder Sp245 inokulierte Weizenkeimlinge zunächst in einem monoxenischen System angezogen, das Verwendung fand, da hier im Vergleich zur Kultivierung im Bodensystem höheren Besiedlungsdichten erreicht wurden. Bei allen fünf Kultivaren ergaben sich bei der Untersuchung der Gesamtzellzahl durch Plattenkoloniezählung ähnliche Werte um 10^8 Zellen pro Gramm Wurzelfeuchtgewicht (s.

Abbildung C.3). Dies entsprach in etwa den gefundenen Werten von Schloter und Hartmann (1998), die außerdem bei dem untersuchten brasilianischen Weizenkultivar eine stärkere Besiedlung durch Stamm Sp245 im Vergleich zu Sp7 feststellten. In der vorliegenden Arbeit konnte eine höhere Kolonisierungsdichte von Stamm Sp245 ebenfalls bei der brasilianischen Weizensorte dokumentiert werden, während bei den anderen Kultivaren zwischen den Stämmen Sp7 und Sp245 kaum signifikante Unterschiede in der Kolonisierung existierten. Bei der Bestimmung der Zellzahlen über semisoliden NfB-Medium mittels MPN-Methode wurden stets niedrigere Zellzahlen ermittelt, wobei jedoch das Verhältnis der Werte zueinander im Wesentlichen mit der Plattenkoloniezählung vergleichbar war (s. Abbildung C.4). Die Standardabweichung bei der MPN-Methode lag jedoch wesentlich höher und zudem war die Versuchsdurchführung und -auswertung sehr viel komplexer. Oftmals war es nicht einfach zu entscheiden, ob ein schwach sichtbarer Pellicel im Kulturgefäß bereits als bakterielles Wachstum zu werten war oder nicht. Deshalb können die über die Plattenkoloniezählungen gewonnenen Daten als realistischer angesehen werden.

Eine Oberflächensterilisierung der Wurzeln mit Chloramin T reduzierte nach der entsprechenden Optimierung von Einwirkzeit und Konzentration die Zellzahl um einen Faktor 100 bis 1000. Bei dieser Methode muss allerdings davon ausgegangen werden, dass nicht nur Endophyten überleben, sondern auch eng assoziierte Zellen, die z.B. eingebettet in der Mucigelschicht oder in Vertiefungen der Wurzeloberfläche siedeln. Trotzdem war zu erwarten, dass die Mehrzahl der nach einer Oberflächensterilisierung kultivierten Bakterien aus dem Wurzelinneren stammten (Baldani *et al.*, 1986b). Der Einsatz dieser Methode in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keinen Aufschluss darüber geben, ob Stamm Sp245 im Gegensatz zu Stamm Sp7 in den untersuchten Weizensorten tatsächlich zu einer endophytischen Besiedlung befähigt war. Schloter und Hartmann (1998), die mit Hilfe der Oberflächensterilisierung mit Chloramin T und immunologischen Nachweismethoden eine ausgeprägtere endophytische Kolonisierung durch Stamm Sp245 zeigen konnten, verwendeten für ihre Untersuchung die brasilianische Weizensorte, von der Stamm Sp245 ursprünglich isoliert worden war.

Wie bereits in mehreren Studien nachgewiesen wurde, kann sich eine Inokulation mit *A. brasilense* positiv auf die Entwicklung von Wurzel und Spross auswirken und zum Teil zu erheblichen Ertragssteigerungen führen (Mertens and Hess, 1984; Millet *et al.*, 1985; Boddey *et al.*, 1986). Dobbelaere *et al.* (2001) fasste eine Reihe von Freilandstudien aus verschiedenen Ländern zusammen, bei denen die Reaktion von Nutzpflanzen, wie z. B. Mais und Weizen, auf die Inokulation mit den Spezies *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* und

A. irakense untersucht wurde. Dabei ergab sich bei 60-70% der Experimente eine ertragssteigernde Wirkung durch die Inokulation um bis zu 30%. Die beste wachstumsstimulierende Wirkung des *Azospirillum*-Inokulums konnte in leichten Böden bei geringer Stickstoffdüngung erzielt werden. In Übereinstimmung mit den publizierten Daten konnte bei den drei untersuchten Weizensorten Naxos, PF839197 und Atir nach 7 Wochen Wachstum auf einem sandigen deutschen Ackerboden ohne Stickstoffzugabe ein ausgeprägter wachstumsstimulierender Effekt bei *A. brasilense* inokulierten Pflanzen im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollpflanzen festgestellt werden (s. Abbildung C.6 und Abbildung C.7). Nach 4 Wochen Wachstum war dieser Effekt noch nicht klar ausgeprägt, da möglicherweise im Samen gespeicherte Nährstoffe die frühe Pflanzenentwicklung erheblich beeinflussten. Am stärksten wirkte sich die Kolonisierung durch *A. brasilense* nach 7 Wochen bei dem brasilianischen Weizenkultivar (PF839197) aus. Obwohl das Kultivar Naxos das größte Sprossgewicht aufwies, war der Unterschied zwischen inokulierten und nicht inokulierten Pflanzen als ein Maß für den wachstumsstimulierenden Effekt der *A. brasilense* Kolonisierung bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei PF839197. Da die ermittelten Besiedlungszahlen bei der Sorte Naxos im Bodensystem sogar etwas höher lagen als bei dem Weizen aus Brasilien, weist dies darauf hin, dass die brasilianische Weizensorte am meisten von der Kolonisierung durch *A. brasilense* profitiert. Eine mögliche Begründung wäre eine gewisse Anpassung dieser Weizensorte an *A. brasilense* als ein in tropischen Böden weit verbreitetes Bakterium (Döbereiner *et al.*, 1976). Die Tatsache, dass die israelische Sorte Atir am wenigsten auf die Inokulation reagierte, lässt sich entsprechend durch eine schlechtere Anpassung an die Bodenbedingungen und die verwendeten Bakterienstämme erklären. In mehreren Studien konnte bereits eine solche Affinität zwischen Stämmen diazotropher Bakterien und bestimmten Pflanzenkultivaren nachgewiesen werden (Patriquin *et al.*, 1983; Wani *et al.*, 1985). Eine Spezifität für bestimmte Wirtspflanzen wurde für *Azospirillum* sp. sowohl bei verschiedenen Getreidesorten (Baldani and Döbereiner, 1980), als auch bei Mais (Penot *et al.*, 1992) gezeigt. Ebenso wurde die Beeinflussung der Interaktion von *Azospirillum* spp. und Weizen durch den Genotyp der besiedelten Wirtspflanze diskutiert (Avivi and Feldman, 1982). In vielen Freilandstudien wurde der Auswahl des geeigneten Bakterienstamms für die Inokulation einer bestimmten Wirtspflanze eine zu geringe Bedeutung beigemessen, was eine mögliche Ursache für die dokumentierten Fehlschläge beim Einsatz einer *Azospirillum*-Inokulation zur Ertragssteigerung bei Nutzpflanzen sein könnte (Fages, 1994). Deshalb ist eine genaue Charakterisierung des Besiedlungsverhaltens eines verwendeten Bakterienstammes unabdingbar.

D.3. FISH und GFP-Markierung von *A. brasilense* für den Nachweis der endophytischen Besiedlung mit dem CLSM

Um die endophytische Besiedlung von Stamm Sp245 im Vergleich zu Sp7 detailliert zu untersuchen, war der Einsatz von mikroskopischen *in situ* Detektionsverfahren notwendig. Mit der 16S rRNS gerichteten Sonde Abras 1420 (Stoffels *et al.*, 2001) konnte eine speziesspezifische Identifizierung von *A. brasilense* mittels FISH erfolgen. Um auf diese Weise markierte Zellen an und in Wurzeln detektieren zu können, war die Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) erforderlich. Das gesamte untersuchte Wurzelmaterial zeigte besonders nach der Fixierung und Entwässerung im Rahmen der FISH-Methode eine starke Autofluoreszenz. Zusätzlich kam bei der mikroskopischen Betrachtung von Wurzelpräparaten mit einer Dicke von über 10µm ohne konfokale Lochblende das störende Streulicht ausgehend von Bereichen ober- und unterhalb der Fokusebene hinzu. Diese Effekte summierten sich zu einer starken Hintergrundfluoreszenz, die häufig die spezifischen Signale von fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen überdeckte. Diese Schwierigkeiten konnten mit Hilfe des CLSM überwunden werden (Hartmann *et al.*, 1998). Außerdem war es durch die Aufnahme von z-Stapeln bestehend aus zahlreichen optischen Schnitten eines Präparats möglich, dreidimensionale Informationen über die Position einer siedelnden Bakterienzelle innerhalb der Wurzel bis zu einer Penetrationstiefe von 40µm zu erhalten. Die Zugänglichkeit von tieferem Wurzelgewebe für Oligonukleotidsonden war jedoch stark limitiert. Daher wurden Radial- und Longitudinalschnitte von verschiedenen Teilen der Wurzel angefertigt. Dabei ergab sich, dass eine Dicke zwischen 50 und 100µm ein optimales Eindringen der Sonden gewährleistete, und gleichzeitig immer noch ein großer Anteil an nicht oder nur einseitig angeschnittenen Wurzelzellen erhalten blieb. Mit dieser Methode konnte Stamm Sp245 wiederholt inter- und intrazellulär innerhalb der äußeren Kortexschichten lokalisiert werden, während Stamm Sp7 nicht im Inneren der Wurzel gefunden wurde (vgl. Abbildung C.9). Zellen die beim Schneiden der Wurzel ins Innere gelangt waren, wurden während der Fixierung, Entwässerung, Hybridisierung und den verschiedenen Waschschritten mit größter Wahrscheinlichkeit ausgespült, wodurch eine fälschliche Identifizierung als Endophyt nahezu ausgeschlossen war. Die Tatsache, dass Stamm Sp7 nicht im Inneren der Wurzel nachgewiesen werden konnte, stützt diese Argumentation. Da die Gesamtzellzahl von *A. brasilense* bei den monoxenisch angezogenen Weizenwurzeln höher war, wurden auch dementsprechend häufiger endophytisch siedelnde

Zellen bei Wurzeln aus dem monoxenischen System im Vergleich zum Bodensystem gefunden.

