

**Wirkung des biologischen Pflanzenstärkungsmittels
Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf das
Wachstum von Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Barke)
und auf die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre**

Katharina Ella Marie Buddrus-Schiemann

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

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

August 2008

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

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

Eingereicht am: 07. August 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Dezember 2008

In Dankbarkeit

für meine lieben Eltern, Geschwister und für Matthias

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Die Rhizosphäre - ein bedeutender Lebensraum mit intensiver mikrobieller Diversität und Aktivität	10
1.2 Mikroorganismen-Pflanzen-Interaktionen in der Rhizosphäre	12
1.3 Mikrobielle Kolonisierung der Rhizosphäre	13
1.4 Fluoreszierende Pseudomonaden als potente, konkurrenzfähige und bedeutungsvolle Rhizosphärenbakterien	15
1.5 Biologischer Pflanzenschutz mit Hilfe von „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR) in der Landwirtschaft	18
1.6 Proradix® als biologisches Pflanzenstärkungsmittel	19
1.7 Methoden der mikrobiellen Ökologie	20
1.8 Zielstellung dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Herstellung von Lösungen und Nährmedien	23
2.2 Kultivierung von Mikroorganismen	23
2.2.1 Verwendete Mikroorganismen	23
2.2.2 Nährmedien	25
2.2.3 Bakterienanzucht und Stammhaltung	26
2.2.4 Antibiotika	27
2.3 Isolierung der aktiven biologischen Komponente aus dem Proradix®-Originalpräparat und Bestimmung von Parametern mit Bedeutung hinsichtlich des PGPR-Effekts	28
2.3.1 Keimzahlbestimmung und Isolierung des Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Stammes	28
2.3.2 Nachweis der Siderophorenproduktion	29
2.3.3 Nachweis der Produktion von Indol-3-Essigsäure (IES)	31
2.3.4 Nachweis der 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase Aktivität	32
2.3.5 Dualkulturtests	34
2.4 Anzucht von Pflanzenmaterial	35
2.4.1 Verwendete Pflanzenart	35
2.4.2 Applikation von Proradix®	35
2.4.2.1 Saatgutbeizung bei Gerste	35
2.4.2.2 Inokulation von Gerstenkeimlingen mit dem Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Stamm	35
2.4.3 Anzucht von Gerste im Labor	36
2.4.3.1 Gerste im Quarzsandsystem	36
2.4.3.2 Samensterilisierung	37

2.4.4	Topfexperimente im Gewächshaus	37
2.4.4.1	Experimente mit Kultursubstrat	38
2.4.4.2	Experimente mit Ackerboden	39
2.4.5	Parzellenversuche im Freiland	39
2.4.6	Wurzelernte und Wurzelzubereitung	41
2.4.7	Auswertung von Ergebnissen aus Topf- und Parzellenexperimenten	42
2.5	Molekularbiologische Methoden	43
2.5.1	Probenvorbereitung	43
2.5.2	Isolierung von DNS	43
2.5.2.1	Isolierung hochmolekularer DNS aus Rhizosphärenproben	43
2.5.2.2	Isolierung chromosomaler DNS aus bakteriellen Reinkulturen	44
2.5.2.3	Isolierung von Plasmid-DNS	45
2.5.3	Aufreinigung von DNS und PCR-Produkten	45
2.5.4	Quantitative, photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration	46
2.5.5	Qualitative Analyse von hochmolekularer chromosomaler DNS und DNS-Fragmenten	46
2.5.5.1	Bestimmung der Länge von DNS-Fragmenten	47
2.5.5.2	Präparative DNS-Gelelektrophorese	48
2.5.6	Amplifikation von spezifischen DNS-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
2.5.6.1	Verwendete PCR-Primer	49
2.5.6.2	Standardansatz für die Durchführung einer PCR	50
2.5.6.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	51
2.5.7	Erstellung von Klonbanken	51
2.5.7.1	Amplifikation der 16S-rDNS	51
2.5.7.2	Erzeugung von Adenin-Überhängen	52
2.5.7.3	Klonierung von PCR-Produkten	53
2.5.7.4	Kolonie-PCR	54
2.5.7.5	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse	55
2.5.8	DNS-Sequenzanalyse	56
2.5.8.1	Durchführung von Sequenzierungen	56
2.5.8.2	Phylogenetische Auswertung von Sequenzdaten	58
2.5.9	Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse	59
2.5.9.1	Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS	59
2.5.9.2	Aufreinigung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte	60
2.5.9.3	Restriktion der 16S-rDNS-Amplifikate	60
2.5.9.4	Aufreinigung der Restriktionsfragmente	60
2.5.9.5	Detektion fluoreszenzmarkierter Restriktionsfragmente	60
2.5.9.6	Auswertung von T-RFLP-Ergebnissen	61
2.5.10	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	62
2.5.10.1	Verwendete rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden	64
2.5.10.2	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	65
2.5.10.3	Zellfixierung mit Paraformaldehyd	65
2.5.10.4	Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden	66

2.6	Mikroskopische Methoden	69
2.6.1	Epifluoreszenz-Mikroskopie	69
2.6.2	Vorbereitung von Wurzeln für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie	69
2.6.2.1	Wurzeln mit GFP-markierten Bakterien	69
2.6.2.2	Präparation von Wurzelschnitten	70
2.6.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	70
3	Ergebnisse	72
3.1	Untersuchung des Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Stammes anhand von Parametern mit pflanzenwachstumsfördernder Relevanz	72
3.1.1	Keimzahlbestimmung	72
3.1.2	Siderophorenproduktion	72
3.1.3	IES-Produktion	73
3.1.4	ACC-Deaminase Aktivität	73
3.1.5	Hemmung von Pilzwachstum (Dualkulturtests)	74
3.2	Überprüfung des pflanzenwachstumsfördernden Effekts durch Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	76
3.2.1	Anzucht von Gerste im Quarzsandsystem	76
3.2.2	Kultivierung von Gerste in Topfexperimenten im Gewächshaus	76
3.2.2.1	Experimente mit Kultursubstrat	76
3.2.2.2	Experimente mit Ackerboden	82
3.2.3	Parzellenversuche mit Gerste im Feldmaßstab	84
3.3	Besiedlung von Gerstenwurzeln durch den Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Stamm - Untersuchungen mit FISH und spezifischer GFP-Markierung	89
3.3.1	Inokulation von Gerstenkeimlingen	89
3.3.2	<i>In situ</i> Detektion von Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	90
3.3.3	Detektion von GFP-markierten Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Zellen	92
3.4	Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft mit molekularen Fingerprinting-Methoden	95
3.4.1	Isolierung der Gesamt-DNS aus Rhizosphärenproben für die T-RFLP-Analyse	95
3.4.2	Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS für die folgende T-RFLP-Analyse	96
3.4.3	Bestimmung der Länge des für Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) charakteristischen terminalen Restriktionsfragments	97
3.4.4	T-RFLP-Analyse der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaften im Rahmen eines Gewächshausversuches	98
3.4.5	T-RFLP-Analyse der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaften im Quarzsandsystem	104
3.5	Erstellung von Klonbanken zur Identifizierung terminaler Restriktionsfragmente	107
3.5.1	Differenzierung der erhaltenen Klone mit Hilfe der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse	107
3.5.2	Phylogenetische Analyse der erhaltenen 16S-rDNS-Sequenzen	112
3.5.3	Phylogenetische Einordnung des Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Stammes	118
3.5.4	Identifizierung der in T-RFLP-Analysen erhaltenen Restriktionsfragmente	120

4	Diskussion	129
4.1	Wirkmechanismen mit pflanzenwachstumsförderndem Potenzial von Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	129
4.2	Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	134
4.3	Lokalisierung von Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) in der Rhizosphäre von Gerste	141
4.4	Auswirkung der Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)-Applikation auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft von Gerste	146
4.5	Ausblick	152
5	Zusammenfassung	153
6	Literatur	155
7	Anhang	170
	Publikationsliste	203
	Tagungsbeiträge	204
	Danksagung	205

Abkürzungsverzeichnis

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat
bp	Basenpaare
CAS	Chromazurol S
CFU	Colony Forming Unit
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-(γ -carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylindol-carbocyanin-N-hydroxysuccinimidester
Cy5	Cy5.18 Derivat, N-hydroxysuccinimidester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH _{abs}	absoluter Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
Fluos	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
HDTMA	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
H ₂ O _{dem.}	einfach entionisiertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	entsalztes und filtriertes Wasser
K2	Klonbank K2: Gerste ohne Proradix®-Behandlung (Kontrolle) nach 2 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshausversuch
K4	Klonbank K4: Gerste ohne Proradix®-Behandlung (Kontrolle) nach 4 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshausversuch

kb	Kilobasenpaare
OD _{x nm}	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
P2	Klonbank P2: Gerste mit Proradix®-Saatgutbeizung nach 2 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshausversuch
P4	Klonbank P4: Gerste mit Proradix®-Saatgutbeizung nach 4 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshausversuch
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Potato-Dextrose-Agar
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TKG	Tausendkorngewicht
T-RFLP	Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die Rhizosphäre - ein bedeutender Lebensraum mit intensiver mikrobieller Diversität und Aktivität

Für das Leben und Wachsen aller heterotrophen Organismen spielen Pflanzen eine entscheidende Rolle, da sie während der Photosynthese Kohlendioxid und Wasser unter Ausnutzung der Strahlungsenergie der Sonne in komplexe organische Verbindungen umwandeln. Nach heutigen Schätzungen sind etwa 500.000 Pflanzenarten beschrieben (Sitte *et al.*, 2002). Pflanzen sind über ihre Wurzeln fest im Boden verankert und werden zudem durch diese mit Wasser und darin gelösten anorganischen Mineralstoffen aus dem Boden versorgt. Der Boden besitzt eine zentrale Bedeutung für die Funktion terrestrischer Ökosysteme. Dort laufen die wesentlichen Prozesse der Stoffkreisläufe ab. Eine bedeutende Stellung innerhalb dieser Stoffkreisläufe nehmen Bodenmikroorganismen ein. Dabei variieren die Zusammensetzung und die Quantität der Mikroflora im Wurzelbereich im Vergleich zum wurzelfreien Boden. Pflanzenwurzeln stellen eine einzigartige ökologische Nische dar, die als Rhizosphäre bezeichnet wird und sich durch eine hohe mikrobielle Besiedlungsdichte auszeichnet. Die Rhizosphäre ist der zentrale Ort, an dem die Pflanze, der Boden und Bodenmikroorganismen miteinander interagieren.

Der Pionier der Bodenbakteriologie und Rhizosphärenforschung, Lorenz Hiltner, definierte den Begriff der Rhizosphäre erstmals in einem Vortrag auf einer Tagung der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft in Eisenach / Thüringen im Jahre 1904 mit dem Titel „Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache“ (Hiltner, 1904). Darin hob er die Wechselwirkung zwischen der Pflanze und den Bakterien der Rhizosphäre hervor und berichtete, dass Ausscheidungen unterschiedlicher Pflanzenwurzeln verschiedene Bakteriengemeinschaften fördern. Gleichzeitig wird die

Ernährung der Pflanze von der bakteriellen Zusammensetzung der Rhizosphäre wesentlich bestimmt. Darüber hinaus schlussfolgerte er, dass auch die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegenüber Erkrankungen von ihrer Wurzelflora abhängt (Hartmann *et al.*, 2008a).

Nach Hiltner umfasst die Rhizosphäre die Pflanzenwurzel und den unmittelbar umgebenden Boden, der durch die lebende Wurzel physikalisch, chemisch und biologisch beeinflusst wird. Heute wird die Rhizosphäre zusätzlich in Endo- und Ektorhizosphäre untergliedert (Belandreau & Knowles, 1978), wobei die Endorhizosphäre den Wurzelkortex, die Rhizodermis mit Wurzelhaaren und die aufliegende Mucusschicht einschließt und die Ektorhizosphäre der Teil des Bodens ist, der die Wurzel direkt umgibt. Die Oberfläche der Wurzel mit ihrer Mucusschicht wird auch als Rhizoplane bezeichnet.

Im Gegensatz zu vielen terrestrischen Habitaten zeichnet sich die Rhizosphäre durch einen hohen Nährstoffgehalt aus, da die Pflanze über die Wurzel eine Vielzahl organischer Verbindungen in die Rhizosphäre abgibt. Diese Substanzen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden (Brimecombe *et al.*, 2007). Dabei wird zwischen wasserlöslichen Wurzelexsudaten, wie verschiedenen Zuckern, Aminosäuren, organischen Säuren, Hormonen sowie Vitaminen und wasserunlöslichem Wurzelmaterial, wie Epidermis- und Wurzelhaarzellen, unterschieden. Die Exsudation ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wozu beispielsweise die Pflanzenart, der Ernährungs- und Entwicklungszustand der Pflanze, das Pflanzenwachstum, aber auch die Bodenbeschaffenheit, Temperatur, der pH-Wert, der Wassergehalt, der Einsatz von Dünger, Herbiziden und Pestiziden gezählt werden (Brimecombe *et al.*, 2007). Wurzelexsudate bieten eine äußerst wichtige Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroorganismen. Aufgrund des reichhaltigen Nährstoffangebots im Wurzelbereich kommt es zu einer starken mikrobiellen Abundanz und Aktivität, was als Rhizosphäreneffekt bezeichnet wird (Whipps, 1990).

Mikroorganismen, die in der Rhizosphäre leben, erfüllen wichtige ökologische Funktionen. So sind sie zum Beispiel maßgeblich an den Nährstoffzyklen beteiligt und üben einen Einfluss auf das pflanzliche Wachstum und die Pflanzengesundheit aus. In

der Rhizosphäre finden vielfältige Interaktionen sowohl zwischen den Mikroorganismen als auch mit der Pflanze, mit phytopathogenen Organismen und Fraßfeinden statt.

1.2 Mikroorganismen-Pflanzen-Interaktionen in der Rhizosphäre

Die Wechselwirkungen zwischen wurzelbesiedelnden Mikroorganismen und der Pflanze sind sehr mannigfaltig und komplex (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Sie können eine nützliche, neutrale oder auch eine pathogene Wirkung auf die Pflanze zur Folge haben, was von den jeweiligen kolonisierenden Mikroorganismen, der betreffenden Pflanze und den vorherrschenden Umweltbedingungen abhängt (Whipps, 2001; Brimecombe *et al.*, 2007).

Bakterielle Interaktionen, welche das Pflanzenwachstum fördern, können hauptsächlich in drei Gruppen eingeteilt werden. Zunächst gibt es eine Reihe von Rhizosphärenbakterien, die das Nährstoffangebot für die Pflanze verbessern. Dazu gehören beispielsweise die in Symbiose mit Leguminosen vorkommenden stickstofffixierenden *Rhizobium*-, *Sinorhizobium*-, *Mesorhizobium*-, *Bradyrhizobium*-, *Ensifer*-, *Azorhizobium*- und *Allorhizobium*-Arten oder die mit Wurzeln assoziiert frei lebenden diazotrophen Bakterien der Gattungen *Azospirillum* (Hartmann, 1988; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), *Herbaspirillum* (Olivares *et al.*, 1996), *Gluconacetobacter* (James *et al.*, 1994) und *Azoarcus* (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993).

Weitere Rhizosphärenbakterien können das Pflanzenwachstum indirekt stimulieren, indem sie die Aktivität von bodenbürtigen phytopathogenen Organismen hemmen bzw. kontrollieren. Diese zur so genannten Biokontrolle befähigten Organismen sind in der Lage, Krankheitserreger infolge von Konkurrenz um vorhandene Nährstoffe und Lebensraum zu verdrängen, antifungisch sowie antimikrobiell wirksame Substanzen zu produzieren, die systemische Resistenz in der Pflanze zu erhöhen und folglich pflanzeigene Abwehrmechanismen zur Unterdrückung von phytopathogenen Mikroorganismen zu aktivieren (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Lugtenberg & Leveau, 2007). Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Haas & Defago, 2005) und auch *Bacillus* (Emmert & Handelsman, 1999) spielen eine wesentliche Rolle im

Rahmen der Biokontrolle besonders auch im Hinblick auf die praktische Anwendung zur Gesunderhaltung von Nutzpflanzen.

Über die Bildung von Phytohormonen steigern Rhizosphärenorganismen auf direktem Wege die pflanzliche Produktivität. So werden zum Beispiel Cytokinine, Gibberelline und vor allem Indol-3-Essigsäure von *Azospirillum brasilense* produziert (Reynders & Vlassak, 1979; Tien *et al.*, 1979; Hartmann *et al.*, 1983), wodurch die Morphologie der Wurzel verändert und die Wurzeloberfläche vergrößert wird, was schließlich zu einer verbesserten Nährstoff- und Wasseraufnahme (Okon & Kapulnik, 1986) und im Ergebnis zu Ertragssteigerungen führt (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001). Alle diese wurzelbesiedelnden Bakterien, die sich förderlich auf das Pflanzenwachstum und den Ertrag auswirken, werden auch „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR) genannt (Kloepper *et al.*, 1989). Sie finden im Bereich der Biodüngung, Biokontrolle und Phytostimulierung Anwendung (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

1.3 Mikrobielle Kolonisierung der Rhizosphäre

Kolonisierende Mikroorganismen können in direkter Verbindung mit der Wurzel, als freie Organismen in der Rhizosphäre oder als Endophyten vorkommen (Lugtenberg *et al.*, 2001). Die endophytische Besiedlung ist vor allem bedeutsam, da Nährstoffe effizienter ohne Vorhandensein vieler konkurrierender Rhizosphärenorganismen genutzt werden können (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006; Schulz *et al.*, 2006). Immer wieder wird die Bedeutung und Notwendigkeit einer erfolgreichen, effizienten Besiedlung der Wurzel gerade für die praktische Verwendung von PGPR in der Landwirtschaft aufgezeigt (Benizri *et al.*, 2001; Bloemberg & Lugtenberg, 2001). So konnten zum Beispiel Chin-A-Woeng *et al.* (2000) in einer Studie mit Kolonisierungsmutanten von *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 beweisen, dass die erfolgreiche Kolonisierung essentiell für die Biokontrollfähigkeit ist.

Die Kolonisierung des Wurzelraumes umfasst mehrere Phasen. Dazu gehören die Bewegung der Mikroorganismen zur Wurzeloberfläche, das Anheften an die Wurzel oder das Eindringen ins Wurzelinnere bei Endophyten und Pathogenen und schließlich die

Vermehrung der besiedelnden Organismen sowie die Ausbildung der Interaktionen mit der Pflanze (Brimecombe *et al.*, 2007). Wurzelassoziierte Bakterien entwickelten eine Vielzahl von Eigenschaften und besitzen spezifische Gene, deren Expression ihnen diese Schritte ermöglichen. In diesem Zusammenhang werden unter anderem Motilität, das Vorhandensein von Flagellen und Pili, Chemotaxis in Richtung der Wurzelexsudate, die Produktion von spezifischen Zelloberflächenbestandteilen (Exo- und Lipopolysaccharide), die Fähigkeit zur Selbstsynthese von Vitaminen und Aminosäuren, Proteinsekretionen, die Bildung von Siderophoren, die Antibiotika-Produktion und das Phänomen „Quorum Sensing“ genannt (Lugtenberg *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2008b).

Bei Besiedlungsstudien werden Bakterien in der Rhizosphäre oft in Mikrokolonien angeordnet gefunden (Schloter *et al.*, 1997; Bloemberg *et al.*, 2000; Cassidy *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2000). Die Bildung von Mikrokolonien ist besonders für das Quorum Sensing interessant. Darunter versteht man die Fähigkeit von Bakterien mit Hilfe kleiner Signalmoleküle zelldichteabhängig zu kommunizieren, Genexpressionen zu regulieren und schließlich ihre Aktivitäten, wie zum Beispiel die Biofilmbildung oder die Produktion von Antibiotika, zu koordinieren (Gantner *et al.*, 2006). Gram-negative Bakterien verwenden unter anderem Signalmoleküle des *N*-Acyl-Homoserin-Lacton-Typs (AHL). Schuhegger *et al.* (2006) fanden heraus, dass die AHL-Produktion in der Rhizosphäre der Tomate zur Erhöhung der systemischen Resistenz in der Pflanze führen kann und diese Moleküle somit eine Rolle hinsichtlich der Biokontrollaktivität von Rhizosphärenbakterien spielen.

1.4 Fluoreszierende Pseudomonaden als potente, konkurrenzfähige und bedeutungsvolle Rhizosphärenbakterien

Bakterien der Gattung *Pseudomonas* wurden in der Vergangenheit besonders intensiv hinsichtlich Wurzelbesiedlung und PGPR-Effekt untersucht (Lugtenberg *et al.*, 2001). Dabei erwiesen sich eine Reihe von Pseudomonaden als sehr wirksame Rhizosphärenbakterien. Vertreter dieser Gattung sind stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien, die phylogenetisch der Hauptentwicklungslinie der γ -*Proteobacteria* zugeordnet werden. Sie zeichnen sich durch eine enorme metabolische Vielseitigkeit, die überwiegend aerobe Lebensweise und die Motilität aufgrund vorhandener polarer Flagellen aus. Fluoreszierende Pseudomonaden produzieren ein extrazellulär diffusionsfähiges, fluoreszierendes Pigment, bekannt als Pyoverdin oder auch Pseudobactin, welches eine hohe Affinität gegenüber Eisen-(III)-Ionen besitzt und so als Siderophor fungiert. Zu dieser großen und diversen Gruppe gehören unter anderem die Arten *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida*.

Während der Wurzelbesiedlung produzieren fluoreszierende Pseudomonaden eine Vielzahl entwicklungshemmender Verbindungen und Metabolite, wobei Siderophore und Sekundärmetabolite mit antifungischer und antimikrobieller Wirkung die Hauptrolle bei der Unterdrückung bodenbürtiger Krankheitserreger spielen (Dowling & O'Gara, 1994; Thomashow, 1996; Haas & Defago, 2005). Aus diesem Grund waren diese nützlichen Rhizosphärenbakterien in den letzten Jahrzehnten von besonders großem wissenschaftlichem Interesse und sind heute bedeutungsvoll für die Applikation im Rahmen des biologischen Pflanzenschutzes in der Landwirtschaft.

Im Hinblick auf die Biokontrollaktivität nennen Haas & Defago (2005) die Antibiose, die Induktion systemischer Resistenz und die Ausbildung spezifischer Pathogen-Antagonist-Interaktionen als die drei hauptsächlichen Wirkungsweisen fluoreszierender Pseudomonaden (Abbildung 1.1).

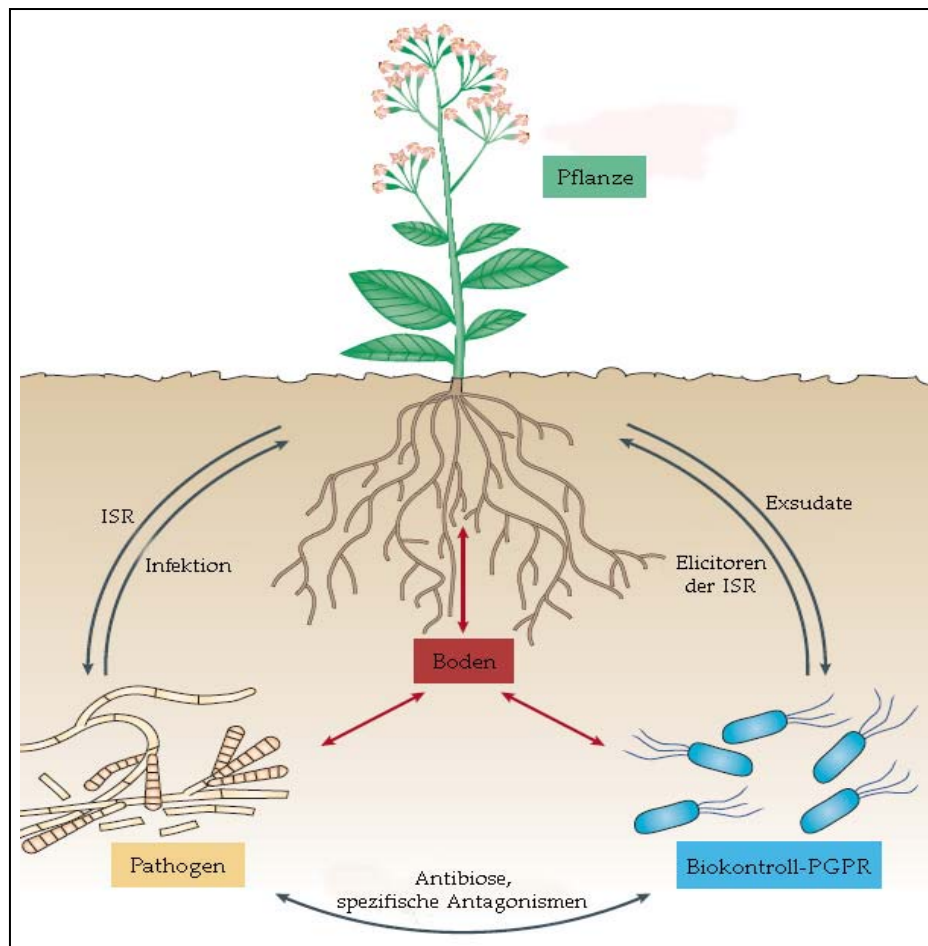


Abb. 1.1: Interaktionen zwischen Biokontroll-„Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR), Pathogenen, der Pflanze und dem Boden.

ISR: induzierte systemische Resistenz
(Haas & Defago, 2005)

Siderophore werden von vielen Mikroorganismen unter Eisenmangelbedingungen gebildet (Neilands, 1995). Pseudomonaden produzieren eine Reihe von Eisen-Chelatoren, zu denen Salicylsäure, Pyochelin und fluoreszierende Pseudobactine sowie Pyoverdine gehören (Dowling & O’Gara, 1994). Fluoreszierende Siderophore, einzigartig bei *Pseudomonas*, wurden ursprünglich aus dem Boden isoliert (Powell *et al.*, 1980). Es wird angenommen, dass Siderophore den in der Rhizosphäre vorkommenden phytopathogenen Mikroorganismen Eisen entziehen (Schroth & Hancock, 1982).

Die meisten zur Biokontrolle befähigten Stämme unter den fluoreszierenden Pseudomonaden produzieren eine oder auch mehrere antibiotisch wirksame Verbindungen, welche hauptsächlich in sechs verschiedene Klassen eingeteilt werden: Phenazine, Phloroglucinole, Pyoluteorin, Pyrrolnitrin, zyklische Lipopeptide und Hydrogencyanid (Haas & Defago, 2005).

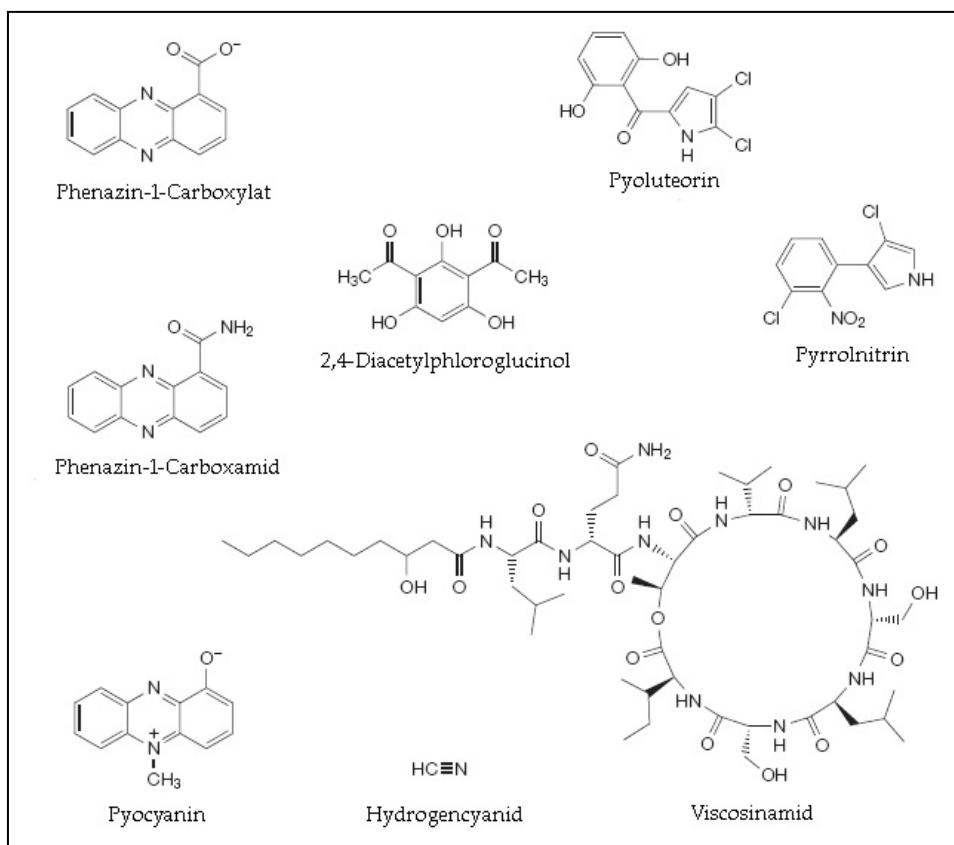


Abb. 1.2: Von fluoreszierenden Pseudomonaden produzierte, für die Biokontrollaktivität relevante, antibiotisch wirksame Verbindungen. Phenazine, Phloroglucinole, Pyoluteorin, Pyrrolnitrin und zyklische Lipopeptide sind diffusionsfähig, Hydrogencyanid ist eine flüchtige Verbindung. (Haas & Defago, 2005)

Mit Hilfe dieser Antibiotika können beispielsweise phytopathogene Pilze, wie *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Erreger der Schwarzbeinigkeit im Getreide, Mais und zahlreichen Gräserarten), *Fusarium oxysporum* (Fusarium-Welke im Getreide), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltötterkrankheit bei Kartoffeln, späte Rübenfäule bei der Zuckerrübe) und *Pythium ultimum* (verschiedene Symptome bei mehreren Nutzpflanzen), unterdrückt werden.

Neben der Biokontrollaktivität können fluoreszierende Pseudomonaden auch Phytohormone, wie Salicylsäure und Indol-3-Essigsäure, produzieren. Nach Raskin (1992) wird Salicylsäure als Pflanzenhormon angesehen und ist an der Induktion der systemisch erworbenen Resistenz („systemic acquired resistance“, SAR) bei Pflanzen beteiligt (Dowling & O’Gara, 1994). Indol-3-Essigsäure wird von vielen Stämmen, die Biokontrolleigenschaften zeigen, produziert, wobei dieses Hormon die Wurzelentwicklung und schließlich das Pflanzenwachstum stimuliert.

1.5 Biologischer Pflanzenschutz mit Hilfe von „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ (PGPR) in der Landwirtschaft

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umwelt einer Vielzahl abiotischer und biotischer Einflussfaktoren ausgesetzt, wozu sowohl Temperatur, Licht, Feuchtigkeit, landwirtschaftliche Bearbeitung, Schadstoffe aus Industrie und Haushalt als auch Bakterien, Pilze, Viren, Protozoen, Nematoden, Insekten, Tiere und der Mensch gehören. Kulturpflanzen müssen jedoch vor schädigenden Einwirkungen geschützt werden, um die zentralen Ziele der heutigen Landwirtschaft, Realisierung stabiler und hoher Erträge, Vermeidung von Leistungsminderungen und Sicherung der Nahrungsmittelqualität, zu erreichen. In keinem Anbaugebiet könnten die heute erwarteten Erträge ohne Pflanzenschutzmaßnahmen gewährleistet werden. Lange Zeit wurden ausschließlich physikalische und chemische Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten angewendet. Besonders bei der Bewertung des chemischen Pflanzenschutzes rückten aber immer mehr die ökotoxikologischen Risiken in den Vordergrund und das Umweltbewusstsein in der Bevölkerung stieg. Dies führte zu neuen Wegen im Pflanzenschutz, wobei schließlich biologische Maßnahmen wesentliche Berücksichtigung fanden. Hier erlangte der Einsatz von PGPR eine wichtige Bedeutung, da diese Rhizosphärenbakterien einen starken Einfluss auf die Gesunderhaltung von Nutzpflanzen ausüben können (Lugtenberg *et al.*, 2001).

Die ersten Inokulationen mit nützlichen Bakterien liegen bereits mehr als 100 Jahre zurück. So wussten Landwirte aufgrund ihrer Erfahrungen zum Beispiel, dass wenn sie Boden, in dem zuvor Leguminosen wuchsen, mit anderem Boden mischten, sich die Erträge beim darauf folgenden Anbau oftmals erhöhten (Bashan, 1998). Zum Ende des 19. Jahrhunderts beschäftigten sich Friedrich Nobbe und Lorenz Hiltner mit der symbiontischen Interaktion von Leguminosen mit Knöllchenbakterien und entwickelten das erste Bakterienpräparat mit dem Namen „Nitragin“ für die Inokulation von Pflanzen (Hartmann *et al.*, 2008a).

Eine intensive Suche nach pflanzenwachstumsfördernden Bakterien und nutzbaren mikrobiellen Antagonisten von phytopathogenen Mikroorganismen erfolgte seit Mitte der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts. Dabei zählen die Untersuchungen mit *Azospirillum* (Baldani *et al.*, 1986; Okon & Kapulnik, 1986) und mit *Pseudomonas fluorescens* oder *Pseudomonas putida* (Schroth & Hancock, 1982; Voisard *et al.*, 1989) als Meilensteine. Bereits 1983 wurde der von Broadbent *et al.* (1971) isolierte *Bacillus subtilis*-Stamm A13 als kommerzielles Produkt unter dem Namen „Quantum-4000“ zugelassen. Inzwischen gibt es weltweit mehrere kommerziell erhältliche biologische Pflanzenschutzmittel, die zum Beispiel *Bacillus subtilis*-Stämme („Kodiak“, „Subtilex“ oder „Serenade“), *Bacillus pumilus* („YieldShield“), *Bacillus licheniformis* („EcoGuard“), *Azospirillum lipoferum* („Azogreen“) und *Pseudomonas fluorescens*-, *Pseudomonas putida*- sowie *Pseudomonas chlororaphis*-Stämme („Cerall“, „Cedomon“) enthalten. Seit 1997 erfolgt die Präparation von Pflanzenstärkungsmitteln auf mikrobieller Basis auch in Deutschland. Hier werden beispielsweise „FZB24“ (*Bacillus amyloliquefaciens*) und „Proradix“ (*Pseudomonas fluorescens*) für den Einsatz in der Landwirtschaft angeboten.

1.6 Proradix® als biologisches Pflanzenstärkungsmittel

Pflanzenstärkungsmittel sind gemäß § 2 Nr. 10 des deutschen Pflanzenschutzgesetzes (Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen) Produkte, die ausschließlich dazu bestimmt sind, die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Schadorganismen zu erhöhen sowie

Pflanzen vor nichtparasitären Beeinträchtigungen zu schützen. Proradix® ist eines der zugelassenen Pflanzenstärkungsmittel und enthält einen natürlich vorkommenden *Pseudomonas fluorescens*-Stamm als biologisch aktive Komponente. Laut Hersteller (Sourcon-Padena GmbH & Co. KG) besiedelt dieser *Pseudomonas fluorescens*-Stamm nach Aussaat des behandelten Saatgutes die Oberfläche der Pflanzenwurzeln und vermehrt sich dort. Die Wirkung soll sich über die Aktivierung pflanzeigener Abwehrmechanismen, über wachstumsfördernde Effekte aufgrund vermehrter Wurzelbildung und Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum entfalten. Proradix® soll die Pflanze vor qualitätsminderndem Befall durch bodenbürtige Schadpilze, wie *Pythium* sp. und *Rhizoctonia solani*, schützen. Der Hersteller empfiehlt die Anwendung von Proradix® als Saatgutbeizung (Vakuuminfiltration), Tauchbehandlung, Gießbehandlung oder im Sprühverfahren für Kartoffeln, Gemüse (Mohrrübe, Feldsalat, Rettich, Spargel, Sellerie), Gründüngungssaaten, Sportrasen, Zierpflanzen (Blumenkulturen), Baumschulen, Tabak sowie Gewürz- und Arzneipflanzen.

Details zur Besiedlung und Wirkungsweise des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes sind größtenteils nicht bekannt. Insbesondere die pflanzenwachstumsfördernde Wirkung auf Gerste ist nicht untersucht.

1.7 Methoden der mikrobiellen Ökologie

Um einen möglichst umfassenden Einblick in die Abundanz, die Dynamik, die Aktivität und die Diversität mikrobieller Gemeinschaften in ihren natürlichen Habitaten zu erhalten, werden in der mikrobiellen Ökologie klassische Kultivierungstechniken und kultivierungsunabhängige Methoden miteinander kombiniert (Liesack *et al.*, 1997; van Veen *et al.*, 2007). Die üblichen Kultivierungsansätze beruhen auf der Anreicherung von Mikroorganismen unter Verwendung spezieller Nährmedien sowie der Isolierung von Reinkulturen. Dazu gehören beispielsweise die von Garland & Mills (1991) entwickelte Methode zur Charakterisierung heterotropher mikrobieller Populationen auf Grundlage der Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen mit Hilfe des BIOLOG-Systems

(BIOLOG, Inc., Hayward, CA, USA) oder die Quantifizierung der Koloniebildung auf Agarplatten, wobei zwischen so genannten r- und K-Strategen (schnell wachsende Opportunisten und langsam wachsende Spezialisten) unterschieden wird (De Leij *et al.*, 1993).

Die Simulation der natürlichen Lebensbedingungen der Organismen im Labor und auch die Auswahl der relevanten Proben sind jedoch mit Schwierigkeiten verbunden und so wachsen meist weniger als 1% der mikroskopisch detektierbaren Zellen unter Laborbedingungen an (Amann *et al.*, 1995). Durch Optimierung von Kulturbedingungen können jedoch stets neue bakterielle Arten und Gattungen isoliert werden (Koch *et al.*, 2008a; Zul *et al.*, 2008). Dennoch ist die Diversität bakterieller Gemeinschaften in natürlichen Systemen größtenteils noch nicht bekannt.

In den letzten zwei Jahrzehnten brachte aber die Entwicklung molekularbiologischer Techniken revolutionierende Fortschritte in der Mikrobiologie und ermöglichte die Analyse mikrobieller Gemeinschaften unabhängig von deren Kultivierung (Olsen *et al.*, 1986). Dabei kommt den ribosomalen RNS Genen der Bakterien (16S-rRNS und 23S-rRNS) als universelle molekulare Marker für phylogenetische Studien eine wesentliche Bedeutung zu (Olsen *et al.*, 1986). So ermöglicht die Entwicklung von 16S-rRNS gerichteten, fluoreszenzmarkierten, phylogenetischen Oligonukleotidsonden und die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in Kombination mit der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie die Identifizierung von Bakterien direkt in ihrem natürlichen Habitat (Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2003). Darüber hinaus erweist sich die Markierung von Organismen mit Reportergenen, wie grün oder rot fluoreszierende Proteine (GFP, RFP), als alternative, sehr effiziente Methode der *in situ* Detektion. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), verschiedener Klonierungs- und moderner Sequenzierungstechniken können hoch komplexe Gemeinschaften untersucht werden. Um Aussagen zur Abundanz und zur Diversität spezifischer mikrobieller Gruppen in einem Habitat treffen zu können, werden so genannte „Fingerprinting-Methoden“, wie die Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse, die Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) oder die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE), eingesetzt, welche die Diversität der 16S-rDNS wiedergeben.

Die Bedeutung all dieser kultivierungsunabhängigen Techniken ist immens. Während bis vor 20 Jahren 12 Phyla innerhalb der Domäne *Bacteria* bekannt waren, umfasst diese heute mehr als 50 verschiedene Divisionen, von denen viele ausschließlich Sequenzen bisher nicht kultivierter Organismen enthalten (Hugenholtz *et al.*, 1998; Keller & Zengler, 2004).

1.8 Zielstellung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das biologische Pflanzenstärkungsmittel Proradix® in verschiedenen Experimenten sowohl im Labor als auch im Gewächshaus und im Freiland eingesetzt und deren Wirkung auf Gerste (Sorte Barke) untersucht werden. Dabei sollte der PGPR-Effekt in verschiedenen Topfexperimenten unter Verwendung von landwirtschaftlich genutztem Ackerboden und zwei weiteren unterschiedlichen Kultursubstraten im Gewächshaus überprüft werden. Im Rahmen von Parzellenversuchen auf verschiedenen Schlägen zweier Versuchsgüter in der Nähe Münchens sollten die nach Applikation von Proradix® erzielten Erträge im Vergleich zu den Kontrollparzellen ermittelt werden.

Außerdem sollte die Kolonisierung von Gerstenwurzeln durch den im Proradix® enthaltenen pflanzenwachstumsstimulierenden *Pseudomonas fluorescens*-Stamm mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der GFP-Markierung als Methoden der molekularen mikrobiellen Ökologie verfolgt werden. Zur Lokalisierung der Bakterienzellen auf und in der Wurzel sollte die konfokale Laserscanning-Mikroskopie verwendet werden.

Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden, ob der Einsatz von Proradix® möglicherweise die bestehende bakterielle Rhizosphärengemeinschaft beeinflusst. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollten Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analysen durchgeführt und Klonbanken erstellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von Lösungen und Nährmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen wurden mit entsalztem und filtriertem Wasser (im Folgenden $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$) aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q PLUS, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) hergestellt. Für Nährmedien wurde einfach entionisiertes Wasser (im Folgenden $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$) verwendet. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und VWR (Ismaning, Deutschland) bezogen. Die Sterilisation sämtlicher Lösungen und Medien erfolgte in Wasserdampfhochdruckautoklaven (Systec D65 und Systec V65, Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland) bei 121°C und einem Überdruck von $1,013 \times 10^5$ Pa für 20 min. Hitzelabile Substanzen hingegen wurden steril filtriert (Sterilfilter $0,22 \mu\text{m}$ Porengröße, Millipore GmbH) und schließlich den autoklavierten, auf etwa 45°C abgekühlten Lösungen unter sterilen Bedingungen zugegeben. Alle pH-Werte wurden mit NaOH- oder HCl-Lösungen entsprechender Normalitäten eingestellt (pH-Meter, pH 523, WTW, Weilheim, Deutschland).

2.2 Kultivierung von Mikroorganismen

2.2.1 Verwendete Mikroorganismen

In der Tabelle 2.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Pilzisolat zusammengefasst:

Tab. 2.1: Verwendete Mikroorganismen

Organismus	Isolat	Referenz
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	-	Angela Sessitsch, ULB Biotechnologie ¹
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	-	Tatiana Binder, Abt. Mikroben-Pflanzen Interaktionen ² (isoliert aus Mutaflor, Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland)
Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	-	Sourcon-Padena GmbH & Co. KG, Tübingen, Deutschland
Proradix® (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) Plasmid pJBA28, GFP-markiert	-	Uta von Rad, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie ²
<i>Fusarium coeruleum</i>	421	Marion Wenig, Institut für Biochemische Pflanzenpathologie ²
<i>Fusarium culmorum</i>	-	Alexandra Hagn, Institut für Bodenökologie, Abt. Terrestrische Ökogenetik ²
<i>Fusarium graminearum</i>	L1P2 11 cß	Alexandra Hagn
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	DSMZ 2018 ³
<i>Fusarium solani</i>	346	Marion Wenig
<i>Gaeumannomyces graminis</i> Ggt 13	-	Karin Schreiner, Institut für Bodenökologie, Abt. Terrestrische Ökogenetik ²
<i>Pythium ultimum</i> Witzchenhausen	-	Alexandra Hagn
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	422	Marion Wenig
<i>Rhizoctonia solani</i>	329	Marion Wenig
<i>Rhizoctonia solani</i>	352	Marion Wenig

¹ Austrian Research Centers GmbH (ARC), Seibersdorf, Österreich² Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Deutschland³ DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.2.2 Nährmedien

Folgende Nährmedien wurden zur Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen hergestellt:

King's B Medium (King <i>et al.</i> , 1954)	Bacto™ Proteose Pepton Nr. 3 ¹	20 g
	K ₂ HPO ₄	1,5 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5 g
	Glycerol	10 ml
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,2	¹ Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
LB (Luria-Bertani)-Medium (modifiziert nach Bertani (1951))	Trypton (Caseinhydrolysat)	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,0	
M9-Minimalmedium 1.) M9-Salze: Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (modifiziert nach Sambrook <i>et al.</i> (1989))		7,5 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	0,5 g
	NH ₄ Cl	1 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	2.) Glukose-Lösung (40% [w/v])	1 ml
ad M9-Salzlösung	100 ml	

Die Glukose-Lösung wurde zunächst steril filtriert (Sterilfilter 0,22 µm Porengröße, Millipore GmbH) und der M9-Salzlösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

MS (Murashige&Skoog)-Medium (Murashige & Skoog, 1962)	MS-Fertigmedium	4,3 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,2	
NB (Nutrient Broth)-Medium	Pepton	5 g
	Fleischextrakt	3 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,0	
Potato-Dextrose-Agar (PDA) (Fluka, Buchs, Schweiz)	Kartoffelextrakt	4 g
	Dextrose	20 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,0	

Zur Verfestigung der Medien wurde den Nährlösungen vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Bernd Euler Biotechnologie Mikrobiologie, Frankfurt am Main, Deutschland) zugegeben.

2.2.3 Bakterienanzucht und Stammhaltung

Die Bakterienanzucht erfolgte bei 30 bzw. 37°C für 24 oder 48 Stunden auf festen Nährböden in Petrischalen in entsprechenden Inkubatoren (Innova 4200, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA und Memmert, Schwabach, Deutschland). Übernachtkulturen wurden in Reagenzgläsern mit einer definierten Menge Flüssigmedium auf Rundschüttlern (Innova 4200, New Brunswick Scientific und Kompaktschüttler KS 15 mit Inkubationshaube TH 15, Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen, Deutschland) bei 175 rpm angezogen. Auf festen Nährmedien kultivierte Mikroorganismen wurden bei 4°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden Einzelkolonien mit Hilfe einer abgeflamten Impföse oder sterilen Zahnstochern unter sterilen Bedingungen auf frische Nährböden überimpft.

Zur längerfristigen Stammhaltung wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurde jeder Stamm ausgehend von einer Einzelkolonie in einer Übernachtskultur mit 4 ml des entsprechenden Mediums angezogen. Nach Zentrifugation (Sigma 1-15 Tischzentrifuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) bei 11000 rpm für 1 min wurden die Zellen in 1,8 ml steriler 1 x PBS-Glycerin-Lösung (4:1) resuspendiert. Diese Zelllösung wurde schließlich in Kryoröhrchen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt und bei -80°C gelagert. Glycerin wird neben DMSO zum Einfrieren von Zellen verwendet, da es die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindert und dadurch eine Schädigung der Zellen weitgehend unterbunden wird.

Zur Wiederanzucht der Stämme wurden bei -80°C gelagerte Zellen mittels einer sterilen 1 ml Pipette oder einer abgeflammtten Impföse auf dem jeweiligen Nährmedium ausgestrichen, bei der entsprechenden Wachstumstemperatur inkubiert und anschließend vereinzelt.

Lösungen

10 x PBS	NaH ₂ PO ₄ (100 mM)	12 g
	Na ₂ HPO ₄ (100 mM)	14,2 g
	NaCl (1,3 M)	76 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,2-7,4	
1 x PBS	10 x PBS	100 ml
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml

2.2.4 Antibiotika

Für die Kultivierung des GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes und plasmidhaltiger *E. coli*-Stämme unter Selektionsdruck wurde Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Als Lösungsmittel für Kanamycin wurde

H₂O_{reinst} verwendet. Eine 1000-fach konzentrierte Stammlösung wurde hergestellt, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Flüssigmedien wurden direkt vor der Inokulation mit Kanamycin versetzt. Festen Nährmedien wurde das Antibiotikum nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von etwa 45°C zugegeben. Mit Kanamycin versehene Festmedien wurden bei 4°C maximal 2 Monate aufbewahrt und verwendet.

2.3 Isolierung der aktiven biologischen Komponente aus dem Proradix[®]-Originalpräparat und Bestimmung von Parametern mit Bedeutung hinsichtlich des PGPR-Effekts

2.3.1 Keimzahlbestimmung und Isolierung des Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes

Zur Bestimmung der Anzahl der Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Bakterien (CFU) im Proradix[®]-Originalpräparat wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Dazu wurde zunächst 0,1 g Proradix[®]-Pulver in a) 1 ml 1 x PBS und b) 1 ml 10 mM Magnesiumsulfat-Lösung (0,25 g MgSO₄, ad H₂O_{dem.} 100 ml, pH 7,2) gelöst. Diese zwei Ausgangslösungen wurden 25 min bei 200 rpm geschüttelt, so dass homogene Suspensionen vorlagen. Die Verdünnungen erfolgten anschließend bis zu einer Stufe von 10⁻⁸. Von den Verdünnungsstufen 10⁻⁶ bis 10⁻⁸ wurden in fünffacher Wiederholung jeweils 100 µl auf King's B Medium ausplattiert und bei 30°C 24 Stunden inkubiert.

Innerhalb dieser Verdünnungsreihen wurde der Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm aus dem Proradix[®]-Originalpräparat isoliert und stand somit für Folgeexperimente zur Verfügung.

2.3.2 Nachweis der Siderophorenproduktion

Siderophore sind niedermolekulare Komplexbildner mit einer sehr hohen Affinität für Eisen. Sie werden von Bakterien und Pilzen unter Eisenmangelbedingungen produziert und spielen eine wesentliche Rolle bei der Eisenaufnahme (Neilands, 1995).

Eine universelle und schnelle Methode, um die Bildung von Siderophoren nachzuweisen, ist die Inkubation von Mikroorganismen auf CAS-Indikatorplatten. Dabei dient der ternäre Komplex aus Chromazurol S/Eisen-(III)/Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HDTMA) mit seiner charakteristischen Blaufärbung als Indikator (Schwyn & Neilands, 1987). Wenn Siderophore produziert und in das umgebende Medium abgegeben werden, können sie Eisen-(III)-Ionen aus dem Chromazurol S/HDTMA-Komplex binden. Dadurch erfolgt eine Veränderung der Farbe von blau zu rot/orange.

Der Siderophorennachweis erfolgte nach Schwyn & Neilands (1987). Dazu wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt:

MOPS-Puffer (0,5 M)	Morpholinopropansulfonsäure	10,46 g
	ad H ₂ O _{reinst}	100 ml
	pH 6,8	

MOPS sollte immer steril filtriert, nicht autoklaviert und lichtgeschützt aufbewahrt werden. Nicht mehr verwendbare MOPS-Lösungen sind an ihrer gelben Farbe zu erkennen.

Magnesiumsulfat-Lösung (10% [w/v])	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g
	ad H ₂ O _{reinst}	100 ml

Calciumchlorid-Lösung (1% [w/v])	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1 g
	ad H ₂ O _{reinst}	100 ml

Lösung 1	Chromazurol S	60,5 mg
	ad H ₂ O _{reinst}	50 ml

Lösung 2	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	135 mg
	ad H ₂ O _{reinst}	495 ml
	1 N HCl	5 ml
Lösung 3	HDTMA	72,9 mg
	ad H ₂ O _{reinst}	40 ml

Die Magnesiumsulfat- und die Calciumchlorid-Lösung wurden steril filtriert. Unter ständigem Rühren wurde Lösung 1 (50 ml) mit Lösung 2 (10 ml) versetzt und dies langsam Lösung 3 (40 ml) zugegeben. Diese Farblösung wurde autolaviert.

Die CAS-Indikatorplatten wurden schließlich wie folgt angefertigt:

CAS-Medium	KH ₂ PO ₄	0,3 g
	K ₂ HPO ₄	0,2 g
	Fruktose	2 g
	Glukose	2 g
	NH ₄ Cl	0,5 g
	NaCl	0,1 g
	ad H ₂ O _{dem.}	800 ml
	pH 6,8	

Zur Verfestigung wurde vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurden unter sterilen Bedingungen die weiteren Bestandteile zugefügt:

MOPS-Puffer (0,5 M)	100 ml
Farblösung	100 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (10% [w/v])	2 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1% [w/v])	2 ml

Chromazurol S/HDTMA-Indikatorplatten wurden mit sterilen Zahnstochern mit dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm beimpft und bei 30°C für 48 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurde *Escherichia coli* Nissle 1917 verwendet.

2.3.3 Nachweis der Produktion von Indol-3-Essigsäure (IES)

Zur Überprüfung einer möglichen IES-Produktion wurde der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm in M9-Minimalmedium unter Zugabe von Tryptophan (0,05%) in Schikanekolben bei 30°C über Nacht angezogen. Diese Übernachtskultur wurde steril filtriert und bis zur IES-Messung einige Tage bei -20°C gelagert. Im Institut für Ökologische Chemie (Helmholtz Zentrum München) erfolgte die Quantifizierung von Indol-3-Essigsäure mit Hilfe eines Waters ACQUITY-UltraPerformance-LiquidChromatography-Trennsystems (UPLC; Waters GmbH, Darmstadt, Deutschland), welches mit einem 2996 Photodiodearray (PDA)-Detektor ausgerüstet war. Die Umkehrphasenseparation wurde mit einer HSS C₁₈ Säulenpackung mit 1,7 µm Partikeldurchmesser und Säulengrößen von 100 x 2,1 mm (Waters GmbH, Darmstadt, Deutschland) ausgeführt. Der Thermostat der Säule war auf 60°C und der Autosampler auf 27°C eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und die Durchflussrate 0,8 ml/min mit einem Druck von 750 bar. Als mobile Phase A wurde 0,1% wässrige Ameisensäure und als mobile Phase B 0,06% Ameisensäure in Acetonitril verwendet. Ein Lösungsmittelgradient wurde von 20% bis 100% mobile Phase B innerhalb einer Minute benutzt. Zur Detektion wurde die Wellenlänge auf 222 nm mit einer Abtastrate von 40 Hz gestellt. Die Retentionszeit von Indol-3-Essigsäure war 0,800 min mit einem Zeitfenster von 0,001 min. Die Integration der Peak-Flächen erfolgte mit Hilfe der Chromatographiedatensoftware Empower 2 (Waters GmbH, Darmstadt, Deutschland) und zur Quantifizierung wurde die Drei-Punkt-Kalibrierung angewendet. Der Regressionskoeffizient der Kalibrierkurve war 0,986.

2.3.4 Nachweis der 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase Aktivität

Bodenmikroorganismen, die das Enzym 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase synthetisieren, können das Pflanzenwachstum fördern, indem sie das von Pflanzen produzierte ACC, als Vorstufe von Ethylen, aufnehmen und verwerten. Infolgedessen wird der Ethylen-Gehalt in der Pflanze vermindert, da die Ethylenbiosynthese von der ACC-Bildung in der Regel limitiert wird. Die wachstumshemmende Wirkung von zu hohen Ethylenkonzentrationen wird dadurch aufgehoben und die Pflanze wird so durch umweltbedingte Stresseinflüsse, welche zur Erhöhung von Ethylen führen, weniger beeinträchtigt (Glick, 2005).

Für den Nachweis der ACC-Deaminase Aktivität wurde ein Minimalmedium nach Brown & Dilworth (1975) verwendet. Dieses Medium wurde in einzelnen Komponenten hergestellt. Alle Lösungen wurden steril filtriert und nicht autoklaviert, um eine mögliche Kontamination mit Ammoniak als weitere Stickstoffquelle während des Autoklaviervorgangs zu vermeiden.

Lösungen

Lösung 1 (100 x)	KH_2PO_4	10,8 g
	K_2HPO_4	42 g
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	300 ml
Lösung 2 (100 x)	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	7,5 g
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,6 g
	NaCl	6 g
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	300 ml
Lösung 3 (1000 x)	$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	1,1 g
	EDTA	0,015 g
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$	100 ml

Lösung 4	Thiamin HCl	0,1 g
	Ca-Pantothenat	0,2 g
	Biotin (10 mg/100 ml)	20 ml
	ad H ₂ O _{reinst}	100 ml
Glukose-Lösung (10% [w/v])	Glukose	5 g
	ad H ₂ O _{reinst}	50 ml
Ammoniumchlorid-Lösung (1000 x)	NH ₄ Cl	1 g
	ad H ₂ O _{reinst}	10 ml
ACC-Lösung (1000 x)	ACC	1 g
	ad H ₂ O _{reinst}	10 ml
Grundmedium	Agarose	12 g
	ad H ₂ O _{dem.} (steril filtriert)	950 ml

Das Grundmedium wurde 20 min in der Mikrowelle gekocht und anschließend mit den jeweiligen Lösungen versetzt:

Lösung 1	10 ml
Lösung 2	10 ml
Lösung 3	1 ml
Lösung 4	1 ml
Glukose-Lösung	20 ml

Danach wurde das daraus resultierende Medium gut gemischt und in 3 Teile (je 300 ml) aufgeteilt. Das reine Minimalmedium ohne weitere Zusätze diente als Negativkontrolle. Der zweite Teil des Minimalmediums (300 ml) wurde mit 2,1 ml Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und als Positivkontrolle verwendet. ACC-Testplatten wurden durch Zugabe von 2,1 ml ACC-Lösung zu den übrigen 300 ml Minimalmedium erhalten.

Der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm wurde auf allen drei Medien ausgestrichen und bei 30°C für 2 Wochen inkubiert. Auf den Negativkontrollplatten sollte kein Wachstum erfolgen, da keine Stickstoffquelle vorhanden ist. Die Positivkontrollen hingegen sollten ein deutliches Wachstum erkennen lassen. Wenn Bakterien das Enzym ACC-Deaminase bilden, so können sie ACC als Stickstoffquelle nutzen und auf den ACC-Testplatten wachsen. Als Positivkontrollstamm wurde *Burkholderia phytofirmans* eingesetzt.

2.3.5 Dualkulturtests

Zur Überprüfung einer möglichen antifungischen Aktivität des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes wurden so genannte Dualkulturtests durchgeführt. Zunächst wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten bodenbürtigen Schadpilze auf PDA-Medium bei 22°C angezogen. Mit der abgeflammt runden Öffnung einer Pasteurpipette wurden gleich große Agarscheiben aus den entsprechenden mit Pilzmyzel bewachsenen Platten ausgestochen, auf frische PDA- und M9-Agarplatten übertragen und in deren Mitte platziert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes wurden diese Pathogenisolate bei 22°C 1 bis 3 Tage vorkultiviert. Der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm wurde dann ebenfalls auf die Dualkulturtestplatten in gleichmäßigem Abstand zum bereits wachsenden Pilz gebracht. Die Inkubation bei 22°C setzte sich über 4 weitere Tage fort. Jeder Dualkulturtest erfolgte in dreifacher Wiederholung. Zur Kontrolle des pilzlichen Wachstums wurde in je einer Petrischale pro Testreihe nur der Pilz ohne Bakterien inkubiert.

2.4 Anzucht von Pflanzenmaterial

2.4.1 Verwendete Pflanzenart

Innerhalb dieser Arbeit wurde Sommergerste (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) der Sorte Barke (Saatzucht Josef Breun GdB, Herzogenaurach, Deutschland) in Experimenten im Labor, Gewächshaus und im Freiland verwendet.

2.4.2 Applikation von Proradix®

2.4.2.1 Saatgutbeizung bei Gerste

Gerstensaatgut wurde in ausreichender Menge kurz vor Beginn einer Experimentreihe vom Proradix®-Hersteller (Sourcon-Padena GmbH & Co. KG) mittels Vakuuminfiltration mit Proradix® behandelt. Dazu wurden die Samen mit einer Flüssigbeize mit 8×10^{10} CFU/kg Saatgut besprüht. Anschließend wurde ein Vakuum angelegt und die Gerste bei 27°C für vier Stunden rückgetrocknet. Auf diese Weise gebeiztes Saatgut wurde bis zur Aussaat kurzzeitig bei 4°C gelagert.

2.4.2.2 Inokulation von Gerstenkeimlingen mit dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm

Eine Kolonie des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes wurde in 5 ml King's B Medium überimpft und bei 30°C für etwa 10 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 50 ml oder 200 ml Übernachtkultur 1:100 beimpft. Diese über Nacht gewachsene Kultur wurde bei 6000 rpm für 5 min zentrifugiert (Universal 320 R, Hettich Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen zweimal in 10 ml 1 x PBS gewaschen und schließlich in 20 ml 1 x PBS resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der optischen Dichte (OD) in Kunststoffküvetten bei einer Wellenlänge von 436 nm in einem Spektralphotometer (CE3021, Cecil, Cambridge, Großbritannien). Die Bakterienkultur

wurde mit 1 x PBS-Lösung bis zu einer OD_{436nm} von 0,7 bis 0,8 verdünnt, was bei dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm einem durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen ermittelten Wert von etwa 10^8 Zellen pro ml entsprach.

Zwei Tage zuvor wurden unsterile Gerstensamen auf Wasseragarplatten (15 g Agar, ad $H_2O_{dem.}$ 1000 ml) gelegt und bei 30°C ohne Licht inkubiert. Jedes Samenkorn wurde mit 100 μ l H_2O_{reinst} befeuchtet, um das Auskeimen zu begünstigen. Gerstenkeimlinge mit 1 bis 2 cm langen Wurzeln wurden dann in 40 ml der vorbereiteten Zellsuspension mit 10^8 Zellen/ml in Petrischalen bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden parallel Keimlinge in 40 ml 1 x PBS-Lösung inkubiert. Wenn mit dem GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm inokuliert wurde, erfolgte vorher die Überprüfung der grünen Fluoreszenz mit Hilfe der Epifluoreszenz-Mikroskopie (Abschnitt 2.6.1).

2.4.3 Anzucht von Gerste im Labor

2.4.3.1 Gerste im Quarzsandsystem

Zur Anzucht von Gerste im Labor wurde Kristallquarzsand (Sakret®, Sakret Trockenbaustoffe GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) der Korngröße Nr. 5 (\varnothing 1,0 bis 2,5 mm) fünfmal mit $H_2O_{dem.}$ gewaschen und bei 70°C getrocknet. Reagenzgläser (\varnothing 30 mm, Schott Glas, Schott AG, Mainz, Deutschland) wurden mit etwa 70 g trockenem Quarzsand befüllt, mit Alu-Steck-Kappen (schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland) verschlossen und autoklaviert. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe von 10 ml MS-Medium je Reagenzglas. Ein inokulierter Gerstenkeimling (Abschnitt 2.4.2.2) wurde mit einer sterilen Pinzette vorsichtig in jedes Reagenzglas eingesetzt und konnte darin bei Raumtemperatur für maximal 4 Wochen bis zu einer Länge von etwa 30 cm wachsen. Nach einigen Tagen wurde dieses System durch ein zweites steriles Reagenzglas ergänzt, welches auf dem ersten mit der Öffnung nach unten mit Parafilm M® (Alcan Packaging, Neenah, WI, USA) befestigt wurde.

Die Anzucht von Gerstenkeimlingen erfolgte entweder im unsterilen Quarzsandsystem, wenn die Gerstensamen vor der Inokulation nicht sterilisiert bzw. mit Proradix® gebeizte

Samen verwendet wurden, oder in einem keimfreien (axenischen) System, in dem sterile Keimlinge mit einem definierten Bakterienstamm inokuliert wurden.

2.4.3.2 Samensterilisierung

Für die Anzucht im axenischen System mussten die Gerstensamen vor der Inokulation mit dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm einer Oberflächensterilisierung unterzogen werden, um Pilzsporen und bakterielle Kontaminationen abzutöten. Dazu wurden Samen in ausreichender Menge 2 min in 70%-Ethanol geschwenkt. Nach Abgießen des Ethanols wurden die Samen für 15 min in 2%-Natriumhypochlorit-Lösung ([v/v] 14% freies NaOCl, Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland) inkubiert und dann sechsmal mit sterilem H₂O_{dem.} gewaschen. Es folgte eine 30minütige Inkubation der Samen in einer Lösung, die Penicillin (600 mg/l), Streptomycin (250 mg/l) und Cycloheximid (100 mg/l) enthielt. Penicillin sowie Streptomycin wurden zuvor in H₂O_{reinst} und Cycloheximid in Ethanol 1000fach konzentriert gelöst. Anschließend wurden mit einer sterilen Pinzette je 10 Samen auf NB-Agarplatten gelegt und bei 30°C 2 Tage inkubiert. Vor der Inokulation mit dem Bakterienstamm wurden ausgekeimte Samen ohne erkennbare Kontamination mindestens dreimal mit sterilem H₂O_{dem.} gewaschen.

2.4.4 Topfexperimente im Gewächshaus

Im Gewächshaus wurden verschiedene Experimente mit Gerste bei einer Lichtdauer von 12 bis 14 Stunden, 50 bis 70% Luftfeuchte, 16°C am Tag und 12°C in der Nacht durchgeführt. Entsprechend der Außentemperatur kam es zu Temperaturschwankungen. Als Lichtquellen wurden entweder Hochdruck-Natriumdampflampen Philips SON-T AGRO 400 (Philips GmbH, Hamburg, Deutschland) oder Halogen-Metaldampflampen Osram HQI-TS 400 W/D (Osram GmbH, München, Deutschland) mit einer Leistung von jeweils 400 W verwendet.

2.4.4.1 Experimente mit Kultursubstrat

Für Topfexperimente im Gewächshaus wurden zwei verschiedene Kultursubstrate eingesetzt: Kultursubstrat Typ RKS 2 mittel (Ökohum® Tonsubstrat, Ökohum GmbH, Herbertingen, Deutschland) und eine Nullerde (Fruhstorfer Erde®, HAWITA Gruppe GmbH, Vechta, Deutschland).

Tab. 2.2: Herstellerangaben der verwendeten Kultursubstrate in Topfexperimenten im Gewächshaus

Substrat	pH	Salz- gehalt (g/l)	N (mg/l)	P ₂ O ₅ (mg/l)	K ₂ O (mg/l)
Ökohum	5,2-6,2	1,3-2,2	230-430	170-310	280-480
Nullerde	5,9	0,2	20	10	40

Kunststofftöpfe mit einem Volumen von 7 l (d=26 cm) wurden mit einem Gemisch aus dem entsprechenden Substrat und Perlit im Verhältnis 3:1 befüllt. Mit Proradix® gebeizte Gerstensamen (Abschnitt 2.4.2.1) bzw. Samen ohne Behandlung wurden in die Töpfe gesetzt, mit Substrat bedeckt und gewässert. In jedem Topf wuchsen 5 (bzw. 6) Pflanzen in achtfacher (bzw. vierfacher) Wiederholung bis zur vollständigen Kornreife. Die Pflanzen wurden regelmäßig dreimal pro Woche mit einer Mischung aus Leitungswasser und H₂O_{dem.} (1:1) ihrem Entwicklungszustand entsprechend gegossen. Eine Düngung mit Wuxal Top N (Wilhelm Haug GmbH & Co. KG, Ammerbuch-Pfäffingen, Deutschland; NPK 12-4-6, N-Anteil: 141,6 g/l) und einer 0,5 M MgSO₄-Lösung erfolgte nach 8 Wochen Wachstum. Dabei wurden 0,25 g Stickstoff pro Topf und 0,025 g Magnesium je Pflanze verabreicht. In Versuchen unter Nährstoffmangelbedingungen wurde insgesamt die Hälfte dieser Nährstoffmengen in 2 Gaben nach 4 und 8 Wochen Wachstum gedüngt.

