

Mag.rer.soc.oec. Eveline Adam, BSc

**Screening, Applikation und Mechanismen von
Mikroorganismen und effektverstärkenden Agenzien für
biologische Pflanzenschutzmittel**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Masterstudium Biotechnologie

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuerin

Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Gabriele Berg

Institut für Umweltbiotechnologie

Graz, November 2015

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche, finanzielle und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere Frau Prof. Gabriele Berg und Herrn Dr. Henry Müller für die Möglichkeit, dieses interessante Thema im Rahmen der nun vorliegenden Arbeit zu studieren, sowie für ihre mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung. Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Umweltbiotechnologie für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau Dr. Anastasia Bragina für ihre Unterstützung bei allen Fragen zur konfokalen Laser Scanning Mikroskopie und bei Kollegin Kathrin Hölzl für ihre Mitarbeit bei den letzten Versuchen.

Die Masterarbeit wurde im Rahmen des Bridge-Projektes „Ernährung und Stressschutz von Pflanzen durch Mikroorganismen: Neue Verfahren für die Saatgut- und Wurzelbehandlung“ erstellt, welches durch die Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft mbH (FFG) und die Biotenz GmbH finanziell unterstützt wurde.

Ein besonderer Dank gilt ebenso meinem Arbeitgeber, der Saatzucht Gleisdorf GmbH, insbesondere Frau DI Johanna Winkler und ihrem gesamten Team, die mir die für das Studium nötige Flexibilität gewährt und mich außerdem mit fachlichen Inputs zum Thema Kürbis und der Bereitstellung von Saatgut unterstützt haben.

Meinen Eltern Gottfried und Franziska Adam, meinen Geschwistern Siegfried und Sabine, meiner Freundin Denise Atzmüller und besonders meinem Lebensgefährten Philipp Kipperer danke ich für ihre persönliche Unterstützung und der mir entgegengebrachten Nachsichtigkeit während meiner gesamten Studienzeit.

Kurzfassung

Bis zur Marktreife eines biologischen Pflanzenschutzmittels müssen die Schritte des mehrphasigen Entwicklungsprozesses zum Teil wiederholt durchlaufen werden. Die Arbeit befasste sich daher mit dem Screening, der Applikation und der Analyse von Mechanismen von Mikroorganismen und effektverstärkenden Agenzien für biologische Pflanzenschutzmittel mit dem Ziel, die aussichtsreichen Resultate aus *in vitro*- und Gewächshausversuchen auch in der landwirtschaftlichen Praxis umsetzen zu können. Um die Hypothese zu überprüfen, dass Konsortien von Mikroorganismen unter natürlichen Bedingungen am Feld zu besseren Resultaten führen als Behandlungen mit Einzelisolaten, wurden diverse Standard-Experimente in sterilen Keimfiltern und unter Gewächshausbedingungen mit Mischkulturen von Mikroorganismen durchgeführt. Parallel dazu wurden konventionelle Dualkulturplattentest für die Testung von Mischbehandlungen erweitert und Transportversuche mit Pilzen, deren Hyphen als Vektor für Bakterien dienen sollten, angelegt. Für diese Versuche wurden einige der Stämme mit rhizosphärenstabilen Plasmiden transformiert, welche für eine Antibiotikaresistenz und ein Fluoreszenzprotein codieren. Mit deren Hilfe konnte eine Besiedelung an den Pflanzen beziehungsweise an den Pilzhyphen unter anderem mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert und aussagekräftige Daten aus Reisolationen von den Pflanzen gewonnen werden. Weiters wurden die Genome der *Serratia plymuthica* Stämme 3Rp8 und 3Re4-18 sequenziert, für die Veröffentlichung in NCBI vorbereitet und zusammen mit zwei weiteren, in den Experimenten verwendeten, bereits veröffentlichten Sequenzen von *S. plymuthica* Stämmen *in silico* analysiert. Für die zwei *S. plymuthica* Stämme 3Rp8 und S13, welche die besten Ergebnisse an den Pflanzen zeigten, konnte eine starke Besiedelung an den Wurzeln und auch an den Blättern von Ölkürbis-Pflanzen mit mehreren unabhängigen Methoden nachgewiesen werden. Durch Nutzung des *Trichoderma velutinum* Isolates G1/8 als Vektor konnte ein Transport der beiden Stämme über bis zu 5 mm breite Luftspalten nachgewiesen werden. Es wurde weiters gezeigt, dass G1/8 zusätzlich auch die Fähigkeit besitzt, die pilzlichen Pathogene *Didymella bryoniae* GL1 und A220-2b stark im Wachstum zu hemmen und zu parasitieren. In den Genomen von 3Rp8 und 3Re4-18 wurden mehrere für Biokontrollfunktionen bekannte Gene identifiziert und weiters genomische Inseln mit bislang schlecht charakterisierten Genen detektiert, welche sich für die stark unterschiedlichen Effekte der *S. plymuthica* Isolate auf die Pflanzen verantwortlich zeichnen könnten. Aufgrund der Ergebnisse wird als Konzept für die Applikation eines mikrobiellen Konsortiums an den Steirischen Ölkürbis eine Pelletierung des Saatgutes vorgeschlagen, in welcher jene Mikroorganismen, die sich gegenseitig behindern, jeweils in einer eigenen Nische verpackt und in welche auch spezifische Additive hinzugefügt werden können. Damit sollte das große Potential von biologischen Pflanzenschutzmitteln zukünftig besser in die Praxis übertragen werden können.

Abstract

Multiphasic process steps have to be conducted repeatedly till launching a biological plant protecting product on the market. Accordingly, a screening, application tests and an analysis of the mechanisms of microorganisms and effect reinforcing agents for biological plant protecting products were conducted in this thesis with the aim to transfer the promising results of *in vitro* and greenhouse trials to the conditions of agricultural practice. To prove the hypothesis that consortia of microorganisms could lead to better results under field conditions than a treatment with a single strain, several standardized experiments were performed in sterile germination filter assays as well as under greenhouse conditions with mixed cultures of microorganisms. In parallel, conventional dual culture plate assays were extended for the testing of mixed cultures. Transport experiments with fungi whose hyphae should serve as a vector for bacteria were designed. For those experiments, some of the strains were transformed with rhizosphere stable plasmids coding for an antibiotic resistance and a fluorescent protein. This facilitated the analysis of the colonization on the plants or on the fungal hyphae, which was shown by using confocal laser scanning microscopy and other methods for the detection of fluorescence signals, as well as obtaining reliable data from re-isolations of the strains from the plants. In addition, the genomes of the *Serratia plymuthica* strains 3Rp8 and 3Re4-18 were sequenced, and prepared for publication in NCBI. They were analyzed *in silico* together with another two *S. plymuthica* strains used in the experiments with sequences already published. For the two *S. plymuthica* strains 3Rp8 and S13 showing the best results on the plants a strong colonization of the roots and leaves of oil pumpkin plants could be detected with several independent methods. By using the *Trichoderma velutinum* isolate G1/8 as a transport vector a transfer of bacterial strains across air gaps up to 5 mm wide could be detected. It was further shown that G1/8 has the additional ability to inhibit the growth of the fungal pathogens *Didymella bryoniae* GL1 and A220-2b and to parasitize their mycelia. Within the genomes of 3Rp8 and 3Re4-18 several genes known to express biocontrol functions were identified. Genomic islands including poorly characterized genes were detected that could be responsible for the varying effects of the different *S. plymuthica* isolates on the plants. Based on the results of the study, a concept for the application of a microbial consortium to the seeds of the Styrian oil pumpkin is proposed including a seed pelleting where the microorganisms that interfere with each other are packaged in their own niche and supplemented with specific additives. By applying tailored treatments the great potential of biological plant protecting products might be better transferred into practice in the future.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Material und Methoden.....	7
2.1	Verwendete Kulturpflanzen und Substrate.....	7
2.2	Applikation der Mikroorganismen	8
2.3	Molekulare Charakterisierung und Fluoreszenzmarkierung bakterieller Isolate.....	10
2.3.1	Box A1R Fingerprint.....	11
2.3.2	16S rDNA-Sequenzierung der Stämme <i>Serratia sp.</i> 3Rp5 und 3Rp8.....	14
2.3.3	Transformation verschiedener <i>Serratia</i> Stämme mit pIN69-Plasmiden	16
2.3.3.1	Klonierung des Gens für ZsYellow in pIN69.....	16
2.3.3.2	Aufreinigung der pIN69-Vektoren aus <i>E. coli</i> 5 α -Zellen	20
2.3.3.3	Herstellung elektrokompenter <i>S. plymuthica</i> Zellen	21
2.3.3.4	Transformation von Umweltstämmen mit pIN69-Plasmiden	22
2.3.3.5	Herstellung von Gefrierkonserven	23
2.3.4	Aussaat und Kultivierung der Pflanzen.....	23
2.3.4.1	Experimente in Töpfen	24
2.3.4.2	Experimente in Keimfiltern.....	24
2.3.4.3	Experimente mit Mikronährstoffen in Pflanzenagar-Platten.....	25
2.3.4.4	Sterilitätskontrolle und Reisolierung der applizierten <i>Serratia</i> -Stämme	26
2.3.4.5	Alternative Testmethoden	26
2.3.5	Übersicht Versuche	27
2.4	Screening pilzlicher Isolate und Transportversuche	28
2.4.1	Dualkulturplattentests in Standard-Petrischalen	29
2.4.2	Dualkulturplattentests in Zwei- und Drei-Kompartiment Petrischalen	32
2.5	Equipment zur Analyse von Fluoreszenz-Signalen	33
2.5.1	Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System mit Universal Hood III	33
2.5.2	Motic AE31 Mikroskop	34
2.5.3	Konfokales Laser Scanning Mikroskop Leica DM5500Q.....	34
2.5.4	Zusammenfassung der Möglichkeiten zur Fluoreszenzüberprüfung	39

2.6	Sequenzierung, Annotierung und <i>in silico</i> Analyse der <i>Serratia plymuthica</i> Stämme	40
2.6.1	NCBI Annotation und Veröffentlichung.....	40
2.6.2	BASys Annotation	41
2.6.3	Vergleichende Genomanalyse.....	42
2.6.3.1	Phylogenetische Analysen.....	42
2.6.3.2	Multiples Genom-Alignment mit Mauve.....	43
2.6.3.3	Vergleich der orthologen Gruppen mit OrthoMCL DB.....	43
2.6.3.4	Darstellung und Berechnung von Venn-Diagrammen.....	44
2.6.3.5	Analyse genomischer Inseln mit IslandViewer 3.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Molekulare Methoden	45
3.1.1	Box-A1-Fingerprint	45
3.1.2	16S rDNA-Sequenzierung der Stämme <i>Serratia plymuthica</i> 3Rp5 und 3Rp8	47
3.1.3	Klonierung des Gens für ZsYellow in pIN69.....	51
3.1.4	Transformationen der <i>Serratia plymuthica</i> Stämme.....	54
3.2	Effekt bakterieller Isolate auf die Pflanzen	58
3.2.1	cfu/ml in Übernachtskulturen und bei Applikation	58
3.2.2	Topfexperimente zur Analyse des Auflaufs und Gewichts der oberirdischen Pflanzenteile	60
3.2.2.1	Effekte auf den Steirischen Ölkürbis	60
3.2.2.2	Effekte auf Maispflanzen.....	68
3.2.2.3	Effekte auf Tomatenpflanzen	70
3.2.2.4	Zusammenfassung der Versuche im Gewächshaus	72
3.2.3	Alternative Testmethoden in Erde	75
3.2.4	Experimente mit transformierten Stämmen in Keimfiltern	76
3.2.5	Experimente mit Wurzeltauchbad	86
3.2.6	Experimente mit Mikronährstoffen in Pflanzenagar.....	87
3.2.7	Sterilitätskontrolle der Samen, Besiedelung und Reisolierung vom Samen	88
3.3	Transportversuche mit Pilzen als Vektor.....	90

3.3.1	Dualkulturplattentests in Standard-Petrischalen	90
3.3.2	Dualkulturplattentests in Zwei- und Drei-Kompartiment Petrischalen	103
3.4	<i>In situ</i> Visualisierung.....	109
3.4.1	Mikroskopie der Kürbis-Samen, Wurzeln und Blätter.....	109
3.4.2	Mikroskopie der Transportversuche	117
3.5	<i>In silico</i> Analyse der <i>Serratia plymuthica</i> Stämme	120
3.5.1.1	NCBI Veröffentlichung und Annotationen	120
3.5.1.2	Blastn Alignments.....	124
3.5.1.3	BASys Annotationen und Darstellung	125
3.5.1.4	Phylogenetische Analysen.....	126
3.5.1.4.1	Analysen der 16S rDNA	126
3.5.1.4.2	Analyse des <i>gyrB</i> -Gens	128
3.5.1.4.3	Vergleich der Gesamtgenom Proteindaten mit CVTree3.....	129
3.5.1.5	Multiples Genom-Alignment mit Mauve.....	129
3.5.1.6	Vergleich der orthologen Gruppen mit OrthoMCL DB.....	132
3.5.1.7	Analyse genomischer Inseln mit IslandViewer 3	136
4	Diskussion.....	140
5	Abkürzungsverzeichnis	145
6	Literaturverzeichnis.....	146
7	Anhang.....	151
7.1	Verwendete DNA-Leitern	151
7.2	Poster zur Arbeit.....	151

1 Einleitung

Unter Pflanzenschutz wird die Gesamtheit der Bemühungen verstanden, Schäden und Leistungsminderungen von Nutzpflanzen durch Ausnutzung aller einschlägigen wissenschaftlichen Erkenntnisse in einer ökologisch und ökonomisch angemessenen Weise zu verhindern oder zu mildern (Heitefuss, 2000). Durch die langfristige Belastung der Böden durch intensive konventionelle Landwirtschaft, dem Klimawandel und dem Streben nach Ertragsmaximierung in der landwirtschaftlichen Produktion steigen auch die Anforderungen an den Pflanzenschutz stetig. Gleichzeitig gewinnt die ökologische Landwirtschaft eine immer größere Bedeutung, da ebenso der Wunsch nach Produkten aus nachhaltigem Anbau zunimmt.

Anhang I der EU-VERORDNUNG 2092/91 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel sieht vor, dass Schädlinge, Krankheiten und Unkräuter durch die ganzheitliche Anwendung verschiedener Maßnahmen wie geeignete Arten- und Sortenwahl; geeignete Fruchtfolge; mechanische Bodenbearbeitung; Schutz von Nützlingen durch Schaffung günstiger Verhältnisse (z. B. Hecken, Nistplätze, Aussetzung von natürlichen Gegenspielern) sowie das Abflammen von Unkrautkeimlingen bekämpft werden müssen (Verordnung (EWG) Nr. 2092/91, 1991). Zur Verbesserung des Gesamtzustandes des Bodens oder der Nährstoffverfügbarkeit im Boden oder in den Kulturen können geeignete Zubereitungen aus Mikroorganismen verwendet werden (Verordnung (EG) Nr. 889/2008, 2008).

Die Eindämmung pflanzenpathogener Mikroorganismen mit Hilfe antagonistischer beziehungsweise biokontrollaktiver Mikroorganismen wird als Biokontrolle bezeichnet. Die Wirkung beruht auf unterschiedlichsten Mechanismen wie zum Beispiel Antibiose, Konkurrenz, Lyse oder Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft. Weitere Einsatzmöglichkeiten von nützlichen Mikroorganismen betreffen die Bereiche der Pflanzenwachstumsförderung beziehungsweise der Verbesserung der Pflanzengesundheit, wobei hier als Mechanismen eine verbesserte Stresstoleranz, induzierte Resistenz, hormonelle Stimulation oder verbesserte Nährstoffaufnahme in Frage kommen (Berg, 2009). Die Wirkmechanismen unterscheiden sich deutlich in ihrer Komplexität und reichen von (i) der Inhibierung eines Pathogens durch antimikrobielle Stoffe (Antibiotika, flüchtige organische Substanzen, Toxine und oberflächenaktive Stoffe), (ii) Parasitismus durch die Produktion extrazellulärer Zellwand-abbauender Enzyme (zum Beispiel Chitinasen und β -1,3 Glukanasen) über (iii) die Konkurrenz um Eisen durch die Produktion von Siderophoren, (iv) Konkurrenz um Nischen für die Kolonisierung, (v) Konkurrenz um Nährstoffe bis zum (vi) Abbau von Pathogenitätsfaktoren des Erregers. Häufig werden mehrere unterschiedliche Wirkmechanismen durch einen einzigen Biokontroll-Stamm ausgeprägt, welche in Kombination zu einer Unterdrückung von verschiedenen Pflanzen-Pathogenen führen können (Whipps, 2000).

Einleitung

Trotz zunehmender Forschungsarbeit im Bereich des biologischen Pflanzenschutzes, erzielen biologische Pflanzenschutzmittel nach wie vor nicht dieselben reproduzierbaren Ergebnisse wie chemische oder synthetische Pflanzenschutzmittel und schwanken zudem, abhängig von den jeweiligen Umweltbedingungen, in ihrer Wirkungseffizienz. Grosch *et al.* zeigten in einer 2006 veröffentlichten Studie über die Wirkung pilzlicher Antagonisten, dass der Einfluss einer Behandlung auf das Gesamt-Mikrobiom der Pflanze ebenso wie die eigentlich beabsichtigte Wirkung auf das Zielpathogen berücksichtigt werden müsse. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Pathogen selbst sowie die Vegetationszeit einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms hatten als die Biokontroll-Behandlung (Grosch, *et al.*, 2006). Werden Biokontrollstämme in ihre neue Umgebung freigesetzt, treffen diese auf ein komplexes indigenes Mikrobiom, das bereits alle verfügbaren Nischen besetzt. Des Weiteren ist auch die abiotische Umwelt komplex und schwankt stark zwischen unterschiedlichen Regionen oder gar Feldabschnitten.

Um die Etablierung eines neuen Mikroorganismus in der Umwelt zu fördern, kann das bestehende Mikrobiom kurzfristig gestört oder die Umwelt in Bezug auf die Bedürfnisse des neuen Organismus verbessert werden. Beide Methoden haben das Ziel, eine Nische für die Kolonisierung freizumachen beziehungsweise eine neue Nische bereitzustellen. In der landwirtschaftlichen Praxis sind regelmäßige Störungen des Bodenmikrobioms gängig, zum Beispiel wenn der Boden gepflügt, Fruchtfolge oder Mischkulturanbau betrieben wird. Auch der Einsatz von Chemikalien oder Bodendesinfizierungstechniken führt zu tiefgreifenden Störungen der etablierten Bodenorganismen. Weniger drastische Störungen um die Etablierung eines neuen Stammes zu fördern, wäre der Einsatz von spezifischen Antibiotika, mikrobiellen Räubern oder Helferstämmen. So wird beispielsweise der Einsatz von Protozoen erforscht, welche sich von Bakterien ernähren, aber jene Stämme verschonen, die stark toxische Sekundärmetabolite erzeugen und dadurch als Biokontrollstämme in Frage kommen (Müller, *et al.*, 2013). Eine Verbesserung der Bedingungen für den Biokontrollstamm kann durch die Bereitstellung von nährstoffreichen Substraten wie zum Beispiel Kompost oder durch die Hinzugabe sehr spezifischer Kohlenstoffquellen, spezifischer Nährstoffe oder Signalstoffen erreicht werden. Die Veränderung physikalischer Bodenparameter, wie die Bodentextur, die Porengrößenverteilung im Substrat oder die Bodenfeuchtigkeit sowie chemischer Parameter wie der pH-Wert, können zu Gunsten des applizierten Organismus verändert werden. Als weitere Möglichkeit könnte die Pflanze selbst als Lösungsansatz herangezogen werden, da diese durch die Sekretion spezifischer Wurzelexsudate ihr Rhizosphärenmikrobiom selbst zu beeinflussen vermag (Berendsen, *et al.*, 2012). So könnte in zukünftigen Zuchtzielen vermehrt Augenmerk auf die positiven Pflanzen-Mikroben-Interaktionen gelegt werden und die Zuchtverfahren auf die Bedingungen eines ökologischen Landbaus ausgerichtet werden (Berg, *et al.*, 2013).

Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war daher, effektverstärkende Agenzien für biologische Pflanzenschutzmittel zu untersuchen. Anhand eines synergistischen Konsortiums (einer Kombination von bakteriellen Stämmen), sowie eines Ko-Beneficials (ein als Vektor fungierender Pilz), sollten Interaktionsstudien durchgeführt und die Partner gemeinsam an die Pflanzen appliziert werden. In Hinblick auf biologischen Pflanzenschutz sollten Mechanismen ergründet werden, welche für die positive Wirkung auf die Pflanze verantwortlich sein könnten um zukünftig die Zusammensetzung mikrobieller Konsortien zu verbessern.