Um jedoch einen zweifelsfreien Nachweis der endophytischen Besiedlung durch *A. brasilense* Stamm Sp245 zu erbringen, wurden beide Stämme mit einem konstitutiv *gfp* exprimierenden, auch ohne Antibiotikadruck stabilen Plasmid markiert. Mit einem vergleichbaren Vektor, der die konstitutiv exprimierten Gene *gfp* und *gusA* beinhaltet, wurde auch von Ramos *et al.* (2002) eine Markierung von *A. brasilense* FP2 (Stamm Sp7 mit zwei Antibiotikumsresistenzen) erreicht. Mit diesem Stamm gelang den Autoren eine mikroskopische Dokumentation der Besiedlung von Weizen, wobei eine relativ gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Wurzeloberfläche, aber keine Besiedlung im Wurzelinneren gefunden wurde. In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die grün fluoreszierenden *A. brasilense* Zellen auf der Wurzeloberfläche und im Inneren zu detektieren, ohne dass dabei eine Manipulation oder chemische Behandlung der Wurzel notwendig war. Dies hatte einerseits den Vorteil, dass die Autofluoreszenz nicht durch die Behandlung mit Formamid bei der Zellfixierung verstärkt wurde, andererseits war eine mögliche Artefaktbildung beim Schneiden der Wurzel ausgeschlossen. Über dreidimensionale Aufnahmen mit dem CLSM gelang eine klare Demonstration der endophytischen Besiedlung durch Stamm Sp245, während Stamm Sp7 wiederum auf eine epiphytische Siedlungsweise beschränkt blieb (vgl. Abbildung C.10). Dieser Unterschied im Besiedlungsverhalten von Stamm Sp7 und Sp245 war bei allen drei Weizenkultivaren gleichermaßen zu finden und entsprach den Ergebnissen vieler früherer Publikationen. Baldani *et al.* (1987) berichteten erstmals über eine mögliche endophytische Siedlungsweise von Stamm Sp245. Später konnte durch die differentielle Markierung mittels stammspezifischer, monoklonaler Antikörper das unterschiedliche Besiedlungsverhalten der beiden Stämme demonstriert werden: Sowohl eine vergleichende Quantifizierung der endophytisch siedelnden Zellen mittels ELISA, als auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung nach einer Immunogold-Markierung bestätigte das Auftreten von Stamm Sp245 als Endophyt in Weizen (Schloter *et al.*, 1994; Schloter and Hartmann, 1998). Aßmus *et al.* (1995) verwendete fluoreszenzmarkierte, 16S rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden für eine spezifische Detektion von *A. brasilense* in Weizenwurzeln mittels CLSM, wobei eine Besiedlung ganzer Wurzelhaare und Zellen des Kortex durch Stamm Sp245 festgestellt wurde. Die Abweichungen bei der Effizienz der Kolonisierung durch Stamm Sp245 kann auf die unterschiedlichen verwendeten Weizenkultivare und Wachstumsbedingungen zurückgeführt werden. Dies bestätigt wiederum die auch in dieser Arbeit gefundene Anpassung einzelner Weizenkultivare an einen bestimmten *A. brasilense*

Stamm. Daher ist eine gezielte Auswahl des Inokulums je nach vorliegender Weizensorte für eine zuverlässige Ertragssteigerung zwingend notwendig (Okon and Lavandera-Gonzalez, 1994).

Die Fähigkeit von Stamm Sp245 das Wurzelinnere zu kolonisieren stellt eher eine Ausnahme dar, da die meisten *A. brasilense* Stämme vornehmlich die Wurzeloberfläche besiedeln (Patriquin *et al.*, 1983). Ähnliches gilt auch für die anderen Vertreter der Gattung *Azospirillum* (Dobbelaere *et al.*, 2001). Nach Baldani *et al.* (1997) kann demnach *A. brasilense* als fakultativer Endophyt bezeichnet werden, wohingegen Bakterien, die während des größten Teils ihres Lebenszyklusses durch eine endophytische Lebensweise charakterisiert sind, als obligate Endophyten gelten. Zu diesen zählen beispielsweise die stickstofffixierenden Bakterien *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante and Döbereiner, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al.*, 1986a) oder *Azoarcus* spp. (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993). *G. diazotrophicus* konnte vor allem bei Zuckerrohr in Blättern, Stamm und Wurzeln gefunden werden (Reis *et al.*, 1994), während die Spezies im Boden nicht nachzuweisen ist (Baldani *et al.*, 1997). Dabei lässt die Detektion des Bakteriums in den Gefäßen des Xylems darauf schließen, dass die Verbreitung von *G. diazotrophicus* innerhalb der Pflanze über das vaskuläre System erfolgt (Cavalcante and Döbereiner, 1988). *H. seropedicae* wurde bereits aus den unterschiedlichsten Gramineen isoliert, wobei vorwiegend in den Wurzeln hohe Siedlungsdichten erreicht wurden (James and Olivares, 1997), während das Bakterium in den Blättern von beispielsweise Zuckerrohr nicht zu finden ist (Olivares *et al.*, 1996). *Azoarcus* sp. wurde aus Kallargras isoliert und konnte an mehreren Standorten innerhalb der Wurzeln von Kallargras identifiziert werden (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998). Als Endophyt scheint *Azoarcus* von dem effektiveren Austausch von Metaboliten mit der Pflanze zu profitieren (Hurek *et al.*, 1994). Auch bei *G. diazotrophicus* und *H. seropedicae* wird angenommen, dass die endophytische Lebensweise zu einer verbesserten Versorgung der Pflanze mit fixiertem Stickstoff beiträgt (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Das endophytische Besiedlungsverhalten von *A. brasilense* Stamm Sp245 stand allerdings in keiner Beziehung zu der beobachteten Wachstumsstimulation, was darauf schließen lässt, dass in diesem Fall endophytische Kolonisierung zumindest bei geringer Zelldichte keinen Einfluss auf den stimulatorischen Effekt des Inokulums hat.

D.4. Vergleich der verschiedenen Methoden zur GFP- und RFP-Markierung von *A. brasilense*

D.4.1. Eignung von *gfpmut3*, *gfp(ASV)* und *dsred* für den Einsatz in *A. brasilense*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Methoden getestet, um sowohl eine konstitutive Markierung von *A. brasilense* durch GFP oder RFP zu erreichen, als auch eine Fusion eines promotorlosen *gfp*-Gens mit dem *ipdC*-Promotor. Zu diesem Zweck wurde versucht mit zwei verschiedenen Varianten des *gfp*-Gens eine Fluoreszenzmarkierung zu erzeugen: *gfpmut3* und *gfp(ASV)*. Bei dem Genprodukt von *gfpmut3* handelt es sich um eine mutierte Form des wildtypischen GFP-Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei einer Anregungswellenlänge von 488nm eine zwanzig mal stärkere grüne Fluoreszenz zeigt als das Wildtyp-Protein und zudem nur noch gering durch UV-Licht anregbar ist (Cormack *et al.*, 1996). Ausgehend von *gfpmut3* war von Andersen *et al.* (1998) die Variante *gfp(ASV)* konstruiert worden, die aufgrund von angehängten kurzen Peptidsequenzen an das C-terminale Ende des intakten GFP-Proteins für den Abbau durch die zelleigenen Proteasen zugänglich wird. Deshalb eignet sich *gfp(ASV)* besonders für Promotorstudien, da die Halbwertszeit gegenüber *gfpmut3* wesentlich verkürzt ist und somit auch Änderungen in der Expression von Genfusionen im Bereich von Stunden erfassbar sind (Andersen *et al.*, 1998). So wurden Sensorsysteme basierend auf Genfusionen mit *gfp(ASV)* erfolgreich für die Untersuchung bakterieller Kommunikation über Homoserin-Lactone eingesetzt (Andersen *et al.*, 2001; Steidle *et al.*, 2001) und trugen z. B. zur Aufklärung des „Quorum sensing“ zwischen *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* in gemischten Biofilmen bei (Riedel *et al.*, 2001). Die Variante *gfpmut3* wurde beispielsweise für eine stabile, chromosomale Markierung von *B. cepacia* (Huber *et al.*, 2001) oder *Pseudomonas putida* (Andersen *et al.*, 1998) verwendet.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich beim Einsatz von *gfp(ASV)*, dass keine ausreichende Fluoreszenzmarkierung in *A. brasilense* erzielt werden konnte. Aufgrund der Instabilität des Proteins war es offensichtlich nicht möglich die für eine Visualisierung notwendige Zahl von GFP-Molekülen in den Zielzellen zu erreichen. Ebenso gelang es weder mit *gfp(ASV)* noch mit *gfpmut3* über mini-Tn5-Transposons oder „gene replacement“ Vektoren eine chromosomale Expression bei *A. brasilense* herbeizuführen, obwohl nachweislich eine Insertion ins Genom der Zielzellen erfolgt war. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von

Xi *et al.* (1999) gemacht, wobei die Autoren das Phänomen auf eine möglicherweise unterschiedliche Codon-Nutzung bei *A. brasilense* zurückführten.

Parallel wurde auch eine Markierung von *A. brasilense* mit dem rot fluoreszierenden Protein drFP583 der Koralle *Discosoma* sp. „red“ getestet, das auch als DsRed oder RFP bezeichnet wird (Matz *et al.*, 1999). Über ein Transposon mit einem konstitutiv exprimierten *dsred*-Gen konnte von Hentzer *et al.* (2002) eine rote Fluoreszenzmarkierung bei *P. aeruginosa* erzeugt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Markierung von *A. brasilense* sowohl über ein Plasmid (pMH433) versucht, auf dem das *dsred*-Gen konstitutiv exprimiert wird, als auch über ein Transposon, das neben dem Antibiotikumsresistenzmarker ebenfalls ein konstitutiv exprimiertes *dsred*-Gen trägt (pTn5-red). Doch mit keiner der genannten Methoden konnte eine rote Fluoreszenz im Zielbakterium hervorgerufen werden. Eine Erklärung hierfür ist vermutlich in einer gewissen hemmenden oder sogar toxischen Wirkung des RFP-Proteins für die *A. brasilense* Zellen zu finden. Auch in den *E. coli* Donorzellen war wiederholt ein Verlust der roten Fluoreszenz festzustellen, obwohl die Antibiotikumsresistenz, die auf demselben Plasmid wie RFP kodiert ist, noch vorhanden war. Beim Kultivieren ohne Selektionsdruck konnte bei der Betrachtung der angewachsenen Reinkulturen am Mikroskop keine einzige DsRed-markierte Zelle gefunden werden. Auch bei *E. coli* schienen somit Zellen, welche entweder durch Verlust des Trägerplasmids oder durch Inaktivierung des *dsred*-Gens kein RFP exprimierten, einen Selektionsvorteil zu besitzen. Bei GFP-markierten Zellen waren solche Effekte nie zu beobachten, was dafür spricht, dass das *dsred*-Genprodukt eine schlechtere Zellverträglichkeit besitzt als GFP (A. Steidle, persönliche Mitteilung). Somit blieb die Fluoreszenzmarkierung durch Markergene bei *A. brasilense* auf *gfpmut3* beschränkt.

D.4.2. Genomische GFP-Markierung durch Genaustausch

Eine in dieser Arbeit getestete Methode, um eine vom *ipdC*-Promotor abhängige Expression des *gfp*-Gens bei *A. brasilense* auf Genomebene herbeizuführen, war die spezifische Inaktivierung von *ipdC* durch das Einfügen einer *gfp-npt*-Kassette mit Hilfe des pEX18Gm Suizid-Vektors (Hoang *et al.*, 1998). Derartige „Genaustausch“-Vektoren ermöglichen grundsätzlich die genetische Manipulation von nahezu jedem DNS-Fragment in einer großen Zahl von Gram-negativen Bakterien (Schweizer and Hoang, 1995). Bei den pEX18-Vektoren wurde diese breite Anwendbarkeit erreicht, indem ein *lacZ α* -Allel für blau/weiß-Screening, ein *oriT* für konjugativen Plasmidtransfer, unterschiedliche Antibiotika-Selektionsmarker, ein

sacB-Gen zur Differenzierung zwischen merodiploiden und Knock-out-Mutanten und die multiple Klonierungsstelle von pUC18 in einen einzigen Vektor eingeführt wurden (Hoang *et al.*, 1998). Bei *A. brasilense* waren zwei wesentliche Voraussetzungen für die Einsetzbarkeit eines solchen Vektors erfüllt: Plasmide vom Typ ColE1 konnten im Zielbakterium nicht replizieren und der pEX18Gm-Vektor beinhaltet mit *aacCI* (Gentamycinresistenz) einen geeigneten Resistenzmarker. Zusätzlich sollte es bei merodiploiden Mutanten beim Wachstum auf saccharosehaltigem Medium durch die Expression des *sacB*-Gens zum Zelltod kommen. Dies würde zur Selektion der echten Knock-out-Mutanten führen, bei denen lediglich die *gfp-npt*-Kassette im Genom verblieben ist. Der Erfolg einer solchen Selektion lässt sich am Auftreten einer Sensitivität der Mutanten gegen Gentamycin überprüfen, da der Resistenzmarker auf dem pEX18Gm-Vektor kodiert ist und folglich bei den echten Knock-out-Mutanten fehlt. Nach einer Selektion auf NB-Saccharose-Platten konnten jedoch ausschließlich *Azospirillum*-Mutanten anwachsen, die eine Resistenz gegen Gentamycin aufwiesen. Hierfür gab es zwei denkbare Erklärungen: Eine Möglichkeit wäre das Auftreten von *sacB*⁻ Mutanten (Schweizer and Hoang, 1995; Jäger *et al.*, 1995). Eine Punktmutation oder eine Insertion könnte zu einer Inaktivierung des *sacB*-Gens geführt haben, wodurch nicht nur für die Knock-out-Mutanten das Wachstum auf Saccharose möglich wird, sondern auch für die merodiploiden *sacB*⁻ Mutanten. Eine weitere Erklärung könnte das Vorliegen einer „Saccharoseresistenz“ bei *A. brasilense* sein. Dies wurde im Zusammenhang mit der *sacB*-Expression bereits bei anderen Mikroorganismen festgestellt, wie beispielsweise bei *Pasteurella multocida* (Jost *et al.*, 1997) und *Streptomyces lividans* (Jäger *et al.*, 1992). Bei *S. lividans* wird durch eine Sekretion der Lävansucrase ins Medium die Entstehung toxischer Konzentrationen von Lävans in der Zelle verhindert. Über einen derartigen aktiven Transport des SacB-Enzyms aus der Zelle ist bislang bei *A. brasilense* nichts bekannt, doch weist das ausschließliche Auftreten von gentamycinresistenten Kolonien nach der Saccharoseselektion auf einen ähnlichen Mechanismus hin.