Nach einer Wachstumsdauer von 18 bis 24 Wochen erfolgte die Ernte. Dazu wurden alle Halme je Topf direkt über der Substratoberfläche abgeschnitten. Ähren wurden von den Halmen abgetrennt, pro Topf ausgezählt und separat gesammelt. Das Pflanzenmaterial wurde bei 45°C getrocknet, anschließend gewogen und das Korn im Versuchsgut der Technischen Universität München in Roggenstein mit Hilfe eines Laborährendreschers (Wintersteiger AG, Ried im Innkreis, Österreich) ausgedroschen. Die Bestimmung des

Tausendkorngewichts (TKG) erfolgte ebenfalls in Roggenstein mit einem Körnerzählgerät Contador „E“ (Pfeuffer GmbH, Kitzingen, Deutschland).

2.4.4.2 Experimente mit Ackerboden

Zur Kultivierung von Gerste im Ackerboden wurde ein lehmiger Boden mit einem pH-Wert von 6,3 vom Schlag A21 des HMGU-Versuchsgutes in Scheyern verwendet. Der Boden wurde gesiebt (<10 mm) und in Töpfe mit einem Volumen von 400 cm³ oder 2,5 l (d=18 cm) gefüllt. In 400 cm³ Töpfen wurden Einzelpflanzen, in 2,5 l Töpfen 3 Pflanzen je Topf für 8 bis 10 Wochen angezogen und zweimal in der Woche nach Bedarf mit H₂O_{dem.} bewässert. Für verschiedene Experimente wurden entweder Proradix® gebeizte Samen (Abschnitt 2.4.2.1) oder inokulierte Gerstenkeimlinge (Abschnitt 2.4.2.2) in den Boden eingesetzt und schließlich mit nicht behandelten Kontrollpflanzen verglichen.

2.4.5 Parzellenversuche im Freiland

In den Jahren 2006 und 2007 wurden Parzellenversuche auf verschiedenen Schlägen des vom Helmholtz Zentrum München (HMGU) gepachteten Versuchsgutes des Klosters Scheyern angelegt. Dabei wurde Gerste auf Parzellen mit einer Größe von 8 bis 10 x 1,5 m ausgesät. Darüber hinaus wurde im Jahr 2007 ein weiterer Parzellenversuch mit Gerste im Versuchsgut der Technischen Universität München in Roggenstein durchgeführt. Die Aussaat- und Erntetermine sind in der Tabelle 2.3 zusammengefasst. Zur Aussaat wurde ausreichend Gerstensaatzgut vom Proradix®-Hersteller (Sourcon-Padena GmbH & Co. KG) mit Proradix® gebeizt (Abschnitt 2.4.2.1).

Tab. 2.3: Aussaat- und Erntetermine der Parzellenversuche mit Gerste in Scheyern und Roggenstein

Standort	Schläge	Aussaat	Ernte
Scheyern	A1/A19/A21/A26	24.04.06	27.07./08.08.06
Scheyern	A1/A19/A20/A26	05.04.07	01./02.08.07
Roggenstein	-	17.03.07	18.07.07

Alle Parzellen auf den Schlägen A1 und A26 wurden ökologisch und die Schläge A19, A20 und A21 integriert bewirtschaftet. In der integrierten Bewirtschaftung erfolgten Düngungs- und Pflanzenschutzmaßnahmen. Die landwirtschaftliche Bearbeitung der Parzellen ist im Anhang in den Tabellen 7.1-7.3 detailliert aufgeführt.

Parzellen mit Proradix® behandelten Pflanzen wurden neben Parzellen mit Pflanzen ohne Behandlung mit jeweils 4 oder 8 Wiederholungen angelegt. Innerhalb dieser Feldexperimente wurde in einer weiteren Doktorarbeit am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (Helmholtz Zentrum München) ein zweites Pflanzenstärkungsmittel (Messenger) eingesetzt. Abbildung 2.1 zeigt die Anordnung der Parzellen.

Auf allen Parzellenstandorten wurden Bodenproben genommen und analysiert. Dazu erfolgten auf jedem Schlag diagonal gleichmäßig über die Gesamtparzellenfläche verteilt 10 Einstiche mit einem Bohrstock in einer Tiefe von 0 bis 30 cm. Aus diesen 10 Einstichen wurde eine Mischprobe hergestellt. Diese Bodenproben wurden über Nacht bei 45°C getrocknet, gesiebt (<2 mm) und anschließend in der Arbeitsgruppe Elemente und Elementspezies im Institut für Ökologische Chemie (Helmholtz Zentrum München) analysiert.

In Bonituren durch die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL, Freising, Deutschland) im Jahr 2007 wurde der Pathogendruck in Scheyern aufgrund der Trockenheitsphasen besonders im Keimlingsstadium der Gerstenpflanzen als nicht signifikant vorhanden eingestuft. Auch im Parzellenversuch in Roggenstein wurde sowohl in der ökologischen als auch in der integrierten Bewirtschaftung kaum Pathogendruck festgestellt (Johann Dennert, persönliche Mitteilung).

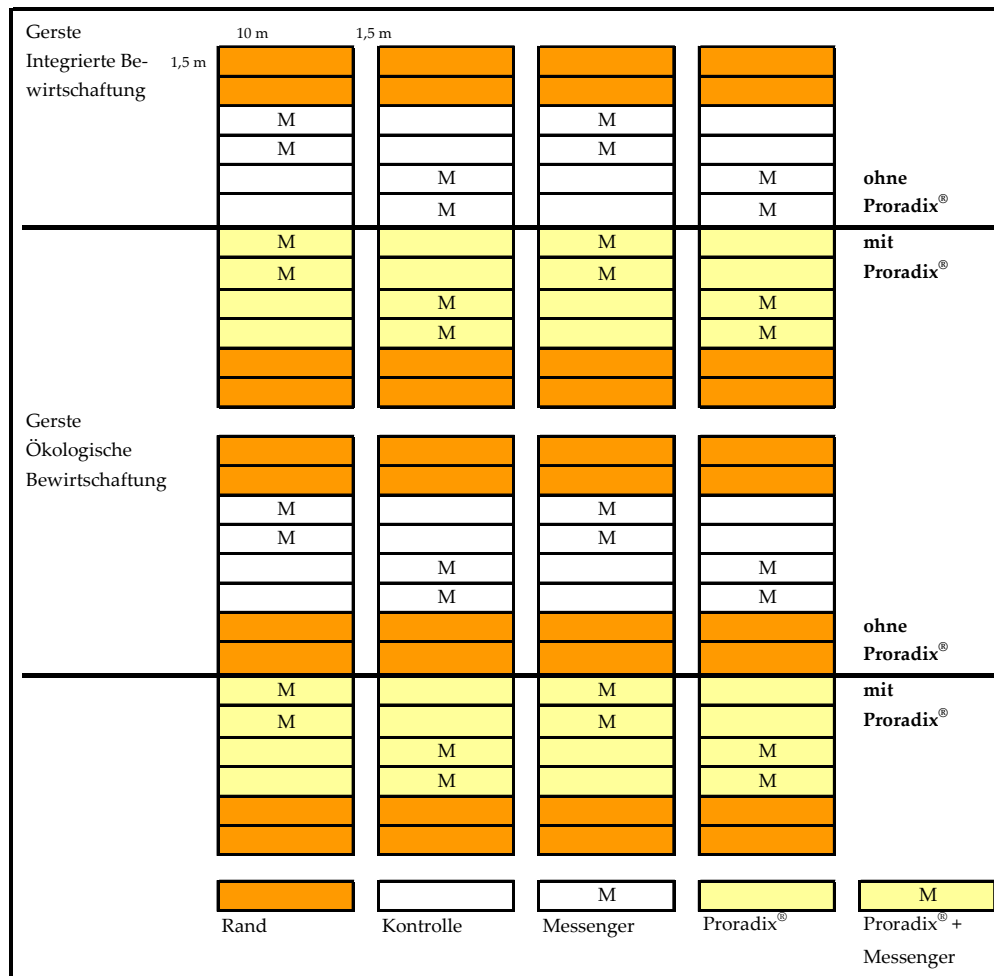


Abb. 2.1: Parzellenplan der Feldexperimente in Scheyern und Roggenstein

2.4.6 Wurzelextrakte und Wurzelaufbereitung

Zur Wurzelextrakte wurden Pflanzen vorsichtig unter Vermeidung von Verletzungen aus dem Quarzsand oder Boden, im Freiland mit Hilfe eines Spatens, entnommen. Grob anhaftendes Material wurde abgeschüttelt. Aus Quarzsand entnommene Wurzeln wurden einmal in sterile 1 x PBS-Lösung getaucht und Quarzsandpartikel mit einer Pinzette entfernt. Wurzeln aus Ackerboden wurden zweimal in sterilem 1 x PBS in Petrischalen gewaschen. Danach wurden die Wurzeln mit einer sterilen Schere vom Sprossansatz abgetrennt und kurz zum Abtropfen auf ein mit Ethanol desinfiziertes Zellstofftuch gelegt. Für die Anfertigung von Wurzelschnitten oder die sofortige Mikroskopie wurden Wurzeln nach dem Waschen kurzzeitig bis zur Präparation in

1 x PBS-Lösung aufbewahrt. Abgetropfte Wurzeln wurden anschließend entweder mit Paraformaldehyd fixiert, zur Isolierung von DNS in flüssigem Stickstoff zerrieben oder zur Bestimmung des Frischgewichtes mit einer Feinwaage gewogen. Zur Ermittlung der Trockenmasse wurden je nach Experiment Wurzeln bzw. Sprosse einzeln geerntet oder von drei Pflanzen vereinigt und bei 70°C zwei Tage getrocknet.

Um den Einfluss des Wurzelwaschens mit 1 x PBS auf die zu untersuchende Bakteriengemeinschaft zu überprüfen, wurden Vorversuche durchgeführt. Dabei wurden Wurzelproben in drei verschiedene Fraktionen aufbereitet: Wurzeln mit fest anhaftenden Bodenpartikeln ohne Waschen mit 1 x PBS (Fraktion 1), zweimal in 1 x PBS gewaschene Wurzeln (Fraktion 2) und Bodenpartikel, die beim Waschvorgang von den Wurzeln abgewaschen und durch Zentrifugation konzentriert wurden (Fraktion 3). Nach Durchführung molekularbiologischer Methoden (T-RFLP-Analyse, Abschnitt 2.5.9) konnte festgestellt werden, dass der Waschvorgang die erfassten, wurzellozierten Bakterien nicht beeinflusste, denn fast alle detektierten Restriktionsfragmente kamen sowohl in der Fraktion 1 als auch in der Fraktion 2 vor. Zusätzliche, nur in der Fraktion 3 vorhandene Restriktionsfragmente stammten von Bodenbakterien, die nicht direkt wurzelloziert waren.

2.4.7 Auswertung von Ergebnissen aus Topf- und Parzellenexperimenten

Die in Gewächshaus- und Feldexperimenten erhobenen Daten wurden zunächst mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2003 SP2 (Microsoft, Redmond, WA, USA) ausgewertet. Statistische Analysen zur Ermittlung der Signifikanz und Beurteilung von Unterschieden erfolgten mit der Software S-PLUS® 6.2 (Insightful Corporation, Seattle, WA, USA). Dabei wurde zuerst ein „Standard Two-Sample t-Test“ durchgeführt. Der t-Test wird zum Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben verwendet. Die Voraussetzungen dafür sind, dass beide Grundgesamtheiten normalverteilt mit gleichen, unbekanntem Varianzen sind, die Stichproben müssen unabhängig und die Messwerte intervallskaliert sein (Köhler *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test (äquivalent mit U-Test von Mann und Whitney)

als verteilungsunabhängige Methode angewendet. Beide Grundgesamtheiten sollen hier stetige Verteilungen von gleicher Form haben, unabhängig sowie die Daten ordinalskaliert sein. Aufgrund des geringen Datenumfangs wurden beide Testverfahren angewendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde immer auf 0,05 festgelegt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Isolierung hochmolekularer Gesamt-DNS aus Rhizosphärenproben wurden Wurzeln von in Quarzsand oder Ackerboden gewachsenen Gerstenpflanzen geerntet (Abschnitt 2.4.6) und folgendermaßen vorbereitet:

Alle verwendeten Labormaterialien wurden mit 80%-Ethanol gereinigt und anschließend in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Gewaschenes Wurzelmaterial von jeweils drei Pflanzen wurde je versuchsbedingter Behandlung und Probenahmezeitpunkt vereinigt und in flüssigem Stickstoff gekühlt in Mörsern mit einem Pistill fein zerrieben. Dieses Wurzelmaterial wurde dann in entsprechende Röhrchen zur DNS-Extraktion überführt, erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt und bis zur weiteren Behandlung kurzzeitig bei -20°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von DNS

2.5.2.1 Isolierung hochmolekularer DNS aus Rhizosphärenproben

Die Isolierung der Gesamt-DNS erfolgte mit Hilfe des *Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) nach Herstellerangaben. Dieses Kit ermöglicht die Extraktion genomischer Gesamt-DNS aus Boden- oder Rhizosphärenproben. Mitgelieferte Lyse Matrix E-Röhrchen enthielten 1 g eines Gemisches aus Keramik- und Silika-Partikeln. In diese Röhrchen wurden 500 mg des wie oben beschrieben zerriebenen Wurzelmaterials eingewogen und mit Natriumphosphatpuffer sowie MT Puffer versetzt,

um Proteine in Lösung zu bringen. Anschließend kam es zu einer effizienten Zellyse aller in der Probe vorhandenen Mikroorganismen durch Schütteln in einem Zellhomogenisator (Fast Prep[®] Instrument, BIO 101, Carlsbad, CA, USA). Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und mit PPS (Protein Precipitating Solution) versetzt. In diesem Schritt erfolgte die Ausfällung der Proteine. Eine weitere Zentrifugation ermöglichte die Abtrennung von Zellbestandteilen, Verunreinigungen und ausgefällten Proteinen. Der DNS enthaltende Überstand wurde mit Bindematrixsuspension vermischt. Dabei erfolgte die selektive Bindung von DNS an eine Silika-Matrix. In zwei Schritten wurde die DNS-haltige Matrix auf Spin[™] Filter gegeben und abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit SEWS-M (Salt/Ethanol Wash Solution) wurde die DNS bei Raumtemperatur 5 min getrocknet und schließlich mit 52 µl DES (DNA Elution Solution-Ultra Pure Water) eluiert. Es folgte die photometrische Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 2.5.4). Die extrahierte DNS wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaute DNS wurde bei 4°C für maximal 3 Monate aufbewahrt und verwendet. Dabei wurden nach Überprüfung mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.5.5) keine qualitativen Veränderungen festgestellt.

2.5.2.2 Isolierung chromosomaler DNS aus bakteriellen Reinkulturen

Für die Extraktion der chromosomalen DNS aus Reinkulturen wurden 3 ml Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Stammes beimpft und bei 30°C sowie 175 rpm über Nacht auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (14000rpm, 1 min) geerntet und die DNS, wie im Abschnitt 2.5.2.1 beschrieben, mit dem *Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals) isoliert.

2.5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNS

Plasmid-DNS aus rekombinanten *Escherichia coli*-Kulturen wurde unter Verwendung des *NucleoSpin® Plasmid Kits* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) den Angaben des Herstellers entsprechend isoliert. Alle notwendigen Puffer und Lösungen wurden gebrauchsfertig mitgeliefert. *E. coli*-Stämme wurden in 4 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Kanamycin (50 µg/ml), bei 37°C und 200 rpm über Nacht auf einem Rundschtüttler angezogen. Die unter Selektionsdruck gewachsenen Kulturen wurden bei 11000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Zellen mit dem Puffer A1 erfolgte der Zellaufschluss durch alkalische Lyse. Die Zugabe des Puffers A3 neutralisierte das Lysat und erzeugte geeignete Bedingungen für die Bindung der Plasmid-DNS an die Silika-Membran der *NucleoSpin® Plasmid Säulchen*. In einem Zentrifugationsschritt wurde die Plasmid-DNS von Proteinen und Zellbestandteilen abgetrennt. Der DNS enthaltende Überstand wurde auf die *NucleoSpin® Plasmid Säulchen* gegeben und es folgten zwei Waschschrte. Zuletzt wurde die Plasmid-DNS unter Niedrigsalz-Bedingungen mit 50 µl eines schwach alkalischen Puffers AE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert. Plasmid-DNS-Isolate wurden nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

2.5.3 Aufreinigung von DNS und PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von DNS-Isolaten, zur Abtrennung aller aus der PCR stammenden eventuell störenden Komponenten von amplifizierten PCR-Fragmenten und für die Extraktion von DNS aus Agarosegelen wurde das *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet. Aufzureinigende DNS wurde hierbei nach Zugabe eines Puffers in Anwesenheit chaotropischer Salze an eine Silika-Matrix der im Kit enthaltenden Chromatographiesäulchen gebunden. Verunreinigungen und makromolekulare Bestandteile wurden in einem Waschschrte entfernt. Gereinigte DNS-Moleküle wurden unter Niedrigsalz-Bedingungen mit 30 µl des schwach alkalischen Puffers NE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

2.5.4 Quantitative, photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde mit Hilfe von spektral-photometrischen Messungen bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Bei $\lambda = 260$ nm zeigt DNS aufgrund ihrer pseudoaromatischen Struktur eine maximale Absorption. Dabei entspricht 1 OD_{260 nm} meist 50 µg/ml für doppelsträngige DNS (Cryer *et al.*, 1975). Nach vorsichtiger, jedoch gründlicher Durchmischung der jeweiligen Probe wurden 2 µl gelöste DNS entnommen und auf ein NanoDrop Spektralphotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) aufgetragen. Die Messung erfolgte mit der dazugehörigen Software ND-1000 v3.3.0 (NanoDrop Technologies).

Aussagen zur Qualität und Reinheit der Nukleinsäure-Lösungen konnten anhand der Quotienten aus den Extinktionswerten bei 230, 260 und 280 nm getroffen werden. Ist die isolierte DNS mit Protein verunreinigt, nimmt der Quotient E_{260}/E_{280} einen Wert kleiner 1,8 an. Verunreinigungen mit RNS werden durch den Quotienten E_{260}/E_{230} mit Werten unter 2,2 angezeigt (Marmur, 1961; Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.5 Qualitative Analyse von hochmolekularer chromosomaler DNS und DNS-Fragmenten

Die Geschwindigkeit, mit der sich DNS-Fragmente im elektrischen Feld auf den positiven Pol zu bewegen, ist hauptsächlich von ihren Molekulargewichten abhängig. Lineare, doppelsträngige DNS wandert durch ein Agarosegel mit Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe sind. Unterschiedlich große DNS-Moleküle werden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Länge von linearisierten, unbekanntem DNS-Fragmenten kann schließlich durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und unter Verwendung eines Größenstandards ermittelt werden.

Lösungen

50 x TAE-Puffer	Tris/HCl (2M)	242 g
	EDTA (0,1 M)	37 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 8,8 mit Eisessig	
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid (1% [w/v])	50 µl
	ad H ₂ O _{dem.}	500 ml

Zur qualitativen Analyse von Nukleinsäure-Lösungen und PCR-Produkten wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 0,8 bis 3,5%ige (w/v) Agarose (PeqLab, Erlangen, Deutschland) in 1 x TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst und in mit Klebeband abgedichtete Gelträger mit eingesetzten Probekämmen gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Probekämme entfernt und das Gel in die mit 1 x TAE-Puffer befüllte Elektrophoreseapparatur gelegt. Von der DNS-Lösung wurden 5 µl entnommen, mit 2 µl 6 x *Loading Dye Solution* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70 bis 100 mA. Durch die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker (Bromphenolblau, Xylencyanol) konnte der Lauf optisch verfolgt werden. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Agarosegel zur Anfärbung 20 bis 40 min in der Ethidiumbromid-Lösung leicht geschwenkt. Die DNS-Fragmente wurden unter UV-Licht bei $\lambda = 312$ nm detektiert und mit einem Video-Dokumentationssystem (INTAS, Göttingen, Deutschland) fotografisch festgehalten.

2.5.5.1 Bestimmung der Länge von DNS-Fragmenten

Durch Auftragung eines DNS-Größenstandards zusammen mit den zu analysierenden DNS-Fragmenten konnte die Länge einer unbekannt Probe ermittelt werden. Es wurden folgende Größenstandards von der Firma Fermentas GmbH verwendet:

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder für DNS-Fragmente mit einer Länge von 100-10000 bp

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder für DNS-Fragmente mit einer Länge von 100-3000 bp

2.5.5.2 Präparative DNS-Gelelektrophorese

Zur gezielten Abtrennung von nicht gewünschten DNS-Fragmenten aus einem Gemisch von DNS-Banden unterschiedlicher Größe wurden präparative DNS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Sie verlaufen nach dem Prinzip der im Abschnitt 2.5.5 beschriebenen analytischen Agarosegelelektrophorese. Um eine möglichst schonende Isolierung und genügend Ausbeute des gewünschten DNS-Fragments zu erreichen, wurden jedoch einige Änderungen vorgenommen. Es wurden 45 µl eines PCR-Amplifikats mit 10 µl 6 x *Loading Dye Solution* (Fermentas GmbH) versetzt und in ausreichend breite Geltaschen überführt. Größere DNS-Mengen konnten schärfer aufgetrennt werden, indem für die Gelelektrophorese eine geringere Stromstärke (70 mA) gewählt wurde. Das 0,8%ige (w/v) Agarosegel wurde in einer frischen SYBR® Green I-Lösung für 10 min angefärbt. Anschließend erfolgte die Detektion im UV Licht in sehr kurzer Zeit, um eine Beschädigung der DNS zu verhindern und die entsprechende DNS-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell zügig ausgeschnitten. Die DNS wurde aus dem Agarosestückchen entsprechend Abschnitt 2.5.3 extrahiert.

Lösung

SYBR® Green I-Lösung	SYBR® Green I	50 µl
	(10000 x Lösung in DMSO)	
	ad 1 x TAE (pH 8,0)	500 ml

2.5.6 Amplifikation von spezifischen DNS-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, mit der auch aus Lösungen mit sehr niedrigen DNS Konzentrationen spezifische DNS-Abschnitte vervielfältigt werden können. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung einer DNS-Sequenz mit Hilfe eines Oligonukleotidprimerpaares, welches zu den DNS-

Abschnitt flankierenden Oligonukleotidsequenzen komplementär ist. In einem Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNS in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. Dann erfolgt die Anlagerung der Primer in der Annealingphase und schließlich synthetisiert eine DNS-Polymerase komplementäre DNS-Sequenzen im Elongationsschritt. Diese drei aufeinander folgenden Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die DNS-Kopienzahl unter optimalen Bedingungen exponentiell ansteigt.

2.5.6.1 Verwendete PCR-Primer

Alle innerhalb dieser Arbeit eingesetzten PCR-Primer wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Lyophilisierte Primer wurden in nukleasefreiem Wasser (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) zu Lösungen von 50 oder 100 pmol/μl rekonstituiert. Die Lagerung aller Primer-Lösungen erfolgte bei -20°C.

Tab. 2.4: Verwendete 16S-rDNS spezifische Oligonukleotidprimer

Primer	Sequenz (5'-3')	Bindungsposition	Referenz
616-F	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	8-27	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
630-R	CAK AAA GGA GGT GAT CC	1529-1545	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
Ba27-F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27	Edwards <i>et al.</i> (1989)
907-R	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	907-926	Lane <i>et al.</i> (1985)
1492-R	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	1492-1513	Lane (1991)

Der mit F gekennzeichnete „Forward“ (Vorwärts)-Primer bindet an den -Strang, der mit R versehene „Reverse“ (Rückwärts)-Primer bindet an den +Strang. Für Y werden die Basen T oder C, für M die Basen A oder C und für K die Basen G oder T in der Primersequenz

verwendet. Als Bindungsposition wird die Position in der rRNS von *Escherichia coli* angegeben (Brosius *et al.*, 1981).

2.5.6.2 Standardansatz für die Durchführung einer PCR

Die Durchführung der PCR erfolgte in 200 µl Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) oder in 96er Mikrotiterplatten (ABgene, Hamburg, Deutschland) in den Geräten Primus 96 plus (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und Primus 96 advanced (PeqLab, Erlangen, Deutschland). Alle PCR-Reagenzien wurden von der Firma Fermentas GmbH bezogen. Die verwendete thermostabile DNS-Polymerase stammt aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermus aquaticus* (*Taq*). Sie katalysiert eine DNS-Synthese in 5'-3'-Richtung, erzeugt PCR-Produkte mit 3'-Adenin-Überhängen und besitzt keine 3'-5' Exonukleaseaktivität („Proofreading“).

Reaktionspuffer, Nukleotide, Magnesiumchlorid, DMSO und nukleasefreies Wasser wurden entsprechend der Anzahl der zu amplifizierenden Proben gemischt und für 3 min mit UV-Licht bei $\lambda = 312$ nm bestrahlt, um einer Kontamination vorzubeugen. Anschließend wurden Primer und *Taq*-Polymerase dazu gegeben. Das Gesamtvolumen eines jeden PCR-Ansatzes betrug 50 µl. Für alle Ansätze wurde nukleasefreies, steriles Wasser (Promega GmbH) verwendet.

Standardansatz für eine PCR:

10 x Puffer	5 µl
10 x 2,5 mM dNTP-Mix	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
Primer F (50 pmol/µl)	1 µl
Primer R (50 pmol/µl)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
DNS	1 µl
ad H ₂ O _{nukleasefrei}	50 µl

PCR-Standardprogramm:

Initiale Denaturierung	5 min, 95°C
30-35 Zyklen:	
Denaturierung	1 min, 94°C
Annealing	30 s, 50-55°C
Elongation	2 min, 72°C
Finale Elongation	10 min, 72°C

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm wurden entsprechend der zu amplifizierenden DNS-Abschnitte modifiziert. Für die verwendeten Primerpaare wurde die jeweils optimale Annealing-Temperatur gewählt. Um die Vervielfältigung bestimmter DNS-Abschnitte zu optimieren, wurden verschiedene MgCl₂-Konzentrationen und wenn notwendig auch DMSO als Additiv (verhindert weitgehend die Ausbildung von störenden Primerdimeren) eingesetzt.

2.5.6.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe des *NucleoSpin® Extract II Kits*, wie im Abschnitt 2.5.3 beschrieben, aufgereinigt und von störenden PCR-Reagenzien abgetrennt. Traten mehrere unspezifische PCR-Produkte auf, wurde eine präparative DNS-Gelelektrophorese durchgeführt (Abschnitt 2.5.5.2). Aufgereinigte PCR-Produkte wurden erneut durch horizontale Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.5.5) überprüft und dann bei -20°C gelagert.

2.5.7 Erstellung von Klonbanken**2.5.7.1 Amplifikation der 16S-rDNS**

Bei der Konstruktion von Klonbanken erfolgte die Amplifikation der gesamten 16S-rDNS aller Mikroorganismen aus Rhizosphärenproben von 2 und 4 Wochen im Ackerboden

(Scheyern, Schlag A21) im Gewächshaus gewachsenen Gerstenpflanzen in Anlehnung an die T-RFLP-Analysen (Abschnitt 2.5.9).

Ansatz für eine PCR (Klonbanken):

10 x Puffer	5 µl
10 x 2,5 mM dNTP-Mix	5 µl
25 mM MgCl ₂	6 µl
DMSO	3 µl
Primer 616-F (50 pmol/µl)	1 µl
Primer 1492-R (50 pmol/µl)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
DNS (10 ng/µl)	1 µl
ad H ₂ O _{nukleasefrei}	50 µl

Das PCR-Standardprogramm (Abschnitt 2.5.6.2) wurde mit einer Annealing-Temperatur von 53°C verwendet. Im Anschluss an die PCR erfolgte die präparative DNS-Gel-elektrophorese (Abschnitt 2.5.5.2). Für jede Rhizosphärenprobe wurde die PCR mit 20, 24 und 28 Zyklen durchgeführt. Die daraus entstandenen, aufgereinigten PCR-Amplifikate wurden anschließend gepoolt. Zuvor wurde die Konzentration aller PCR-Produkte bestimmt (Abschnitt 2.5.4), um beim Poolen berücksichtigen zu können, dass mit steigender Zyklenanzahl die Konzentration der amplifizierten 16S-rDNS zunahm.

2.5.7.2 Erzeugung von Adenin-Überhängen

Die verwendete DNS-abhängige DNS Polymerase besitzt die Eigenschaft, strang-unabhängig 3' terminale Adenin-Überhänge an die PCR Amplifikate zu generieren. Diese Eigenschaft wird bei der so genannten T-Vektor Klonierung genutzt („sticky ends“). Im Gegensatz zu einer „blunt end“ Ligation wird bei dieser Methode eine sehr viel höhere Effizienz erreicht. Da die überhängenden Adenin-Enden der PCR-Produkte relativ schnell wieder abgebaut werden, diese aber für die Ligation bei der T-Vektor Klonierung

entscheidend sind, wurden zusätzlich nach der PCR und direkt vor der Ligation Adenin-Überhänge generiert. Dazu wurden 50 µl Ansätze, wie im Abschnitt 2.5.7.1 aufgeführt, jedoch ohne Primer und mit je 20 µl des jeweiligen aufgereinigten PCR-Produkts, hergestellt. Die Ansätze wurden 30 min bei 72°C inkubiert und anschließend aufgereinigt (Abschnitt 2.5.3).

2.5.7.3 Klonierung von PCR-Produkten

In der vorliegenden Arbeit wurde das *TOPO TA Cloning*[®] Kit der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) mit chemokompetenten *Escherichia coli* TOP10 Zellen zur Ligation und anschließenden Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Als Klonierungsvektor wurde das Plasmid pCR[®]2.1-TOPO eingesetzt. Alle benötigten Lösungen und die kompetenten Zellen waren im Klonierungskit enthalten. Die Durchführung entsprach dem beiliegenden Arbeitsprotokoll.

Der Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO trägt an den 3'-Enden ein überhängendes Desoxythymidin. Da die PCR-Produkte 3'-Desoxyadenin-Überhänge aufweisen, läuft die Ligation durch die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase erfolgreich ab. Die Topoisomerase verknüpft das PCR-Fragment mit dem Vektor und wird dabei freigesetzt. Außerdem trägt das Plasmid eine Ampicillin- und Kanamycinresistenz sowie eine multiple Klonierungsstelle (MCS), die für das α -Peptid der β -Galaktosidase (*lacZ*-Gen) kodiert. Das α -Peptid komplementiert das *lacZ* ω -Fragment der Wirtszelle, so dass β -Galaktosidase gebildet werden kann. Bei Zugabe von X-Gal, einem Derivat des natürlichen Substrates Laktose, wird dieses gespalten und die Klone sind an ihrer blauen Farbe zu erkennen. Wenn ein DNS-Fragment in die MCS inseriert wird, wird der Leserahmen von *lacZ* unterbrochen und die Bildung des α -Peptids und somit auch die β -Galaktosidase Aktivität unterbleiben. Deswegen kann X-Gal nicht gespalten werden und die Zellen erscheinen weiß (Blau-Weiß-Selektion).

Auf LB-Kanamycin-Agarplatten (50 µg/ml Kanamycin) wurden je 40 µl X-Gal-Lösung aufgetragen. Darauf wurden jeweils 20 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 weiße Kolonien pro

Klonbank entnommen und auf frische LB-Kanamycin-X-Gal-Platten übertragen. Nach erneuter Inkubation folgten die Kolonie-PCR (Abschnitt 2.5.7.4) und anschließend die Isolierung der Plasmid-DNS (Abschnitt 2.5.2.3) sowie die Anfertigung einer Glycerinkultur für jeden Klon (Abschnitt 2.2.3).

Lösung

X-Gal-Lösung	X-Gal	0,04 g
	ad Dimethylformamid (99% [v/v])	1 ml

Die X-Gal-Lösung wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

2.5.7.4 Kolonie-PCR

Die Methode der Kolonie-PCR wurde nach der Klonierung zur Überprüfung der richtigen Insertgröße gewählt. Dabei wurden Zellen von einer frisch gewachsenen *E. coli*-Einzelskolonie mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in 100 µl nukleasefreies Wasser überführt. Diese Lösungen wurden mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellyse zu begünstigen und DNS für die folgende Kolonie-PCR ohne zeitaufwendige Extraktionsmethoden frei zu setzen. Die initiale Denaturierung wurde auf 10 min verlängert, um ebenfalls Zellen zu lysieren. Von der Zellsuspension (100 µl) wurden 2 bis 5 µl je Reaktion eingesetzt. Ansonsten entsprach der Reaktionsansatz dem PCR-Standardansatz (Abschnitt 2.5.6.2). Es wurden die Primer 616-F (Tabelle 2.4) und M13-R (Tabelle 2.6) verwendet.

Kolonie-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung 10 min, 94°C

30 Zyklen:

 Denaturierung 1 min, 94°C

 Annealing 1 min, 55°C

 Elongation 1 min, 72°C

Finale Elongation 10 min, 72°C

2.5.7.5 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse

Bei dieser Methode entstehen nach Behandlung eines doppelsträngigen DNS-Abschnittes mit einer Restriktionsendonuklease entsprechend ihrer Erkennungssequenz der Restriktionsschnittstelle unterschiedlich lange DNS-Fragmente, die als Bandenmuster nach Auftrennung durch horizontale Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid (Abschnitt 2.5.5) sichtbar werden. Demzufolge können verschiedene Mikroorganismen aufgrund von Unterschieden in ihrer DNS-Sequenz und daraus resultierenden ungleichen Fragmentmustern differenziert werden.

Zunächst wurden von jeder Plasmid-Probe Lösungen mit einer Plasmid-DNS-Konzentration von 5 ng/ μ l hergestellt. Diese Lösungen wurden erneut 1:100 verdünnt und anschließend in eine PCR mit 30 Zyklen, wie im Abschnitt 2.5.7.1 beschrieben, zur Amplifikation der Inserts eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden einer RFLP-Analyse unterzogen. Dabei wurden die beiden Restriktionsendonukleasen MspI und RsaI (Fermentas GmbH und Promega GmbH; Tabelle 2.5) verwendet. Alle Restriktionen wurden nach Empfehlungen des Herstellers in den entsprechenden Reaktionspuffern durchgeführt. Es wurden jeweils 1 μ l des Enzyms (10 U/ μ l) und 10 μ l des PCR-Amplifikats in einem Volumen von 20 μ l eingesetzt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden die RFLP-Ansätze mit 6 x *Loading Dye Solution* (Fermentas GmbH) vermischt und in die Taschen eines 3,5%igen (w/v) Agarosegels überführt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 70 mA.

Tab. 2.5: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	T (°C)	Erkennungssequenz	Herkunftsorganismus
MspI	37	5'-C [^] C G G-3'	<i>Moraxella species</i>
RsaI	37	5'-G T [^] A C-3'	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>

2.5.8 DNS-Sequenzanalyse

2.5.8.1 Durchführung von Sequenzierungen

Die Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte im Genomanalysezentrum (GAC) am Helmholtz Zentrum München mit dem DNS-Kapillarsequenzierautomaten ABI 3730 (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland).

Zunächst wurde die Sequenzier-PCR in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (ABgene) durchgeführt, wobei das *BigDye Terminator (BDT) v3.1* Sequenzierkit (Applera Deutschland GmbH) verwendet wurde.

Ansatz für eine Sequenzier-PCR:

BDT Puffer	1 μ l
Primer (10 pmol/ μ l)	0,2 μ l
BDT Mix	1 μ l
Plasmid-DNS (50, 100 oder 150 ng/ μ l)	1 μ l
ad H ₂ O _{nukleasefrei}	5 μ l

Sequenzier-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	1 min, 96°C
50 Zyklen:	
Denaturierung	10 s, 96°C
Annealing	5 s, 50°C
Elongation	4 min, 60°C

Zur Sequenzierung der etwa 1500 bp langen 16S-rDNS-Fragmente wurden folgende Primer eingesetzt:

Tab. 2.6: Verwendete Primer für die Sequenzierung

Primer	Sequenz (5'-3')	Bindungsposition
M13-F	TGT AAA ACG ACG GCC AG	Klonierungsvektor
M13-R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Klonierungsvektor
609-F	GGA TTA GAT ACC CBD GTA	16 S rDNS, 785-802
616-F	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	16 S rDNS, 8-27
612-R	GTA AGG TTY TNC GCG T	16 S rDNS, 969-984
907-R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	16 S rDNS, 907-926

Für B werden die Basen G, T oder C, für D die Basen G, A oder T, für M die Basen A oder C, für N die Basen A, G, T oder C und für Y die Basen C oder T in der Primersequenz verwendet. Als Bindungsposition wird die Position in der rRNS von *Escherichia coli* angegeben (Brosius *et al.*, 1981).

Nach der Sequenzier-PCR erfolgte eine Ethanol-fällung zur Aufreinigung der PCR-Produkte. Zu jedem 5 µl PCR-Ansatz wurden 25 µl 100%-Ethanol gegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Dann wurden die Ansätze bei 2000 x g und 4°C 15 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die PCR-Amplifikate mit je 125 µl 70%-Ethanol versetzt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die gereinigten PCR-Produkte in 50 µl LiChrosolv Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst, in eine Sequenzier-Mikrotiterplatte (ABgene) überführt und sequenziert.

2.5.8.2 Phylogenetische Auswertung von Sequenzdaten

Alle erhaltenen 16S-rDNS-Sequenzen wurden mit Hilfe der vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angebotenen Suchmaschine „BLAST“ (Altschul *et al.*, 1997) mit in der Datenbank GenBank abgelegten Sequenzen verglichen. Zuvor wurden alle vorhandenen Vektorsequenzen manuell entfernt.

Für die phylogenetische Auswertung wurden die erhaltenen Teilsequenzen zuerst mit der Sequenzanalyse-Software SeqMan (Lasergene® v7.1, DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) zu Gesamtsequenzen zusammengefügt und korrekturgelesen. Dann wurden die Sequenzen in das Softwarepaket ARB (Ludwig *et al.*, 2004) importiert und in ein „Alignment“ bereits bekannter Sequenzen eingepasst. Dabei wurden die neu importierten Sequenzen mit phylogenetisch bereits analysierten Sequenzen verglichen und homologe Positionen an der gleichen Stelle angeordnet. Zunächst erfolgte eine automatische Anordnung der Sequenzen mit dem Tool „Fast Aligner“ aus dem ARB Softwarepaket. Danach wurden alle Sequenzen anhand der Sequenziererergebnisse sowie unter Verwendung der Chromatogramme und der Software Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty Ltd., Australien) überprüft und wenn notwendig das Alignment manuell korrigiert. Bei dieser Art der Sequenzanalyse ist es notwendig, die erhaltenen Sequenzen einem Chimärentest zu unterziehen. Dazu wurde in dieser Arbeit das Programm Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>) (Huber *et al.*, 2004b) verwendet. Als Chimären eingestufte Sequenzen wurden von der weiteren phylogenetischen Analyse ausgeschlossen.

Die Stammbäume zur Rekonstruktion phylogenetischer Verwandtschaften wurden nach der Maximum-Parsimony- (Fitch, 1966), Neighbor-Joining- (Saitou & Nei, 1987) und Maximum-Likelihood- (Felsenstein, 1981) Methode erstellt. Alle Baumberechnungsverfahren waren im Programmpaket ARB implementiert. Die Matrix der paarweisen Distanzwerte diente als Grundlage zur Stammbaumrekonstruktion nach der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei, 1987). Mittels Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Analysen wurde die Topologie der Stammbäume überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

2.5.9 Terminale-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP)-Analyse

Die T-RFLP-Analyse ist eine sichere und reproduzierbare Methode, um die Zusammensetzung und Diversität einer bakteriellen Gemeinschaft in den unterschiedlichsten Proben zu untersuchen sowie Veränderungen innerhalb der Populationsstruktur zu erfassen (Osborn *et al.*, 2000). Diese kultivierungsunabhängige Methode beruht auf der Extraktion und Amplifikation (PCR) der Gesamt-16S-rDNS der zu untersuchenden Probe, wobei ein oder auch beide Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Nach Behandlung der PCR-Produkte mit einer Restriktionsendonuklease werden die terminal fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente mit Hilfe eines DNS-Größenstandards und eines Sequenzierautomaten ihrer Länge nach aufgetrennt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T-RFLP-Methode verwendet, um mögliche Veränderungen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre von Gerste nach Einsatz von Proradix® zu untersuchen. Dabei wurden von jeder Rhizosphärenprobe jeweils drei parallele DNS-Isolierungen und schließlich drei separate T-RFLP-Analysen durchgeführt.

2.5.9.1 Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS

Nach der Isolierung hochmolekularer Gesamt-DNS aus Rhizosphärenproben (Abschnitt 2.5.2.1) erfolgte die Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS wie im Abschnitt 2.5.7.1 beschrieben. Dabei wurden die Primer Ba27-F und 907-R (Tabelle 2.4; 50 pmol/μl, 0,5 μl je Primer je Ansatz) eingesetzt. Der Primer Ba27-F war mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) mit einem Absorptionsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 518 nm markiert. Die PCR wurde mit 23 bis 27 Zyklen durchgeführt.

2.5.9.2 Aufreinigung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte

Die PCR-Amplifikate wurden nach ihrer Überprüfung mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.5.5) mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Alle notwendigen Lösungen und Puffer waren im Kit enthalten. Aufgereinigte PCR-Amplifikate wurden mit 25 µl EB Puffer eluiert und ihre Konzentrationen photometrisch bestimmt (Abschnitt 2.5.4).

2.5.9.3 Restriktion der 16S-rDNS-Amplifikate

Die Restriktion der aufgereinigten 16S-rDNS-Amplifikate erfolgte unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *MspI* (Fermentas GmbH; Tabelle 2.5). Dazu wurden jeweils 1 µl des entsprechenden Enzympuffers, 0,3 µl des Enzyms (10 U/µl) und 50 ng des PCR-Produkts in einem Volumen von 10 µl eingesetzt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert.

2.5.9.4 Aufreinigung der Restriktionsfragmente

Zur Aufreinigung der Restriktionsfragmente wurde das *DyeEx 2.0 Spin Kit* (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit diesem Kit werden Moleküle entsprechend ihrem Molekulargewicht schnell und effizient mittels Gelfiltration aufgereinigt.

2.5.9.5 Detektion fluoreszenzmarkierter Restriktionsfragmente

Die Detektion der terminal fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente erfolgte im Genomanalysezentrum (GAC) am Helmholtz Zentrum München mit dem DNS-Sequenzierautomaten ABI 3730 (Applied Biosystems). Zur Bestimmung der Fragmentlängen wurde als interner Größenstandard der *MapMarker[®] 1000* (BioVentures, Inc.,

Murfreesboro, TN, USA) eingesetzt. Dieser Größenstandard ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin, Absorptionsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum: 602 nm) markiert.

In Sequenzier-Mikrotiterplatten (ABgene) mit 96 Vertiefungen wurden jeweils 1 µl des mit der Restriktionsendonuklease MspI geschnittenen PCR-Amplifikats mit 13 µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) versetzt. Im Formamid war eine 1:400 Verdünnung des MapMarkers[®] 1000 enthalten. Es folgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min im Thermocycler Primus 96 plus (MWG Biotech). Danach wurde die Mikrotiterplatte sofort auf Eis gestellt und schließlich die Detektion der Restriktionsfragmente begonnen.

2.5.9.6 Auswertung von T-RFLP-Ergebnissen

Die Ergebnisse einer T-RFLP-Analyse wurden in Form eines Elektropherogrammes, welches die einzelnen Fluoreszenzsignale (Peaks) mit unterschiedlichen Peak-Höhen entsprechend der Fluoreszenzintensitäten zeigt und in einer Tabelle mit den jeweiligen Fragmentlängen in Basenpaaren, den entsprechenden Peak-Höhen und Peak-Flächen angegeben. Dazu erfolgte die erste Auswertung und Ermittlung der Fragmentlängen über den internen Größenstandard mit Hilfe der GeneMapper[®] v3.5-Software (Applied Biosystems). Signale mit einer Peak-Höhe unter 100 Fluoreszenzeinheiten wurden als Hintergrundrauschen eingestuft und nicht detektiert (Osborn *et al.*, 2000).

Zur weiteren Auswertung wurden die Peak-Höhen verwendet. Zunächst wurden die mittleren Peak-Höhen für die jeweiligen gleichen Fragmente aus den drei separaten T-RFLP-Analysen einer Rhizosphärenprobe mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft[®] Office Excel 2003 SP2 (Microsoft) errechnet. Dabei wurden die Restriktionsfragmente als identisch eingestuft, deren Fragmentlängen in einem Bereich von $\pm 1-2$ bp lagen (Graff & Conrad, 2005). Alle Fragmente, die kleiner als 50 bp waren, wurden als Primerdimere eingestuft und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Innerhalb der Sequenzdatenanalyse (Abschnitt 2.5.8.2) wurden Sequenzen gefunden, die durch Amplifikation von rRNS Genen von Chloroplasten und Mitochondrien der Gerste entstanden sind. Bei der Auswertung der T-RFLP-Analysen wurden die Fragmente, die

von Chloroplasten (494, 620, 868 bp) und von Mitochondrien (386, 534, 953 bp) stammten, nicht berücksichtigt (Sessitsch *et al.*, 2004; Graff & Conrad, 2005).

Die relative Abundanz eines jeden Restriktionsfragments wurde aus der jeweiligen Signalhöhe dieses Fragments dividiert durch die gesamte Peak-Höhe aller Fragmente der entsprechenden T-RFLP-Analyse berechnet. Diese Quotienten wurden schließlich in prozentuale Anteile an der Gesamt-Peak-Höhe (100%) eines T-RFLP-Elektropherogrammes umgerechnet. Fragmente mit einer relativen Abundanz unter 0,25% wurden ausgeschlossen.

Um die in umfangreichen T-RFLP-Datensätzen enthaltenen Informationen komprimiert und vereinfacht darzustellen, bietet die Hauptkomponentenanalyse in der molekularen, mikrobiellen Ökologie eine wertvolle Anwendung (Dollhopf *et al.*, 2001). So wurde zur statistischen Auswertung eine Datenmatrix mit den Fragmentlängen und ihren entsprechenden relativen Abundanzen der zu vergleichenden T-RFLP-Analysen angelegt und eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis (PCA)) mit der Software CANOCO 4.5 (Microcomputer Power, Inc., Ithaca, NY, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Beziehungen der Variablen untereinander simultan dargestellt. Die Skalierung wurde mit Fokus auf die Korrelation der Fragmentlängen eingeteilt und es erfolgte keine nachträgliche Transformation der Abundanzen.

2.5.10 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Nur ein kleiner Bruchteil der in natürlichen Ökosystemen vorkommenden Mikroorganismen ist kultivierbar und kann mit Hilfe von klassischen kultivierungsabhängigen Techniken identifiziert werden (Giovannoni *et al.*, 1988; Amann *et al.*, 1995). Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hingegen ist eine Methode, die die phylogenetische Identifizierung und Quantifizierung einzelner Mikroorganismen direkt in ihrem Mikrohabitat ohne Populationsverschiebungen ermöglicht (Amann *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2003). Dabei werden gegen die ribosomale RNS gerichtete, fluoreszenzmarkierte, phylogenetische Oligonukleotidsonden eingesetzt. Als Zielmolekül dient meistens die 16S- oder 23S-rRNS, die wegen ihrer funktionellen Konstanz, der hohen Kopienzahl und

der Struktur mit konservierten und variablen Regionen besonders gut für phylogenetische Analysen geeignet ist. Die Oligonukleotide sind komplementär zu bestimmten Regionen der ribosomalen RNS, wodurch je nach Spezifität der verwendeten Sonde gezielt Mikroorganismen in einer Umweltprobe nachgewiesen werden können und eine Unterscheidung bis auf Artniveau möglich ist.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit fand die FISH-Methode zur Detektion der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen in der Rhizosphäre von Gerste Anwendung.

Lösungen

10 x PBS	NaH ₂ PO ₄ (100 mM)	12 g
	Na ₂ HPO ₄ (100 mM)	14,2 g
	NaCl (1,3 M)	76 g
	ad H ₂ O _{dem.}	1000 ml
	pH 7,2-7,4	
0,5 M EDTA-Lösung	EDTA	73,05 g
	NaOH-Plättchen	10 g
	ad H ₂ O _{reinst}	500 ml
	pH 8,0	
5 M Natriumchlorid-Lösung	NaCl	146,1 g
	ad H ₂ O _{reinst}	500 ml
SDS-Lösung (10% [w/v])	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 g
	ad H ₂ O _{reinst}	100 ml
1 M Tris/HCl-Lösung	Tris	60,57 g
	ad H ₂ O _{reinst}	500 ml
	pH 8,0 (mit HCl einstellen)	

2.5.10.1 Verwendete rRNS gerichtete Oligonukleotidsonden

Alle innerhalb dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Thermo Electron GmbH fertig markiert bezogen und sind in der Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Verwendete Oligonukleotidsonden

Sonde	Spezifität	Bindungsposition	Sondensequenz 5'-3'	% FA	Referenz
EUB-338-I	<i>Bacteria</i> ohne <i>Planctomycetales</i> , <i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	35	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
EUB-338-II	<i>Planctomycetales</i>	16S, 338-355	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	35	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
EUB-338-III	<i>Verrucomicrobiales</i>	16S, 338-355	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	35	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
GAM-42A	<i>γ-Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
PSE-225	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>aeruginosa</i> , <i>syringae</i> , <i>putida</i>	16S 225-242	CCG ACC TAG GCT CAT CTA	35	diese Arbeit

Für % FA wird die verwendete Formamidkonzentration in Prozent (v/v) im Hybridisierungspuffer angegeben. Zur Detektion der Domäne *Bacteria* wurden die Sonden EUB-338-I, II, III als äquimolare Mischung eingesetzt. Die Sonde PSE-225 wurde in Anlehnung an die von Huber *et al.* (2004a) veröffentlichte Sonde PSE-224 gelegt. Aus dieser Arbeit war bekannt, dass diese Zielregion für die Detektion von *Pseudomonas*-Stämmen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden geeignet ist. Die Sondensequenz und Bindungsstelle wurden entsprechend angepasst, um den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm detektieren zu können.

Sämtliche Sonden-Lösungen wurden bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Bei Einsatz der Oligonukleotidsonde GAM-42A wurde gleichzeitig der nicht fluoreszenzmarkierte Kompetitor (Sondensequenz 5'-3': GCC TTC CCA CTT CGT TT) verwendet.

2.5.10.2 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Alle eingesetzten Oligonukleotidsonden waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluos, Cy3 und Cy5 verwendet.

Tab. 2.8: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Absorptionsmaximum (nm)	Emmissionsmaximum (nm)	Extinktionskoeffizient ϵ in (1 x mol x cm)
Fluos	494	518	$7,5 \times 10^4$
Cy3	554	570	$1,3 \times 10^5$
Cy5	650	667	2×10^5

2.5.10.3 Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Die Zellfixierung mit Paraformaldehyd (PFA) ermöglicht den Erhalt der Zellstruktur in ihrem natürlichen Zustand, da PFA eine Quervernetzung der Zellwände bewirkt. Reinkulturen Gram-negativer Bakterien und ganze Wurzeln wurden mit einer 4% (w/v)-PFA-Lösung fixiert (Amann *et al.*, 1990).

Zunächst wurde die 4% (w/v)-PFA-Lösung hergestellt. Dazu wurden 45 ml H₂O_{reinst} auf 60 bis 65°C erwärmt und nach Zugabe von 2 g Paraformaldehyd tropfenweise mit 10 N NaOH versetzt, bis sich die Lösung aufklarte. Nach Zugabe von 5 ml 10 x PBS wurde die Lösung auf etwa 20°C abgekühlt und der pH-Wert auf 7,2-7,4 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert (0,45 µm Porengröße, Millipore GmbH) und war bei 4°C gelagert maximal eine Woche haltbar.

Je 2 ml einer Übernachtskultur wurden bei 8000 rpm 2 bis 3 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 200 µl 1 x PBS-Lösung resuspendiert, zur Fixierung mit 600 µl 4% (w/v)-PFA-Lösung vermischt und bei 4°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert, zweimal mit 1 x PBS-Lösung

gewaschen und in einer 1:1 1 x PBS/EtOH_{abs}-Lösung bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

Ganze Wurzeln wurden in 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ebenfalls in einer Mischung aus 4% (w/v)-PFA- und 1 x PBS-Lösung im Verhältnis 3:1 bei 4°C für zwei Stunden fixiert. Danach wurden die Wurzeln zweimal mit 1 x PBS-Lösung vorsichtig gewaschen und zur Lagerung in 15 ml Röhrchen bei -20°C mit 1 x PBS/EtOH_{abs} (1:1) überschichtet.

2.5.10.4 Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden

Für die Hybridisierung von Reinkulturen wurden je nach Zelldichte 1 bis 3 µl der fixierten Bakteriensuspension auf Objektträger mit 6 oder 10 Aussparungen (Carl Roth GmbH + Co. KG) pipettiert und bei 46°C angetrocknet. Der Objektträger mit dem Probenmaterial wurde zur Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50% (v/v), 80% (v/v), 100%) für je 3 min behandelt und anschließend luftgetrocknet. Bei der folgenden Hybridisierung wurde die Stringenz (Bindungsstärke) durch Zugabe von Formamid (FA) 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% (v/v)-Formamid zum Hybridisierungspuffer die Dissoziationstemperatur des Hybrids um etwa 0,5°C. Je mehr Formamid im Puffer enthalten ist, desto stringenter sind die Hybridisierungsbedingungen. Die verwendete Formamidkonzentration war von der jeweils eingesetzten Oligonukleotidsonde abhängig und wurde der entsprechenden Literatur entnommen.

Der Hybridisierungspuffer setzte sich wie folgt zusammen:

Hybridisierungspuffer	NaCl (5 M)	360 µl
	Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	40 µl
	deionisiertes Formamid siehe Tabelle 2.9	
	H ₂ O _{reinst}	siehe Tabelle 2.9
	SDS (10% [w/v])	2 µl

Tab. 2.9: Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bei 46°C Hybridisierungstemperatur

% (v/v) Formamid	Formamid (µl)	H₂O_{reinst} (µl)
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

Zur Hybridisierung wurde auf jedes Feld mit Reinkulturen eine Mischung von 1 µl Sondenarbeitslösung (Cy3 und Cy5: 30 µg/ml, Fluos: 50 µg/ml) und 9 µl Hybridisierungspuffer pipettiert. Bei Verwendung einer zweiten Sonde bei derselben Formamidkonzentration wurde von dieser Sonde ebenfalls 1 µl in denselben Reaktionsansatz gegeben. Der Objektträger wurde anschließend in ein 50 ml Probengefäß überführt, welches ein mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchtetes Stück Zellstoff zum Schutz vor Verdunstung enthielt. Die Proben wurden bei 46°C für mindestens 1,5 h inkubiert.

Danach folgte ein stringenter Waschschrift in 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer bei 48°C für 15 min, 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% (v/v) Formamid wurde zusätzlich zur Komplexierung störender zweiwertiger Kationen 500 µl 0,5 M EDTA-Lösung zugegeben.

Waschpuffer	Tris/HCl (1 M, pH 8,0)	1 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0; ab 20% FA)	500 μ l
	NaCl (5 M)	siehe Tabelle 2.10
	ad H ₂ O _{reinst}	50 ml
	SDS (10% [w/v])	50 μ l

Tab. 2.10: NaCl-Konzentration im Waschpuffer bei 48°C Waschttemperatur

% (v/v) Formamid im Hybridisie- rungspuffer	NaCl (mol)	μ l NaCl (5 M) (von 20-65% FA: Zugabe von 500 μ l 0,5 M 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

Nach dem Waschschrift wurden der Objektträger vorsichtig mit H₂O_{reinst} abgespült, lichtgeschützt luftgetrocknet und die fertigen Präparate in Citifluor-AF1 (Citifluor Ltd., London, Großbritannien) eingebettet, um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu vermindern. Der Objektträger wurde mit einem Deckglas versehen.

Bei der Hybridisierung von etwa 2 cm langen Wurzelabschnitten erfolgten alle Schritte außer dem stringenten Waschen im 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf). Im Hybridisierungsschritt wurden die Wurzelabschnitte mit einer Mischung aus 120 μ l Hybridisierungspuffer und je 15 μ l der entsprechenden Sonde bedeckt. Am Ende wurden die Wurzelstücke auf Standardobjektträger gelegt und in Citifluor-AF1 eingebettet.

2.6 Mikroskopische Methoden

2.6.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Die Detektion von fluoreszenzmarkierten Bakterien aus Reinkulturen erfolgte mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Zur Auswertung wurden ein Ölimmersionsobjektiv (Plan-Neofluar Objektiv, numerische Apertur 1,3) mit 100-facher Vergrößerung oder ein Wasserimmersionsobjektiv (63x/1,2 W) verwendet. Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilberdampfampe (HBO50/AC, Carl Zeiss AG) erzeugt. Die verwendeten Fluoreszenzfiltersätze sind in der Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Tab. 2.11: Kenndaten der zur Epifluoreszenz-Mikroskopie verwendeten Filtersätze

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

2.6.2 Vorbereitung von Wurzeln für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

2.6.2.1 Wurzeln mit GFP-markierten Bakterien

Mit dem GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm inokulierte Gerstenwurzeln wurden, wie im Abschnitt 2.4.6 beschrieben, geerntet, sofort auf einen Objektträger gelegt und in Citifluor-AF1 eingebettet. Darauf wurde ein Deckglas gelegt und mit Klebestreifen befestigt.

2.6.2.2 Präparation von Wurzelquerschnitten

Neben der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an ungeschnittenen Wurzelstücken wurden auch Wurzelschnitte von mit dem GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm inokulierten Gerstenwurzeln angefertigt. Dazu wurde ein kleiner Styroporblock in der Mitte eingeschnitten und dazwischen ein Stück einer frisch geernteten Wurzel (Abschnitt 2.4.6) eingeklemmt. Mit einer Rasierklinge wurden mehrere, zwischen 50 und 100µm dicke Querschnitte von allen Teilen der Wurzel durchgeführt. Anschließend wurden die Querschnitte jeweils in einen Tropfen H₂O_{reinst} auf einen Epoxyharzbeschichteten Objektträger mit 10 Aussparungen (Carl Roth GmbH + Co. KG) gelegt, kurz angetrocknet, mit Citifluor-AF1 überschichtet und sofort mikroskopiert.

2.6.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Diese mikroskopische Methode besitzt den Vorteil, ausschließlich aus der Fokusebene stammende Fluoreszenzsignale detektieren zu können. Die Erfassung von Streulichtsignalen, die von ober- und unterhalb der eigentlichen Fokusebene stammen, kann mit Hilfe eines so genannten Pinholes verhindert werden. Das zu untersuchende Präparat wird dabei punktförmig mit monochromatischem Licht angeregt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop LSM-510 der Firma Zeiss zur Betrachtung von Wurzelpräparaten und Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterien verwendet. Dabei dienten ein Argon- (488 nm) und zwei Helium-Neon-Laser (543, 633 nm) als Lichtquelle und es wurde ein Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat® 63x/1,2 W Korr mit 63-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 verwendet. Die Bildaufnahme und -verarbeitung erfolgte mit der mitgelieferten Software Zeiss LSM Image Browser Version 2.80. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe, Filtersätze und Laser sind in der Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tab. 2.12: Kenndaten der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und der entsprechenden Filtersätze und Laser des konfokalen Laserscanning-Mikroskops

Fluorochrom	Absorptions-maxima (nm)	Emissions-maxima (nm)	Laser (nm)	Strahlteiler	Filter
GFP	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

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes anhand von Parametern mit pflanzenwachstumsfördernder Relevanz

3.1.1 Keimzahlbestimmung

Zur Quantifizierung des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes im Proradix®-Originalpräparat wurden Verdünnungsreihen mit 1 x PBS- und 10 mM Magnesiumsulfat-Lösung hergestellt. Die Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-8} wurden auf King's B Medium ausplattiert (Abschnitt 2.3.1). Alle gewachsenen Kolonien hatten die gleiche Kolonieform und die bei dem verwendeten Medium für *Pseudomonas fluorescens* typische gelb-grün fluoreszierende Farbe. Für die Zellzahlbestimmung wurden die Platten der Verdünnungsstufe 10^{-7} ausgezählt. Dabei wurden Mittelwerte aus fünf parallelen Zählungen in Höhe von $2,4 \times 10^{10}$ ($\pm 0,6 \times 10^{10}$; 1 x PBS) und $2,9 \times 10^{10}$ ($\pm 0,5 \times 10^{10}$; MgSO₄-Lösung) CFU pro g Proradix®-Originalpräparat ermittelt. Die Zahlen in Klammern stellen die Standardabweichungen dar. Der Hersteller des Präparates gibt einen Wert von 5×10^{10} CFU je g Proradix® an (Sourcon-Padana GmbH & Co. KG).

3.1.2 Siderophorenproduktion

Um eine mögliche Bildung von Siderophoren nachzuweisen, wurde der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm auf Chromazurol S/HDTMA-Indikatorplatten angezogen (Abschnitt 2.3.2). Das Ergebnis wird in der Abbildung 3.1 gezeigt. Es waren deutlich rot/orangefarbene Höfe um die Bakterienkolonien ausgeprägt. Demzufolge besitzt der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm die Fähigkeit, Siderophore zu produzieren, die

Eisen-(III)-Ionen aus dem Chromazurol S/HDTMA-Komplex herauslösten und somit den Farbumschlag bewirkten.

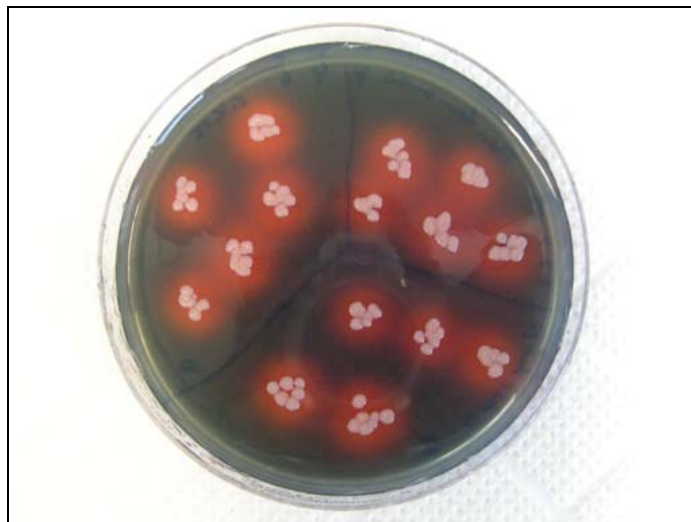


Abb. 3.1: Nachweis der Siderophorenproduktion mit Hilfe von Chromazurol S/HDTMA-Indikatorplatten für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm

3.1.3 IES-Produktion

Um zu überprüfen, ob der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm in der Lage ist, Indol-3-Essigsäure zu produzieren, wurde er in einer Übernachtskultur in M9-Minimalmedium mit Tryptophan angezogen und der IES-Gehalt mittels eines Waters ACQUITY-UltraPerformance-LiquidChromatography-Trennsystems (UPLC) ermittelt (Abschnitt 2.3.3). Dabei wurde ein Wert von 93,5 nmol IES/ml Überstand bestimmt. Im Vergleich dazu wurde für den IES-produzierenden Stamm *Azospirillum brasilense* Sp7 ein IES-Gehalt von 90,6 nmol/ml Überstand gemessen.

3.1.4 ACC-Deaminase Aktivität

Da bei einigen Bakterien ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Enzyms 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase und der Förderung des pflanzlichen Wachstums besteht, wurde der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm auf Produktion

dieses Enzyms getestet (Abschnitt 2.3.4). Dazu wurde das Minimalmedium nach Brown & Dilworth (1975) verwendet und *Burkholderia phytofirmans* als Positivkontrollstamm eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2 dargestellt.

Auf den Positivkontrollen, die das Minimalmedium und Ammoniumchlorid enthielten, war ein deutliches Wachstum und auf den Negativkontrollen ohne Stickstoffquelle kein Wachstum erkennbar. Der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm wuchs nicht auf der ACC-Testplatte. Im Vergleich zum Positivkontrollstamm konnte bei *Burkholderia phytofirmans* ein eindeutiges Wachstum auf der ACC-Testplatte beobachtet werden. Folglich ist der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm anhand der gewählten Methode nicht in der Lage, das Enzym ACC-Deaminase zu synthetisieren.

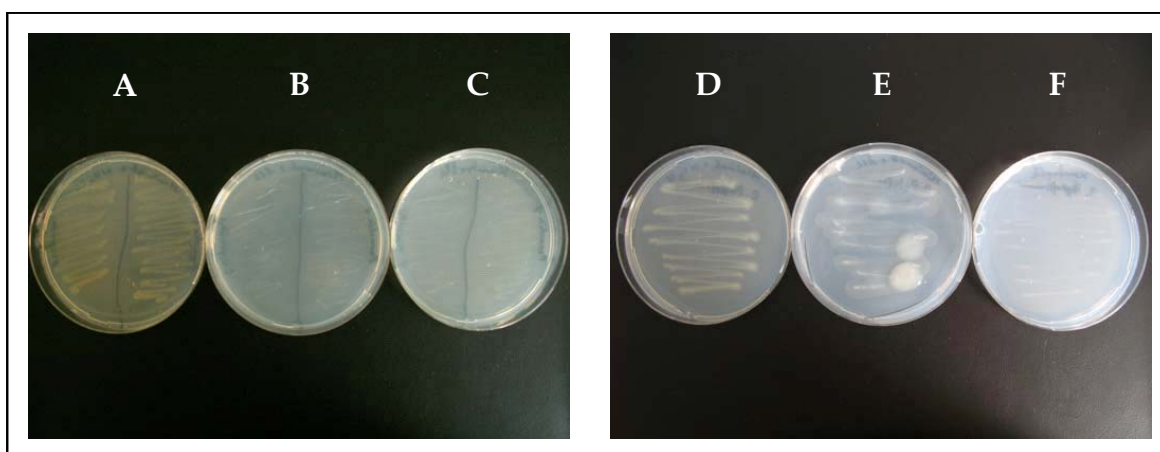


Abb. 3.2: Nachweis der ACC-Deaminase Aktivität

A-C: Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*), **D-F:** *Burkholderia phytofirmans*; **A/D:** Positivkontrolle, **B/E:** ACC-Testplatte, **C/F:** Negativkontrolle

3.1.5 Hemmung von Pilzwachstum (Dualkulturtests)

In so genannten Dualkulturtests oder auch Konfrontationstests wurde überprüft, ob der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm das Wachstum phytopathogener Pilze beeinflussen kann. Dabei wurde der Stamm, wie im Abschnitt 2.3.5 beschrieben, zusammen mit bodenbürtigen Schadpilzen auf PDA- und M9-Agarplatten (Abschnitt 2.2.2) inkubiert. Welche Wirkung Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die ausgewählten Pilze ausübte, ist in der Tabelle 3.1 und der Abbildung 3.3 dargestellt.