In den Versuchen wurden unterschiedliche Applikationsmethoden wie zum Beispiel das Priming von Samen, Wurzeltauchbäder oder Gießvarianten getestet um den Effekt der Biokontroll-Stämme auf die Pflanzen einfach und verlässlich testen zu können.

Um effektive Biokontrolle erreichen zu können, müssen Rhizosphären-Bakterien an den Wurzeln an der richtigen Stelle (bis zu den Wurzelspitzen), zur richtigen Zeit (bevor das Pathogen Schaden angerichtet hat) und in ausreichender Anzahl vorhanden sein. Der Grenzwert einer Besiedelungsdichte, die beispielsweise für einen signifikanten Schutz von Weizen notwendig ist, schwankt zwischen 10^5 und 10^6 Zellen pro Gramm Wurzel wobei die Gesamtzellzahl zirka 10^8 Zellen pro Gramm Wurzel ist (Haas, *et al.*, 2000).

Um das mikrobielle Produkt gut in den Handel bringen zu können, muss die Überlebensrate der Mikroorganismen in ihrer Formulierung maximiert werden. Für Praxisanwendungen müssen Applikations- oder Ausbringungsmethoden implementiert werden, die für den Endanwender einfach handhabbar sind und gut in den Routinebetrieb integriert werden können. Beispiele hierfür sind Streuapplikationen (Pilzgerste, Sporengranulat, Kapseln, Substrate als Trägermaterialien), Spritzapplikationen (Sporensuspension, Bakteriensuspension, wasserlösliche Granulate oder Kapseln, Pulver), eine Saatgutfiltration, eine Inkrustierung (Film Coating) oder Pillierung (dicke Umhüllung zur Vereinheitlichung der Form) des Saatguts. Eine Aufbringung der Biokontrollstämmen auf das Saatgut durch den Saatgutproduzenten oder –vertrieb ist für den Endanwender eine gute Lösung, da für diesen keine zusätzlichen Arbeitsschritte im Betrieb anfallen. Die dazu notwendigen Träger-, Haft- und Zusatzstoffe sowie weitere Applikations-Hilfsstoffe müssen ebenso auf den Samentyp und das Einsatzgebiet in der Praxis abgestimmt sein wie eine eventuell zusätzlich notwendige Reinigung des Saatguts, Zugabe von Mikronährstoffen oder zusätzliche chemische oder synthetische Beizmittel oder Repellents. Letztendlich muss die gewählte Lösung für Mensch, Tier und Pflanze ungefährlich sein. Abbildung 1 zeigt als Beispiel unbehandelte, inkrustierte und pelletierte Kürbissamen.

Einleitung



Abbildung 1: Unbehandelte (links), inkrustierte (Mitte) und pelletierte Kürbissamen (rechts).

Der Steirische Ölkürbis (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) kann von pathogenen Pilzen, Bakterien und Viren, aber auch Insekten sowie deren Maden, Vögeln und verschiedenen Säugetieren sowie abiotischen Stressfaktoren wie starker Hitze, Nässe, Hagel, Spritzmittel und anderen Faktoren beeinträchtigt werden. Tabelle 1 listet beispielhaft einige der für den Ölkürbis potentiell schädlichen Mikroorganismen auf, welche direkt oder indirekt zu einer Reduktion des Ernteertrags führen können.

Tabelle 1: Auswahl einiger für den Steirischen Ölkürbis potentiell pathogener Mikroorganismen

Mikroorganismus	Symptome
<i>Didymella bryoniae</i>	„Schwarzfäule“-Erreger an Früchten, Blattnekrosen (Huss & Pucher, 2007) (Winkler, <i>et al.</i> , 2008), Stängelknicken, Gummistängelkrankheit (Babadoost & Zitter, 2009)
Echter und Falscher Mehltau	Vergilbung und Verbräunung der Blätter (Bedlan & Huss, 2005)
Fusarien	Frucht-Fäulnis mit rosa Pilzrasen (Huss, 2011)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Schädigung von Trieben, Stängeln und Früchten (Huss, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	„Weichfäule“-Erreger an Früchten (Huss, 2011), (Grube, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Blattnekrosen (Huss & Mavridis, 2007)
<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	Blattflecken, Deformierung, Fäulnis und Flecken an Früchten (Babadoost & Zitter, 2009)
Zucchini-Gelbmosaikvirus	Blattscheckung oder deformierte Blätter, Beulen an Früchten und nicht vollständig ausgebildete Kerne (Babadoost & Zitter, 2009)

Von großer Relevanz für einen biologischen Anbau des Steirischen Ölkürbis sind bis heute noch nicht im Detail bestimmte boden- und samenbürtige Schaderreger, welche eine massive Reduktion des Aufbaus des Ölkürbis bis hin zu Totalausfällen unter schwierigen Bedingungen wie Nässe, Kälte oder verdichtetem Boden bewirken können. Aus diesem Grund wird Saatgut des Steirischen Ölkürbis nur fungizidgebeizt im Handel angeboten, wobei für den konventionellen Landbau üblicherweise das

Einleitung

Fungizid Maxim® XL (Wirkstoffe Fludioxonil und Mefenoxam) verwendet wird. Für 2014 wurde weiters für das Präparat Merpan 80 WDG (Wirkstoff Captan) eine Notfallzulassung vom Bundesamt für Ernährungssicherheit erteilt. Für den biologischen Landbau sind Beizmittel auf Kupferbasis, zum Beispiel Cuprofor®, zugelassen. Unbehandelte Samen sind einem starken Infektionsdruck von Schimmelpilzen wie *Botrytis cinerea* und *Fusarium*-Arten ausgesetzt (Obersteiner, 1996). Weitere für Kürbisgewächse im Allgemeinen beschriebene Pathogene der keimenden Pflanzen sind *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. und *Rhizoctonia solani* (Zitter, et al., 1996). Die Entwicklung eines biologischen Beizmittels mit Hilfe von Mikroorganismen stellt daher eine große Herausforderung dar und wird unter anderem durch die hier vorliegende Arbeit weiter vorangetrieben.

Der erste Teil der Arbeit beinhaltet das Screening bakterieller Stämme, wobei auch der Effekt bakterieller Konsortien sowie der Effekt unterschiedlich hoher Ausgangskonzentrationen auf die Pflanzen untersucht wurden. Die Klonierung des Fluoreszenzproteins ZsYellow in den Vektor pIN69 sowie die Transformation mehrerer *Serratia*-Stämme mit pIN69-Vektoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen wird in diesem Teil der Arbeit ebenso beschrieben.

Die verwendeten bakteriellen Stämme stammen aus mehreren Studien, in welchen diese bereits in Hinblick auf ihr antagonistisches Potential untersucht wurden. Die *Serratia plymuthica* Stämme 3Rp5, 3Rp8 und 4rx13 wurden beispielsweise aus unterschiedlichen *Verticillium*-Wirtspflanzen isoliert und mit Hilfe Dualkulturplattentests eine Aktivität gegen *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* Kühn und *Sclerotinia sclerotiorum* Lib *in vitro* festgestellt (Berg, et al., 2002). Der *Serratia plymuthica* Stamm 3Re4-18 wurde aus der Endorhiza einer Kartoffelpflanze isoliert und zeigte ebenfalls antagonistisches Potential gegen *Verticillium dahliae* und *Rhizoctonia solani*. Des Weiteren konnte eine Produktion hydrolytischer Enzyme wie Cellulasen, Chitinasen, Glukanasen, Pektinasen und Proteasen in Plattenassays nachgewiesen werden (Berg, et al., 2005). Einige Autoren gehen soweit, dass sie die Nutzung von regionalen Stämmen vorschlagen um die Performance von Biokontrollansätzen zu verbessern, da kein einzelner Biokontrollstamm in der Lage sein wird, unter allen erdenklichen landwirtschaftlichen Bedingungen optimal zu funktionieren (Bashan, et al., 2013).

In Teil zwei des Screenings wurden mit ausgewählten bakteriellen Stämmen Transportversuche mit Pilzen als Vektor sowohl auf Agar als auch in Erde sowie erste Transportversuche bakterieller und pilzlicher Konsortien *ad planta* durchgeführt. Die Idee, Pilze als Transportvektoren zu nutzen, wurde beispielsweise bereits aufgegriffen, um eine bessere Verteilung von schadstoffabbauenden Bakterien im Boden zu erreichen (Kohlmeier, et al., 2005). Auch für Biokontroll-Strategien erscheint eine gemeinsame Nutzung von Bakterien und Pilzen interessant, da sowohl metabolische Kooperationen (Boonchan, et al., 2000), physikalische Interaktionen bei Prozessen wie der Besiedelung von Wurzeln

Einleitung

oder die Anheftung von Bakterien an die Hyphen von Mykorrhiza-Pilzen als auch die Bildung von Biofilmen in der Nähe der Hyphen (Bianciotto, *et al.*, 1996) beschrieben wurde.

Bei der Auswahl der Pilze für die Transportversuche wurde auf Stämme, welche selbst positiv auf Pflanzen wirken und möglicherweise als Transportvektor dienen könnten, sowie auf Stämme, welche als Pflanzenpathogene gelten, zurückgegriffen. Der Pilz *Trichoderma velutinum* G1/8 wurde beispielsweise im Rahmen einer Studie über pilzliche Antagonisten aus einem *Rhizoctonia*-Sklerotium einer Kartoffelknolle isoliert und in der Studie als effizienter Hyperparasit identifiziert (Grosch, *et al.*, 2006). Viele *Trichoderma*-Isolate sind dafür bekannt, Hyphen, Sklerotien und andere pilzliche Strukturen zu parasitieren sowie antifungale Metabolite zu produzieren und eine induzierte Resistenz in ihren Wirtspflanzen auszulösen (Howell, 2003). Auch ein Antagonismus von *Trichoderma*-Isolaten gegen *Didymella bryoniae* Isolate wurde bereits in *in vitro* Studien festgestellt (Martinez, *et al.*, 2013). Aus den Studien zur Masterarbeit von Octavian Murgu wurden einige Pilzisolat aufgrund der möglichen Eignung als Transportvektor ausgewählt, deren Wuchstyp passend schien und welche das Wachstum einiger ausgewählter bakterieller Isolate nicht inhibierten (Murgu, 2014). Die *Didymella bryoniae* Isolate A220-2b, GL1 und SP2 wurden ausgewählt, da diese bereits in einer Studie über das gemeinsame Auftreten bakterieller und pilzlicher Pathogene am Steirischen Ölkürbis charakterisiert wurden (Grube, *et al.*, 2011) und als mögliche Positiv-Kontrolle für einen Transport von Bakterien über pilzliche Hyphen dienen sollten.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse möglicher Mechanismen, welche für die positiven Effekte der Biokontrollstämmen verantwortlich sein könnten. Einerseits wurden Proben behandelte Pflanzen mikroskopiert, um die Besiedelung mit den applizierten Mikroorganismen zu zeigen, andererseits wurden die Genome zweier *Serratia plymuthica* Stämme sequenziert und annotiert und gemeinsam mit den Genomdaten zweier weiterer bereits veröffentlichter *S. plymuthica* Stämme analysiert. Durch das bessere Verständnis des genetischen Hintergrundes eines Isolates könnten zukünftig durch die Auswahl von gewünschten Funktionen passende Konsortien von Mikroorganismen für eine Biokontrollstrategie einfacher zusammengestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Kulturpflanzen und Substrate

Tabelle 2 führt Details zu dem in den Versuchen verwendeten Saatgut an und Tabelle 3 beschreibt die verwendeten Substrate.

Tabelle 2: Sorte, Saatgutproduzent und Saatgutcharge der verwendeten Kulturpflanzen

Abkürzung	Kulturpflanze	Sorte und Saatgutherkunft	Charge
K ₁₂	Steirischer Ölkürbis	Rustikal, Alwera AG	SGR 9/12
K ₁₃	Steirischer Ölkürbis	Rustikal, Alwera AG	Ernte 2013
M	Mais	Ronaldinio, KWS	E06/2011
T	Tomate	Rispentomaten von Billa, abgepackt von Perlinger Gemüse GmbH, Samen aus den im Handel erhältlichen Tomaten entnommen	291393

Tabelle 3: Beschreibung der verwendeten Substrate für die Versuche in Petrischalen, Plastikboxen und Töpfen

Abkürzung	Substrat	Anbieter/Beschreibung	Düngung
Std.ET	Standard-Erde Torf	Gramo Flor/mäßig bis stark zersetzter Hochmoortorf	schwach gedüngt
Kokos	Kokos	Eine Welt Handel AG/Kokosfaser-Reste aus der Kokos-Verarbeitung, gepresst zu einem Block	keine
Bel.E	stark belastete Erde	Erde vom „Anstaltsfeld“ am Tieberhof 33 der Saatzucht Gleisdorf GmbH. 2013 und 2012 wurde auf diesem Feld Mais angebaut, 2011 Ackerbohnen. An diesen wurde ein starker Befall durch <i>Phoma medicaginis</i> var <i>pinodella</i> sowie durch <i>Fusarium solani</i> festgestellt (Analyse von Hrn. Dr. Herbert Huss). Das Feld gilt allgemein als sehr belastet und äußerst schwierig (Information von Fr. DI Johanna Winkler).	zuletzt gedüngt im Frühjahr 2013, NPK
NÖ-E	normal belastete Erde	Normal belastete Erde aus Niederösterreich, von der Firma Kwizda für Auflauftests aufbereitet.	unbekannt
Keimfilter	keines	sterile Papierfilter-Tücher mit einer Falz zur Samenablage, eingefasst in einer Plastik-Hülle (cyg™ germination pouch, Mega International, MN, USA)	keine

Für alle Versuche wurden unbeschädigte, durchschnittlich große Samen ausgewählt. In den Versuchen 1 bis 5 wurden diese direkt für das Samentauchbad verwendet. Bei den für Versuch 6 und Versuch 7 verwendeten Kürbissamen wurde vorsichtig das Samenhäutchen abgerieben und die

Material und Methoden

Samen anschließend mit 96%igen Ethanol beidseitig eingesprüht und in einer Laminar-Flow-Einheit rückgetrocknet. Ab Versuch 8 wurden alle Samen zirka 20 Sekunden in 70%igen Ethanol geschwenkt und unter einer Laminar-Flow-Einheit rückgetrocknet.

2.2 Applikation der Mikroorganismen

Die bakteriellen Isolate wurden auf LB-Agar-Platten (25 g/l LB-Medium Luria/Miller der Firma Roth, 20 g/l Agar-Agar (peqGOLD Universal Agarose, peqlab)) kultiviert. In den LB-Agar-Platten für die Kultivierung von mit pIN69-Vektoren transformierten Stämme waren 50 µg/ml Trimethoprim (Tp) (Sigma Aldrich, M 290,32 g/mol; > 99 % kristallisiert; Dihydrofolatreduktasehemmer (Prokaryonten)) enthalten. Für das Samentauchbad (ST) wurden 20 ml LB-Medium (25 g/l) mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Stammes inokuliert und über Nacht bei 30 °C in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Bei den transformierten Stämmen wurde hier auf eine Antibiotika-Zugabe verzichtet, da eine spätere Auswirkung des Antibiotikums auf die Samen durch das Samentauchbad mit der verdünnten Übernachtkultur (ONC) vermieden werden sollte.

Die Laborarbeiten beim **Priming** der Samen (Samentauchbad) erfolgten unter sterilen Bedingungen (unter dem Bunsenbrenner). Die ONCs wurden mit 0,85%igen NaCl auf die gewünschte Konzentration für das Samentauchbad verdünnt. Anschließend wurden die Samen der Kulturpflanzen in dieser verdünnten Suspension für vier Stunden bei 100 rpm geschwenkt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurden für Mais- und Kürbissamen Petrischalen mit 9 cm Durchmesser und zirka 22 ml verdünnter Suspension, für die Tomaten-Samen Zellkulturschalen mit 5 cm Durchmesser mit zirka 10 ml verdünnter Suspension verwendet. Die genauen Daten hierzu sind in Tabelle 4 angegeben. Pro Petrischale wurden bis zu 35 Samen verwendet. Um das Handling zu erleichtern und ein Austreten der Suspensionen zu vermeiden, empfiehlt es sich, die Petrischalen mit Parafilm zu verschließen.

Da die Kürbissamen in den Petrischalen nicht gut geschwenkt wurden, wurden in Versuch 4 die Samen für den Test auf Std.ET und NÖ-E je bakteriellem Isolat vereinigt und somit 33 Kürbissamen gemeinsam in 45 ml verdünnter Suspension in einem 100 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Auch im Erlenmeyerkolben funktionierte die Durchmischung nur suboptimal. Für folgende Versuche mit Kürbis wird die Verwendung eines größeren, flachen Gefäßes, wie zum Beispiel einer Wanne empfohlen.

Tabelle 4: Verwendetes Volumen der mit 0,85%igen NaCl verdünnten Suspension im Samentauchbad in Versuchen mit Einzelstämmen beziehungsweise mit Mischbehandlungen

Kultur	Behandlung	verwendete Suspension
K, M	Einzelstamm	22,5 ml ONC
T	Einzelstamm	10 ml ONC
K, M	Mischbehandlung mit 2 Stämmen	11 ml ONC Stamm 1 und 11 ml ONC Stamm 2
T	Mischbehandlung mit 2 Stämmen	5 ml ONC Stamm 1 und 5 ml ONC Stamm 2
K, M	Mischbehandlung mit 3 Stämmen	7 ml ONC Stamm 1, 7 ml ONC Stamm 2 und 7 ml ONC Stamm 3
M	Mischbehandlung mit 4 Stämmen	5,5 ml ONC Stamm 1, 5,5 ml ONC Stamm 2, 5,5 ml ONC Stamm 3 und 5,5 ml ONC Stamm 4

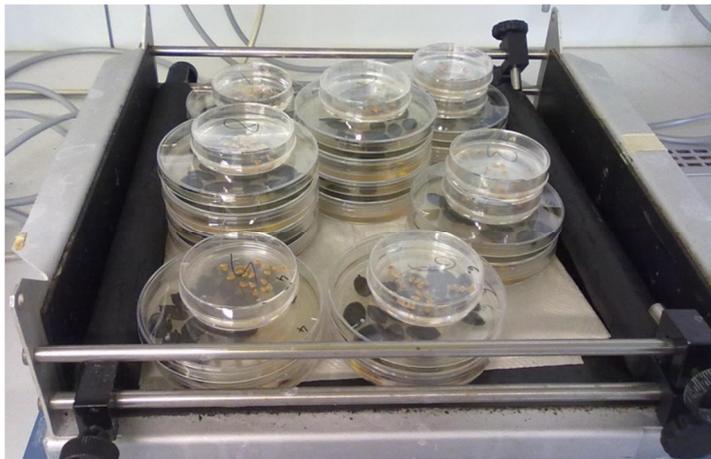


Abbildung 2: Samentauchbad von Kürbis-, Mais- und Tomatensamen in 9-cm-Petri- beziehungsweise 5-cm-Zellkultur-Schalen.

Nach dem ST wurden die Samen mindestens 1,5 Stunden unter einer Laminar-Flow-Einheit rückgetrocknet. Die Zellzahl der im Samentauchbad verwendeten Bakterien-Suspension wurde nach Austropfen von zwei Mal je 10 µl verschieden hoher Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-6}) auf Agar-Platten ermittelt.

Bei der **Gießvariante** (V6) erfolgte das erste Eingießen mit der mit 0,85%iger NaCl-Lösung verdünnten ONC des jeweiligen Stammes beziehungsweise einer Mischung der verdünnten ONCs (50 ml pro Topf). Für die Mischbehandlung war zu wenig ONC vorhanden, weswegen hier die Verdünnung etwas angepasst wurde (6,5 ml S13 + 6,5 ml 3Rp8 + 135 ml 0,85%iges NaCl).

Für das **Wurzeltauchbad** (V12) wurden mit 70%igen Ethanol gewaschene aber ansonsten noch unbehandelte Samen in mit zwei Lagen Filterpapier ausgelegten Petrischalen drei Tage bei

Raumtemperatur im Dunkeln deponiert. In jede Petrischale zu je sieben Samen wurden 5 ml sterilisiertes dH₂O hinzugefügt. Von den auf sterilem Filterpapier ausgelegten Samen aus der Charge K₁₃ keimten 93 % der Samen an, aus Charge K₁₂ 82 %. Die angekeimten Samen wurden am dritten Tag je 20 Minuten lang in Petrischalen mit 20 ml der verdünnten bakteriellen Suspension gestellt. Während der Behandlung sind einige Keimlinge umgekippt, was zu einer kurzzeitig kompletten Benetzung mit bakterieller Suspension führte. Danach wurden die Keimlinge in sterile Keimfilter gesetzt und bis zum 13. Tag nach der Aussaat wachsen gelassen.