D.4.3. GFP-Markierung auf Plasmidebene

Eine erfolgreiche Markierung von *A. brasilense* wurde schließlich auf Plasmidebene mit dem Vektor pBBR1MCS-2 erzielt. Dieses Plasmid zeichnet sich *in vivo* und *in vitro* unter anderem durch eine hohe Stabilität in der Zielzelle auch ohne Antibiotikadruck aus (Kovach *et al.*, 1995) und wurde bereits in einer Reihe von Mikroorganismen mit Erfolg eingesetzt. In der Arbeit von Antoine and Locht (1992) wurde eine Replizierbarkeit des Vektors in

verschiedenen Gram-negativen Bakterien, darunter *Bordetella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Sinorhizobium melilotii* und *Vibrio cholerae* festgestellt, was das Plasmid auch für die Anwendung in *A. brasilense* geeignet erscheinen ließ. Die Verwendung eines stabilen Trägerplasmids für das *gfp*-Gen hat verschiedene Vorteile: Erstens ist bei der Verwendung eines replizierbaren Plasmids die nach der Konjugation resultierende Zahl von resistenten Klonen wesentlich höher, da die Resistenzmarker nicht erst z. B. über Transposition ins Genom integrieren müssen. Zweitens kann durch das Vorliegen der Plasmide als mehrfache Kopien innerhalb einer Zelle die Fluoreszenzstärke erheblich gesteigert werden. Ein Nachteil ist jedoch, dass selbst bei extrem stabilen Plasmiden der Prozentsatz von markierten Zellen in einer Kultur von Generation zu Generation sinkt. Dies muss bei der mikroskopischen Untersuchung der GFP-markierten Zellen berücksichtigt werden. Mit Hilfe des Plasmids pBBR1MCS-2 konnten auch die nachfolgend diskutierten Expressionsanalysen durchgeführt werden.

D.5. Die Expression von *ipdC* in den *A. brasilense* Stämmen Sp7 und Sp245

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war der Vergleich von Sequenz und Aktivität der *ipdC*-Promotorregionen von *A. brasilense* Sp7 und Sp245, sowie deren *in situ* Expression. Hierzu erfolgte zunächst eine Gegenüberstellung der entsprechenden DNS-Abschnitte der beiden Sequenzen. Dabei konnte festgestellt werden, dass der unmittelbar strangaufwärts vom *ipdC*-Startcodon gelegene Abschnitt bis auf einige Basen bei beiden Stämmen identisch war. Weiter strangaufwärts konnte jedoch bei Stamm Sp245 ein Sequenzabschnitt identifiziert werden, der bei Stamm Sp7 fehlte. Innerhalb dieses Abschnitts wurden zwei zueinander komplementäre Sequenzen gefunden, welche außerdem eine abschnittsweise palindromische Basenabfolge aufwiesen (s. Abbildung C.14). Diese charakteristischen Sequenzmotive lassen auf eine Bedeutung dieser Region bei der Transkriptionsregulation des *ipdC*-Gens schließen, da die meisten bekannten prokaryotischen Transkriptionsfaktoren an palindromische oder pseudopalindromische Sequenzabschnitte binden (Huffman and Brennan, 2002).

Um die Bedeutung dieser nur bei Stamm Sp245 gefundenen Insertion in der Promotorregion aufzuklären wurden zwei translationale Fusionen mit dem Reporter gen *gfpmut3* konstruiert. Wie bereits erwähnt erfolgte dies mit Hilfe des Vektors pBBR1MCS-2, der sich bei den

vorangegangenen konstitutiven *gfp*-Markierungen als geeignet für den Einsatz in *A. brasilense* erwiesen hatte. Ein Konstrukt enthielt den gesamten Promotorabschnitt von Stamm Sp245 (Abschnitt i2.2P), das andere nur den mit Stamm Sp7 homologen Teil (Abschnitt i2P, siehe auch Abbildung C.13). In der Arbeit von Dosselaere (2000) wurde eine *ipdC-gusA*-Promotorfusion (Vande Broek *et al.*, 1999), welche ebenfalls die gesamte bei Stamm Sp245 vorhandene Promotorregion beinhaltete, auf ihre Induzierbarkeit durch Wachstum auf MMAB-Medium mit den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin geprüft. Hier konnte die stärkste Induktion durch die Zugabe von Tyrosin erzielt werden, während auf reinem MMAB-Medium beinahe keine GusA-Aktivität festgestellt werden konnte. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden bei den Expressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit gleiche Konzentrationen an Phenylalanin und Tyrosin verwendet. Allerdings wurden die Kulturen nicht flüssig, sondern auf Agarplatten angezogen und anschließend noch bei 4°C gelagert, da dies erfahrungsgemäß die Expression und Reifung des GFP-Proteins begünstigte. Auf diese Weise konnten mit dem Konstrukt i2.2Pg(mut3)T vergleichbare Daten gewonnen werden: Durch Tyrosin war die stärkste Induktion zu erzielen, während durch Phenylalanin ein nur etwa halb so starker Effekt hervorgerufen werden konnte. Ebenso war auf reinem MMAB-Medium kaum noch Fluoreszenz zu detektieren. Anders verhielt es sich jedoch bei Konstrukt i2Pg(mut3)T (beinhaltet nur den Sp7 homologen Teil des Sp245 Promotors ohne die Sp245 spezifische Region), bei dem auch nach dreiwöchiger Lagerung bei 4°C nur eine minimale Fluoreszenzintensität erreicht wurde. Zwar konnte noch eine leichte Induktion durch die beiden Aminosäuren festgestellt werden, doch ein signifikanter Unterschied zwischen Phenylalanin und Tyrosin ließ sich nicht ermitteln (vgl. Abbildung C.18). Somit war eindeutig nachgewiesen, dass für eine volle Induzierung der Transkriptionsaktivität bei Stamm Sp245 die strangaufwärts gelegene Insertion von entscheidender Bedeutung ist. Außerdem war auch ein weitgehender Verlust der Induzierbarkeit des Konstrukt i2Pg(mut3)T durch die zugesetzten Aminosäuren zu erkennen, sowie eine Erhöhung der *gfp*-Expression im Vergleich zu i2.2Pg(mut3)T auf reinem MMAB-Medium. Diese Daten sprechen für eine maßgebliche regulatorische Funktion der strangaufwärts von Position -136 gefundenen Region bei Stamm Sp245.

Trotz der hohen Übereinstimmung von Abschnitt i2P und i7P konnte bei Stamm Sp7 mit der entsprechenden Promotorfusion i7Pg(mut3)T nicht nur eine eindeutige Induzierbarkeit durch die zugesetzten Aminosäuren nachgewiesen werden, sondern auch eine insgesamt deutlich stärker ausgeprägte Fluoreszenzintensität. In diesem Fall war jedoch im Gegensatz zu Stamm Sp245 die induzierende Wirkung von Phenylalanin beinahe 50% stärker als die von Tyrosin.

Außerdem war kein so deutlicher Rückgang der *gfp*-Fluoreszenz auf reinem MMAB-Medium zu erkennen (s. Abbildung C.17). Offensichtlich unterliegt die Expression des *ipdC*-Gens bei Stamm Sp245 einer strengeren Kontrolle als bei Stamm Sp7, was möglicherweise durch die beinahe doppelt so große Promotorregion gewährleistet wird. Dies könnte bei der Auswahl von *A. brasilense* Sp7 oder Sp245 als Inokulum zur Ertragssteigerung bei Nutzpflanzen von entscheidender Bedeutung sein. Hartmann *et al.* (1983a) isolierten Mutanten des *A. brasilense* Stammes Sp Cd (phylogenetisch nahe verwandt zu Stamm Sp7), die hohe Mengen an IES produzierten. Wurden Maispflanze mit einer solchen Mutante inokuliert, zeigte sich eine hemmende Wirkung auf Wurzel- und Sprosswachstum (Hartmann *et al.*, 1983b). Zudem wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass es bei einer zu hohen *Azospirillum*-Dichte im Inokulum (mehr als 10^8 Zellen pro ml) ebenfalls zu einer Hemmung der Wurzelentwicklung kommen kann (Fallik *et al.*, 1988; Okon and Kapulnik, 1986). Beide Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sich Auxin oberhalb einer gewissen optimalen Konzentration negativ auf das Wachstum der inokulierten Pflanzen auswirkt. Daher erscheint Stamm Sp245 geeigneter für eine Inokulation von Nutzpflanzen, da aufgrund der ausgeprägteren Regulation bei der IES-Synthese eine geringere Gefahr einer Auxin-Überproduktion besteht.

Beim Wachstum auf NB-Medium zeigten alle GFP-markierten Stämme eine mehrfach stärkere Fluoreszenzintensität als auf MMAB-Medium (s. Abbildung C.17 und Abbildung C.18). Dies ließe sich bei den Transkonjuganden Sp7 pBBR-i7Pg(mut3)T-rev und Sp245 pBBR-i2.2Pg(mut3)T-rev durch die im NB-Medium enthaltenen Aminosäuren erklären, die durch die hydrolytische Aufspaltung von Fleischprotein produziert werden und über 60% des fertigen Mediums ausmachen. Da jedoch auch bei den *A. brasilense* Stämmen eine starke Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war, die das Plasmid pBAH7 mit einem konstitutiv exprimierten *gfp*mut3-Gen trugen, ist die verstärkte *gfp*-Expression höchstwahrscheinlich auf eine erhöhte physiologische Aktivität von *A. brasilense* aufgrund der guten Nährstoffverfügbarkeit beim Wachstum auf Vollmedium zurückzuführen. Die Induktion der Promotorfusionen durch die beiden Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin spielt dabei offensichtlich eine untergeordnete Rolle.

Schließlich wurden alle drei Konstrukte auf die Stärke der *gfp*-Expression an Weizenwurzeln getestet. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der Expressionsanalysen. Transkonjugande Sp7 i7Pg(mut3)T-rev zeigte die stärkste Fluoreszenzintensität über den gesamten Wurzelbereich, bei Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev wurden wenige schwach *gfp*-exprimierende Zellen entlang der gesamten Wurzeloberfläche gefunden und eine GFP-Fluoreszenz von Sp245 i2Pg(mut3)T-rev war nicht zu detektieren (s. Abbildung C.19). Da besonders bei

Konstrukt Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev ohne das Vorhandensein der induzierenden Aminosäuren (entsprechend dem Wachstum auf reinem MMAB) annähernd keine Promotoraktivität zu verzeichnen war, lässt dies auf die Ausscheidung induzierender Wurzelexsudate schließen. Dies belegt die induzierende Wirkung von pflanzlichen Exsudaten auf die *ipdC*-Expression und damit höchstwahrscheinlich auch auf die Synthese von IES durch *A. brasilense* auf der Rhizoplane.