Eine deutliche Hemmung des pilzlichen Wachstums in Anwesenheit von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) war bei *Gaeumannomyces graminis* Ggt 13 (auf M9-Medium) und *Pythium ultimum* Isolat Witzenhausen sichtbar. Das Wachstum aller in dieser Arbeit verwendeten Fusarien-Arten mit Ausnahme von *Fusarium coeruleum* wurde durch Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) nicht beeinflusst und das Wachstum von *Phytophthora erythroseptica* sowie *Rhizoctonia solani* wurde nur schwach gehemmt.

Tab. 3.1: Dualkulturtests: Die Tabelle gibt an, welchen Einfluss der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm auf das Wachstum ausgewählter phytopathogener Pilze ausübte.

-: keine Hemmung, ±: Wachstum verlangsamt jedoch keine Hemmung, (+): schwache Hemmung, +: deutliche Hemmung, /: kein Pilzwachstum auf diesem Medium möglich

Phytopathogener Pilz	PDA	M9
<i>Fusarium coeruleum</i>	/	±
<i>Fusarium culmorum</i>	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	/	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	/	-
<i>Fusarium solani</i>	-	-
<i>Gaeumannomyces graminis</i> Ggt 13	(+)	+
<i>Pythium ultimum</i> Witzenhausen	+	+
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	(+)	/
<i>Rhizoctonia solani</i> 1	±	(+)
<i>Rhizoctonia solani</i> 2	±	(+)

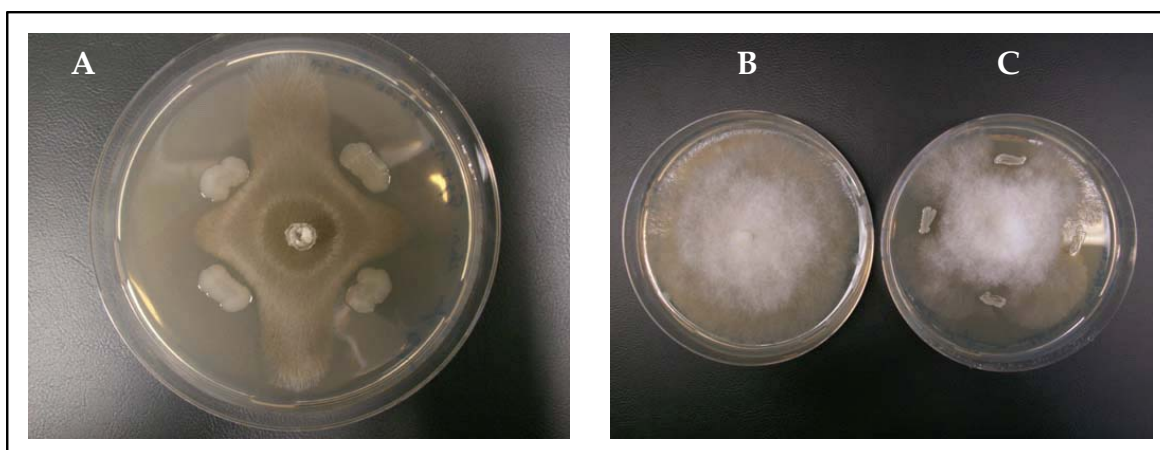


Abb. 3.3: Wirkung des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes auf phytopathogene Pilze

A: *Gaeumannomyces graminis* Ggt 13 auf M9-Agar und **B/C:** *Pythium ultimum* Isolat Witzenhausen auf PDA-Agar (**B:** Kontrolle, auf der nur der Pilz wächst)

3.2 Überprüfung des pflanzenwachstumsfördernden Effekts durch Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)

3.2.1 Anzucht von Gerste im Quarzsandsystem

Zunächst wurden 4 Pflanzen, die mit Proradix® durch Saatgutbeizung behandelt waren und 4 unbehandelte Kontrollpflanzen im unsterilen Quarzsandsystem im Labor angezogen (Abschnitt 2.4.3.1). Nach 3 Wochen Wachstum wurden alle Pflanzen geerntet und ihre Spross- und Wurzellängen sowie die Trockenmassen nach Inkubation bei 70°C bestimmt (Abschnitt 2.4.6).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Proradix® behandelten Pflanzen und den Kontrollen gefunden werden (Abbildungen 7.1 und 7.2 im Anhang). Dieses Experiment wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

3.2.2 Kultivierung von Gerste in Topfexperimenten im Gewächshaus

3.2.2.1 Experimente mit Kultursubstrat

Um die Frage zu beantworten, ob sich die Behandlung mit Proradix® förderlich auf das pflanzliche Wachstum auswirkt, wurde Gerste in Experimenten mit zwei verschiedenen Kultursubstraten und zwei unterschiedlichen Lichtquellen in 7 l Töpfen bis zur Kornreife im Gewächshaus angezogen (Abschnitt 2.4.4). Es wurden durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelte Pflanzen mit nicht inokulierten Kontrollpflanzen verglichen. In allen durchgeführten Experimenten wurden die Anzahl der Ähren pro Topf, das Stroh-, Ähren- und Korngewicht pro Topf sowie das Tausendkorngewicht (TKG) ermittelt.

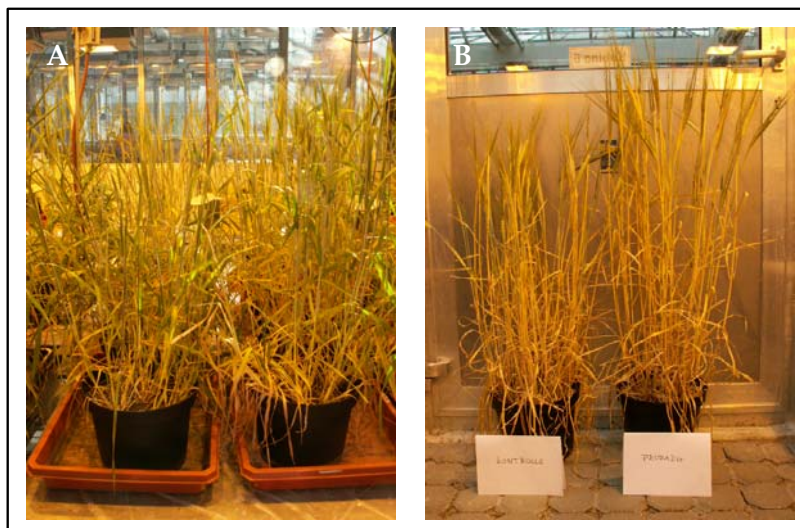


Abb. 3.4: Durchführung von Topfexperimenten im Gewächshaus unter Verwendung von Hochdruck-Natriumdampflampen
 A: Pflanzen nach 13 Wochen Wachstum, B: Vergleich zwischen Kontrolle und Proradix®-Behandlung zum Erntezeitpunkt

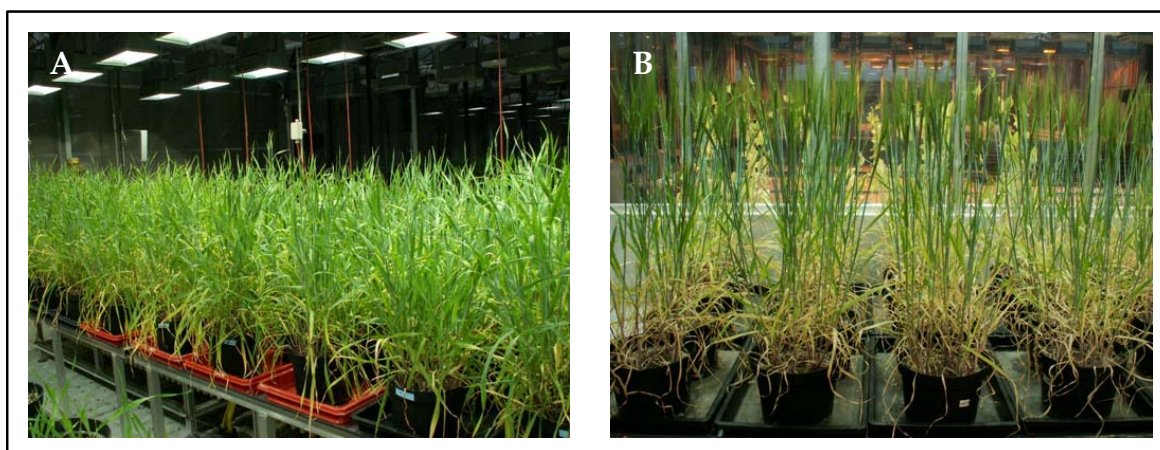


Abb. 3.5: Durchführung von Topfexperimenten im Gewächshaus unter Verwendung von Halogen-Metall-dampflampen
 A: nährstoffreiches Substrat (Ökohum®), B: Mischung (1:1) aus nährstoffreichem Substrat (Ökohum®) und nährstoffarmer Nullerde (Fruhstorfer Erde®)

Ein Teil der Experimente erfolgte unter Verwendung von Hochdruck-Natriumdampflampen Philips SON-T AGRO 400 als Lichtquelle und eines nährstoffreichen Substrats (Ökohum®) mit 6 Pflanzen je Topf. Für fast alle ermittelten Parameter konnten signifikant höhere Werte bei den Pflanzen mit Proradix®-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 3.4 B und 3.6). So nahmen die Anzahl der Ähren und das Strohgewicht pro Topf im Vergleich zur Kontrolle um 44% zu. Nur das Tausendkorngewicht war für die Kontrolle und für die Proradix®-Behandlung gleich und lag bei 43 g.

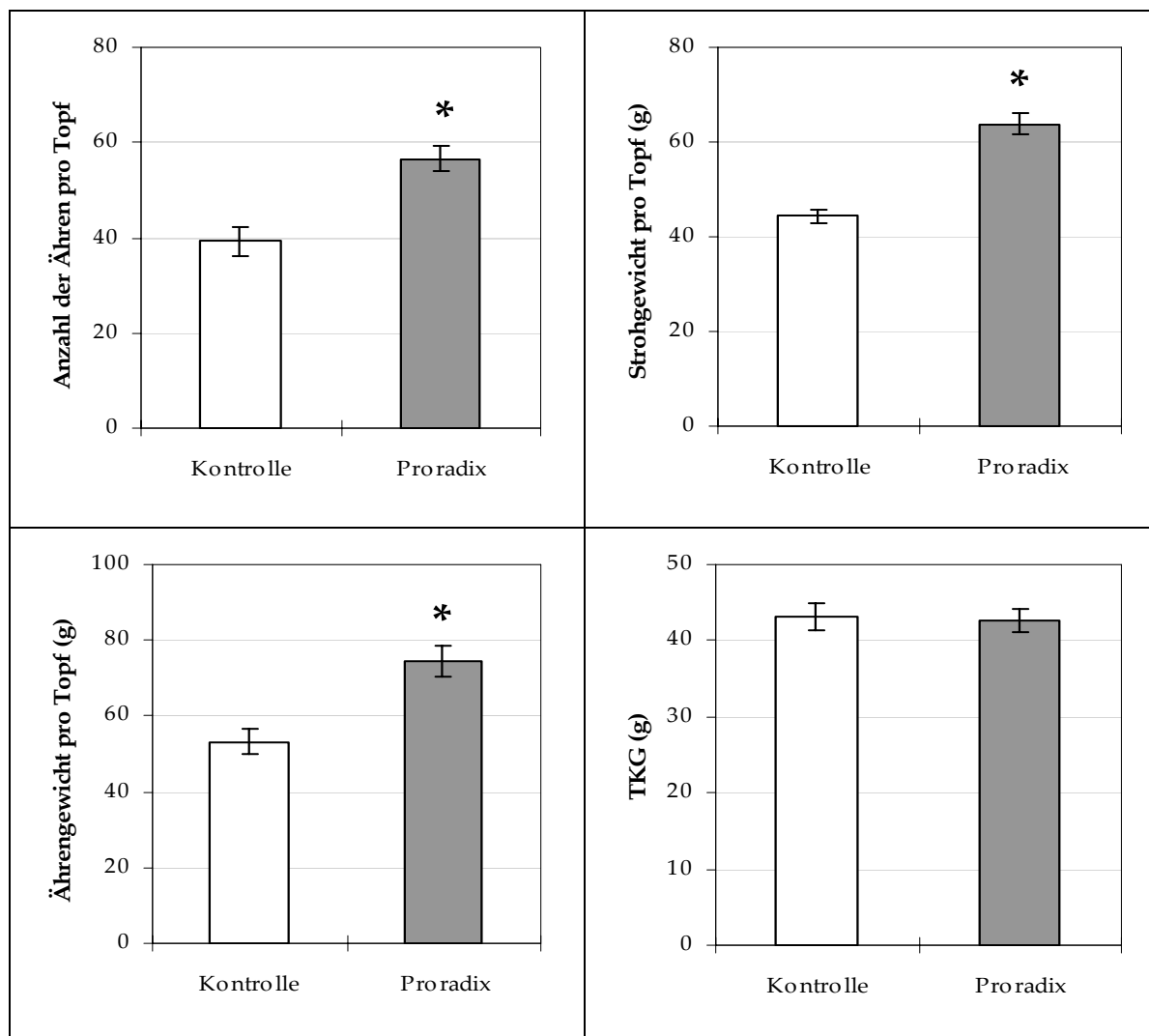


Abb. 3.6: Topfexperiment im Gewächshaus mit Hochdruck-Natriumdampflampen und nährstoffreichem Substrat (Ökohum®): Anzahl der Ähren pro Topf, Stroh-, Ährgewicht pro Topf und Tausendkorngewicht von nicht inokulierten Gerstenpflanzen und durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Pflanzen (6 Pflanzen pro 7 l Topf); Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 4 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

An den Gerstenpflanzen traten jedoch starke Mangelerscheinungen auf (Abbildung 3.4 A). Dieser Zustand konnte durch Düngergaben in verschiedenen Konzentrationen nicht verändert werden. Demzufolge wurde die Beleuchtung ausgetauscht und so kamen Halogen-Metallampfen Osram HQI-TS 400 W/D in allen Folgeexperimenten zum Einsatz (Abbildung 3.5). Das Wachstum der Gerste verbesserte sich deutlich.

Zunächst wurde ein Versuch mit Halogen-Metallampfen und optimaler Nährstoffversorgung (Ökohum® Substrat, zusätzliche Nährstoffzufuhr durch Düngung, Abschnitt 2.4.4.1)) mit 5 Pflanzen pro Topf in dreifacher Wiederholung im Abstand von einem

Monat durchgeführt. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Kontrollpflanzen fällt im Vergleich zum vorherigen Experiment auf, dass unter diesen Bedingungen in allen drei Versuchsansätzen deutlich höhere Ergebnisse für alle untersuchten Parameter erzielt wurden. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Proradix®-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 3.7).

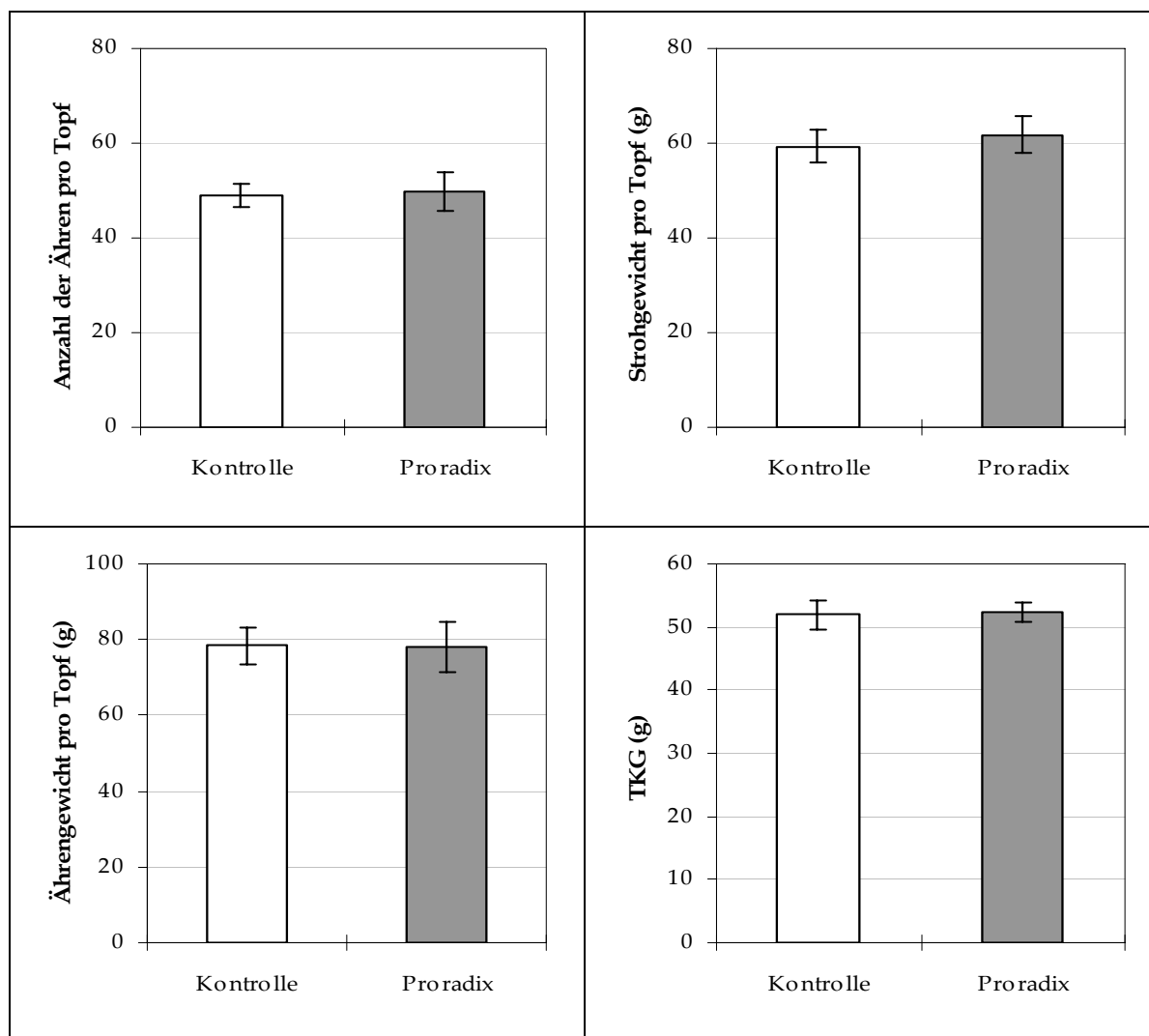


Abb. 3.7: Topfexperiment im Gewächshaus mit Halogen-Metaldampflampen und nährstoffreichem Substrat (Ökohum®): Anzahl der Ähren pro Topf, Stroh-, Ährengewicht pro Topf und Tausendkorngewicht von nicht inokulierten Gerstenpflanzen und durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Pflanzen (5 Pflanzen pro 7 l Topf); Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 8 Wiederholungen an. Unterschiede sind nicht signifikant.

In einem weiteren Experiment wurden Nährstoffmangelbedingungen erzeugt. Es wurde eine nährstoffarme Nullerde (Fruhstorfer Erde®, Abschnitt 2.4.4.1) verwendet und nur die Hälfte der für Versuche mit Nährstoffreichtum eingesetzten Düngermenge verabreicht. Die Ährenanzahl, das Stroh-, Ähren- und Korngewicht und auch das Tausendkorn-

gewicht verringerten sich in diesem Experiment verglichen mit den vorhergehenden Versuchsansätzen unter Nährstoffreichtum sehr deutlich. Dabei konnte ein signifikanter wachstumsstimulierender Effekt durch Proradix® nachgewiesen werden (Abbildung 3.8). Für die Anzahl der Ähren pro Topf konnte eine Zunahme um 24% im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. Es ergab sich eine Steigerung um 29% für das Strohgewicht und um 16% für das Ährgewicht verglichen mit den nicht inokulierten Kontrollen. Bei den mit Proradix® behandelten Pflanzen wurde ein nicht signifikant geringeres Tausendkorngewicht gegenüber den Kontrollpflanzen bestimmt.

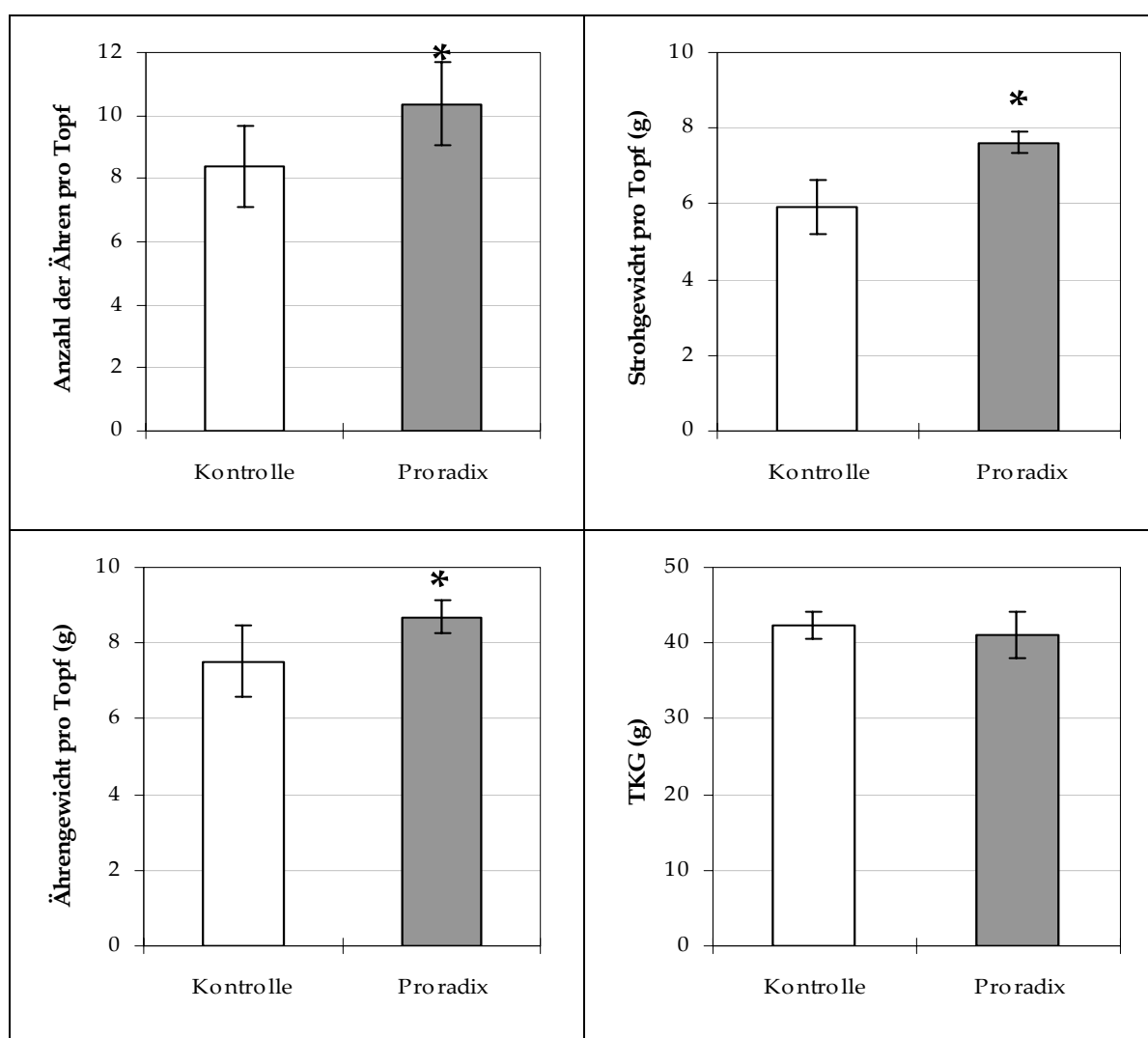


Abb. 3.8: Topfexperiment im Gewächshaus mit Halogen-Metaldampflampen und nährstoffarmer Nullerde (Fruhstorfer Erde®): Anzahl der Ähren pro Topf, Stroh-, Ährgewicht pro Topf und Tausendkorngewicht von nicht inokulierten Gerstenpflanzen und durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Pflanzen (5 Pflanzen pro 7 l Topf); Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 8 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

Im darauf folgenden Versuch wurden nährstoffreiches Substrat (Ökohum®) und nährstoffarme Nullerde (Fruhstorfer Erde®) im Verhältnis 1:1 gemischt und wie im vorherigen Experiment unter Nährstoffmangelbedingungen gedüngt. Die Ergebnisse in der Abbildung 3.9 zeigen eine signifikant höhere Ährenzahl mit einer Zunahme um 18%, während für das Stroh- und das Ährgewicht pro Topf nur eine leichte, nicht signifikante Steigerung um 4% bzw. 6% bei der mit Proradix® behandelten Gerste zu verzeichnen war. Das Tausendkorngewicht nahm fast identische Werte sowohl für die Kontroll- als auch die Proradix®-Pflanzen an.

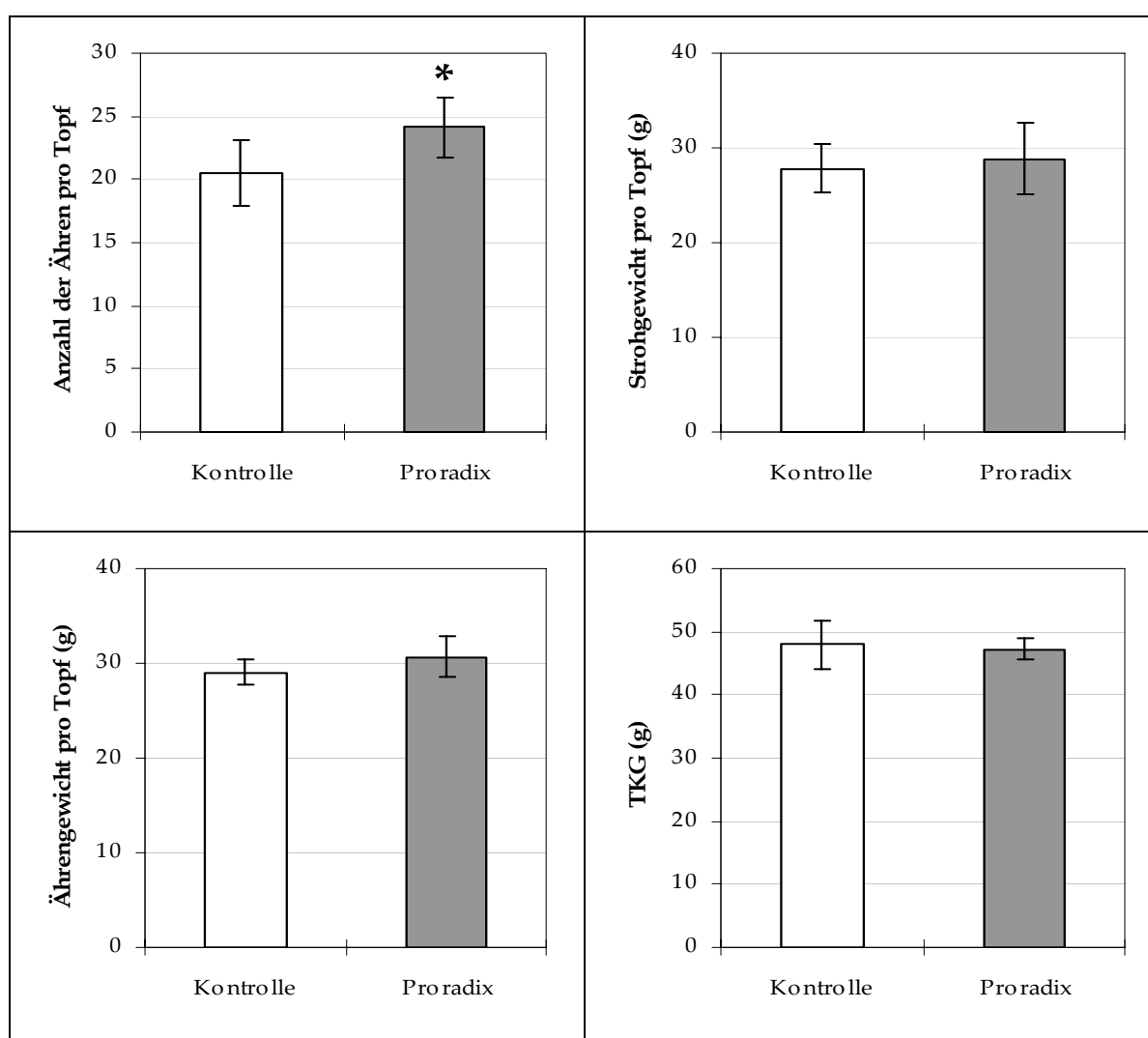


Abb. 3.9: Topfexperiment im Gewächshaus mit Halogen-Metall dampflampen und einer Mischung (1:1) aus nährstoffreichem Substrat (Ökohum®) und nährstoffarmer Nullerde (Fruhstorfer Erde®): Anzahl der Ähren pro Topf, Stroh-, Ährgewicht pro Topf und Tausendkorngewicht von nicht inokulierten Gerstenpflanzen und durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Pflanzen (5 Pflanzen pro 7 l Topf); Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 8 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

3.2.2.2 Experimente mit Ackerboden

Darüber hinaus wurden jeweils **drei Pflanzen in 2,5 l Töpfen** befüllt mit Ackerboden vom Schlag A21 des HMGU-Versuchsgutes in Scheyern unter den im Abschnitt 2.4.4 genannten Gewächshausbedingungen und Verwendung von Hochdruck-Natriumdampflampen angezogen. Nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Wochen Wachstum wurden je drei Töpfe geerntet und die Sprosslängen sowie die Trockenmassen (70°C) der Sprosse und Wurzeln von nicht inokulierten Kontrollpflanzen und durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Pflanzen ermittelt. Für die Bestimmung der Trockenmassen wurden die drei Sprosse bzw. die drei Wurzeln je Topf vereinigt. In den Abbildungen 3.10-3.12 ist erkennbar, dass in der ersten Wachstumsphase von Spross und Wurzel noch keine sichtbare Wachstumsstimulierung durch Proradix® stattfand. Nach 1, 2 und 3 Wochen Wachstum wurden annähernd gleiche Trockenmassen für Kontroll- und Proradix®-Pflanzen gemessen. Im weiteren Verlauf verringerten sich sogar die Trockenmassen vom Spross und der Wurzel der mit Proradix® behandelten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle. Erst nach 10 Wochen konnte eine leichte Tendenz zur Erhöhung des Spross- und Wurzelgewichts bei der mit Proradix® behandelten Gerste festgestellt werden.

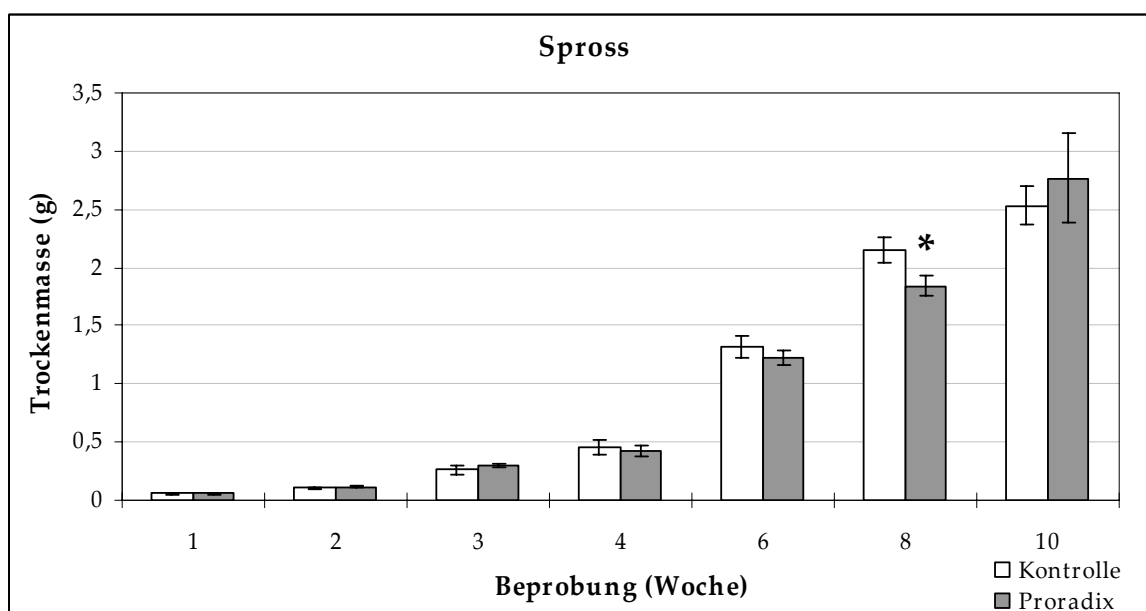


Abb. 3.10: Sprosstrockenmassen von bis zu 10 Wochen im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus angezogenen Gerstenpflanzen, deren Samen unbehandelt bzw. mit Proradix® gebeizt waren (3 Pflanzen pro 2,5 l Topf). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 3 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

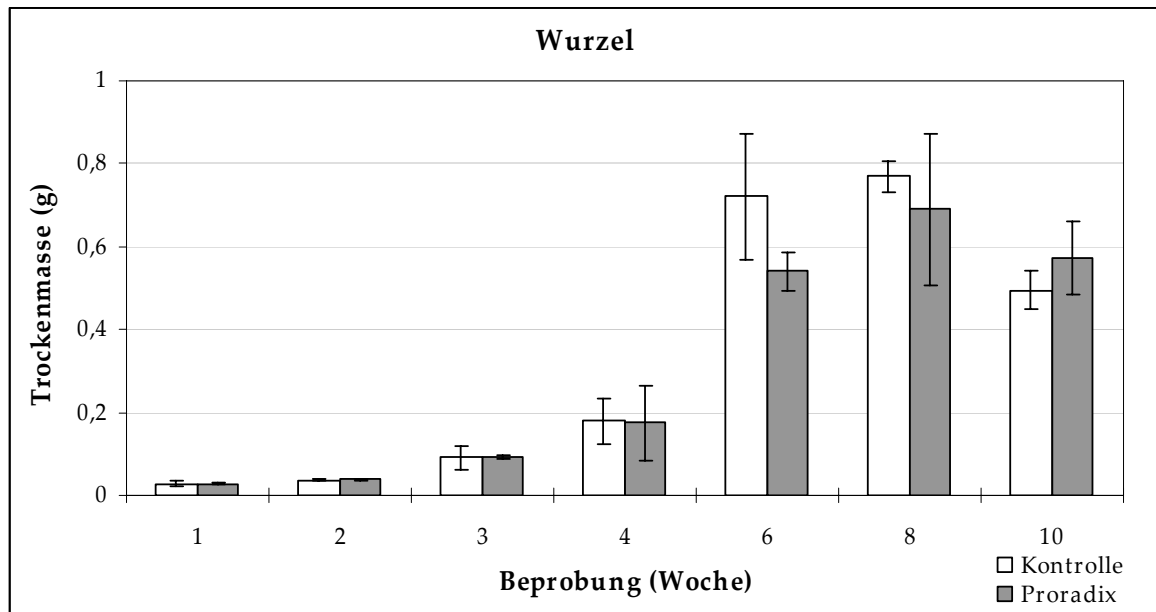


Abb. 3.11: Wurzeltrockenmassen von bis zu 10 Wochen im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus angezogenen Gerstenpflanzen, deren Samen unbehandelt bzw. mit Proradix® gebeizt waren (3 Pflanzen pro 2,5 l Topf). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 3 Wiederholungen an. Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) nicht signifikant.

Die Sprosslängen zeigten einen ähnlichen Verlauf, wobei eine geringe Zunahme bei der Proradix®-Behandlung bereits nach 8 Wochen zu sehen war.

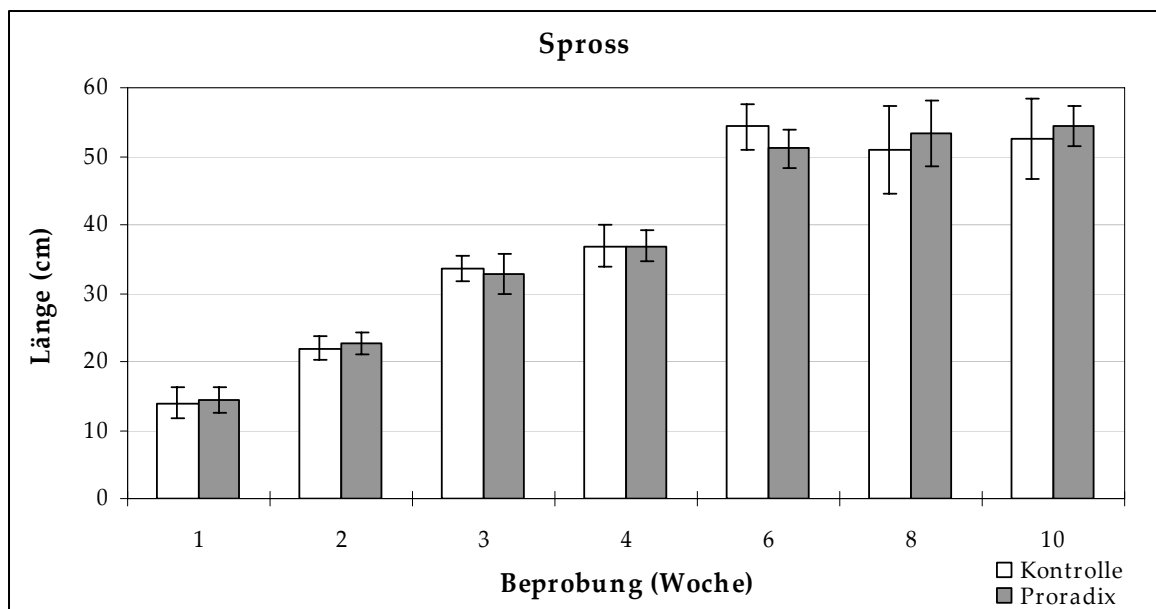


Abb. 3.12: Sprosslängen von bis zu 10 Wochen im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus angezogenen Gerstenpflanzen, deren Samen unbehandelt bzw. mit Proradix® gebeizt waren (3 Pflanzen pro 2,5 l Topf). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 9 Messungen an. Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) nicht signifikant.

Zur Untersuchung von **Einzelpflanzen** wurde der Ackerboden in 400 cm³ Töpfe gefüllt. Die Ernte der Gerste erfolgte bereits nach 8 Wochen, da diese Töpfe aufgrund der geringen Bodenmenge und eines begrenzten Nährstoffangebots eine längere Anzucht nicht zuließen. In mehreren Versuchsansätzen wurden nicht inokulierte Gerstenkeimlinge als Kontrollen und Keimlinge von mit Proradix® gebeizten Samen verwendet. Zusätzlich wurden zunächst unbehandelte Keimlinge und Keimlinge der durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten Samen mit der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellsuspension (10⁸ Zellen/ml, Abschnitt 2.4.2.2) inokuliert. Innerhalb dieser Experimente konnte nach 8 Wochen kein pflanzenwachstumsfördernder Effekt nach Applikation von Proradix® beobachtet werden (siehe Abbildungen 7.3 und 7.4 im Anhang).

Die innerhalb der im Gewächshaus durchgeführten Topfexperimente erzielten Ergebnisse zeigen, dass unter optimalen Wachstumsbedingungen kein wachstumsstimulierender Effekt durch Proradix® nachweisbar war. Wurde Gerste jedoch unter Mangelbedingungen, zum Beispiel das Licht- oder Nährstoffangebot betreffend, angezogen, so wurden sowohl mehr Ähren mit einer größeren Masse gebildet als auch das Sprossgewicht erhöht. Dieser Effekt konnte noch nicht nach 8 Wochen Wachstum, sondern erst am Ende einer kompletten Vegetationsperiode, welche die vollständige Kornreife einschließt, beobachtet werden.

3.2.3 Parzellenversuche mit Gerste im Feldmaßstab

Neben den Topfexperimenten im Gewächshaus wurden praxisbezogen Parzellenversuche mit Gerste auf verschiedenen ökologisch oder integriert bewirtschafteten Schlägen des vom Helmholtz Zentrum München betriebenen Versuchsgutes des Klosters Scheyern durchgeführt (Abschnitt 2.4.5). Dabei wurden die in den Abbildungen 3.14 und 3.15 dargestellten Erträge ermittelt.



Abb. 3.13: Durchführung von Parzellenversuchen mit Gerste auf dem vom Helmholtz Zentrum München betriebenen Versuchsgut des Klosters Scheyern in den Jahren 2006 und 2007

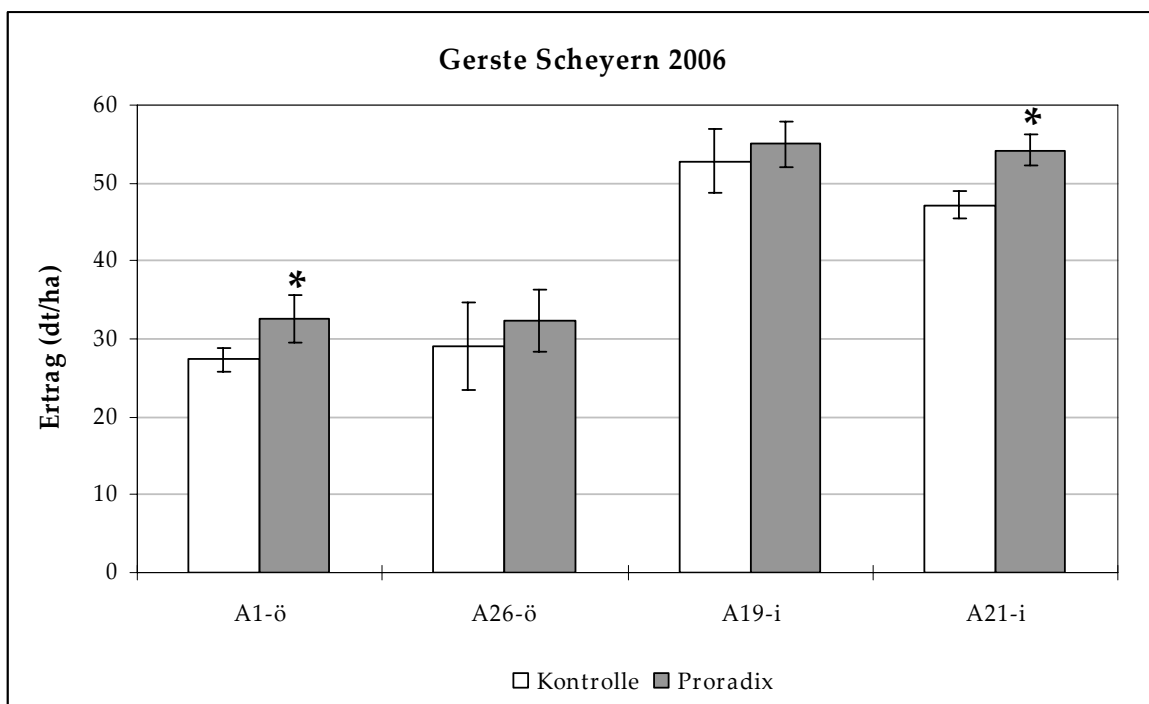


Abb. 3.14: Parzellenversuche auf den Schlägen A1, A26, A19 und A21 des Versuchsgutes in Scheyern im Jahr 2006: Erträge von Gerste mit und ohne Proradix-Behandlung; Mit „ö“ ist die ökologische, mit „i“ die integrierte Bewirtschaftung bezeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 4 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

Im Jahr 2006 führte der Einsatz von Proradix® zu einer signifikanten Ertragssteigerung um 19% auf dem ökologisch bearbeiteten Schlag A1 und um 15% auf dem integriert bewirtschafteten Schlag A21. An den übrigen beiden Standorten war eine leichte, nicht signifikante Tendenz zur Erhöhung des Ertrags in den Proradix® behandelten Beständen

zu erkennen, wobei das vermehrte Auftreten der Ackerkratzdistel das Wachstum der Gerste auf dem Schlag A26 beeinträchtigte.

Das Jahr 2007, welches durch eine sehr ausgeprägte Trockenheitsphase gekennzeichnet war, erbrachte insgesamt um bis zu 50% erniedrigte Erträge (Vergleich Abbildungen 3.14 und 3.15). Auf dem integrierten Schlag A19 war eine signifikante Zunahme des Ertrags um 13% für die mit Proradix® behandelte Gerste zu verzeichnen (Abbildung 3.15), während auf den weiteren drei Schlägen keine Mehrerträge durch Proradix®-Behandlung festgestellt werden konnten. In den ökologisch bearbeiteten Parzellen wurden die Gerstenerträge von einem starken Unkrautdruck durch die Ackerkratzdistel beeinflusst (Abbildung 3.17 B). Insgesamt wurden in beiden Jahren im integrierten Anbau bis zu doppelt so hohe Erträge verglichen mit der ökologischen Bewirtschaftung erreicht.

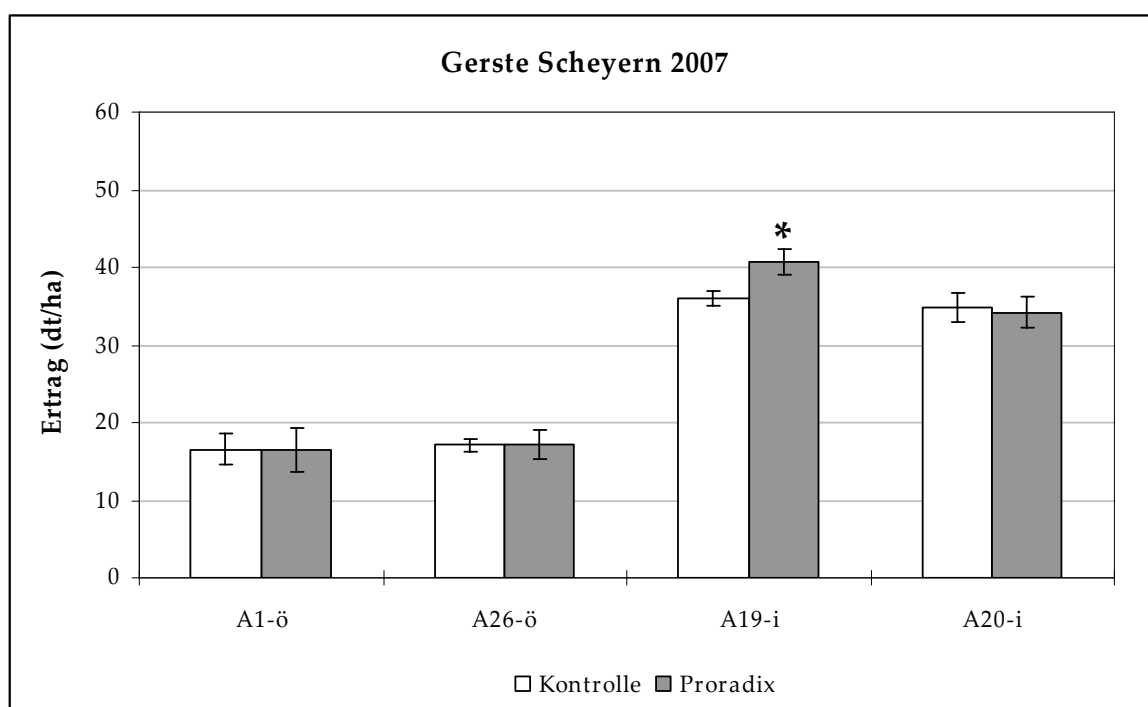


Abb. 3.15: Parzellenversuche auf den Schlägen A1, A26, A19 und A20 des Versuchsgutes in Scheyern im Jahr 2007: Erträge von Gerste mit und ohne Proradix-Behandlung; Mit „ö“ ist die ökologische, mit „i“ die integrierte Bewirtschaftung bezeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 8 Wiederholungen an. Signifikante Unterschiede sind nach Durchführung des t-Tests und des Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($\alpha=0,05$) mit * gekennzeichnet.

Im Jahr 2007 bestand die Möglichkeit, einen weiteren Parzellenversuch mit Gerste im Versuchsgut der Technischen Universität München in Roggenstein anzulegen. Bei diesem

Versuch wurden im ökologischen und im integrierten Anbau bis zu doppelt so hohe Erträge im Vergleich mit den Ergebnissen aus Scheyern erreicht. Eine wachstumsfördernde Wirkung durch Proradix® konnte in Roggenstein jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.16). In den Parzellen im TU-Versuchsgut traten kaum Unkrautdruck (Abbildung 3.17 A) und kaum Pathogendruck auf.

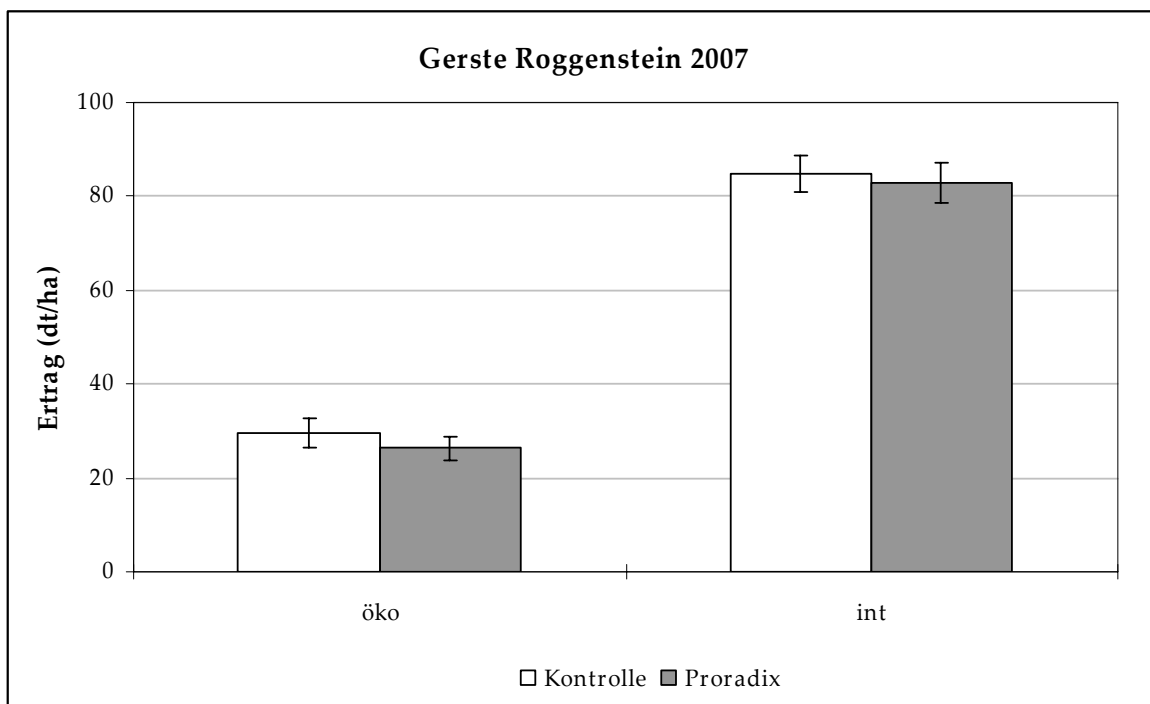


Abb. 3.16: Parzellenversuch im TU-Versuchsgut in Roggenstein im Jahr 2007: Erträge von Gerste mit und ohne Proradix-Behandlung; Mit „öko“ ist die ökologische, mit „int“ die integrierte Bewirtschaftung bezeichnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 8 Wiederholungen an. Unterschiede sind nicht signifikant.

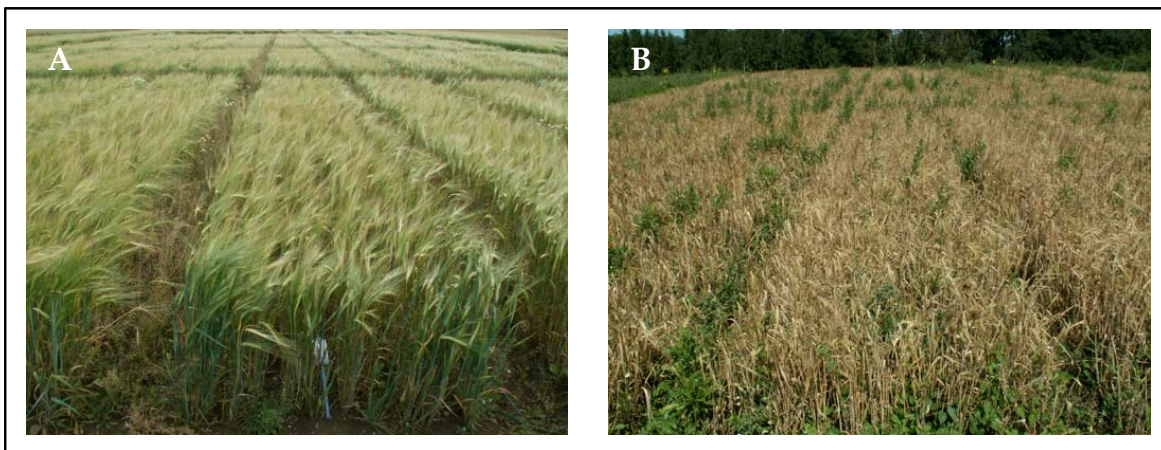


Abb. 3.17: Vergleich der Parzellen mit ökologischer Bewirtschaftung im TU-Versuchsgut in Roggenstein (A) und im HMGU-Versuchsgut in Scheyern (B) im Jahr 2007

Zur Untersuchung des Nährstoffgehalts wurden Bodenproben von allen Parzellenstandorten in Scheyern und Roggenstein analysiert (Abschnitt 2.4.5). Die Ergebnisse der Bodenanalysen sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2: Nährstoffgehalt der Böden in den Versuchsgütern in Scheyern und Roggenstein, auf denen Parzellenversuche innerhalb der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Mit „öko“ ist die ökologische, mit „int“ die integrierte Bewirtschaftung bezeichnet.

Schlag	Versuch/Jahr	C (%)	N (%)	P (g/kg)	K (g/kg)	Mg (g/kg)
A1	Gerste öko/2006	1,38	0,142	0,728	0,974	1,85
A26	Gerste öko/2006	1,61	0,175	0,663	1,00	1,97
A19	Gerste int/2006	1,24	0,127	0,797	1,47	3,28
A21	Gerste int/2006	1,07	0,125	0,614	1,50	3,32
A1	Gerste öko/2007	1,22	0,134	0,802	1,18	2,26
A26	Gerste öko/2007	1,16	0,132	0,578	1,34	2,35
A19	Gerste int/2007	1,85	0,175	1,34	1,88	3,49
A20	Gerste int/2007	1,70	0,177	0,738	1,58	3,33
Roggenstein	Gerste öko/2007	1,71	0,162	0,791	2,46	3,99
Roggenstein	Gerste int/2007	1,70	0,189	0,752	2,10	3,92

Verglichen mit den Schlägen in Scheyern wurden für Roggenstein deutlich höhere Kalium- und Magnesiumkonzentrationen ermittelt. In Scheyern ist das Nährstoffangebot der Böden der Parzellenstandorte im integrierten Anbau im Vergleich zur ökologischen Bewirtschaftung nachweisbar erhöht. Dies zeigen die Werte für Kalium und Magnesium im integrierten Anbau in beiden Versuchsjahren und für Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphat im Jahr 2007. Der Boden in Roggenstein hingegen ist durch gleich große Nährstoffkonzentrationen sowohl für die Parzellen mit integrierter als auch mit ökologischer Bewirtschaftung gekennzeichnet.

3.3 Besiedlung von Gerstenwurzeln durch den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm - Untersuchungen mit FISH und spezifischer GFP-Markierung

3.3.1 Inokulation von Gerstenkeimlingen

Zur Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) an Gerstenwurzeln wurden mit Proradix® gebeizte Samen (Abschnitt 2.4.2.1) verwendet oder zwei Tage alte Keimlinge in 40 ml einer Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellsuspension mit 10^8 Zellen pro ml inokuliert (Abschnitt 2.4.2.2). Um Keimlinge in ausreichender Anzahl präparieren zu können, wurden zunächst unbehandelte Samen in Petrischalen mit 20 ml H_2O_{reinst} , in Petrischalen, welche ein mit 10 ml H_2O_{reinst} befeuchtetes Zellstofftuch enthielten oder auf Wasseragarplatten gelegt und bei 30°C ohne Licht inkubiert. In H_2O_{reinst} war nach 2 Tagen keine Keimung zu beobachten. Auf dem befeuchteten Zellstofftuch keimten die Samen sehr gut, jedoch bereitete das Ablösen der Keimlinge vom Zellstoff ohne deren Beschädigung Schwierigkeiten. So erwies sich zum Auskeimen nicht sterilisierter Samen die Inkubation auf Wasseragarplatten (Abschnitt 2.4.2.2) als erfolgreichster Ansatz und wurde folglich für weitere Inokulationen gewählt.

Nach Optimierung und Auswahl der Keimlinge wurden zwei verschiedene Möglichkeiten der Inokulation getestet. Einerseits wurden Gerstenkeimlinge, wie im Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben, in 40 ml der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellsuspension bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert und anschließend in Quarzsand oder Boden eingesetzt. Andererseits wurden unbehandelte Keimlinge in das Quarzsandsystem oder in Töpfe mit unsterilem Boden gebracht und nach zwei Tagen Wachstum wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit 10^8 Zellen/ml auf die Wurzeln pipettiert. Mit der ersteren Inokulationsmethode konnten die Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen eindeutig und in größerer Zahl als mit der Inokulationsmethode 2 auf den Gerstenwurzeln mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie detektiert werden. Dementsprechend wurden zur Inokulation alle Keimlinge in den folgenden Experimenten in 40 ml Zellsuspension für zwei Stunden inkubiert.

3.3.2 *In situ* Detektion von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Abschnitt 2.5.10) wurde an Wurzeln von Gerstenkeimlingen, deren Samen durch die Saatgutbeizung mit Proradix® behandelt wurden und die für 2 Wochen im Quarzsand oder im Ackerboden unter unsterilen Bedingungen wuchsen, durchgeführt. Bei der Hybridisierung von etwa 2 cm langen Wurzelabschnitten aus allen Bereichen der Wurzel wurde die fluoreszenzmarkierte, speziesspezifische Oligonukleotidsonde PSE-225 zusammen mit der γ -Proteobacteria spezifischen Sonde GAM-42A (mit Kompetitor) und/oder einer äquimolaren Mischung der Sonden EUB-338-I, II und III (EUB-mix), die die meisten bekannten, der Domäne *Bacteria* zugerechneten Sequenzen erfasst, verwendet. Die von der Sonde PSE-225 erfassten Bakterien sind in der Tabelle 3.3 dargestellt.

Pseudomonas-Zellen konnten in großer Zahl vor allem in der Wurzelhaarzone von Wurzeln aus dem Quarzsandsystem nachgewiesen werden (Abbildung 3.18). Dabei handelte es sich jedoch nicht nur um Zellen des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes, da an Wurzeln von Kontrollpflanzen ohne Proradix®-Saatgutbeizung ebenso Pseudomonaden, die sicherlich von der Oberfläche der nicht sterilisierten Samen stammten, erfasst wurden.

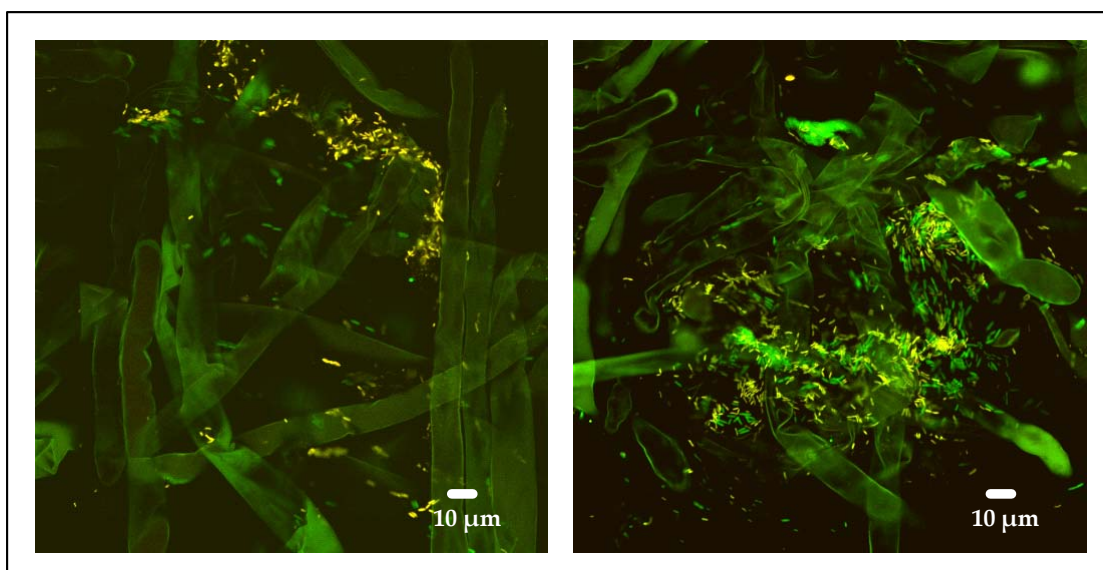


Abb. 3.18: Wurzelhaarzone von mit Proradix® durch Saatgutbeizung behandelten Gerstenpflanzen nach 2 Wochen Wachstum im Quarzsandsystem unter unsterilen Bedingungen. Die *in situ* Hybridisierung erfolgte mit den Sonden EUB-338-mix-Fluos und PSE-225-Cy3, wodurch *Pseudomonas*-Zellen in gelb und alle weiteren Bakterienzellen in grün erschienen.

Tab. 3.3: Sequenzvergleich der Sondensequenz der Oligonukleotidsonde PSE-225 mit den Bindungsregionen aller im verwendeten Datensatz an SSU rRNS vorhandenen Sequenzen. Dargestellt sind die Vertreter, die bis zu 2 Basenfehlpaarungen in ihrer Zielregion zur Sondensequenz aufweisen. Die Berechnung erfolgte mit dem im Programmpaket ARB enthaltenen Tool „probe match“.

Oligonukleotidsonde PSE-225 Sondensequenz Sequenz der Sondenbindungsstelle	5´ -CCGACCTAGGCTCATCTA- 3´ 5´ -UAGAUGAGCCUAGGUCGG- 3´
Proradix® (<i>P. fluorescens</i>)	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Agrobacterium agile</i>	UCGCGCCAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	UUGCGCUAA-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas flavescens</i>	UUGCGCUAA-=====-AUUAGUUAG
<i>Azomonas insignis</i>	UUGCGCUAA-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	UCGCGCCAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas guinea</i>	UCGCGCCAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	UCGCGCCAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UCACGCUAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas mendocina</i>	UCGCGCCAU-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	UUGCGCUAA-=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas straminea</i>	UUGCGCUAA-=====-AUUAGCUUG
<i>Pseudomonas putida</i> F1	UUGCGCUAU-=====-AUUAGCUAG
P4III8	UUGCGCCAU-C=====-AUUAGCUAG
P2III14	UUGCGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas putida</i>	UUGCGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UCACGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas montelii</i>	UUGCGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Bacillus</i> sp. NY27	UUGCGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas poae</i>	UUGCGCUAU-C=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas</i> sp. L54	UUGCGCUAU-C=N=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UCACGCUAU-C=N=====-NUUAGNUAG
<i>Pseudomonas</i> sp. K94.23	UUGCGCUAU-C=N=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas</i> sp. S3-24	UUGCGCUAU-C=N=====-AUUAGCUAG
<i>Flavobacterium lutescens</i>	UCACGCUAU-CN=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas syringae</i>	UUGCGCUAU-C=====N=====AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas entomophila</i>	UUGCGCUAU-C=N=====-AUUAGCUAG
<i>Pseudomonas</i> sp. C9B1	UCACGCUAU- =g====g=====AUUAGCUAG
<i>Azotobacter chroococcum</i>	UCACGCUAU-Cg=====AUUAGCUAG

Im Bodensystem wurden kaum fluoreszenzmarkierte Bakterienzellen gefunden, da sich fest an der Wurzeloberfläche anhaftende Bodenpartikel des lehmigen Ackerbodens (Abschnitt 2.4.4.2) aufgrund ihrer starken Autofluoreszenz bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie störend auswirkten.

3.3.3 Detektion von GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen

Um Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen an den Gerstenwurzeln zu lokalisieren und ihr Besiedlungsverhalten weiterführend zu analysieren, wurden als zusätzliche Methode ausgekeimte, unbehandelte oder oberflächensterilisierte Samen mit dem GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm inokuliert. Die Pflanzen wurden im axenischen bzw. unsterilen Quarzsandsystem (Abschnitt 2.4.3.1) oder in Töpfen mit unsterilem Ackerboden (Abschnitt 2.4.4.2) angezogen und nach 1, 2, 3 oder 4 Wochen geerntet. Der Einsatz des GFP-markierten Stammes ermöglichte es, frisch geerntete Wurzeln (Abschnitt 2.4.6) ohne weitere Behandlungen (Abschnitt 2.6.2.1) sofort zu mikroskopieren und die Bakterienzellen in intaktem Wurzelgewebe zu detektieren.

An zahlreichen verschiedenen Wurzelpräparaten konnten GFP-markierte Zellen vom älteren Teil der Wurzel bis hin zur Wurzelspitze in allen Bereichen auf der Wurzeloberfläche gefunden werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen nicht überall auf der Wurzel gleichmäßig verteilt vorkommen, sondern eher „inselartig“ größere Siedlungsdichten oder Mikrokolonien direkt auf der Wurzeloberfläche oder an Wurzelhaaren detektierbar sind. In einigen Proben war eine starke Besiedlung im Bereich der Wurzelspitze, in anderen Präparaten auf der Wurzeloberfläche älterer Wurzelteile und in der Wurzelhaarzone zu beobachten.

Im axenischen Quarzsandsystem konnten deutlich mehr GFP-markierte Zellen als bei der Anzucht im unsterilen System, in dem weitere, von der Samenoberfläche stammende, konkurrierende Bakterien Siedlungsraum einnahmen, detektiert werden. GFP-markierte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen wurden in mehreren Wurzelquerschnitten

(Abschnitt 2.6.2.2) endophytisch in Wurzelkortexzellen gefunden (Abbildung 3.19). Dieses Phänomen konnte jedoch nur bei der Anzucht unter sterilen Bedingungen beobachtet werden.