2.3 Molekulare Charakterisierung und Fluoreszenzmarkierung bakterieller Isolate

In Tabelle 5 werden die verwendeten bakteriellen Isolate, Referenzen dazu sowie die im Folgenden verwendeten Abkürzungen angeführt.

Tabelle 5: Abkürzung, vollständiger Name und Referenz zu den verwendeten bakteriellen Isolaten sowie Abkürzungen der Kontroll-Behandlungen

Abkürzung	bakterielles Isolat/Kontrolle	Herkunft/Referenz
B2G	<i>Bacillus subtilis</i> B2G	(Marten, <i>et al.</i> , 2000)
PB71	<i>Paenibacillus polymyxa</i> PB71	(Fürnkranz, <i>et al.</i> , 2012)
3Rp8	<i>Serratia plymuthica</i> 3Rp8	(Berg, <i>et al.</i> , 2002)
3Re4-18	<i>Serratia plymuthica</i> 3Re4-18	(Berg, <i>et al.</i> , 2005)
S13	<i>Serratia plymuthica</i> S13 (DBLH13)	(Fürnkranz, <i>et al.</i> , 2012)
4rx13	<i>Serratia plymuthica</i> 4rx13	(Berg, <i>et al.</i> , 2002)
3Rp5	<i>Serratia plymuthica</i> 3Rp5	(Berg, <i>et al.</i> , 2002)
eP17	<i>Stenotrophomonas rhizophilia</i> ep17	(Wolf, <i>et al.</i> , 2002)
P69	<i>Stenotrophomonas rhizophilia</i> P69 (= DSM14405)	(Alavi, <i>et al.</i> , 2013), (Maurer, <i>et al.</i> , 2013)
KTU	Negativkontrolle, Priming der Samen mit 0,85%igen NaCl	-
ORI	Negativkontrolle, Saatgut ohne Priming	-

Wurden fluoreszenzmarkierte Stämme verwendet, wird jeweils die Abkürzung des Stammes inklusive der Abkürzung des Fluoreszenz-Proteins angegeben. Da für Bakterien immer der pIN69-Vektor als Träger des Gens für das Fluoreszenzprotein verwendet wurde, wird auf die Angabe des Vektors in der Abkürzung verzichtet. So handelt es sich beispielsweise bei der Angabe S13-GFP um einen *Serratia plymuthica* S13 Stamm, der einen pIN69-Vektor mit GFP-Insert trägt.

Der pIN69-Vektor ist Teil einer Serie von pBBR1MCS-abgeleiteten Plasmiden einer medizinischen Arbeitsgruppe (Vergunst, *et al.*, 2010), rhizosphärenstabil und nicht mobilisierbar (Δ mob), um einen Plasmidtransfer zwischen Bakterien während Experimenten zu vermeiden. Im Gegensatz zum pIN29-Vektor, aus welchem der pIN69-Vektor letztlich abgeleitet wurde, hat das pIN69-Konstrukt ein Trimethoprim- anstelle eines Chloramphenicol-Resistenzgens. Diese Trimethoprim-Resistenz (TpR) kann als Selektionsmarker verwendet werden. Den unterschiedlichen in diesem Vektor inklonierten Sequenzen für Fluoreszenzproteine ist jeweils ein *tac*-Promotor vorangestellt.

Die pIN69-Vektoren mit den Sequenzen für GFP-, DSRed2-, mNeptune- und eBFP2-Fluoreszenzproteinen stammen aus der Masterarbeit von Octavian Murgu (Murgu, 2014) und waren in Form pIN69-transformierter *E. coli* 5α-Zellen verfügbar. Die Sequenz eines weiteren Fluoreszenzproteins ZsYellow wurde im Rahmen dieser Masterarbeit beziehungsweise des Projektlabors von Kathrin Hölzl in den pIN69-Vektor kloniert.

2.3.1 Box A1R Fingerprint

Eine BOX-PCR-Amplifizierung wird verwendet, um Isolate auf Stammebene zu gruppieren, indem repetitive BOX A-Elemente im Genom der Bakterien amplifiziert werden (Martin, *et al.*, 1992). Sie können jedoch auch zur Qualitätssicherung beziehungsweise als Referenz in Reisolierungsexperimenten verwendet werden.

DNA Isolierung

Mittels einer Methode zur schnellen Extraktion der DNA durch Einfrieren bei -70 °C und anschließendem Aufheizen auf 100 °C konnten nicht für alle Stämme Fingerprints erzeugt werden.

Aus diesem Grund wurde die DNA-Extraktion mittels eines Protokolls mit Einsatz des Ribolyzers und einer anschließenden Phenol-Chloroform Extraktion wiederholt:

1. Eine Impföse frischen Zellmaterials von einer Agar-Platte wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, in welchem zwei Stück große und zwei Portionsschaufeln kleine Glas-Kugeln (0,25 – 50 mm) vorgelegt waren
2. Hinzugabe von 300 µl Extraktions-Puffer
Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt
3. 30 sec FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) (Level 5)
4. Hinzugabe von 150 µl 3 M Na-Acetat, vortexen
5. Lagerung bei -20 °C für 20 min oder länger (bis zu 24 Stunden möglich) -die Ansätze wurden 23 min bei -20 °C gelagert
6. Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm (4 °C) - der Zentrifugationsschritt wurde zwei Mal durchgeführt, da bei der ersten Zentrifugation die Ansätze offensichtlich noch nicht richtig aufgetaut waren und sich der Schaum noch nicht abgesetzt hatte.
7. Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß - es wurden 340 µl Überstand abgehoben
8. Hinzugabe der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Lösung zum Überstand und vorsichtiges Schütteln für 2 min

Material und Methoden

9. Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm (4 °C)
10. Überführen der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß, Hinzugabe der gleichen Menge Iso-Propanol und Inkubation für 5 min bei RT - 200 µl der oberen Phase wurden mit 200 µl Iso-Propanol für 25 min bei 4 °C und (unbeabsichtigt) für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert
11. Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm (4 °C)
12. Abheben des Iso-Propanol und Hinzugabe der gleichen Menge 70%igen eisgekühlten Ethanol (gekühlt bei -20 °C) auf das Pellet
13. Vorsichtiges Mischen und Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm (4 °C)
14. Abheben des Ethanol und lufttrocknen des Pellets - das Pellet wurde für 2,75 Stunden unter der Laminar-Flow-Einheit getrocknet. Im getrockneten Zustand war es völlig farblos/klar und nicht mehr sichtbar.
15. Resuspendieren des Pellets in 50 µl nukleasefreiem PCR-Wasser
16. Überprüfung von 6 µl mittels Agarose-Gelelektrophorese
17. Lagerung bei -20 °C für die weitere Verwendung

Herstellung der Reagenzien

Extraktions-Puffer

200 mM Tris/HCl	(20 ml einer 1 M Stocklösung)
250 mM NaCl	(25 ml einer 1 M Stocklösung)
0,5 % SDS	(5 ml einer 20%igen Stocklösung)
Auffüllen auf 100 ml mit dH ₂ O, autoklavieren	

3 M Natriumacetat, pH 5,2

4,92 g Na-Acetat

15,5 ml dH₂O

4,5 ml 1 N HCl

Zwecks Konzentrationsabschätzung der extrahierten DNA wurde ein Kontrollgel erstellt. Dafür wurde ein 0,8%iges Agarosegel in 1x-Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet (0,8 g Agarose in 100 ml 1x-TAE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis die Lösung klar wird). Generell werden TAE-Gele für Auftrennungen mit kurzen Laufzeiten oder für Abschätzungen und Kontrollen (zum Beispiel einer Konzentrationsabschätzung) verwendet und Tris-Borat-EDTA (TBE)-Gele für exakte Auftrennungen und lange Laufzeiten.

Material und Methoden

BOX PCR-Amplifizierung

Für die PCR wurde der Primer BOX A1R (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3') im nachfolgend beschriebenen PCR-Reaktionsansatz verwendet.

PCR-Reaktionsansatz

16,5 µl H₂O nukleasefrei (Roth)

5,0 µl Taq&Go Polymerase (MP Biomedicals)

2,5 µl Primer BOX A1R (100 pmol/ml)

1,0 µl Template DNA

25,0 µl Gesamtsumme

Box-Programm Thermozykler

- | | | | |
|----|-------|------------|-------------|
| 1. | 95 °C | 5 min | |
| 2. | 95 °C | 1 min | } 35 Zyklen |
| 3. | 53 °C | 1 min | |
| 4. | 65 °C | 8 min | |
| 5. | 65 °C | 16 min | |
| 6. | 4 °C | unbegrenzt | |

Gel-Elektrophorese

12,5 µl der PCR-Produkte wurden mit 3 µl 6x-Ladepuffer gemischt und in einem 1,5%igen Agarose-Gel in 0,5x-TBE-Puffer (pH 8,0) aufgetrennt. In den ersten und letzten Slot wurden 5 µl einer 1 kb Quick load DNA Leiter (GeneRuler, Thermo Fischer Scientific) aufgetragen.

Zutaten für 1 Liter 5x TBE-Puffer:

54,0 g Tris (HCl)

27,5 g Borsäure

20,0 ml 0,5 M EDTA

~ 980 ml dH₂O (auffüllen auf 1000 ml)

Zutaten für 1,5%iges Agarose Gel in 0,5x-TBE:

3,75 g Agar-Agar (peqGOLD Universal Agarose, peqlab)

~ 250 ml 0,5x TBE-Puffer (auffüllen auf 250 ml)

Material und Methoden

Nachdem das Gel 5,5 Stunden (Std) gelaufen war (0,5 Std mit 90 V, 5 Std mit 110 V) wurde es für 20 min zum Färben in ein 0,0001%iges Ethidiumbromid-Bad und eben solange zum Entfärben in dH₂O eingelegt.

2.3.2 16S rDNA-Sequenzierung der Stämme *Serratia sp.* 3Rp5 und 3Rp8

DNA aus der Phenol-Chloroform Extraktion für den Box A1R Fingerprint wurde mit den Primern 27f und 1492r amplifiziert, aufgereinigt und zur Sequenzierung an die LGC Genomics GmbH/Berlin geschickt.

Primersequenzen:

27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Lane, 1991)

Wobei „M“ in diesem Fall bedeutet, dass ein „A“ oder ein „C“ enthalten sein kann.

1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Wobei der gelb hinterlegte Teil in Lane *et al.* 1991 beschrieben ist und das „Y“ in diesem Fall bedeutet, dass ein „C“ oder „T“ enthalten sein kann.

PCR-Ansatz:

1,0 µl Template DNA (10-fache Verdünnung aus Phenol-Chloroform Extraktion)

0,3 µl 27f Primer (10 µM)

0,3 µl 1492r Primer (10 µM)

6,0 µl Taq&Go Polymerase (MP Biomedicals)

22,4 µl H₂O nukleasefrei (Roth)

30,0 µl Summe

Da in den ersten PCR-Läufen hiermit kein Ergebnis erzielt werden konnte, wurde die PCR mit der unverdünnten DNA aus der Phenol-Chloroform Extraktion wiederholt und weiters eine UnibaII-PCR mit den Primern 515f und 927r durchgeführt (PCR-Ansatz ansonsten gleich wie oben). Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquote der PCR-Produkte auf ein Kontroll-Gel aufgetragen.

Primersequenzen für die UnibaII-PCR:

unibaII 515f 5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'

unibaII 927rP 5'-CCCGTCAATTYMTTGA-3'

Material und Methoden

UnibaclI-Programm Thermozykler:

- | | | | |
|----|-------|------------|-------------|
| 1. | 95 °C | 5 min | } 40 Zyklen |
| 2. | 95 °C | 20 sec | |
| 3. | 54 °C | 15 sec | |
| 4. | 72 °C | 30 sec | |
| 5. | 72 °C | 10 min | |
| 6. | 15 °C | unbegrenzt | |

Wie im Ergebnisteil in Abbildung 12 ersichtlich, konnte durch die Verwendung der unverdünnten DNA eine geringe Menge PCR-Produkt mittels 27f PCR hergestellt werden. Daher wurde nochmals eine 27f PCR wie oben mit unverdünnter DNA und der doppelten Anzahl PCR-Ansätze erstellt.

Die beiden PCR-Ansätze eines Stammes wurden vereinigt und es erfolgte eine Aufreinigung mit dem „Wizard SV Gel and PCR Clean-up System“ von Promega wobei das Protokoll für die DNA-Reinigung mittels Zentrifugation verwendet wurde (Kapitel 5.A. „DNA Purification by Centrifugation“ des Handbuchs). Im letzten Eluierungsschritt wurde das Endvolumen auf 30 µl eingestellt.

Eine Vermessung mittels eines NanoDrop Spektrometers ergab eine Konzentration von 72,1 ng/µl für 3Rp5 (A260: 1,441; A280:0,731; 260/280: 1,96; 260/230 2,22) sowie eine Konzentration von 65,7 ng/µl für 3Rp8 (A260: 1,313; A280:0,656; 260/280: 2,00; 260/230 2,11).

Die Vorgaben von LGC Genomics für eine zu sequenzierende Probe lauten:

4 µl mit 5 pM Primer

400 ng DNA in 10 µl Probe

14 µl Probenvolumen

Da die verwendeten Primer 10-fache Verdünnungen der Original-Primer waren, mussten 2 µl Primer eingesetzt werden:

$100 \text{ pM}/\mu\text{l} * x = 5 \text{ pM}/\mu\text{l} * 4 \mu\text{l} \rightarrow x = 0,2 \mu\text{l Originalprimer} * 10$ (aufgrund der 10-fachen Verdünnung) = 2 µl einzusetzender Primer

Die Ansätze für die Sequenzierung wurden daher wie in Tabelle 6 dargestellt zusammengestellt.

Tabelle 6: Zusammenstellung der Sequenzierungsansätze für LGC Genomics

Template Name	Primer	µl DNA Produkte	µl H ₂ O nukleasefrei
3Rp5_27f	2 µl 27f Primer	5,55	6,45
3Rp5_1492r	2 µl 1492r Primer	5,55	6,45
3Rp8_27f	2 µl 27f Primer	6,1	5,9
3Rp8_1492r	2 µl 1492r Primer	6,1	5,9

2.3.3 Transformation verschiedener *Serratia* Stämme mit pIN69-Plasmiden

Verschiedene *S. plymuthica* Stämme sollten für nachfolgende Experimente mit pIN69-Vektoren mit unterschiedlichen Inserts für Fluoreszenzproteine (GFP, DsRed2, eBFP2, mNeptune und ZsYellow) transformiert werden. Da auf diesem Plasmid eine Trimethoprim-Resistenz enthalten ist, kann eine Selektion auf erfolgreiche Transformanten in Medien mit 50 µg/ml Trimethoprim erfolgen. Ein Trimethoprim-Stock mit 100 mg/ml wurde hergestellt, indem 0,1 g Trimethoprim-Pulver in 1 ml DMSO gelöst wurden.

2.3.3.1 Klonierung des Gens für ZsYellow in pIN69

Das künstlich synthetisierte Gen für das ZsYellow-Protein wurde von der Firma Eurofins im Transportvektor pEX-A2 geliefert. Dem Gen wurden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II am 5'- und *Xba*I am 3'-Ende der Sequenz hinzugefügt. Die ZsYellow-Sequenz inklusive der Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme ist in Abbildung 3 dargestellt.

```
>ZsYellow_5bglII_plusC_for_frameshift_3xbaI_plusC_for_frameshift
AGATCTcatggctcattcaaagcacgggtctaaaagaagaaatgacaatgaaataccacatggaagggtgcgtcaa
cggacataaatttgtgatcacgggcgaaggcattggatatccgttcaaagggaaacagactattaatctgtgtgt
gatcgaagggggaccattgccatthttccgaagacatattgtcagctggctttaagtacggagacaggattttcac
tgaatatacctcaagacatagtagactatthtcaagaactcgtgtcctgctggatatacatggggcagggtctthttc
ctttgaggatggagcagctctgcatatgcaatgtagatataacagtgagtgtcaaagaaaactgcatttatcataa
gagcatatthtaatggagtgaaatthttcctgctgatggacctgtgatgaaaagatgacaactaactgggaagcatc
ctgcgagaagatcatgccagtagcctaagcaggggatactgaaaggggatgtctccatgtacctccttctgaagga
tggtgggcgttaccggtgccagttcgacacagtttcaaagcaaagtctgtgccaagtaagatgccggagtgcca
cttcatccagcataagctcctccgtgaagaccgcagcgatgctaagaatcagaagtggcagctgacagagcatgc
tattgcattcccttctgccttggcctgacTCTAGA
```

Abbildung 3: Sequenz des ZsYellow-Gens inklusive der Erkennungssequenzen für *Bgl*II und *Xba*I (gelb hinterlegt).

Der pEX-A2 Transport-Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Um in den Versuchen das selbe Selektionssystem wie bei den anderen transformierten Stämmen (TpR) nutzen zu können, wurde das

Gen für das ZsYellow-Protein aus dem pEX-A2-Transport-Vektor geschnitten und in den pIN69-Vektor kloniert. Die dazu notwendigen Arbeitsschritte sind in Abbildung 4 grafisch zusammengefasst.

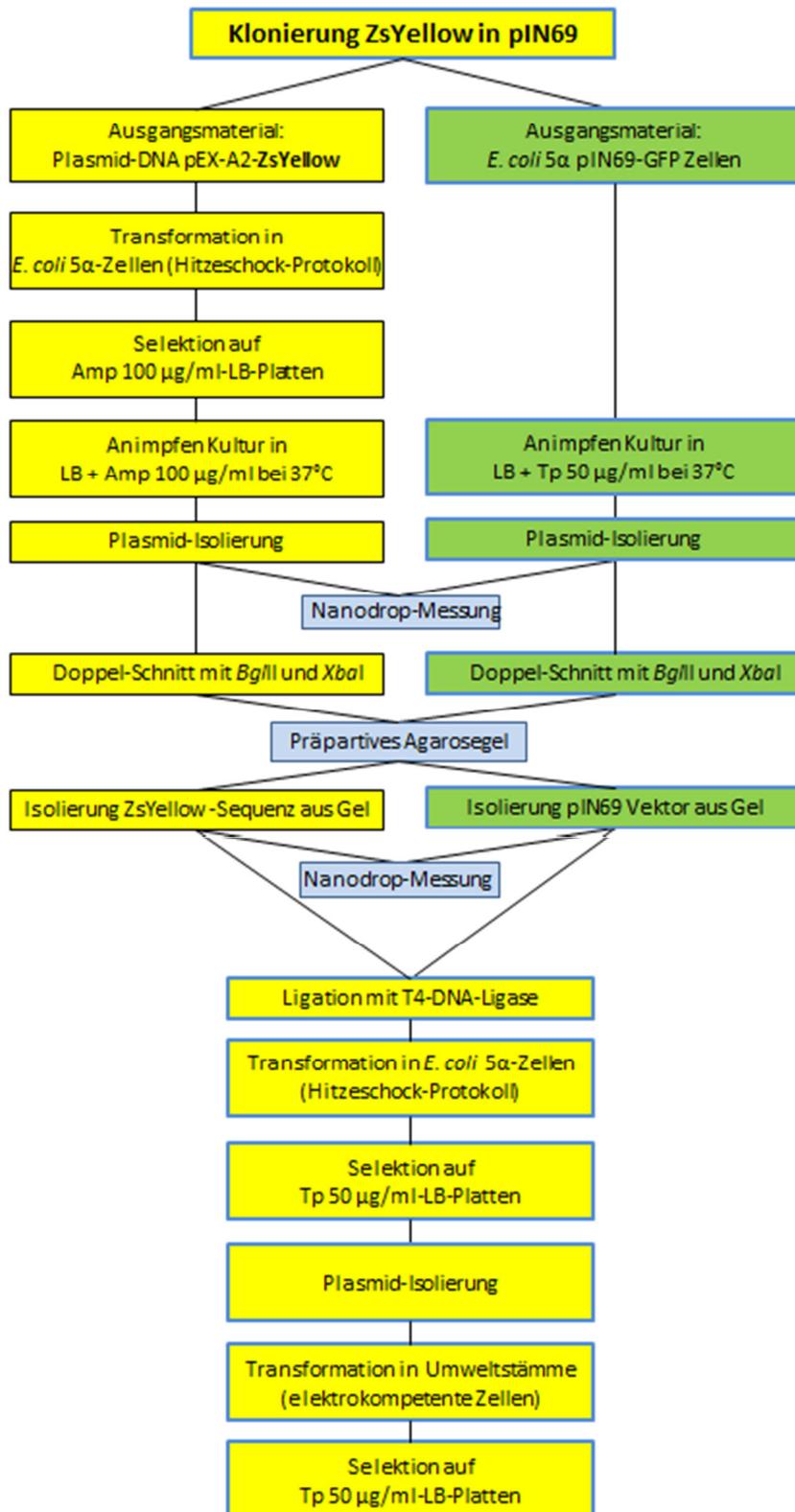


Abbildung 4: Arbeitsschritte zur Klonierung des ZsYellow-Gens in den pIN69-Vektor.