D.6. Phylogenie von *Herbaspirillum* sp. N3 und Besiedlungsverhalten bei Weizen

D.6.1. Phylogenetische Zuordnung von Isolat N3

Die Isolate N3, N5 und N9 wurden von Klein (2003) aus oberflächensterilisierten Weizenwurzeln isoliert und nach einer ersten phylogenetischen Analyse auf Basis eines Sequenzabschnitts von 1,3kb der 16S rDNS der Gattung *Herbaspirillum* zugeordnet, wobei die größte Sequenzhomologie zu *Herbaspirillum lusitanum* gefunden wurde. Diese drei Stämme wurden in der vorliegenden Arbeit einer genaueren Untersuchung unterzogen. Bei der Sequenzierung der annähernd kompletten 16S rDNS ergab sich zum einen, dass die Sequenzen der drei Isolate vollkommen identisch waren, zum anderen, dass sie eine 99,9%ige Homologie zur 16S rDNS von *H. lusitanum* aufwiesen (s. Tabelle C.2). Nach diesen Ergebnissen wurde nur Isolat N3 einer DNS-DNS-Hybridisierung mit dem Typstamm von *H. lusitanum* unterzogen. Dabei ergab sich mit 25% eine DNS-DNS-Übereinstimmung, die weit unterhalb des Grenzwertes von 70% lag, der normalerweise bei der DNS-DNS-Hybridisierung von Stämmen derselben Spezies mindestens erreicht wird (Wayne *et al.*, 1987). Auch wenn dieser Richtwert nicht als absolut angesehen werden kann und in Ausnahmefällen bis auf 50% ausgeweitet wird (Stackebrandt and Göbel, 1994), kann in diesem Fall die Zugehörigkeit des Isolats N3 zur Spezies *H. lusitanum* ausgeschlossen werden. Bei einer nahezu 100%igen Übereinstimmung in der 16S rDNS ist diese niedrige Übereinstimmung bei der DNS-DNS-Hybridisierung zwar nicht der Regelfall, jedoch gibt es in der Literatur mehrer vergleichbare Beispiele. So wurden von Fox *et al.* (1992) ähnlich niedrige DNS-DNS-Übereinstimmungen bei dem Vergleich mehrerer *Bacillus globisporus* und *Bacillus psychrophilus* Stämme gefunden, obwohl eine 99,5%ige Sequenzübereinstimmung in der 16S rDNS, ebenso wie verschiedene phänotypische

Merkmale auf die Zugehörigkeit der Stämme zur selben Art hingewiesen hatten. Weitere Beispiele existieren bei Spezies der Gattung *Aeromonas* (Martinez-Murcia *et al.*, 1992) und *Halobacillus* (Amoozegar *et al.*, 2003), sowie der Art cand. „*Burkholderia brasiliensis*“ (V.L.D. Baldani, persönliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Prozentwerte, die bei der DNS-DNS-Hybridisierung ermittelt werden, nicht den tatsächlichen Prozentsatz der identischen Basen des Genoms der beiden zu vergleichenden Bakterienstämme widerspiegeln. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass es bei Prokaryoten selbst bei niedriger Stringenz erst ab dem Auftreten von etwa 80% komplementärer Sequenzen zur Ausbildung eines DNS-Heteroduplexes kommt. Dies bedeutet, dass durch den bei der DNS-DNS-Hybridisierung ermittelten Prozentsatz zwischen 0% und 100% nur ein bis zu 20%iger Unterschied in den Sequenzen der verglichenen Genome wiedergegeben wird (Goodfellow and O'Donnell, 1993).

Da normalerweise Bakterien mit einer DNS-DNS-Übereinstimmung von über 70% eine Übereinstimmung von 97% oder höher in der Sequenz der 16S rDNS aufweisen, kann dieser Wert als Richtlinie zur Speziesdefinition verwendet werden (Stackebrandt and Göbel, 1994). Alle Spezies der Gattung *Herbaspirillum* zeigen jedoch ein hohes Maß an 16S rDNS Sequenzhomologien, die zwischen 97,0% und 99,2% liegen (Kirchhof *et al.*, 2001). Dies weist auf Spezies hin, deren divergierende Entwicklung erst vor relativ kurzer Zeit begonnen hat und die daher durch 16S rDNS basierende Methoden nur schwer zu differenzieren sind (Fox *et al.*, 1992). Wie auch die Ergebnisse für *Herbaspirillum* sp. N3 im Rahmen dieser Arbeit zeigen, ist die Analyse der 16S rDNS alleine für die Spezieszuordnung nicht ausreichend (Rosselló-Mora and Amann, 2001). Anders verhält es sich jedoch auf Gattungsebene, wo eine 16S rDNS Übereinstimmung von über 95% allgemein als Merkmal für die Zugehörigkeit zu einer Gattung angesehen wird (Ludwig *et al.*, 1998). Bei der DNS-DNS-Hybridisierung existiert kein so klar definierter Grenzwert. Werden jedoch die Ergebnisse für die DNS-DNS-Hybridisierungen zwischen den einzelnen *Herbaspirillum* Spezies in Betracht gezogen, die zwischen 10% und 29% liegen (Valverde *et al.*, in press), so spricht dies zusammen mit der hohen 16S rDNS Übereinstimmung für eine Zugehörigkeit von Isolat N3 zur Gattung *Herbaspirillum*. Da die 16S rDNS Sequenzhomologien von Isolat N3 auch zu den anderen *Herbaspirillum* Spezies zwischen 97,0% und 97,7% liegen, sind für die Beantwortung der Frage, ob es sich bei diesem Isolat um eine neue *Herbaspirillum* Spezies handelt oder ob es einer der anderen Spezies dieser Gattung zugeordnet werden kann, weitergehende Analysen erforderlich. Allerdings war aufgrund dieser 16S rDNS

Sequenzunterschiede die Konstruktion der Sonde HerbN3 möglich, welche spezifisch für die Detektion von *H. lusitanum* und *Herbaspirillum* sp. N3 ist (vgl. Abbildung C.20).

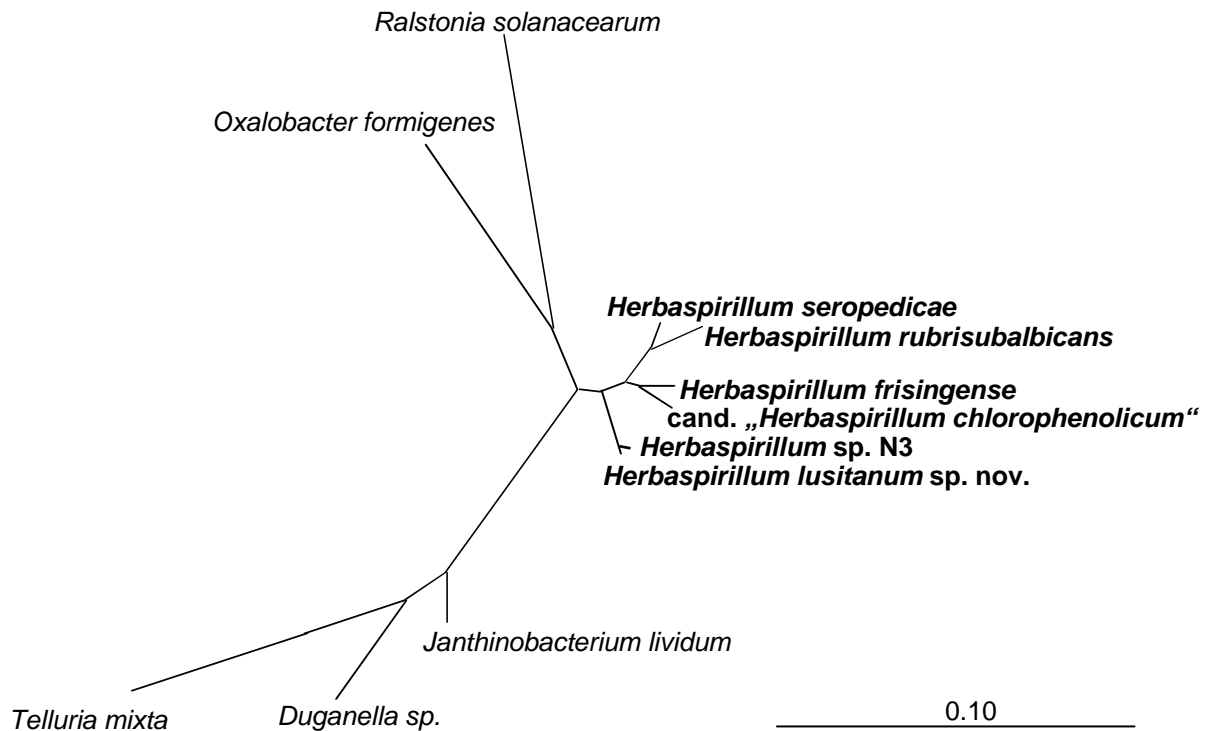


Abbildung D.1: Phylogenetischer Radialbaum berechnet nach dem „Maximum-Likelihood“-Verfahren. Der Balken gibt 10% Sequenzdivergenz wieder. Dargestellt sind alle bisher bekannten *Herbaspirillum* Arten und zum Vergleich einige Spezies aus anderen Gattungen der β -Proteobacteria.

D.6.2. Endophytische Besiedlung durch *Herbaspirillum* sp. N3

Vertreter der Gattung *Herbaspirillum* wurden immer wieder aus oberflächensterilisiertem Wurzelmaterial besonders bei Hirse und Zuckerrohr isoliert (Baldani *et al.*, 1992; Olivares *et al.*, 1996). In der Dissertation von Eckert (2003) konnte die aus *Miscanthus* isolierte Spezies *Herbaspirillum frisingense* durch Fluoreszenzmarkierung mittels polyklonaler Antiseren bei mikroskopischen Untersuchungen bereits sechs Tage nach der Inokulation in den Xylemgefäßen nachgewiesen werden. Auch *H. rubrisubalbicans*, der in Zuckerrohr eine leicht pathogene Wirkung zeigt, und *H. seropedicae* wurden innerhalb des Zentralzylinders von Getreide identifiziert (James and Olivares, 1997). Zusammen mit der Tatsache, dass die Überlebensfähigkeit in wurzelfreiem Ackerboden oftmals stark limitiert ist (Baldani *et al.*, 1992), führten diese Ergebnisse zu der Auffassung, dass *Herbaspirillum* spp. zu den endophytisch siedelnden Mikroorganismen zählen (Reis *et al.*, 1994). Dies bestätigte sich

auch bei der Isolierung von *H. lusitanum* (Valverde *et al.*, in press) aus den Wurzelknöllchen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), sowie in der Arbeit von Klein (2003), die mehrere Stämme der Gattung *Herbaspirillum* aus oberflächensterilisierten Weizenwurzeln der Sorte Naxos isolieren konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte die endophytische Besiedlung der Weizenwurzeln durch Isolat N3 mit mehreren Detektionsmethoden gezeigt werden. Die für diesen Zweck hergestellte 16S rRNS gerichtete Sonde HerbN3 bindet in derselben Region wie die bereits von Kirchhof *et al.* (2001) vorgestellten Oligonukleotidsonden zur speziesspezifischen Identifizierung von *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* und *H. frisingense*. Die Bindungsposition zeichnet sich durch eine gute Zugänglichkeit aus, was in einem starken Hybridisierungssignal resultiert. Aufgrund der hohen Übereinstimmung in der 16S rDNS von *H. lusitanum* und *Herbaspirillum* sp. N3 war eine Differenzierung dieser beiden Stämme nicht möglich. Für Isolat N3 konnte bei den Inokulationsversuchen im monoxenischen System ein ausgeprägtes endophytisches Potential nachgewiesen werden und besonders interzellulär wurden wiederholt Zellen detektiert (s. Abbildung C.21).