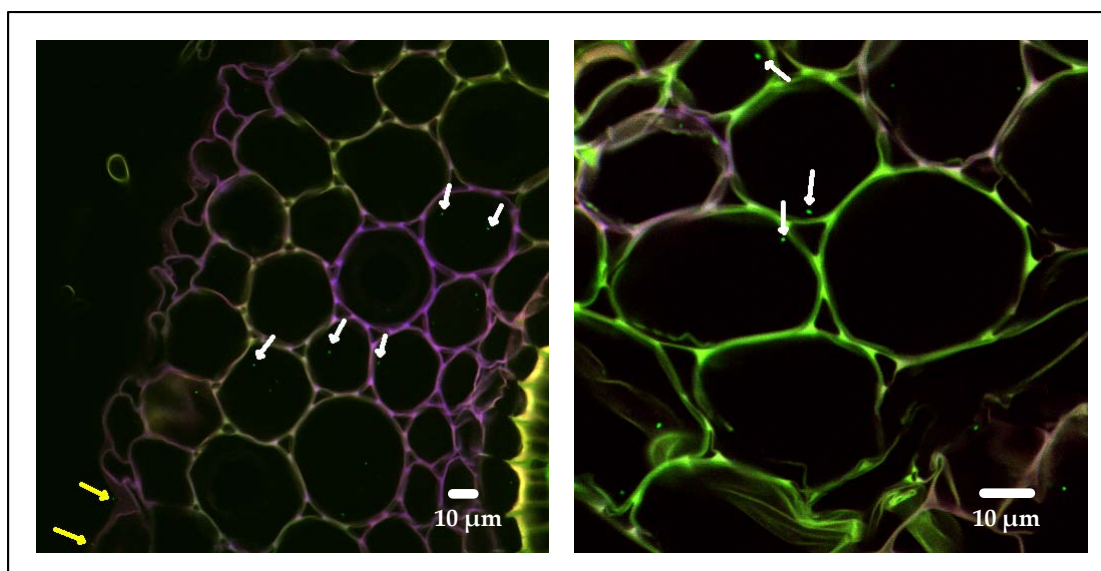


Abb. 3.19: Querschnitt eines älteren Wurzelabschnittes einer Gerstenpflanze, die mit dem GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm inokuliert und nach drei Wochen Wachstum im axenischen Quarzsandsystem geerntet wurde. Die weißen Pfeile heben GFP-markierte Bakterienzellen innerhalb der Wurzelrinde hervor, gelbe Pfeile deuten auf Zellen auf der Wurzeloberfläche.

Beim Vergleich zwischen der Inokulation mit 10^8 Zellen/ml und der Saatgutbeizung mit dem GFP-markierten Stamm war eine stärkere Besiedlung der Wurzeloberfläche nach Inokulation offensichtlich.

Bei der Untersuchung von Wurzeln aus Ackerboden konnte der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm aufgrund der starken GFP-Fluoreszenz trotz Autofluoreszenz anhaftender Bodenpartikel deutlich lokalisiert werden. Selbst nach vier Wochen wurden noch GFP-markierte Zellen gefunden, obwohl die Anzahl detektierbarer Zellen nach drei Wochen deutlich abnahm. Im Bodensystem wurde eine deutlich geringere Besiedlungsdichte der Wurzel verglichen mit der Anzucht im Quarzsandsystem festgestellt. Dennoch konnten auch hier GFP-markierte Zellen auf der Wurzeloberfläche in allen Bereichen der Wurzel, besonders in der Wurzelhaarzone detektiert werden (Abbildung 3.21). Nach der Verwendung saatgutgebeizter Samen waren sehr wenig GFP-markierte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Bakterien auffindbar.

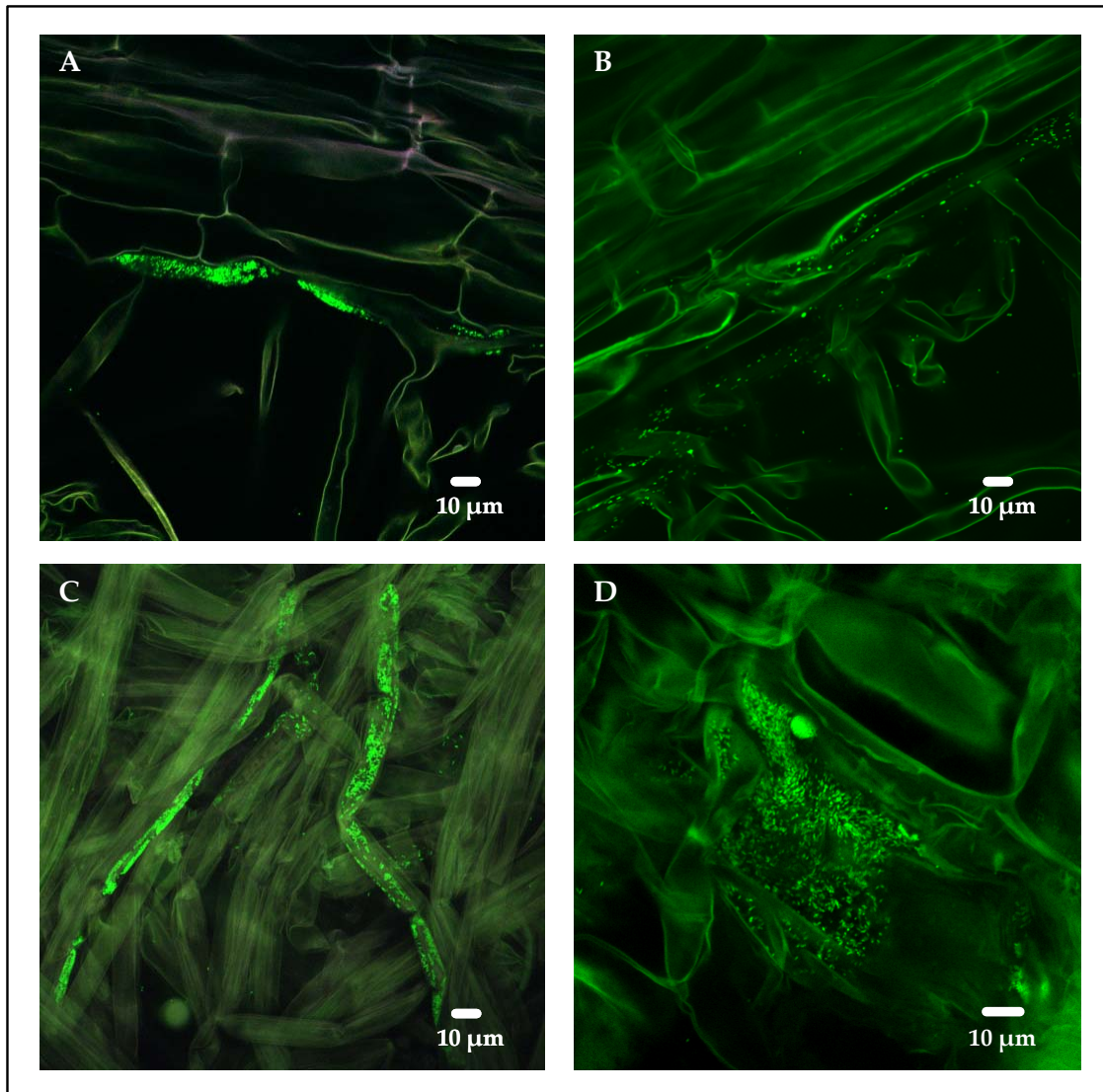


Abb. 3.20: Detektion von GFP-markierten Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen an inokulierten Gerstenwurzeln (siehe Abschnitt 2.4.2.2), die für drei Wochen im Quarzsandsystem unter sterilen (A) bzw. unsterilen (B-D) Bedingungen angezogen wurden.

A: Lokale Ansammlung GFP-markierter Zellen direkt auf der Wurzeloberfläche in der Wurzelhaarzone, B: Besiedlung der Oberfläche in der Wurzelhaarzone, C: Dichte Besiedlung der Oberfläche von Wurzelhaaren eines jungen Wurzelabschnittes, D: An einigen Stellen konnten GFP-markierte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen mit hohen Siedlungsdichten gefunden werden.

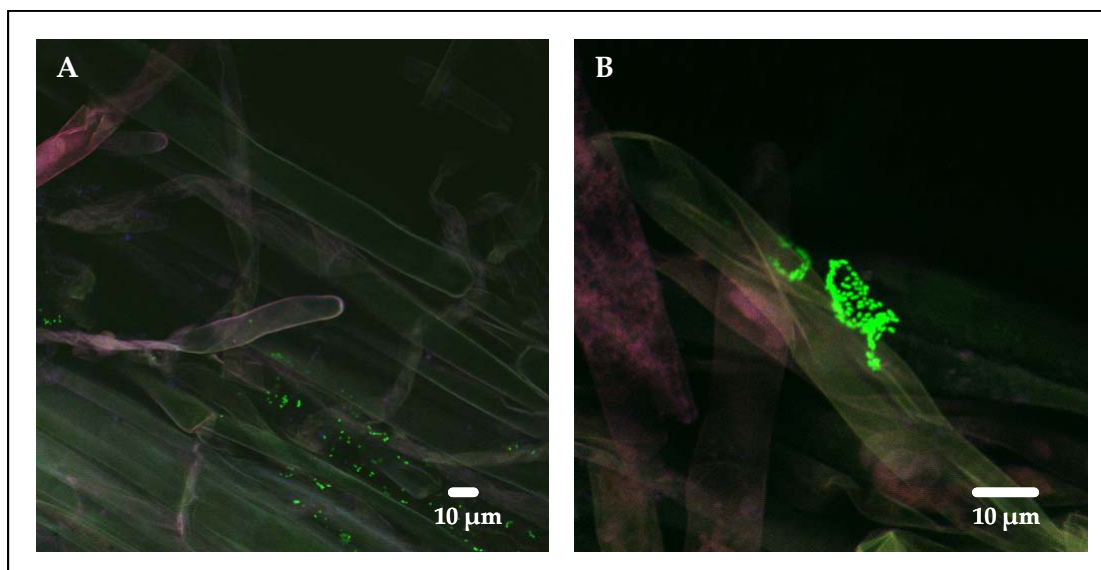


Abb. 3.21: Lokalisierung GFP-markierter Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen im unsterilen Ackerbodensystem. Die gezeigten Gerstenwurzeln wurden, wie im Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben, inokuliert und wuchsen für zwei Wochen im Gewächshaus (Abschnitt 2.4.4.2). **A:** GFP-markierte Zellen auf der Wurzeloberfläche in der Wurzelhaarzone, **B:** Zellansammlung auf der Oberfläche eines Wurzelhaares

3.4 Untersuchung der Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft mit molekularen Fingerprinting-Methoden

3.4.1 Isolierung der Gesamt-DNS aus Rhizosphärenproben für die T-RFLP-Analyse

Um zu untersuchen, ob und wie sich Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre von Gerste auswirkt, wurden in dieser Arbeit T-RFLP-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Wurzeln von Gerstenpflanzen geerntet und die Gesamt-DNS aus den Rhizosphärenproben unter Verwendung des *Fast DNA® SPIN Kit for Soil* isoliert (Abschnitt 2.5.2.1). Dieses Kit ermöglichte die effiziente Extraktion von DNS aus Umweltproben, wobei störende Kontaminanten, wie Huminsäuren, eliminiert wurden. Huminsäuren binden stark an Nukleinsäuren und können bei der Anwendung klassischer Extraktions-

methoden mit isoliert werden und folgende Analysen beeinträchtigen. Von im Quarzsandsystem oder im Ackerboden gewachsenen Gerstenwurzeln lagen die Ausbeuten der aus jeweils 500 mg zerriebenem Wurzelmaterial extrahierten und in 52 μl DES gelösten Gesamt-DNS in den Bereichen von 32 bis 122 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Quarzsand) und 41 bis 235 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Ackerboden).

Für die DNS-Isolierung aus bakteriellen Reinkulturen wurde ebenfalls das *Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil* eingesetzt. Dabei konnten höhere Mengen an extrahierbarer DNS gewonnen und Werte von 399 bis 540 $\text{ng}/\mu\text{l}$ erreicht werden.

3.4.2 Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS für die folgende T-RFLP-Analyse

Zur Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS für die T-RFLP-Analyse wurden der fluoreszenzmarkierte Primer Ba27-F und der Primer 907-R verwendet (Abschnitte 2.5.7.1 und 2.5.9.1, Tabelle 2.4). Zunächst waren einige Optimierungsschritte notwendig. Dazu wurden verschiedene MgCl_2 - und DMSO-Konzentrationen, jeweils 1 bis 6 μl pro PCR-Ansatz, getestet. Dabei wurden für MgCl_2 6 μl und für DMSO 3 μl je PCR-Ansatz als optimale Mengen ermittelt. Der zusätzliche Einsatz von BSA führte zu keiner sichtbaren Verbesserung. Die Konzentration der gelösten Primer betrug 50 $\text{pmol}/\mu\text{l}$. Anfangs wurde je 1 μl beider Primer pro PCR-Ansatz verwendet. Im weiteren Verlauf wurde die Primerzugabe jedoch auf 0,5 μl pro PCR-Ansatz reduziert.

Für die Ermittlung der optimalen Template-DNS-Konzentration wurden Konzentrationsreihen mit 10 bis 70 $\text{ng}/\mu\text{l}$ DNS angesetzt. Nach Durchführung der PCR und der anschließenden Agarosegelelektrophorese wurden mit zunehmender Template-DNS-Konzentration neben dem spezifischen PCR-Produkt auch unspezifische Amplifikate sichtbar (Abbildung 3.22 A). Demzufolge wurden zur Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS für die T-RFLP alle DNS-Lösungen auf eine Konzentration von 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die PCR mit zunächst 30 Zyklen führte zur Entstehung von PCR-Artefakten (Abbildung 3.22 B). Daraufhin wurde die PCR mit 20, 23 sowie 25 Zyklen durchgeführt (Abbildung 3.22 C) und schließlich wurden meist 23 Zyklen gewählt (Abbildung 3.22 D). Die

Zyklusanzahl wurde jedoch je nach Ausgangs-DNS-Isolat geringfügig in einem Bereich von 23 bis 27 Zyklen variiert, um optimale PCR-Produkte zu erhalten.

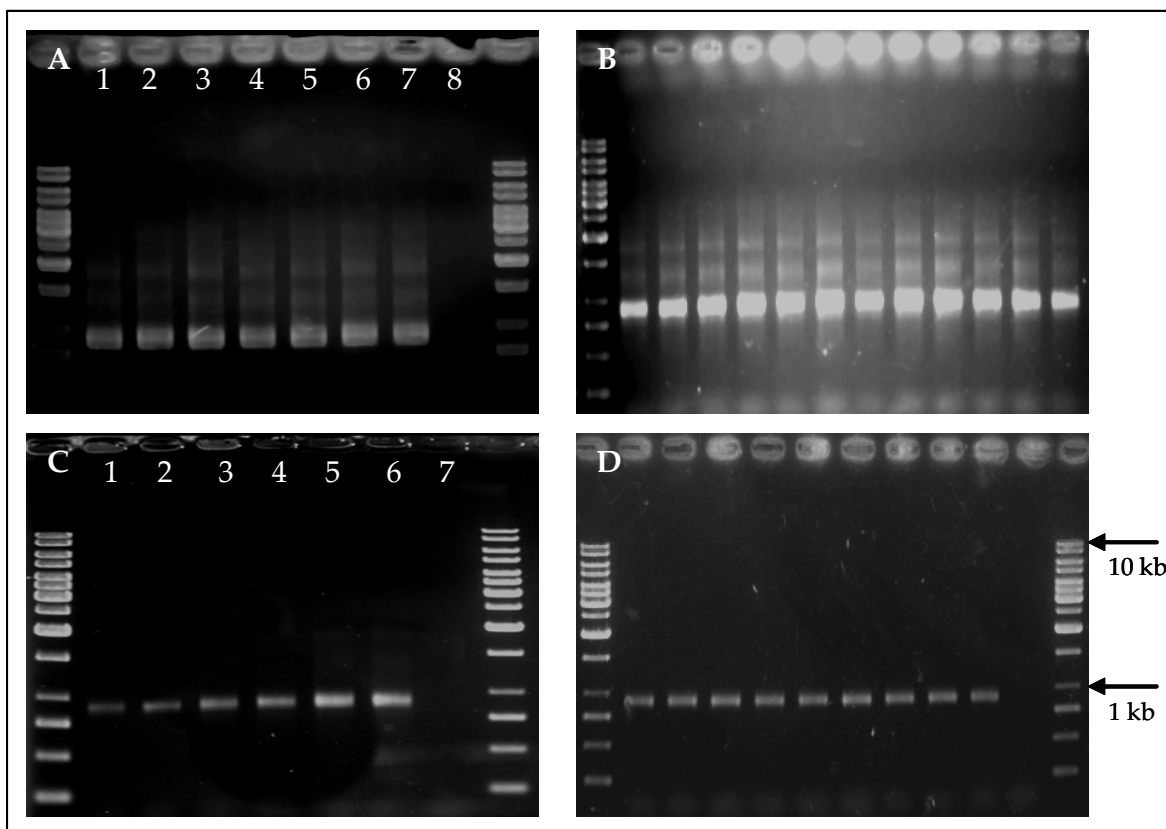


Abb. 3.22: Amplifikation der Gesamt-16S-rDNS mit den Primern Ba27-F-FAM / 907-R und anschließende Agarosegelelektrophorese.

A: Optimierung der Template-DNS-Konzentration. Es wurden 1: 10, 2: 20, 3: 30, 4: 40, 5: 50, 6: 60, 7: 70 ng/ μ l DNS in die PCR eingesetzt (8: PCR-Negativkontrolle ohne Template-DNS), **B:** Amplifikate nach Durchführung der PCR mit 30 Zyklen, **C:** PCR-Produkte nach Reduzierung der Zyklusanzahl auf 20 (1/2), 23 (3/4) und 25 (5/6) Zyklen (7: PCR-Negativkontrolle), **D:** Fragmente nach Durchführung der PCR mit 23 Zyklen. Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* verwendet.

3.4.3 Bestimmung der Länge des für Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) charakteristischen terminalen Restriktionsfragments

Zunächst wurde DNS aus einer Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Kultur isoliert (Abschnitt 2.5.2.2) und stand für die T-RFLP-Analyse (Abschnitt 2.5.9) des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes zur Verfügung. So konnte die Länge des für diesen Stamm charakteristischen terminalen Restriktionsfragments ermittelt und schließlich in

den folgenden T-RFLP-Analysen geprüft werden, ob das Proradix®-spezifische Fragment detektiert wurde. Die Abbildung 3.23 zeigt das Fluoreszenzsignal des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Restriktionsfragments mit einer Fragmentlänge von 143 bp.

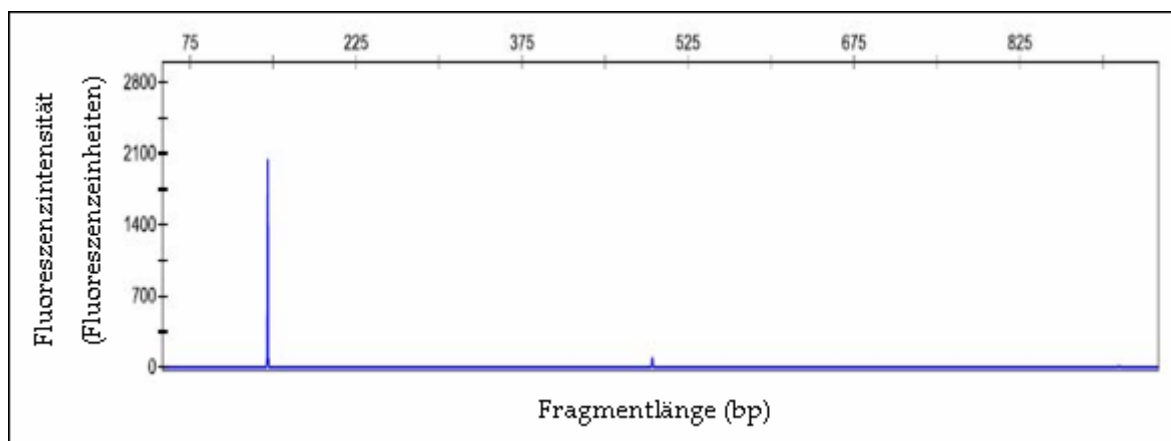


Abb. 3.23: Elektropherogramm einer T-RFLP-Analyse des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes, in der das Proradix®-Restriktionsfragment mit einer Länge von 143 bp detektiert wurde.

3.4.4 T-RFLP-Analyse der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaften im Rahmen eines Gewächshausversuches

Zur Untersuchung der Auswirkung von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die bakterielle Gemeinschaft der Rhizosphäre von Gerste wurden 2,5 l Töpfe mit Ackerboden befüllt und 3 Pflanzen je Topf im Gewächshaus unter Verwendung von Hochdruck-Natriumdampflampen kultiviert (Abschnitt 2.4.4). Nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Wochen Wachstum wurden unbehandelte Kontrollpflanzen (K), durch Saatgutbeizung (Abschnitt 2.4.2.1) mit Proradix® behandelte (P) und nach Saatgutbeizung zusätzlich mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) inokulierte (Abschnitt 2.4.2.2) Pflanzen (PI) geerntet (Abschnitt 2.4.6). Je drei Wurzeln wurden vereinigt und als Ausgangsmaterial zur DNS-Extraktion in Triplikaten eingesetzt. Mit diesen DNS-Triplikaten erfolgten anschließend für jede Wurzelprobe drei parallele T-RFLP-Analysen.

Die T-RFLP-Analysen lieferten umfangreiche Ergebnisse, welche auf den ersten Blick keine sichtbaren Unterschiede zwischen der Kontrolle und den beiden Proradix®-

Behandlungen erkennen ließen. Um die in den T-RFLP-Ergebnissen enthaltenen Informationen und Zusammenhänge zu interpretieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis (PCA)) durchgeführt. Das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse ist in der Abbildung 3.24 dargestellt.

Bei den Proradix®-Pflanzen (P, PI) ist die bakterielle Gemeinschaft für den ersten Untersuchungszeitpunkt nach einer Woche Wachstum deutlich getrennt von der Kontrolle zu unterscheiden. Nach 2 Wochen ist die Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphären-gemeinschaft der Kontrolle und der durch Proradix®-Saatgutbeizung (P) behandelten Pflanzen kaum noch voneinander zu unterscheiden. Die bakterielle Gemeinschaft der Rhizosphäre nach zusätzlicher Inokulation mit dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm (PI) zur erfolgten Saatgutbeizung weicht insgesamt 3 Wochen lang von der Kontrolle ab.

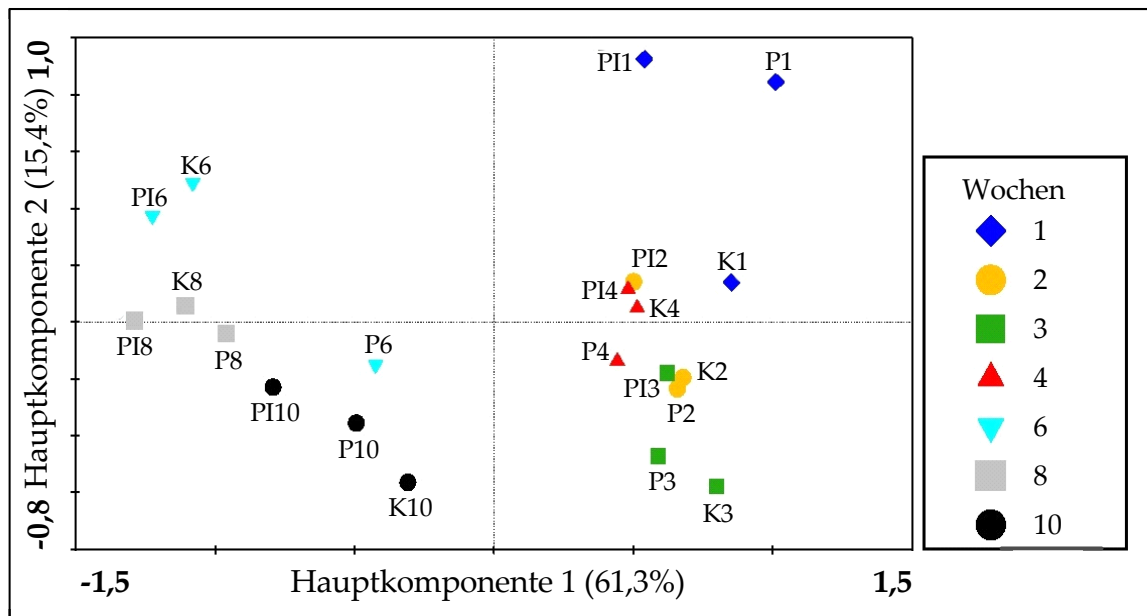


Abb. 3.24: Hauptkomponentenanalyse mit den Fragmentlängen und zugehörigen relativen Abundanzen der T-RFLP-Analysen im Gewächshausversuch.

Gerste wurde im Ackerboden angezogen und nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 10 Wochen beprobt. Die farbigen Symbole sind mit der entsprechenden Behandlung (K=Kontrolle, P=Saatgutbeizung mit Proradix®, PI=Saatgutbeizung mit Proradix® + zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)) und mit der Zahl für die Beprobungswoche bezeichnet. Je ein Symbol wurde für jede Beprobungswoche gewählt und ist in der Legende rechts aufgeführt. Die Prozentangaben in den Achsenbeschriftungen geben den durch die jeweilige Hauptkomponente erklärten Varianz-Anteil an der Gesamtvarianz an.

Zudem wird eine eindeutige Veränderung der T-RFLP-Muster über die Zeit sichtbar, da sich die Muster nach 1, 2, 3, und 4 Wochen auf der rechten Hälfte und nach 6, 8 und 10 Wochen deutlich getrennt auf der linken Seite der Abbildung 3.24 gruppieren. Die Abbildung 3.25 zeigt die zeitliche Veränderung der T-RFLP-Analysen im Verlauf des Beprobungszeitraums.

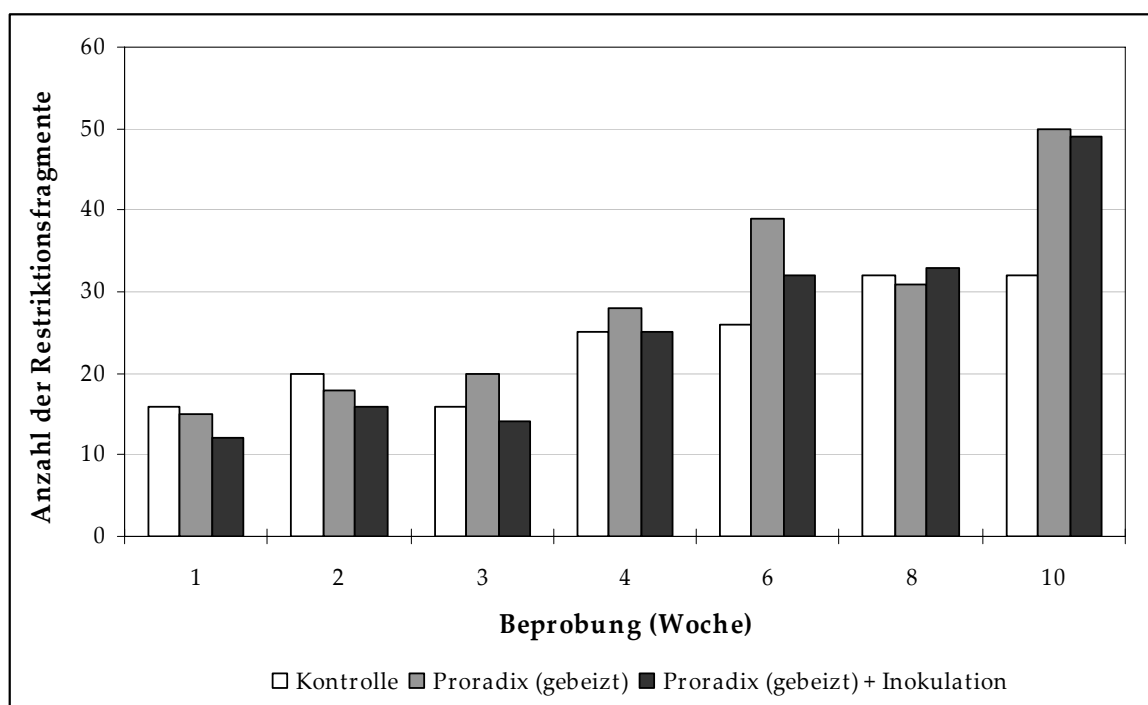


Abb. 3.25: Vergleich der Anzahl der über den gesamten Beprobungszeitraum in den T-RFLP-Analysen detektierten terminalen Restriktionsfragmente im Gewächshausversuch, in dem unbehandelte und mit Proradix® behandelte (Saatgutbeizung und Saatgutbeizung + Inokulation) Gerste im Ackerboden angezogen wurde.

Nach einer Woche Wachstum wurden für die Kontrolle 16, für die Proradix® (gebeizt)-Behandlung 15 und bei der zusätzlichen Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) 12 Restriktionsfragmente detektiert. Von Woche zu Woche nahm die Zahl der Restriktionsfragmente bis auf wenige Ausnahmen zu, so dass nach 10 Wochen Wachstum bis zu 50 verschiedene Fragmente in der T-RFLP-Analyse der mit Proradix® gebeizten Gerste erfasst wurden, was die zunehmende Diversität der Besiedlung widerspiegelt.

Die Abbildungen 3.26 und 3.27 zeigen die ermittelten relativen Abundanzen aller in den T-RFLP-Analysen erhaltenen Fragmente aus der Rhizosphäre der unbehandelten Kontrollpflanzen, der durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelten und der

zusätzlich mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) inokulierten Gerstenwurzeln nach 1, 2, 3 und 4 Wochen. Diese beiden Abbildungen verdeutlichen ebenso die Zunahme der Fragmente über die Zeit, was besonders von Woche 3 zu 4 sichtbar wird. So kamen nach 4 Wochen Wachstum insgesamt zehn Fragmente mit einer Länge von 85, 113, 124, 154, 398, 429, 433, 484, 854 und 855 bp hinzu.

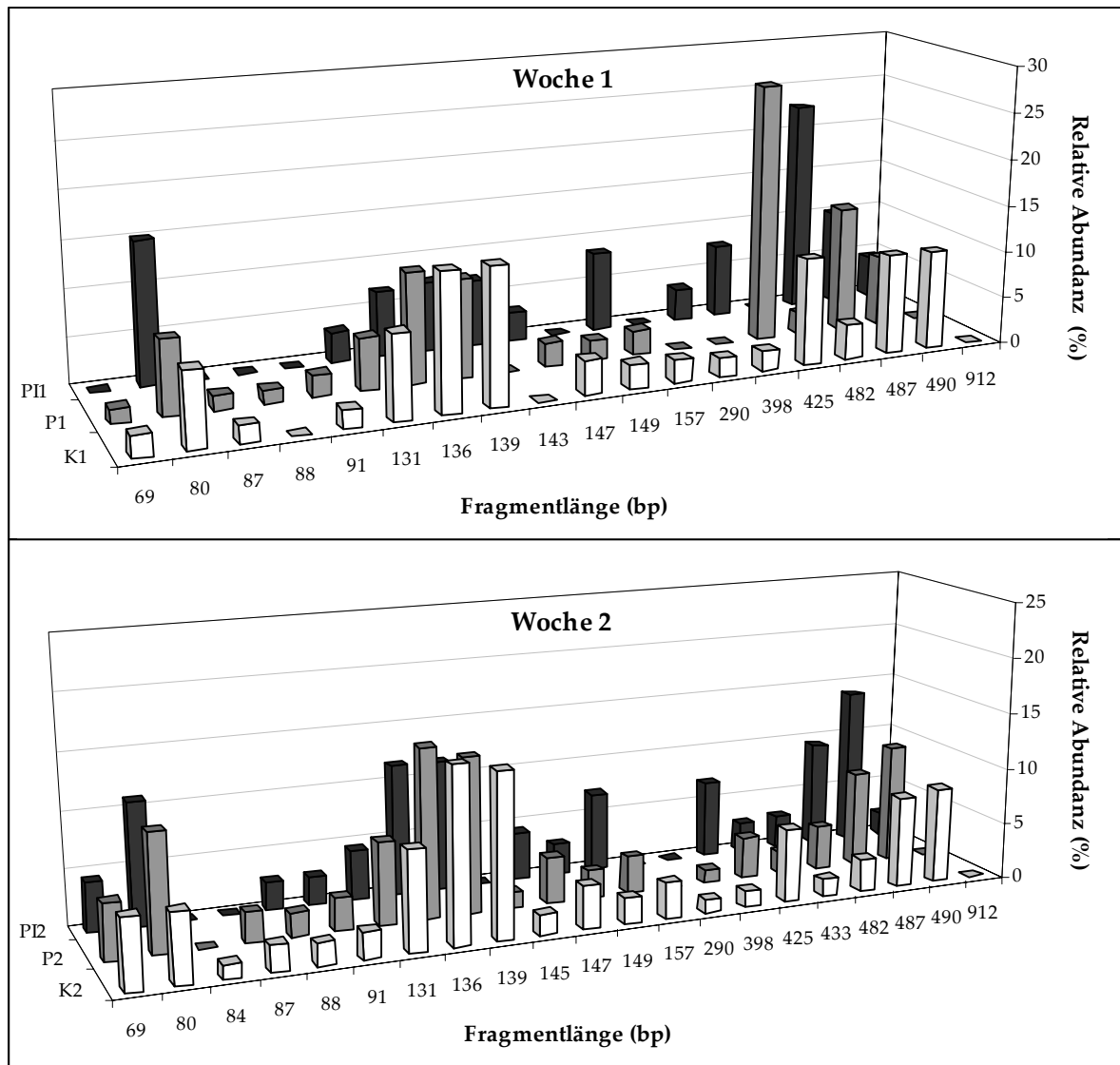


Abb. 3.26: Vergleich der relativen Abundanzen der in T-RFLP-Analysen detektierten Restriktionsfragmente aus der Rhizosphäre von Gerste nach 1 und 2 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshaus (K=Kontrolle, P=Saatgutbeizung mit Proradix®, PI=Saatgutbeizung mit Proradix® + zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*))

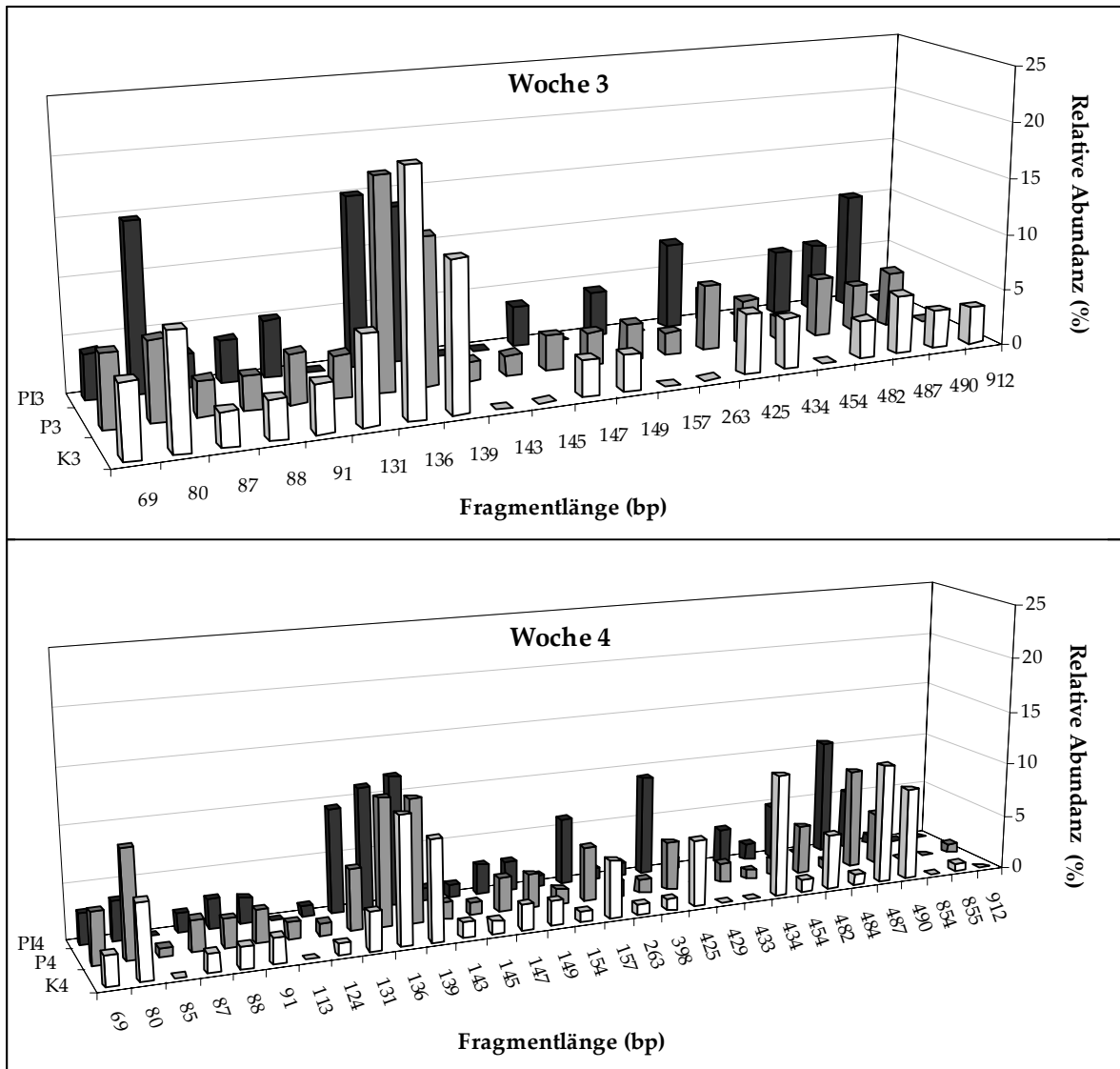


Abb. 3.27: Vergleich der relativen Abundanzen der in T-RFLP-Analysen detektierten Restriktionsfragmente aus der Rhizosphäre von Gerste nach 3 und 4 Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshaus (K=Kontrolle, P=Saatgutbeizung mit Proradix®, PI=Saatgutbeizung mit Proradix® + zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*))

Anhand der Abbildungen 3.26 und 3.27 werden weitere Unterschiede in der Rhizosphärengemeinschaft der Gerstenwurzeln nach Behandlung mit Proradix® deutlich. **Nach 1 Woche** wurden die Fragmente mit einer Länge von 69, 87, 91, 149 und 482 bp in der Behandlung PI nicht detektiert, traten jedoch in den beiden übrigen Behandlungen auf. Ein 290 bp langes Fragment war ausschließlich in der Kontrolle vorhanden. Die Abundanzwerte der 131, 136, 139 bp langen Fragmente nahmen von der Kontrolle her über die Behandlung P bis hin zu PI deutlich ab, während sich die Abundanz des Fragments mit einer Länge von 487 bp in der gleichen Reihenfolge erhöhte. Unterschiede

zwischen den beiden Proradix®-Behandlungen beruhten hauptsächlich auf der erhöhten Abundanz des 80 bp-Fragments bei PI1 und des 425 bp-Fragments bei P1. Ein 157 bp langes Fragment war nach 1 und 2 Wochen Wachstum der Gerste in der PI-Behandlung mit höheren Abundanzen vertreten.

Auch **nach 2 Wochen** konnte das 87 bp-Fragment bei PI2 nicht detektiert werden. Die Fragmente mit 91, 149 und 482 bp Länge wurden nach 2 Wochen mit ähnlichen Abundanzwerten in allen drei Behandlungen gefunden. Ebenso war das 69 bp-Fragment jetzt in allen Behandlungen, jedoch bei P2 und PI2 wie auch bei PI3 gegenüber der Kontrolle verringert vorhanden. Das 290 bp-Fragment trat nach 2 Wochen ebenfalls nur in der Kontrolle auf und war dann im weiteren Untersuchungszeitraum nicht mehr detektierbar. Die Proradix®-Behandlungen bewirkten auch nach 2 Wochen eine Verminderung der Abundanzen der 131, 136 und 139 bp-Fragmente.

Sowohl nach 2 als auch **nach 3 Wochen** waren die Fragmente mit 487 und 490 bp bei PI mit höheren Abundanzen verglichen mit den übrigen beiden Behandlungen vertreten. Dies traf nach 3 Wochen ebenfalls für das 80 bp- und das 482 bp-Fragment zu. Nach 3 Wochen trat schließlich das 139 bp-Fragment in allen Behandlungen mit fast gleichen Abundanzwerten auf. In den Proradix®-Behandlungen konnte aber weiterhin ein Einfluss auf die 131 und 136 bp langen Fragmente beobachtet werden. Das Fragment mit 157 bp wurde nach 3 Wochen nur in den Proradix®-Behandlungen detektiert. Ein nach 3 Wochen hinzugekommenes Fragment mit einer Länge von 434 bp wies in den Proradix®-Behandlungen geringere Abundanzen auf, was auch **nach 4 Wochen** bestätigt wurde. Die 131 und 139 bp langen Fragmente nahmen nach 4 Wochen in den Proradix®-Behandlungen schließlich zu. Nach 4 Wochen waren die Abundanzwerte der detektierten Fragmente im Vergleich zwischen den drei untersuchten Behandlungen meist sehr ähnlich.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so konnten innerhalb der T-RFLP-Analysen im Rahmen des Gewächshausversuches hauptsächlich für die relativen Abundanzwerte der terminalen Restriktionsfragmente mit einer Länge von 131, 136, 139, 157, 434, 482, 487 und 490 bp Unterschiede nach Einsatz von Proradix® und Inokulation mit dem Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm innerhalb der ersten 3 Wochen der Wurzelentwicklung

gefunden werden. Im weiteren Versuchsverlauf hoben sich diese Unterschiede für die meisten Fragmente auf.

Das **Proradix[®]-spezifische Fragment** (143 bp) konnte nur bei der zusätzlichen Inokulation (PI) detektiert werden. Allerdings war das Proradix[®]-Fragment nicht eindeutig zu identifizieren, da insgesamt zwei Fragmente mit einer Länge von 143 bp (142,6 bp und 143,3 bp) auftraten. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurde das 142,6 bp-Fragment nur einmal nach 1 Woche bei der Behandlung Saatgutbeizung + Inokulation mit einer relativen Abundanz von 7,2% gefunden. Das 143,3 bp lange Fragment tauchte erstmalig nach 3 Wochen bei der Proradix[®]-Saatgutbeizung mit einer Abundanz von 1,7% und nach 4 Wochen in allen drei Behandlungen mit Abundanzen von 1,5% (K und P) und 1,2% (PI) auf. Im weiteren Verlauf wurde es mit sehr niedrigen Abundanzen unter 1% in den Proradix[®]-Behandlungen nach 6 und 10 Wochen detektiert. Da dieses Fragment erst nach 3 Wochen Wachstum der Gerste auftrat und nach 4 Wochen auch in der Kontrolle mit gleicher Abundanz wie in den Proradix[®]-Behandlungen vorkam, ist es wahrscheinlich, dass das 142,6 bp-Fragment den Proradix[®]-Stamm repräsentierte.

3.4.5 T-RFLP-Analyse der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaften im Quarzsandsystem

Da der Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm mit Hilfe der T-RFLP-Analysen nach Anzucht von Gerste im Ackerboden nur nach einer Woche detektierbar war, wurde ein zusätzliches Experiment im Quarzsandsystem (Abschnitt 2.4.3.1) im Labor mit den drei gleichen Behandlungen wie im vorangegangenen Gewächshausversuch durchgeführt. T-RFLP-Analysen erfolgten nach 1, 2, 3 und 4 Wochen Wachstum der Gerstenpflanzen im zuvor sterilisierten Quarzsand. Nach 4 Wochen starb die Pflanze aufgrund des begrenzten Systems sowie des eingeschränkten Nährstoffangebots ab, was selbstverständlich zugleich die deutliche Abnahme der Bakterienpopulationen zur Folge hatte.

Insgesamt wurden deutlich weniger Restriktionsfragmente als im Ackerboden detektiert, da sich die untersuchte Bakteriengemeinschaft ausschließlich auf die ursprünglich auf der Oberfläche der nicht sterilisierten Gerstensamen vorhandenen Bakterien beschränkte. Wie die Tabelle 3.4 zeigt, war das Proradix®-spezifische Restriktionsfragment (143 bp) im Labormaßstab eindeutig nachweisbar. Bis auf Woche 3 wurde das 143 bp lange Fragment bei der Proradix®-Behandlung Saatgutbeizung + zusätzliche Inokulation mit höheren Intensitäten als bei der Saatgutbeizung detektiert. Nach 2 Wochen wurde das Proradix®-Fragment mit sehr geringer Intensität auch in der Kontrolle gefunden, was als Hinweis auf weitere Mikroorganismen, die dieses Fragment bilden, angesehen werden muss.

Tab. 3.4: Detektion des für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm charakteristischen Restriktionsfragments mit den zugehörigen Fluoreszenzintensitäten (Peak-Höhen) in Fluoreszenzeinheiten innerhalb der T-RFLP-Analysen nach Anzucht von Gerste im Quarzsandsystem (K=Kontrolle, P=Saatgutbeizung mit Proradix®, PI=Saatgutbeizung mit Proradix® + zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*))

	Fragmentlänge (bp)	Peak-Höhe		Fragmentlänge (bp)	Peak-Höhe		Fragmentlänge (bp)	Peak-Höhe
Woche 1								
K1	/	/	P1	142.66	5218	PI1	142.64	6752
Woche 2								
K2	142.75	139	P2	142.59	4642	PI2	142.62	7781
Woche 3								
K3	/	/	P3	142.69	8925	PI3	142.76	5698
Woche 4								
K4	/	/	P4	142.67	687	PI4	142.74	1451

Die Abbildung 3.28 zeigt das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse für den Quarzsandversuch. Über den gesamten Untersuchungszeitraum sind die Proradix®-Behandlungen deutlich von der Kontrolle zu unterscheiden. Dies ist besonders nach 1 und 2 Wochen Wachstum der Gerste sichtbar. Nach einer Woche wurden für die Proradix®-Behandlungen insgesamt 13 bzw. 14 Restriktionsfragmente detektiert, wobei allein für das Proradix®-Fragment (143 bp) sehr hohe Abundanzen von 46% (Saatgutbeizung) und 47% (Saatgutbeizung + Inokulation) ermittelt wurden.

Wie bereits im Gewächshausversuch beobachtet, ist auch bei der Anzucht im Quarzsand-system die zeitliche Verlagerung entlang der x-Achse erkennbar. Die untersuchten Behandlungen ordnen sich nach einer Woche in der rechten Hälfte und nach 4 Wochen schließlich in der linken Hälfte der Abbildung 3.28 an.

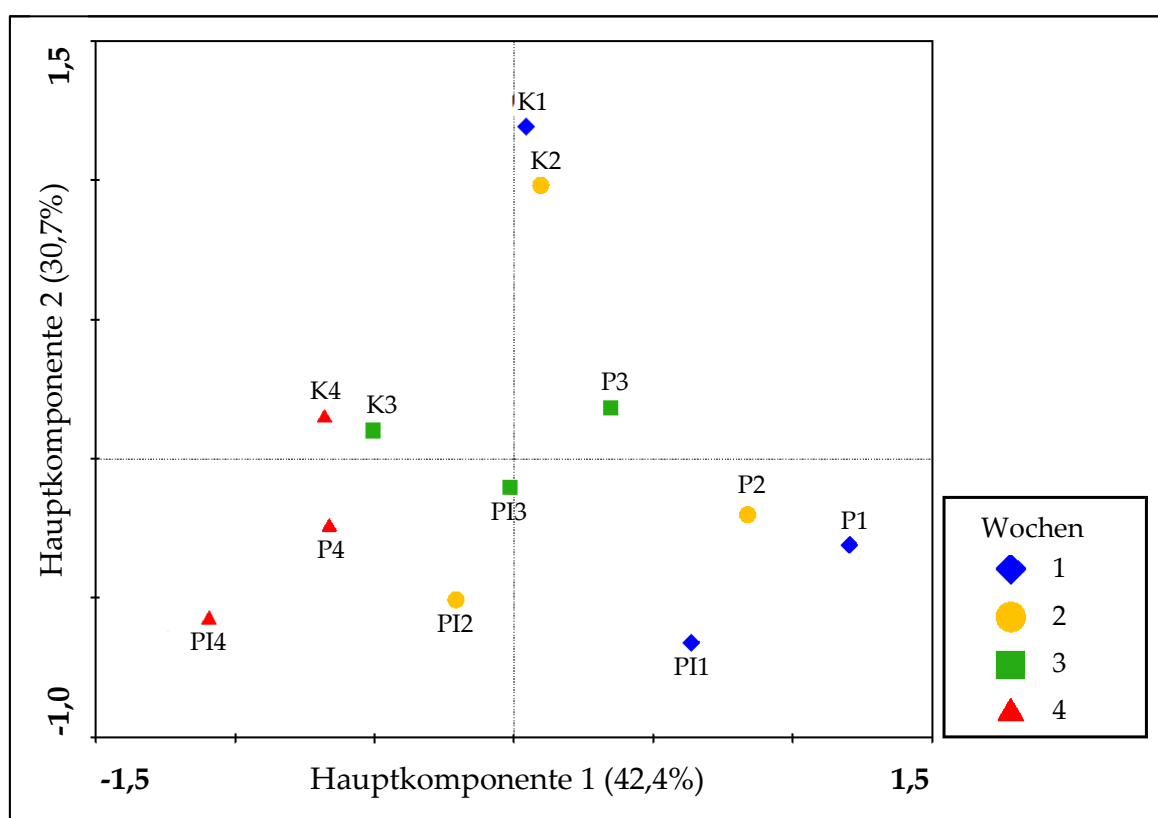


Abb. 3.28: Hauptkomponentenanalyse mit den Fragmentlängen und zugehörigen relativen Abundanzen der T-RFLP-Analysen im Laborversuch.

Gerste wurde im Quarzsandsystem angezogen und nach 1, 2, 3 und 4 Wochen beprobt. Die farbigen Symbole sind mit der entsprechenden Behandlung (K=Kontrolle, P=Saatgutbeizung mit Proradix®, PI=Saatgutbeizung mit Proradix® + zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)) und mit der Zahl für die Beprobungswoche bezeichnet. Je ein Symbol wurde für jede Beprobungswoche gewählt und ist in der Legende rechts aufgeführt. Die Prozentangaben in den Achsenbeschriftungen geben den durch die jeweilige Hauptkomponente erklärten Varianz-Anteil an der Gesamtvarianz an.

3.5 Erstellung von Klonbanken zur Identifizierung terminaler Restriktionsfragmente

Zur Identifizierung der in den T-RFLP-Analysen innerhalb des Gewächshausversuches (mit Scheyern-Boden) erzeugten terminalen Restriktionsfragmente (siehe Abschnitt 3.4.4) wurden vier Klonbanken angelegt. Die Gesamt-DNS wurde aus Rhizosphärenproben von 2 und 4 Wochen im Ackerboden gewachsenen Gerstenpflanzen mit und ohne Proradix®-Behandlung isoliert. Für jede Klonbank wurde DNS aus je drei separaten DNS-Isolierungen vereinigt und anschließend die 16S-rDNS amplifiziert (Abschnitt 2.5.7.1). Aus dem Agarosegel eluierte PCR-Produkte wurden dann in den Vektor pCR®2.1-TOPO ligiert und die vier Ansätze wurden schließlich zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (Abschnitt 2.5.7.3). Die Klonierung verlief erfolgreich. Pro Klonbank wurden 150 Klone auf Vorhandensein eines Inserts mit der richtigen Größe von etwa 1500 bp mit Hilfe der Kolonie-PCR (Abschnitt 2.5.7.4) überprüft.

Alle Klone der Klonbank: Gerste ohne Proradix®-Behandlung (Kontrolle) nach 2 Wochen Wachstum wurden mit K2 und die Klone der Klonbank: Gerste mit Proradix®-Saatgutbeizung nach 2 Wochen mit P2 bezeichnet. Nach 4 Wochen Wachstum lautete die Bezeichnung der Klone entsprechend K4 bzw. P4. Zusätzlich wurde jeder Klon zur internen Nummerierung mit einer römischen und einer arabischen Zahl versehen.

3.5.1 Differenzierung der erhaltenen Klone mit Hilfe der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse

Klone mit der richtigen Insertgröße wurden einer Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse unterzogen. Zunächst wurden mehrere, beliebig ausgewählte Klone in separaten Reaktionsansätzen jeweils mit den Restriktionsenzymen AluI, Hin6I, MspI und RsaI behandelt und die gebildeten Restriktionsmuster nach Agarosegelelektrophorese miteinander verglichen. Daraufhin wurden die Enzyme MspI und RsaI für die RFLP-Analyse ausgewählt.

Insgesamt wurden 466 Klone aus den vier Klonbanken K2, P2, K4 und P4 untersucht. In den Tabellen 3.5 bis 3.8 sind die aufgetretenen RFLP-Muster mit den entsprechenden Häufigkeiten für jede Klonbank aufgeführt. Die Abbildungen 7.5 bis 7.12 im Anhang zeigen die RFLP-Muster aller untersuchten Klone nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese. Durch Restriktion mit dem Enzym MspI entstandene Muster wurden mit Zahlen durchnummeriert. Nach Behandlung mit RsaI unterschiedene Restriktionsmuster wurden mit Buchstaben gekennzeichnet.

Tab. 3.5: Nach Restriktion mit den Enzymen MspI und RsaI entstandene RFLP-Muster innerhalb der Klonbank K2

Klonbank K2					
MspI	MspI	MspI	MspI	RsaI	RsaI
RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit
1	1	33	2	a	1
2	2	34	2	b	6
3	1	35	1	c	1
4	43	37	1	d	48
5	4	38	1	e	6
6	5	39	1	f	1
7	4	40	1	g	6
8	2	41	1	h	2
9	1			i	4
10	1			j	1
11	5			k	1
12	7			l	4
13	1			m	5
14	1			n	5
15	1			o	2
16	2			p	4
17	4			q	1
18	1			r	1
20	1			s	1
21	1			t	1
22	2			u	2
23	1			v	2
24	1			w	1
25	1			x	3
26	5			y	1
27	1			z	1
28	1			aa	1
29	1			ab	1
30	2			ac	1
31	1			ad	1
32	2			ae	1

Innerhalb der Klonbank K2 wurden insgesamt 116 Klone mittels RFLP-Analyse untersucht. Dabei entstanden nach Behandlung mit MspI 39 und mit RsaI 31 verschiedene Muster, die oft durch einen Klon repräsentiert wurden. Das Muster 4 (MspI) / d (RsaI) trat besonders häufig auf. Dieses Muster wurde nach Restriktion des in der PCR mit den verwendeten universellen Primern 616-F und 1492-R amplifizierten DNS-Abschnittes von Chloroplasten der Gerste gebildet. Klone mit diesem Muster wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Tab. 3.6: Nach Restriktion mit den Enzymen MspI und RsaI entstandene RFLP-Muster innerhalb der Klonbank P2

Klonbank P2					
MspI	MspI	MspI	MspI	RsaI	RsaI
RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit
1	1	61	1	a	1
2	2	62	1	b	2
4	48	63	1	c	1
5	5	64	1	d	47
7	5	65	1	e	7
8	4	66	1	g	13
11	5	67	2	i	10
12	3	68	1	l	3
17	1	69	1	m	3
26	5	70	1	n	5
30	1	71	1	p	1
33	2	72	1	u	4
34	1	73	1	v	6
43	3	74	1	af	1
44	1	75	2	ag	4
45	3	76	1	ah	1
46	1	77	1	ai	2
47	1	78	1	aj	2
48	1	79	2	ak	1
49	1	80	1	al	1
50	1			am	1
51	1			an	1
52	1			ao	1
53	1			ap	1
54	1			aq	1
55	1			ar	2
56	1			as	2
57	1			at	2
58	1			au	1
59	2			av	1
60	1			aw	1

Von der Klonbank P2 wurden mit 129 Klonen RFLP-Analysen durchgeführt, wobei 51 MspI-Muster bzw. 31 RsaI-Muster auftraten. Gegenüber der Klonbank K2 kamen nach Restriktion mit MspI 38 und mit RsaI 18 verschiedene RFLP-Muster hinzu.

Tab. 3.7: Nach Restriktion mit den Enzymen MspI und RsaI entstandene RFLP-Muster innerhalb der Klonbank K4

Klonbank K4					
MspI	MspI	MspI	MspI	RsaI	RsaI
RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit
1	1	83	1	a	1
2	6	84	2	b	3
4	39	85	1	d	44
5	4	86	2	e	4
6	2	87	1	f	1
7	1	88	1	g	9
8	7	89	1	i	8
11	4	90	1	l	1
12	3	91	1	m	4
15	3	92	1	n	4
17	1	93	1	p	3
24	1	94	1	q	2
25	1			t	1
26	1			u	5
33	1			v	2
36	1			x	1
39	1			ab	1
45	1			ad	2
48	1			ag	1
49	1			ah	1
52	2			ai	1
55	1			an	1
58	1			ar	2
59	5			au	1
61	1			ax	1
66	1			ay	1
70	1			az	1
81	1			ba	1
82	1			bg	1

Aus der Klonbank K4 wurden 108 Klone einer RFLP-Analyse unterzogen. Es konnten 41 verschiedene Muster nach Restriktion mit MspI und 29 Bandenmuster mit RsaI gefunden werden. Im Vergleich zu K2 und P2 traten in der Klonbank K4 14 (MspI) und

5 (RsaI) weitere neue Muster auf. Alle übrigen RFLP-Muster lagen bereits in den Klonbanken K2 und P2 vor.

Tab. 3.8: Nach Restriktion mit den Enzymen MspI und RsaI entstandene RFLP-Muster innerhalb der Klonbank P4

Klonbank P4					
MspI	MspI	MspI	MspI	RsaI	RsaI
RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit	RFLP-Muster	Häufigkeit
2	5	72	1	b	2
4	32	75	1	c	1
5	1	76	1	d	33
6	1	80	1	e	8
7	1	84	1	g	14
8	9	87	2	h	1
11	8	93	1	i	13
12	3	95	2	l	3
14	1	96	1	m	1
17	2	97	2	n	5
18	2	98	1	p	2
19	1	99	1	u	4
20	1	100	1	v	3
21	1	101	1	w	1
24	1	102	1	x	1
25	3			ab	1
26	2			ad	1
27	1			ag	1
30	2			ah	2
33	1			aj	1
36	1			am	1
44	2			an	1
45	1			ao	1
46	1			ap	1
47	1			ar	1
48	1			aw	3
51	2			ax	1
55	1			ay	1
57	1			bb	1
59	2			bc	1
61	2			bd	1
66	1			be	1
67	1			bf	1

Unter den 113 Klonen der Klonbank P4, die mit der RFLP-Methode analysiert wurden, kamen 48 (MspI) bzw. 33 (RsaI) unterschiedliche Bandenmuster vor, wobei 8 Muster (MspI) und 5 Muster (RsaI) zuvor in den anderen Klonbanken noch nicht vertreten waren.

Durch den Einsatz zweier verschiedener Restriktionsenzyme konnten zusätzliche Unterschiede in den RFLP-Mustern identifiziert werden, die nur mit einem Enzym nicht nachgewiesen werden konnten. Nach Kombination aller RFLP-Muster, die nach Behandlung mit MspI und RsaI entstanden waren, konnten die Klone verschiedenen RFLP-Typen zugeordnet werden. Von jedem RFLP-Typ wurde ein Klon zur Sequenzanalyse ausgewählt.

3.5.2 Phylogenetische Analyse der erhaltenen 16S-rDNS-Sequenzen

Insgesamt wurden 181 Klone aus den vier Klonbanken, wie im Abschnitt 2.5.8.1 beschrieben, sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit bekannten Sequenzen der öffentlichen Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen. Dann erfolgte die phylogenetische Auswertung der Sequenzen mit dem Softwarepaket ARB (Abschnitt 2.5.8.2). Zur Anordnung der Sequenzen in einem phylogenetischen Stammbaum wurden verschiedene Baumberechnungsverfahren (Maximum-Parsimony-, Neighbor-Joining- und Maximum-Likelihood-Methode) sowie unterschiedliche Sequenzfilter verwendet.

Von den 181 Sequenzen wurden 15 Chloroplasten-Sequenzen und eine Mitochondrien-Sequenz, die von der Gerste stammten, bei der phylogenetischen Auswertung nicht berücksichtigt. Nach Durchführung des Chimärentests (Abschnitt 2.5.8.2) wurden weitere 13 Sequenzen als Chimären eingestuft und ebenso von der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen.

Die verbleibenden 152 Klone wurden in die Stammbäume der einzelnen Hauptentwicklungslinien eingerechnet. Der Radialstammbaum in der Abbildung 3.29 zeigt die Hauptentwicklungslinien, denen Sequenzen zugeordnet werden konnten, im Überblick.

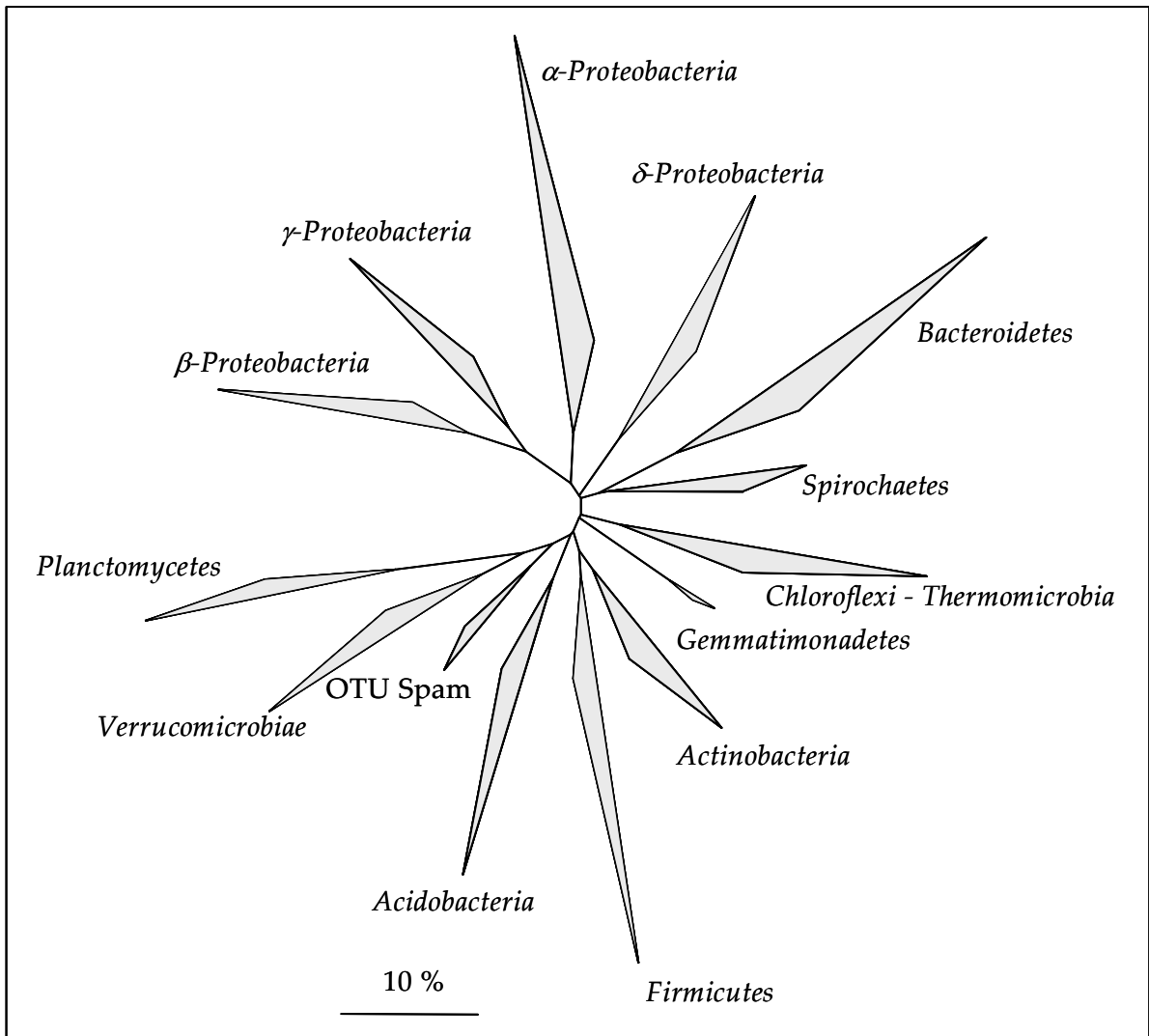


Abb. 3.29: Radialstammbaum der Hauptentwicklungslinien der *Bacteria*, denen 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zugeordnet werden konnten. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Die meisten Sequenzen konnten den Proteobakterien zugeordnet werden. Insgesamt waren 19 Klone unter den *alpha-Proteobacteria* (Abb. 7.13, 7.14), 43 unter den *beta-Proteobacteria* (Abb. 7.15-7.18), 14 bei den *gamma-Proteobacteria* (Abb. 3.30, 3.31) und weitere 14 bei den *delta-Proteobacteria* (Abb. 7.19) zu finden. Dem Phylum *Acidobacteria* waren 3 Sequenzen, den *Actinobacteria* 10 und den *Bacteroidetes* 23 Sequenzen zugeordnet (Abb. 7.20-7.24). Zu den *Chloroflexi-Thermomicrobia* gehörten 7 Klone und zu den *Firmicutes* 6 Sequenzen (Abb. 7.25, 7.26). In die Hauptentwicklungslinien *Gemmatimonadetes* und *Planctomycetes* sowie in die OTU Spam (Lipson & Schmidt, 2004) mit nicht klassifizierten, unkultivierten Bakterien fiel jeweils eine Sequenz (Abb. 7.27). Unter den *Spirochaetes* waren 2 Sequenzen auffindbar und die *Verrucomicrobiae* waren mit 8 Klonen vertreten (Abb. 7.27, 7.28).

In der folgenden Tabelle 3.9 ist zusammengefasst, wie viele der ausgewählten und sequenzierten Klone aus den jeweiligen Klonbanken in die einzelnen Hauptentwicklungslinien fielen. Die Auswahl der Klone, die schließlich sequenziert wurden, erfolgte je nach ihrem RFLP-Typ aus allen vier Klonbanken, wobei nur ein Vertreter des jeweiligen RFLP-Typs zufällig genommen wurde. Mit Hilfe der RFLP-Analyse war sichtbar geworden, dass von den insgesamt 466 untersuchten Klonen diejenigen mit identischen RFLP-Mustern nicht nur in einer der vier Klonbanken vorkamen (siehe Abschnitt 3.5.1). Demzufolge sind die erhaltenen Sequenzen nicht für eine bestimmte Klonbank charakteristisch.