Material und Methoden

3,3 µg des gefriergetrockneten Vektors wurden in 330 µl 10 mM Tris-EDTA Puffer-Lösung (Fluka 93283) gelöst um einen 10 µg/ml Ausgangsstock herzustellen.

Für eine erste Anreicherung wurde der pEX-A2-ZsYellow Vektor mittels Hitzeschock-Transformation in 5α-kompetente *E. coli* Zellen (NEB, Subcloning Efficiency) laut Herstellerangaben transformiert. 5 ng der pEX-A2-ZsYellow-DNA (5 µl der 10-fach verdünnten Stock-Lösung) wurden mit 50 µl der Zellen vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für exakt 30 Sekunden erzeugt. Danach wurde der Ansatz für fünf Minuten auf Eis gekühlt und 950 µl SOC-Medium zur Regeneration der Zellen hinzugefügt. Nachdem die Ansätze für 60 min bei 37 °C und 250 rpm inkubiert wurden, wurden 100 µl der Zell-Suspension, 10- und 100-fache Verdünnungen und der gesamte restliche aufkonzentrierte Transformationsansatz sowie 1.000- und 10.000-fache Verdünnungen einer *E. coli* 5α-Negativkontrolle auf vorgewärmten Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Verdünnungen der Negativkontrolle wurde weiters auf LB-Agarplatten ohne Antibiotikazugabe ausplattiert.

Herstellung von 1 Liter SOC-Medium:

Trypton/Pepton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
MgSO ₄	4,8 g
Dextrose (D-Glucose)	3,6 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g

Zur Gewinnung des Insert-Vektors wurden 5α-*E. coli* Zellen, welche ein pIN69-GFP Plasmid trugen als Ausgangsmaterial verwendet. Zur Plasmidisolierung wurden Übernachtskulturen der beiden Stämme mit den unterschiedlichen Plasmiden in 20 beziehungsweise 100 ml Luria-Bertani (LB) Medium angesetzt, wobei bei den pIN69-Plasmid tragenden Zellen 50 µg/ml Trimethoprim und den pEX-A2-ZsYellow-Plasmid tragenden Zellen 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt wurden. Die Plasmidisolierung wurde mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific laut Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend von den Angaben wurden im ersten Schritt drei mal 1,5 ml der Übernachtskultur bei 10000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert und in 250 µl Resuspensionslösung vereinigt. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurden 50 µl H₂O nukleasefrei (Roth) für die Eluierung der DNA von der Säule verwendet.

Um den pIN69-Vektor ohne GFP-Insert und die ZsYellow-Sequenz ohne den Rest des pEX-A2-Vektors zu erhalten wurden die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Bgl*II wie im nachfolgenden Restriktionsansatz beschrieben verwendet.

Restriktionsansatz für einen Doppelverdau

NEBuffer 3.1 [10 x]	5 µl
<i>Bgl</i> II (10 U/ml*)	2 µl
<i>Xba</i> I (20 U/ml*)	1 µl
Vektor-DNA	x µl entsprechend 1 µg
<u>H₂O nukleasefrei (Roth)</u>	<u>x µl auffüllen auf 50 µl</u>
Summe	50 µl → Inkubation 1 Stunde bei 37 °C

* Eine Unit (U) wird hier als jene Menge Enzym beschrieben, die notwendig ist um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 50 µl zu verdauen.

Die geschnittene DNA wurde sofort im Anschluss mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, da *Bgl*II nicht hitzeinaktiviert werden kann. Der gesamte Restriktionsansatz wurde mit 6-fachem Ladepuffer gemischt und auf das präparative Gel aufgetragen. Gel Stücke mit den entsprechenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Wizard SV Gel Clean-up System (Promega) laut Herstellerangaben, jedoch wurden die Gelstücke von je vier Ansätzen des Vektors und des Inserts in jeweils ein einziges SV Minicolumn vereinigt um die DNA-Konzentration im Endvolumen zu erhöhen. Der Eluierungsschritt erfolgte abweichend zu den Herstellerangaben mit 30 µl H₂O nukleasefrei (Roth). Die Konzentration wurde wiederum mit einem NanoDrop Spektrophotometer bestimmt.

Die Ligation des pIN69-Vektors mit dem ZsYellow -Insert wurde mit einer T4 DNA Ligase von NEB laut Herstellerangaben durchgeführt und ein Vektor-Insert Verhältnis von 1:5 und 1:3, berechnet mit nachfolgender Formel, getestet.

Formel zur Berechnung der einzusetzenden Menge Insert für ein Vektor-Insert-Verhältniss von 1:3 beim Einsatz von 50 ng Vektor-DNA:

$$\text{Einzusetzende Menge Insert in ng} = \frac{50 \text{ ng Vektor} * \text{Insertgröße in kb}}{\text{Vektorgröße in kb}} * \frac{3 \text{ (Verhältnis Insert)}}{1 \text{ (Verhältnis Vektor)}}$$

Material und Methoden

Der Ligationsansatz für die Nutzung des Instant sticky-end Ligase-Mastermix von NEB (M0370) wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und ist für das 1:3-Verhältnis beispielsweise im Folgenden angeführt:

Instant sticky-end Ligase Mastermix (NEB)	5,0 µl
pIN69-Vektor	2,0 µl
ZsYellow-Insert	1,5 µl
<u>H₂O nukleasefrei (Roth)</u>	<u>1,5 µl</u>
Gesamtvolumen	10,0 µl

Nachdem diese Ligation zu keinen Transformanten führten, wurde ein neuer Ansatz unter Nutzung der T4 DNA Ligase (M0202) von NEB erstellt, welcher im Folgenden für das 1:5 Vektor-Insert-Verhältnis angegeben ist:

10XT4 DNA Ligase Puffer	2,0 µl
pIN69-Vektor	2,0 µl
ZsYellow-Insert	2,0 µl
H ₂ O nukleasefrei (Roth)	13,0 µl
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1,0 µl</u>
Gesamtvolumen	20,0 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und am nächsten Tag 10 min bei 65 °C inkubiert, um die T4-Ligase zu deaktivieren. Anschließend wurde wiederum eine Hitzeschock-Transformation in 5α-*E. coli*-Zellen durchgeführt. Es wurde jeweils ein gesamter Transformationsansatz aufkonzentriert, in 100 µl SOC-Medium aufgenommen, auf LB-Platten mit 50 µg/ml Trimethoprim ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.2 Aufreinigung der pIN69-Vektoren aus *E. coli* 5α-Zellen

E. coli Kolonien, die unter dem Motic AE31 Fluoreszenz-Mikroskop beziehungsweise deren Einzelzellen unter dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop ein starkes Fluoreszenz-Signal emittierten, wurden auf LB-Trimethoprim-Agar neu ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurde nach neuerlicher Überprüfung der Fluoreszenz in einem 100 ml Kolben eine ONC in 20 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Trimethoprim angesetzt.

Für die Aufreinigung der pIN69-Plasmide aus *E. coli* wurde das „Qi-Aprep® Spin Miniprep Kit (50)“ von Qiagen (Katalognummer 27104) verwendet.

Material und Methoden

Als Startmaterial wurden drei Eppendorf-Gefäße mit je 2 ml ONC verwendet und die Vorbereitungs-Punkte lt. Protokoll durchgeführt (die Gefäße wurden 3 min bei Raumtemperatur und 8000 rpm zentrifugiert). Anschließend wurde laut dem Protokoll „Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge“ vorgegangen, mit Ausnahme der Aufreinigung des pIN69-ZsYellow Plasmids aus den 5 α -*E. coli* Zellen wo das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0502) verwendet wurde.

Bei der Aufreinigung des pIN69-GFP-Plasmids erfolgte ein Vereinigen der drei Ansätze erst nach Schritt 10, bei Aufreinigungen der Plasmide mit eBFP2, mNeptune und ZsYellow-Insert erfolgte ein Vereinigen bereits bei im ersten Schritt indem jeweils drei Stück 2-ml-Eppendorfggefäße mit 2 ml ONC befüllt und die Zellen abzentrifugiert wurde. Zwei der Zellpellets wurden mit 80 μ l und eines mit 90 μ l Puffer P1 resuspendiert und in eines der Eppendorf Gefäße vereinigt sodass in Summe 250 μ l in P1-Puffer resuspendierter Zellen vorlagen. Dadurch wird weniger Material und Lösungen verbraucht und eine höhere Plasmidkonzentration im Endprodukt erreicht. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.3.3 Herstellung elektrokompetenter *S. plymuthica* Zellen

Die *S. plymuthica* Stämme aus der persönlichen Stammsammlung wurden in 100 ml 2x-TY-Medium über Nacht inokuliert. Nach 16,5 Stunden erreichten diese eine OD₆₀₀ von zirka 3,4. 3 ml davon wurden in 200 ml 2x-TY-Medium überführt um eine Start-OD von 0,05 zu erreichen. Nach zirka 190 min wurde eine OD von 0,5 erreicht und die Kultur geerntet.

Zutaten für 1 Liter 2x-TY-Medium:

16 g Pepton

10 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

Auffüllen mit dH₂O auf 1000 ml.

Das folgende Protokoll wurde jeweils mit fünf Sarstedt-Gefäßen mit je 40 ml ONC gestartet.

Protokoll zur Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Punkte fünf bis 16 werden auf Eis durchgeführt.

- 1.) Ansetzen von 100 ml ONC in 2x-TY-Medium
- 2.) Einstellung einer OD von 0,05 in 200 ml 2x-TY-Medium
- 3.) Wachstum bis zu einer OD von 0,5
- 4.) Je 40 ml der Suspension werden in ein Sarstedt-Röhrchen gefüllt
- 5.) 20 min auf Eis stellen
- 6.) Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 8 min
- 7.) Entfernen des Überstandes
- 8.) Resuspendieren des Pellets in 40 ml 10%igen eisgekühlten Glycerin
- 9.) Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 8 min
- 10.) Entfernen des Überstandes
- 11.) Resuspendieren des Pellets in 20 ml 10%igen eisgekühlten Glycerin
- 12.) Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 8 min
- 13.) Vereinigen aller Pellets aus den fünf Sarstedt-Gefäßen in 10 ml 10%igen eisgekühlten Glycerin
- 14.) Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 6 min
- 15.) Resuspendieren des Pellets in 1 ml 10%igen eisgekühlten Glycerin
- 16.) Aufteilen in 20 Aliquote zu je 50 µl und Lagerung bei -70 °C

Schritt 15 wurde teilweise wiederholt, da die Pellets sehr groß und sehr schmutzig (offensichtlich Asche-Reste von der zum Verschluss der Kolben der ONC-Kultur verwendeten Aluminium-Folie) waren. Trotz dieser Wiederholung waren manche Pellets noch immer stark schwarz-grau eingefärbt.

2.3.3.4 Transformation von Umweltstämmen mit pIN69-Plasmiden

Die Transformation der *Serratia plymuthica*-Stämme erfolgte nach folgendem Protokoll für elektrokompetente Umweltstämme:

- 1.) Überführen von 50 µl elektrokompetenter Zellen in 2 mm Elektroporationsküvetten auf Eis
- 2.) Hinzufügen von 5 µl Plasmid (max. 1 µg DNA) zu den Zellen und Mischen durch Kippen (es können bis zu 15 µl Plasmid hinzugefügt werden wenn die Plasmid-Konzentration sehr niedrig ist)
- 3.) Inkubation für 10 min auf Eis
- 4.) Elektroporation/Pulse mit dem EC2-Programm (zirka 2,5 kV). Achtung: vor dem Pulsen muss die Küvette trocken und auch kondensierte Feuchtigkeit sauber abgewischt werden.

Material und Methoden

- 5.) Sofortiges Auffüllen mit 950 µl LB- oder SOC-Medium (ohne Antibiotika, um Stress für die Zellen zu vermeiden). Es wurde SOC-Medium verwendet.
- 6.) Inkubation für 60 min bei 37 °C und 250 rpm im Heizblock
- 7.) Ausplattieren von 100 µl auf Selektions-Platten (hier: LB-Agar + 50 µg/ml Trimethoprim)
- 8.) Zentrifugation des restlichen Ansatzes für 2 min bei 2500 rpm und RT, Verwerfen des Überstandes
- 9.) Resuspendieren des Pellets in 100 µl LB-Medium und Ausplattieren auf Selektions-Platten
- 10.) Inkubation der Agar-Platten über Nacht bei 30 °C

Im Fall der Transformation mit pIN69-GFP wurde die Transformation mit höheren Mengen eingesetzter Plasmid-DNA (ein Ansatz mit 15 µl und zwei Ansätze mit 10 µl) durchgeführt, da der Vektor in einer niedrigen Konzentration vorlag.

Die benutzten Elektroporationsküvetten wurden zur Reinigung in eine SDS-Lösung gelegt und anschließend gründlich mit Ethanol und destilliertem Wasser (dH₂O) gespült und in sterilen Petrischalen im Trockenschrank getrocknet.

2.3.3.5 Herstellung von Gefrierkonserven

Zur Herstellung von Gefrierkonserven wurden Reinkulturen der transformierten Zellen auf LB-Agar mit 50 µg/ml Trimethoprim erstellt und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Nach zirka zwölf Stunden wurde jeweils eine große Einzelkolonie in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 700 µl LB-Medium mit 50 µg/ml Trimethoprim überführt und mit 300 µl 50%igen Glycerin (Roth) aufgefüllt. Diese Kulturen wurden unmittelbar darauf bei -70 °C eingefroren.

Sollen sehr schwach wachsende Zellen konserviert werden, kann ein Eppendorf-Gefäß mit 750 µl LB-Medium + 50 µg/ml Trimethoprim und einer Kolonie über Nacht geschüttelt inkubiert werden und erst im Anschluss 250 µl mit 50%igem Glycerin hinzugefügt und die Kulturen anschließend bei -70 °C eingefroren werden.

2.3.4 Aussaat und Kultivierung der Pflanzen

Die Experimente wurden im Gewächshaus bei 23 °C mit 13 Stunden künstlicher Belichtung der Pflanzen durchgeführt.

2.3.4.1 Experimente in Töpfen

Pro Behandlung, Kulturpflanzentyp und Substratvariante wurden drei Töpfe mit je 10 cm Durchmesser mit je fünf Samen bestückt. Mais- und Kürbissamen wurden zirka 3 cm tief, Tomatensamen zirka 1 cm tief gesetzt. Bei Versuch 1 wurde nach der Aussaat jede Wanne mit 13 beziehungsweise 14 Töpfen mit Behandlungen in Standarderde mit 2,5 Liter und jede Wanne mit Behandlungen in Kokos-Substrat mit einem Liter gegossen. Nach drei Tagen war das gesamte Wasser aufgesogen und jeder Topf wurde mit einem eigenen Untersetzer versehen, um zukünftige Vermischungen von abrinndem Wasser, in welchem sich möglicherweise die applizierten Mikroorganismen befinden zu verhindern.

In Versuch 2 wurden die Wannen mit belasteter Erde mit 3 Litern Wasser eingegossen, was jedoch zirka 750 ml zu viel waren, welche nach 2,5 Tagen abgegossen werden mussten. Bei allen folgenden Versuchen wurde von Anfang an pro Topf ein eigener Untersetzer verwendet.

An den darauf folgenden Tagen wurden die Töpfe (je nach vorhandener Feuchtigkeit) jeweils pro Versuch mit der gleichen Menge Leitungswasser gegossen, wobei 100 ml/Topf das Maximum zu sein scheint. Die Anzahl der aufgelaufenen Pflanzen wurde regelmäßig ermittelt und bei Abbruch des Experiments die oberirdischen Pflanzenteile gewogen.

Bei der Gießvariante (V6) wurde die verwendete Erde zwei Mal im Abstand von drei Tagen autoklaviert und alle Behelfsmittel (Töpfe, Untertöpfe, Wannen und Deckel) zwei Mal im Abstand von drei Tagen mit Bacillol stark eingesprüht.

2.3.4.2 Experimente in Keimfiltern

Bei diesen Versuchen wurden die durchsichtigen Plastik-Behältnisse und deren Deckel, die als Stützen für die Keimfilter dienenden Duran Flaschen sowie die Keimfilter selbst autoklaviert und die gepressten Samen unter sterilen Bedingungen im Falz der Keimfilter platziert.

Da in diesen Versuchen eine Reisolation der gepressten Samen von Wurzeln und Blättern sowie eine Mikroskopie von Pflanzenteilen stattfanden, wurden hier immer pIN69-transformierte *S. plymuthica* Stämme verwendet.

Nach dem Samentauchbad wurden je drei bis sechs Kürbis-Samen pro Keimfilter platziert, welcher zuvor bereits mit 20 ml sterilisiertem destilliertem Wasser eingegossen wurde. Beim Setzen der Samen in die Keimfilter sollte das Filterpapier so nass sein, dass es am Plastik anklebt. Weiters ist darauf zu achten, dass sich der Falz über den platzierten Samen so gut wie möglich schließt, da Licht die Keimung beeinflussen kann. Aus demselben Grund empfiehlt es sich, die Keimfilter bis drei Tage

Material und Methoden

nach der Inokulation dunkel zu stellen oder abzudecken. Zwei bis drei Keimfilter pro Behandlung wurden nebeneinander in die Behältnisse gestellt und mit einer Duran Flasche stabilisiert. Hier ist zu beachten, dass die Keimfilter dermaßen platziert werden, dass jene Seite, auf welcher die Wurzeln wachsen werden (die Seite mit dem Falz) in den Stapel der Keimfilter hineinzeigt, da übermäßiges Licht an den Wurzeln zu einer erhöhten Produktion stark autofluoreszierender Stoffe führen kann, welche später beim Mikroskopieren hinderlich sein könnten.

Nachdem die Samen angewachsen waren, musste der Deckel der Behältnisse entfernt werden und stattdessen ein weiterer (umgedrehter) steriler Plastik-Behälter als Abdeckung verwendet werden. Wie in Abbildung 5 links ersichtlich, wurden die beiden Behälter mit Parafilm und Klebeband abgedichtet. Bis zum Abbruch des Experiments, elf bis 14 Tage nach der Inokulation der Samen (dpi; days post inoculation), wurde je nach Bedarf ein bis zwei Mal mit sterilem Wasser nachgegossen.



Abbildung 5: Versuche in Keimfiltern: rechts: mit einer Mischung aus 3Rp8 und S13 behandelte Pflanzen aus Versuch V10, 6 dpi; links: Keimfilter aus Versuch V14 bei Abbruch des Versuchs, 12 dpi.

2.3.4.3 Experimente mit Mikronährstoffen in Pflanzenagar-Platten

Zum Testen des Einflusses von Mikronährstoffen auf die Keimung und Entwicklung der jungen Kürbispflanzen sowie auf die Kolonisierung durch Antagonisten wurde in Versuch 11 ein Experiment mit Pflanzenagar (Duchefa Biochemie Plant Agar, Aufwandsmenge 6 g/l) erstellt. Dem Pflanzenagar wurden einerseits Mikronährstoffe nach Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962) sowie nach Gamborg (Gamborg, *et al.*, 1968) jeweils in der Standardkonzentration (4,4 beziehungsweise 3,2 g/l Medium) sowie in 10-facher Konzentration zugesetzt. Die Kürbissamen wurden leicht in den Agar eingedrückt.

2.3.4.4 Sterilitätskontrolle und Reisolierung der applizierten *Serratia*-Stämme

Zwecks Sterilitätskontrolle wurden je drei mit 96%igen Ethanol oberflächensterilisierte Samen auf eine Agarplatte gelegt und die geschlossene Petrischale geschüttelt. Anschließend wurden die Petrischalen mit den Samen über Nacht im 30 °C-Schrank gelagert.

Zur Mikroskopie der transformierten *Serratia*-Stämme im Samen wurden geprimte Samen in eine Petrischale gelegt, die mit sterilem Filterpapier ausgelegt war und 5 ml steriles dH₂O hinzugefügt. Nach einem Tag wurden die Samen zerschnitten und mikroskopiert. Weiters wurden nach einem Tag von diesen Samen kleine Stücke der Samenhaut und des Keimblattes auf LB-Agar (ohne Antibiotika) "ausgestrichen".