Ähnlich wie bei *A. brasilense* wurde zusätzlich zur Detektion mit Oligonukleotidsonden eine Markierung des Stamms durch ein konstitutiv *gfp*-exprimierendes Plasmid durchgeführt. Die mikroskopische Untersuchung der Naxos Weizenwurzeln, die mit GFP-markierten *Herbaspirillum* sp. N3 Zellen inokuliert worden waren, erbrachte wiederum einen eindeutigen Beweis für das endophytische Besiedlungsverhalten dieses Isolats. Dabei konnten Zellen sowohl inter- wie auch intrazellulär gefunden werden und an den Austrittsstellen von Seitenwurzeln waren sogar komplett besiedelte Zellen zu erkennen (s. Abbildung C.22). Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sind ein weiteres Beispiel für die endophytische Lebensweise von *Herbaspirillum* spp. und bestätigen somit, dass Vertreter dieser Gattung zusammen mit *Gluconacetobacter* spp. und *Azoarcus* spp. (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) zu den typisch endophytischen, diazotrophen Bakterien zu zählen sind. Dies gibt Anlass, die Auswirkungen dieser Besiedlung auf die Physiologie der Pflanze und das Pflanzenwachstum genauer zu untersuchen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die endophytische Besiedlung von Weizenwurzeln durch *Azospirillum brasilense* und *Herbaspirillum* sp. N3 untersucht. Mittels FISH-Methode mit artspezifischen phylogenetischen Oligonukleotidsonden und GFP-Markierungen konnte bei den *A. brasilense* Stämmen Sp7 und Sp245 an drei verschiedenen Weizensorten (*Triticum aestivum*) ein unterschiedliches Besiedlungsverhalten gezeigt werden. Hierzu wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop verwendet, mit dem eine dreidimensionale Aufklärung der bakteriellen Besiedlung der Wurzel möglich war. Für diese Anwendung eigneten sich besonders die GFP-markierten Stämme, da die Detektion in diesem Falle ohne Vorbehandlung oder Schneiden der Wurzel erfolgen konnte. Stamm Sp7 konnte bei allen Kultivaren nur an der Oberfläche lokalisiert werden, während Stamm Sp245 auch inter- und intrazellulär in den äußeren Kortexschichten der Wurzel gefunden wurde. Es war kein Zusammenhang zwischen der wachstumsstimulierenden Wirkung des Inokulums (PGPR-Effekt) und der Lokalisierung der Bakterien nachweisbar. Der stärkste PGPR-Effekt konnte bei dem verwendeten brasilianischen Weizenkultivar dokumentiert werden, das offensichtlich aufgrund einer gewissen Anpassung an das Inokulum den größten Nutzen aus der bakteriellen Besiedlung zu ziehen vermochte.

Da für den PGPR-Effekt die Produktion des Auxins IES (Indol-3-Essigsäure) von zentraler Bedeutung ist, wurde die Expression des Schlüsseligens *ipdC* (Indol-3-pyruvat Decarboxylase) einer genauen Untersuchung unterzogen. Dazu wurden eine Reihe von Methoden getestet, um eine Fusion des *ipdC*-Promotors mit einem *gfp*- oder *rfp*-Reporter gen zu erzeugen. Durch die Konstruktion translationaler Promotorfusionen mit der *gfp*-Variante mut3 auf Plasmidebene waren Expressionsanalysen möglich. Dabei ergab sich, dass sich die unmittelbar strangaufwärts des *ipdC*-Startcodons gelegene Promotorregionen des Stammes Sp7 nur in wenigen Basen von der des Stammes Sp245 unterscheidet. Allerdings schließt sich strangaufwärts an diesen Bereich bei Stamm Sp245 ein etwa 150 Basenpaare messender Abschnitt an, der bei Stamm Sp7 fehlt. Durch die Konstruktion von zwei verschiedenen Fusionen, die einmal den zu Stamm Sp7 homologen Bereich und einmal die gesamte Promotorregion von Sp245 beinhalteten, konnte eine maßgebliche Bedeutung dieser nur bei Stamm Sp245 vorhandenen Region für Kontrolle und Stärke der *ipdC*-Expression in *A. brasilense* Sp245 nachgewiesen werden. Außerdem erfolgte durch die Zugabe von Phenylalanin und Tyrosin eine Induzierung der entsprechenden *ipdC*-Promotorfusionen bei

Sp7 und Sp245. Dabei lag die maximale Promotoraktivität bei Stamm Sp7 höher als bei Stamm Sp245. Bei letzterem unterliegt die *ipdC*-Expression jedoch einer strengeren Kontrolle. Diese Ergebnisse wurden beim Einsatz der Transkonjuganden als Reporterstämme der *ipdC*-Expression auf Weizenwurzeln bestätigt. Es konnte eine Induzierbarkeit des *ipdC*-Promotors durch die Wurzelexsudate *in situ* nachgewiesen werden.

Schließlich wurde das von oberflächensterilisierten Weizenwurzeln gewonnene Isolat N3 einer genaueren Charakterisierung unterzogen. Anhand der 16S rDNS Sequenzdaten ließ sich das Isolat phylogenetisch der Gattung *Herbaspirillum* zuordnen, wobei eine nachfolgende DNS-DNS-Hybridisierung die Zugehörigkeit zu einer der bekannten *Herbaspirillum* Spezies ausschloss. Für das demnach als *Herbaspirillum* sp. N3 bezeichnete Isolat, das möglicherweise den Vertreter einer neuen Art darstellt, wurde eine spezifische, 16S rRNS gerichtete Sonde entwickelt, mit der die Besiedlung von inokulierten Weizensorten durch diesen Bakterienstamm mittels FISH untersucht werden konnte. Außerdem wurde eine GFP-Markierung zur Detektion in ungeschnittenem Wurzelmaterial vorgenommen. Dabei ließ sich eindeutig eine endophytische Besiedlungsweise von *Herbaspirillum* sp. N3 demonstrieren, wobei das Bakterium bevorzugt in Interzellularräumen der Wurzel lokalisiert war.

SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to examine the endophytic colonization behavior of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum* sp. N3 on wheat roots. The application of the FISH method using species specific phylogenetic oligonucleotide probes and GFP tagging facilitated the detection of a differential colonization behavior by the *A. brasilense* strains Sp7 and Sp245 on three different wheat varieties (*Triticum aestivum*). For this purpose a confocal laser scanning microscope (CLSM) was used, which enabled three-dimensional analysis of bacterial colonization of the root. Especially GFP tagged strains were well suited for this application, as there was no pretreatment or sectioning of the root sample necessary. Strain Sp7 was only located on the root surface of all wheat cultivars, whereas strain Sp245 was also found inter- and intracellularly in the outer root cortex layers. There was no recognizable connection between the growth stimulating effect of the inoculum (PGPR-effect) and the localization of the bacteria. The most pronounced PGPR-effect could be observed with the

Brazilian wheat cultivar, which seemed to gain greatest benefit of its partnership with *A. brasilense* due to a certain adaptation to the inoculum.

As the production of the auxin IAA (indole-3-acetic acid) plays a major role in stimulating plant growth, the expression of the key gene *ipdC* (indole-3-pyruvate decarboxylase) was examined. For this, several methods were tested to generate a fusion of the *ipdC* promoter with a *gfp* or *rfp* reporter gene. Constructing a translational promoter fusion with the *gfp* variant mut3 on plasmid level made expression analyses possible. With this method the promoter region of strain Sp7 located directly upstream of the *ipdC* start codon was found to differ only in a few bases from strain Sp245. But further upstream a region of about 150 bases was identified in strain Sp245, which was missing in strain Sp7. For Sp245 two different fusions were constructed, which contained the Sp245 promoter region homologous to strain Sp7 and the whole promoter region of Sp245, respectively. With these constructs the importance of the promoter region only present in strain Sp245 for control and intensity of *ipdC* expression in *A. brasilense* Sp245 could be demonstrated. Additionally an induction of the corresponding *ipdC* promoter fusions of Sp7 and Sp245 was achieved when adding phenylalanine or tyrosine. Total promoter activity was higher in strain Sp7 than in strain Sp245, and *ipdC* expression appeared to be subject to a stricter control in strain Sp245. These results were confirmed, when the strains containing the promoter fusions were used as reporters for *ipdC* expression on wheat roots. A demonstration of the induction of the *ipdC* promoter by root exudates *in situ* was possible.

Finally, isolate N3 from surface sterilized wheat roots was characterized in detail. According to the 16S rDNA sequence data the isolate was phylogenetically allocated to the genus *Herbaspirillum*. But a subsequent DNS-DNS hybridization ruled out, that the strain belonged to any of the known *Herbaspirillum* species. Thus, the isolate, which might represent a new species, was named *Herbaspirillum* sp. N3. A specific, 16S rRNA targeted probe was constructed, which facilitated the examination of wheat roots colonization by this bacteria using FISH. Additionally the strain was GFP tagged to enable the detection in uncut root material. By this, an unequivocal demonstration of the endophytic colonization by *Herbaspirillum* sp. N3 mainly within the intercellular spaces was possible.

F. LITERATUR

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402
- Amann, R.I., Krumholz, L., and Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762-770
- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., Malik, K. A., Schumann, P., and Sproer, C. 2003. *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1059-1063
- Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., and Givskov, M. 2001. *Gfp*-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 575-585
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Kongsbak Poulsen, L., Petersen Bjørn, S., Givskov, M., and Molin, S. 1998. New Unstable Variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2240-2246
- Antoine, R., and Locht, C. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Molecular Microbiology* **6**: 1785-1799
- Aßmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R., and Hartmann, A. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1013-1019
- Avivi, Y., and Feldman, N. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Israel Journal of Botany* **32**: 237
- Bachmann, B.J., and Low, K.B. 1990. Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, 8th ed. *Microbiological Reviews* **54**: 130-197
- Bae, H.-S., Lee, J.M., Kim, Y.B., and Lee, S.T. 1996. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **7**: 463-469
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., and Döbereiner, J. 1986a. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**: 86-93
- Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., and Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 911-922
- Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., and Döbereiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 802-810

- Baldani, V.L.D., Alvarez, I., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1986b. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in the roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* **90**: 35-46
- Baldani, V.L.D., and Döbereiner, J.** 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry* **12**: 86
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1987. Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum brasilense* spp. *Biology and Fertility of Soils* **4**: 37-40
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L., and Döbereiner, J.** 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* **13**: 65-73
- Bar, T., and Okon, Y.** 1992. Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Symbiosis* **13**: 191-198
- Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E., and Zanetti, G.** 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters* **36**: 87-90
- Barclay, G.A., and Crosse, J.E.** 1974. Populations of aerobic bacteria associated with the roots of apple and cherry plants. *Journal of Applied bacteriology* **37**: 475-486
- Bashan, Y.** 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* toward wheat roots in the soil. *Journal of General Microbiology* **132**: 3407-3414
- Bekri, M.A., Desair, J., Keijers, V., Proost, P., Searle-Van Leeuwen, M., Vanderleyden, J., and Vande Broek, A.** 1999. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *Journal of Bacteriology* **181**: 2440-2447
- Belandreau, J., and Knowles, R.** 1978. Interaction between non-pathogenic soil microorganisms and plants. In: Dommergues, Y.R., and Krupa, S.V. eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 243
- Ben Dekhil, S., Cahill, M., Stackebrandt, E., and Sly, L.I.** 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilisto* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **20**: 72-77
- Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**: 293-300
- Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J.** 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 343-350
- Boddey, R.M., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant and Soil* **95**: 109-121
- Bradley, D.E., and Williams, P.A.** 1982. The TOL plasmid is naturally derepressed for transfer. *Journal of General Microbiology* **128**: 3019-3024
- Bradly, D.E., Taylor, D.E., and Cohen, D.R.** 1980. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **143**: 1466-1470