Tab. 3.9: Anzahl der anhand der 16S-rDNS-Sequenzanalyse in die entsprechenden Hauptentwicklungslinien der *Bacteria* gehörigen Klone aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4

Phylum	Anzahl der Sequenzen aus den Klonbanken				Sequenzen insgesamt
	K2	P2	K4	P4	
<i>α-Proteobacteria</i>	6	3	6	4	19
<i>β-Proteobacteria</i>	15	9	8	11	43
<i>γ-Proteobacteria</i>	1	6	2	5	14
<i>δ-Proteobacteria</i>	4	5	4	1	14
<i>Acidobacteria</i>	/	/	/	3	3
<i>Actinobacteria</i>	1	4	3	2	10
<i>Bacteroidetes</i>	3	7	4	9	23
<i>Chloroflexi-Thermomicrobia</i>	4	1	1	1	7
<i>Firmicutes</i>	/	2	1	3	6
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	/	/	/	1
<i>Planctomycetes</i>	/	/	/	1	1
OTU Spam	1	/	/	/	1
<i>Spirochaetes</i>	/	1	/	1	2
<i>Verrucomicrobiae</i>	2	5	1	/	8

Da der in dieser Arbeit untersuchte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm in die Hauptentwicklungslinie der *γ-Proteobacteria* gehört (Abschnitt 3.5.3), wird in den Abbildungen 3.30 und 3.31 exemplarisch die phylogenetische Einordnung weiterer in den Klonbanken gefundener *γ-Proteobacteria*-Sequenzen dargestellt. Die erhaltenen 16S-rDNS-Sequenzen wurden den Klonen entsprechend bezeichnet, wobei dem Namen der Klonbank eine römische und eine arabische Zahl folgen. Neun Sequenzen (K4III39,

P4II12, P2II48, P2II19, P2III4, P2II35, K4I38, P4I36, P4III50) gruppierten sich zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen von nicht kultivierten Bakterien mit Sequenzähnlichkeiten in einem Bereich von 81,2% bis 99,0% (siehe Tabellen 7.4 und 7.5 im Anhang). Die Sequenz P4II48 wies eine Sequenzähnlichkeit von 98,8% zu einem nicht kultivierten *Xanthomonadaceae*-Bakterium und 93,5% zu einem *Rhodanobacter* sp.-Stamm auf.

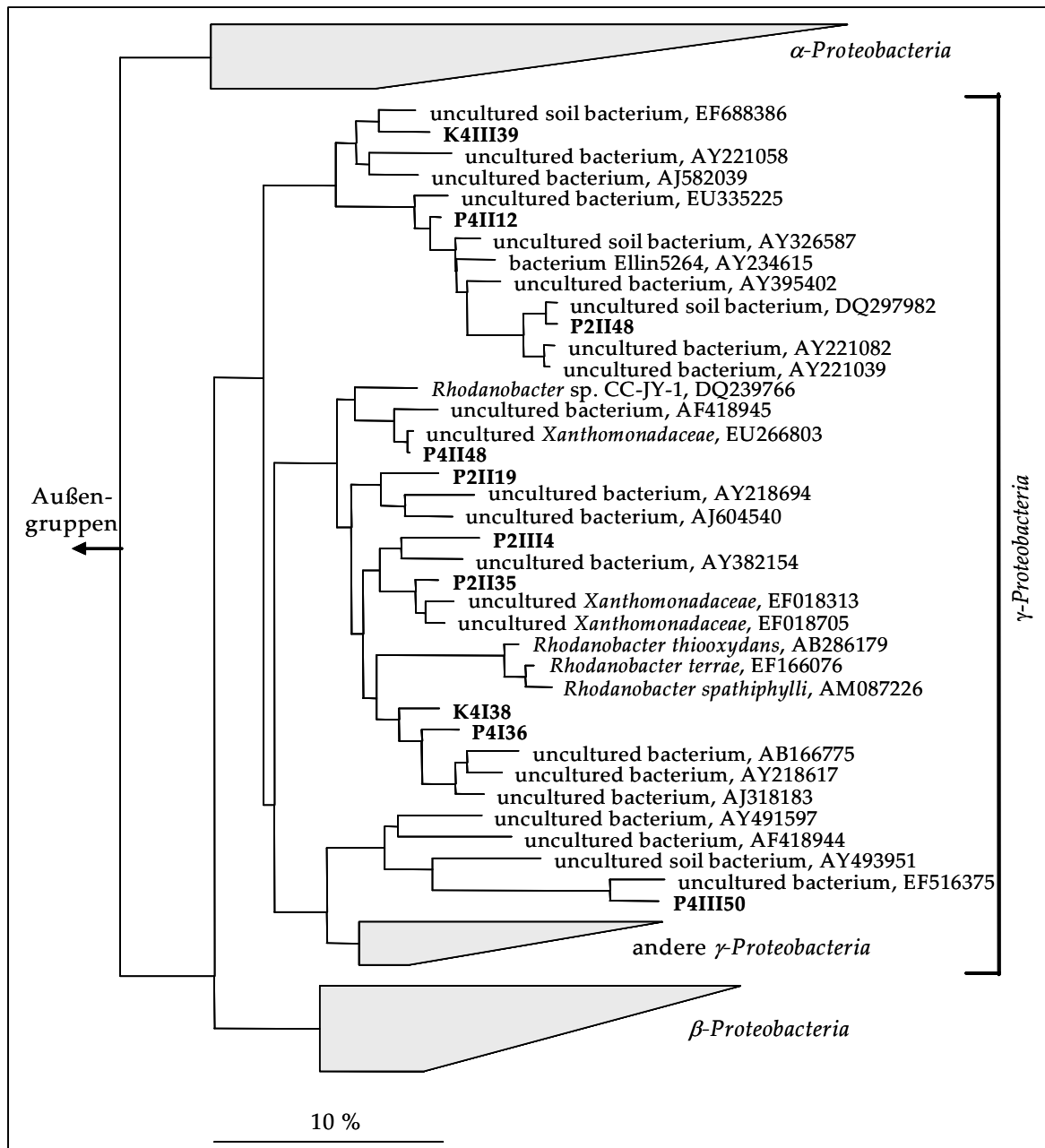


Abb. 3.30: Phylogenetischer Stammbaum der *γ-Proteobacteria*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *γ-Proteobacteria* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Zwei Sequenzen waren der Gattung *Pseudomonas* zuzuordnen (Abbildung 3.31). Dabei zeigten die Sequenzen P4III8 und P2III14 Sequenzähnlichkeiten von 99,7% bzw. 99,3% zu bereits bekannten *Pseudomonas* sp.-Sequenzen (siehe Tabelle 3.10). Für die Sequenz P2II2 wurde die größte Sequenzähnlichkeit zu *Enterobacter amnigenus* mit einem Distanzwert von 99,8% gefunden. Mit 99,4% war die Sequenz K2III45 *Cellvibrio gandavensis* am ähnlichsten (Tabelle 3.10).

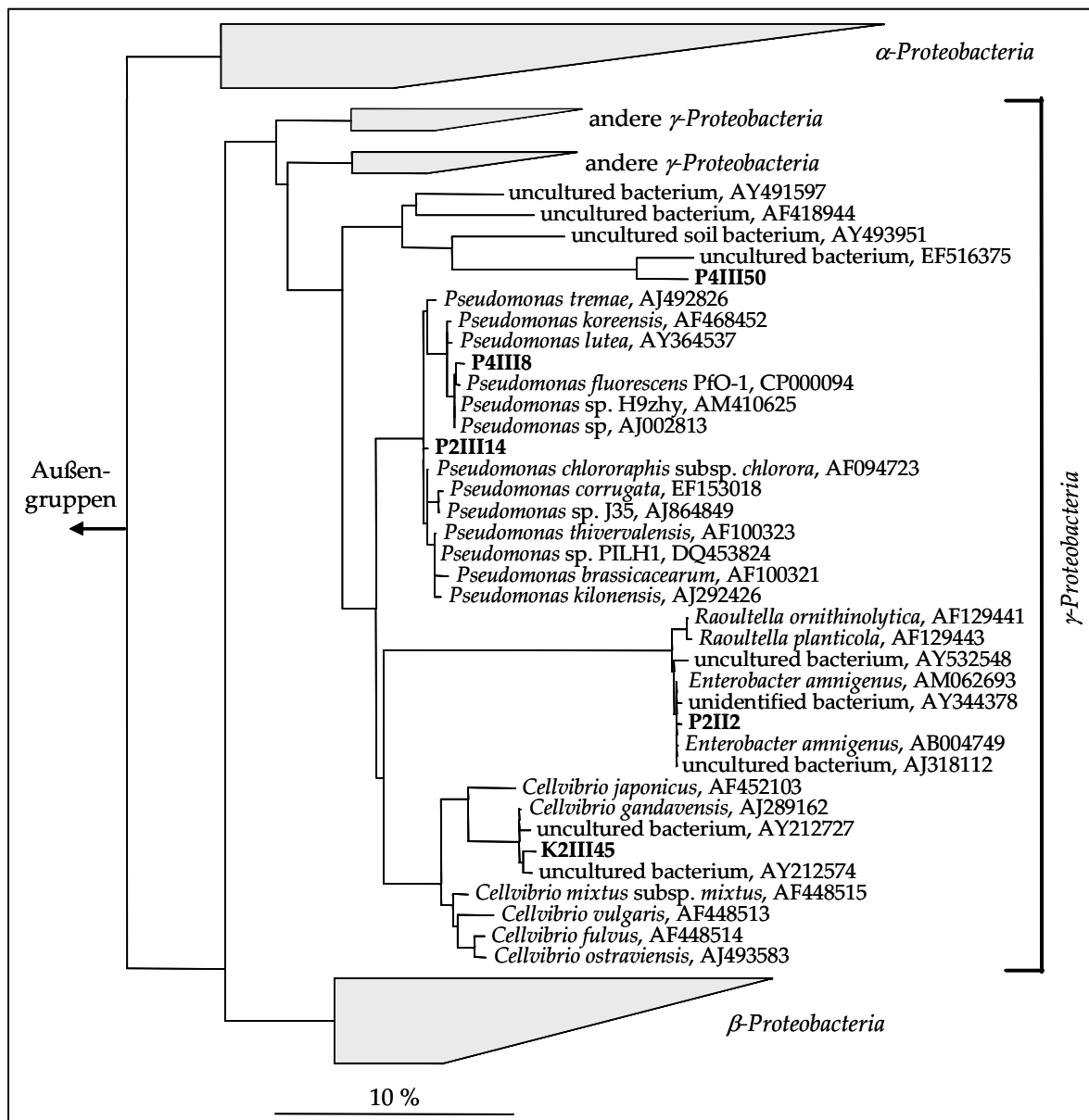


Abb. 3.31: Phylogenetischer Stammbaum der γ -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter γ -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Tab. 3.10: Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für die 16S-rDNS-Sequenzen aus der Abbildung 3.31 (γ -Proteobacteria)

	<i>Enterobacter amnigenus</i> s, AB004749	unidentified bacterium, AY344378	uncultured bacterium, AY532548	uncultured bacterium, AJ318112	<i>Enterobacter aerogenes</i> s, AB004750	<i>Enterobacter aerogenes</i> , D0741573	<i>Pseudomonas</i> sp., AJ002813	uncultured bacterium, AY212574	uncultured bacterium, AY212727	uncultured bacterium, AB187023	K2III45	P2II2	P2III14	P4III8	<i>Cellvibrio</i> sp. R-4001, AJ289161	<i>Cellvibrio gandavensis</i> , AJ289162	<i>Pseudomonas</i> sp. J62, AJ864855	<i>Cellvibrio mixtus</i> subsp. <i>Mixtus</i>	<i>Cellvibrio vulgaris</i> , AF448513	<i>Pseudomonas</i> sp. 33zhy, AM410614	<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy, AM410625	<i>Cellvibrio japonicus</i> s, AF452103	<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1, DQ453824	<i>Enterobacter amnigenus</i> , AM062693	
<i>Enterobacter amnigenus</i> s, AB004749	100																								
unidentified bacterium, AY344378	99,8	100																							
uncultured bacterium, AY532548	98,9	98,7	100																						
uncultured bacterium, AJ318112	99,9	99,6	98,9	100																					
<i>Enterobacter aerogenes</i> , AB004750	99,0	98,7	98,3	98,9	100																				
<i>Enterobacter aerogenes</i> , D0741573	98,6	98,4	97,9	98,5	99,7	100																			
<i>Pseudomonas</i> s sp., AJ002813	85,4	85,4	85,7	85,7	85,3	84,7	100																		
uncultured bacterium, AY212574	85,1	85,4	85,5	85,6	85,0	84,4	90,6	100																	
uncultured bacterium, AY212727	85,2	85,5	85,4	85,6	85,0	84,4	90,6	98,4	100																
uncultured bacterium, AB187023	85,5	85,7	85,7	85,8	85,3	84,6	95,3	88,0	88,0	100															
K2III45	84,7	85,1	85,1	85,3	84,8	84,0	90,4	98,5	98,9	87,9	100														
P2II2	99,6	99,3	98,5	99,5	98,5	98,2	85,3	85,3	85,2	85,5	85,0	100													
P2III14	85,4	85,7	86,0	85,8	85,2	84,5	97,9	91,1	90,9	93,2	91,0	85,5	100												
P4III8	85,3	85,5	85,9	85,8	85,3	84,5	99,7	90,3	90,2	95,1	90,3	85,5	97,7	100											
<i>Cellvibrio</i> sp. R-4001, AJ289161	85,0	85,2	85,3	85,3	84,8	84,2	91,8	96,1	96,4	88,9	96,1	85,0	91,6	91,4	100										
<i>Cellvibrio gandavensis</i> , AJ289162	85,3	85,5	85,5	85,7	85,1	84,5	90,6	99,1	99,5	88,0	99,4	85,3	91,0	90,3	96,5	100									
<i>Pseudomonas</i> sp. J62, AJ864855	85,4	85,5	85,6	85,7	85,3	84,7	99,9	90,6	90,6	95,3	90,4	85,3	98,1	99,6	91,9	90,6	100								
<i>Cellvibrio mixtus</i> subsp. <i>mixtus</i> , AF448515	85,6	86,1	85,9	86,1	85,7	84,9	91,6	95,4	95,4	88,9	95,3	85,8	91,8	91,4	97,6	95,6	91,8	100							
<i>Cellvibrio vulgaris</i> , AF448513	84,5	84,9	84,8	85,0	84,5	83,7	90,7	94,4	94,4	88,4	94,2	84,7	90,9	90,5	96,1	94,5	91,0	97,7	100						
<i>Pseudomonas</i> sp. 33zhy, AM410614	85,3	85,5	85,7	85,7	85,2	84,5	99,9	90,5	90,5	95,3	90,4	85,4	97,7	99,5	91,6	90,5	99,9	91,7	90,8	100					
<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy, AM410625	85,4	85,6	85,8	85,8	85,3	84,5	100,0	90,5	90,6	95,3	90,5	85,4	97,9	99,7	91,7	90,6	99,9	91,8	90,8	99,9	100				
<i>Cellvibrio japonicus</i> s, AF452103	85,7	86,1	85,9	86,1	85,8	85,0	91,5	94,8	94,6	89,0	94,7	85,8	91,4	91,4	94,5	94,9	91,5	96,0	94,4	91,6	91,7	100			
<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1, DQ453824	85,4	85,8	85,7	85,8	85,2	84,4	97,5	91,1	91,0	92,9	91,0	85,4	99,3	97,2	91,6	91,0	97,8	92,0	91,0	97,4	97,5	91,7	100		
<i>Enterobacter amnigenus</i> , AM062693	99,8	99,6	98,7	99,7	98,7	98,4	85,5	85,4	85,5	85,5	85,1	99,8	85,5	85,4	85,3	85,6	85,5	85,9	84,8	85,4	85,5	85,9	85,5	100	

3.5.3 Phylogenetische Einordnung des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes

Der in dieser Arbeit eingesetzte und untersuchte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm wurde ebenfalls einer Sequenzanalyse unterzogen und konnte phylogenetisch eindeutig der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe zugeordnet werden (Abbildung 3.32).

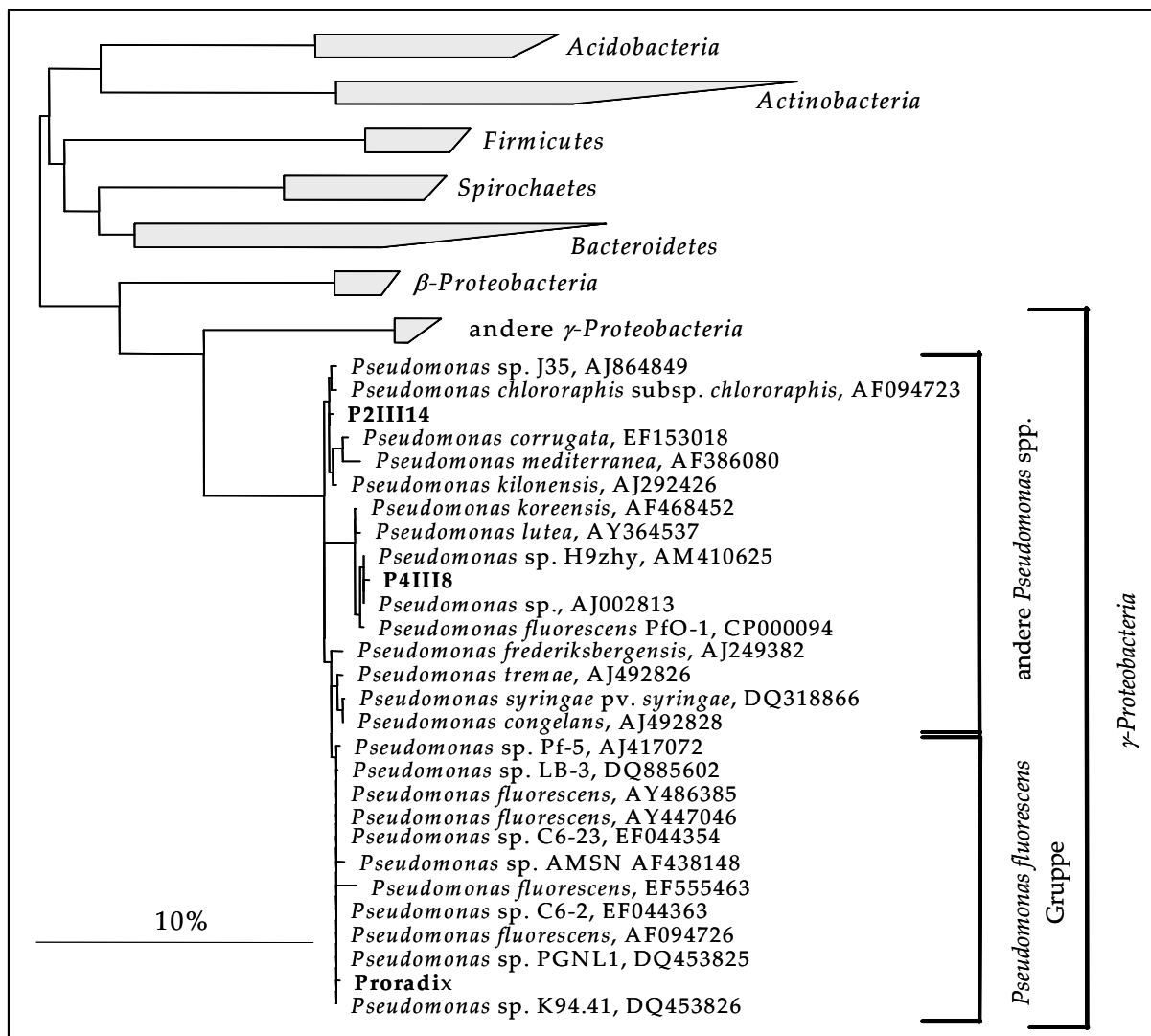


Abb. 3.32: Phylogenetischer Stammbaum, der die Einordnung der 16S-rDNS-Sequenz des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes zeigt. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Dabei wies die 16S-rDNS-Sequenz des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes Sequenzähnlichkeiten von 96,7% und 99,8% zu anderen bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen von *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen auf (Tabelle 3.11).

Tab. 3.11: Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für die 16S-rDNS-Sequenz des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes im Vergleich zur 16S-rDNS-Sequenz verschiedener bekannter *Pseudomonas*-Stämme und der beiden Klone P2III14 und P4III8

	Proradix	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> , AF094723	<i>Pseudomonas corrugata</i> , EF153018	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , PfO-1, CP000094	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY486385	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AF094726	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY486385	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY447046	<i>Pseudomonas</i> sp. J35, AJ864849	<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy, AM410625	<i>Pseudomonas</i> sp., AF521651	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-23, EF044354	<i>Pseudomonas</i> sp. AMSN, AF438148	<i>Pseudomonas</i> sp. CI14, DQ530066	<i>Pseudomonas</i> sp. PGNL1, DQ453825	<i>Pseudomonas</i> sp. K94.41, DQ453826	<i>Pseudomonas</i> sp. S8-62, DQ453827	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-23, EF044354	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-2, EF044363	<i>Pseudomonas</i> sp. AJ002813	P2III14	P4III8
Proradix	100																					
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> , AF094723	97,6	100																				
<i>Pseudomonas corrugata</i> , EF153018	97,0	98,9	100																			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , PfO-1, CP000094	96,7	97,7	97,3	100																		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY486385	99,8	97,8	97,2	96,8	100																	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AF094726	99,8	97,8	97,2	96,8	100	100																
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY486385	99,8	97,8	97,2	96,8	100	100	100															
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , AY447046	99,8	97,8	97,2	96,8	100	100	100	100														
<i>Pseudomonas</i> sp. J35, AJ864849	97,1	98,9	99,5	97,6	97,3	97,3	97,3	97,3	100													
<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy, AM410625	96,6	97,7	97,5	99,5	96,8	96,8	96,8	96,8	97,6	100												
<i>Pseudomonas</i> sp., AF521651	99,8	97,8	97,2	96,9	100	100	100	100	97,3	96,8	100											
<i>Pseudomonas</i> sp. C6-23, EF044354	99,8	97,9	97,3	97,0	100	100	100	100	97,4	96,9	100	100										
<i>Pseudomonas</i> sp. AMSN, AF438148	99,7	97,6	97,1	96,6	99,9	99,9	99,9	100	97,1	96,6	99,9	100	100									
<i>Pseudomonas</i> sp. CI14, DQ530066	99,7	97,7	97,0	96,7	99,9	99,9	99,9	99,9	97,1	96,7	99,9	99,9	99,8	100								
<i>Pseudomonas</i> sp. PGNL1, DQ453825	99,7	97,9	97,3	96,9	100	100	100	100	97,4	97,0	99,9	99,9	100	99,9	100							
<i>Pseudomonas</i> sp. K94.41, DQ453826	99,7	97,9	97,3	96,9	100	100	100	100	97,3	96,9	99,9	99,9	100	99,9	100	100						
<i>Pseudomonas</i> sp. S8-62, DQ453827	99,7	97,9	97,3	96,8	100	100	100	100	97,2	96,9	99,9	99,9	100	99,9	99,8	99,8	100					
<i>Pseudomonas</i> sp. C6-23, EF044354	99,8	97,9	97,3	97,0	100	100	100	100	97,4	96,9	100	100	100	99,9	99,9	99,9	99,9	100				
<i>Pseudomonas</i> sp. C6-2, EF044363	99,8	97,9	97,3	97,0	100	100	100	100	97,4	96,9	100	100	100	99,9	99,9	99,9	99,9	100	100			
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ002813	96,6	97,7	97,5	99,5	96,8	96,8	96,8	96,8	97,7	100	96,8	97,0	96,6	96,6	96,9	96,9	96,8	97,0	97,0	100		
P2III14	97,5	98,8	98,8	97,6	97,7	97,7	97,7	97,7	99,3	97,9	97,7	97,8	97,5	97,6	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,9	100	
P4III8	96,4	97,5	97,3	99,3	96,6	96,7	96,6	96,5	97,4	99,7	96,6	96,7	96,4	96,5	96,7	96,7	96,7	96,7	96,7	99,7	97,7	100

Bei der Erstellung der Klonbanken zur Identifizierung der in den T-RFLP-Analysen detektierten Restriktionsfragmente konnte die 16S-rDNS-Sequenz von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) unter den erhaltenen Sequenzen der Klonbanken P2 und P4 nicht gefunden werden.

3.5.4 Identifizierung der in T-RFLP-Analysen erhaltenen Restriktionsfragmente

Nach der vollständigen phylogenetischen Auswertung aller aus den vier Klonbanken erhaltenen 16S-rDNS-Sequenzen konnte mit Hilfe des ARB Softwarepakets für jede Sequenz die Länge des in der T-RFLP-Analyse zu erwartenden terminalen Restriktionsfragments ermittelt werden. Schließlich konnten dann den Sequenzen die im Rahmen des Gewächshausversuches tatsächlich detektierten Restriktionsfragmentlängen zugeordnet werden. Die Tabelle 3.13 gibt einen Überblick zu den Ergebnissen aus der Klonbanken-Sequenzanalyse und den zugehörigen Ergebnissen der T-RFLP-Analyse. Dabei ist jedem sequenzierten Klon eine nach dem Vergleich mit in der Datenbank NCBI abgelegten Sequenzen verwandtschaftlich ähnliche 16S-rDNS-Sequenz mit der zugehörigen „Accession-Number“ und der Sequenzähnlichkeit in % zugeordnet. Außerdem werden für jeden Klon der ermittelte RFLP-Typ, die erwartete (ARB) und die tatsächlich erhaltene (T-RFLP) Restriktionsfragmentlänge sowie die relative Abundanz der jeweiligen Fragmente zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten angegeben. Die Klone sind bezüglich der Restriktionsfragmentlängen in aufsteigender Reihenfolge angeordnet.

Für 24 der insgesamt 152 sequenzierten Klone konnten in den durchgeführten T-RFLP-Analysen keine entsprechenden Restriktionsfragmente gefunden werden (Tabelle 3.12). Dies entspricht der geringen Häufigkeit des für diese Klone charakteristischen RFLP-Typs innerhalb der vier erstellten Klonbanken K2, P2, K4 und P4. Oft wurde der jeweilige RFLP-Typ nur einmal in einer der vier Klonbanken gefunden. Dabei bildete der Klon P2I5 mit der erwarteten Fragmentlänge von 444 bp die einzige Ausnahme, denn der zugehörige RFLP-Typ trat in den vier Klonbanken insgesamt zehnmal auf. Innerhalb der

T-RFLP-Analysen für K2, P2, K4 und P4 wurden 11 weitere Restriktionsfragmente detektiert, welchen wiederum anhand der Ergebnisse der Klonbanken keine Sequenz zugeordnet werden konnte, obwohl die relativen Abundanzwerte für die 69, 88 und 425 bp langen Fragmente erhöht waren (Tabelle 3.12).

Tab. 3.12: Auflistung der sequenzierten Klone, für die kein terminales Restriktionsfragment gefunden werden konnte und der detektierten Restriktionsfragmente, die nicht identifiziert werden konnten.

Erhaltene Sequenz ohne Fragment- zuordnung (erwartete Länge)	RFLP-Typ MspI/RsaI	Häufigkeit				Detektiertes Fragment ohne Sequenz- zuordnung	relative Abundanz (%)			
		K2	P2	K4	P4		K2	P2	K4	P4
P2II 38 (95 bp)	65an	0	1	0	0	69 bp	6,1	4,9	2,7	4,6
P4II 13 (95 bp)	99aw	0	0	0	1	88 bp	2,0	2,1	1,9	2,6
P4III 5 (95 bp)	55an	0	0	1	1	113 bp	0	0	0	1,5
K2I 1 (128 bp)	1a	1	1	1	0	124 bp	0	0	1,1	1,1
K4I 37 (128 bp)	48ar	0	0	1	0	263 bp	0	0	0,9	1,4
K4II 10 (128 bp)	58ar	0	0	1	0	398 bp	1,5	1,2	1,0	1,2
P2II 11 (208 bp)	56aj	0	1	0	0	425 bp	6,5	3,7	6,1	4,4
P2I 18 (219 bp)	48g	0	1	0	1	454 bp	0	0	1,2	1,5
P2II 19 (232 bp)	57e	0	1	0	0	484 bp	0	0	1,0	0,8
P2II 28 (282 bp)	60am	0	1	0	0	855 bp	0	0	0,7	0
K2I 3 (404 bp)	3c	1	0	0	0	912 bp	0	0	0	0,8
P4I 19 (441 bp)	72c	0	1	0	1					
P2I 5 (444 bp)	2i	1	3	3	3					
P2II 47 (444 bp)	43i	0	2	0	0					
P2III 5 (458 bp)	71aq	0	1	0	0					
K4III 39 (475 bp)	2n	0	0	1	0					
P2I 27 (496 bp)	49n	0	1	1	0					
P4II 48 (496 bp)	25e	0	0	0	1					
K2III 28 (504 bp)	37b	1	0	0	0					
K2III 35 (504 bp)	38b	1	0	0	0					
P4II 6 (512 bp)	17bc	0	0	0	1					
P2III 11 (602 bp)	75as	0	2	0	0					
P4II 25 (685 bp)	102bf	0	0	0	1					
K2II 2 (797 bp)	18q	1	0	0	0					

In der Tabelle 3.13 ist ersichtlich, dass eine bestimmte Fragmentlänge mehreren in den Klonbanken erhaltenen Sequenzen zugeordnet werden konnte. So war das 490 bp lange Fragment für verschiedene Mikroorganismen aus den Phyla β -Proteobacteria und γ -Proteobacteria charakteristisch. Dazu gehörten zum Beispiel *Herbaspirillum lusitanum* und *Duganella violaceinigra* als β -Proteobacteria sowie *Pseudomonas* sp.-Stämme der

γ-Proteobacteria. Das 139 bp lange Fragment repräsentierte Vertreter der *Actinobacteria*, *β-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* und der *δ-Proteobacteria*. Es kam auch vor, dass für einige Klone, für die beim Vergleich mit Sequenzen der Datenbank NCBI aufgrund der Sequenzähnlichkeit die gleiche verwandte Sequenz gefunden wurde, trotzdem unterschiedliche terminale Restriktionsfragmente infolge von Sequenzunterschieden zu erwarten waren. Beispielsweise wurden fünf Klone als „uncultured *Flexibacter* sp. clone TM19_36“ mit Fragmentlängen von 538, 540 und 541 bp oder drei Klone als *Paenibacillus alginolyticus* mit zu erwartenden Fragmentlängen von 159, 184 und 496 bp identifiziert.

Die meisten Klonsequenzen der in dieser Arbeit erstellten Klonbanken fielen in die Hauptentwicklungslinie der *β-Proteobacteria*. Dies stimmt mit den Ergebnissen der T-RFLP-Analysen überein. Für die in den Klonbanken enthaltenen Vertreter der *β-Proteobacteria* wurden unter anderem Restriktionsfragmente mit Längen von 136, 139, 482, 487 und 490 bp detektiert. Nach 2 und 4 Wochen Wachstum der Gerste wurden für diese Fragmente entsprechend hohe relative Abundanzen ermittelt, die zum Beispiel beim 139 bp-Fragment in einem Bereich von 9,0 (K4) bis 14,5% (K2) lagen oder sich beim 487 bp-Fragment von 8,1 (K2) bis 10,9% (K4) und beim 490 bp-Fragment von 4,7 (P4) bis 10,5% (P2) erstreckten (siehe Tabelle 3.13).

Bezüglich des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-spezifischen Fragments (142,6 bp) wurden in den T-RFLP-Analysen des Gewächshausversuches zwei Fragmente detektiert (siehe Abschnitt 3.4.4). Beim Vergleich mit den Sequenzergebnissen der Klonbanken konnte das 143 bp lange Fragment außerdem als *Conexibacter woesei* identifiziert werden.

Tab. 3.13: Identifizierung der in den T-RFLP-Analysen des Gewächshausversuches detektierten terminalen Restriktionsfragmente.

Phylogenetische Einordnung der 16S-rDNS-Sequenzen der 152 untersuchten Klone aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 und Zuordnung der Restriktionsfragmentlängen der T-RFLP-Analysen (NCBI: Die aufgeführten Informationen stammten aus der öffentlichen Datenbank NCBI.; ARB: Die aufgeführten Informationen wurden mit dem Softwarepaket ARB ermittelt.; n. d.: Das entsprechende Restriktionsfragment konnte in den durchgeführten T-RFLP-Analysen nicht detektiert werden.; /: Das entsprechende Fragment wurde in den T-RFLP-Analysen der bakteriellen Gemeinschaften von K2, P2, K4 oder P4 nicht detektiert, trat aber im gesamten Untersuchungszeitraum auf.; -: Es sind keine Abundanzen vorhanden, da das Fragment nicht detektiert wurde.; Der RFLP-Typ setzt sich aus beiden Mustern zusammen, die jeweils mit MspI (Zahl) und mit RsaI (Buchstabe) erhalten wurden.)

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession-Number (NCBI)	% Ähnlichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP-Typ	T-RF-Länge (bp) (ARB)	T-RF-Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)			
								K2	P2	K4	P4
K2III 15	<i>Polyangium cellulorum</i> strain So9857	AF467674.1	95	<i>Deltaproteobacteria</i>	34g	76	78	/	/	/	/
K2I 11	<i>Polyangium thaxteri</i> strain Pl t3	AJ233943.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	6h	78	80	6,0	10,3	6,7	9,6
P2I 13	<i>Polyangium thaxteri</i> strain Pl t3	AJ233943.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	45ag	78	80				
P2II 10	<i>Polyangium thaxteri</i> strain Pl t3	AJ233943.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	34ag	78	80				
P2II 29	Uncultured delta proteobacterium clone AKYG817	AY922068.1	98	<i>Deltaproteobacteria</i>	61n	78	80				
K4II 32	Uncultured delta proteobacterium clone MSB-5C5	DQ811828.1	88	<i>Deltaproteobacteria</i>	89g	78	80				
P4II 35	Bacterium Ellin5086	AY234503.1	98	<i>Alphaproteobacteria</i>	21l	79	80				
P2II 8	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	M58768.1	97	<i>Bacteroidetes</i>	55ai	82	80	1,2	/	/	/
P2II 33	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	M58768.1	97	<i>Bacteroidetes</i>	63ai	82	80				
P4III 1	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> strain:IFO 15942	AB078060.1	95	<i>Bacteroidetes</i>	18aw	83	84				
P2III 20	Uncultured actinobacterium clone EB1077	AY395396.1	93	<i>Actinobacteria</i>	77au	84	84	2,3	2,7	1,7	2,9
P4I 43	<i>Flavobacterium</i> sp. WB 4.4-73	AM177638.1	98	<i>Bacteroidetes</i>	11ay	85	87				
P4III 2	<i>Flavobacterium</i> sp. WB-1.1.56	AM177392.1	98	<i>Bacteroidetes</i>	27ap	85	87				
P4III 13	<i>Flavobacterium aquatile</i> type strain DSM 1132	AM230485.1	96	<i>Bacteroidetes</i>	18i	85	87				
P4II 27	<i>Phycococcus dokdonensis</i> strain DS-8	EF555583.1	99	<i>Actinobacteria</i>	101b	85	87	2,4	2,9	2,3	3,0
P2II 23	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium clone AS34	EU283364.1	89	<i>Bacteroidetes</i>	58ak	91	91				
K4II 6	Uncultured bacterium clone A09	EF589974.1	97	<i>Bacteroidetes</i>	84i	91	91				
P2I 29	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> type strain DSM 30193	AM230484.1	94	<i>Bacteroidetes</i>	50i	93	91				
K4I 25	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. isolate OF70	AY177767.1	96	<i>Bacteroidetes</i>	84ax	93	91				
P2II 38	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> type strain DSM 30193	AM230484.1	93	<i>Bacteroidetes</i>	65an	95	n. d.	-	-	-	-
P4II 13	Uncultured bacterium clone aab66d10	DQ814283.1	96	<i>Bacteroidetes</i>	99aw	95	n. d.				
P4III 5	<i>Flavobacterium ferrugineum</i> type strain DSM 30193	AM230484.1	94	<i>Bacteroidetes</i>	55an	95	n. d.				

Tab. 3.10: Fortsetzung

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession- Number (NCBI)	% Ähn- lichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP- Typ	T-RF- Länge (bp) (ARB)	T-RF- Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)			
								K2	P2	K4	P4
K2I 1	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	AF041447.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	1a	128	n. d.				
K4I 37	Uncultured bacterium clone FCPS491	EF515925.1	96	<i>Deltaproteobacteria</i>	48ar	128	n. d.	-	-	-	-
K4II 10	Uncultured bacterium clone FCPS491	EF515925.1	96	<i>Deltaproteobacteria</i>	58ar	128	n. d.				
K4II 29	Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium clone AKYG476	AY922024.1	98	<i>Actinobacteria</i>	39an	132	131	8,8	7,3	3,5	5,5
P4I 5	Uncultured <i>planctomycete</i> clone Amb_16S_1421	EF018919.1	90	<i>Planctomycetes</i>	57ah	133	131				
K2I 24	Uncultured eubacterium WD2102	AJ292626.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	11e	134	136				
K2III 37	Uncultured eubacterium WD2102	AJ292626.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	39ab	134	136	15,3	15,0	11,4	11,5
K2III 40	Uncultured <i>Gemmatimonadetes</i> bacterium clone OS-C105	EF612389.1	94	<i>Gemmatimonadetes</i>	40ac	137	136				
P2II 1	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> bacterium clone <i>A.damicornis</i> 19	DQ302114.1	93	<i>Verrucomicrobiae</i>	53ah	137	136				
P2I 44	<i>Actinomadura longicatena</i> strain IMSNU 22180T	AJ293707.1	96	<i>Actinobacteria</i>	52i	139	139				
K2I 6	Uncultured bacterium clone 268ds10	AY212718.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	5e	139	139				
K2I 8	<i>Leptothrix</i> sp. S1.1	DQ241397.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	7g	139	139				
K2II 17	Uncultured bacterium clone Hot Creek 29	AY168738.2	94	<i>Betaproteobacteria</i>	24t	139	139				
K2II 45	Uncultured bacterium clone 268ds10	AY212718.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	11x	139	139				
P2I 30	Uncultured bacterium clone 5-40	DQ833473.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	11g	139	139				
P2II 16	<i>Leptothrix</i> sp. S1.1	DQ241397.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	5g	139	139	14,5	13,8	9,0	11,1
K4I 28	<i>Comamonadaceae</i> bacterium MWH55	AJ556799.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	11ab	139	139				
K2III 45	<i>Cellovibrio</i> sp. R4069	AJ289162.1	99	<i>Gammaproteobacteria</i>	5n	140	139				
P2II 37	Uncultured bacterium clone 268ds10	AY212718.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	11e	141	139				
K4I 17	Uncultured bacterium clone FCPN625	EF516599.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	81g	141	139				
P4III 3	Uncultured bacterium clone FCPO756	EF516497.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	24e	141	139				
P4III 31	Uncultured bacterium clone FCPT598	EF516335.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	5ab	141	139				
K4I 18	Uncultured bacterium clone 40_st3_4-6cm	EU290707.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	82i	141	139				
K2I 32	<i>Conexibacter woesei</i> type strain DSM 14684T	AJ440237.1	95	<i>Actinobacteria</i>	14m	143	143	/	/	1,5	1,5

Tab. 3.10: Fortsetzung

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession- Number (NCBI)	% Ähn- lichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP- Typ	T-RF- Länge (bp) (ARB)	T-RF- Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)							
								K2	P2	K4	P4				
P4I 32	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone lhad17	DQ648916.1	97	<i>Acidobacteria</i>	98g	144	145	1,8	1,4	1,2	1,2				
K4III 19	Uncultured bacterium clone FFCH17365	EU133733.1	87	<i>Bacteroidetes</i>	6bg	144	145								
P4III 25	<i>Bacillus niacini</i> strain YM1C7	EU221338.1	99	<i>Firmicutes</i>	76ar	145	145								
P4III 49	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone VC47	AY211077.1	96	<i>Acidobacteria</i>	47g	146	145	3,8	4,2	2,3	3,1				
P4III 49	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium clone VC47	AY211077.1	96	<i>Acidobacteria</i>	47g	146	147								
K2II 18	<i>Sphingomonas aurantiaca</i> strain MA306a	AJ429237.1	97	<i>Alphaproteobacteria</i>	22m	150	149	2,3	2,5	2,3	3,0				
K2III 11	<i>Caulobacter</i> sp. PhyCEm-1426	AM921648.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	33z	150	149								
P2II 32	Uncultured bacterium clone 48	DQ413107.1	95	<i>Alphaproteobacteria</i>	62m	152	154	/	/	0,9	1,4				
P2II 41	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone 73	EU223948.1	97	<i>Alphaproteobacteria</i>	67b	152	154								
K4II 4	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone 73	EU223948.1	95	<i>Alphaproteobacteria</i>	88f	152	154								
K4II 42	Uncultured bacterium clone BacA_095	EU335286.1	98	<i>Alphaproteobacteria</i>	59b	152	154								
K4III 3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain SEMIA 6069	AY904746.1	98	<i>Alphaproteobacteria</i>	59m	152	154								
P4II 9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> isolate RLA12	EU333382.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	44m	152	154								
K4III 27	<i>Acidovorax</i> sp. BSB421	Y18617.1	93	<i>Betaproteobacteria</i>	5v	152	154								
K4III 23	<i>Opitutus</i> sp. VeGlc2	X99390.1	96	<i>Verrucomicrobiae</i>	92ah	158	157					3,1	3,3	5,2	4,9
P2III 41	<i>Lentzea albidocapillata</i>	AF328680.1	97	<i>Actinobacteria</i>	79aw	159	161					/	/	/	/
P2III 47	<i>Lentzea albidocapillata</i>	AF328680.1	95	<i>Actinobacteria</i>	79g	159	161								
K4II 33	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	AY207582.1	98	<i>Actinobacteria</i>	90b	159	161								
P4I 8	<i>Lentzea albidocapillata</i>	AF328680.1	98	<i>Actinobacteria</i>	51i	159	161								
P4II 4	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	AB073362.1	96	<i>Firmicutes</i>	4n	159	161								
K2II 46	Uncultured bacterium clone SLB728	DQ787731.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	30m	160	161								
K4II 34	Uncultured bacterium clone AKAU4098	DQ125862.1	98	<i>Alphaproteobacteria</i>	91m	160	161								
K4II 38	<i>Agromyces cerinus</i> subsp. <i>cerinus</i> type strain DSM 8595	AM410680.1	98	<i>Actinobacteria</i>	93x	163	161								
P2III 9	<i>Paenibacillus sepulcri</i> strain CCM 7311	DQ291142.1	94	<i>Firmicutes</i>	74ar	169	169								
P2I 15	Uncultured bacterium clone FCPT575	EF516767.1	94	<i>Verrucomicrobiae</i>	2i	169	169	/	/	/	/				

Tab. 3.10: Fortsetzung

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession- Number (NCBI)	% Ähn- lichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP- Typ	T-RF- Länge (bp) (ARB)	T-RF- Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)			
								K2	P2	K4	P4
P4III 50	Uncultured bacterium clone FCPT680	EF516375.1	94	<i>Gammaproteobacteria</i>	44n	170	170	/	/	/	/
K2II 41	Uncultured bacterium clone BacC-s_039	EU335202.1	97	OTU Spam	29w	171	170				
P4III 24	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	AB073362.1	94	<i>Firmicutes</i>	14am	184	183	/	/	/	/
P2II 11	Uncultured bacterium clone FCPT656	EF516525.1	99	<i>Verrucomicrobiae</i>	56aj	208	n. d.	-	-	-	-
P2I 18	Uncultured <i>delta proteobacterium</i> clone MSB-5C5	DQ811828.1	89	<i>Deltaproteobacteria</i>	48g	219	n. d.	-	-	-	-
P2II 19	Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium clone D10_39	EU266803.1	92	<i>Gammaproteobacteria</i>	57e	232	n. d.	-	-	-	-
P4I 14	<i>Leptospira interrogans</i>	X17547.1	88	<i>Spirochaetes</i>	96l	272	274	/	/	/	/
P2II 28	<i>Spirochaeta</i> sp. MWH-HuW8	AJ565433.1	94	<i>Spirochaetes</i>	60am	282	n. d.	-	-	-	-
P4II 23	Uncultured bacterium clone FCPU401	EF516971.1	98	<i>Acidobacteria</i>	100w	292	290	1,2	/	/	/
P2III 7	<i>Phenylobacterium immobile</i>	Y18216.1	96	<i>Alphaproteobacteria</i>	72c	401	401	/	/	/	/
K4II 2	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone TM4_21	DQ303370.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	6ba	401	401				
K2I 7	<i>Caulobacter fusiformis</i> strain ATCC 15257(T)	AJ227759.1	99	<i>Alphaproteobacteria</i>	6f	403	401				
K2I 3	<i>Sphingomonas wittichii</i> strain DSM 6014	AB021492.2	95	<i>Alphaproteobacteria</i>	3c	404	n. d.	-	-	-	-
K4III 47	<i>Dechloromonas</i> sp. JJ	AY032611.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	59ad	430	429	/	/	/	/
P2II 35	Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium clone Amb_16S_1156	EF018705.1	97	<i>Gammaproteobacteria</i>	64g	430	429				
K4I 38	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> clone BIsiii14	AJ318183.1	94	<i>Gammaproteobacteria</i>	15g	430	429				
P4I 36	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> clone BIsiii14	AJ318183.1	94	<i>Gammaproteobacteria</i>	33g	430	429				
P4II 49	Uncultured <i>beta proteobacterium</i> clone EB1078	AY395397.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	61e	432	433				
K2III 47	Uncultured bacterium clone SLB624	DQ787718.1	97	<i>Verrucomicrobiae</i>	41ae	433	433	1,6	1,6	1,6	1,6
K2II 7	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> strain:EJ2M-A	AB079638.1	89	<i>Chloroflexi</i>	21l	434	434	/	/	11,1	0,8
P2I 39	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> strain:MYSI-A	AB079639.1	93	<i>Chloroflexi</i>	51l	434	434				
K2I 30	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> strain:EJ2M-A	AB079638.1	90	<i>Chloroflexi</i>	13l	436	434				
K2II 36	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> strain:MYSI-A	AB079639.1	90	<i>Chloroflexi</i>	27l	436	434				
K2II 47	<i>Kouleothrix aurantiaca</i> strain:MYSI-A	AB079639.1	90	<i>Chloroflexi</i>	31l	436	434				
K4II 40	<i>Kaistia</i> sp. B1-1	AM409363.1	98	<i>Alphaproteobacteria</i>	59q	437	437				
P4II 1	uncultured eubacterium WD2107	AJ292610.1	88	<i>Alphaproteobacteria</i>	19ao	439	438	/	/	/	/
P4I 19	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> strain SKO11	EU410423.1	95	<i>Alphaproteobacteria</i>	72c	441	n. d.	-	-	-	-

Tab. 3.10: Fortsetzung

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession- Number (NCBI)	% Ähn- lichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP- Typ	T-RF- Länge (bp) (ARB)	T-RF- Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)			
								K2	P2	K4	P4
P2I 5	<i>Telluria mixta</i>	DQ005909.2	98	<i>Betaproteobacteria</i>	2i	444	n. d.	-	-	-	-
P2II 47	<i>Telluria mixta</i>	DQ005909.2	98	<i>Betaproteobacteria</i>	43i	444	n. d.	-	-	-	-
P2III 5	Uncultured bacterium clone FFCH1244	EU135492.1	99	<i>Verrucomicrobiae</i>	71aq	458	n. d.	-	-	-	-
K4III 39	Uncultured soil bacterium clone F6-105	EF688386.1	95	<i>Gammaproteobacteria</i>	2n	475	n. d.	-	-	-	-
K2I 25	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	12k	483	482	2,9	3,9	5,0	4,3
K2II 8	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	20r	483	482				
K2II 42	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	17p	483	482				
K4II 35	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	12p	483	482				
P4III 48	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	2p	483	482	8,1	8,4	10,9	9,1
K2III 18	<i>Duganella zoogloeoides</i>	D14256.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	26aa	488	487				
K2III 44	<i>Methylibium fulvum</i> strain: Gsoil 328	AB245357.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	12ad	488	487				
P2II 36	<i>Duganella</i> sp. BD-a14	EF575562.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	47i	488	487				
K4I 27	<i>Janthinobacterium</i> sp. SY12	EF455530.1	97	<i>Betaproteobacteria</i>	8g	488	487				
K4I 46	Uncultured bacterium clone BANW456	DQ264450.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	61u	488	487				
P4II 2	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i>	Y08845.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	2g	488	487				
P4II 7	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	AF368755.1	93	<i>Betaproteobacteria</i>	12g	488	487				
P4II 16	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i>	Y08845.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	59i	488	487				
P4III 23	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i>	Y08845.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	8i	488	487				
K2II 33	<i>Beta proteobacterium</i> A0637	AF236004.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	26v	490	490	8,5	10,5	8,4	4,7
K2III 12	Uncultured bacterium clone 29	AY250094.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	26i	490	490				
K2III 29	Uncultured bacterium clone 29	AY250094.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	8u	490	490				
K2III 48	Uncultured bacterium clone 29	AY250094.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	12i	490	490				
P2I 23	Uncultured bacterium clone 29	AY250094.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	43i	490	490				
P2III 22	<i>Janthinobacterium</i> sp. SY12	EF455530.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	12i	490	490				
K4I 32	<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	AF543312.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	8b	490	490				
P4I 10	<i>Duganella violaceinigra</i> strain YIM 31327	AY376163.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	95i	490	490				
P4I 20	<i>Duganella violaceinigra</i> strain YIM 31327	AY376163.1	99	<i>Betaproteobacteria</i>	97i	490	490				

Tab. 3.10: Fortsetzung

Klon	Sequenzähnlichkeit (NCBI)	Accession- Number (NCBI)	% Ähn- lichkeit (NCBI)	Phylogenetische Einordnung (ARB)	RF LP- Typ	T-RF- Länge (bp) (ARB)	T-RF- Länge (bp) (T-RFLP)	relative Abundanz (%)			
								K2	P2	K4	P4
P4I 25	<i>Beta proteobacterium</i> A0637	AF236004.1	98	<i>Betaproteobacteria</i>	20v	490	490				
P2III 4	Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium clone Amb_16S_676	EF018313.1	94	<i>Gammaproteobacteria</i>	70n	490	490				
P2III 14	<i>Pseudomonas</i> sp. PILH1	DQ453824.1	99	<i>Gammaproteobacteria</i>	12n	490	490				
P4III 8	<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy	AM410625.1	99	<i>Gammaproteobacteria</i>	8n	490	490				
K2II 26	Uncultured <i>Beta proteobacterium</i> clone CI-73-TB2-II	AY599723.1	96	<i>Betaproteobacteria</i>	25u	491	490				
P2II 48	Uncultured soil bacterium clone UE4	DQ297982.1	98	<i>Gammaproteobacteria</i>	68ao	491	490				
P4II 12	Uncultured bacterium clone BacA_002	EU335225.1	97	<i>Gammaproteobacteria</i>	25l	493	492				
P2II 2	<i>Enterobacter amnigenus</i> isolate p412	AM062693.1	99	<i>Gammaproteobacteria</i>	54m	494	492	/	/	/	/
P2I 27	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	AB073362.1	94	<i>Firmicutes</i>	49n	496	n. d.	-	-	-	-
P4II 48	Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium clone D10_39	EU266803.1	98	<i>Gammaproteobacteria</i>	25e	496	n. d.	-	-	-	-
K2III 28	<i>Polyangium thaxteri</i> strain Pl t3	AJ233943.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	37b	504	n. d.	-	-	-	-
K2III 35	<i>Polyangium thaxteri</i> strain Pl t3	AJ233943.1	91	<i>Deltaproteobacteria</i>	38b	504	n. d.	-	-	-	-
P2III 8	Uncultured bacterium clone FFCH7961	EU134515.1	98	<i>Deltaproteobacteria</i>	73ar	507	509	/	/	/	/
P4II 6	Uncultured bacterium clone JSC8-B3	DQ532221.1	95	<i>Thermomicrobia</i>	17bc	512	n. d.	-	-	-	-
K4I 39	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone AKYG1623	AY921965.1	96	<i>Chloroflexi</i>	2ai	518	518	/	/	/	/
K2III 49	Uncultured bacterium clone Hot Creek 83	AY168752.1	94	<i>Bacteroidetes</i>	32b	525	524	/	/	/	/
K4III 32	Uncultured bacterium clone FCPT509	EF516821.1	93	<i>Firmicutes</i>	94m	535	534	/	/	/	/
P2I 12	Uncultured <i>Flexibacter</i> sp. clone TM19_36	DQ279370.1	90	<i>Bacteroidetes</i>	44af	538	540	/	/	/	/
P4II 45	<i>Mucilaginibacter</i> sp. BNX5-31	EU423302.1	97	<i>Bacteroidetes</i>	80aw	540	542				
P4III 41	Uncultured <i>Flexibacter</i> sp. clone TM19_36	DQ279370.1	93	<i>Bacteroidetes</i>	87bd	540	542				
P4III 42	Uncultured <i>Flexibacter</i> sp. clone TM19_36	DQ279370.1	94	<i>Bacteroidetes</i>	87be	540	542				
K2I 22	Uncultured bacterium clone FCPP438	EF516475.1	94	<i>Bacteroidetes</i>	10j	541	542	/	/	/	/
K4II 1	Uncultured bacterium clone: SRRB37	AB240511.1	98	<i>Bacteroidetes</i>	87az	541	542				
P2II 24	Uncultured <i>Flexibacter</i> sp. clone TM19_36	DQ279370.1	93	<i>Bacteroidetes</i>	33al	541	542				
K2I 40	Uncultured <i>Flexibacter</i> sp. clone TM19_36	DQ279370.1	92	<i>Bacteroidetes</i>	16o	541	542				
P2III 11	Uncultured bacterium clone SLB624	DQ787718.1	98	<i>Verrucomicrobiae</i>	75as	602	n. d.	-	-	-	-
P4II 25	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain BEP2	AF148938.1	93	<i>Deltaproteobacteria</i>	102bf	685	n. d.	-	-	-	-
K2II 2	Uncultured bacterium clone FFCH11598	EU135485.1	93	<i>Verrucomicrobiae</i>	18q	797	n. d.	-	-	-	-

4 Diskussion

4.1 Wirkmechanismen mit pflanzenwachstumsförderndem Potenzial von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)

Der in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Experimenten im Labor, Gewächshaus und im Freiland eingesetzte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm wurde anhand einiger Parameter, die im Hinblick auf die pflanzenwachstumsstimulierende Wirkung von Bedeutung sind, untersucht. Zunächst sollte der Stamm hinsichtlich der **Produktion von Siderophoren** mit Hilfe von Chromazurol S/HDTMA-Indikatorplatten überprüft werden. Die Fähigkeit zur Bildung von Siderophoren konnte unter Laborbedingungen nachgewiesen werden.

Siderophoren werden sowohl von Mikroorganismen als auch von Gramineen unter Eisenmangelbedingungen gebildet (Crowley & Kraemer, 2007). Die Siderophorenproduktion ist in der Vergangenheit vielfach im Zusammenhang mit der Rhizosphärenkompetenz wurzelbesiedelnder Bakterien (Raaijmakers *et al.*, 1995; Moënne-Loccoz *et al.*, 1996) und mit der Unterdrückung phytopathogener Organismen infolge von Konkurrenz um Eisen (Neilands & Leong, 1986; Buysens *et al.*, 1996) untersucht worden. Beispielsweise beobachteten Kloepper *et al.* (1980) unter Gewächshausbedingungen, dass der *Pseudomonas putida*-Stamm B10 die phytopathogene Wirkung der Schadpilze *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* und *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* schwächte. Dies traf jedoch nicht zu, wenn dem verwendeten Boden Eisen zugegeben und somit die Siderophorenproduktion des Stammes unterdrückt wurde. De Weger *et al.* (1986) untersuchten 30 verschiedene wurzelbesiedelnde *Pseudomonas*-Stämme hinsichtlich Siderophorenproduktion und antagonistischer Aktivität. Alle Stämme zeigten eine antagonistische Aktivität gegenüber einer Reihe von Testorganismen *in vitro*. Diese Aktivität verringerte sich bei 25 Stämmen mit zunehmender Eisenkonzentration im Medium. Siderophorenegative Mutanten zweier Stämme verloren die Biokontrollaktivität gänzlich.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Biokontrollfähigkeit pflanzenwachstumsfördernder Bakterien im Vergleich zur Siderophorenbildung eher die Antibiotika-Produktion die größere Bedeutung einnimmt (Oedjijono *et al.*, 1993; Haas & Defago, 2005; Crowley & Kraemer, 2007). Crowley & Kraemer (2007) weisen darauf hin, dass viele biokontrollaktive Bakterien bei der Anzucht in nährstoffreichem, Eisenlimitiertem Medium (*in vitro*) viel höhere Quantitäten an Siderophoren produzieren als in der Rhizosphäre detektiert werden. Deshalb ist die Rolle der Siderophoren bezüglich der direkten Unterdrückung phytopathogener Organismen in der Rhizosphäre umstritten. Die Siderophorenproduktion in der Rhizosphäre ist außerdem vom Besiedlungsort der entsprechenden Bakterien an der Wurzel, vom Wachstumsstadium und vom Nährstoffstatus der Pflanze sowie von chemischen Bodeneigenschaften (pH-Wert, Redox-Verhältnisse) abhängig (Crowley & Kraemer, 2007).

Viele verschiedene Bakterien produzieren das Phytohormon **Indol-3-Essigsäure (IES)**. Es wird angenommen, dass 80% der Rhizosphärenbakterien dazu in der Lage sind (Spaepen *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Produktion von IES auch für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm festgestellt werden. Dabei wurde *in vitro* eine mit dem IES-produzierenden Stamm *Azospirillum brasilense* Sp7 vergleichbare Konzentration an IES gemessen.

Für viele PGPR ist gezeigt worden, dass die bakterielle IES-Biosynthese in engem Zusammenhang mit einer erhöhten Wurzelentwicklung steht. Spaepen *et al.* (2007) postulieren, dass Bakterien IES als Bestandteil ihrer Kolonisierungsstrategie nutzen, indem sie die Entwicklung von Wurzelgewebe stimulieren und so die Besiedlungsoberfläche und auch die Nährstoffexsudation für das bakterielle Wachstum erhöhen. In den letzten Jahren wurde die IES-Produktion hauptsächlich von *Azospirillum* als bedeutungsvoller Mechanismus der Förderung des pflanzlichen Wachstums untersucht (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Dobbelaere & Okon, 2007; Spaepen *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2008). Experimente mit *Azospirillum*-Mutanten, die Modifizierungen hinsichtlich der IES-Biosynthese enthielten, führten zu einer deutlichen Abnahme des stimulierenden Effekts auf die Wurzelmorphologie von Weizen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Barbieri *et al.*, 1986; Dobbelaere *et al.*, 1999; Spaepen *et al.*, 2008).

Rothballer *et al.* (2005) konnten erstmalig die *in situ* Expression des *ipdC*-Gens nachweisen. Das Enzym Indol-3-Pyruvat-Decarboxylase (IpDC) gilt als Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Indol-3-Pyruvat zu Indol-3-Essigsäure innerhalb des Indol-3-Pyruvat-Weges, der einen der biochemischen Wege für die Produktion von IES darstellt.

Mehrere Studien mit *Azospirillum* zeigten jedoch, dass Wachstums- und Ertragssteigerungen nicht allein durch die IES-Produktion erreicht werden sondern vielmehr als Ergebnis des Zusammenwirkens mehrerer Mechanismen anzusehen sind (Spaepen *et al.*, 2007). Xie *et al.* (1996) fanden in Experimenten unter axenischen Bedingungen mit dem pflanzenwachstumsfördernden *Pseudomonas putida*-Stamm GR12-2 keine direkte Beziehung zwischen der IES-Biosynthese und dem Wurzelwachstum von Rapskeimlingen. Eine Mutante mit *in vitro* vierfach höherer IES-Produktion verglichen mit dem Wildtyp konnte dabei keine Wurzelverlängerung bewirken.

Die für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm nachgewiesene IES-Produktion dürfte in Bezug auf die Steigerung des Wurzelwachstums auch eher eine untergeordnete Rolle spielen, denn im Gewächshausversuch konnte in den ersten 10 Wochen Wachstum kein signifikanter Unterschied bei der Wurzeltrockenmasse von mit Proradix® behandelten Gerstenpflanzen gefunden werden (siehe Abbildung 3.11). In weiteren Experimenten konnte ebenso keine deutliche Veränderung der Wurzelmorphologie durch die Proradix®-Behandlung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise bietet die IES-Produktion dem Proradix®-Stamm eher einen Kolonisierungsvorteil, wie dies für *Pseudomonas fluorescens* HP72 festgestellt werden konnte (Suzuki *et al.*, 2003). Dieser IES-produzierende Stamm induzierte eine Verminderung des Wurzelwachstums von Straußgras. Seine Fähigkeit zur Kolonisierung war jedoch im Vergleich zu einer Mutante mit geringer IES-Produktion höher. Einige Autoren berichten außerdem von physiologischen Veränderungen in der Wurzel nach Inokulation mit IES-produzierenden PGPR. Zum Beispiel führte die Inokulation mit dem *Azospirillum brasilense*-Stamm Cd (1×10^8 CFU/ml) in Versuchen mit Tomatenkeimlingen zur Erhöhung der Respirationsrate pro Wurzel um 70%, der spezifischen Aktivität der Malat-Dehydrogenase um 45-65% und des Proteingehalts um 20% im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle (Hadas & Okon, 1987). Eine erhöhte Wurzel-Respirationsrate deutet auf eine Zunahme der metabolischen Aktivität hin. Fallik *et al.* (1988) beobachteten

einen Anstieg der spezifischen Aktivität mehrerer Enzyme, wie beispielsweise der Alkohol-Dehydrogenase, der Glutamin-Synthetase, der Pyruvat-Kinase und der sauren Phosphatase, in Wurzelextrakten von Mais nach Applikation von *Azospirillum brasilense* (10^7 CFU/Pflanze). So könnte die erhöhte Phosphataufnahme, die nach Inokulation mit *Azospirillum* in Wurzeln beobachtet wurde, mit der gesteigerten Aktivität der sauren Phosphatase erklärt werden. Es ist möglich, dass sich die IES-Produktion des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes aufgrund solcher oder ähnlicher physiologischer Veränderungen in der Wurzel stimulierend auf das pflanzliche Wachstum auswirkt.

Ein weiterer Parameter, der im Zusammenhang mit der Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Rhizosphärenbakterien bereits intensiv untersucht wurde, ist die **Synthese des Enzyms 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase** (Glick, 2005). Die ACC-Deaminase wandelt ACC in Ammoniak und α -Ketobutyrat um. Rhizosphärenbakterien, die zur Biosynthese der ACC-Deaminase befähigt sind, verringern somit den ACC-Gehalt im Wurzelbereich. Dies führt zu einer Reduzierung der von Pflanzen gebildeten Ethylen-Menge und schließlich zur Verminderung der Hemmung der Wurzelelongation, verursacht durch hohe Ethylenkonzentrationen. Ethylen wird von höheren Pflanzen aus L-Methionin über die Zwischenstufen S-Adenosyl-L-Methionin und ACC gebildet und ist beispielsweise an der Samenkeimung, der Gewebedifferenzierung, der Wurzelelongation, der Blütenentwicklung, der Frucht-reifung und der Seneszenz beteiligt. Auf biotischen und abiotischen Stress reagieren Pflanzen mit einer erhöhten Ethylen-Biosynthese. In einigen Fällen wirkt sich Ethylen stimulierend, in anderen Situationen hemmend auf die Pflanze aus.

Im Jahr 1978 wurde die ACC-Deaminase vom *Pseudomonas* sp.-Stamm ACP erstmalig isoliert und ist später bei einer Vielzahl anderer pflanzenwachstumsfördernder Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas* sp. 6G5 (Klee *et al.*, 1991) und *Pseudomonas putida* GR12-2 (Jacobson *et al.*, 1994) detektiert worden. Für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem gewählten Testverfahren keine ACC-Deaminase Aktivität nachgewiesen werden.

Die Fähigkeit zur **Hemmung phytopathogener Mikroorganismen** wurde besonders bei Vertretern der Gattung *Pseudomonas* untersucht und konnte hauptsächlich für fluoreszierende Pseudomonaden nachgewiesen werden (Dowling & O’Gara, 1994; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Haas & Defago, 2005). In dieser Arbeit sollte die wachstumsinhibierende Wirkung des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes auf eine Reihe ausgewählter bodenbürtiger Schadpilze überprüft werden. Eine Hemmung des pilzlichen Wachstums konnte bei *Gaeumannomyces graminis* Ggt 13 und *Pythium ultimum* Isolat Witzenhausen in so genannten Dualkulturtests im Labor beobachtet werden. Weller (1988), Kloepper *et al.* (1989) und Dowling & O’Gara (1994) heben hervor, dass solche Effekte unter Laborbedingungen nicht direkt auf die Biokontrollfähigkeit im Freiland übertragbar sind, da *in vivo* viel komplexere Bedingungen zu berücksichtigen sind.

Parallel zu dieser Arbeit wurde in einer zweiten Doktorarbeit von Andreas Fröhlich am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie (BIOP) am Helmholtz Zentrum München der Effekt von Proradix® und weiterer Pflanzenaktivatoren auf die Resistenz von Gerste untersucht. Dabei wurden unter anderem Topfversuche mit dem bodenbürtigen, phytopathogenen Pilz *Gaeumannomyces graminis* Ggt 13 (Sandkulturen) unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Als weiterer phytopathogener Pilz wurde *Rhynchosporium secalis*, bei dem Erstinfektionen von Myzel in Blättern und Körnern ausgehen, in Experimenten mit Torfsubstrat verwendet. Mit Proradix® behandelte Gerstenpflanzen zeigten weniger Pilzbefall als nicht behandelte Kontrollpflanzen (Andreas Fröhlich, persönliche Mitteilung), was nach der Proradix®-Applikation im Falle von *Gaeumannomyces graminis* auf die Ausbildung spezifischer Pathogen-Antagonist-Interaktionen sowie Antibiose und bei *Rhynchosporium secalis* auf systemische Resistenzeffekte hinweisen würde. Der Nachweis des verringerten Pilzbefalls erfolgte mit der quantitativen „real-time“ PCR. Folglich besitzt der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm Potenzial zur Biokontrolle und zur Produktion antibiotisch wirksamer Verbindungen.