Bei den Versuchen in Keimfiltern mit transformierten Stämmen sowie bei einem Nebenversuch mit transformierten Stämmen in Erde wurden von je zwei Pflanzen/Behandlung die Wurzeln und Sprosse gewogen und anschließend mit 5 ml 0,85%igen NaCl in einem sterilen Whirl-pak[®]-Beutel (Nasco) zerrieben. Verschiedene Verdünnungsstufen (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2}) dieser Suspension wurden auf LB-Agar (mit oder ohne Trimethoprim) ausplattiert, bei 30 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für zwei Tage inkubiert und die Zellzahl unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzsignals der transformierten Stämme bestimmt.

Die Differenzierung von reisolierten Kolonien aus einer Misch-Behandlung mehrerer Stämme erfolgte, indem die Agar-Platten im Bio-Rad ChemiDoc[™] XRS System mit den für die jeweiligen fluoreszierenden Stämme notwendigen Protokoll (Lichtquelle-Filter-Kombination) hintereinander beleuchtet wurden, ein Bild pro Protokoll ausgedruckt und die Bilder der selben Platte verglichen wurden. Kolonien, die ein starkes Signal in einem der Protokolle zeigten und ein schwaches in den anderen wurden dem jeweiligen zum Protokoll gehörenden Fluoreszenzprotein (und damit dem korrekten bakteriellen Stamm) zugeordnet. Kolonien, die in allen Protokollen für Fluoreszenz-Proteine ein schwaches Signal zeigten oder in ihrer Erscheinung (Farbe, Kolonieform) abweichend waren wurden als Kontamination eingestuft. Die stärksten Fluoreszenzsignale wurden gemessen, wenn die Platten zuerst über Nacht bei 30 °C bebrütet und anschließend noch ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden.

2.3.4.5 Alternative Testmethoden

Um das Keimverhalten besser untersuchen zu können und Methoden zu finden, welche weniger Erde benötigen, wurden einige Samen in Petrischalen (mit und ohne Zuhilfenahme von Filterpapier in verschiedenen Größen für die Zurückhaltung von Erde), in Glasschalen sowie in Eppendorf-Gefäße gesetzt. Bei den Versuchen mit einem Filter hat es sich bewährt, vor Zugabe des Substrates den Filter mit Wasser an die Petrischale „anzukleben“. Die Eppendorf-Gefäße wurden leer, nach Zugabe von

Erde und nach Zugabe des Samens gewogen. Damit könnten in größeren Versuchen exaktere Daten bezüglich der erzeugten Biomasse (inklusive der Wurzeln) gewonnen werden. Die Gefäße wurden in einem Ständer in ein großes Plastikgefäß mit Deckel gestellt, in welches Wasser gefüllt wurde. Durch die hohe Luftfeuchtigkeit trocknete die Erde in den Gefäßen auch über das Wochenende nicht aus. Gegossen wurde mit einer Pipette.

2.3.5 Übersicht Versuche

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche und führt die verwendeten Saatgutchargen, Substrate und Bedingungen an.

Tabelle 7: Übersicht der Versuche zum Effekt der bakteriellen Isolate auf die Kulturpflanzen

Versuch	Kultur	Substrat	Bedingungen	Isolate
V1	M, K ₁₂ , T	Std.ET	unsteril	Priming mit allen 8 Umweltstämmen + KTU
V1	T	Kokos	unsteril	Priming mit allen 8 Umweltstämmen + KTU
V2	M, K ₁₂ , T	Bel.E	unsteril	Priming mit allen 8 Umweltstämmen + KTU
V3	K ₁₂	Bel.E	unsteril	Priming mit 3Re4-18 , S13, 3Rp8, P69, ep17, B2G, KTU, ORI
V4	K ₁₂	Std.ET, NÖ-E,	unsteril	Priming mit 3Rp8 und S13 einzeln sowie in Kombination, KTU
V4	T	Bel.E	unsteril	Priming mit 3Rp8 und S13 einzeln sowie in Kombination, KTU
V4	M	Bel.E	unsteril	Priming mit B2G, 3Re4-18 , P69 einzeln sowie in Kombination, KTU
V5	K ₁₂	Std.ET	unsteril	Priming mit 3Rp8 und S13 einzeln sowie in Kombination, KTU
V6	K ₁₂	Std.ET	steril	Gießvarianten mit 3Rp8 und S13 einzeln sowie in Kombination, ORI
V7	K ₁₂	Keimfilter	steril	Priming mit 3Rp8 –DsRed2 und S13-GFP einzeln sowie in Kombination, KTU
V8	K ₁₂	Keimfilter	steril	Priming mit 3Rp8 -DsRed2, 3Rp5-GFP, 4Rx13-mNeptune, einzeln sowie in ausgewählten Kombination, KTU
V9	K ₁₂	Std.ET	unsteril	Priming mit 3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13, einzeln sowie in ausgewählten Kombination, KTU
V10	K ₁₃	Keimfilter	steril	Dosis-Wirkungs-Test für Priming mit 3Rp8-DsRed2, 3Rp5-eBFP2, 4Rx13-mNeptune, S13-GFP, KTU
V11	K ₁₂	Pflanzen-agar	steril	Priming mit 3Rp8-DsRed2, KTU und ORI auf Pflanzenagar mit verschiedenen Mikronährstoffen
V12	K ₁₂ , K ₁₃	Keimfilter	steril	Wurzeltauchbad mit 3Rp5-eBFP2, 3Rp8-DsRed2, 4Rx13-eBFP2, S13-GFP einzeln sowie in ausgewählten Kombinationen, KTU
V13	K ₁₃	Keimfilter	steril	Dosis-Wirkungs-Test für Priming mit 3Rp8-DsRed2, S13-GFP einzeln sowie in ausgewählten Kombinationen, KTU
V14	K ₁₃	Keimfilter	steril	Dosis-Wirkungs-Test für Priming mit 3Rp8-DsRed2, S13-GFP und Mischung dieser, Konfrontations-Test von 3Rp8-DsRed2 gegen 3Rp5-GFP und 4Rx13-mNeptune

2.4 Screening pilzlicher Isolate und Transportversuche

Bei den pilzlichen Isolaten wurde ebenfalls auf bereits charakterisiertes Material zurückgegriffen, welches in Tabelle 8 aufgelistet wird.

Tabelle 8: Abkürzung, Bezeichnung und Referenz der im Zuge der Experimente verwendeten Pilzisolat

Abkürzung	Bezeichnung des Isolats	Herkunft/Referenz
G1/8	<i>Trichoderma velutinum</i> G1/8	(Grosch, <i>et al.</i> , 2006)
P1	<i>Trichoderma atroviride</i> P1	(Brunner, <i>et al.</i> , 2005)
A220-2b	<i>Didymella bryoniae</i> A220-2b	(Grube, <i>et al.</i> , 2011)
GL1	<i>Didymella bryoniae</i> GL1	(Grube, <i>et al.</i> , 2011)
SP2	<i>Didymella bryoniae</i> SP2	(Grube, <i>et al.</i> , 2011)
BE3-1-10	Pink fluffy	Stammsammlung Institut für Umweltbiotechnologie TU Graz
RR3-5-16	<i>Epicoccum</i>	Stammsammlung Institut für Umweltbiotechnologie TU Graz
1OCV3	-	(Murgu, 2014)
1OCV4	-	(Murgu, 2014)
1OCV15	-	(Murgu, 2014)
1OCV17	-	(Murgu, 2014)
1PSM2	-	(Murgu, 2014)
1OCM2	-	(Murgu, 2014)

Für einige Transportversuche wurde ein mit einem grün fluoreszierenden Protein- markierter *Trichoderma velutinum* G1/8 Stamm verwendet, der im Folgenden als G1/8-GFP abgekürzt wird. Der Stamm *Trichoderma velutinum* G1/8 wurde von einer Arbeitsgruppe zum Thema pilzlicher Antagonisten gegen *Rhizoctonia solani* (Grosch, *et al.*, 2006) isoliert. Im Zuge weiterer Forschung zu diesem Thema wurde der Stamm am Institut für Umweltbiotechnologie an der TU Graz mit dem Vektor pIGPAPA transformiert, welcher eine Hygromycin B-Resistenz und ein GFP-Gen unter der Kontrolle eines Isocitrat-Lyase-Gen-Promotors von *Neurospora crassa* trägt (Zachow, *et al.*, 2010). Die Kultivierung erfolgt auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA) mit Hygromycin B (Hersteller: Invitrogen Katalognummer 10687-010) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, wobei zur Herstellung dieser Platten ein flüssiger Hygromycin B-Stock mit 50 mg/ml in PBS verwendet wurde.

Zur Herstellung von Gefrierkonserven wurden Reinkulturen der pilzlichen Isolate auf PD-Agar inokuliert und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Je nach Isolat wurde nach einigen Tagen nahe der Wachstumsfront mit einem sterilen Skalpell rechteckige Stücke aus dem Agar geschnitten und bis zu sieben Stücke in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Pilzkonservierungs-Medium überführt. Diese Kulturen wurden unmittelbar darauf bei -70 °C eingefroren.

Material und Methoden

Zusammensetzung des Pilzkonservierungsmediums:

Glycerin [99 %]	600 ml/l
Glucose [50 %]	200 ml/l
Pepton [20 %]	100 ml/l
Hefeextrakt [10 %]	100 ml/l

Die Bestandteile wurden separat autoklaviert und nach Abkühlung gemischt.

Transportversuche in standardisierten Petrischalen wurden auf Waksman Agar (WA) durchgeführt. Durch den hohen Zucker- und Nährstoffgehalt soll ein gutes Wachstum sowohl von Bakterien als auch Pilzen erreicht werden.

Zusammensetzung von 1 Liter Medium für Waksman Agar (Berg, *et al.*, 2002):

Proteose-Pepton	5 g
Glukose	10 g
Fleischextrakt	3 g
NaCl	5 g
Agar-Agar (peqGOLD Universal Agarose, peqlab)	20 g
dH ₂ O	auf 1 l auffüllen und einstellen auf pH 6,8.

Transportversuche in Zwei- und Dreikompartiment-Petrischalen wurden auf Kartoffel-Dextrose-Agar in Kombination mit doppelt sterilisierter Standard-Erde durchgeführt.

Zusammensetzung von 1 Liter Medium für Kartoffel-Dextrose Agar (PDA):

Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon (Roth)	26,5 g
Agar-Agar (peqGOLD Universal Agarose, peqlab)	16,0 g
dH ₂ O	auf 1 l auffüllen

2.4.1 Dualkulturplattentests in Standard-Petrischalen

Es stehen vielseitige Möglichkeiten zur Verfügung Dualkulturplattentests zu gestalten. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, kann das pilzliche Isolat neben oder auf dem bakteriellen Isolat platziert werden und umgekehrt. Es können Hürden wie ein Luftspalt, sonstige Barrieren oder Hilfen platziert werden um einen Transport von Bakterien über die Pilzhyphen nachzuweisen. Abbildung 6 zeigt fünf dieser Methoden, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Einem der Partner kann ein zeitlicher Vorsprung gewährt werden oder nicht. Auch sollten unterschiedliche Ausgangskonzentrationen der Inokula getestet werden. Entstehende Hemmhöfe müssen regelmäßig

überprüft werden. Sind pilzliche Isolate in den Screenings miteinbegriffen, empfiehlt sich, eine Lagerung der Platten im Dunkeln um ein Sporulieren photosensitiver Pilze so lange wie möglich zu vermeiden. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (zirka 23 °C) durchgeführt.

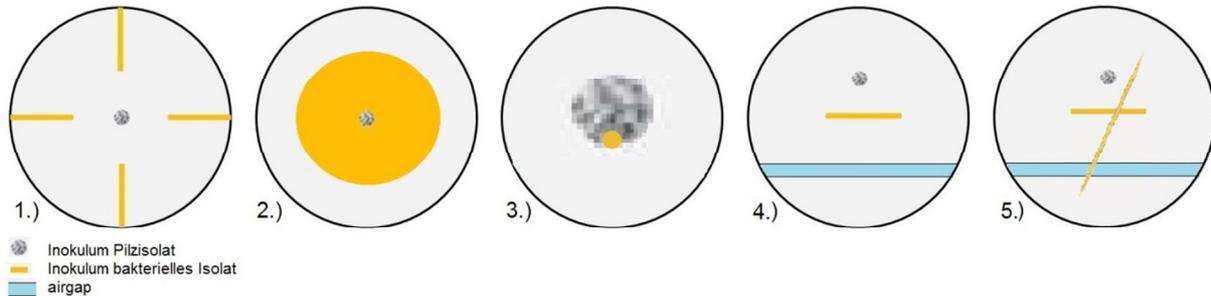


Abbildung 6: Möglichkeiten von Dualkulturplattentests in Standard Petrischalen: 1.) Platzierung des Pilzisolates neben dem bakteriellen Inokulum; 2.) Platzierung des Pilzisolates auf dem bakteriellen Inokulum; 3.) Auftropfen des bakteriellen Inokulums auf das bestehende Pilzmyzel; 4.) Einführung eines Luftspaltes, welcher von den Isolaten überbrückt werden soll; 5.) Platzierung eines Zahnstochers, welcher den Transport über den Luftspalt erleichtern soll.

Dualkulturplattentest VT1

Der Transportversuch VT1 fand auf WA statt, aus welchem 3 cm vom Rand aus gemessen ein 2 bis 5 mm breiter Agar-Streifen entfernt wurde, wodurch ein Luftspalt zwischen zwei nun vollständig getrennten Agar-Stücken entstand. Es empfiehlt sich, die Platten nach dem Herausschneiden der Agar-Streifen und vor Inokulation der Experimente über Nacht bei 30 °C zu lagern, um möglicherweise kontaminierte Platten vorab entfernen zu können. Das pilzliche Isolat wurde am größeren Agar-Stück 1 cm unterhalb des Plattenrandes platziert, indem aus einer frischen Platte mit dem Isolat ein rundes Stück Myzel mit 5 mm Durchmesser ausgestochen und auf die neue Platte übertragen wurde. Im Anschluss wurde 1 cm unter dem Pilzisolat auf einer Länge von 2,5 cm das bakterielle Isolat ausgestrichen, indem eine Kolonie von einer frischen Agar-Platte mit einer Impföse übertragen und verteilt wurde. Die mit diesem Versuchsansatz getesteten Kombinationen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Getestete Kombinationen in Transportversuch VT1

Ziel	Pilzisolat	Bakterielles Isolat
Transportversuch	P1	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Transportversuch	G1/8	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Transportversuch	A220-2b	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Transportversuch	GL1	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Transportversuch	SP2	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Negativkontrolle Pilze	keines	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13
Negativkontrolle Bakterien	P1, G1/8, A220-2b, GL1, SP2	keines

Dualkulturplattentest VT2

Dieser Transportversuch fand wiederum auf WA, jedoch mit einem zirka 1 cm breiten Luftspalt statt. 2 cm über dem Spalt wurde das pilzliche Isolat platziert und zwei Tage nach Inokulation des Pilzes 10 µl Bakterien-Suspension (zirka 10^5 cfu/ml) **auf** die Wachstumsfront des bestehenden Pilzmyzels aufgetropft. Es wurden die pilzlichen Isolate P1, G1/8, RR3-5-16, Be3-1-10, SP2(1), A220-2b(1), 1PSM2, 1OCV4, 1OCV3, 1OCV17 und 1OCV15 jeweils einzeln gegen die beiden *S. plymuthica* Stämme S13 und 3Rp8 getestet.

Dualkulturplattentest VT4

Wie in den Vorversuchen wurde ein zirka 1 cm breiter Luftspalt in den Waksman-Agar geschnitten. 2 cm über dem Spalt wurde das pilzliche Isolat platziert und zwei Tage nach Inokulation des Pilzes 10 µl Bakterien-Suspension (zirka 10^5 cfu/ml) **vor** die Wachstumsfront des Pilzmyzels bogenförmig ausgebracht. Es wurden die pilzlichen Isolate P1, G1/8, RR3-5-16, Be3-1-10, SP2(1), 1PSM2, 1OCV4 und 1OCV3 jeweils einzeln gegen die beiden *S. plymuthica* Stämme S13 und 3Rp8 sowie einer Mischung derer getestet. Abweichend zu VT1 und VT2 wurde hier in einigen Kombinationen eine Wiederholung angelegt, in welcher zusätzlich ein steriler Zahnstocher in die Mitte der Platte gelegt wurde, so dass dieser den Luftspalt überbrückte.

Dualkulturplattentest VT5

Der Transportversuch VT5 war eine Wiederholung von VT4 mit den Isolaten G1/8, RR3-5-16 und Be3-1-10, jedoch betrug die Breite des Luftspaltes nur 5 mm. Die Inokulation der Bakterien-Suspension erfolgte nur wenige Millimeter oberhalb des Luftspaltes vor der Wachstumsfront des Pilzisolates.

Dualkulturplattentest VT8

Der Transportversuch VT8 war eine Wiederholung von VT4 und VT5 mit einem 5 mm breiten Luftspalt. Die Inokulation der Bakteriensuspension erfolgte direkt an der Wachstumsfront des Pilzisolates.

Dualkulturplattentest V9

Versuchsserie V9 ähnelte klassischen Dualkulturplattentest (gezeigt in Abbildung 6, Grafik 1), in welchen die Interaktionen unterschiedlicher Isolate beobachtet werden. Der Fokus lag jedoch darauf, zu testen ob eine Mischung von Isolaten andere Auswirkungen als die jeweiligen Einzelisolate, zum Beispiel auf die Größe des Hemmhofes, hat. G1/8 wurde in Form von Sporen ausgebracht. Je Strich wurden 10 µl der jeweiligen Verdünnung an Zellen beziehungsweise Sporen aufgetragen.

Dualkulturplattentest V10

In Versuchsserie V10 wurden ebenfalls Mischungen von Isolaten getestet, jedoch wurden diese nicht entlang einer Linie ausgebracht, sondern auf der gesamten Agar-Platte ausplattiert. Damit soll der Versuchsansatz näher an natürliche Bedingungen herangeführt werden. Pro Platte wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung an Zellen beziehungsweise Sporen aufgetragen. Um die Ergebnisse besser quantifizieren zu können, wurden bei Abbruch des Versuchs im Bio-Rad-System Bilder der Platten erstellt und anschließend die Fläche des pilzlichen Pathogens mit Hilfe der ImageJ-Software, Version 1.48v (Rasband, 2015) vermessen.

2.4.2 Dualkulturplattentests in Zwei- und Drei-Kompartiment Petrischalen

Um die Testserien näher an natürliche Bedingungen heranzuführen, wurden Mikrokosmos-Experimente mit Zwei- und Dreikompartiment Petrischalen (angelehnt an Warmink & van Elsas, 2009) ebenfalls bei RT durchgeführt. Diese bestanden aus je einem Kompartiment mit PDA (30 min unter der Laminar-Flow-Einheit getrocknet) sowie ein beziehungsweise zwei Kompartimenten mit Standarderde (siehe Tabelle 3), welche mit Abstand von drei Tagen zwei Mal autoklaviert wurde. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, wurde in Transportversuch VT3 ein 1 x 0,5 cm großes Stück Waksman-Agar an den Rand eines Erdkompartiments platziert, um zu detektieren, wann der Pilz diese Stelle erreicht und ob dieser auch die bakteriellen Isolate mitgebracht hat. In das zweite mit steriler Erde befüllte Kompartiment wurde ein mit 96%igen Ethanol gewaschener Kürbissamen platziert. Das Erdkompartiment mit dem Samen wurde mit 3 ml sterilem dH₂O gegossen. Einen Tag nach Inokulation mit einem Stück Pilzmyzel und der Platzierung des Samens wurden 10 µl Bakteriensuspension (10⁴ cfu/ml) bogenförmig nahe der Wachstumsfront des Pilzes ausgebracht. Um den Keimprozess des Kürbissamens nicht zu behindern, wurden die Platten erst drei Tage nach Platzierung des Samens mit Parafilm verschlossen und die Platten bis zum Auflauf im Dunkeln gelagert. In den Transportversuchen VT6 und VT7 wurden, wie in Abbildung 7 gezeigt, nur mehr Zwei-Kompartiment-Petrischalen verwendet. Zudem wurden die Samen derart ausgerichtet, dass die Keimblätter beim Auflauf nicht das PDA-Kompartiment berühren.