- Brosius, J., Dull, T.L., Sleeter, D.D., and Noller, H.F.** 1981. Gene organization of primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**: 107-127
- Cashion, P., Hodler-Franklin, M.A., McCully, J., and Franklin, M.** 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry* **81**: 461-466
- Cavalcante, V.A., and Döbereiner, J.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* **108**: 23-31
- Clark, F.E.** 1949. Soil microorganisms and plant roots. *Adv. Agron.* **1**: 241-288
- Clark, J.M., and Swika, R.L.** 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nd Edn., W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S.** 1996. FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- Cryer, D.R., Eccleshall, R., and Marmur, L.** 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods in Cell Biology* **12**: 39-44
- Curl, E.A., and Truelove, B.** 1986. Chapter 3: Root exudates. In: *The Rhizosphere*. Curl, E.A., and Truelove, B., eds., Springer-Verlag, Berlin, pp. 55-92
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R.I., Schleifer, K.-H., and Wagner M.** 1999. The domain-specific probe EUB-338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 434-444
- De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A.** 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* **12**: 133-142
- deMan, J.C.** 1983. MPN tables, corrected. *European Journal of Applied Biotechnology* **17**: 301-305
- Dedonder, R.** 1966. Levan sucrose from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology* **8**: 500-505
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Amber, T., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Shimon, B., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., and Okon, Y.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 1-9
- Döbereiner, J.** 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef, K., Nannipieri, P., eds., Academic Press, London, pp. 134-141
- Döbereiner, J., Marriell, I.E., and Nery, M.** 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology* **22**: 1464-1473
- Döbereiner, J., Reis V.M., Paula M.A., and Olivares, F.L.** 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, tuber plants and cereals. In: *New horizons in nitrogen fixation*. Palacios, R. Mora, J., and Newton, W.E., eds., Kluwer, Dordrecht, pp. 671-676
- Dosselaere, F.** 2000. Tryptophan biosynthesis in *Azospirillum brasilense*: Molecular characterization and role in indole-3-acetic acid production. *Doctoraatsproefschrift Nr. 458 aan de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, K.U. Leuven, België*
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**: 6127-6145

- Eckert, B.** 2003. Isolierung, Identifizierung und Lokalisierung von diazotrophen Bakterien aus der C₄-Rohstoffpflanze Miscanthus. Dissertation, Fakultät der Biologie, LMU München
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., and Hartmann, A.** 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass Miscanthus. *International Journal of Systematic and Environmental Microbiology* **51**: 17-26
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., and Minamisawa, K.** 2001. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5285-5293
- Escara, J.F. and Hutton, J.R.** 1980. Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: Acceleration of renaturation rate. *Biopolymers* **19**: 1315-1327
- Fages, J.** 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: *Azospirillum / plant associations*. Okon, Y., ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 87-109
- Fallik, E., Okon, Y., and Fischer, M.** 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* interaction: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* **20**: 45
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **76**: 1648-1652
- Flatten, M.** 1996. Affinitätschromatographie an immobilisiertem Protein A und G. *BIOforum* **11**: 512-514
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., and Jurtshuk, P. Jr.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 166-170
- Goodfellow, M., and O'Donnell, A.G.** 1993. Roots of bacterial systematics. In: *Handbook of new bacterial systematics*. Goodfellow, M., and O'Donnell, A.G., eds., Academic Press Ltd., London, pp. 3-54
- Hadas, R., and Okon, Y.** 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils* **5**: 241-247
- Hale, M.G., Moore, L.D., and Griffin, G.J.** 1978. Root exudates and exudation. In: *Interactions between non-pathogenetic soil microorganisms and plants*. Dommergues, Y.R., and Krupa, S.V. eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 163-203
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580
- Hartmann, A.** 1989. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Plant and Soil* **110**: 225-238
- Hartmann, A., and Zimmer, W.** 1994. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum / plant associations*. Okon, Y., ed., CRC Press, Boca Raton, pp. 15-39
- Hartmann, A., Fußeder, A., and Klingmüller, W.** 1983b. Mutants of *Azospirillum* affected in nitrogen fixation and auxin production. In: *Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology*. Klingmüller, W., ed., Birkhäuser-Verlag, Basel, pp. 78-88

- Hartmann, A., Lawrence, J.R., Abmus, B., Schloter, M.** 1998. Detection of microbes by laser confocal microscopy. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., and de Bruijn, F.J., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, chapter 4.1.10., pp. 1-34
- Hartmann, A., Singh, M., and Klingmüller, W.** 1983a. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 916-923
- Hartmann, A., Stoffels, M., Eckert, B., Kirchhof, G., and Schloter, M.** 2000. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. In: *Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process*. Triplett, E.W., ed., Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp 727-736
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., Haas, D.** 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**: 232-237
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., and Givskov, M.** 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**: 87-102
- Hiltner, L.** 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirt. Gesellschaft* **98**: 59-78
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P.** 1998. A broad-host-range F₁p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77-86
- Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M., and Kersters, K.** 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 406-416
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S., and Eberl, L.** 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**: 2517-2528
- Huffman, J.L., and Brennan, R.G.** 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Current Opinion in Structural Biology* **12**: 98-106
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., Kellenberger, E.** 1994. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* **176**: 1913-1923
- Huss, V.A.R., Festl, H., and Schleifer, K.-H.** 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 184-192
- Jäger, W., Schäfer, A., Kalinowski, J., and Pühler, A.** 1995. Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene as a positive selection marker. *FEMS Microbiology Letters* **126**: 1-6
- Jäger, W., Schäfer, A., Puhler, A., Labes, G., and Wohlleben, W.** 1992. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* **174**: 5462-5465

- Jahnke, K.D.** 1992. Basic computer program for evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD System 2600 spectrometer on a PC/XT/AT type personal computer. *Journal of Microbiological Methods* **15**: 61-73
- James, E.K., and Olivares, F.L.** 1997. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews of Plant Science* **17**: 77-119
- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* **45**: 757-766
- Jost, B.H., Homchampa, P., Strugnell, R.A., and Adler, B.** 1997. The *sacB* gene cannot be used as a counter-selectable marker in *Pasteurella multocida*. *Molecular Biotechnology* **8**: 189-191
- Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosome of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molecular Genetics and Genomics* **233**: 293-301
- Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A.D., and Kaiser, P.** 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology* **140**: 679-693
- Kirchhof, G., and Hartmann, A.** 1992. Development of gene-probes of *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. *Symbiosis* **13**: 27-35
- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J.I., Reis, V.M., and Hartmann, A.** 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:157-168
- Klein, I.** 2003. Besiedlung von Weizen- und Gerstenwurzeln durch endophytische Rhizosphärenbakterien. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, LMU München
- Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M., and Lifshitz, R.** 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kleister, D.L., and Gregan, P.B., eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315-326
- Köhler, G., and Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M.II, and Peterson, K.M.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176
- Krieg, N.R., and Döbereiner, J.** 1986. The genus *Azospirillum*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N.R., and Holt, J.G., eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 96-104
- Kristensen, C.S., Eberl, L., Sanches-Romero, J.M., Givskov, M., Molin, S., and de Lorenzo, V.** 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *Journal of Bacteriology* **177**: 52-58
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A., Heulin, T.** 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2207-2223

- Lozan, J.L. und Kausch, H.** 1998. Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., and Schleifer, K.-H.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568
- Magalhães, F.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R., and Döbereiner, J.** 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **55**: 417-430
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K.-H.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass 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
- Martinez-Murcia, A.J., Benlloch, S., and Collins, M.D.** 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 412-421
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraksky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A.** 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology* **17**: 969-973
- McCrary, M.H.** 1915. The numerical interpretation of fermentation tube results. *Journal of Infectious Diseases* **17**: 183-212
- Mertens, T., and Hess, D.** 1984. Yield increase in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. *Plant and Soil* **82**: 87-99
- Millet, E., Avivi, Y., and Feldman, M.** 1985. Effects of rhizospheric bacteria on wheat yield under field conditions. *Plant and Soil* **86**: 347-355
- Murthy, M.G., and Ladha, J.K.** 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice. *Biology and Fertility of Soils* **4**: 3-7
- O'Hara, G.W., Davey, M.R., and Lucas, J.A.** 1983. Associations between the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum barsilense* and excised plant roots. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **113**: 1-13
- Okon, Y., and Kapulnik, Y.** 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* **90**: 3-16
- Okon, Y., and Lavandera-Gonzalez, C.A.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1591-1601
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils* **21**: 197-200
- Olivares, F.L., James, E.K., Baldani, J.I., and Döbereiner, J.** 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytology* **135**: 723-737

- Patriquin, D.G., and Döbereiner, J.** 1978. Light microscopy observations of tetrazolium reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 734-742
- Patriquin, D.G., Döbereiner, J., and Jain, D.K.** 1983. Sites and processes of the association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 900-915
- Penot, I., Bergès, N., Guinguené, C., and Fages, J.** 1992. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 798
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Onckelen, H.** 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interaction* **6**: 609-615
- Ramos, H.J.O., Roncato-Maccari, L.D.B., Souza, E.M., Soares-Ramos J.R.L., Hungria, M., and Pedrosa, F.O.** 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology* **97**: 243-252
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., and De Ley, J.** 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 43-51
- Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T.** 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* **6**: 139-144
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., and DeLey, J.** 1993. *Azoarcus*, gen. nov., nitrogen-fixing *Proteobacteria* associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenes* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 574-584
- Reis, V.M., Olivares, F.L., and Döbereiner, J.** 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**: 401-405
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin S., Eberl, L.** 2001. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147**: 3249-3262
- Rosselló-Mora, R., and Amann, R.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 39-67
- Rovira, A.D., and Davey, C.B.** 1974. Biology of the rhizosphere. In: *The plant root and its environment*. Carson, E.W., ed., University of Virginia Press, Charlottesville, pp. 153-204
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edn. New York. Cold Spring Harbor Laboratory
- Schlöter, M., and Hartmann, A.** 1996. Production and characterization of strain-specific monoclonal antibodies against outer membrane components of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Hybridoma* **15**: 225-232
- Schlöter, M., and Hartmann, A.** 1998. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis* **25**: 159-179

- Schloter, M., Kirchhof, G., Heinzmann, J., Döbereiner, J., and Hartmann, A.** 1994. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain specific monoclonal antibodies. In: *Nitrogen Fixation with Non-legumes*. Hegazi, N.A., Fayez, M., and Monib, M., eds. American University in Cairo Press, Cairo, pp. 291-297
- Schweizer, H.P., and Hoang, T.T.** 1995. An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **158**: 15-22
- Stackebrandt, E., and Göbel, B.M.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA-reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J.** 2000. *Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 487-506
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C., and Eberl, L.** 2001. Visualization of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5761-5770
- Stoffels, M., Castellanos, T., and Hartmann, A.** 2001. Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-Cluster. *Systematic and Applied Microbiology* **24**: 83-97
- Stotzky, G., Devanas, M.A., and Zeph, L.R.** 1990. Methods for studying bacterial gene transfer in soil by conjugation and transduction. In: *Advances in Applied Microbiology*. Neidleman, S.L., and Laskin, A.I., eds., Academic Press, San Diego, pp. 57-169
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., and Schimper, A.F.W.** 1991. V. Wurzeln. In: *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 33. Auflage neubearbeitet von Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., und Bresinsky, A., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 221-229
- Strunk, O. and Ludwig, W.** 1997. ARB: A software environment for sequence data [www.document]. URL <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., and Wallace, R.B.** 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. In: *Developmental Biology Using Purified Genes*. Brown, D.D., and Fox, C.F., eds., Academic Press, New York, pp. 683-693
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R., and Döbereiner, J.** 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. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 967-980
- Terry, N.** 1980. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. *Plant Physiology* **65**: 114-120
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., and Hubbell, D.H.** 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 1016
- Umali-Garcia, M., Hubbell, D.H., Gaskins, M., and Dazzo, F.** 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 219-226

- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., and Boddey, R.M.** 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Proc.* **56**: 105-114
- Valverde, A., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., and Igual, J.-M.** in press. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews in Phytopathology* **36**: 453-483
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., and Vanderleyden, J.** 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal Bacteriology* **181**: 1338-1342
- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Gool, A.** 1987. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 410-415
- Vanstockem, M., Milcamps, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Gool, A.** 1988. Tn5-Mutagenesis in *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*. Klingmüller, W., ed., Springer-Verlag, Berlin, pp. 32-39
- Wani, S.P., Chandrpalaiah, S., and Dart, P.J.** 1985. Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. *Expl. Agriculture* **21**: 175
- Wayne, L.G., et al.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464
- Werner, D.** 1992. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and function. In: *Biological nitrogen fixation*. Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H.J., eds., Chapman & Hall, New York, pp. 399-431
- Xi, C., Lambrecht, M., Vanderleyden, J., and Michiels, J.** 1999. Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *Journal of Microbiological Methods* **35**: 85-92
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., and Dazzo, F.B.** 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil* **194**: 99-114
- Zhulin, I.B., Bepalov, V.A, Johnson, M.S, and Taylor, B.L.** 1996. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* **178**: 5199-5204
- Zimmer, W., Wesche, M., Timmermans, L.** 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current Microbiology* **36**: 327-331

G. ANHANG

G.1. Konstruierte Plasmide, Mutanten und Transkonjuganden

Bezeichnung	Organismus	Resistenz	Vektor/Plasmid	Insert / Insertion
pTopo-ipdC3	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR4-Topo	PCR-Fragment ipdC3 aus <i>A. brasilense</i> Sp7 über TA-Klonierung
pTopo-ipdC4	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR4-Topo	PCR-Fragment ipdC4 aus <i>A. brasilense</i> Sp7 über TA-Klonierung
pGemMR4	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGEM-3Zf(+)	PCR-Amplifikat von <i>gfp</i> (ASV) aus pKR-C12 über TA-Klonierung
pMR1	<i>E. coli</i> Top10	Gm ^R 20	pEX18Gm geöffnet mit EcoRI und SacI	ipdC3 aus pTopo-ipdC3 geschnitten mit EcoRI und SacI
pMR2	<i>E. coli</i> Top10	Gm ^R 20	pMR1 geöffnet mit PstI und HindIII	ipdC4 aus pTopo-ipdC4 geschnitten mit PstI und HindIII
pMR3	<i>E. coli</i> XL1blue	Gm ^R 20	pMR2 geöffnet mit BamHI und PstI	Km ^R aus pBBR1MCS-2 geschnitten mit BglIII und NsiI
pMR4	<i>E. coli</i> GeneHogs	Gm ^R 20	pMR3 geöffnet mit SacI und KpnI	<i>gfp</i> (ASV) aus pGemMR4 geschnitten mit SacI und KpnI
Sp7 MR4Mero	<i>A. brasilense</i> Sp7 Mutante	Gm ^R 20, Km ^R 50, Nal ^R 6		gesamtes Plasmid pMR4 in <i>ipdC</i> Gen
Sp245 MR4Mero	<i>A. brasilense</i> Sp245 Mutante	Gm ^R 20, Km ^R 50, Nal ^R 6		gesamtes Plasmid pMR4 in <i>ipdC</i> Gen
Sp7 <i>gfp</i> mut3	<i>A. brasilense</i> Sp7	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBAH7	
Sp245 <i>gfp</i> mut3	<i>A. brasilense</i> Sp245	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBAH7	
pTopo-i7P	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR2.1-Topo	PCR-Amplifikat i7P der <i>ipdC</i> -Promotorregion von <i>A. brasilense</i> Sp7 über TA-Klonierung
pTopo-i2P	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR2.1-Topo	PCR-Amplifikat i2P der <i>ipdC</i> -Promotorregion von <i>A. brasilense</i> Sp245 über TA-Klonierung

Bezeichnung	Organismus	Resistenz	Vektor/Plasmid	Insert / Insertion
pTopo-i2.2P	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR2.1-Topo	PCR-Amplifikat i2.2P der <i>ipdC</i> -Promotorregion von <i>A. brasilense</i> Sp245 über TA-Klonierung
pGem-i7P	<i>E. coli</i> XL1blue	Ap ^R 100	pGemMR4 geöffnet mit ApaI und NcoI	Fragment i7P aus pTopo-i7P geschnitten mit ApaI und NcoI
pGem-i2P	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGemMR4 geöffnet mit ApaI und NcoI	Fragment i2P aus pTopo-i2P geschnitten mit ApaI und NcoI
pGem-i2.2P	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem- i7Pg(mut3)T geöffnet mit EcoRI und NcoI	Fragment i2.2P aus pTopo- i2.2P geschnitten mit EcoRI und NcoI
pGem- i7Pg(ASV)	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem-i7P geöffnet mit NcoI und KpnI	<i>gfp</i> (ASV) aus pGemMR4 geschnitten mit PagI und KpnI
pBBR- i7Pg(ASV)	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50	pBBR1MCS-2 geöffnet mit ApaI und KpnI	Translationale <i>ipdC</i> (Sp7)- <i>P- gfp</i> (ASV) Promotorfusion aus pGem-i7Pg(ASV) ge- schnitten mit ApaI und KpnI
Sp7 iPg(ASV)	<i>A. brasilense</i> Sp7	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBBR- i7Pg(ASV)	
pTopo- <i>gfp</i> mut3	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR2.1-Topo	PCR-Amplifikat von <i>gfp</i> mut3 aus pBAH7 über TA- Klonierung
pGem- i7Pg(mut3)	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem-i7P geöffnet mit NcoI und KpnI	<i>gfp</i> mut3 aus pTopo- <i>gfp</i> mut3 geschnitten mit PagI und KpnI
pGem- i2Pg(mut3)	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem-i2P geöffnet mit NcoI und KpnI	<i>gfp</i> mut3 aus pTopo- <i>gfp</i> mut3 geschnitten mit PagI und KpnI
pGem- i2.2Pg(mut3)	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem-i2.2P geöffnet mit NcoI und KpnI	<i>gfp</i> mut3 aus pTopo- <i>gfp</i> mut3 geschnitten mit PagI und KpnI
pTopo-T1T2	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50, Ap ^R 100	pCR2.1-Topo	PCR-Amplifikat der Terminatorregion T1T2 aus pEX18Gm über TA-Klonier.
pGem- i7Pg(mut3)T	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem- i7Pg(mut3) ge- öffnet mit ApaI	Terminatorregion T1T2 aus pTopo-T1T2 geschnitten mit ApaI
pGem- i2Pg(mut3)T	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem- i2Pg(mut3) ge- öffnet mit ApaI	Terminatorregion T1T2 aus pTopo-T1T2 geschnitten mit ApaI
pGem- i2.2Pg(mut3)T	<i>E. coli</i> Top10	Ap ^R 100	pGem- i2Pg(mut3) ge- öffnet mit EcoRI	Terminatorregion T1T2 aus pTopo-T1T2 geschnitten mit EcoRI

Bezeichnung	Organismus	Resistenz	Vektor/Plasmid	Insert / Insertion
pBBR-i7Pg(mut3)T-rev	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50	pBBR1MCS-2 geöffnet mit SacI	Im Vektor bzgl. der Km ^R revers orientierte transl. T1T2- <i>ipdC</i> (Sp7)P- <i>gfp</i> mut3 Promotorfusion aus pGem- i7Pg(mut3)T geschn. m. SacI
pBBR-i2Pg(mut3)T-rev	<i>E. coli</i> Top10	Km ^R 50	pBBR1MCS-2 geöffnet mit SacI	Im Vektor bzgl. der Km ^R revers orientierte transl. T1T2- <i>ipdC</i> (Sp245)P- <i>gfp</i> mut3 Promotorfusion aus pGem- i2Pg(mut3)T geschn. m. SacI
pBBR-i2.2Pg(mut3)T-rev	<i>E. coli</i> GeneHogs	Km ^R 50	pBBR1MCS-2 geöffnet mit SacI	Im Vektor bzgl. der Km ^R revers orientierte transl. T1T2- <i>ipdC</i> (Sp245)P- <i>gfp</i> mut3 Promotorfusion aus pGem- i2.2Pg(mut3)T gesch. m. SacI
Sp7 i7Pg(mut3)T-rev	<i>A. brasilense</i> Sp7	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBBR- i7Pg(mut3)T-rev	
Sp245 i2Pg(mut3)T-rev	<i>A. brasilense</i> Sp245	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBBR- i2Pg(mut3)T-rev	
Sp245 i2.2Pg(mut3)T-rev	<i>A. brasilense</i> Sp245	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBBR- i2.2Pg(mut3)T- rev	
N3 <i>gfp</i> mut3	<i>Herbaspirillum</i> <i>sp.</i>	Km ^R 50, Nal ^R 6	pBAH7	

Tabelle G.1: In dieser Arbeit erzeugte Konstrukte

Die *A. brasilense* bzw. *Herbaspirillum* sp. Transkonjuganden und *A. brasilense* Mutanten sind grau unterlegt. Für genauere Ausführungen zu den einzelnen Konstruktionsschritten siehe Punkt C.5 und C.6.3.

G.2. Verwendete Primer

Name	Sequenz	Schnittstelle	Fragment	T _M
ipdC2EcoRI	5'-tac-gaa-ttc-ggc-atc-att-cga-aag-tcg-3'	EcoRI	ipdC3	54°C
ipdC3SacI	5'-tac-gag-ctc-acc-ttg-gcc-tcc-agc-c-3'	SacI		54°C
ipdC4PstI	5'-tac-ctg-cag-gct-gga-gcg-gct-gcc-3'	PstI	ipdC4	54°C
ipdC5HindIII	5'-tac-aag-ctt-acg-aat-tgt-tgc-gcg-gc-3'	HindIII		54°C
ipdC-P-ApaI	5'-aaa-aaa-ggg-ccc-ggt-cta-tcg-cgt-tcg-g-3'	ApaI	i7P /	52°C
ipdC-P-NcoI	5'-aaa-aaa-cca-tgg-ccg-gtc-tcc-c-3'	NcoI	i2.2P	52°C
ipdC-Sp245-P-ApaI	5'-aaa-aaa-ggg-ccc-ggg-acg-gag-agg-3'	ApaI	i2P /	54°C
ipdC-Sp245-P-NcoI	5'-aaa-aaa-cca-tgg-ccg-ctc-tcc-c-3'	NcoI	i2.2P	52°C
gfpAsv-vor	5'-tac-gag-ctc-atg-agt-aaa-gga-gaa-gaa-c-3'	SacI	gfpASV/	52°C
gfpAsv-rev	5'-tac-ggt-acc-tta-tta-aac-tga-tgc-agc-g-3'	KpnI	gfpmut3	52°C
gfpMut3-rev	5'-tac-ggt-acc-tat-ttg-tat-agt-tca-tcc-3'	KpnI	gfpmut3	50°C
T1T2-SacI	5'-aaa-aaa-gag-ctc-aaa-taa-aac-gaa-agg-c-3'	SacI	T1T2	46°C
T1T2-ApaI	5'-aaa-aaa-ggg-ccc-gag-ttt-gta-gaa-acg-c-3'	ApaI		46°C

Tabelle G.2: In dieser Arbeit hergestellte Primer: Sequenzdaten, angefügte Schnittstellen, Bezeichnung des amplifizierten Fragments und Annealingtemperatur.