4.2 Stimulierung des Pflanzenwachstums durch Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)

Die pflanzenwachstumsfördernde Wirkung nützlicher Rhizosphärenbakterien konnte in der Vergangenheit in einer Vielzahl verschiedener Studien nachgewiesen werden (Brown, 1974; Weller, 1988; Kloepper *et al.*, 1989; Reddy & Rahe, 1989; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001; Rothballer *et al.*, 2003; Spaepen *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit sollte der PGPR-Effekt von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf Gerste in verschiedenen Experimenten im Labor, im Gewächshaus und im Freiland überprüft werden. Im Labor konnten nach dreiwöchiger Anzucht im unsterilen Quarzsandsystem sowohl bei den Sprossen als auch bei den Wurzeln keine signifikanten Wuchsunterschiede für die Proradix®-Behandlung ermittelt werden (siehe Abbildungen 7.1 und 7.2). Zur Ausprägung eines stimulierenden Effekts durch Proradix® ist dieser gewählte Untersuchungszeitraum zu kurz, aber durch die Versuchsbedingungen des Quarzsandsystems nicht ausweitbar. Außerdem wird der Beginn der Pflanzenentwicklung stark von im Samen gespeicherten Nährstoffen beeinflusst.

Auch nach zehn Wochen Wachstum im Ackerboden im Gewächshaus wurde keine signifikante Stimulierung des Gerstenwachstums gefunden (siehe Abbildungen 3.10-3.12). Der pflanzenwachstumsfördernde Effekt durch Proradix® wurde erst nach Anzucht bis zur vollständigen Kornreife in Topfexperimenten mit Kultursubstraten sichtbar (siehe Abbildungen 3.6, 3.8, 3.9). Rothballer *et al.* (2003) fanden unter ähnlichen Gewächshausbedingungen in Experimenten mit *Azospirillum brasilense*-Stämmen und unterschiedlichen Weizensorten bereits nach sieben Wochen einen ausgeprägten PGPR-Effekt mit einer Steigerung der Sprosstrockenmasse von bis zu 60% gegenüber der Kontrolle. Ebenso zeigten Dobbelaere *et al.* (2001) einen frühen stimulierenden Effekt auf die Wurzelentwicklung und das Pflanzenwachstum während der ersten Wochen nach der Inokulation mit *Azospirillum*-Stämmen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Experimente mit Proradix®.

In den Topfexperimenten im Gewächshaus wurden signifikante Wachstumssteigerungen durch Proradix® nur bei der Anzucht von Gerste unter Mangelbedingungen (Licht und Nährstoffangebot) festgestellt (Tabelle 4.1).

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Topfexperimente mit Kultursubstraten im Gewächshaus
*: signifikant erhöht, n. s.: nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle

Beleuchtung	Substrat	Effekt durch Proradix®-Behandlung			
		Anzahl Ähren	Strohgewicht	Ährengewicht	TKG
Hochdruck-Natriumdampf- lampe	Ökohum® nährstoffreich	*	*	*	n. s.
Halogen-Metall- dampf- lampe	Ökohum® nährstoffreich	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Halogen-Metall- dampf- lampe	Fruhstorfer Erde® nährstoffarm	*	*	*	n. s.
Halogen-Metall- dampf- lampe	Ökohum®:Fruhs- torfer Erde® 1:1	*	n. s.	n. s.	n. s.

Dieser stimulierende Effekt war bei der Verwendung von Hochdruck-Natriumdampf-
lampen mit einer Zunahme der Anzahl der Ähren und des Strohgewichts um 44%
gegenüber der Kontrolle am stärksten ausgeprägt.

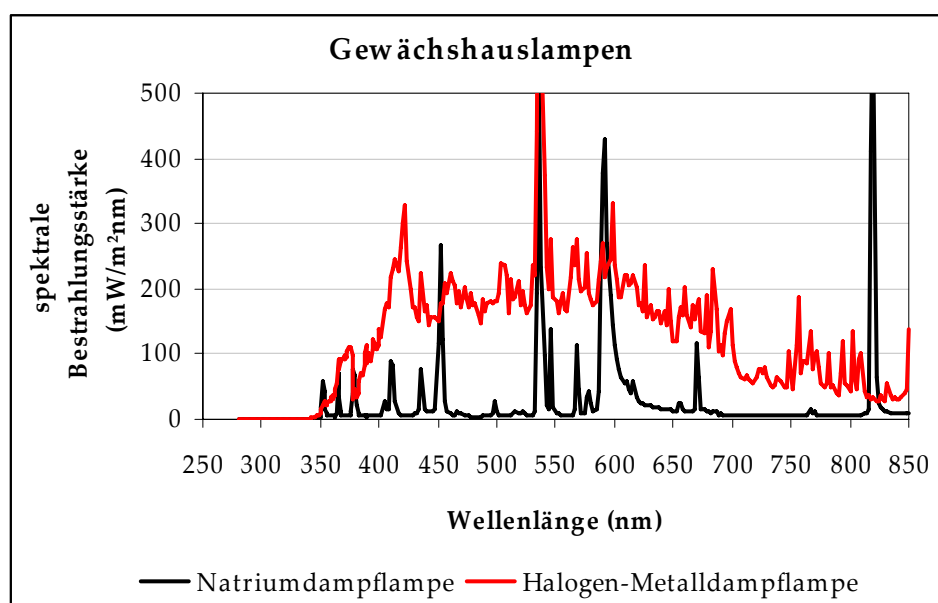


Abb. 4.1: Spektrale Bestrahlungsstärken der in dieser Arbeit verwendeten Gewächshauslampen. Die Messungen erfolgten in 1 m Entfernung von den Lampen.

Mit den Hochdruck-Natriumdampflampen wurden Lichtmangelbedingungen erzeugt. Anhand der Abbildung 4.1, die die Lichtspektren für beide verwendeten Lampenarten zeigt, wird deutlich, dass unter Verwendung der Hochdruck-Natriumdampflampen Blaulicht- (420-490 nm) und Rotlichtanteile (650-750 nm) fehlen. Für die Photosynthese sind jedoch die roten und blauen Bereiche des Lichtspektrums entscheidend.

Auch unter Nährstoffmangel waren die Anzahl der Ähren um bis zu 24% und das Strohgewicht um bis zu 29% bei den Proradix®-Behandlungen erhöht. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten aus Gewächshaus- und Felduntersuchungen mit mehreren Azospirillen-Stämmen überein (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001). Dabei konnten ausgeprägte PGPR-Effekte hauptsächlich in leichten Böden mit verminderter oder fehlender Stickstoffdüngung ermittelt werden. In schweren Böden und unter Einsatz von Dünger verringerten sich diese förderlichen Effekte drastisch oder verschwanden ganz.

In einer Reihe von Freilanduntersuchungen konnten bereits erhebliche Ertragssteigerungen mit Hilfe von „Plant Growth Promoting Rhizobacteria“ erreicht werden. So fanden Weller & Cook (1986) die höchste Ertragssteigerung mit 26% durch *Pseudomonas fluorescens* Q72a-80 in Parzellenversuchen mit Winterweizen, wobei die Parzellen mit *Pythium* spp. befallen waren. Schroth & Hancock (1982) berichteten, dass sich die Erträge von Kartoffeln durch den Einsatz fluoreszierender Pseudomonaden um 5-33% erhöhten. Nach Auswertung weltweiter Feldversuche mit verschiedenen Nutzpflanzen, wie beispielsweise Gerste, Weizen, Mais und Reis, zeigten Okon & Labandera-Gonzalez (1994), dass Inokulationen mit *Azospirillum brasilense*- und *Azospirillum lipoferum*-Stämmen statistisch signifikante Ertragssteigerungen in einem Bereich von 5 bis 30% bei 60-70% der Experimente bewirkten.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten nach Applikation von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) signifikante Steigerungen der Ertragszahlen um 19% (ökologische Bewirtschaftung), 15 und 13% (integrierte Bewirtschaftung) im Vergleich zu unbehandelten Gerstenpflanzen ermittelt werden. Dies beschränkte sich im Jahr 2006 auf zwei und 2007 auf einen der insgesamt jeweils vier untersuchten Schläge des HMGU-Versuchsgutes in Scheyern. In Übereinstimmung berichteten Dobbelaere *et al.* (2001) ebenso, dass bei der Durchführung verschiedener Feld- und Gewächshausversuche in Belgien, Uruguay,

Mexiko und Israel die Inokulationen nicht immer zu signifikanten Unterschieden zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen führten und nannten als Gründe unterschiedliche Witterungseinflüsse, variierende Umwelt-Boden-Pflanzen Bedingungen und die Zusammensetzung der Mikroflora an den jeweiligen Untersuchungsstandorten. Bei der Diskussion von Freilandergebnissen müssen viele verschiedene, komplex wirkende Faktoren, die den förderlichen Effekt der Inokulation beeinflussen, in Betracht gezogen werden. Dazu gehören die Temperatur, die Bodenfeuchte, der pH-Wert des Bodens, der Ton- und Nährstoffgehalt des Bodens, die autochthone Mikroflora, die Eigenschaften der Nutzpflanze, der speziellen Sorte, der vorhandenen phytopathogenen Organismen und des eingesetzten PGPR, die Art der Applikation und der Formulierung sowie die applizierte Keimzahl (Weller, 1988; Reddy & Rahe, 1989; Dowling & O’Gara, 1994; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Kloepper, 1996; Bashan, 1998; Haas & Defago, 2005). Viele Autoren sehen neben der Inokulationsdichte die Temperatur als eine bedeutende Einflussgröße auf die Populationsdichte von Mikroorganismen an. Loper *et al.* (1985) kamen zu dem Ergebnis, dass die Populationen von zwei verschiedenen inokulierten fluoreszierenden Pseudomonaden in der Rhizosphäre von Kartoffeln bei 12 bzw. 18°C größer waren als bei 24°C. Von einer besseren Wurzelbesiedlung durch *Pseudomonas fluorescens* ANP15 bei 18°C im Vergleich zu 30°C berichten auch Seong *et al.* (1991). Vandenhove *et al.* (1991) beobachteten eine höhere Überlebensrate von *Pseudomonas fluorescens* 88W1 im Boden mit einer Temperatur von 5 und 15°C verglichen mit 25°C.

Auf dem Versuchsgut in Scheyern beeinflussten besonders die Witterungsbedingungen, die sich auch zwischen den beiden Untersuchungsjahren stark unterschieden, das Wachstum der Gerstenpflanzen und wahrscheinlich auch den Proradix®-Effekt. Anhand der Abbildungen 4.2 und 4.3 ist ersichtlich, dass im Jahr 2006 der Juli sehr warm und trocken war, was sich wesentlich auf die Kornreifung auswirkte. Im Jahr 2007 wurde besonders das Keimlingsstadium der Gerstenpflanzen im April von einer extremen Trockenheit und höheren Temperaturen bestimmt, was möglicherweise auch einen negativen Einfluss auf die Besiedlung der auskeimenden Wurzeln durch Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) zur Folge hatte. Der weitere Verlauf des Untersuchungszeitraums bis Ende Juni zeichnete sich durch deutlich höhere Temperaturen gegenüber der

entsprechenden langjährigen, mittleren Monatstemperatur aus und die Monate Mai und Juli waren sehr feucht. Aufgrund dieser Witterungsbedingungen wurden in Scheyern 2007 im Vergleich zu 2006 insgesamt um bis zu 50% erniedrigte Erträge ermittelt.

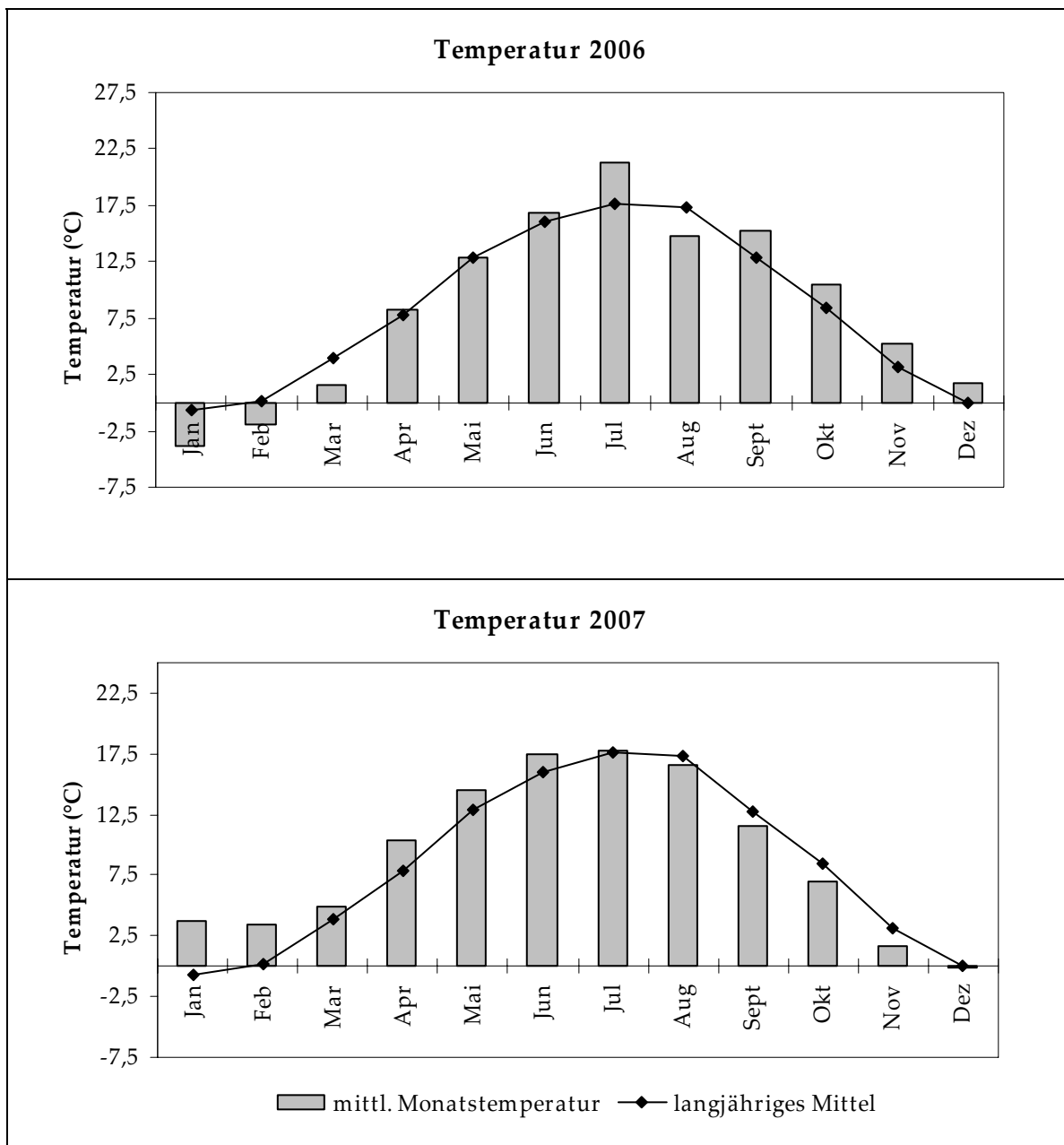


Abb. 4.2: Temperaturen für das HMGU-Versuchsgut in Scheyern in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

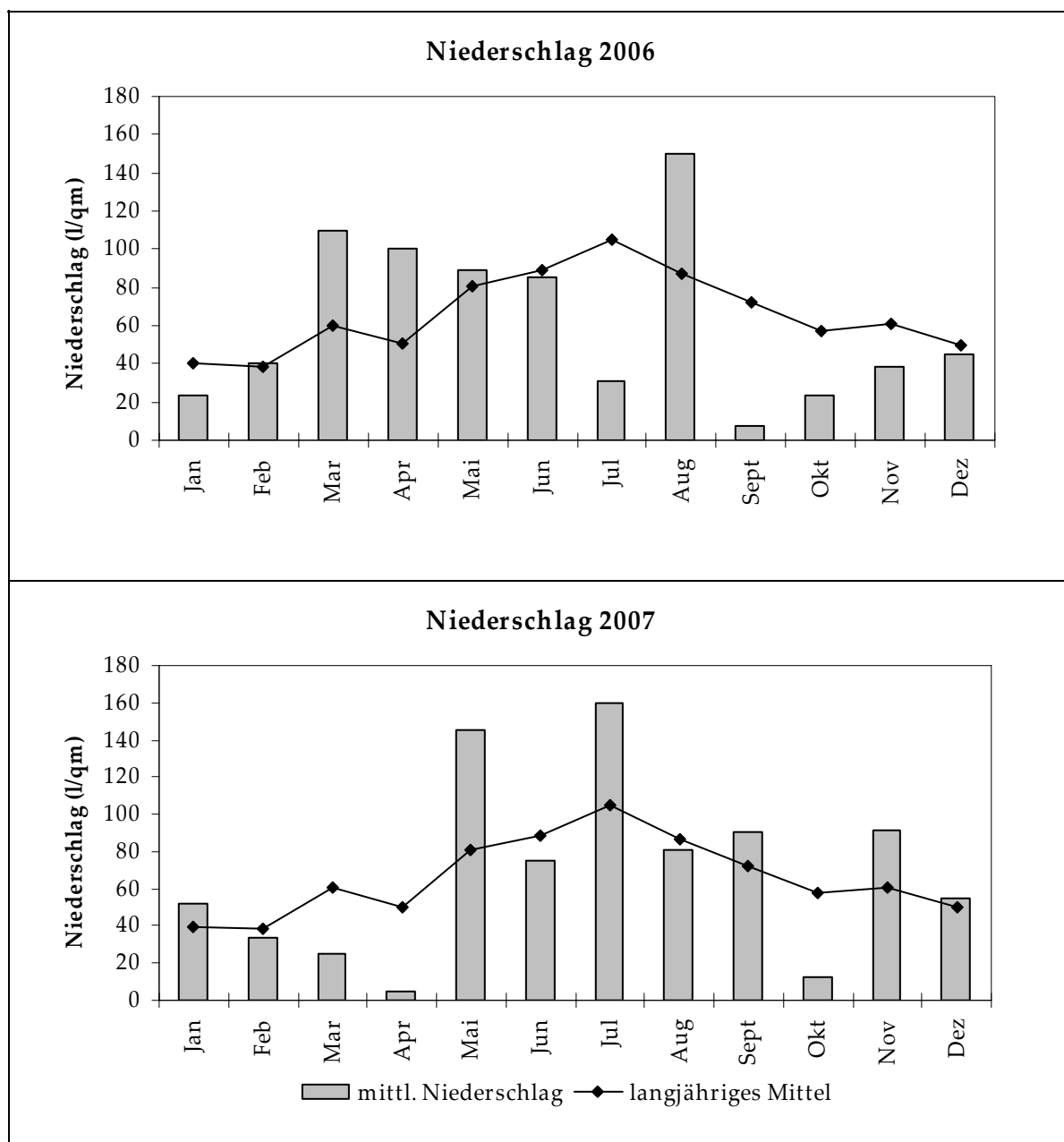


Abb. 4.3: Niederschlagsmengen für das HMGU-Versuchsgut in Scheyern in den Untersuchungsjahren 2006 und 2007

In Scheyern konnten in der integrierten Bewirtschaftung in beiden Jahren Ertragssteigerungen durch Behandlung mit Proradix® festgestellt werden, obwohl die Pflanzen durch Düngung optimal mit Nährstoffen versorgt waren und auch höhere Nährstoffkonzentrationen im Boden, verglichen mit dem ökologischen Anbau, nachgewiesen wurden (siehe Abschnitt 3.2.3, Tabelle 3.2). Für die ökologische Bearbeitung ohne Düngergaben bewirkte Proradix® nur 2006 an einem der ausgewählten Parzellenstandorte eine signifikante Zunahme des Ertrags. Das Wachstum der Gerste wurde in beiden

Untersuchungsjahren, besonders 2007, auf den ökologisch bewirtschafteten Parzellen von einem starken Unkrautdruck beeinflusst, was sich negativ auf die Erträge, den möglichen Effekt durch Proradix® und die Auswertung der Parzellenexperimente auswirkte. Die aufgetretenen, für die Pflanzenentwicklung extremen Einflüsse (phasenweise Trockenheit, erhöhte Temperaturen, hoher Unkrautdruck) können die Gegensätze der Freilandergebnisse zu den Ergebnissen im Gewächshaus und anderer publizierter Erfahrung mit PGPR (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001) erklären.

Möglicherweise bietet der Einsatz von Proradix® behandelten Pflanzen einen Wachstumsvorteil in Anwesenheit von phytopathogenen Mikroorganismen. Um diesbezüglich Aussagen treffen zu können, wären weitere definierte Experimente unter Pathogendruck bzw. Stressbedingungen in Pflanzenklimakammern oder im Gewächshaus notwendig. Im Freiland sind mehrjährige Experimente mit Untersuchungszeiträumen über mindestens 5 Jahre erforderlich, um auswertbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten und Empfehlungen geben zu können.

Im Versuchsgut in Roggenstein wurden aufgrund des wesentlich niedrigeren Unkrautdrucks, eines kaum vorhandenen Pathogendrucks sowie eines optimalen Nährstoffangebots im ökologischen und im integrierten Anbau bis zu doppelt so hohe Erträge, verglichen mit den Ergebnissen aus Scheyern, erreicht. Ein wachstumsfördernder Effekt durch Proradix® war unter diesen optimalen Bedingungen jedoch nicht nachweisbar. Dies stimmt mit den im Gewächshaus erhaltenen Ergebnissen und der Literatur (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 2001) überein.

Für die Biokontrolle und die stimulierende Wirkung auf das Pflanzenwachstum müssen inokulierte PGPR in ausreichenden Populationsdichten in der Rhizosphäre vorhanden sein (Weller, 1988; Haas & Defago, 2005). Als Grund für eine ungenügende, unbeständige Wirkung von PGPR in der Praxis wurde oft die ineffiziente Wurzelbesiedlung genannt (Weller, 1988). Okon & Labandera-Gonzalez (1994) sehen in der Inokulationsdichte den wichtigsten Faktor für die Intensität des PGPR-Effekts und nennen als optimale Konzentration 1×10^7 CFU pro Same oder Keimling anhand ihrer Untersuchungen mit verschiedenen Azospirillen. Zur Biokontrolle von *Gaeumannomyces graminis* oder *Pythium* spp. durch *Pseudomonas* sind Besiedlungszahlen im Bereich von 10^5 bis 10^6 CFU/g Wurzel entscheidend (Haas & Defago, 2005). Es ist möglich, dass nach der in dieser Arbeit

angewendeten Vakuuminfiltration zur Behandlung des Gerstensaatgutes mit Proradix® zu wenig Bakterien auf und in den Samen vorhanden waren bzw. überlebten, um die Wurzel erfolgreich zu besiedeln, sich gegenüber der starken Konkurrenz in der Rhizosphäre durchzusetzen und letztendlich überzeugende Ertragssteigerungen im Feldmaßstab zu bewirken.

Inokulationsexperimente, die zum Erfolg führen, können solche sein, bei denen der optimalen Zellzahl des Inokulums spezielle Aufmerksamkeit gewidmet wird und geeignete Inokulationsmethoden verwendet werden, bei denen die Inokulumkonzentration erhalten und für die effektive Wurzelbesiedlung verfügbar bleibt (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

4.3 Lokalisierung von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) in der Rhizosphäre von Gerste

Da eine erfolgreiche Wurzelbesiedlung für die nützliche Wirkung pflanzenwachstumsfördernder Rhizosphärenbakterien von zentraler Bedeutung ist, wurden bereits zahlreiche Besiedlungsstudien mit verschiedenen PGPR und unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Dabei konnte stets festgestellt werden, dass besonders die Orte, für die eine hohe Wurzelexsudation charakteristisch ist, durch eine enorme mikrobielle Abundanz und Aktivität gekennzeichnet sind. Hohe Exsudatkonzentrationen wurden an den Austrittsstellen von Seitenwurzeln und an Wurzelhaaren (Rovira & Davey, 1974) sowie unmittelbar auf der Wurzeloberfläche (Rhizoplane) (Hartmann *et al.*, 2008b) gefunden. Entsprechend der Wurzelexsudation variiert die Besiedlung entlang der Wurzel (Weller, 1988).

Die Kolonisierung der Wurzel wurde am intensivsten für *Pseudomonas* untersucht (Lugtenberg *et al.*, 2001). So beobachteten Chin-A-Woeng *et al.* (1997) in Studien mit *Pseudomonas fluorescens* WCS365 eine starke Besiedlung nahe der Wurzelbasis, die in Richtung Wurzelspitze abnahm, wobei Mikrokolonien meist in den Verbindungen zwischen epidermalen Wurzelzellen und an eingerückten Stellen der epidermalen

Oberfläche lokalisiert waren. Ähnliche Aussagen konnten Gamalero *et al.* (2004) anhand von Untersuchungen zur frühen Besiedlung von Tomatenkeimlingen durch *Pseudomonas fluorescens* A6RI treffen. Sie fanden außerdem zahlreiche Bakterienzellen des inokulierten Stammes auf den Wurzelhaaren, die entweder homogen verteilt oder in Gruppen angeordnet waren.

In Übereinstimmung mit diesen publizierten Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen von der Wurzelbasis bis zur Wurzelspitze in allen Bereichen auf der Oberfläche von Gerstenwurzeln detektiert. Dabei besiedelte der Stamm besonders die Wurzelhaarzone (siehe Abschnitte 3.3.2 und 3.3.3) und konnte mit hohen Zelldichten auf der Oberfläche von Wurzelhaaren (siehe Abbildungen 3.20C und 3.21B) gefunden werden. Die Zellen waren nicht gleichmäßig über die Wurzel verteilt, sondern traten, wahrscheinlich wie bereits erwähnt in Abhängigkeit von der Wurzelexsudation, in einigen Bereichen mit größeren Siedlungsdichten oder als Mikrokolonien auf. In zahlreichen Besiedlungsstudien mit wurzelbesiedelnden *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen wurde ebenso die Ausbildung von Mikrokolonien beobachtet (Bloemberg *et al.*, 1997; Chin-A-Woeng *et al.*, 1997; Cassidy *et al.*, 2000; Dekkers *et al.*, 2000; Gamalero *et al.*, 2004).

Im Sinne der Rhizosphärenkompetenz und für das Zustandekommen der Interaktion zwischen inokuliertem PGPR und der Pflanze ist die Kolonisierung der Wurzel erst effizient, wenn die auf den Samen oder Keimling applizierten Bakterien in der Lage sind, sich entlang der im Boden wachsenden Wurzel zu verteilen, die Wurzelspitze zu erreichen, sich zu vermehren und in Anwesenheit der autochthonen Mikroflora zu überleben (Weller, 1988; Lugtenberg *et al.*, 2001). Diese Fähigkeit konnte für den Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm nachgewiesen werden. Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen wurden nach Anzucht im unsterilen Quarzsandsystem oder im Ackerboden in allen Wurzelbereichen und auch an der Wurzelspitze gefunden. An im Ackerboden gewachsenen Gerstenwurzeln konnten auch nach vier Wochen noch GFP-markierte Proradix®-Zellen deutlich lokalisiert werden.

Um das Besiedlungsverhalten von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und die spezifische GFP-Markierung in Kombination mit der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie angewendet.

Im Rahmen der FISH-Methode wirkten während der Fixierung, Hybridisierung und dem Waschen Salze und Temperaturen auf die Wurzelpräparate ein.

Die eingesetzte 16S-rRNS gerichtete Oligonukleotidsonde PSE-225 war nicht nur spezifisch für den Proradix®-Stamm oder *Pseudomonas fluorescens*, sondern erfasste auch andere *Pseudomonas*-Arten (siehe Tabelle 3.3). Demzufolge war es mit dieser Methode nicht möglich, Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen eindeutig zu identifizieren. Nach Durchführung der FISH-Methode konnte durch den Einsatz weiterer Oligonukleotidsonden (GAM-42A, äquimolare Mischung der Sonden EUB-338-I, II und III) die Anwesenheit weiterer, konkurrierender, autochthoner Bakterien auf den Gerstenwurzeln sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 3.18). Die Detektion fluoreszenzmarkierter Bakterienzellen auf im Bodensystem gewachsenen Gerstenwurzeln wurde stark durch die Autofluoreszenz anhaftender Bodenpartikel beeinflusst.

Zur deutlichen Lokalisierung der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen auf Gerstenwurzeln wurde außerdem der GFP-markierte Proradix®-Stamm verwendet. Das grünfluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* wurde bereits sehr erfolgreich als wichtiger Marker zur Untersuchung von Populationen und Abläufen in der Rhizosphäre eingesetzt (Bloemberg *et al.*, 1997; Chin-A-Woeng *et al.*, 2004). Dabei können frisch geerntete Wurzeln ohne äußere Einwirkungen sofort mikroskopiert und GFP-markierte Zellen ohne Zugabe exogener Substrate detektiert werden. Chalfie *et al.* (1994) zeigten, dass GFP, wenn es in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen exprimiert wird, eine starke und sehr stabile grüne Fluoreszenz produziert. So konnten in dieser Arbeit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen aufgrund der starken GFP-Fluoreszenz auf Wurzeln aus Ackerboden trotz Autofluoreszenz anhaftender Bodenpartikel lokalisiert werden (siehe Abbildung 3.21). Die GFP-Markierung über ein Plasmid bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass Plasmide in Experimenten ohne Antibiotikadruck nicht immer über längere Zeiträume stabil sind und so zum Teil nicht für Langzeitversuche geeignet sind (van der Bij *et al.*, 1996; Bloemberg *et al.*, 1997). Dies könnte ein Grund für die beobachtete Abnahme GFP-markierter Proradix®-Zellen auf den für drei Wochen im Ackerboden gewachsenen Wurzeln sein. Das Vorhandensein GFP-exprimierender Plasmide und die Expression des grünfluoreszierenden Proteins kann außerdem das

Wachstum des markierten Stammes beeinflussen (Bloemberg *et al.*, 1997; Götz *et al.*, 2006) und zu einem Selektionsnachteil führen.

Die meisten kommerziellen Inokula werden über eine Samenbehandlung appliziert. Von dort aus können die Bakterien den jungen Keimling besiedeln. Um jedoch die Reproduzierbarkeit von Experimenten mit nützlichen Rhizosphärenbakterien zu erhöhen, werden anstelle einer Samenbehandlung oft eher inokulierte Keimlinge verwendet (Lugtenberg *et al.*, 2001). Es ermöglicht den Einsatz einheitlich behandelter Keimlinge und liefert gleiche Grundvoraussetzungen zu Beginn eines jeden Experiments. Götz *et al.* (2006) erreichten eine bessere Besiedlung von Tomatenwurzeln durch eine Wurzelinokulation verglichen mit der Sameninokulation.

Eindeutige Aussagen zum Besiedlungsverhalten von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) konnten in dieser Arbeit auch erst getroffen werden, wenn inokulierte Keimlinge (10^8 Zellen/ml) untersucht wurden. Bei der Verwendung saatgutgebeizter Samen waren besonders im Bodensystem sehr wenig Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Bakterien detektierbar. Dies könnte auch als ein weiterer Hinweis darauf angesehen werden, dass die Anwendung der Saatgutbeizung bei Gerste für die Ausbildung einer ausreichenden Populationsdichte in der Rhizosphäre nicht effizient genug ist (siehe Abschnitt 4.2). Beim Einsatz Gram-negativer Bakterien muss das Überleben der Zellen auch vor und während der Applikation gewährleistet sein. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung verbesserter Formulierungen besonders im Hinblick auf die Osmoprotektion notwendig. Gram-positive Bakterien besitzen diesbezüglich einen Vorteil in der praktischen Handhabung, da sie in der Lage sind, gegenüber Hitze und Austrocknung widerstandsfähige Endosporen zu bilden (Weller, 1988).

Lugtenberg *et al.* (2001) stellen außerdem die Vorteile eines Quarzsandsystems gegenüber der Verwendung von Freilandboden in Experimenten zur Wirkungsweise und Besiedlung von PGPR heraus. Boden enthält eine hohe Anzahl konkurrierender Bakterien und die Einflussfaktoren sind viel komplexer. In Versuchen mit dem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm WCS365 verringerten sich die Zellzahlen zehnfach, wenn Quarzsand gegen Blumenerde ausgetauscht wurde (Lugtenberg *et al.*, 2001). Diese Erfahrungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn im Ackerboden war die

Besiedlungsdichte von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) im Vergleich zum Quarzsand deutlich geringer.

Auf Wurzeln aus Ackerboden nahm die Anzahl detektierbarer, GFP-markierter Proradix®-Zellen nach drei Wochen ab. Neben einer zuvor diskutierten Plasmidinstabilität kann auch die Überlebensfähigkeit des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes in der Rhizosphäre von Gerste begrenzt sein. Van Elsas *et al.* (1986) zeigten in Experimenten mit *Pseudomonas fluorescens* WCS374 die geringe Überlebensrate. Dabei verringerten sich die Zellzahlen sowohl in der Rhizosphäre als auch im wurzelfreien Boden stetig.

Um die Besiedlung von Weizenwurzeln durch verschiedene *Azospirillum brasilense*-Stämme im Verlauf einer Wachstumsperiode von 14 Wochen zu charakterisieren, führten Schloter & Hartmann (1998) Experimente mit stammspezifischen monoklonalen Antikörpern durch. Sie stellten fest, dass die Anzahl der Azospirillen in der Rhizosphäre 14 Wochen nach der Pflanzung signifikant reduziert war. Die Besiedlungsdichte des Stammes *Azospirillum brasilense* Wa5 verringerte sich dabei von 10^6 (nach 4 Wochen) auf 10^4 (nach 14 Wochen) Bakterien/g getrockneter Wurzel. Obwohl die Gesamtzellzahl von *Azospirillum brasilense* Sp245 innerhalb der 14 Wochen abnahm, blieb die Zahl der Bakterien dieses Stammes, die das Innere der Wurzeln besiedelten, im gewählten Untersuchungszeitraum konstant.

Jacoud *et al.* (1998) inokulierten Maissamen mit *Azospirillum lipoferum* CRT1 mit einer Zelldichte von 10^7 CFU/Same für Experimente unter Feldbedingungen. Während der ersten zwei Wochen nach der Aussaat blieb die Zelldichte von 10^7 CFU/Pflanze erhalten. Danach nahm die Konzentration von *Azospirillum lipoferum* CRT1 stark ab bis nach 28 Tagen keine CRT1-Zellen mehr auf den Maiswurzeln detektiert werden konnten. Die Bakterienkonzentration lag nach 28 Tagen schließlich unter der Nachweisgrenze von 10^3 CFU/Pflanze (Jacoud *et al.*, 1998). Für die Biokontrolle und die Förderung des Pflanzenwachstums ist jedoch die Überlebensfähigkeit applizierter PGPR in der Rhizosphäre von besonderer Bedeutung (siehe Abschnitt 4.2).

4.4 Auswirkung der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Applikation auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft von Gerste

Molekulare Fingerprinting-Methoden, wie die 16S-rDNS gerichtete T-RFLP- oder die DGGE-Analyse, bieten die Möglichkeit, Veränderungen der relativen Abundanz bestimmter Bakterien oder Bakteriengruppen in einer Rhizosphärengemeinschaft als Folge variierender Umweltbedingungen oder von Inokulationen mit wurzelbesiedelnden, nützlichen Bakterien zu verfolgen (Osborn *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004; van Veen *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der mögliche Einfluss von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die bakterielle Rhizosphärengemeinschaft von Gerste mit Hilfe der T-RFLP-Analyse auf Basis der Gesamt-16S-rDNS untersucht werden. Dazu wurden Gerstenpflanzen in Töpfen mit Ackerboden im Gewächshaus und im Quarzsandsystem im Labor angezogen. Mit Proradix® behandelte Pflanzen wurden mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Wenn der inokulierte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm zu den dominanten Bakterien in der Gerstenrhizosphäre gehört, sollte er mit seiner spezifischen Fragmentlänge von 143 bp in den T-RFLP-Analysen der behandelten Pflanzen eindeutig detektierbar sein.

Das Proradix®-spezifische Restriktionsfragment war im Labormaßstab gut nachweisbar, wobei höhere Abundanzen nach zusätzlicher Inokulation (10^8 Zellen/ml) ermittelt wurden (siehe Abschnitt 3.4.5 und Tabelle 3.4). Im komplexen Ackerbodensystem konnte der Proradix®-Stamm nur nach einer Woche Wachstum der Gerste bei der Behandlung Saatgutbeizung + zusätzliche Inokulation detektiert werden. Folglich zählte er hier nicht zu den dominanten Vertretern der untersuchten bakteriellen Gemeinschaft. Trotzdem lassen diese Ergebnisse erneut erkennen, dass höhere Inokulumdichten (Saatgutbeizung + Inokulation mit 10^8 Zellen/ml) und die Inokulation von Keimlingen verglichen mit der Samenbehandlung (Saatgutbeizung) zu einer effektiveren Besiedlung führen (siehe Abschnitte 4.2 und 4.3).

Übereinstimmend konnten Götz *et al.* (2006) in Samen- und Wurzelinokulationsexperimenten den inokulierten *Pseudomonas putida*-Stamm PRD16 mittels DGGE-

Analysen auch nur zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach 8 Tagen eindeutig in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen (Torf-Tongranulat-Sand-Gemisch) nachweisen. Dabei kam der untersuchte Stamm im Sameninokulationsexperiment mit viel geringerer Intensität vor. In der Studie von Lottmann *et al.* (2000) konnten die beiden inokulierten Stämme in DGGE-Analysen in der Rhizosphäre von transgenen Kartoffelpflanzen nicht detektiert werden.

Obwohl PGPR oftmals doch eher mit geringerer Zelldichte innerhalb einer bestehenden Rhizosphärengemeinschaft gefunden und oft nur an bestimmten Stellen der Wurzel lokalisiert werden, können trotzdem wachstumsfördernde Effekte beobachtet werden. So stellten beispielsweise Reddy & Rahe (1989) signifikante Wachstumseffekte an Zwiebelkeimlingen fest, obwohl die Zellzahlen des inokulierten *Bacillus subtilis* B-2 von $4,8 \times 10^6$ CFU/Same auf $1,1 \times 10^3$ CFU/Pflanze innerhalb der ersten 14 Tage rapide abnahmen. Auch Jacoud *et al.* (1998) beobachteten einerseits optimale Zelldichten von 10^7 CFU/Pflanze von *Azospirillum lipoferum* CRT1 für nur zwei Wochen nach der Inokulation und andererseits PGPR Effekte an Maiswurzeln nach 3 oder 4 Wochen Wachstum. Sie schlussfolgerten daraus, dass zur Ausbildung stimulierender Effekte hohe *Azospirillum*-Zelldichten auf den Wurzeln nicht für lange Zeiträume notwendig sind. Dazu ist aber der Erhalt einer optimalen Inokulumdichte während und direkt nach der Aussaat erforderlich.

Im Ackerboden- und im Quarzsandsystem konnte ein Einfluss von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die bakterielle Gemeinschaft der Gerstenrhizosphäre beobachtet werden, der sich jedoch auf die erste Phase der Wurzelentwicklung beschränkte (siehe Abbildungen 3.24 und 3.28). Dabei waren die Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Proradix®-Behandlung nach zusätzlicher Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) deutlicher ausgeprägt als nach der Saatgutbeizung und wurden im Gewächshausversuch in den ersten 3 Wochen nach Inokulation sichtbar.

Der Vergleich mit Literaturdaten bringt in diesem Zusammenhang unterschiedliche Ergebnisse hervor. Während einige Autoren von einem Einfluss auf die Rhizosphärengemeinschaft infolge der Inokulation mit ausgewählten Bakterienstämmen berichten (Gilbert *et al.*, 1993; Robleto *et al.*, 1998; Schwieger & Tebbe, 2000; Bankhead *et al.*, 2004; Götz *et al.*, 2006), konnten in anderen Arbeiten keine Veränderungen in der

Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft festgestellt werden (Lottmann *et al.*, 2000; Herschkovitz *et al.*, 2005). Miethling *et al.* (2000) beobachteten nur einen geringen Einfluss der Inokulation mit *Sinorhizobium meliloti* L33 in Experimenten mit Luzerne und keine Auswirkung auf die Rhizosphärengemeinschaft von Roggen. Inokulationen mit antibiotikaproduzierenden *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen führten auch nur zu vorübergehenden Änderungen von geringem Ausmaß (Bankhead *et al.*, 2004). In DGGE-Analysen von Götz *et al.* (2006) waren Unterschiede in der bakteriellen Besiedlung zwischen der Kontrolle und den inokulierten Pflanzen eher detektierbar, wenn einzelne Bakteriengruppen unter Verwendung gruppenspezifischer Primer untersucht wurden. Dies bietet eine Möglichkeit, auch die Auswirkung von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die bestehende Rhizosphärengemeinschaft weiterführend zu untersuchen. In den T-RFLP-Analysen dieser Arbeit wurde eine klare zeitliche Veränderung festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft und der Wurzelentwicklung besteht. Außerdem erhöhte sich die Anzahl der detektierten Restriktionsfragmente im Verlauf des untersuchten Zeitraums. Ebenso stellten Herschkovitz *et al.* (2005) und Mougél *et al.* (2006) mit Hilfe von Fingerprinting-Methoden fest, dass die Struktur bakterieller Rhizosphärengemeinschaften vom Alter der untersuchten Mais- bzw. *Medicago truncatula*-Pflanzen abhängig war. Hingegen fanden Normander & Prosser (2000) keine Änderungen innerhalb der Bakteriengemeinschaft in Bezug auf die Entwicklung von Gerstenpflanzen.

Mit fortschreitender Wurzelentwicklung nimmt die Anzahl wurzelbesiedelnder Bakterien zu, da ebenso die Menge an abgegebenen Wurzelexsudaten ansteigt und wachsende Wurzeln demzufolge als bedeutungsvolle Kohlenstoffquelle angesehen werden (Herschkovitz *et al.*, 2005). Mougél *et al.* (2006) beobachteten, dass sich die Struktur der bakteriellen im Vergleich zur pilzlichen Gemeinschaft besonders während der vegetativen Entwicklung der Pflanze veränderte. Sie erklären die gefundenen Modifikationen mit Veränderungen in der Zusammensetzung der vorhandenen Exsudate während der Pflanzenentwicklung. Gransee & Wittenmayer (2000) zeigten, dass die Zusammensetzung der Wurzelabscheidungen vom Pflanzenalter im Zusammenhang mit pflanzenphysiologischen Veränderungen im Verlauf der Entwicklung abhängt. Der Anteil an Kohlenstoff,

der durch Getreide über die Wurzeln in den Boden abgegeben wird, verringert sich im Laufe der Pflanzenentwicklung (Kuzyakov & Domanski, 2000). Während der reproduktiven Phase werden bedeutend weniger organische Verbindungen in die Rhizosphäre abgegeben als im vegetativen Stadium, was dementsprechend eine Abnahme der bakteriellen Aktivität in der Rhizosphäre während der reproduktiven Entwicklung zur Folge hat.

Anhand dieser Aussagen kann geschlussfolgert werden, dass die in dieser Arbeit gefundene zeitliche Veränderung der Rhizosphärengemeinschaft von Gerste einerseits aufgrund einer veränderten Wurzelexsudation erfolgte, zumal die Vorgänge im Keimlingsstadium stark von im Samen gespeicherten Nährstoffen abhängen. Demzufolge siedelt sich zunächst eine bestimmte Rhizosphärengemeinschaft an, die sich im weiteren Verlauf verändert.

Andererseits fanden Yang & Crowley (2000) in einer Studie mit Gerste heraus, dass sich bakterielle Rhizosphärengemeinschaften in verschiedenen Wurzelbereichen beträchtlich voneinander unterscheiden. Auch De Leij *et al.* (1993) stellten fest, dass die Struktur der bakteriellen Gemeinschaft an jungen Wurzeln sich von der an älteren Wurzeln differenzierte. Dabei traten auf jungen Wurzeln eher schnell wachsende Organismen (r-Strategen) und in alten Wurzelbereichen langsam wachsende Spezialisten (K-Strategen) auf. R-Strategen wachsen in weniger besiedelten Habitaten und unter nährstoffreichen Bedingungen, treten nur kurzzeitig auf und sind charakteristisch für eine instabile Umwelt. Dagegen sind K-Strategen in der Lage, Nährstoffe unter dicht besiedelten Bedingungen zu nutzen und sie vermehren sich in einer stabilen Umwelt (De Leij *et al.*, 1993).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft der Rhizosphäre wurden immer ganze Wurzeln untersucht. Zu Beginn des Untersuchungszeitraums wurden entsprechend der Keimlingsentwicklung junge Wurzeln geerntet und für die T-RFLP-Analysen verwendet. Im weiteren Verlauf der Wurzelentwicklung wurden junge und alte Wurzelabschnitte mit einem zunehmenden Lebensraum- und Nährstoffangebot sowie immer mehr Nischen für siedelnde Bakterien vereinigt.

Um die in den T-RFLP-Analysen detektierten Restriktionsfragmente als Mitglieder der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft von im Ackerboden gewachsener Gerste zu identifizieren, wurden vier verschiedene Klonbanken erstellt. Dabei wurden in der Rhizosphäre von Proradix®-behandelten Gerstenpflanzen zwei weitere *Pseudomonas*-Sequenzen gefunden. Diese beiden Stämme haben möglicherweise den gleichen Siedlungsraum wie der inokulierte Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) eingenommen und beeinflussten deren Besiedlung eventuell auch durch Konkurrenz um Nährstoffe. In Folgeexperimenten könnte diese Vermutung untersucht werden.

Sowohl bei der Durchführung von T-RFLP-Analysen als auch bei der Erstellung von Klonbanken müssen jedoch methodische Einschränkungen berücksichtigt werden. In kultivierungsunabhängigen Analysen der mikrobiellen Gemeinschaft, die auf Durchführung der PCR basieren, treten eine Reihe von Schritten auf, die Fehler bewirken können (Kent & Triplett, 2002). Beispielsweise ist die bakterielle Zell- und Zellwandstruktur in verschiedenen phylogenetischen Gruppen unterschiedlich und so lassen sich einige Bakterienzellen während der DNS-Extraktion leichter lysieren als andere. Gram-negative Bakterien lysieren schneller als Gram-positive. Folglich werden in Fingerprinting-Analysen oftmals eher Gram-negative Gattungen erfasst (Bankhead *et al.*, 2004). Dies trifft auch auf die vorliegende Arbeit zu, obwohl mit Hilfe der Klonbanken auch einige Gram-positive Bakterien, wie zum Beispiel *Lentzea albidocapillata*, *Streptomyces turgidiscabies*, *Paenibacillus alginolyticus*, *Bacillus niacini*, identifiziert wurden.

Außerdem kann die Kopienzahl der rRNS Gene in verschiedenen Organismen beträchtlich voneinander abweichen, was bei der Untersuchung hoch diverser Gemeinschaften zu einem grundsätzlichen Nachteil hinsichtlich quantitativer Aussagen führt. Aus diesem Grund sollten quantitative Analysen basierend auf molekularen Markergenen mit Vorsicht betrachtet werden (van Veen *et al.*, 2007).

Bankhead *et al.* (2004) und Herschkovitz *et al.* (2005) verwendeten in T-RFLP- bzw. DGGE-Analysen universelle Bakterienprimer und erfassten so nur die dominanten Vertreter der untersuchten bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft. Dabei weisen Bankhead *et al.* (2004) darauf hin, dass sie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eher nur bakterielle Populationen mit Zelldichten von mehr als 10^5 Zellen/g Wurzel in ihren T-RFLP-Analysen detektierten. Koch *et al.* (2008b) führten eine Reihe von Versuchen zur

Kultivierung von Bodenbakterien durch und untersuchten die erhaltenen Kulturen mittels DGGE-Analysen unter Verwendung von allgemeinen Bakterienprimern einerseits und phylogenetisch gruppenspezifischer Primer andererseits. Beim Vergleich der Analysen stellten sie fest, dass die Gesamtanzahl der detektierten Phylotypen 2,6 mal höher war, wenn sie gruppenspezifische Primer einsetzten. Während mit Bakterienprimern maximal drei verschiedene Phylotypen je Kultur detektiert wurden, konnten in Analysen mit gruppenspezifischen Primern bis zu acht verschiedene Phylotypen in einer Kultur gefunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die bakterielle Diversität bei Verwendung von universellen Bakterienprimern unterschätzt wird.

In der vorliegenden Arbeit beeinflusste außerdem die Amplifikation von DNS von Chloroplasten und Mitochondrien der Gerste unter Verwendung universeller Bakterienprimer die Analyse der Rhizosphärengemeinschaft. Von diesem Problem berichten auch andere Autoren (Normander & Prosser, 2000; Yang & Crowley, 2000; Sessitsch *et al.*, 2004; Graff & Conrad, 2005), die diese Chloroplasten- und Mitochondrien-Restriktionsfragmente oder -Banden aus der weiteren Analyse ausschlossen. Green & Minz (2005) veröffentlichten in diesem Zusammenhang eine Methode, in der mit Hilfe von Restriktionen durch eine Endonuklease unerwünschte, dominante DNS noch vor der PCR-Amplifikation abgebaut werden und sich somit nicht mehr störend auf folgende Analysen auswirken kann. Da diese Pflanzen-DNS meist dominant auftritt, wird die Amplifikation von weniger dominanter bakterieller DNS oftmals stark unterdrückt (Normander & Prosser, 2000).

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Arbeit der Einfluss von Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) auf die eher dominanten Mitglieder der bakteriellen Gerstenrhizosphäre untersucht wurde. In weiterführenden Experimenten könnte mit Hilfe von gruppenspezifischen Primern die Auswirkung der Proradix®-Applikation auf spezielle Bakteriengruppen untersucht werden.

4.5 Ausblick

Der Einsatz pflanzenwachstumsfördernder Rhizosphärenbakterien bietet mehrere Vorteile gegenüber chemischen Pflanzenschutzmaßnahmen. Trotzdem hängt die Effektivität inokulierter PGPR von einer Vielzahl verschiedener Faktoren ab, die abiotische und biotische Umweltbedingungen sowie das Überleben der Bakterien in der entsprechenden Produktformulierung, die Applikationstechnologie, das Überleben auf den Samen oder Keimlingen und die erfolgreiche Besiedlung der Rhizosphäre einschließen.

Einige Autoren schlagen die Kombination verschiedener PGPR vor, um die Wirkungssicherheit zu erhöhen und synergistische Effekte auszunutzen (Weller, 1988; Dowling & O’Gara, 1994; Bashan, 1998; de Boer *et al.*, 2003). Darauf basierend könnte der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm in Folgeexperimenten zusammen mit anderen gut untersuchten PGPR eingesetzt und die Wirkung auf die Pflanze getestet werden. Gerade für die kombinierte Applikation müssen jedoch die Wirkmechanismen der verwendeten PGPR bekannt und verstanden sein. Die Wirkungsweise des Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Stammes sollte in weiterführenden experimentellen Ansätzen untersucht werden. Dabei könnten Mutanten, die Modifikationen hinsichtlich der Siderophoren-, Indol-3-Essigsäure- und Antibiotika-Produktion sowie des Besiedlungsverhaltens aufweisen, zum Einsatz kommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass besonders die Inokulumdichte eine wesentliche Rolle für den Erfolg einer PGPR-Anwendung in der Praxis spielt. So könnte die pflanzenwachstumsfördernde Wirkung von Proradix® unter Verwendung verschiedener Inokulumdichten und unterschiedlicher Applikationstechniken in Gewächshausversuchen unter definierten Bedingungen weitergehend untersucht werden. Darüber hinaus sollten Experimente unter Pathogendruck folgen. PGPR müssen umfassend untersucht sein, um letztendlich Empfehlungen für die praktische Anwendung zu geben und neue wirkungsvolle Pflanzenstärkungsmittel auf bakterieller Basis für die Praxis bereitzustellen.

5 Zusammenfassung

Seit mehreren Jahrzehnten sind Rhizosphärenbakterien aufgrund ihrer Fähigkeit, das pflanzliche Wachstum zu fördern, von besonderem wissenschaftlichem, ökologischem und ökonomischem Interesse. Der Einsatz solcher Bakterien erlangte unter anderem im Rahmen des biologischen Pflanzenschutzes zur Erhöhung der landwirtschaftlichen Produktivität von Nutzpflanzen Bedeutung. Daraufhin wurden die Eigenschaften dieser Bakterien umfangreich erforscht und Pflanzenschutzmittel auf bakterieller Basis entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des kommerziell erhältlichen Pflanzenstärkungsmittels Proradix[®], welches einen natürlich vorkommenden *Pseudomonas fluorescens*-Stamm enthält, untersucht werden. Dabei wurde der pflanzenwachstumsfördernde Effekt auf Gerste in verschiedenen Experimenten im Labor, Gewächshaus und im Freiland überprüft. Darüber hinaus wurde die Besiedlung von Gerstenwurzeln durch den Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm mit Methoden der molekularen mikrobiellen Ökologie verfolgt. Einen weiteren Schwerpunkt bildete die Fragestellung, ob und in welchem Maße sich die Applikation von Proradix[®] auf die bestehende bakterielle Rhizosphärengemeinschaft auswirkt.

Für den Proradix[®] (*Pseudomonas fluorescens*)-Stamm konnte *in vitro* die Produktion von Siderophoren und von Indol-3-Essigsäure sowie die Hemmung der bodenbürtigen, phytopathogenen Pilze *Gaeumannomyces graminis* Ggt 13 und *Pythium ultimum* in so genannten Dualkulturtests nachgewiesen werden. Der Stamm war jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht in der Lage, das Enzym 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat (ACC)-Deaminase, welches ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Stimulierung des Pflanzenwachstums spielt, zu synthetisieren.

Eine deutliche Steigerung des Wachstums der Gerste nach Anwendung von Proradix[®] wurde in Gewächshausversuchen unter Licht- und Nährstoffmangel festgestellt. Im Gegensatz dazu ließen sich unter optimalen Wachstumsbedingungen keine Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und der mit Proradix[®] behandelten Gerste erkennen. Dies

unterstützt die auch von anderen Autoren veröffentlichte Schlussfolgerung, dass ausgeprägte PGPR-Effekte unter limitierenden Bedingungen auftreten. Im Rahmen zweijähriger Freilandversuche wurden an verschiedenen Parzellenstandorten einerseits Ertragssteigerungen um bis zu 19% und andererseits keine förderlichen Effekte nach Einsatz von Proradix® ermittelt. Zur Diskussion solcher Freilandergebnisse muss eine Vielzahl komplex wirkender Faktoren berücksichtigt werden. In dieser Arbeit beeinflussten vor allem Witterungsbedingungen und die Inokulumdichte die erhaltenen Ertragszahlen. Anhand dieser Ergebnisse wird die Notwendigkeit von Langzeitstudien mit Zeiträumen von mindestens fünf Jahren offensichtlich.

Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit spezifischen phylogenetischen Oligonukleotidsonden und der GFP-Markierung konnte eine effektive Wurzelbesiedlung durch Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) in allen Bereichen der Wurzel nachgewiesen werden. Unter Verwendung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops war die Lokalisierung von GFP-markierten Proradix®-Zellen besonders in der Wurzelhaarzone und mit hohen Zelldichten auf der Oberfläche von Wurzelhaaren möglich. Eine endophytische Besiedlung konnte nur unter axenischen Bedingungen gefunden werden.

In T-RFLP-Analysen wurde ein Einfluss durch Proradix® auf die dominanten Vertreter der bakteriellen Gemeinschaft der Gerstenrhizosphäre während der ersten Phase der Wurzelentwicklung dokumentiert. Auch hier wurde die Bedeutung der Inokulumdichte sichtbar, denn die zusätzliche Inokulation mit Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellen (10^8 Zellen/ml) zeigte einen gegenüber der herkömmlichen Saatgutbeizung deutlicher ausgeprägten Effekt.

6 Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25** (17): 3389-3402.
- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A.** (1990): Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172** (2): 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H.** (1995): Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59** (1): 143-169.
- Baldani, V. L. D., de B. Alvarez, M. A., Baldani, J. I. & Döbereiner, J.** (1986): Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil* **90**: 35-46.
- Bankhead, S. B., Landa, B. B., Lutton, E., Weller, D. M. & McSpadden Gardener, B. B.** (2004): Minimal changes in rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *FEMS Microbiology Ecology* **49** (2): 307-318.
- Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E. & 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** (1): 87-90.
- Bashan, Y.** (1998): Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* **16** (4): 729-770.
- Belandreau, J. & Knowles, R.** (1978): Interaction between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Y. R. Dommergues & S. V. Krupa (Hrsg.). Amsterdam: Elsevier, 243.
- Benizri, E., Baudoin, E. & Guckert, A.** (2001): Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* **11** (5): 557-574.

- Bertani, G.** (1951): STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62** (3): 293-300.
- Bloemberg, G. V., O'Toole, G. A., Lugtenberg, B. J. J. & Kolter, R.** (1997): Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (11): 4543-4551.
- Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Stuurman, N. & Lugtenberg, B. J. J.** (2000): Simultaneous Imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins in the Rhizosphere: New Perspectives for Studying Microbial Communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** (11): 1170-1176.
- Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J.** (2001): Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **4** (4): 343-350.
- Brimecombe, M. J., De Leij, F. A. A. M. & Lynch, J. M.** (2007): Rhizodeposition and microbial populations. In: The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Second edition. R. Pinto, Z. Varanini & P. Nannipieri (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 73-109.
- Broadbent, P., Baker, K. F. & Waterworth, Y.** (1971): Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biological Sciences* **24** (5): 925-944.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. & Noller, H. F.** (1981): Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **148** (2): 107-127.
- Brown, C. M. & Dilworth, M. J.** (1975): Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *Journal of General Microbiology* **86** (1): 39-48.
- Brown, M. E.** (1974): Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology* **12**: 181-197.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. & Höfte, M.** (1996): Involvement of Pyochelin and Pyoverdinin in Suppression of *Pythium*-Induced Damping-Off of Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (3): 865-871.

- Cassidy, M. B., Leung, K. T., Lee, H. & Trevors, J. T. (2000): A comparison of enumeration methods for culturable *Pseudomonas fluorescens* cells marked with green fluorescent protein. *Journal of Microbiological Methods* **40** (2): 135-145.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., de Priester, W., van der Bij, A. J. & Lugtenberg, B. J. J. (1997): Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS 365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** (1): 79-86.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H. M., Dekkers, L. C. & Lugtenberg, B. J. J. (2000): Root Colonization by Phenazine-1-Carboxamide-Producing Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Is Essential for Biocontrol of Tomato Foot and Root Rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** (12): 1340-1345.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Lagopodi, A. L., Mulders, I. H. M., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2004): Visualisation of rhizosphere interactions of *Pseudomonas* and *Bacillus* biocontrol strains. In: Plant Surface Microbiology. A. Varma, L. Abbott, D. Werner & R. Hampp (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 431-448.
- Crowley, D. E. & Kraemer, S. M. (2007): Function of siderophores in the plant rhizosphere. In: The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Second edition. R. Pinto, Z. Varanini & P. Nannipieri (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 173-200.
- Cryer, D. R., Eccleshall, R. & Marmur, J. (1975): Isolation of yeast DNA. *Methods in Cell Biology* **12**: 39-44.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999): The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22** (3): 434-444.

- de Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J. J. B., van der Sluis, I., van Loon, L. C. & Bakker, P. A. H. M. (2003): Control of Fusarium Wilt of Radish by Combining *Pseudomonas putida* Strains that have Different Disease-Suppressive Mechanisms. *Phytopathology* **93** (5): 626-632.
- De Leij, F. A. A. M., Whipps, J. M. & Lynch, J. M. (1993): The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology* **27**: 81-97.
- de Weger, L. A., van Boxtel, R., van der Burg, B., Gruters, R. A., Geels, F. P., Schippers, B. & Lugtenberg, B. (1986): Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp.. *Journal of Bacteriology* **165** (2): 585-594.
- Dekkers, L. C., Mulders, I. H. M., Phoelich, C. C., Chin-A-Woeng, T. F. C., Wijfjes, A. H. M. & Lugtenberg, B. J. J. (2000): The *sss* Colonization Gene of the Tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Can Improve Root Colonization of Other Wild-type *Pseudomonas* spp. Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** (11): 1177-1183.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. & Vanderleyden, J. (1999): Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* **212** (2): 153-162.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. & Okon, Y. (2001): Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 1-9.
- Dobbelaere, S. & Okon, Y. (2007): The plant growth-promoting effect and plant responses. In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. C. Elmerich & W. E. Newton (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 145-170

- Dollhopf, S. L., Hashsham, S. A. & Tiedje, J. M.** (2001): Interpreting 16S rDNA T-RFLP Data: Application of Self-Organizing Maps and Principal Component Analysis to Describe Community Dynamics and Convergence. *Microbial Ecology* **42** (4): 495-505.
- Dowling, D. N. & O'Gara, F.** (1994): Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* **12** (4): 133-141.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. & Böttger, E. C.** (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17** (19): 7843-7853.
- Emmert, E. A. B. & Handelsman, J.** (1999): Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* **171** (1): 1-9.
- Fallik, E., Okon, Y. & Fischer, M.** (1988): The effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on metabolic enzyme activity in maize root seedlings. *Symbiosis* **6**: 17-28.
- Felsenstein, J.** (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17** (6): 368-376.
- Fitch, W. M.** (1966): An improved method of testing for evolutionary homology. *Journal of Molecular Biology* **16** (1): 9-16.
- Gamalero, E., Lingua, G., Caprì, F. G., Fusconi, A., Berta, G. & Lemanceau, P.** (2004): Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* **48** (1): 79-87.
- Gantner, S., Schmid, M., Dürr, C., Schuegger, R., Steidle, A., Hutzler, P., Langebartels, C., Eberl, L., Hartmann, A. & Dazzo, F. B.** (2006): *In situ* quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* **56** (2): 188-194.
- Garland, J. L. & Mills, A. L.** (1991): Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (8): 2351-2359.
- Gilbert, G. S., Parke, J. L., Clayton, M. K. & Handelsman, J.** (1993): Effects of an Introduced Bacterium on Bacterial Communities on Roots. *Ecology* **74** (3): 840-854.

- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. & Pace, N. R.** (1988): Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* **170** (2): 720-726.
- Glick, B. R.** (2005): Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* **251** (1): 1-7.
- Götz, M., Gomes, N. C. M., Dratwinski, A., Costa, R., Berg, G., Peixoto, R., Mendonça-Hagler, L. & Smalla, K.** (2006): Survival of *gfp*-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **56** (2): 207-218.
- Graff, A. & Conrad, R.** (2005): Impact of flooding on soil bacterial communities associated with poplar (*Populus* sp.) trees. *FEMS Microbiology Ecology* **53** (3): 401-415.
- Gransee, A. & Wittenmayer, L.** (2000): Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **163** (4): 381-385.
- Green, S. J. & Minz, D.** (2005): Suicide polymerase endonuclease restriction, a novel technique for enhancing PCR amplification of minor DNA templates. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (8): 4721-4727.
- Haas, D. & Defago, G.** (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3** (4): 307-319.
- Hadas, R. & Okon, Y.** (1987): Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils* **5** (3): 241-247.
- Hartmann, A., Singh, M. & Klingmüller, W.** (1983): Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic-acid. *Canadian Journal of Microbiology* **29** (8): 916-923.
- Hartmann, A.** (1988): Ecophysiological Aspects of Growth and Nitrogen-Fixation in *Azospirillum* Spp.. *Plant and Soil* **110** (2): 225-238.

- Hartmann, A., Pukall, R., Rothballer, M., Gantner, S., Metz, S., Schloter, M. & Mogge, B.** (2004): Microbial community analysis in the rhizosphere by *in situ* and *ex situ* application of molecular probing, biomarker and cultivation techniques. In: Plant Surface Microbiology. A. Varma, L. Abbott, D. Werner & R. Hampp (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 449-469.
- Hartmann, A., Rothballer, M. & Schmid, M.** (2008a): Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*: im Druck.
- Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D. & Berg, G.** (2008b): Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*: im Druck.
- Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y. & Jurkevitch, E.** (2005): Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* **50** (2): 277-288.
- Hiltner, L.** (1904): Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* **98**: 59-78.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. & Gram, L.** (2004a): Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **96** (1): 117-132.
- Huber, T., Faulkner, G. & Hugenholtz, P.** (2004b): Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20** (14): 2317-2319.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R.** (1998): Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* **180** (18): 4765-4774.
- Jacobson, C. B., Pasternak, J. J. & Glick, B. R.** (1994): Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 1019-1025.

- Jacoud, C., Faure, D., Wadoux, P. & Bally, R.** (1998): Development of a strain-specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. *FEMS Microbiology Ecology* **27** (1): 43-51.
- James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. I. & Döbereiner, J.** (1994): Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* **45** (6): 757-766.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Roser, A., Koops, H.-P. & Wagner, M.** (1998): Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like Bacteria as Dominant Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (8): 3042-3051.
- Keller, M. & Zengler, K.** (2004): Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* **2** (2): 141-150.
- Kent, A. D. & Triplett, E. W.** (2002): Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology* **56** (1): 211-236.
- King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E.** (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44** (2): 301-307.
- Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F. & Kishore, G. M.** (1991): Control of Ethylene Synthesis by Expression of a Bacterial Enzyme in Transgenic Tomato Plants. *Plant Cell* **3** (11): 1187-1193.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. & Schroth, M. N.** (1980): *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology* **4** (5): 317-320.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R. M.** (1989): Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* **7** (2): 39-44.
- Kloepper, J. W.** (1996): Host specificity in microbe-microbe interactions - Biological control agents vary in specificity for hosts, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. *Bioscience* **46** (6): 406-409.