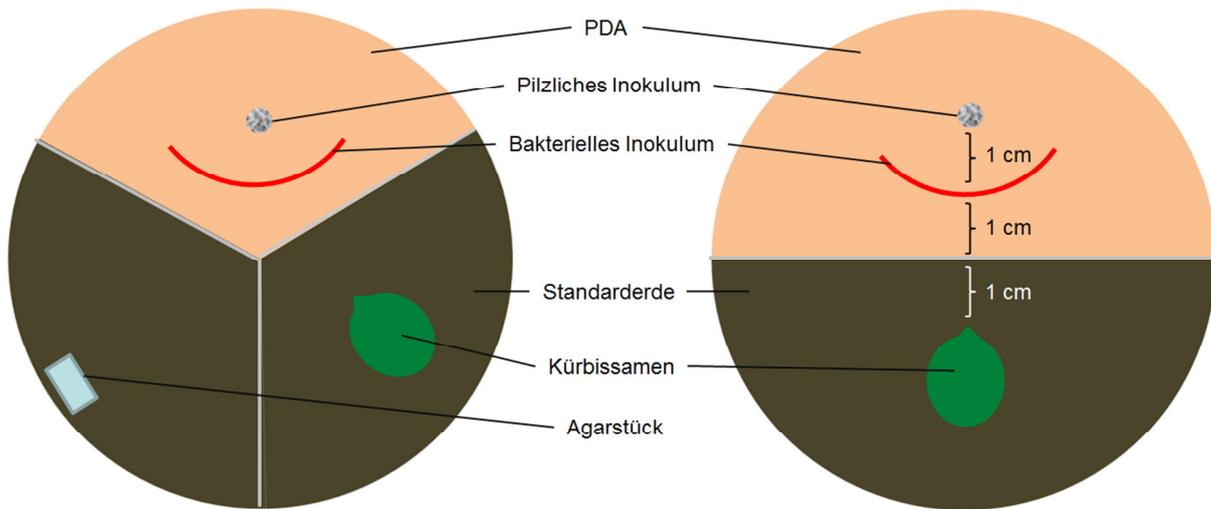


Abbildung 7: Versuchsaufbau von VT3 (links) und VT6 sowie VT7 (rechts) in Zwei- beziehungsweise Drei-Kompartiment-Petrischalen.

Als weitere Versuchsvariante wurden in Transportversuch VT6 das Pilzinokulat neben die bereits aufgelaufene Pflanze in der Standarderde platziert und 10 µl des bakteriellen Isolates (10^4 cfu/ml) auf die Hauptwurzel kurz unter dem Sprossansatz getropft. Mit diesem Versuchsansatz sollte ein Transport entlang der Pflanze gezeigt werden. Für den Fall, dass die Stämme gemeinsam mit den Wurzeln auf der Agar-Platte ankommen, würde sie auf dieser schnell dicht anwachsen und leicht detektiert werden können. Die Deckel der Petrischalen wurden entfernt und jeder Ansatz separat in eine sterile Plastikbox platziert.

Transportversuch VT7 war eine Wiederholung von VT6, jedoch wurde hier das GFP-markierte G1/8-Isolat verwendet.

2.5 Equipment zur Analyse von Fluoreszenz-Signalen

2.5.1 Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System mit Universal Hood III

Das Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System ist ein System zur Detektion von Fluoreszenz und kolorimetrischen Daten, welches mit einer lichtdichten Kammer ausgestattet ist, die die UV- und Weißlichtquelle sowie eine CCD-Kamera beinhaltet. Mögliche Lichtquelle-Einstellungen sind keine Lichtquelle, UV Trans, Red Epi, Green Epi, Blue Epi, White Epi und Blue trans Belichtung. Mögliche Filtereinstellungen sind kein Filter, Standard Filter, 695/55, 605/50 sowie 530/28 Filter. Ein Bio-Rad Protokoll beschreibt eine Kombination von Lichtquellen- und Filtereinstellungen zur Detektion eines erwarteten Signals. Die Image Lab Software Version 4.0.1 wurde verwendet, um die Fluoreszenz von transformierten Stämmen oder Isolaten auf Agar-Platten oder auf Pflanzenteilen zu dokumentieren sowie um schwarz-weiß-Fotos von Platten und Pflanzen zu erstellen.

2.5.2 Motic AE31 Mikroskop

Zur Überprüfung ob eine Transformation mit GFP- oder DsRed2-tragenden Vektoren erfolgreich war oder ob die transformierten Bakterien nach längerer Zeit nach dem ST noch am Samen nachweisbar sind, können die Kolonien auf Agar oder kleine Stücke der Samenhaut und des Keimblattes am Motic AE31 Mikroskop untersucht und die Bilder mit Hilfe der Software Motic Images Advanced 3.2. gespeichert werden. Mit diesem Mikroskop können drei Arten von Filtern verwendet werden: DIA-ILL (Durchlicht), TRITC Rhodamine (605/55 nm) und GFP (525/50 nm), welche die Unterscheidung zwischen mit GFP- oder DsRed2-Vektoren transformierten und untransformierten Stämmen möglich machen.

2.5.3 Konfokales Laser Scanning Mikroskop Leica DM5500Q

Für hochauflösende Bilder wurde das TCS SP konfokale Laser Scanning Mikroskop DM5500Q von Leica Microsystems, Wetzlar/Deutschland verwendet. Im Vergleich zu einem Epifluoreszenz-Mikroskop werden bei einem konfokalen Mikroskop Signale aus Ebenen, die sich nicht im Fokus befinden, ausgeblendet, was zu einer höheren Schärfe des Bildes führt. Für die konfokale Mikroskopie standen bei diesem Mikroskop vier Laser der Laserklasse 3B zur Anregung der Proben zur Verfügung (635, 488 und 532 nm im sichtbaren sowie 405 nm im UV-Bereich). Die Filter für den Emissionsbereich können manuell variabel eingestellt werden. Es können acht Kanäle für Fluoreszenz-Licht und einer für Durchlicht sequenziell analysiert werden. Im Scann-Vorgang wird Licht eines Lasers mit einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) auf die Probe geführt, welche Licht in einer im Lichtspektrum Richtung rot verschobenen Wellenlänge emittiert (Emissionswellenlänge). Dieses Licht wird über das Objektiv durch ein Pinhole an den Detektor geführt. Ein Photomultiplier wandelt das analoge Signal in einen Elektronenfluss um, amplifiziert diesen zwischen elektrischen Spiegeln und leitet das Signal an den Computer weiter. Die Software wandelt schließlich die Signale in Pixel eines digitalen Bildes um, wobei jeder vom Laser angeregte Punkt einem Pixel entspricht. Die Erstellung und Verarbeitung der Bilder erfolgte in der Software LAS AF Version: 2.60 build 7266 (© 1997 – 2011 Leica Microsystems CMS GmbH).

Das Mikroskop beinhaltet auch eine Leica DFC360FX Kamera zur Aufnahme von nicht-konfokalen, filter-basierenden Fluoreszenz-Licht. Für diese Mikroskopie stehen drei voreingestellte Anregungs- und Filterwürfelkombinationen zur Verfügung (A, GFP und N2.1).

Bei der Auswahl von Wurzelstücken für die Mikroskopie ist darauf zu achten, dass die Wurzeln möglichst im Dunkeln wachsen konnten und auch während den Vorbereitungsarbeiten für die Mikroskopie möglichst vor Licht geschützt gelagert werden, um eine Bildung stark autofluoreszierender Stoffe zu vermeiden.

Analyse von mit einem Fluoreszenzprotein markierten Stämmen

Die aufgrund des pIN69-Plasmids produzierten Fluoreszenz-Proteine werden vom Laser des Mikroskops angeregt und das emittierte Licht im Bereich des angegebenen Emissionsspektrums erfasst. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der einzelnen Proteine sind im Kapitel 2.5.4 zusammengefasst.

Eine Offset-Einstellung (Verarbeitung des Hintergrundsignals) von zirka -0,57 hat sich in den meisten Fällen bewährt, die Einstellungen des Gains (Ausmaß der Amplifizierung des Signals durch den Photomultiplier) variierte je nach Probe zwischen 1230 und 100. Die Laser mit Wellenlängen von 405, 488 und 532 nm wurden mit einer Intensität von 40 % betrieben, die Laserintensität des Lasers für 635 nm wurde auf bis zu 100 % erhöht. Alle getätigten Einstellungen werden für jedes Bild separat in einer .xml Datei abgespeichert und können somit jederzeit nachvollzogen werden.

Die besten Bilder konnten erzeugt werden, wenn die Wurzelstücke direkt in einem auf einer Seite aufgeschnittenen Keimfilter mit einer Rasierklinge abgeschnitten wurden und ohne jede weitere Bearbeitung auf einen Objektträger mit einer Einbuchtung von 1,2 mm (Thermo Fisher Scientific) gelegt wurden, auf welchem sich bereits zirka 80 µl 0.85%iges NaCl befanden. Anschließend wurde darauf ein Deckglas platziert (möglichst ohne dass sich darunter Luftblasen bildeten) und mit Nagellack alle vier Ränder dicht verschlossen.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) ist eine Methode, um auch nicht mit einem Fluoreszenz-Protein transformierte Zellen in ihrer natürlichen Umgebung spezifisch anzufärben. Dazu werden fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotide (Sonden) verwendet, die spezifisch für die jeweils gewünschte Analyse sind und welche an die in den Ribosomen gebundene rRNA der Zielzellen binden. Je nach verwendetem Oligonukleotid können alle Vertreter einer Domäne (zum Beispiel alle Bakterien), oder spezifisch alle Vertreter einer Klasse, Ordnung, Familie, Gattung, Art oder ein einzelner spezifischer Stamm markiert werden. Ein Bakterium kann mit mehreren unterschiedlichen Sonden gleichzeitig markiert werden, zum Beispiel mit einer universellen Sonde für alle Bakterien und einer spezifischen Sonde für eine Klasse, um damit zum Beispiel Autofloreszenz-Signale von Nicht-Bakterien ausschließen zu können.

Aus Versuch V6 (Gießvariante Kürbis) wurden Blätter und Wurzeln einer Pflanze entnommen, die in steriler Standarderde angezogen und mit einer 3Rp8-DsRed2 Suspension gegossen wurde, sowie Blätter und Wurzeln einer Pflanze der Negativkontrolle (ORI).

Damit ein möglichst realitätsnahes Bild der bakteriellen Besiedelung einer Probe entsteht, mussten die Bakterien in ihrer Umgebung fixiert werden. Es wurde eine **Ethanol-Fixierung** gewählt, bei welcher die Probe mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit

Material und Methoden

gleichen Teilen PBS und 96%igen Ethanol bedeckt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Vor der Mikroskopie wurde die Probe drei Mal mit ddH₂O gewaschen.

Für die ***in situ* Hybridisierung** wurde ein „in tube“ FISH-Protokoll, angelehnt an Cardinale, *et al.* (2008), angewendet, welches für Gammaproteobakterien angepasst wurde:

1. Hinzugabe von 200 µl des ersten Hybridisierungs-Puffers (Zusammensetzung siehe Tabelle unten, spezifische FISH-Sonde + Kompetitor); Inkubation für 90 - 180 min bei 41 °C im Dunkeln.
2. Entfernen des Hybridisierungs-Puffers und zweimaliges Waschen des Präparates mit 500 µl vorgewärmten (42 °C) Wasch-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle unten).
3. Hinzugabe von 1 ml Wasch-Puffer und Inkubation in einem Wasserbad für 10 - 15 min bei 42 °C.
4. Entfernen des Wasch-Puffers.
5. Hinzugabe des zweiten Hybridisierungs-Puffers (Zusammensetzung siehe Tabelle unten, Sonde: EUBMix) und Inkubation für 90 – 180 min bei 41 °C im Dunkeln.
6. Entfernen des Hybridisierungs-Puffers und zweimaliges Waschen des Präparates mit 500 µl vorgewärmten (42 °C) Wasch-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle unten).
7. Hinzugabe von 1 ml Wasch-Puffer und Inkubation in einem Wasserbad für 10 – 15 min bei 42 °C.
8. Entfernen des Wasch-Puffers und Waschen des Präparates mit 500 µl eisgekühlten ddH₂O um alle Salze zu entfernen.
9. Platzieren der Präparate auf einem Objektträger und schnelles vorsichtiges Trocknen mit Druckluft.
10. Sofortiges Bestreichen der Präparate mit ProLong Gold antifadent. Lagerung der Objektträger für 24 Stunden im Dunkeln bei RT und versiegeln des Deckglases mit Nagellack am nächsten Tag.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Hybridisierungs-Puffers

Volumangaben in µl	Formamid-Konzentration								
	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %
5 M NaCl	36	36	36	36	36	36	36	36	36
1 M Tris/HCl	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2 % SDS	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Formamid	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ddH ₂ O	138	128	118	108	98	88	78	68	58
FISH-Sonde	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 11: Zusammensetzung des Wasch-Puffers

Volumangaben in μl	Formamid-Konzentration*								
	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %
5 M NaCl	450	318	215	149	102	70	46	30	18
1 M Tris/HCl	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,5 M EDTA	0	0	50	50	50	50	50	50	50
ddH ₂ O	4450	4582	4635	4701	4748	4780	4804	4820	4832

* Es ist die selbe Formamid-Konzentration wie im Hybridisierungspuffer zu verwenden.

Passend zur phylogenetischen Einordnung des *Serratia plymuthica* 3Rp8-Stammes in die Klasse der Gammaproteobakterien wurden die in Tabelle 12 angeführten FISH-Sonden ausgewählt.

Tabelle 12: Im Hybridisierungspuffer verwendete FISH-Sonden

Sonden-Name	Sequenz (5'-3')	Marker	Zielorganismus	Referenz
GAM42a***	GCC TTC CCA CAT CGT TT	Cy5	Gamma-Proteobakterien	(Manz, <i>et al.</i> , 1992)
GAM42a-competitor	GCC TTC CCA CTT CGT TT	/	Beta-Proteobakterien	(Manz, <i>et al.</i> , 1992)
universal probe EUB338-MIX	GCT/A GCC T/ACC CGT AGG A/TGT	Cy3	die meisten Bakterien	(Amann, <i>et al.</i> , 1990) (Daims, <i>et al.</i> , 1999)
Negativkontrolle NONEUB-Cy5	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Cy5	/	(Wallner, <i>et al.</i> , 1993)

Abweichend zu dem dargestellten Protokoll für die Hybridisierung, wurden die in Tabelle 13 dargestellten Mengen an Sonden verwendet. Es wurde eine Formamid-Konzentration von 45 % im ersten und eine Konzentration von 20 % im zweiten Hybridisierungsschritt verwendet.

Tabelle 13: Menge verwendeter FISH-Sonden pro Hybridisierungsschritt

Sonden-Name	Konzentration Sonde	eingesetzt
GAM42a***	500 ng/ μl	4 μl
GAM42a-competitor	500 ng/ μl	4 μl
universal probe EUB338-MIX	300 ng/ μl	8 μl
Negativkontrolle NONEUB-Cy5	400 ng/ μl	4 μl

Für das im Ergebnisteil in Abbildung 77 gezeigte Bild wurden die in Tabelle 14 gezeigten Einstellungen der Kanäle für die Marker vorgenommen. Zur Darstellung des Pflanzengewebes wurden die Einstellungen des DAPI-Kanals verwendet.

Tabelle 14: Daten zur Detektion der Sonden in der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Marker	Sondenspezifische Daten		Verwendete Einstellungen			
	Anregungs- wellenlänge	Emissions- maximum	Laser	Laser- intensität	Gain / Offset	Emissionsfilter
Cy3	550 nm	568 nm	532 nm	100 %	1250 / -2	551 – 592 nm
Cy5	649 nm	670 nm	635 nm	60 %	1099 / -1	657 – 693 nm
DAPI	-	-	405 nm	44 %	100 / 0	423 – 476 nm

2.5.4 Zusammenfassung der Möglichkeiten zur Fluoreszenzüberprüfung

Nachfolgende Tabelle fasst die Möglichkeiten und die dazu notwendigen Einstellungen für eine Detektion der Fluoreszenz der pIN69-markierten Stämme zusammen.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Möglichkeiten zur Fluoreszenzüberprüfung der mit pIN69 transformierten Stämme

Plasmid pIN69 (Trimethoprim-Resistenz, 50 µg/ml Tp im Medium)						
Fluoreszenzprotein	eBFP2	GFP	ZsYellow	DsRed2	mNeptune	
Anregungswellenlänge nm	383	475	529	563	600	
Emissionsmaximum nm	448	505	539	583	650	
Überprüfungsmöglichkeiten der Fluoreszenz						Hinweise
Fluoreszenzprotein	eBFP2	GFP	ZsYellow	DsRed2	mNeptune	
Motic AE31 Mikroskop: Überprüfung auf Agar-Platten oder am Pflanzengewebe						
	nicht möglich	GFP-Filter 525/50 nm	GFP-Filter 525/50 nm	TRITC-Filter 605/55 nm	nicht möglich	GFP und ZsYellow schwer zu unterscheiden
Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System: Überprüfung auf Agar-Platten oder am Pflanzengewebe						
Anregungslicht	blue epi	blue epi	blue/green epi	green epi	red epi	eBFP2, GFP und ZsYellow nicht, GFP, DsRed2 und mNeptune sehr gut zu unterscheiden
Emissionsfilter	Filter 4: 530/28	Filter 4: 530/28	Filter 4: 530/28	Filter 3: 605/50	Filter 2: 695/55	
Leica DM5500Q nicht-konfokal: Überprüfung in Suspension oder am Pflanzengewebe						
	GFP	GFP	N2.1 und GFP	N2.1	N2.1	DsRed2 und mNeptune sowie eBFP2 und GFP überlagern sich teilweise im Anregungsbereich
Leica DM5500Q konfokal: Überprüfung in Suspension oder am Pflanzengewebe						
Anregung Laser in nm	405	488	532	532	635 (532)	405 (DAPI)
Emissionsfilter nm	495 - 546	495 - 550	535 – 580	580 - 640	640 - 685	403 – 488 Pflanzengewebe eBFP2 schwer vom Kürbis-Pflanzengewebe zu unterscheiden

2.6 Sequenzierung, Annotierung und *in silico* Analyse der *Serratia plymuthica* Stämme

Aufgrund der guten Ergebnisse des 3Rp8-Stammes im Zuge der Experimente dieser Masterarbeit und der erfolgversprechenden Ergebnisse des 3Re4-18-Stammes in anderen Arbeitsgruppen des Instituts für Umweltbiotechnologie wurden diese beiden Stämme sequenziert, um mögliche genetischen Funktionen zu ergründen, die für die Pflanzenwachstumsförderung und die Biokontrollaktivität ausschlaggebend sein könnten. Das Genom des *S. plymuthica* Stammes S13 ist in der NCBI-Datenbank unter der Akzessions-Nummer NC_021659.1 (CP006566.1) veröffentlicht (Müller, *et al.*, 2013), jenes des *S. plymuthica* 4Rx13 unter NC_021591.1 (CP006250.1) (Thuermer, *et al.*, 2009). Da der Stamm 4Rx13 ein Plasmid trägt, welches unter NC_021594.1 (CP006251.1) veröffentlicht ist (Thuermer, *et al.*, 2009), wurde die Plasmidsequenz für die vergleichenden Genomanalysen am Ende der DNA- beziehungsweise Protein-Sequenz des Hauptchromosom hinzugefügt.

Isolierte, aufgereinigte DNA einer Kultur der Stämme *Serratia plymuthica* 3Rp8 und 3Re4-18 wurde von Hrn. Dr. Müller vorbereitet und versendet und mittels PacBio RSII Technologie sequenziert. Es wurde eine *de novo* Assemblierung mit dem Celera Assembler und dem „Hierarchical genome assembly process v. 2.2.0“ durchgeführt.

2.6.1 NCBI Annotation und Veröffentlichung

Die Genome der Stämme 3Rp8 und 3Re4-18 wurden für die Veröffentlichung in NCBI vorbereitet. Für die beiden Genome wurde online ein gemeinsames Bioproject (PRJNA289082) sowie zwei separate Biosamples (SAMN03841799 für 3Rp8 und SAMN03841798 für 3Re4-18) angelegt und Daten zur Herkunft der Stämme hinterlegt.

Die Information zu den Biosamples ist wichtig, um für andere User einen Kontext zu den hochgeladenen Daten bereitzustellen, damit diese besser verstanden werden können, die Weiterverwendung der Daten gefördert, eine Aggregation und Integration unterschiedlicher Datensets ermöglicht und die Gewinnung neuer Einsichten und Entdeckungen über einen großen Bereich biologischer Forschungsfelder erleichtert wird (Barrett, 2013).