G.3. Sequenzdaten

Die folgenden Daten geben die relevanten Sequenzabschnitte der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten bzw. analysierten DNS-Fragmente wieder. Die *ipdC*-Promotorregion ist jeweils durch blaue Sequenzbuchstaben hervorgehoben, Abschnitte des *gfp*-Gens durch grüne und die T1T2-Terminatorregion durch rote. Das ATG Startcodon ist schwarz unterlegt.

G.3.1. Sequenzabschnitt ipdC3 von Stamm Sp245

Für Amplifikation und Sequenzierung (s. B.5.8) wurden die Primer ipdC2EcoRI und ipdC3SacI verwendet. Die Sequenzdaten wurden nach der Analyse zusammengesetzt.

```

CGGCAGAACGTAGCACGCCGCGCGCCGGTCCGAAAGACGCCCATCAGGCGTCACGGGGGC
CTATCGCGTTTCGGAGAAAACCCCTCTCCCGCCCCGGGAGAGGGTGGCGCCGAAGCGGCC
GGGTGAGGGTCGTCCGAGGATCAAGACACCAGCCCTTGCGGACACCCTCACCCCTCCCAC
GCTGCGCGTGGGCCCTTCCCTCTCCCGGGACGGGAGAGGGGATATCAAGCGCGGCCTCC
ACCCCTCCACAATTTCCGGCGCGAATGGATTGTTTCGAATGAAACAATTTCTTGCGCGGAG
CGGTGGCGGAGGGCGATGCTGTCCCCCTGTGCGGGTTTTTCGACCCGCGAAACCAATTGGAA
CGGGAGAGCGGCCATGAAGCTGGCCGAAGCCCTGCTGCGCGCGCTGAAGGATCGCGGCGC
ACAGGCCATGTTTCGGGATTCGGGTGATTCCGCCTGCCCTTCTTTAGGCGGCGGAGGAAA
CGCAGATCCTGCGCTCCACACGCTGAGCACGAGCCGCGGTGGGCTTCGCGGCGGACGC
GGCGGCGCGTTACAGTTCGACGCTGGGGGTGGCGGCGGTACCTACGGATCGGGCGCCTT

```

CAACATGGTGAACGCGGTGGCCGGCGCCTACGCCGAGAAGTCACCGGTGGTCGTCATCTC
 CGGCGCGCCGGGCACGACGGAGGGCAACCCCGGCCTGCTGCTGCACCACCAGGACCGCAC
 GCTGGACACGCAGTTCCAGGTGTTCAAGGAGATCACCGTCGCCAGGCGCGGCTGGACGA
 CCCGGCCAAGGCCCGCGGAGATCGCCCGGTGCTGGGGGCCCGCCGCGCCCTGTCGCG
 CCCGGTCTATCTGGAAATTCGCCGCAACATGGTCAACGCCGAGGTGAGCCGGTGGGCGA
 CGACCCGGCTTGGCCGGTGGACCGCGACGCGCTGGCCGCCTGCGCGGACGAGGTGCTGGC
 GGCCATGCGCTCGGCCACGTGCGCCGGTGCAGATGGT

G.3.2. Sequenzabschnitt des Konstrukts i7Pg(ASV)

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Primers ipdC-P-ApaI gewonnen, wobei das Plasmid pBBR-i7Pg(ASV) als Template diente.

CGATCGCTCTCCACCCCTCCACAATTTCCGGCGCATATGGATTGTTTCGAATGAAACAA
 TTCTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGCGATGCTGTCCCCCTGTGCGGGTTTTTCGGCCCGCG
 AAACCTATTGGAACGGGAGACCGGCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTG
 TCCCAATTCCTTGTGTAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGAGTGGAG
 AGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA
 AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTG
 CGAGATAACCAGATCATATGAAACAGCATAACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTT
 ATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAG
 TCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAG
 AAGATGGAACATTCCTTGGACACAAATGGAATACAACCTATAACTCACACAATGTATACA
 TCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTG
 AAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGGTGGCC
 CTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCC

G.3.3. Sequenzabschnitt des Konstrukts i7Pg(mut3)T

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Primers T1T2-SacI gewonnen unter Verwendung von Plasmid pBBR-i7Pg(mut3)T als Template.

GTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAG
 GACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGC
 AGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGG
 CCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCGGGCCCGGTCTATCGCGTTCGGCGCCCGATCGCTCTC
 CCACCCCTCCACAATTTCCGGCGCATATGGATTGTTTTCGAATGAAACAATTCCTTGCGCGG
 AGCGGTGGCGGAGGCGATGCTGTCCCCCTGTGCGGGTTTTTCGGCCCGCGAAACCTATTGG
 AACGGGAGACCGGCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCT
 GTTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGAGTGGAGAGGGTGAAGGT
 GATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTT
 CCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCA
 GATCATATGAAACAGCATGACTTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAA
 AGAACTATATTTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAA
 GGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGT

G.3.4. Sequenzabschnitt des Konstrukts i2Pg(mut3)T

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Primers T1T2-SacI gewonnen mit pBBR-i2Pg(mut3)T als Template.

```
GTCGAAAGACTGGGTCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAG
GACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGC
AGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGG
CCTTTTTACGTTTCTACAAACTCGGGCCCGGGACGGAGAGGGGGTATCAAGCGCGGCCTC
CACCCCTCCACAATTTCCGGCGCGAATGGATTGTTTCGAATGAAACAATTCTTGCGCGGA
GCGGTGGCGGAGGCATGCTGTCTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAAACCAATTGGA
ACGGGAGAGCGGCCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCTG
TTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTG
ATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTT
CATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATAACCAG
ATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAA
GAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACCACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAG
GTGATAACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTAT
```

G.3.5. Sequenzabschnitt des Konstrukts i2.2Pg(mut3)T

Die Sequenz setzt sich aus den Ergebnissen der Sequenzierung mit Universalprimer T7, sowie Primer gfpMut3-rev zusammen, wobei pBBR-i2.2Pg(mut3)T als Template verwendet wurde. Zur Absicherung der Sequenzdaten in der Region i2.2P wurde dieser Abschnitt zusätzlich mit Primer ipdC-P-ApaI sequenziert.

```
CGAATTGGAGCTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATC
TGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAAC
GTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCAT
CAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCGGGCC
CTTTTTTAAGGGCGAATTCGCCCTTAAAAAGGGCCCGGTCTATCGCGTTCGGAGAAAA
CCCCCTCTCCGCCCCGGGAGAGGGTGGCGCCGAAGGCGCCGGGTGAGGGTGTCCGAGGA
TCAAGACACCAGCCCTTGCGGACACCCTCACCCCTCCACGCTGCGCGTGGGCCCTTCC
CTCTCCCGGACGGGAGAGGGGATATCAAGCGCGGCCTCCACCCTCCACAATTTCCGGC
GCGAATGGATTGTTTCGAATGAAACAATTCTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGCGATGCTG
TCCCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAAACCAATTGGAACGGGAGAGCGGCCATGAGTA
AAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCTGTTGAATTAGATGGTGATGTTA
ATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTA
CCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTA
CTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATAACCAGATCATATGAAACAGCATGACT
TTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATG
ACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATAACCCTTGTTAATAGAA
TCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAAT
ACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAG
TTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATC
AACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCA
CACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGT
TTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCAT
```

DANKSAGUNG

Abschließend gilt mein herzlicher Dank den folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, sowie für seine Unterstützung und Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann für die Korrektur und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Michael Schmid für die vielen hilfreichen, aufbauenden, motivierenden und freundschaftlichen Gespräche und sein Ausharren mit mir im 2m² Büro – das soll uns erst mal einer nachmachen!

Der „Chefin“ und späteren Bürogenossin Draženka Selesi für das gemeinsame Durchstehen vieler Höhen und Tiefen, für ihre humor- und temperamentvolle Art den Laboralltag aufzuwirbeln und die Einführung in die Grundsätze der indischen Botanik.

Dr. Stephan Gantner für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen Lebenslagen, und sein stetes Interesse an elementaren, nebensächlichen und grundsätzlichen Aspekten meiner Arbeit.

Den ARB-gepeinigten Diplomandinnen Valerie Albrecht und Ilona Klein für eine unvergessliche Zeit mit unselbstständigen Indern, untreuen Freunden, unentwirrbaren Beziehungen, unwilligen Isolaten, unlösbaren Computerspielen und unerhörten Bildschirmschonern.

Dem CLSM-Spezialisten Stefan Kutter für seine unerschütterliche Fröhlichkeit, die Insider-Infos aus Universitätskreisen und die vielen detailgetreuen Farbbilder aus Fachzeitschriften und Internet.

Unserer „ersten“ Christine Dürr und den beiden Knallgas-Experten Isabelle Pattis und Susanne Stein für die gute Arbeitsatmosphäre, sowie für die häufigen fachlichen und privaten Unterhaltungen.

Meinen unermüdlichen Helferinnen Ute Slotta, Dagmar Dörrenberg und Linda Kinzel, die durch ihre engagierte Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Angelika Schulz für ihre Hilfe und Freundlichkeit, sowie Tarik Durkaja für die Einführung in die Welt der Zellkulturen.

Dr. Bernhard Ruth für das ständige Aushelfen mit wichtigen Werkzeugen und seine physikalische Sicht der Dinge.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Schloter, Schroll, Schröder und Zsolnay für das angenehme Arbeitsklima am IBÖ.

Herrn Peter Hutzler für die kompetente Beantwortung unzähliger Fragen zum CLSM.

Dr. Katrin Riedel, Dr. Birgit Huber und Dr. Anette Steidle aus der Arbeitsgruppe PD Dr. Leo Eberl am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der TU-München für die zur Verfügung gestellten Plasmide und ihre hilfreichen Auskünfte bei Klonierungsfragen.

Joav Herschkovitz als Kooperations- und Diskussionspartner in diesem Projekt.

Der German-Israeli-Foundation (GIF) für die Finanzierung eines Großteils dieses Projekts.

Meinem Vater und Karin für Rückhalt, Aufmunterung, Hilfe und das gute Essen, was mich stets mit neuer Motivation versorgt hat.

Und schlussendlich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner „Zukünftigen“ Simin – ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen.

LEBENS LAUF

Name: Michael Heinz Rothballer

Geboren: 18.9.74 in München

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule in Neukeferloh (Gemeinde Grasbrunn)

1985 – 1994 Ernst-Mach-Gymnasium Haar

Mai – Sept. 1992 Aufenthalt als Austauschschüler in den USA

1994 Abitur mit einem Notendurchschnitt von 1,8

Studium

WS 1994 – SS 1996 Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität München

Ende SS 1996 Vordiplom

WS 1996 – WS 1998 Hauptstudiengang Mikrobiologie mit den Nebenfächern Biophysik und Genetik

SS 1999 – WS 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie mit dem Thema: „Konstruktion von Knock-out-Mutationen in den Genen *gltB* und *nasT* von *Pseudomonas putida*“ (Note: 1,0)

April 2000 Abschluss als Dipl. Biol. Univ. mit dem Prädikat „sehr gut“

Promotion

Juni 2000 – Nov. 2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der LMU-München, durchgeführt am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Abteilung Rhizosphärenbiologie in der Arbeitsgruppe Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktion

Leiter: Prof. Dr. Anton Hartmann