- Koch, I. H., Gich, F., Dunfield, P. F. & Overmann, J.** (2008a): *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** (5): 1114-1122.
- Koch, I. H., Gich, F. & Overmann, J.** (2008b): Significance of inducers and bacterial interactions for the cultivation of soil bacteria. (Manuskript).
- Köhler, W., Schachtel, G. & Voleske, P.** (2007): Biostatistik - Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Kuzyakov, Y. & Domanski, G.** (2000): Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **163** (4): 421-431.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. & Pace, N. R.** (1985): Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82** (20): 6955-6959.
- Lane, D. J.** (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Hrsg.). New York: John Wiley and Sons, 115-175.
- Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. & Stackebrandt, E.** (1997): Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: Modern soil microbiology. J. D. van Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington (Hrsg.). New York, NY: Marcel Dekker Inc., 375-439.
- Lipson, D. A. & Schmidt, S. K.** (2004): Seasonal Changes in an Alpine Soil Bacterial Community in the Colorado Rocky Mountains. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (5): 2867-2879.
- Loper, J. E., Haack, C. & Schroth, M. N.** (1985): Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **49** (2): 416-422.
- Lottmann, J., Heuer, H., de Vries, J., Mahn, A., Düring, K., Wackernagel, W., Smalla, K. & Berg, G.** (2000): Establishment of introduced antagonistic bacteria in the rhizosphere of transgenic potatoes and their effect on the bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **33** (1): 41-49.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K. H. (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32** (4): 1363-1371.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. & Bloemberg, G. V. (2001): Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **39** (1): 461-490.
- Lugtenberg, B. J. J. & Leveau, J. (2007): Biocontrol of plant pathogens: Principles, promises and pitfalls. In: The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Second edition. R. Pinto, Z. Varanini & P. Nannipieri (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 267-296.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K.-H. (1992): Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 593-600.
- Marmur, J. (1961): A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**: 208-218.
- Miethling, R., Wieland, G., Backhaus, H. & Tebbe, C. C. (2000): Variation of Microbial Rhizosphere Communities in Response to Crop Species, Soil Origin, and Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology* **40** (1): 43-56.
- Moënne-Loccoz, Y., McHugh, B., Stephens, P. M., McConnell, F. I., Glennon, J. D., Dowling, D. N. & O'Gara, F. (1996): Rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* sp. B24 genetically modified to utilise additional ferric siderophores. *FEMS Microbiology Ecology* **19** (4): 215-225.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006): Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* **170** (1): 165-175.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

- Neilands, J. B. & Leong, S. A. (1986): Siderophores in relation to plant-growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 187.
- Neilands, J. B. (1995): Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry* **270** (45): 26723-26726.
- Normander, B. & Prosser, J. I. (2000): Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (10): 4372-4377.
- Oedjijono, Line, M. A. & Dragar, C. (1993): Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **25** (2): 247-250.
- Okon, Y. & Kapulnik, Y. (1986): Development and Function of *Azospirillum*-Inoculated Roots. *Plant and Soil* **90**: 3-16.
- Okon, Y. & Labandera-Gonzalez, C. A. (1994): Agronomic Applications of *Azospirillum*: An Evaluation of 20 Years Worldwide Field Inoculation. *Soil Biology & Biochemistry* **26** (12): 1591-1601.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis, V. M., Baldani, J. I. & Döbereiner, J. (1996): Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. *Biology and Fertility of Soils* **21** (3): 197-200.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. A. (1986): Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology* **40** (1): 337-365.
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (2000): An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2** (1): 39-50.
- Powell, P. E., Cline, G. R., Reid, C. P. P. & Szaniszlo, P. J. (1980): Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* **287**: 833-834.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., van Oorschot, M. M. P., van der Sluis, I., Schippers, B. & Bakker, P. A. H. M. (1995): Dose-Response Relationships in Biological Control of Fusarium Wilt of Radish by *Pseudomonas* spp.. *Phytopathology* **85**: 1075-1081.

- Ramos, C., Molbak, L. & Molin, S. (2000): Bacterial Activity in the Rhizosphere Analyzed at the Single-Cell Level by Monitoring Ribosome Contents and Synthesis Rates. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (2): 801-809.
- Raskin, I. (1992): Salicylate, A New Plant Hormone. *Plant Physiology* **99** (3): 799-803.
- Reddy, M. S. & Rahe, J. E. (1989): Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil Biology & Biochemistry* **21** (3): 373-378.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K. & De Ley, J. (1993): *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing *Proteobacteria* associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**: 574-584.
- Reynders, L. & Vlassak, K. (1979): Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry* **11** (5): 547-548.
- Robleto, E. A., Borneman, J. & Triplett, E. W. (1998): Effects of Bacterial Antibiotic Production on Rhizosphere Microbial Communities from a Culture-Independent Perspective. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (12): 5020-5022.
- Rosenblueth, M. & Martinez-Romero, E. (2006): Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** (8): 827-837.
- Rothballer, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2003): *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* **34** (3): 261-279.
- Rothballer, M., Schmid, M., Fekete, A. & Hartmann, A. (2005): Comparative *in situ* analysis of *ipdC-gfpmut3* promoter fusions of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245. *Environmental Microbiology* **7** (11): 1839-1846.
- Rovira, A. D. & Davey, C. B. (1974): Biology of the rhizosphere. In: The plant root and its environment. E. W. Carson (Hrsg.). Charlottesville: University of Virginia Press, 153-204.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4** (4): 406-425.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schloter, M., Wiehe, W., Assmus, B., Steindl, H., Becke, H., Höflich, G. & Hartmann, A.** (1997): Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (5): 2038-2046.
- Schloter, M. & 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.
- Schroth, M. N. & Hancock, J. G.** (1982): Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* **216**: 1376-1381.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A. & Langebartels, C.** (2006): Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell & Environment* **29** (5): 909-918.
- Schulz, B., Boyle, C. & Sieber, T.** (2006): Microbial root endophytes, Soil Biology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Schwieger, F. & Tebbe, C. C.** (2000): Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)-linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (8): 3556-3565.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B.** (1987): Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160** (1): 47-56.
- Seong, K., Höfte, M., Boelens, J. & Verstraete, W.** (1991): Growth, survival and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biology & Biochemistry* **23** (5): 423-428.

- Sessitsch, A., Reiter, B. & Berg, G. (2004): Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* **50** (4): 239-249.
- Sitte, P., Weiler, E., Kadereit, J. W., Bresinsky, A. & Körner, C. (2002): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Begründet von E. Strasburger. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31** (4): 425-448.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A. & Vanderleyden, J. (2008): Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*: im Druck.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000): *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* **24** (4): 487-506.
- Suzuki, S., He, Y. & Oyaizu, H. (2003): Indole-3-Acetic Acid Production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and Its Association with Suppression of Creeping Bentgrass Brown Patch. *Current Microbiology* **47** (2): 138-143.
- Thomashow, L. S. (1996): Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* **7** (3): 343-347.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H. & Hubbell, D. H. (1979): Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **37** (5): 1016-1024.
- van der Bij, A. J., de Weger, L. A., Tucker, W. T. & Lugtenberg, B. J. J. (1996): Plasmid Stability in *Pseudomonas fluorescens* in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (3): 1076-1080.
- van Elsas, J. D., Dijkstra, A. F., Govaert, J. M. & van Veen, J. A. (1986): Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microbiology Ecology* **38** (3): 151-160.
- van Veen, J. A., Morgan, J. A. W. & Whipps, J. M. (2007): Methodological approaches to the study of carbon flow and the associated microbial population dynamics in the

- rhizosphere. In: *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Second edition. R. Pinto, Z. Varanini & P. Nannipieri (Hrsg.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 371-399.
- Vandenhove, H., Merckx, R., Wilmots, H. & Vlassak, K.** (1991): Survival of *Pseudomonas fluorescens* inocula of different physiological stages in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **23** (12): 1133-1142.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Defago, G.** (1989): Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal* **8** (2): 351-358.
- Wagner, M., Horn, M. & Daims, H.** (2003): Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* **6** (3): 302-309.
- Weller, D. M. & Cook, R. J.** (1986): Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**: 328-334.
- Weller, D. M.** (1988): Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 379-407.
- Whipps, J. M.** (1990): Carbon economy. In: *The rhizosphere*. J. M. Lynch (Hrsg.). Chichester: Wiley, 59-97.
- Whipps, J. M.** (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**: 487-511.
- Xie, H., Pasternak, J. J. & Glick, B. R.** (1996): Isolation and Characterization of Mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 That Overproduce Indoleacetic Acid. *Current Microbiology* **32** (2): 67-71.
- Yang, C.-H. & Crowley, D. E.** (2000): Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (1): 345-351.
- Zul, D., Wanner, G. & Overmann, J.** (2008): *Massilia brevitalea* sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from lysimeter soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** (5): 1245-1251.

7 Anhang

- Tab. 7.1:** Behandlung der Parzellenversuche nach landwirtschaftlicher Praxis im HMGU-Versuchsgut Scheyern (2005/2006)
- Tab. 7.2:** Behandlung der Parzellenversuche nach landwirtschaftlicher Praxis im HMGU-Versuchsgut Scheyern (2006/2007)
- Tab. 7.3:** Behandlung des Parzellenversuches nach landwirtschaftlicher Praxis im TU-Versuchsgut Roggenstein (2007)
- Abb. 7.1:** Spross- und Wurzellängen von Gerste nach 3 Wochen Wachstum im unsterilen Quarzsandsystem.
- Abb. 7.2:** Spross- und Wurzeltrockenmassen von Gerste nach 3 Wochen Wachstum im unsterilen Quarzsandsystem.
- Abb. 7.3:** Sprosslängen von Gerste nach 8 Wochen Wachstum im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus (1 Pflanze pro 400 cm³ Topf).
- Abb. 7.4:** Spross- und Wurzeltrockenmassen von Gerste nach 8 Wochen Wachstum im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus (1 Pflanze pro 400 cm³ Topf).
- Abb. 7.5-7.12:** RFLP-Muster positiver Klone der Klonbanken K2, P2, K4 und P4 nach Einsatz der Restriktionsenzyme MspI und RsaI
- Tab. 7.4:** Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für die 16S-rDNS-Sequenzen aus der Abbildung 3.30
- Tab. 7.5:** Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für weitere 16S-rDNS-Sequenzen aus der Abbildung 3.30
- Abb. 7.13-7.28:** Phylogenetische Stammbäume, die die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen zeigen.

Tab. 7.2: Behandlung der Parzellenversuche nach landwirtschaftlicher Praxis im HMGU-Versuchsgut Scheyern (2005/2006)

Schlag	Bodenart	Bodenzahl	Anbau/ Anbauverfahren	Kultur (Sorte)	Vorfrucht	Aussaat	Bodenbe- arbeitung	Düngung	Pflanzenschutz/ Pflegetmaß- nahmen	Ernte
A01	sL 4D	44	ökologisch Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Weizen	24.04.2006 420 Körner je m ² Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	30.11.2005 Pflug Arbeitstiefe: 23 cm 24.04.2006 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm	keine Düngung	23.05.2006 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 03.06.2006 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 07.06.2006 Messenger 21./25.06.2006 Distel schneiden	27.07.2006
A26	sL 4D	52	ökologisch Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Weizen	24.04.2006 420 Körner je m ² Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	01.11.2005 Pflug Arbeitstiefe: 23 cm 24.04.2006 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm	keine Düngung	23.05.2006 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 03.06.2006 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 07.06.2006 Messenger 21./25.06.2006 Distel schneiden	27.07.2006
A19	L 4D	53	integriert Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Weizen	24.04.2006 420 Körner je m ² Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	20.10.2005 Grubber Arbeitstiefe: 15 cm 24.04.2006 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm	15.05.2006 BBCH 24 Ammoniumnitrat- Harnstoff (AHL) 167 l/ha 50 kg N/ha	25.05.2006 BBCH 25 Herbizid: Plattform S 0,9 l/ha + Gropper 10 g/ha 17.06.2006 Insektizid: Bulldog 300 ml/ha 07.06.2006 Messenger	08.08.2006

Tab. 7.2: Behandlung der Parzellenversuche nach landwirtschaftlicher Praxis im HMGU-Versuchsgut Scheyern (2006/2007)

Schlag	Bodenart	Bodenzahl	Anbau/ Anbauverfahren	Kultur (Sorte)	Vorfrucht	Aussaat	Bodenbe- arbeitung	Düngung Bewässerung	Pflanzenschutz/ Pflegetmaß- nahmen	Ernte
A01	sL 4D	44	ökologisch Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Sonnen- blumen	05.04.2007 320 Körner je m ² (TKG 51 g) Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	13.03.2007 Pflug Arbeitstiefe: 24 cm 04.04.2007 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm 07.04.2007 Walzen	keine Düngung 27.04.2007 Bewässern 10-12 l/m ² 03.05.2007 Bewässern 10-12 l/m ²	25.04.2007 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 24.05.2007 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 17.07.2007 Distel schneiden	02.08.2007
A26/ Ö7	sL 4D	48	ökologisch Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Sonnen- blumen	05.04.2007 320 Körner je m ² (TKG 51 g) Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	29.12.2006 + 15.01.2007 Grubber Arbeitstiefe: 15 cm 03.04.2007 Fräsen Arbeitstiefe: 7 cm 04.04.2007 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm 07.04.2007 Walzen	keine Düngung 27.04.2007 Bewässern 10-12 l/m ² 03.05.2007 Bewässern 10-12 l/m ²	25.04.2007 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 24.05.2007 Striegel Arbeitstiefe: 1 cm 17.07.2007 Distel schneiden	01.08.2007
A19	L 4D	53	integriert Drillsaat	Sommer- gerste (Barke)	Weizen	05.04.2007 320 Körner je m ² (TKG 51 g) Reihen- abstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	05.09.2006 Grubber Arbeitstiefe: 16 cm 03.04.2007 Fräsen Arbeitstiefe: 7 cm 04.04.2007 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm	12.03.2007 Schwefelsaures Ammoniak 1 dt/ha, 20 kg N/ha 03.05.2007 Ammoniumnitrat- Harnstoff (AHL) 100 l/ha, 30 kg N/ha	12.03.2007 Totalherbizid: Glyphosate 3,5 l/ha 22.05.2007 Herbizid: Primus 100 ml/ha 27.05.2007 Herbizid: Axial 0,45 l/ha 07.06.2007 Insektizid: Karate 75 ml/ha	01.08.2007

Tab. 7.2: Fortsetzung

Schlag	Bodenart	Bodenzahl	Anbau/ Anbauverfahren	Kultur (Sorte)	Vorfrucht	Aussaat	Bodenbearbeitung	Düngung Bewässerung	Pflanzenschutz/ Pflegemaßnahmen	Ernte
A19							07.04.2007 Walzen	09.06.2007 Ammoniumnitrat- Harnstoff (AHL) 133 l/ha, 40 kg N/ha 27.04./03.05.2007 Bewässern 10-12 l/m ²		
A20	L 4D	57	integriert Drillsaat	Sommergerste (Barke)	Weizen	05.04.2007 320 Körner je m ² (TKG 51 g) Reihenabstand: 13 cm Saattiefe: 3 cm	05.09.2006 Grubber Arbeitstiefe: 16 cm 03.04.2007 Kreiselegge Arbeitstiefe: 7 cm 04.04.2007 Kreiselegge Arbeitstiefe: 5 cm 07.04.2007 Walzen	12.03.2007 Schwefelsaures Ammoniak 1 dt/ha, 20 kg N/ha 03.05.2007 Ammoniumnitrat- Harnstoff (AHL) 100 l/ha, 30 kg N/ha 09.06.2007 Ammoniumnitrat- Harnstoff (AHL) 133 l/ha, 40 kg N/ha Bewässern: wie A19	12.03.2007 Totalherbizid: Glyphosate 3,5 l/ha 22.05.2007 Herbizid: Primus 100 ml/ha 27.05.2007 Herbizid: Axial 0,45 l/ha 07.06.2007 Insektizid: Karate 75 ml/ha	01.08.2007

Tab. 7.3: Behandlung des Parzellenversuches nach landwirtschaftlicher Praxis im TU-Versuchsgut Roggenstein (2007)

Schlag	Bodenart	Bodenzahl	Anbau/ Anbauverfahren	Kultur (Sorte)	Vorfrucht	Aussaat	Bodenbearbeitung	Düngung	Pflanzenschutz/ Pflegemaßnahmen	Ernte
Rog U6	sL 4D	54/51	ökologisch Drillsaat	Sommergerste (Barke)	Winterweizen	17.03.2007 340 Körner je m ²	2* Stoppelbearbeitung, Arbeitstiefe: 10 cm; Pflug Arbeitstiefe: 25 cm 2* Saatbettkombination	keine Düngung	-	18.07.2007
Rog U6	sL 4D	54/51	integriert Drillsaat	Sommergerste (Barke)	Winterweizen	17.03.2007 340 Körner je m ²	2* Stoppelbearbeitung, Arbeitstiefe: 10 cm; Pflug Arbeitstiefe: 25 cm 2* Saatbettkombination	28.03.2007 NPK Grunddüngung 60 kg/ha P ₂ O ₅ 60 kg/ha K ₂ O 60 kg N/ha 25.04.2007 KAS 40 kg N/ha 03.05.2007 Spurennährstoffe Mn-Foliarel 2 l/ha Solobor 0,3 kg/ha 10.05.2007 Spurennährstoffe Mn-Sulfat 4 kg/ha Bittersalz 10 kg/ha Solobor 0,3 kg/ha	03.05.2007 Herbizide: Husar 0,15 l/ha Mero 1l/ha Insektizid:Biscaya 0,3 l/ha 14.05.2007 Fungizid: Input 0,6 l/ha 21.05.2007 Wachstumsregulator Camposan 0,3 l/ha Insektizid:Bulldog 0,3 l/ha 26.05.2007 Fungizid: Fandango 0,8 l/ha	18.07.2007

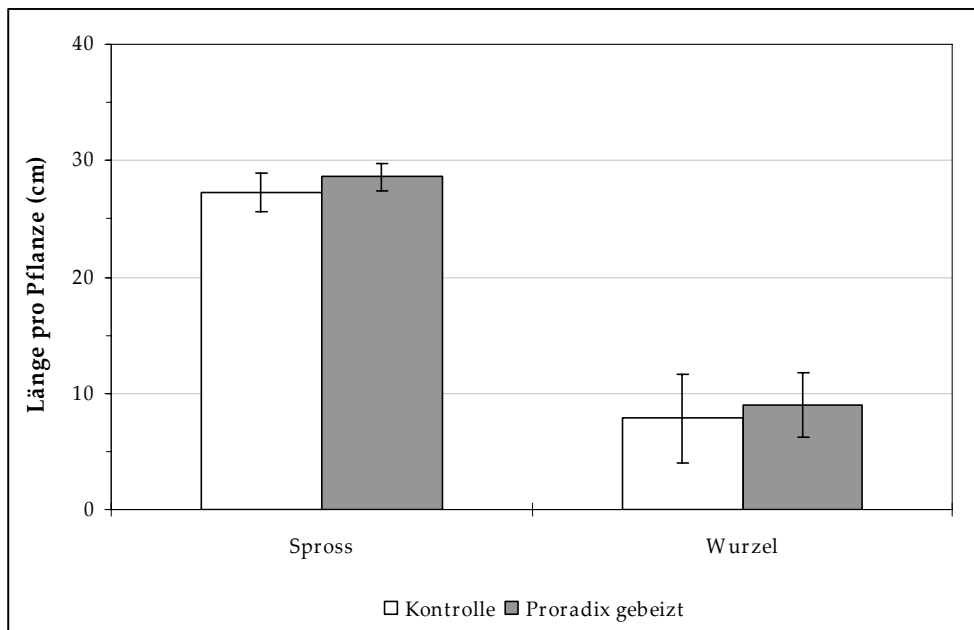


Abb. 7.1: Spross- und Wurzellängen von Gerste nach 3 Wochen Wachstum im unsterilen Quarzsandsystem.

Die Samen waren unbehandelt bzw. mit Proradix® gebeizt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 4 Messungen an. Unterschiede sind nicht signifikant.

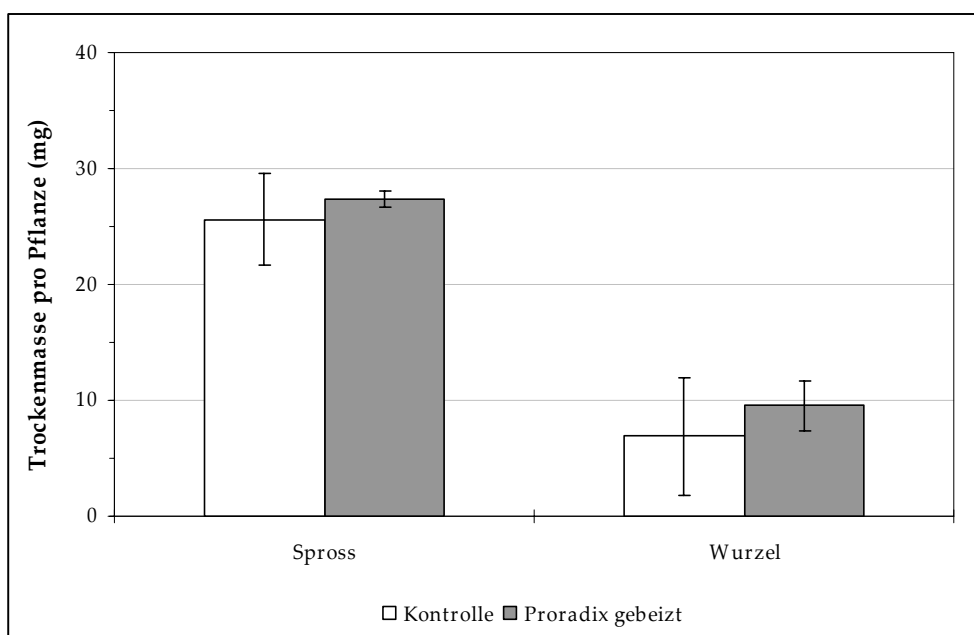


Abb. 7.2: Spross- und Wurzel-trockenmassen von Gerste nach 3 Wochen Wachstum im unsterilen Quarzsandsystem.

Die Samen waren unbehandelt bzw. mit Proradix® gebeizt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 4 Messungen an. Unterschiede sind nicht signifikant.

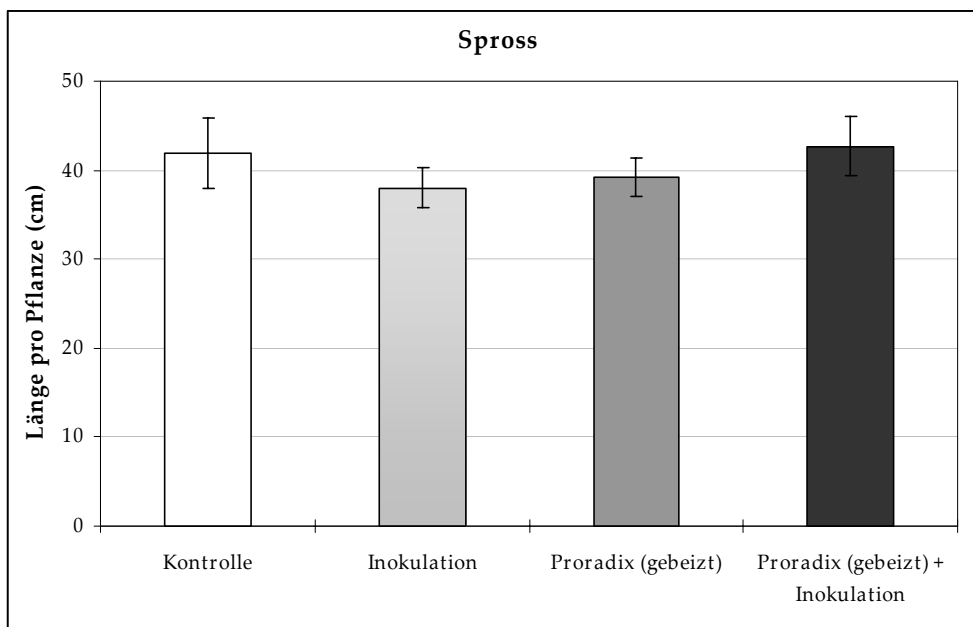


Abb. 7.3: Sprosslängen von Gerste nach 8 Wochen Wachstum im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus (1 Pflanze pro 400 cm³ Topf).

Die Keimlinge waren unbehandelt oder durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelt oder mit der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellsuspension (10⁸ Zellen/ml) inokuliert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 10 bis 13 Wiederholungen an.

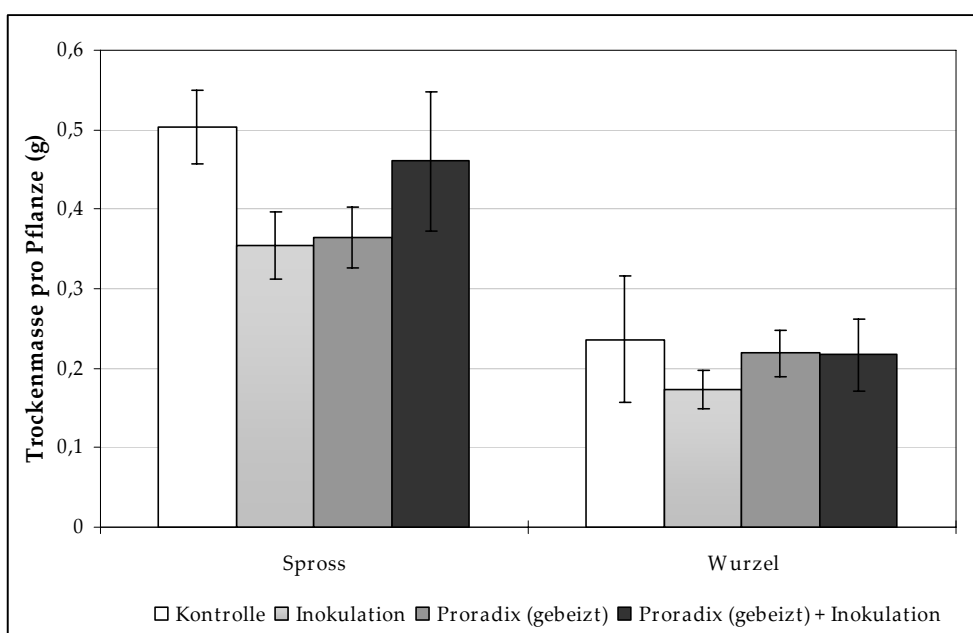


Abb. 7.4: Spross- und Wurzel trockenmassen von Gerste nach 8 Wochen Wachstum im Ackerboden (Versuchsgut Scheyern) im Gewächshaus (1 Pflanze pro 400 cm³ Topf).

Die Keimlinge waren unbehandelt oder durch Saatgutbeizung mit Proradix® behandelt oder mit der Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*)-Zellsuspension (10⁸ Zellen/ml) inokuliert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert aus 10 bis 13 Wiederholungen an.

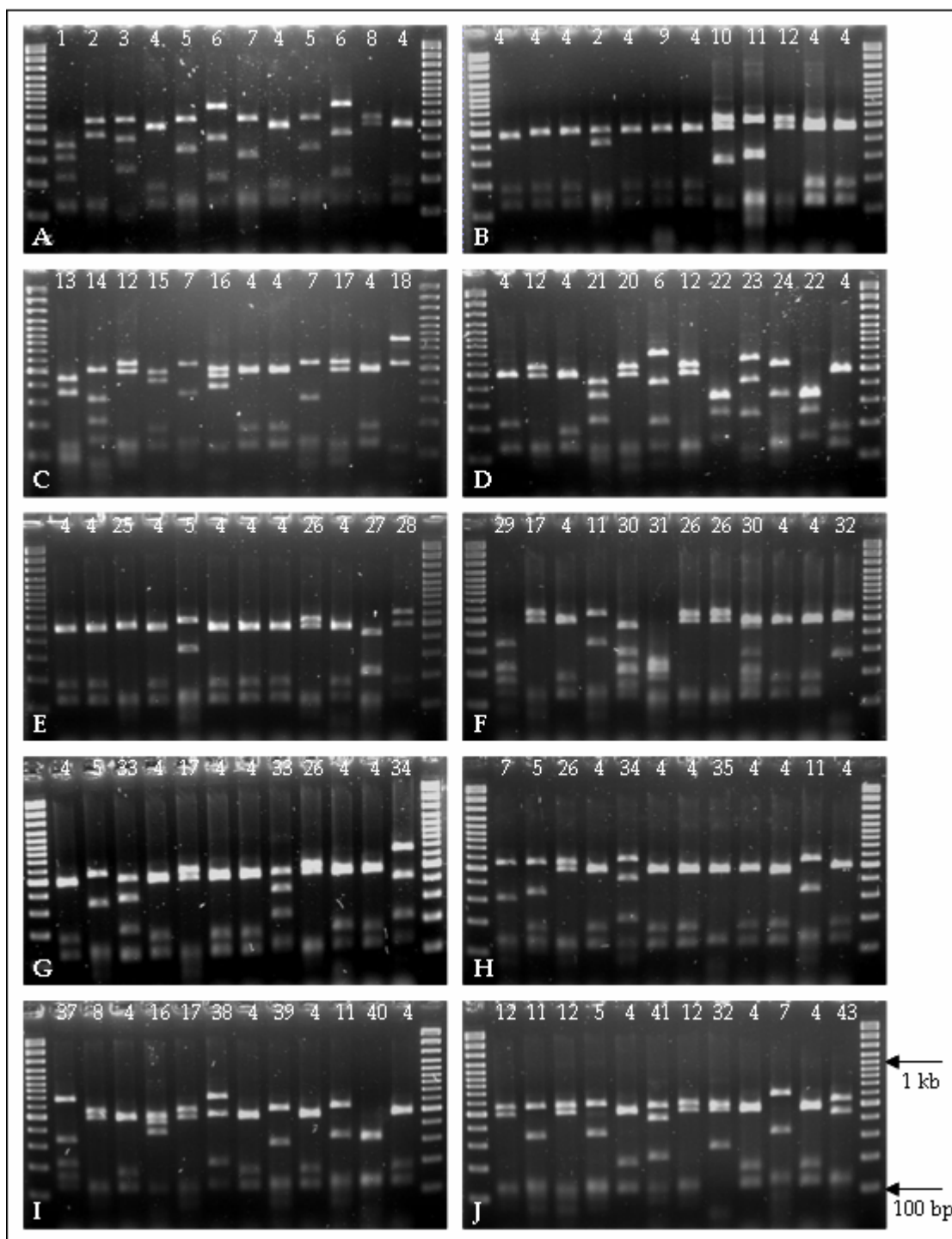


Abb. 7.5: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbanken K2 (A-J) und P2 (J ab Muster 9) nach Einsatz des Restriktionsenzym *MspI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose).

Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

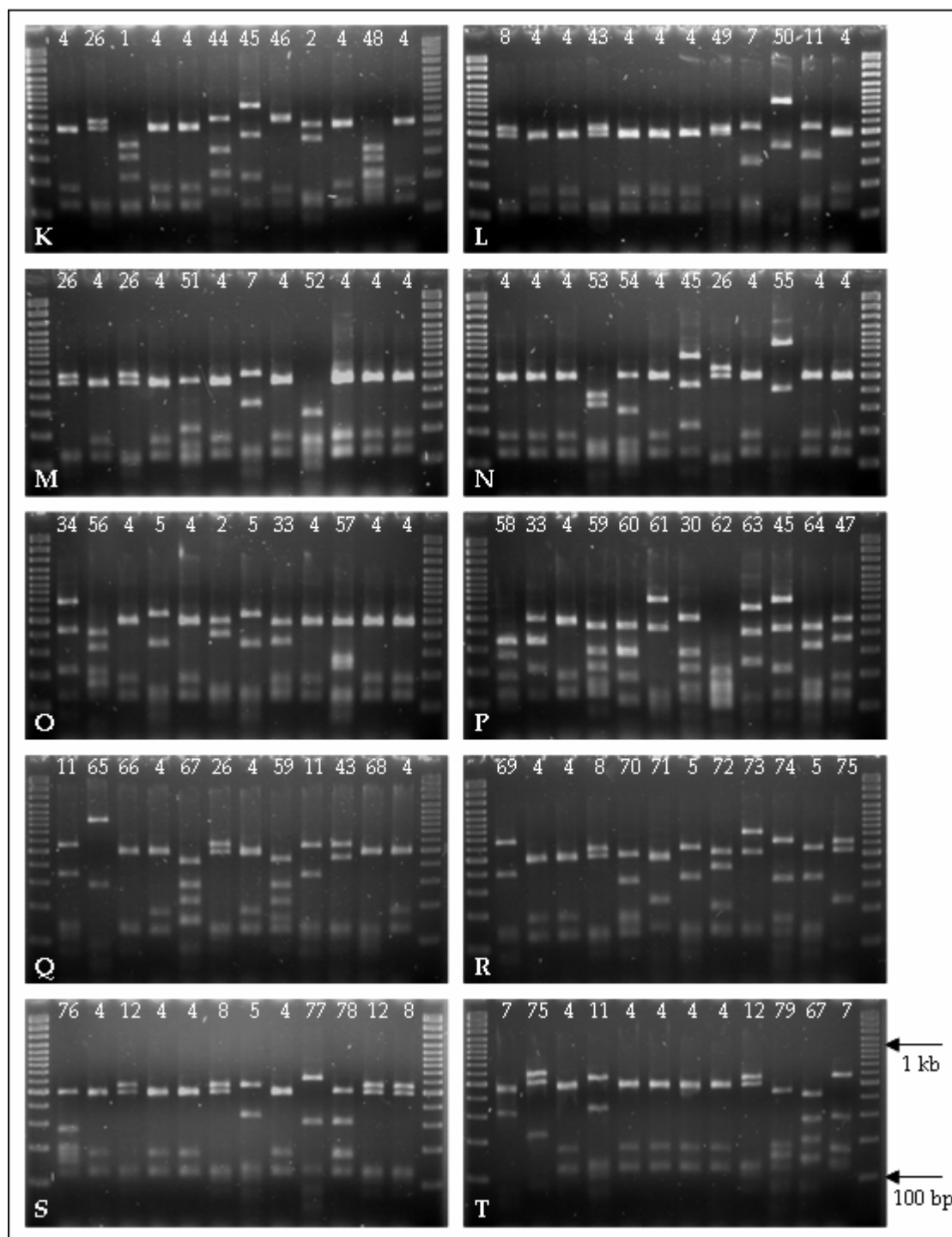


Abb. 7.6: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbank P2 nach Einsatz des Restriktionsenzym *MspI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

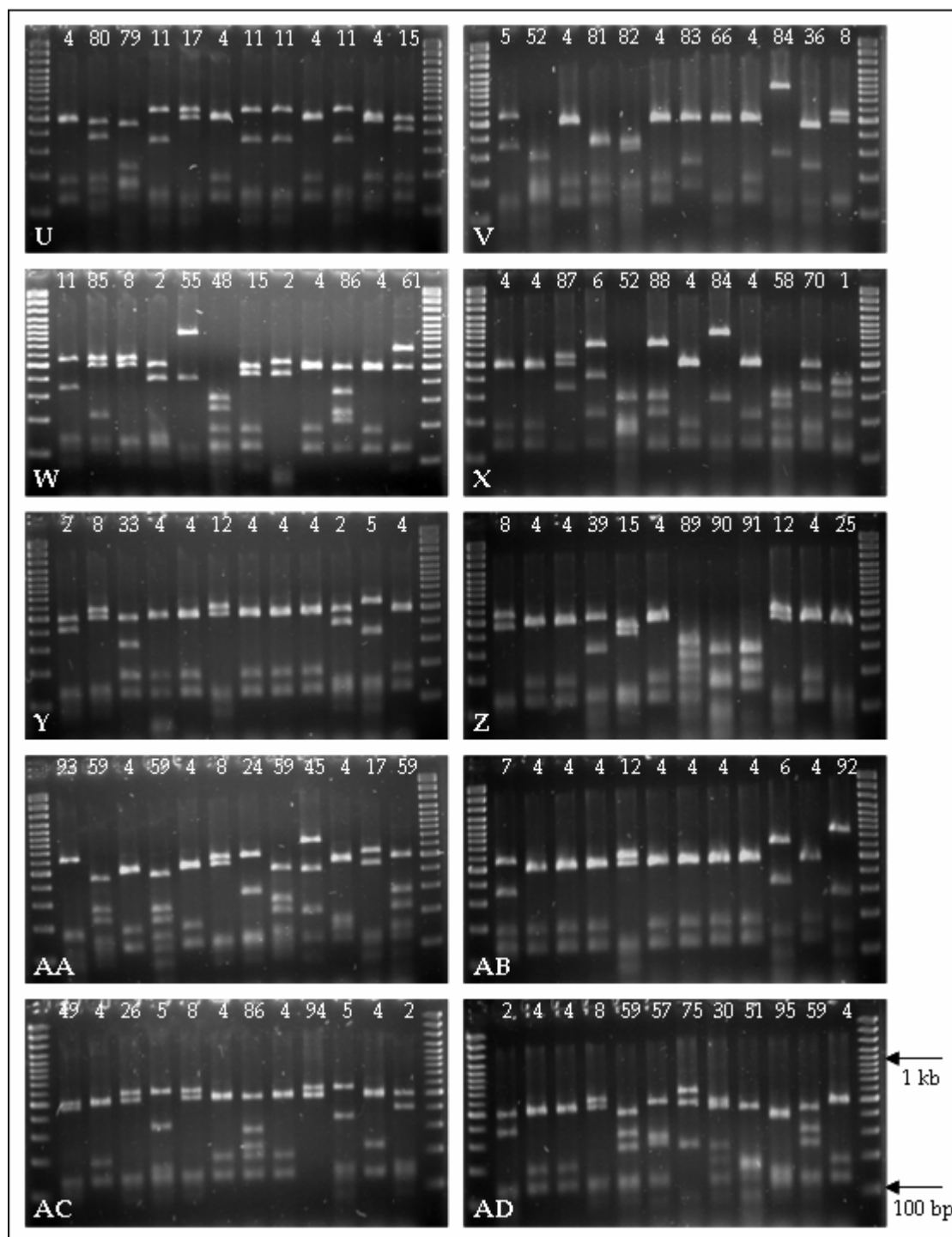


Abb. 7.7: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbanken P2 (U), K4 (U ab Muster 6-AD) und P4 (AD ab Muster 6) nach Einsatz des Restriktionsenzym *MspI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

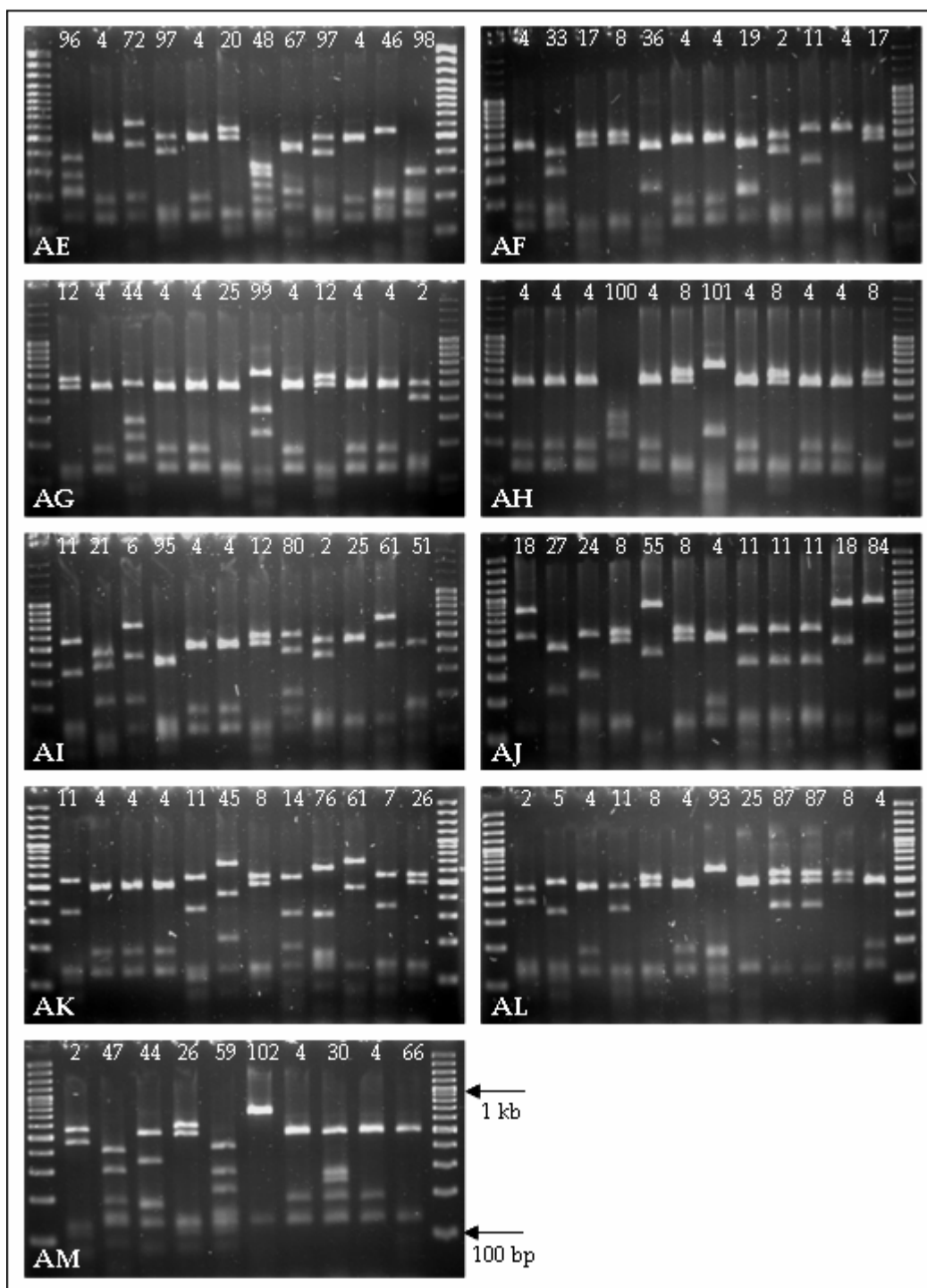


Abb. 7.8: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbank P4 nach Einsatz des Restriktionsenzym *MspI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

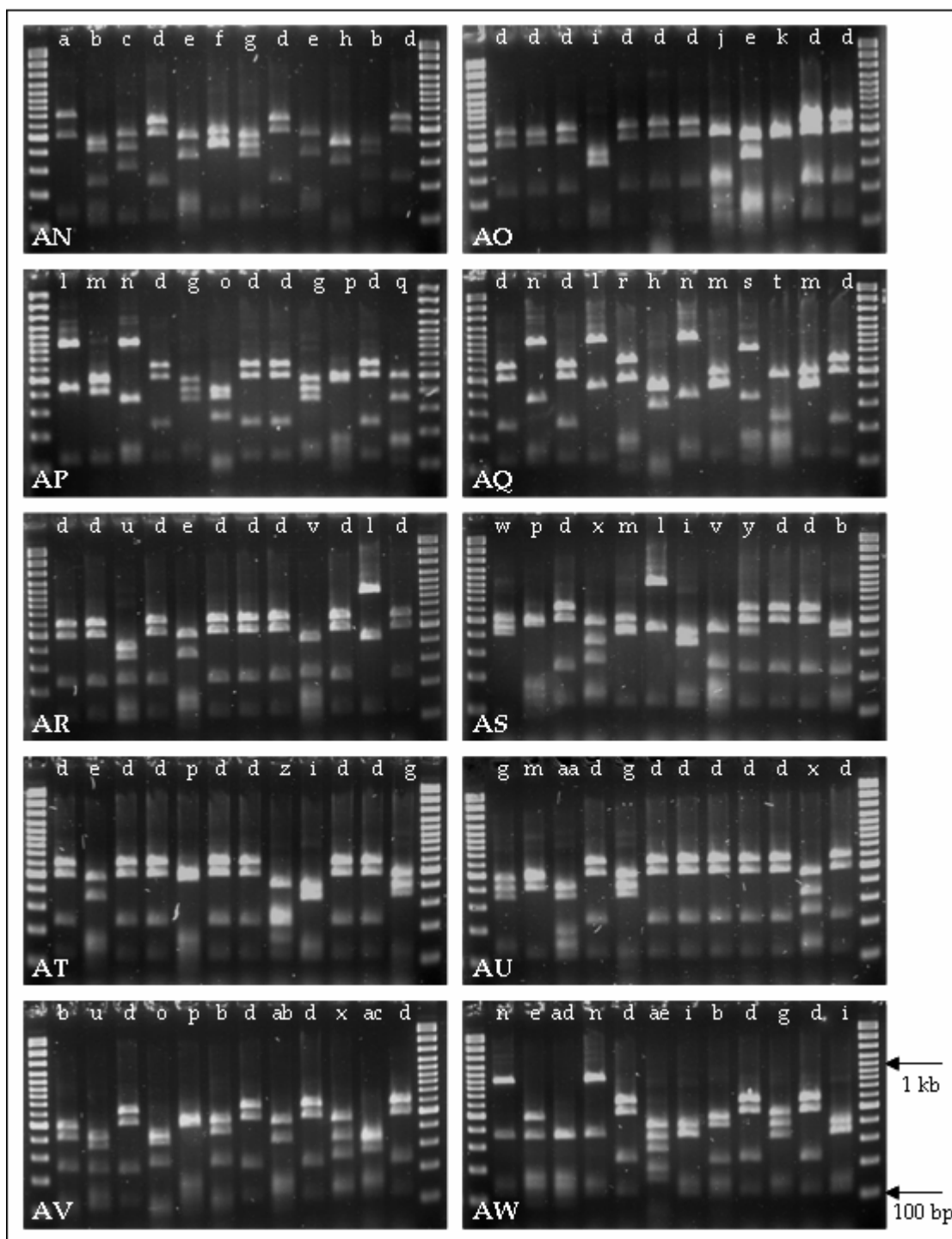


Abb. 7.9: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbanken K2 (AN-AW) und P2 (AW ab Muster 9) nach Einsatz des Restriktionsenzym *RsaI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

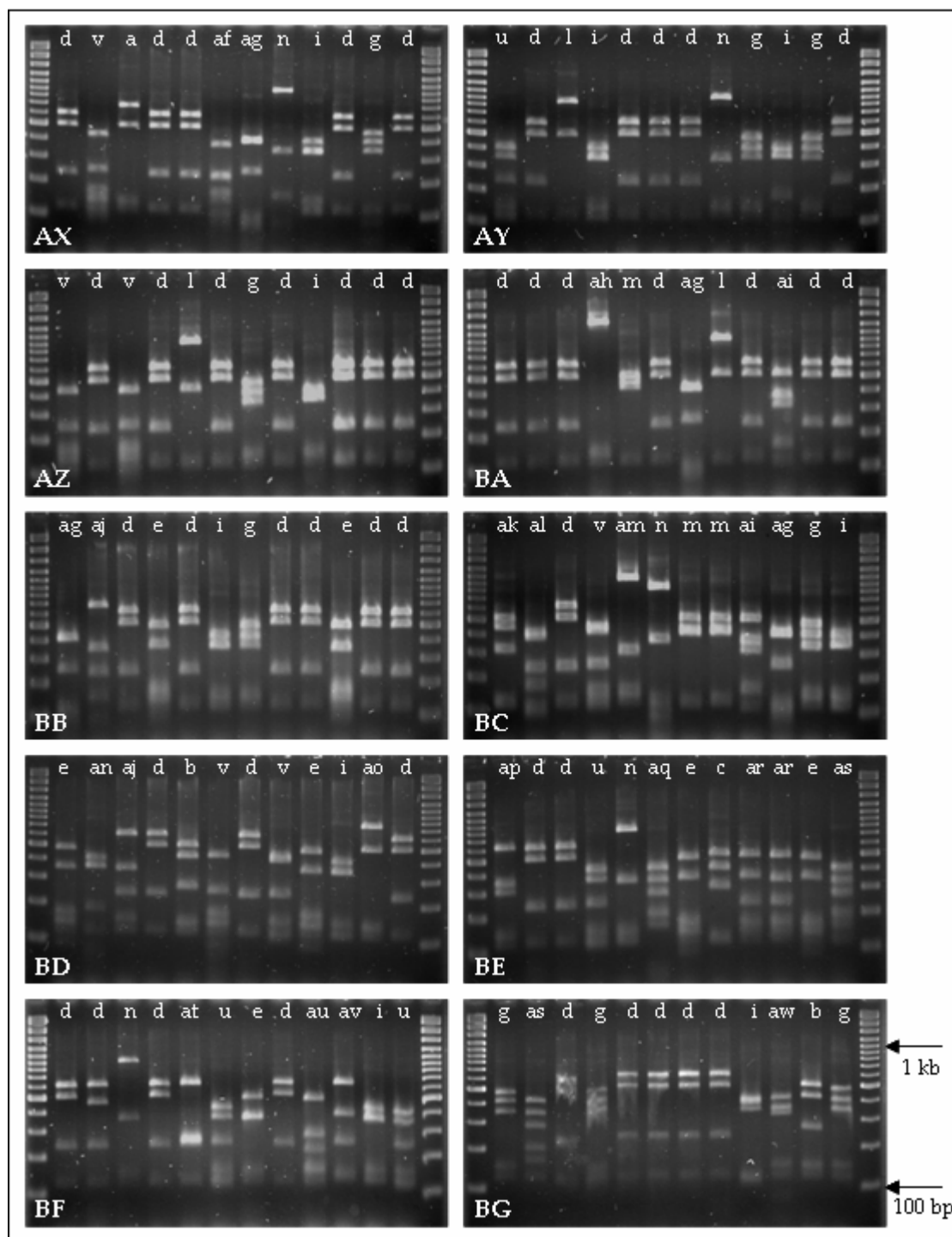


Abb. 7.10: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbank P2 nach Einsatz des Restriktionsenzym *RsaI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

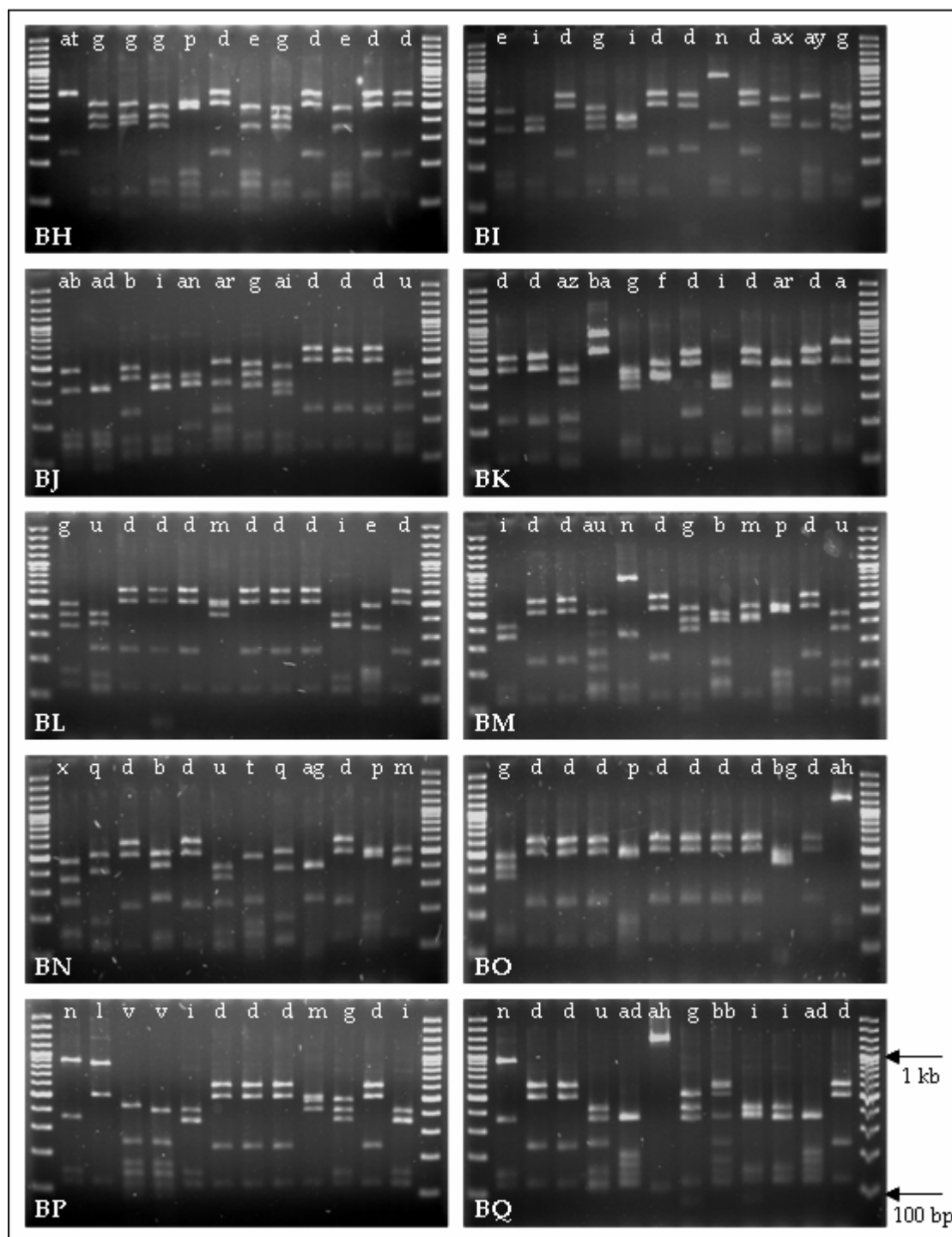


Abb. 7.11: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbanken P2 (BH), K4 (BH ab Muster 6-BQ) und P4 (BQ ab Muster 6) nach Einsatz des Restriktionsenzym *RsaI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose).

Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

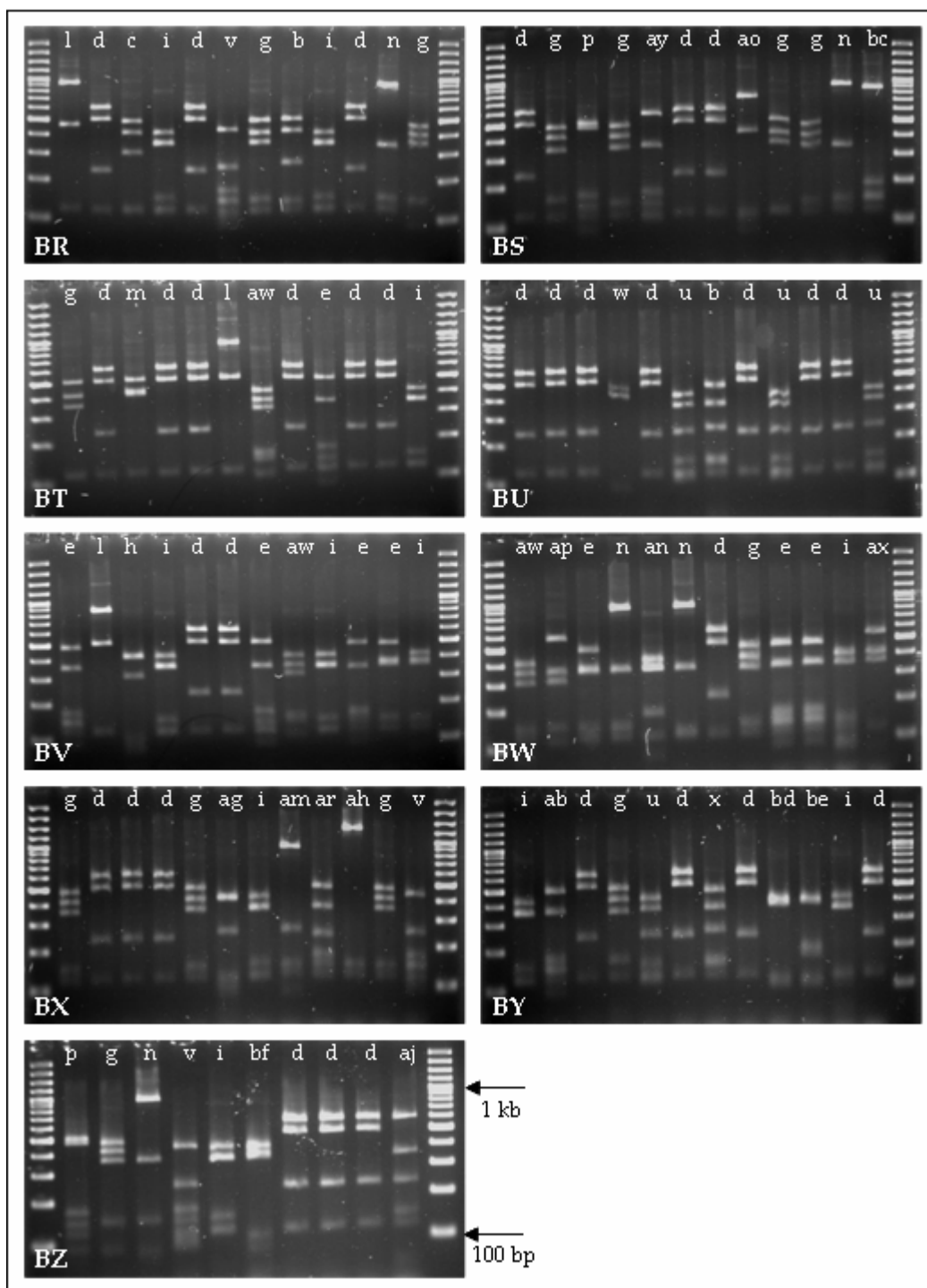


Abb. 7.12: RFLP-Muster positiver Klone der Klonbank P4 nach Einsatz des Restriktionsenzym *RsaI* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3,5% (w/v) Agarose). Als Längenstandard wurde der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* verwendet.

Tab. 7.4: Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für die 16S-rDNS-Sequenzen aus der Abbildung 3.30

	uncultured bacterium, AY491597	uncultured soil bacterium, AY493951	uncultured bacterium, AF418944	uncultured bacterium, AB013257	uncultured bacterium, AY221039	uncultured bacterium, AY221082	uncultured soil bacterium, AY326587	uncultured bacterium, AF465652	uncultured bacterium, AY395360	P4III50	P2II48	K4III39	P4II12	uncultured soil bacterium, DQ297982	uncultured bacterium, EF516375	uncultured soil bacterium, EF688386	uncultured bacterium, EU335225
uncultured bacterium, AY491597	100																
uncultured soil bacterium, AY493951	88,8	100															
uncultured bacterium, AF418944	90,4	87,1	100														
uncultured bacterium, AB013257	87,2	85,6	87,4	100													
uncultured bacterium, AY221039	84,9	82,9	84,9	81,4	100												
uncultured bacterium, AY221082	84,9	82,7	84,9	81,4	99,5	100											
uncultured soil bacterium, AY326587	84,1	83,2	84,4	81,8	95,5	95,3	100										
uncultured bacterium, AF465652	84,2	82,8	84,2	81,5	95,0	94,8	96,6	100									
uncultured bacterium, AY395360	84,0	83,3	83,7	81,6	95,2	95,0	97,2	96,1	100								
P4III50	86,4	85,9	84,0	84,2	83,5	83,2	82,9	82,3	82,4	100							
P2II48	84,6	82,2	84,7	81,2	97,9	97,8	95,1	94,5	95,0	83,1	100						
K4III39	84,7	82,4	85,4	81,7	92,0	92,0	92,2	92,1	90,7	82,3	91,1	100					
P4II12	84,6	83,1	84,9	82,3	94,7	94,6	97,5	96,5	96,9	83,0	94,1	92,3	100				
uncultured soil bacterium, DQ297982	84,6	82,3	84,6	81,0	97,8	97,7	95,3	94,8	95,1	83,2	99,0	90,8	94,3	100			
uncultured bacterium, EF516375	85,9	86,0	84,1	83,8	83,1	82,8	83,4	82,8	83,1	94,5	82,6	81,8	83,0	83,0	100		
uncultured soil bacterium, EF688386	85,1	83,5	85,8	82,5	92,5	92,6	92,4	92,6	91,1	82,4	91,9	96,3	93,1	91,7	82,1	100	
uncultured bacterium, EU335225	84,3	82,8	84,7	81,4	94,1	93,9	96,4	95,7	95,5	83,0	93,9	91,7	97,5	94,0	82,7	92,2	100

Tab. 7.5: Distanzmatrix mit den Sequenzähnlichkeiten in % für weitere 16S-rDNS-Sequenzen aus der Abbildung 3.30

	uncultured bacterium, AY212621	uncultured bacterium, AY212712	uncultured soil, AY493950	uncultured bacterium, AF418945	uncultured bacterium, AY218729	uncultured bacterium, AY218747	uncultured gamma, AJ318183	uncultured bacterium, AY188294	uncultured bacterium, AY218737	uncultured bacterium, AY218694	uncultured gamma, AJ604540	uncultured bacterium, AB166775	uncultured bacterium, AB179523	P2III4	P2II19	P2II35	K4I38	P4I36	P4II48	<i>Rhodanobacter</i> sp. CC-JY-1, DQ239766	uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EF018313	uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EF018705	uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EU266803
uncultured bacterium, AY212621	100																						
uncultured bacterium, AY212712	94,3	100																					
uncultured soil, AY493950	91,8	91,6	100																				
uncultured bacterium, AF418945	92,6	94,4	90,9	100																			
uncultured bacterium, AY218729	91,7	92,5	93,8	92,6	100																		
uncultured bacterium, AY218747	90,6	92,3	93,1	92,5	98,4	100																	
uncultured gamma, AJ318183	91,7	92,1	93,9	92,4	98,8	97,4	100																
uncultured bacterium, AY188294	87,5	88,8	89,5	89,4	91,7	91,6	92,3	100															
uncultured bacterium, AY218737	91,4	91,9	93,6	91,7	99,1	97,9	98,3	91,4	100														
uncultured bacterium, AY218694	88,6	88,1	90,2	89,0	90,8	90,5	91,0	88,0	90,8	100													
uncultured gamma, AJ604540	89,6	91,1	91,6	90,7	91,5	91,7	91,1	87,6	91,1	93,4	100												
uncultured bacterium, AB166775	90,0	90,4	91,2	90,9	94,2	92,8	94,8	92,0	93,7	90,3	89,7	100											
uncultured bacterium, AB179523	90,7	91,2	92,5	90,7	92,5	91,3	92,3	87,8	92,3	90,5	91,9	91,2	100										
P2III4	90,5	90,1	91,6	90,0	92,0	91,2	92,4	87,5	91,7	88,7	89,5	89,8	92,3	100									
P2II19	90,4	91,6	91,0	91,0	92,0	91,2	91,8	87,7	91,5	90,6	92,6	90,6	92,2	89,1	100								
P2II35	91,0	91,1	91,6	91,1	92,2	91,6	92,1	87,7	92,2	90,3	92,2	90,9	97,1	93,1	91,8	100							
K4I38	91,5	92,3	94,8	92,3	94,2	93,6	94,6	90,1	93,9	90,4	92,4	92,7	93,0	91,5	92,2	92,8	100						
P4I36	91,6	92,5	93,8	92,4	94,9	94,3	95,0	90,7	94,5	89,2	90,1	92,5	92,3	91,3	91,3	92,1	95,2	100					
P4II48	93,8	95,9	91,9	96,8	93,5	93,1	93,4	89,6	92,6	89,7	91,8	91,7	91,7	90,7	92,4	91,9	93,3	93,1	100				
<i>Rhodanobacter</i> sp. CC-JY-1, DQ239766	92,1	93,8	92,1	92,8	93,8	93,3	93,8	89,8	93,4	89,6	92,0	91,8	91,0	90,5	91,0	91,7	92,8	92,6	93,5	100			
uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EF018313	91,2	91,3	91,9	91,7	93,0	92,6	93,3	89,5	92,8	90,9	91,5	91,8	96,1	94,3	90,8	96,6	92,6	92,8	92,0	92,1	100		
uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EF018705	90,8	90,6	91,2	91,5	92,2	91,7	92,4	88,8	91,9	89,9	92,0	91,0	96,5	92,8	91,4	97,4	92,6	92,4	91,8	92,0	98,2	100	
uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> , EU266803	93,2	95,1	91,6	96,4	93,0	92,5	93,1	89,9	92,1	89,8	91,3	92,1	91,5	90,4	92,7	91,5	93,1	92,9	98,8	93,9	92,1	91,8	100

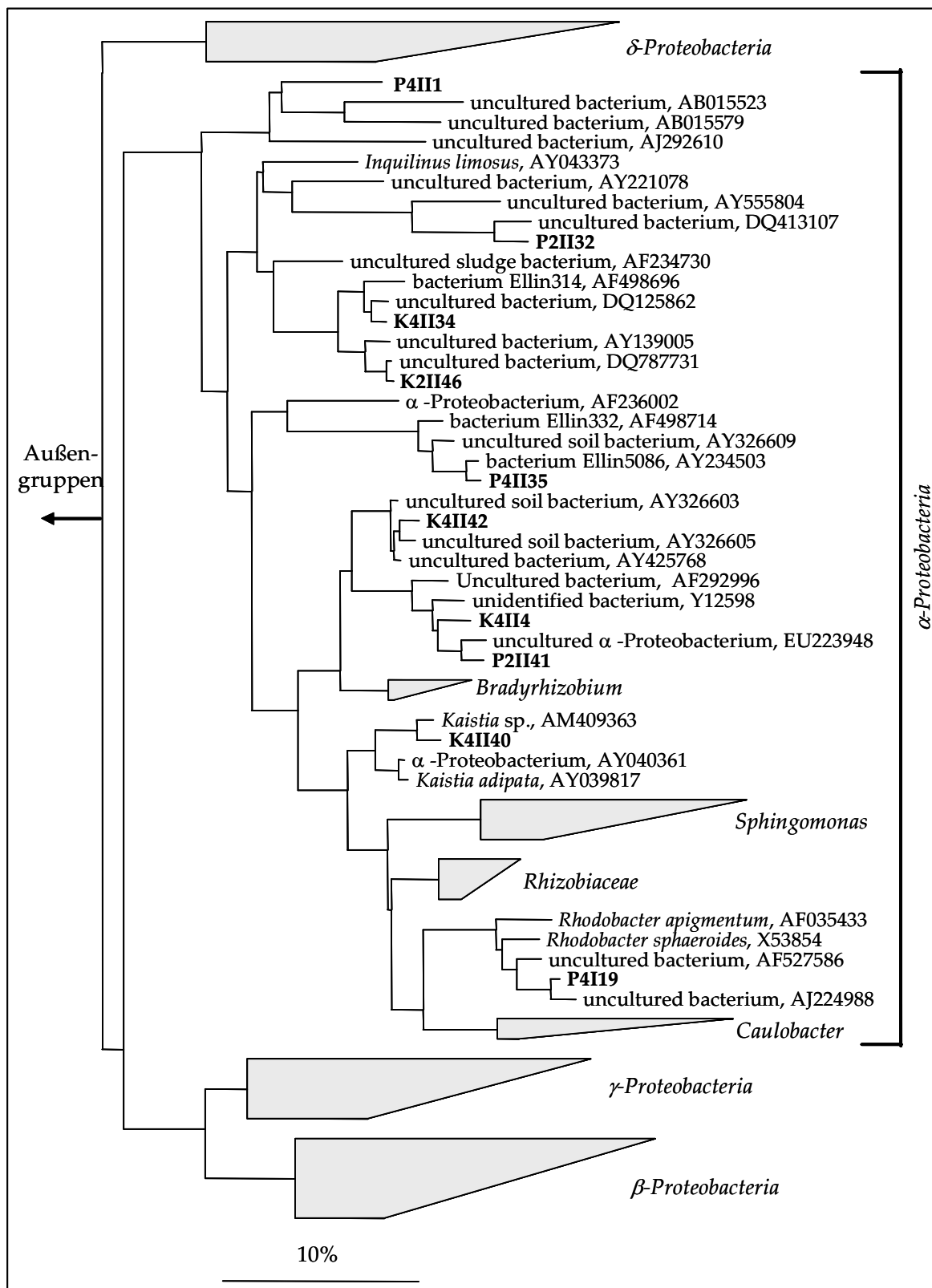


Abb. 7.13: Phylogenetischer Stammbaum der α -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter α -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere α -Proteobacteria-Sequenzen sind in der Abbildung 7.14 zu finden.