Um die DNA-Sequenz bei NCBI einreichen zu können, muss ein genau definiertes Format eingehalten werden. Hierzu wurde das Softwarepaket „Sequin“ installiert, über dessen Oberfläche jene Daten erfasst werden können, die bei Veröffentlichung im Kopf des Genbank-Files aufscheinen werden. Weiters kann die DNA-Sequenz in das Tool geladen werden um gemeinsam mit den sonstigen Daten bei NCBI für die Annotierung eingereicht zu werden.

Material und Methoden

Die Annotationen für die beiden Stämme fanden am 15.07.2015 mit der NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013, Software revision 2.10) statt, wobei die Methoden „Best-placed reference protein set“ und GeneMarkS+ angewendet wurden.

Die Genom-Annotation in NCBI ist ein mehrstufiger Prozess, welcher die Vorhersage von Protein-codierenden Genen sowie anderen funktionellen Genom-Bereichen wie strukturelle RNAs, tRNAs, small RNAs, Pseudogenen, Kontroll-Regionen, Sequenzwiederholungen, Insertions-Sequenzen, Transposons und anderen mobilen Elementen inkludiert. Die automatische NCBI Annotation-Pipeline kombiniert *ab initio* Gen-Vorhersage-Algorithmen mit Homologie-basierenden Methoden (Tatusova, *et al.*, 2013).

2.6.2 BASys Annotation

BASys (Bacterial Annotation System) ist ein Web Server, der automatisierte Tiefen-Annotationen von bakteriellen genomischen chromosomalen und Plasmid-DNA-Sequenzen erstellt. BASys benutzt mehr als 30 Programme um an die 60 Annotations-Subpunkte für jedes Gen, zum Beispiel Gene/Protein-Name, GO Funktion, COG Funktion, mögliche paraloge und orthologe Gruppen, Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, subzellulare Lokalisierung und viele mehr in Form von .ecard-Files bereitzustellen. Daneben können grafische Darstellungen des Outputs aufgerufen werden (Van Domselaar, *et al.*, 2005).

Die Genome aller vier *S. plymuthica* Stämme wurden mittels der BASys-Server, abrufbar unter <https://www.basys.ca/>, annotiert. Das p75-Plasmid des Stammes 4Rx13 wurde in BASys als eigenständiges Genom annotiert.

Zur besseren Handhabbarkeit der detaillierten BASys-Daten wurde das in Abbildung 8 dargestellte Python-Skript erstellt, welches die Daten der BASys-.ecard-Files in jeweils eine Zeile in einem Excel-Tabellenblatt einliest.

```
import fileinput
import glob

file_list = glob.glob("D:/Pfad/1_basys_with_evidence/basys_final/*.ecard")

with open('D:/Pfad/1_basys_with_evidence/basys_final/merged-basys-files.txt', 'w') as file:
    input_lines = fileinput.input(file_list)
    file.writelines(input_lines)
    file.close

in_file = open('D:/Pfad/1_basys_with_evidence/basys_final/merged-basys-files.txt', 'r')
text = in_file.read()
in_file.close()

text = text.replace('\n', '')
text = text.replace('; ', ';')
text = text.replace('#', ';')
text = text.replace('Entry_ID:', '\nEntry_ID:')

in_file = open('D:/Pfad/1_basys_with_evidence/basys_final/merged-basys-files.csv', 'w')
in_file.write(text)
in_file.close()
```

Abbildung 8: Python-Skript zum Einlesen und Aufbereiten der Daten der BASys.ecard-Files in ein Excel-Tabellenblatt.

Mit einem nachgeschalteten Excel-Makro wurden die Daten zur besseren Lesbarkeit weiter aufbereitet, indem zum Beispiel redundante Spaltenbeschriftungen entfernt wurden.

2.6.3 Vergleichende Genomanalyse

2.6.3.1 Phylogenetische Analysen

Über die Weboberfläche des **NCBI Tree Viewer 1.6** kann ohne Installation einer Software ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden, welcher einem online BLAST-Alignment einer gewünschten Sequenz nachgelagert ist.

Mega ist eine Freeware Software (Kumar, *et al.*, 2015), die nach Installation auf einem Windows-Rechner verwendet werden kann. In dieser Arbeit wurde die beta-Version Mega7 (Version 7.0.7, Build#: 7150910-x86_64) verwendet. Als Input-Dateien werden sowohl DNA- als auch Proteinsequenzen in FASTA-Format akzeptiert. Hier wird ebenfalls zuerst ein Alignment mit einer beliebigen Anzahl von Sequenzen erstellt, wobei zwischen verschiedenen Alignment-Methoden gewählt werden kann. Für die im Ergebnis-Teil gezeigten Stammbäume wurde jeweils ClustalW als Alignment-Methode ausgewählt. Es steht eine Vielzahl von Methoden zur Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde als statistische Methode für

die Konstruktion des Stammbaumes eine Maximum Likelihood Analyse gewählt, die mit 100 Bootstrap-Wiederholungen getestet wurde.

CVTree3 errechnet phylogenetische Bäume auf Basis ganzer Genome ohne Sequenz-Alignment, indem es einen Composition Vector (CV) Ansatz heranzieht (Ji, *et al.*, 2004), (Guanghong & Bailin, 2015). Als Input wird ein Protein-file im .faa-Format oder ein File mit der codierenden DNA im .ffn-Format erwartet. In dieser Arbeit wurde die Analyse mit Input der Proteinfiles von *S. plymuthica* 3Rp8 und 3Re4-18 gewählt und die Standardeinstellungen belassen (K-tuple length 3 bis 7, modified lineage und Ausschluss der “tiny genomes”).

2.6.3.2 Multiples Genom-Alignment mit Mauve

Zur grafischen Darstellung eines Genomvergleichs kann die open source Software Mauve – Multiple Genome Alignment (Darling, *et al.*, 2003-2009) verwendet werden. Hier wurde mit Version 20150226 build 10 © 2003-2015 von Aaron Darling, Paul Infield-Harm, Anna Rissmann und Andrew Tritt gearbeitet. Als Input werden .txt Dateien der Stämme mit der Nukleotid-Sequenz (nicht annotiert) verarbeitet - der Vergleich der Genome erfolgt daher auch nur auf Basis der Nukleotid-Sequenzen.

2.6.3.3 Vergleich der orthologen Gruppen mit OrthoMCL DB

Die Identifizierung orthologer Gruppen ist nützlich für Genom-Annotationen, Studien zur Evolution von Genen/Proteinen, vergleichende Genomanalysen und die Identifizierung von taxonomisch beschränkten Sequenzen. Im Programm OrthoMCL DB wird ein Markov Cluster Algorithmus angewendet um putative orthologe und paraloge Gencluster zu gruppieren. Als Input werden .fasta-Dateien der Stämme mit der annotierten Aminosäure-Sequenz verarbeitet.

Der OrthoMCL Algorithmus gruppiert Proteine nach ihrer Orthologie (kürzliche Abstammung), Inparalogie (kürzliche Duplikation) und Co-Orthologie (kürzliche Abstammung und Duplikation), wobei die Verarbeitung der Daten in fünf Phasen stattfindet:

- 1.) Filterung der Sequenzen
- 2.) All-versus-all BLAST
- 3.) Berechnung der prozentuellen match-Länge für jeden BLAST-Treffer
- 4.) Finden der potentiellen inparalogen, orthologen und co-orthologen Paare
- 5.) Clusterung der Paare in Gruppen mit dem MCL Programm (Li, *et al.*, 2003).

Als Input-Files für die OrthoMCL DB-Berechnung wurde für alle vier zu vergleichenden Genome die von NCBI annotierten Protein-Daten verwendet. Da die Output-Files von OrthoMCL DB lediglich

Listen mit den locus tags der Gene sind, wurden diese in ein Excel-File importiert und dort weitere Details aus den NCBI-Protein-Files hinzugefügt. Um ein breiteres Bild zu erlangen wurden diese Daten außerdem mit den BASys-Annotations-Daten verknüpft. Mit Hilfe mehrerer Excel-Formeln und Tabellen wurde pro Genom eine Matrix erstellt, in welcher je Gen sowohl die NCBI als auch die BASys-Annotation sowie das Vorhandensein in den jeweils drei anderen Genomen angezeigt wird.

2.6.3.4 Darstellung und Berechnung von Venn-Diagrammen

Venny ist ein Online-Tool, aufrufbar unter <http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/>. Hier können bis zu vier Genome (oder jegliche andere Datenpakete) miteinander verglichen und dargestellt werden. Als Input sind jedoch geordnete Listen, bezogen auf eine Referenzliste notwendig, die selbst errechnet werden müssen.

OrthoVenn ist ebenfalls ein Online-Tool, aufrufbar unter <http://probes.pw.usda.gov/OrthoVenn>.

Hier können bis zu sechs Genome verglichen werden. OrthoVenn bietet eine umfangreiche Abdeckung von Vertebraten-, Metazoen-, Protisten-, Pilze-, Pflanzen- und Bakterien-Daten zur Identifizierung orthologer Gen-Cluster und unterstützt auch das Hochladen von eigenen Protein-Sequenzen (Wang, *et al.*, 2015). Als Input dienen Files mit Protein-Sequenzen im *.fasta-Format.

Letztendlich wurde das Venn-Diagramm jedoch in **PowerPoint** (Microsoft Office Paket 2010, Microsoft Corporation) dargestellt, da beide oben genannten Tools die in einem Stamm einzigartigen Gene nicht wunschgemäß darstellten und es weiters zu geringfügigen Abweichungen der Anzahl der orthologen Gruppen kam. Die von OrthoMCL errechneten orthologen Gruppen aus dem output-File „groups“ wurden den einzelnen Kompartimenten des Venn-Diagramms zugeordnet. Die in einem Stamm einzigartigen Gene, welche nicht in einer orthologen Gruppe erfasst sind, wurden gezählt und am Rande des Venn-Diagramms in einer separaten Blase je Genom hinzugefügt. Die Ergebnisse aus Venny und OrthoVenn wurden zur Plausibilitätskontrolle herangezogen.

2.6.3.5 Analyse genomischer Inseln mit IslandViewer 3

IslandViewer 3 ist ein online-Tool, welches drei unterschiedliche Methoden zur Vorhersage genomischer Inseln integriert: IslandPick, IslandPath-DIMOB und SIGI-HMM (Dhillon, *et al.*, 2015), (Dhillon, *et al.*, 2013), (Langille & Brinkman, 2009).

Es wurden die NCBI-Genbank-Files der Stämme *S. plymuthica* 3Rp8 und 3Re4-18 eingelesen. Die Stämme S13 und 4Rx13 waren bereits online veröffentlicht, allerdings mit einer veralteten NCBI-Annotation, weswegen diese ebenfalls neu eingelesen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Molekulare Methoden

3.1.1 Box-A1-Fingerprint

Nach Extraktion der DNA mit dem Protokoll zur „Quick“-Extraktion konnten im 1,5%igen Agarose-Gel Banden der beiden *Stenotrophomonas*-Stämme sowie von *Bacillus subtilis* B2G gezeigt werden, bei allen fünf *Serratia*-Stämmen waren hingegen keine klar abgrenzbaren Banden sichtbar. Das Gel ist in Abbildung 9 dargestellt.

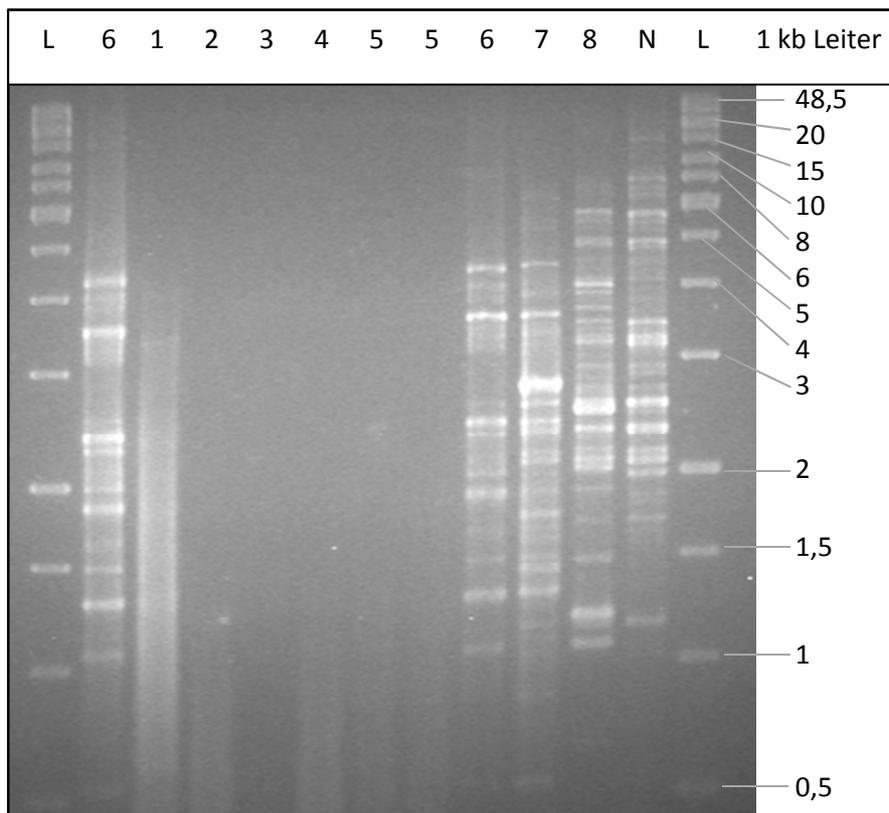


Abbildung 9: Fingerprint nach Quick-Extraktion der DNA und BoxA1-PCR in 1,5%igen Agarose-Gel in 0,5x-TBE-Puffer. Laufzeit 30 min bei 90 V und anschließend 5 Std bei 110 V. L: 5 µl 1 kb Quick load DNA ladder; Spuren 1 bis 8 jeweils 12,5 µl PCR-Ansatz mit 3 µl Ladepuffer; 1: 3Re4-18 ; 2: S13; 3: 3Rp5; 4: 3Rp8; 5: 4rx13; 6: P69; 7: ep17; 8: B2G; N: Negativkontrolle.

Ein möglicher Grund, dass genau bei den fünf *Serratia*-Stämmen kein Fingerprint zustande kam, könnte sein, dass diese im Vergleich zu den beiden *Stenotrophomonas*-Stämmen sowie im Vergleich zu dem verwendeten *Bacillus*-Stamm schnell auf den Agar-Platten anwachsen und große, massige Kolonien bilden und dadurch eventuell zu viel Zellmaterial für die PCR verwendet wurde oder zu viele andere Stoffe, die in diesem Fall die PCR gehemmt haben, gebildet wurden. Die positive Negativkontrolle lässt sich unter Umständen auf die sehr unspezifischen BoxA1-Primer oder eine Verschmutzung der DNA-Polymerase-Lösung zurückführen.

Ergebnisse

Nach nochmaliger Extraktion der DNA mittels FastPrep Instrument-Phenol-Chloroform-Protokoll wurde das in Abbildung 10 gezeigte Kontrollgel erstellt.

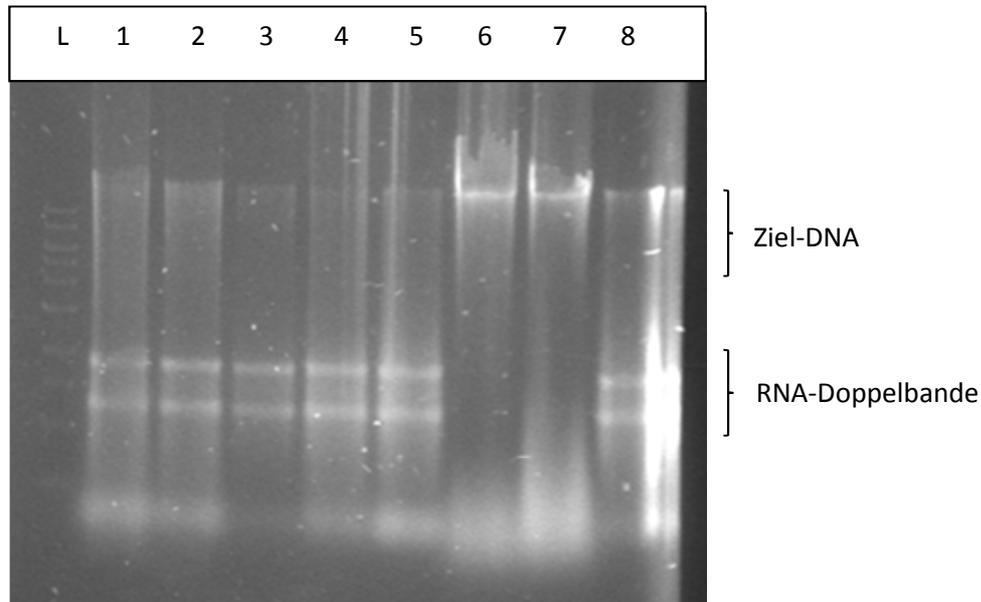


Abbildung 10: 0,8%iges Agarose-Kontrollgel in 1x-TAE zur Konzentrationsabschätzung der DNA nach der FastPrep Instrument-Phenol-Chloroform DNA-Extraktion, Laufzeit 45 min bei 100 V. L: 2 μ l 1 kb Gene Ruler DNA ladder; Spuren 1 – 8 jeweils 6 μ l PCR-Ansatz mit 2 μ l Ladepuffer; 1: 3Re4-18 ; 2: S13; 3: 3Rp5; 4: 3Rp8; 5: 4rx13; 6: P69; 7: ep17; 8: B2G.

Nachdem wie in Abbildung 10 gezeigt ausreichend DNA vorhanden war wurde eine 10-fache Verdünnung des PCR-Ansatzes hergestellt und es konnte für alle acht Stämme ein Box-A1R-Fingerprint (siehe Abbildung 11) erzeugt werden.

Ergebnisse

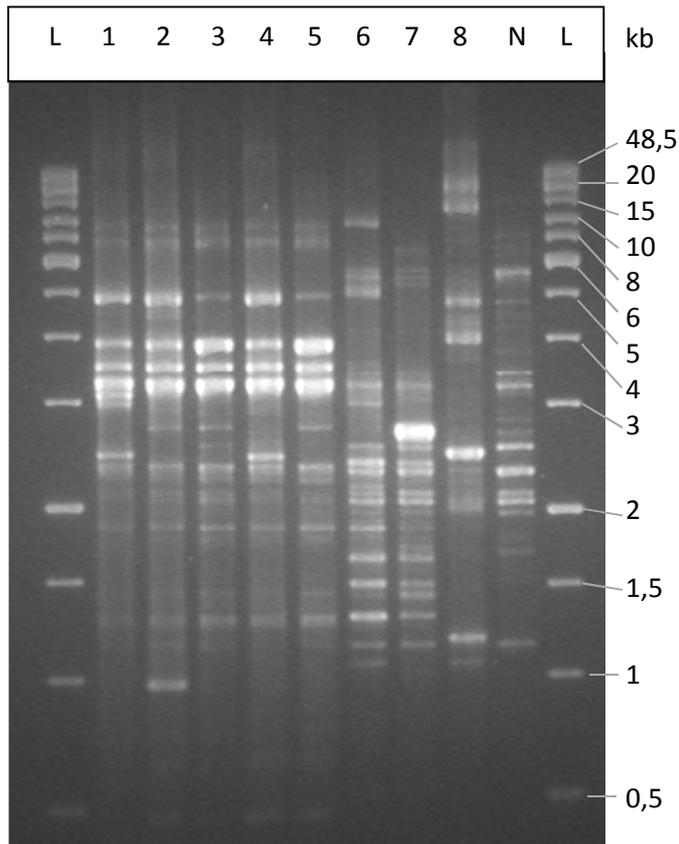


Abbildung 11: BoxA1-Fingerprint nach Ribolyzer-Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA und BoxA1-PCR in 1,5%igen Agarose-Gel in 0,5x-TBE-Puffer, Laufzeit 30 min bei 90 V + 5 Std bei 110 V. L: 5 μ l 1 kb Quick load DNA ladder; Spuren 1 bis 9 jeweils 12,5 μ l PCR-Ansatz mit 3 μ l Ladebuffer; 1: 3Re4-18 ; 2: S13; 3: 3Rp5; 4: 3Rp8; 5: 4rx13; 6: P69; 7: ep17; 8: B2G; N: Negativkontrolle.

3.1.2 16S rDNA-Sequenzierung der Stämme *Serratia plymuthica* 3Rp5 und 3Rp8

Die für die PCR verwendeten 10-fachen Verdünnungen der DNA wurden mit Hilfe des NanoDrop Spektrometers vermessen, da bei mehreren Wiederholungen der 27F-PCR kein Ergebnis erzielt wurde.