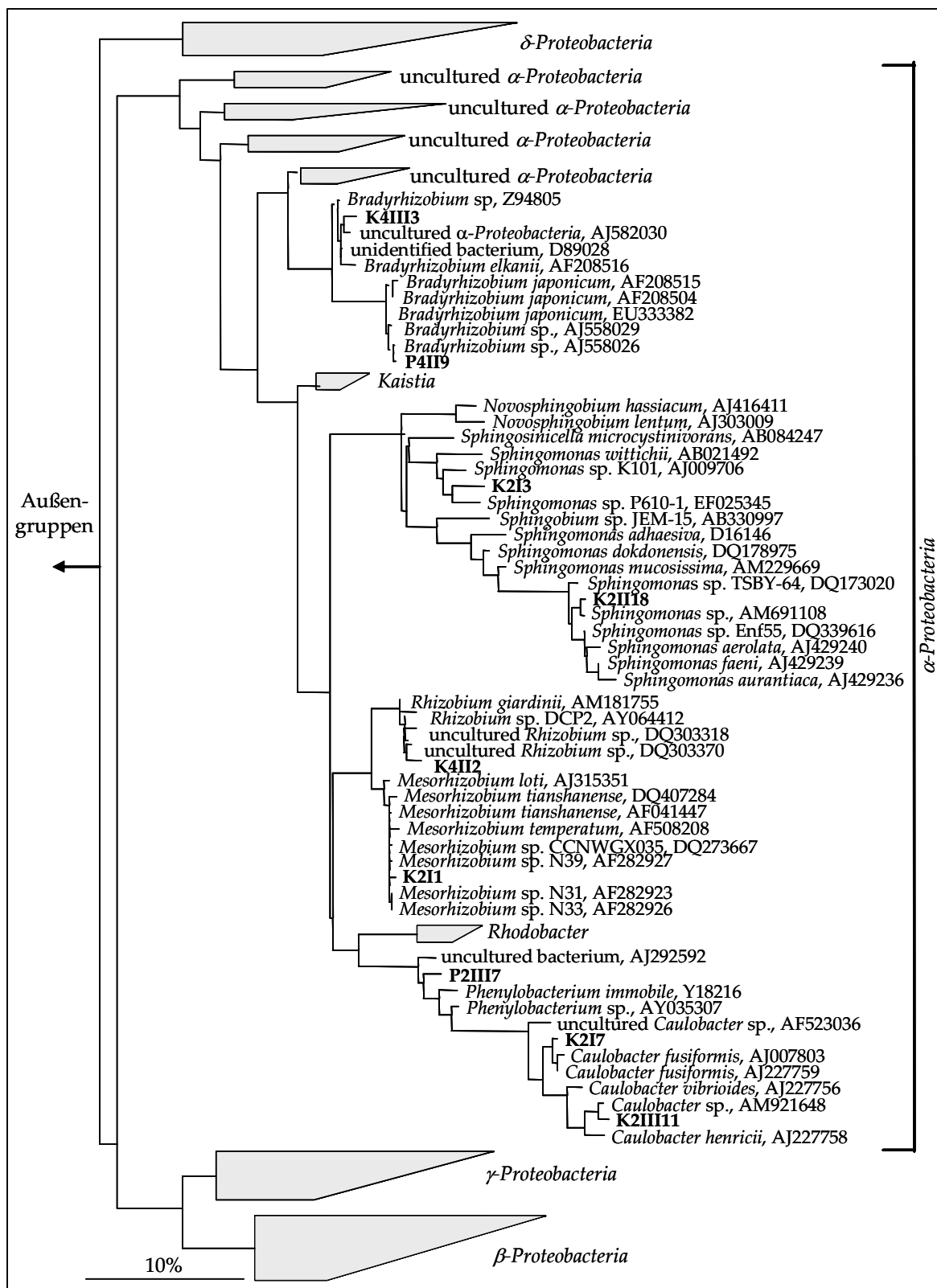


Abb. 7.14: Phylogenetischer Stammbaum der α -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter α -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere α -Proteobacteria-Sequenzen sind in der Abbildung 7.13 zu finden.

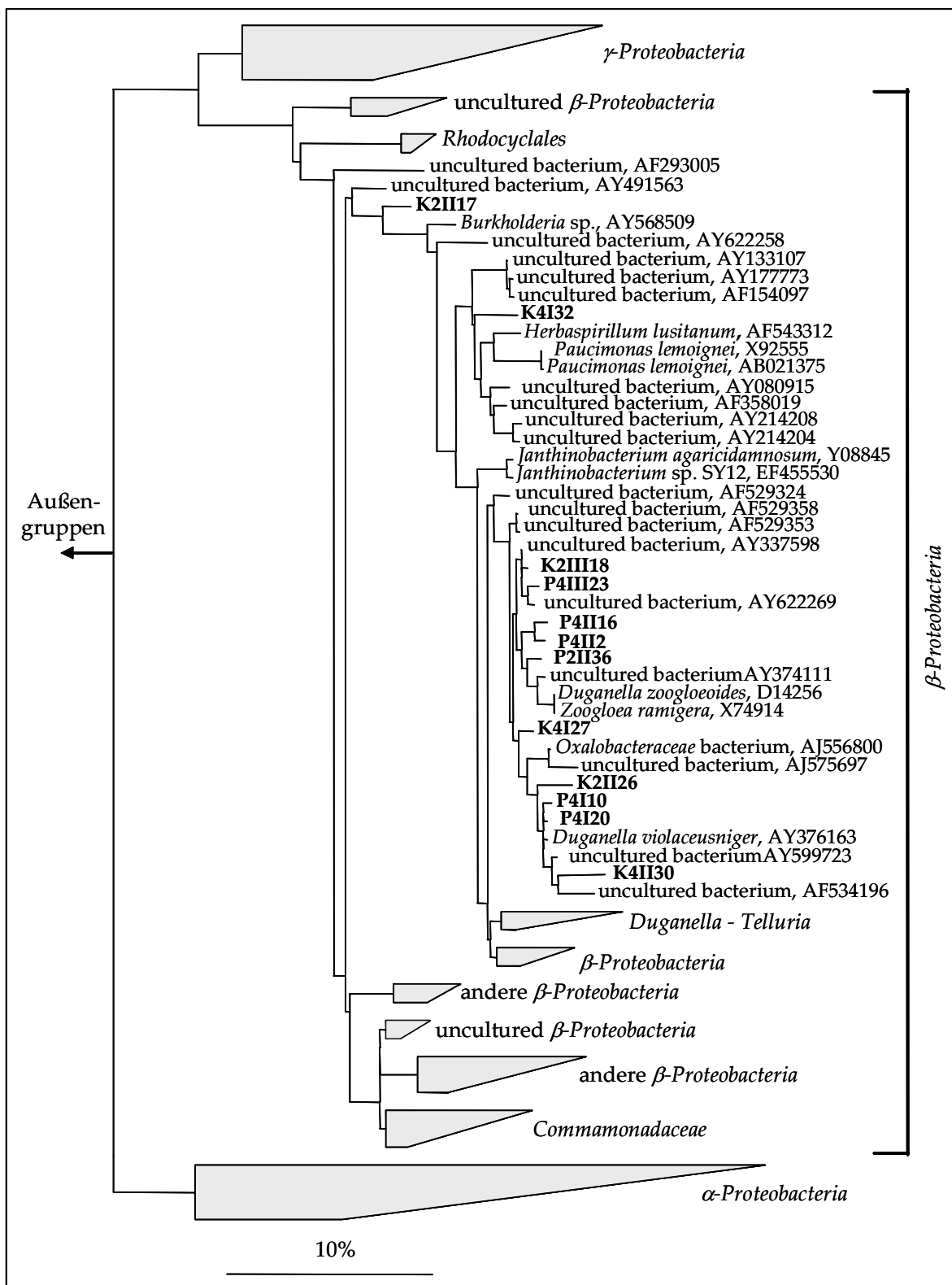


Abb. 7.15: Phylogenetischer Stammbaum der β -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter β -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere β -Proteobacteria-Sequenzen sind in den Abbildungen 7.16, 7.17 und 7.18 zu finden.

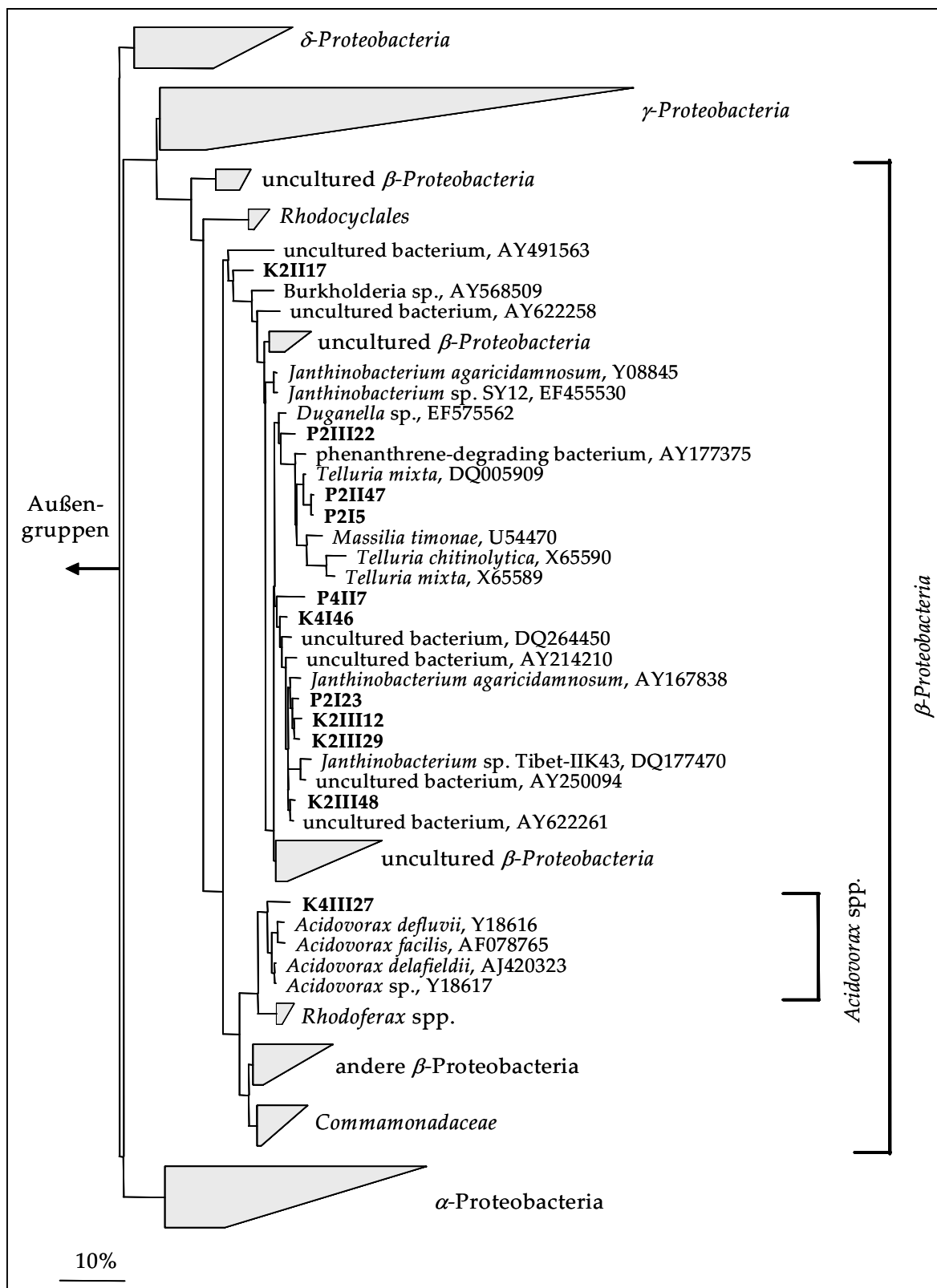


Abb. 7.16: Phylogenetischer Stammbaum der *β-Proteobacteria*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *β-Proteobacteria* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere *β-Proteobacteria*-Sequenzen sind in den Abbildungen 7.15, 7.17 und 7.18 zu finden.

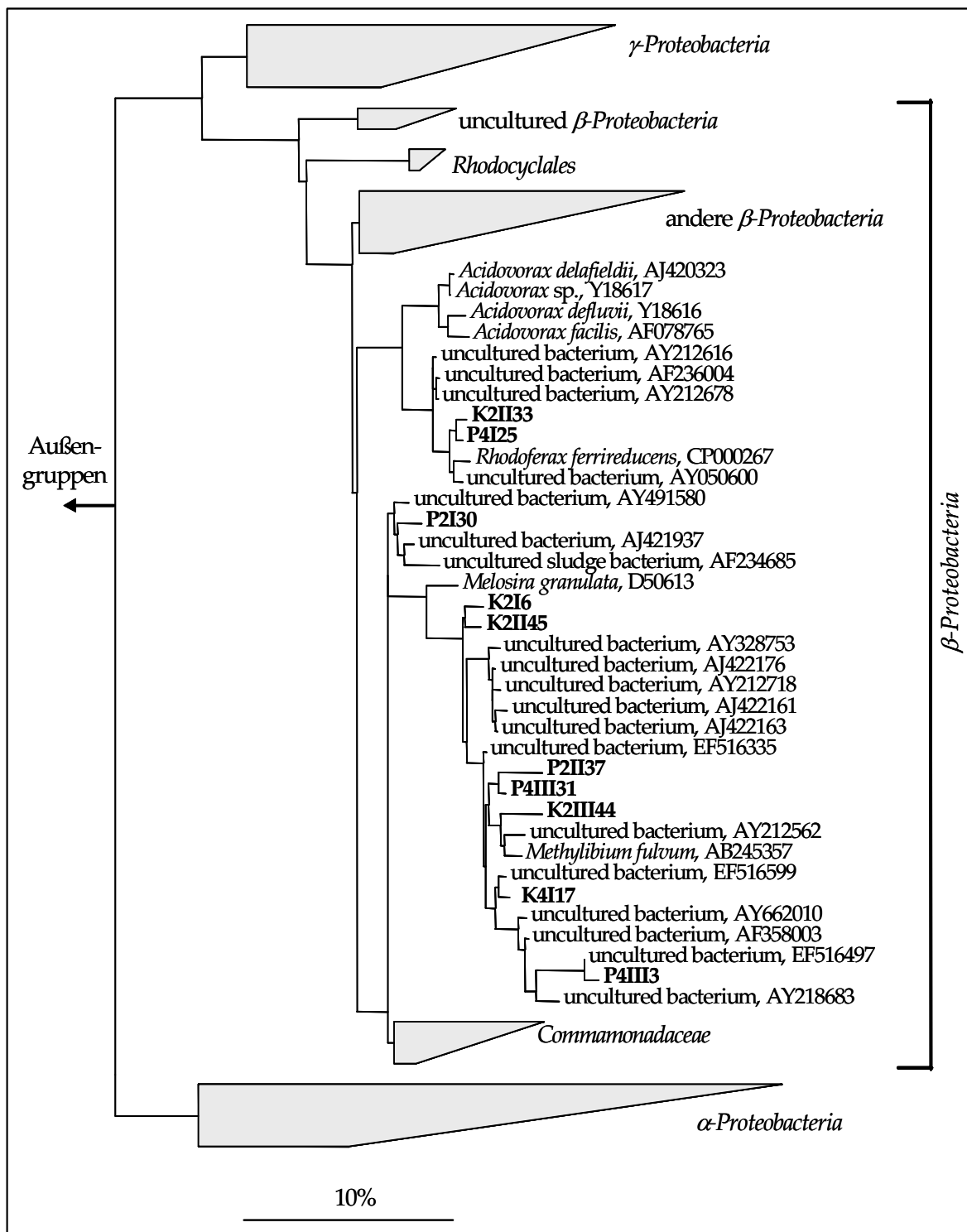


Abb. 7.17: Phylogenetischer Stammbaum der β -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter β -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere β -Proteobacteria-Sequenzen sind in den Abbildungen 7.15, 7.16 und 7.18 zu finden.

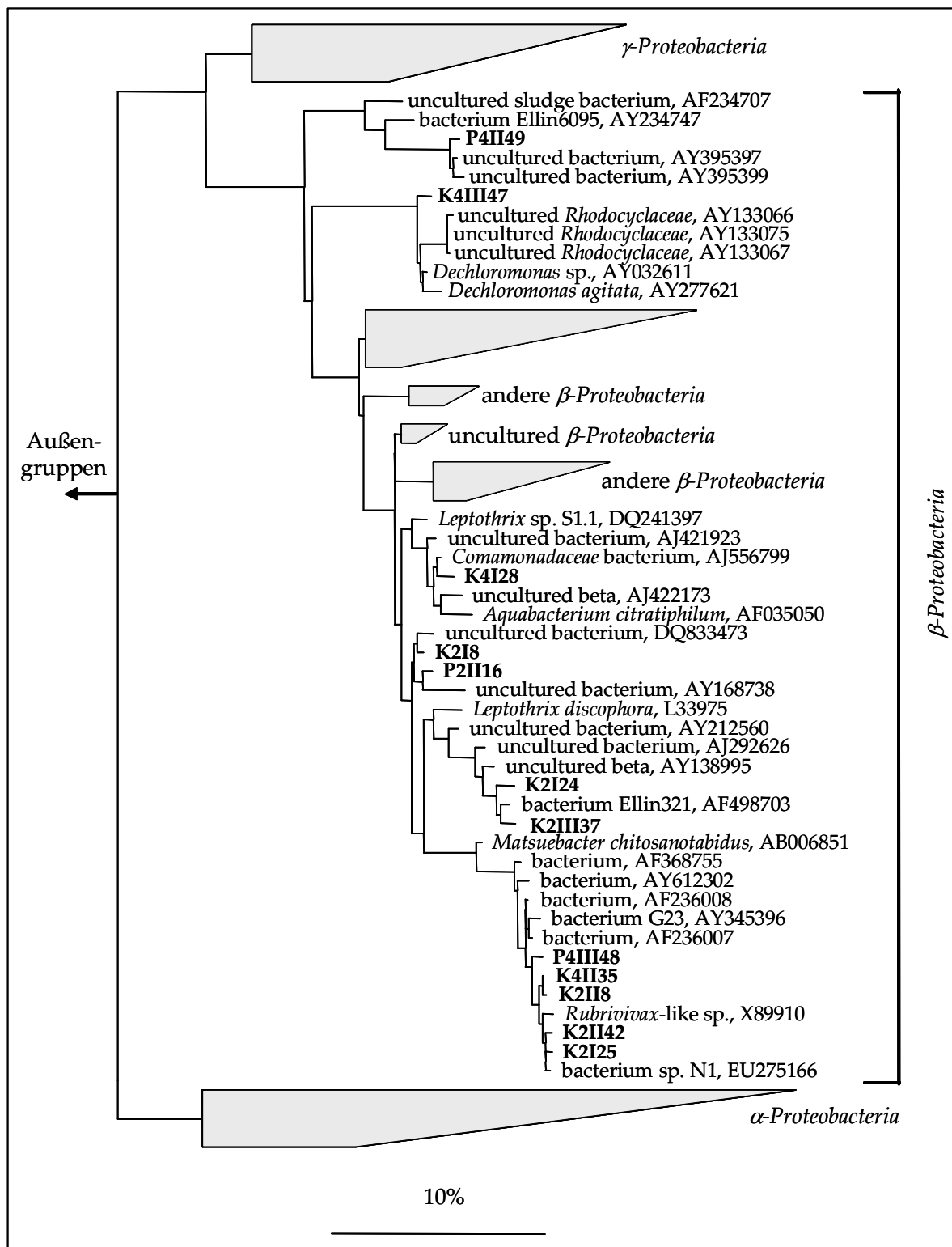


Abb. 7.18: Phylogenetischer Stammbaum der β -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter β -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere β -Proteobacteria-Sequenzen sind in den Abbildungen 7.15, 7.16 und 7.17 zu finden.

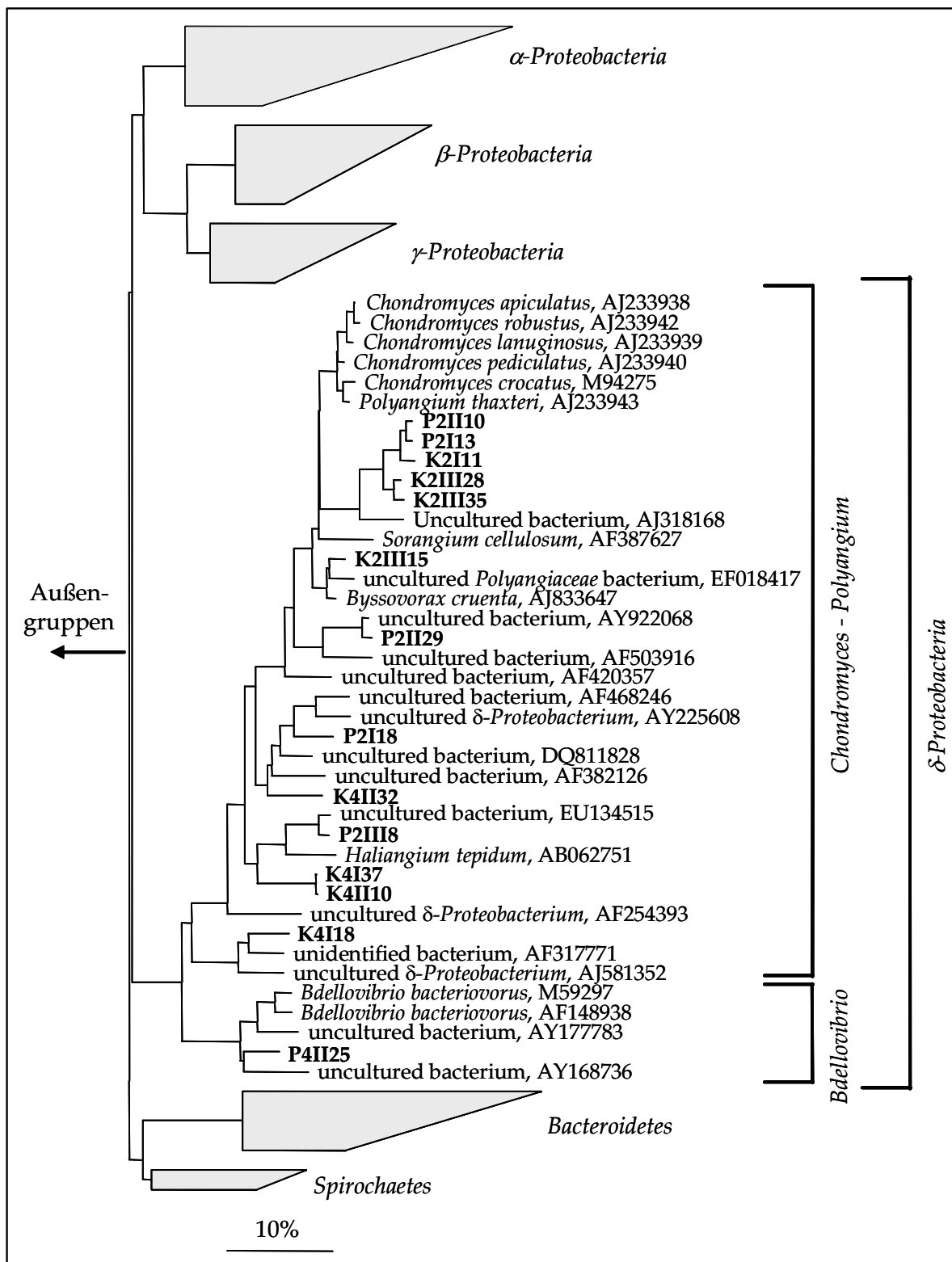


Abb. 7.19: Phylogenetischer Stammbaum der δ -Proteobacteria, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter δ -Proteobacteria zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

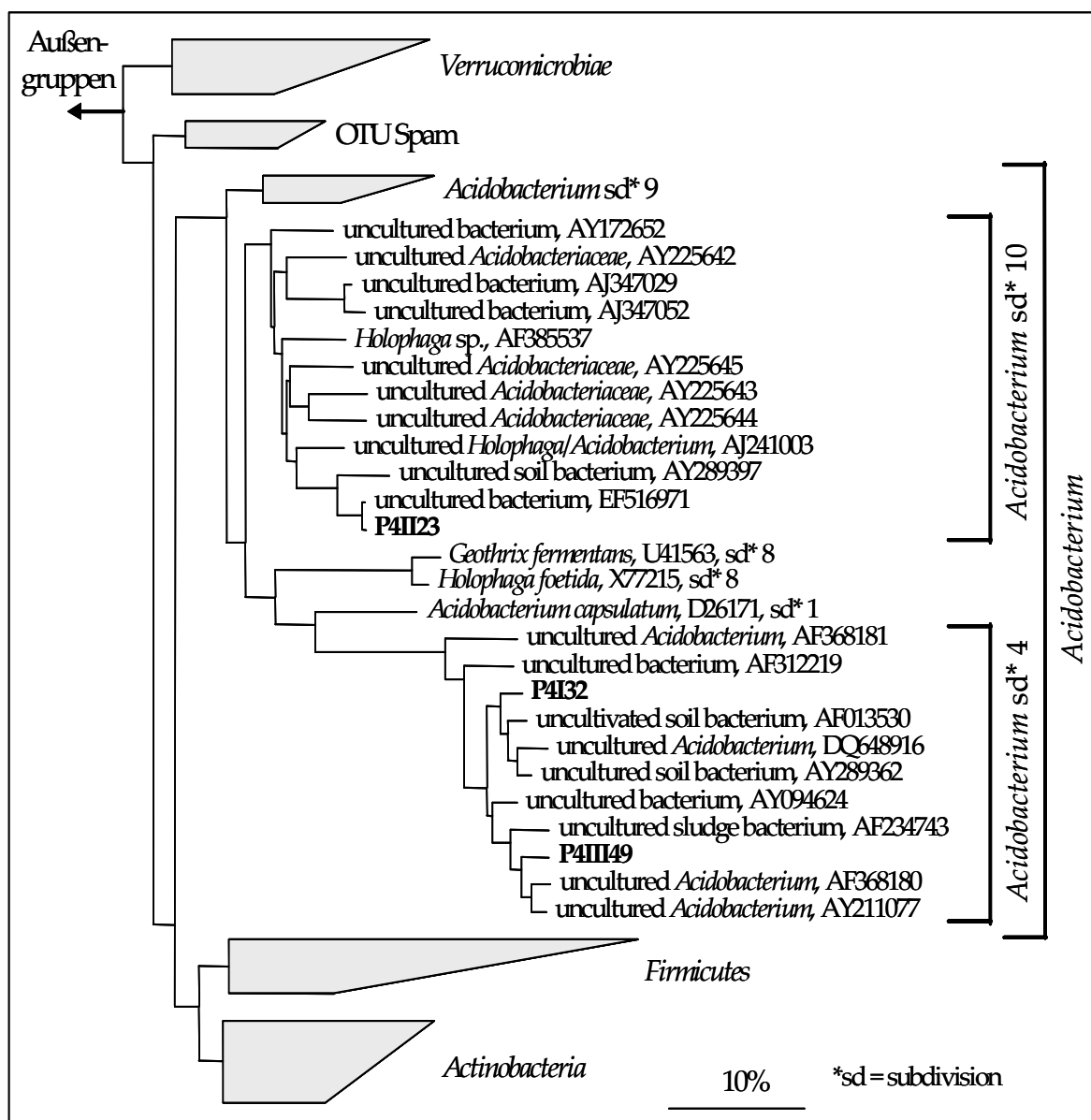


Abb. 7.20: Phylogenetischer Stammbaum der *Acidobacteria*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus der Klonbank P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Acidobacteria* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

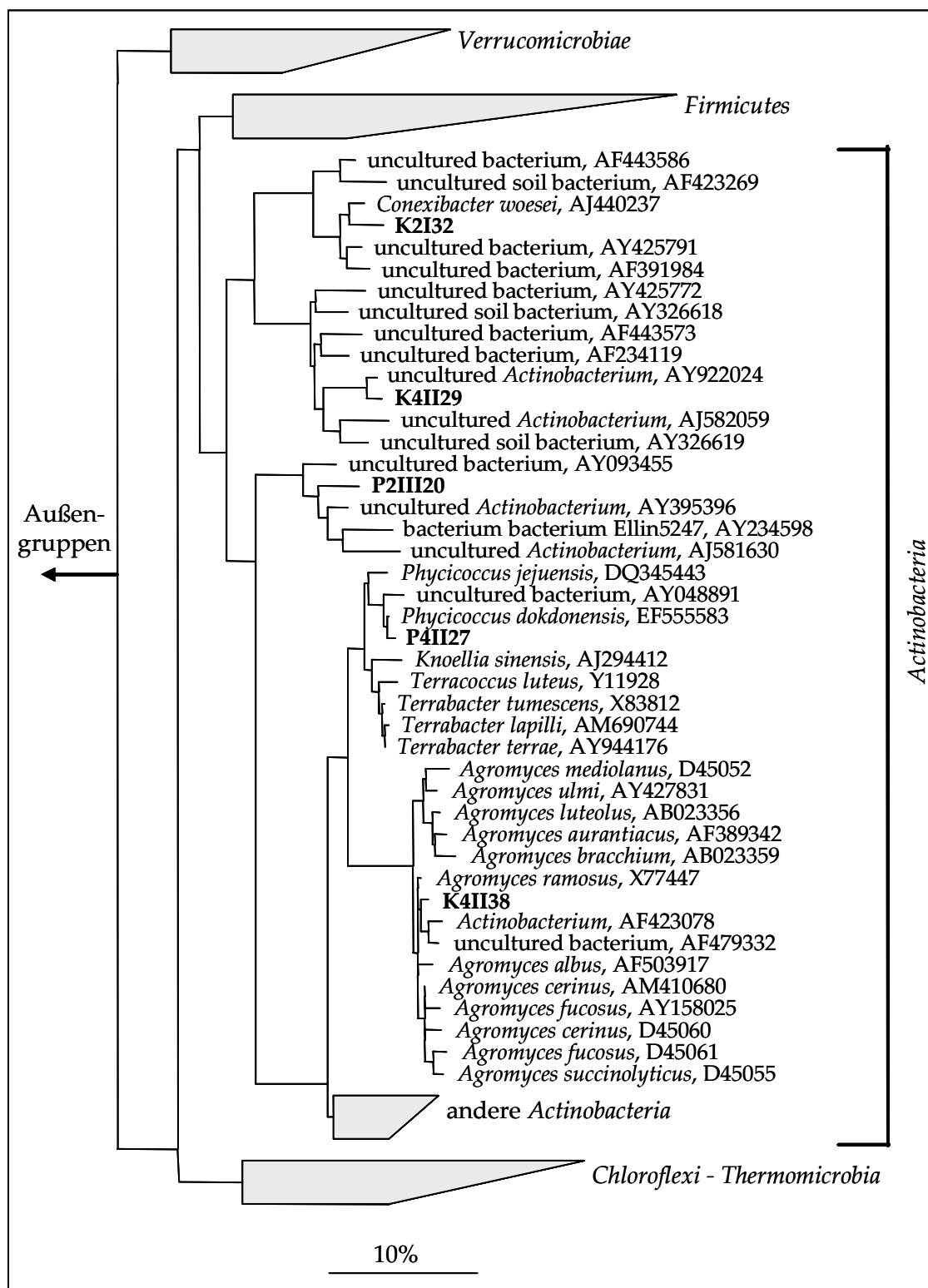


Abb. 7.21: Phylogenetischer Stammbaum der *Actinobacteria*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Actinobacteria* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere *Actinobacteria*-Sequenzen sind in der Abbildung 7.22 zu finden.

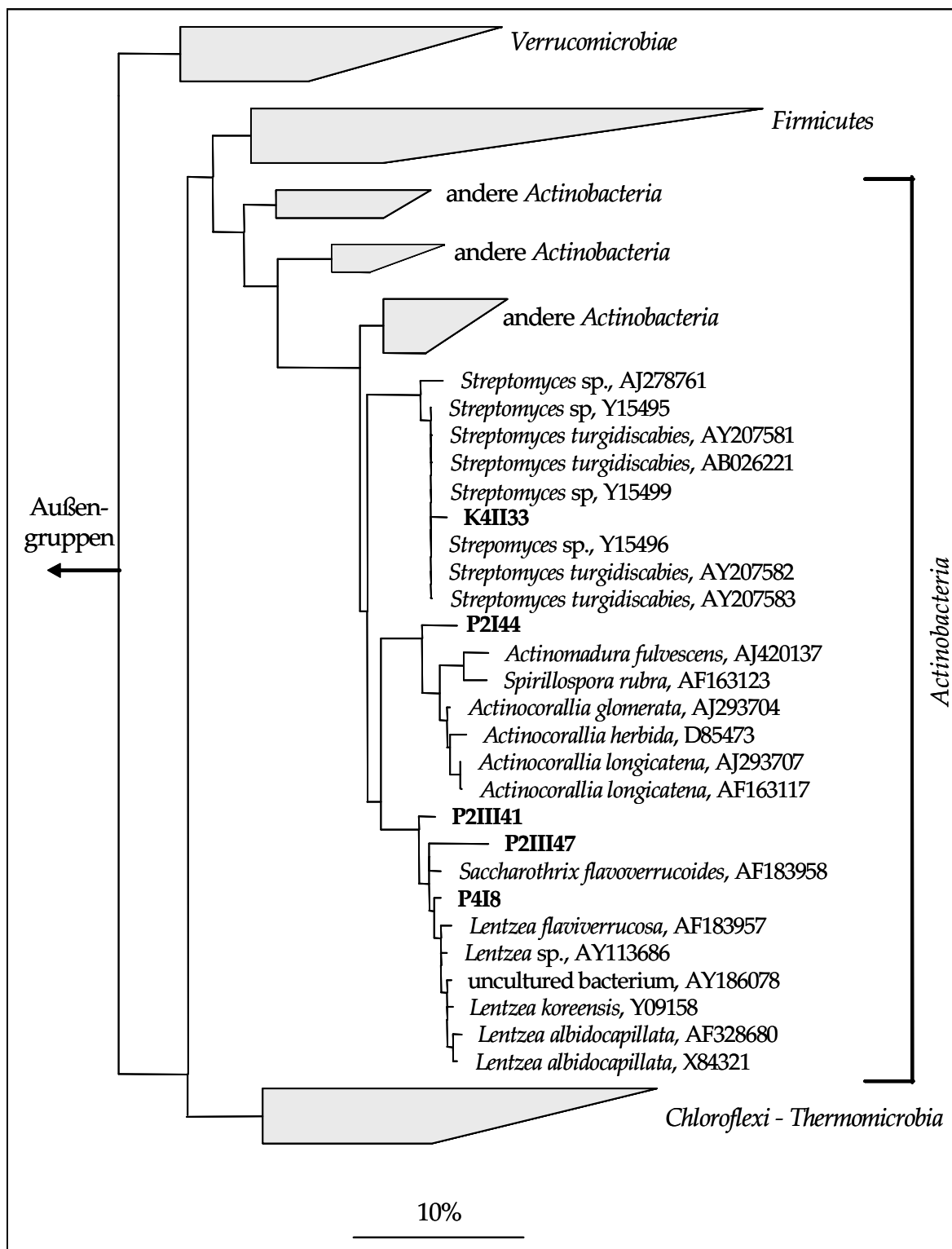


Abb. 7.22: Phylogenetischer Stammbaum der *Actinobacteria*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNA-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNA-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Actinobacteria* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Weitere *Actinobacteria*-Sequenzen sind in der Abbildung 7.21 zu finden.

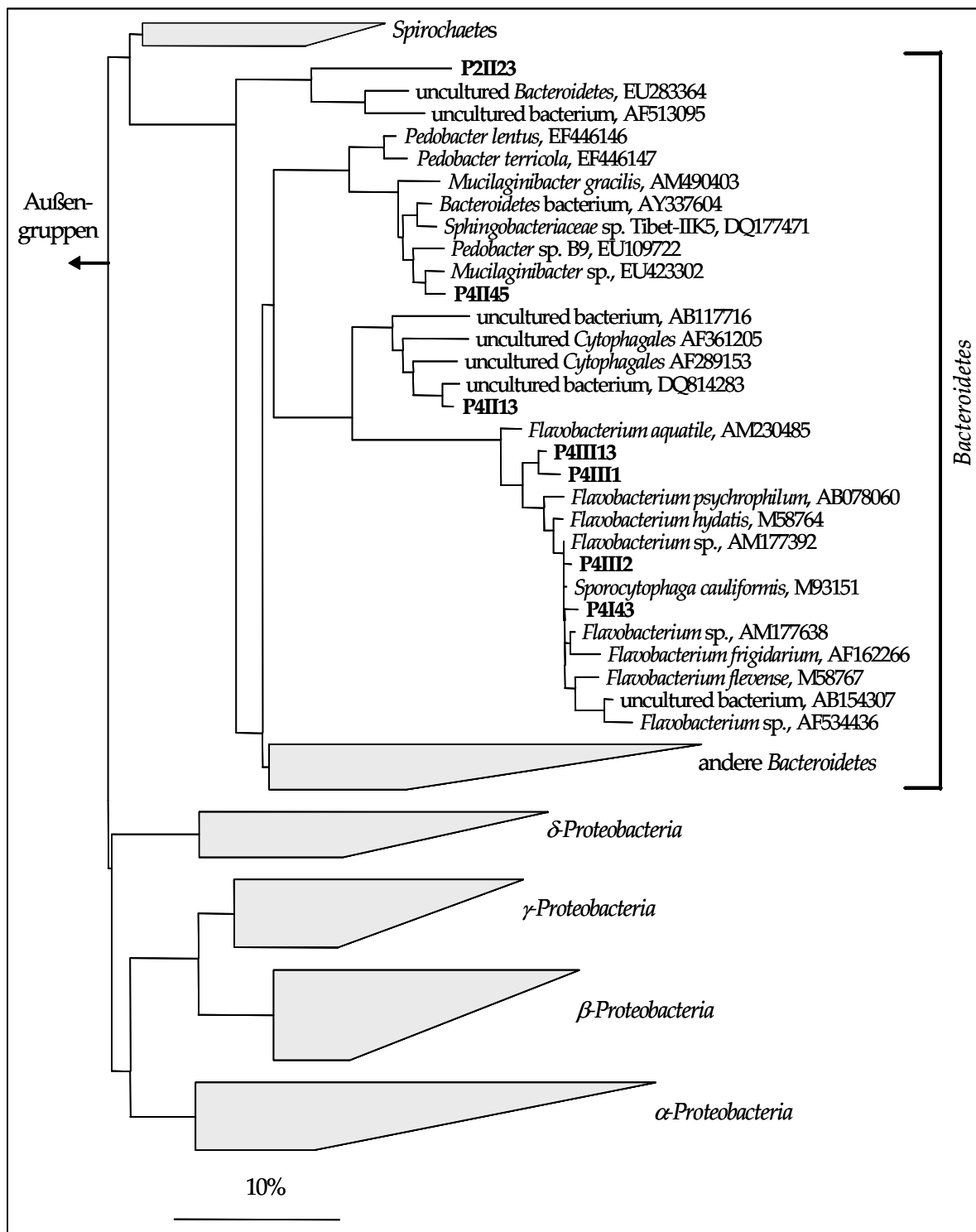


Abb. 7.23: Phylogenetischer Stammbaum der *Bacteroidetes*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken P2 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Bacteroidetes* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an. Weitere *Bacteroidetes*-Sequenzen sind in der Abbildung 7.24 zu finden.

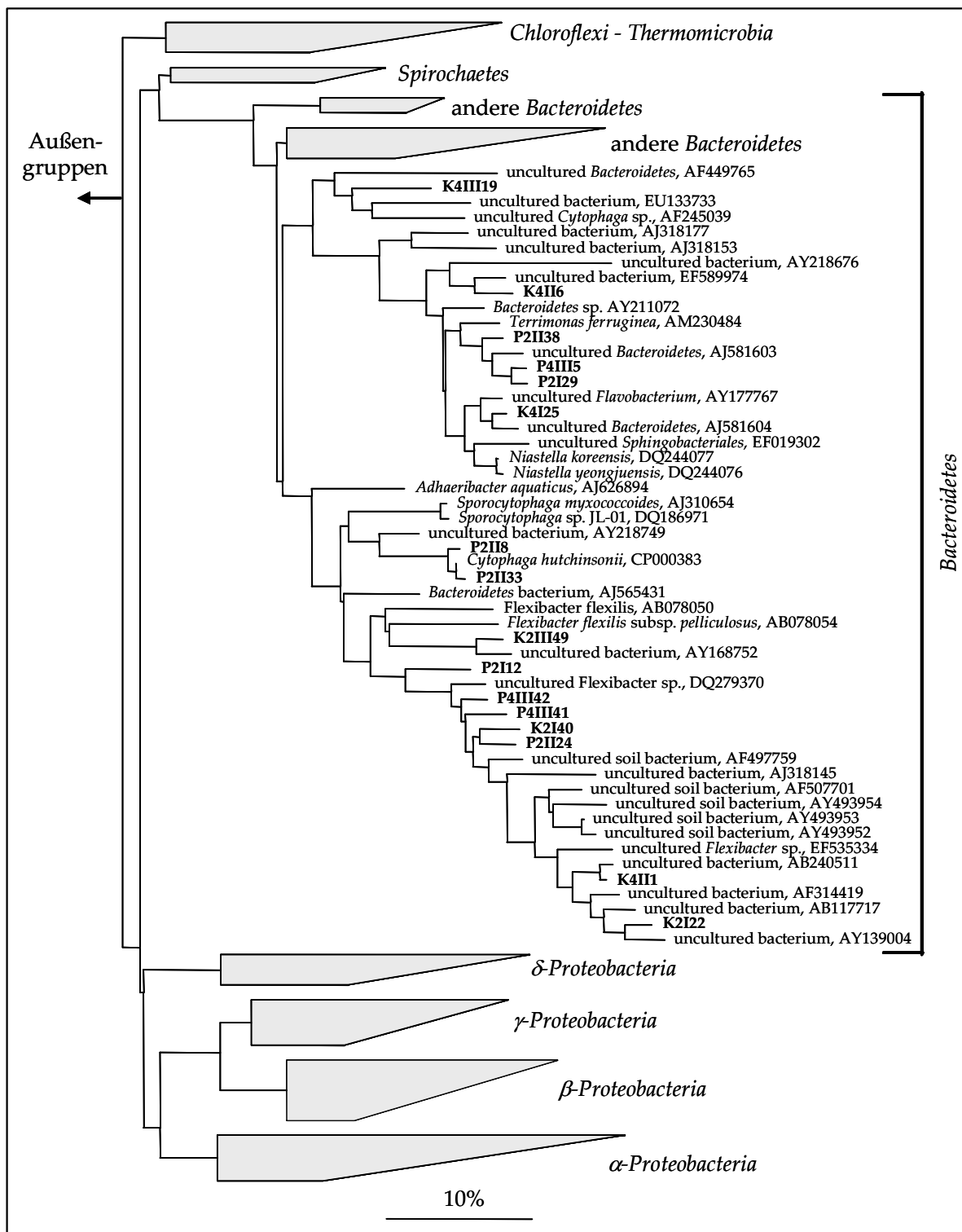


Abb. 7.24: Phylogenetischer Stammbaum der *Bacteroidetes*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Bacteroidetes* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an. Weitere *Bacteroidetes*-Sequenzen sind in der Abbildung 7.23 zu finden.

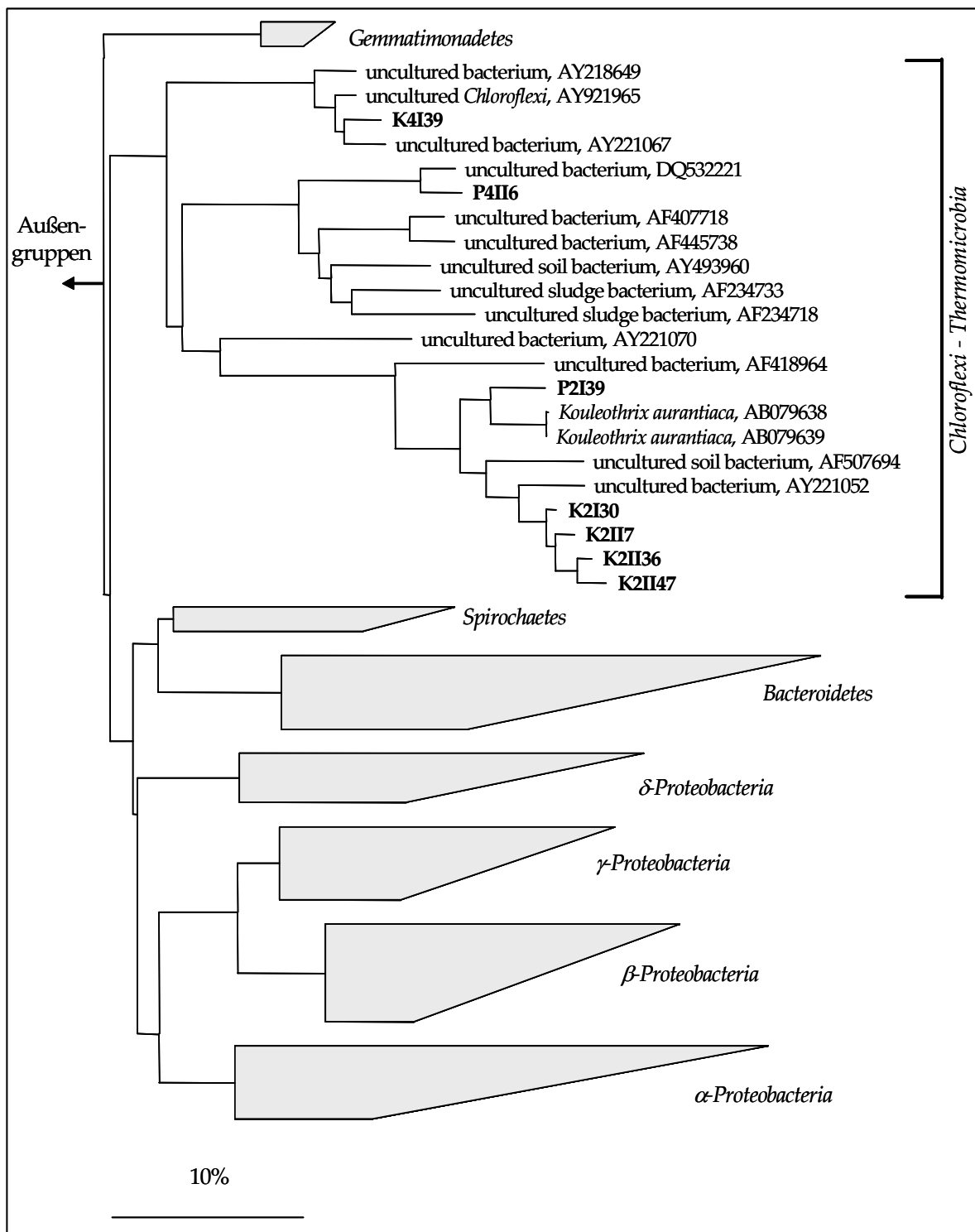


Abb. 7.25: Phylogenetischer Stammbaum der *Chloroflexi-Thermomicrobia*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Chloroflexi-Thermomicrobia* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

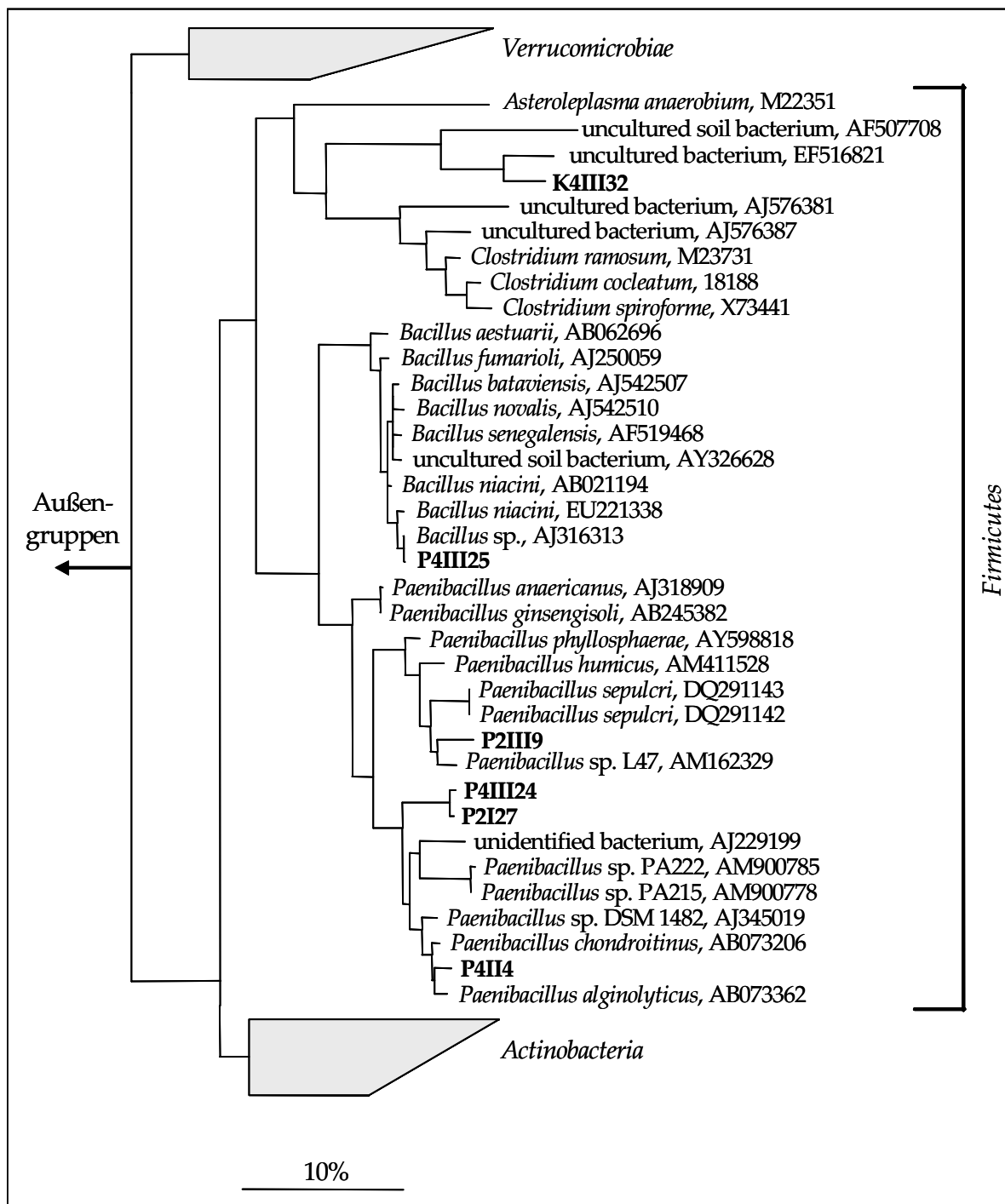


Abb. 7.26: Phylogenetischer Stammbaum der Firmicutes, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken P2, K4 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter Firmicutes zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

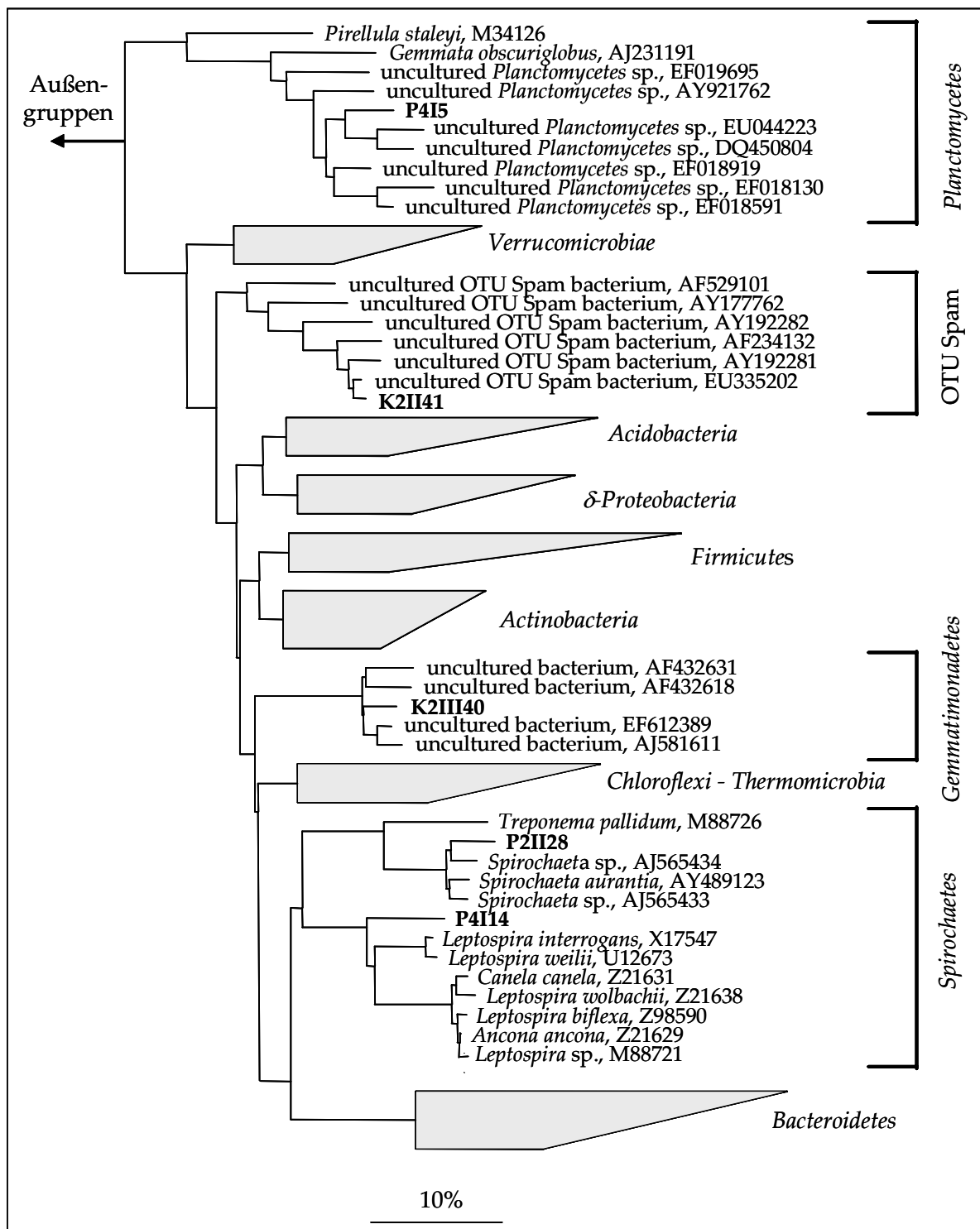


Abb. 7.27: Phylogenetischer Stammbaum der *Planctomycetes*, OTU Spam, *Gemmatimonadetes* und der *Spirochaetes*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2 und P4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter Vertreter dieser Phyla zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

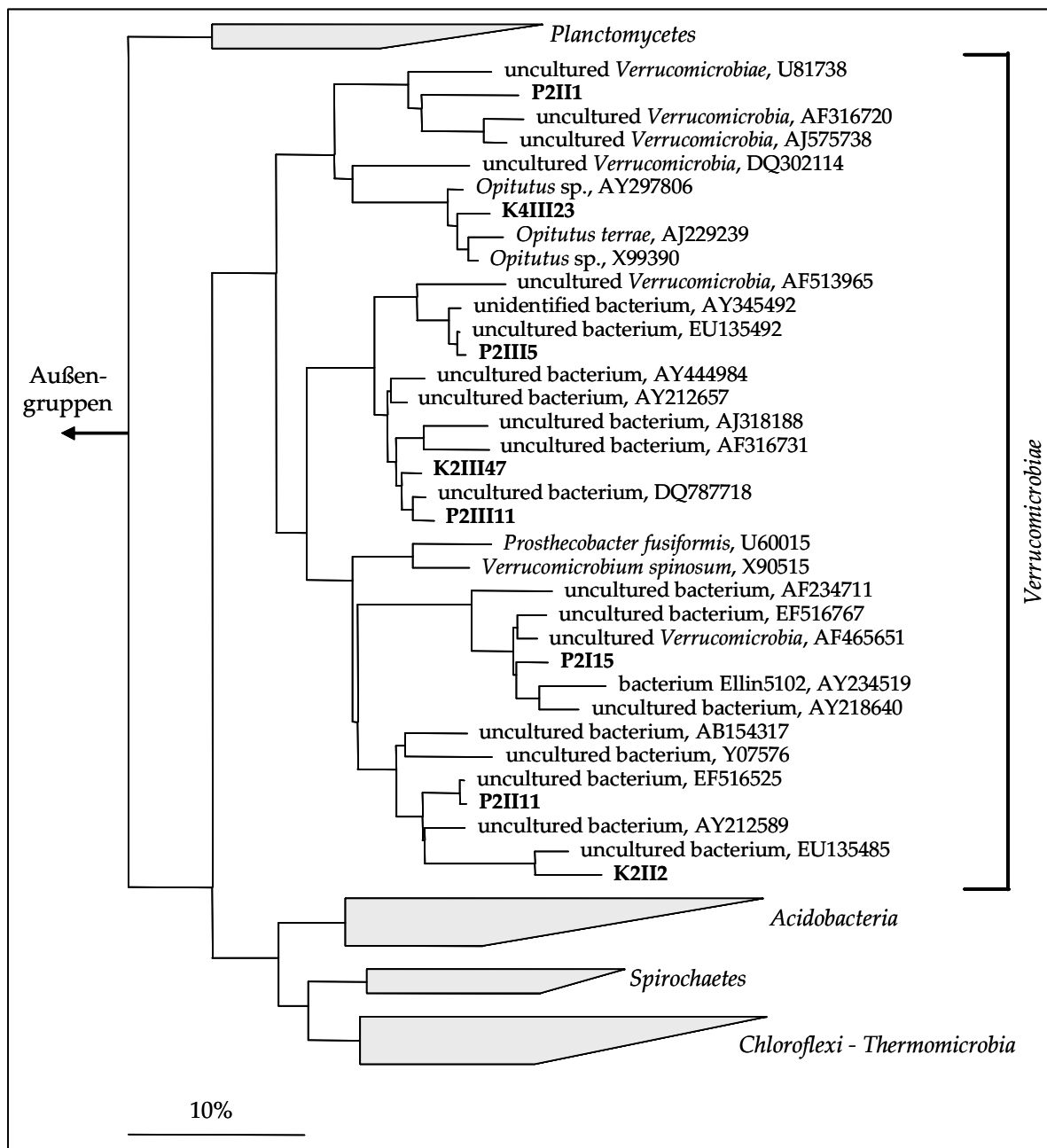


Abb. 7.28: Phylogenetischer Stammbaum der *Verrucomicrobiae*, der die Verwandtschaftsverhältnisse der 16S-rDNS-Sequenzen aus den Klonbanken K2, P2 und K4 zu bereits bekannten 16S-rDNS-Sequenzen unkultivierter und kultivierter *Verrucomicrobiae* zeigt. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen aus den Klonbanken sind fett hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

Publikationsliste

Buddrus-Schiemann, K., Schmid, M., Schreiner, K., Lüders, T. & Hartmann, A. Root colonization by *Pseudomonas fluorescens* (Proradix®) and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. *Microbial Ecology* (in Vorbereitung)

Fröhlich, A.*, Buddrus-Schiemann, K.*, von Rad, U., Schmid, M., Fekete, A., Hartmann, A. & Durner, J. Application of the plant stimulant Proradix® (*Pseudomonas fluorescens*) in barley. *New Phytologist* (in Vorbereitung)

Li, X., Fekete, A., Englmann, M., Götz, C., Rothballer, M., Frommberger, M., Buddrus, K., Fekete, J., Cai, C., Schröder, P., Hartmann, A., Chen, G. & Schmitt-Kopplin, P. (2006): Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **1134** (1-2): 186-193

* Diese Autoren waren gleichermaßen an der Arbeit beteiligt.

Tagungsbeiträge

- 08/2007 International Conference Rhizosphere 2 in Montpellier (Frankreich)
Vortrag: "Application and plant growth promoting effect of a commercially used biological plant stimulant in barley"
- 08/2007 Rhizosphere 2 's satellite international workshop: "Azospirillum VII and related PGPR: Genomics, molecular ecology, plant responses and agronomic significance" in Montpellier (Frankreich)
Poster: "Application and effect of a commercially used biological plant growth stimulant in barley"
- 03/2007 Tagung des Arbeitskreises "Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten" in Graz (Österreich)
Poster: „Application and effect of the plant growth stimulant Proradix® in barley“
- 05/2006 7th PGPR Workshop in Noordwijkerhout (Niederlande)
Poster: "Influence of PGP microbial inocula on the rhizosphere bacterial community in barley"
- 03/2006 Tagung des Arbeitskreises "Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten" in Geisenheim/Rheingau (Deutschland)
Poster: „Inokulation des pflanzenstärkenden Präparats Proradix® bei Gerste“
- 03/2006 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Jena (Deutschland)
Poster: „Influence of a biological plant activator on the rhizosphere microbial community“

Danksagung

Leider lässt sich wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen sehr herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes auch über das Vertragsende hinaus, für seine Hilfsbereitschaft sowie seine Unterstützung, meinen Forschergeist weiter zu entwickeln und sehr frei zu entfalten.

Herrn Prof. Dr. Jörg Overmann für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung und allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Michael Schmid für die großartige Unterstützung, Aufmunterung und Motivation, für die ARB-Hilfe, für viele lustige Stunden auch außerhalb der Arbeit, die Mitfahrgelegenheit in aller Frühe sowie die Einführung in die Geheimnisse der bayrischen Redekunst und Aussprache.

Dr. Michael Rothballer, Tatiana Binder, Doreen Fischer, Andreas Hofmann, Dan Li, Linda Kinzel, Angelika Schulz und Katharina Faber für die überaus freundliche und sehr unkomplizierte Atmosphäre, jede Hilfe und viele nette, offene Gespräche.

Tatiana (Von dir habe ich sehr viel gelernt!), Steffi, Doreen und Andreas ganz besonders für die guten alten Zeiten und den Spaß (Wir werden siegen!, T.: „Da steh ich nun, ich armer Thor und bin so klug als wie zuvor.“).

Allen Ehemaligen insbesondere Dr. Ricardo Yara und Dr. Soumitra Paul Choudhury für den tollen Start und ihre fabelhafte Hilfsbereitschaft, Steffi Rohrer, Andreas Mögele und Dr. Azuka Iwobi für eine schöne Zeit.

Meinen FÖJlern Sofie Brameyer und Marco Fritzsche für ihre tatkräftige Unterstützung.

Christine Götz, Dr. Lyudmila Lyubenova und Tina Riedel für die vielen fröhlichen Gespräche, das herzhafteste, tränenreiche Lachen und die gemeinsamen Busfahrten, mit denen jeder Tag als guter Tag begann.

Dr. Mohammadali Khalvati für die tägliche Motivation während der Endphase meiner Promotion.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Bodenökologie für ihre Freundlichkeit, besonders Dr. Karin Schreiner für die Pilzkulturen, die unkomplizierten Scheyern-Absprachen und die Hilfe bei Canoco sowie Dr. Jürgen Esperschütz, Dr. Felix Häsler und Roland Fuß für nette Gespräche, Aufmunterung und sehr lustige Doktorandenstammtische.

Dr. Andreas Hauser für seine täglichen Kurzbesuche im Stübchen.

Andreas Fröhlich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Gewächshaus- und Freilandversuche und für die gemeinsame Bewältigung aller kleineren und größeren Hürden.

Dr. Tillmann Lüders und Sabine Schäfer für ihre Hilfe und die Beantwortung aller T-RFLP-Fragen.

Dr. Alexandra Hagn, Marion Wenig und Dr. Günther Bahnweg für die Bereitstellung weiterer Pilzkulturen.

Den Mitarbeitern der EUS Dr. Jana Barbro Winkler, Dr. Andreas Albert, Peter Kary, Monika Kugelmann und Dagmar Schneider für die stets schnelle Gewächshausorganisation und wertvolle Ratschläge.

Georg Gerl und seinen fleißigen Mitarbeitern auf dem HMGU-Versuchsgut in Scheyern für die Hilfe bei den Freilandversuchen und unvergessliche Stunden in der praktischen Landwirtschaft.

Johann Dennert und seinen Mitarbeitern des TU-Versuchsgutes in Roggenstein für die Durchführung des Parzellenversuches, die Möglichkeit arbeitserleichternde Geräte zu nutzen sowie die unkomplizierte und freundliche Art.

Dr. Agnes Fekete für die IES-Messung.

Den Mitarbeitern der Firma Sourcon-Padena GmbH & Co. KG für die Bereitstellung von Proradix® und die Saatgutbeizungen.

Meinen Eltern für all ihre Liebe, Fürsorge, Motivation und Unterstützung auf allen Wegen.

Franzi, Susanne und Robert sowie meinen Freunden, die trotz größerer Entfernung immer zu mir gehalten haben, für ihre Treue, ihr Verständnis und ihre Aufrichtigkeit.

Und schließlich meinem größten Glück, meinem lieben Ehemann Matthias dafür, dass du am meisten für mich da bist und in den letzten Jahren stets den Wind für meine Segel gabst.

Die Doktorarbeit ist eine Entdeckungsreise - man lernt viel zum Thema, aber auch sehr viel über die Menschen und über sich selbst!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Katharina Ella Marie Buddrus-Schiemann

Geboren am 17.03.1978 in Prenzlau

Promotion

11/2004 - 08/2008 **Promotion** an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München, Department Biologie 1, Bereich Mikrobiologie; durchgeführt am Helmholtz Zentrum München in Neuherberg (ehemals GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit), Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen unter der Leitung von Prof. Dr. Anton Hartmann, Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Wurzel

Studium

06/2004 **Abschluss: Diplom-Biologin**, Note: 1,5

10/1997 - 06/2004 **Studium der Biologie** an der Humboldt-Universität zu Berlin
Hauptfach: Ökologie
Nebenfächer: Botanik und Molekularbiologie
Diplomarbeit: „Wachstum und Stickstoffhaushalt verschiedener Schilfklone (*Phragmites australis*) nach Anpflanzung auf einer Niedermoorfläche sowie in einem Gefäßversuch mit unterschiedlicher Stickstoffversorgung“

Schulausbildung

06/1997 **Abschluss: Allgemeine Hochschulreife**, Note: 1,4

09/1991 - 06/1997 Städtisches Gymnasium in Prenzlau

09/1984 - 08/1991 Gesamtschule in Dedelow