Tabelle 16: Ergebnisse der NanoDrop-Vermessung der 10-fach verdünnten DNA der *S. plymuthica* Stämme 3Rp5 und 3Rp8

Stamm/Parameter	3Rp5	3Rp8
ng/ μ l	8,4	18,9
A260	0,169	0,377
A280	0,079	0,194
260/280	2,14	1,94
260/230	13,96	2,02

Die in Tabelle 16 gezeigten Werte der Messung zeugen von einer hohen Reinheit und ausreichender Menge DNA in den 10-fachen Verdünnungen, weswegen zu Kontrollzwecken ein UnibaclI-PCR-Lauf durchgeführt wurde. Abbildung 12 zeigt ein 0,8%iges Agarose-Kontroll-Gel der Produkte aus einem PCR-Lauf mit 27f/1492r- sowie dem Lauf mit den UnibaclI 515f/927r-Primern.

Ergebnisse

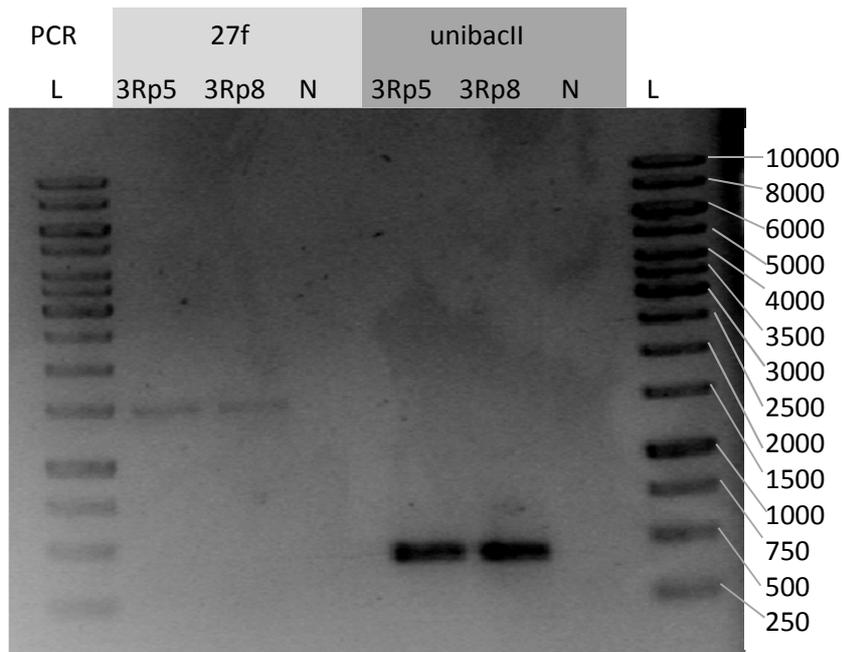


Abbildung 12: 0,8%iges Agarose-Kontroll-Gel in 1x-TAE-Puffer zur Abschätzung der DNA-Menge nach einer 27f- und einer UnibaclI-PCR, Laufzeit 45 min bei 100 V. L: 2 µl 1 kb Gene Ruler DNA ladder; Rest je 3 µl PCR-Produkt und 1,5 µl Ladepuffer: 3Rp5- und 3Rp8-DNA-Fragmente nach PCR mit 27f- und 1492r-Primern; 3Rp5- und 3Rp8-DNA-Fragmente nach PCR mit UnibaclI-515f und UnibaclI-927r-Primern; N: Negativkontrolle.

Die Konzentration der PCR-Produkte aus dem 27f-PCR-Ansatz war sehr gering, wohingegen die Konzentration der PCR-Produkte im UnibaclI-PCR-Ansatz sehr hoch war. Entweder wurde die DNA an jenen Stellen, wo die 27f und 1492r-Primer ansetzen zum Teil verdaut, oder die Primer binden an diesen Stellen in diesem Stamm nicht gut oder waren nicht in Ordnung.

Die Wiederholung der PCR mit 27f/1492r-Primern mit der doppelten Anzahl an Ansätzen brachte das in Abbildung 13 gezeigte Ergebnis.

Ergebnisse

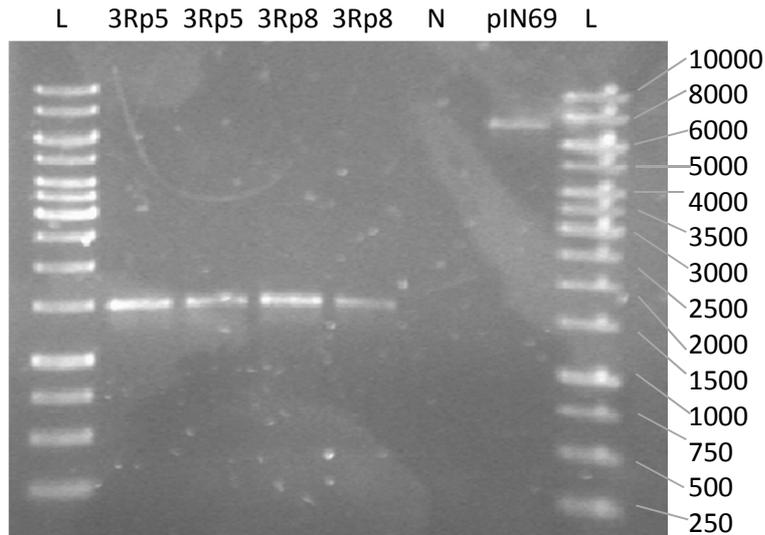


Abbildung 13: 0,8%iges Agarose-Kontroll-Gel in 1x-TAE-Puffer zur Abschätzung der DNA-Menge nach einer 27f-PCR, Laufzeit 45 min bei 100 V. L: 2 µl 1 kb Gene Ruler DNA ladder; Rest je 3 µl PCR-Produkt und 1,5 µl Ladepuffer: 2 Ansätze für 3Rp5 sowie 2 Ansätze für 3Rp8 und N: Negativkontrolle. pIN69 ist das aufgereinigte pIN69-GFP Plasmid für die Transformation von *S. plymuthica* S13.

Analyse der Nukleotid-Sequenzen

Für den Stamm *Serratia sp.* 3Rp5 wurde aus der Richtung des 27f-Primers eine 936 Nukleotide lange Genomsequenz, und aus der Richtung des 1492r-Primers eine 1022 Nukleotide lange Sequenz geliefert. Die Sequenzen hatten überlappende Bereiche und konnten durch ein „Reverse Complement“ der Sequenz von Seite des 1492r-Primers zu einer 1376 Nukleotide langen Sequenz, dargestellt in Abbildung 14, zusammengestellt werden. Die Randbereiche der Sequenz fehlen, da die Primersequenzen selbst nicht in der Sequenz aufscheinen.

```
>3Rp5 16S rDNA
GCAGTTCGAGCGGTAGCACAAAGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAAC
TGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACC
TTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAA
GCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTCAGTGTTAATAGCACTGTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGT
CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTGCAATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGGAGCATGTGGTT
TAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTC
GGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCCGGAAGTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGA
AGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAG
```

Abbildung 14: Nukleotid-Sequenz der 16S rDNA des *Serratia sp.* 3Rp5-Stammes.

Ergebnisse

Für den *Serratia sp.* Stamm 3Rp8 wurde aus der Richtung des 1492r-Primers eine 713 Nukleotide lange und aus der Richtung des 27f-Primers eine 438 Nukleotide lange Sequenz geliefert. Von der Sequenz beginnend bei dem 27f-Primer wurde ein „Reverse complement“ erstellt. Es zeigte sich ein 53 bp langer überlappendender Bereich, in welchem jedoch eine Base abweichend war. Nach Sequenzierung des Genoms zeigte sich, dass es sich hierbei um einen Fehler bei der Sequenzierung für die 16S rDNA-Sequenz handeln könnte. Die beiden Sequenzen konnten somit zu einer Sequenz mit 1098 Nukleotiden zusammengefügt werden. Die Ränder inklusive der Primersequenzen waren wie beim Stamm 3Rp5 ebenfalls nicht in der Sequenz enthalten und wurden anhand der Gesamt-Genom-Sequenz ergänzt. Abbildung 15 zeigt ein Reverse Complement der vollständigen 16S rDNA des Stammes *S. plymuthica* 3Rp8 mit einer Länge von 1530 Nukleotiden.

```
>3Rp8 16S rDNA
AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGAGAG
CTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGGCCTCACGCCATCAGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTA
GTGTGTTAATAGCACATTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AATCCCCGCGCTTAACGTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAG
GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
GACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
ACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGC
GATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCAGGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAAGTTCGAGAGCAAGCGGACC
TCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGA
TCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAG
AAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTTCATGACTGGGGTG AAGTCGTAACAAGGTA
ACCGTAAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCT
```

Abbildung 15: Nukleotid-Sequenz der 16S rDNA des *Serratia sp.* 3Rp8-Stammes.

Analyse der Sequenzen mit SnapGene Viewer

Bei einer Betrachtung der ebenfalls von LGC Genomics gelieferten zusätzlichen Daten in der Software SnapGene Viewer zeigt sich deutlich ein möglicher Grund für die Probleme bei der 27f-PCR. Die grau hinterlegte Base zirka in der Mitte von Abbildung 16 markiert die erste als Sequenz gelieferte Base aus Abbildung 14 (*Serratia sp.* 3Rp5 von Seiten des 27f-Primers). Die an LGC Genomics gelieferte DNA hatte im Bereich der Primersequenzen offenbar eine sehr schlechte Qualität.

Ergebnisse

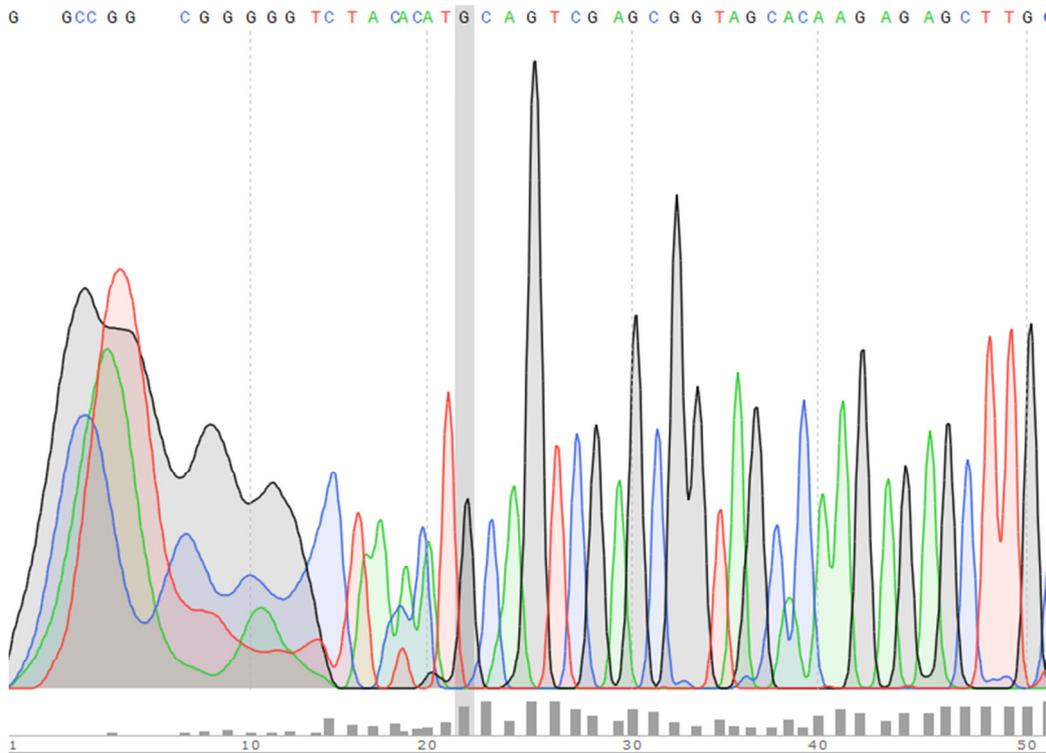


Abbildung 16: Screenshot aus der SnapGene Viewer Software der ersten 50 Basen der 16S rDNA Sequenz von *S. plymuthica* 3Rp5 auf Seiten des 27f-Primers.

Für die 3Rp5-Sequenz, die von Seiten des 1492r-Primers sequenziert wurde erstreckt sich der Bereich mit schlechter Qualität bis Position 58. Für die 3Rp8-Sequenz, die von Seiten des 27f-Primers beginnt erstreckt sich der Bereich mit schlechter DNA-Qualität bis Position 307 und von Seiten des 1492r-Primers bis Position 46.

3.1.3 Klonierung des Gens für ZsYellow in pIN69

Die Transformation der 5α -*E. coli*-Zellen mit dem pEX-A2-ZsYellow-Plasmid war mit einer Transformationsrate von $3,5 \cdot 10^4$ cfu/ μ g DNA sehr effizient. Bei den Negativkontrollen mit untransformierten 5α -*E. coli*-Zellen wurden $2,6 \cdot 10^7$ cfu/ml auf LB-Platten errechnet und keine Kolonien auf LB-Platten mit Antibiotikum detektiert.

Nach Isolierung der Vektoren aus den transformierten Stämmen mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit lag der Doppelansatz des pEX-A2-ZsYellow-Vektors mit 211,3 und 188,6 ng/ μ l und der Doppelansatz den pIN69-GFP-Vektors mit 63,9 und 56,8 ng/ μ l vor.

Die Ansätze wurden mittels Restriktionsenzymen geschnitten und die DNA-Stücke mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, waren die Restriktionsschnitte erfolgreich und die DNA teilet sich sauber in jeweils zwei Stücke auf.

Ergebnisse

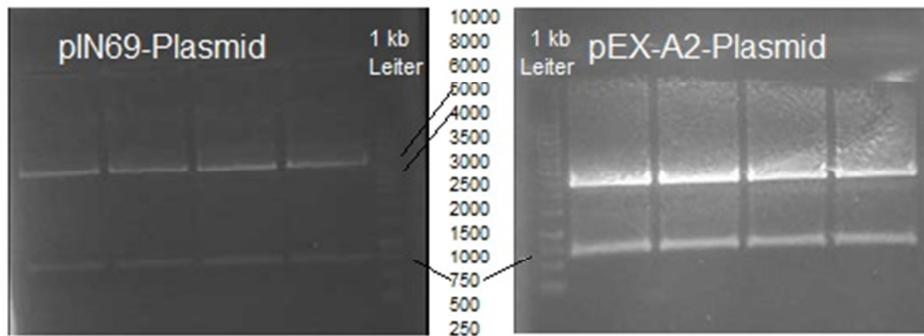


Abbildung 17: Präparatives 0,8%iges Agarosegel in 1x-TAE-Puffer der Restriktionsansätze des pIN69+GFP- (links) sowie des pEX-A2-ZsYellow-Vektors. Laufzeit 50 min bei 100 V, Auftragung von je 50 µl Restriktionsansatz mit 8,3 µl Ladepuffer, Leiter: 5 µl GeneRuler 1 kb DNA ladder.

Die DNA-Banden bei 4500 bp aus dem pIN69-Plasmid (Vektor ohne Fluoreszenz-Protein GFP) und jene bei 710 bp aus dem pEX-A2-Plasmid (ZsYellow-Sequenz) wurden aus dem Gel geschnitten und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) aufgereinigt. Eine NanoDrop-Messung ergab eine Konzentration von 18,1 ng/µl für die ZsYellow- und 24,9 ng/µl für die pIN69-Sequenz.

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} * 0,702 \text{ (kb ZsYellow)}}{4,5 \text{ (kb Vektor)}} * \frac{5}{1} = 39 \text{ ng (einzusetzende Menge Insert)}$$

Für das 1:5 Verhältnis wurden somit 50 ng des pIN69-Vektors und 39 ng der ZsYellow-DNA, für das 1:3 Verhältnis 50 ng des pIN69-Vektors und 23,4 ng der ZsYellow-DNA eingesetzt.

Der Ligationsansatz mit Benutzung des Instant sticky-end Ligase-Mastermix von NEB war nicht erfolgreich. Im Ansatz mit Benutzung der T4-DNA Ligase (M0202) und einem 1:5 Vektor-Insert-Verhältnis konnte ein einzelner 5α-*E.coli*-pIN69-ZsYellow-Transformant erzeugt werden.

Abbildung 18 zeigt eine partielle Sequenz des pIN69-ZsYellow-Vektors wobei die Sequenzierung der partiellen Sequenz des pIN69-Anteils in der Masterarbeit von Kollegen Murgu (Murgu, 2014) durchgeführt wurde.

Ergebnisse

```
AAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGGATCCACGAACCCAGTTGACATAAGCCTGTTCCGGTTCGTAACCTGTAATGCAA
GTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTATG
ACTGTTTTTTTTGTACAGTCTATGCCCTGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGTATGTTAGGAGCAGCAACG
ATGTTACGCAGCAGGGCAGTCCGCTAAACAAAGTTAGGCAGCCGTTGTCTGGTCTTTCTGATAGTTGTTGTGGGGTAGGCAGTCA
GAGCTCGATTGCTTGTGCCATAATAGATTCACAAGAAGGATTGACATGGGTCAAAGTAGCGATGAAGCCAACGCTCCCCTTGCAGG
GCAGTTTGGCCTCCCTGAGTGCCACCTTGGCTTAGGGGATCGCGTACGCAAGAAATCTGGTCCGCTTGGCAGGGTCAAGTCGTCG
GTTGGTATTGCACAAAACCTACCCCTGAAGGCTATGCGGTCGAGTCCGAATCCACCCAGGCTCAGTGCAAATTTATCTGTGGCTGCAC
TTGAACGTGTGGCCTAAGCATGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCTTAAGTAGTAGCCCGCTAATGAG
CGGGCTTTTTTGGTACGGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGGAGCTGTTGACAAATTA
TCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAGATCTcatggctcattcaagcaggtct
aaaagaagaaatgacaatgaaataccacatggaaggggtgctcaacggacataaatttgtgatcacgggcgaagg
cattggatatccggtcaaagggaaacagactattaatctgtgtgtgatcgaagggggaccattgccattttccga
agacatattgtcagctggctttaagtaacggagacaggatTTTTactgaatctcctcaagacatagtagactatTT
caagaactcgtgtcctgctggatatacatggggcaggtcttttctctttgaggatggagcagctcgcataatgcaa
ttagatataaacagtgagtgtcaaagaaaactgcatttatcataagagcatatTTaatggagtgaattttcctgc
tgatggacctgtgatgaaaaagatgacaactaactgggaagcatcctgcgagaagatcatgccagtacctaagca
ggggatactgaaaggggatgtctccatgtacctcctctgaaggatggtgggcttaccgggtgccagttcgacac
agtttacaagcaaagtctgtgccaagtaagatgcccggagtggcacttcatccagcataagctcctccgtgaaga
ccgcagcagatgctaagaatcagaagtggcagctgacagagcatgctattgcattccctctgcttggcctgacT
CTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC
CGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATGTAAGCGTTAATATTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTGT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTTAA
ACGCTGGTTGCTACGCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATCGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTCGGTTCAGGG
CAGGGTCGTTAAATAGCCGCTTATGTCTATTGCTGGTTTACCGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCT
GAGGCCAGTTTGCTCAGGCTCTCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCATTATTCTGCCTCCAGAGCCTGATAAAAACGGTGA
ATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCATTAGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGG
TATAGGGCGGCGAGGCGGCTACAGCCGATAGTCTGGAACAGCGCACTTACGGTTGCTGCGCAACCCAAGTGTACCGGCGCGGCAGC
GTGACCCGTGTCGGCGGCTCCAACGGCTCGCCATCGTCCAGAAAACACGGCTCATCGGGCATCGCAGGGCGTGTGCCCGCGCCGTTCC
CCATTCCTCCGTTTCGGTCAAGGCTGGCAAGGTCTGGTTCCATGCCCGGGAATGC
```

Abbildung 18: Partielle Sequenz des pIN69-ZsYellow-Vektors: grün hinterlegt ist der Sequenzbereich um das Trimethoprim-Resistenzgen (TpR), türkis die Erkennungssequenzen *Bgl*II und *Xba*I, gelb das ZsYellow-Insert und violett ein aus dem pBBR1MCS-Vektor stammender Bereich.

Diese Sequenz wurde mit Hilfe des Online-Tools PlasMapper Version 2.0 (Dong, *et al.*, 2004) grafisch aufbereitet und ist in Abbildung 19 dargestellt.

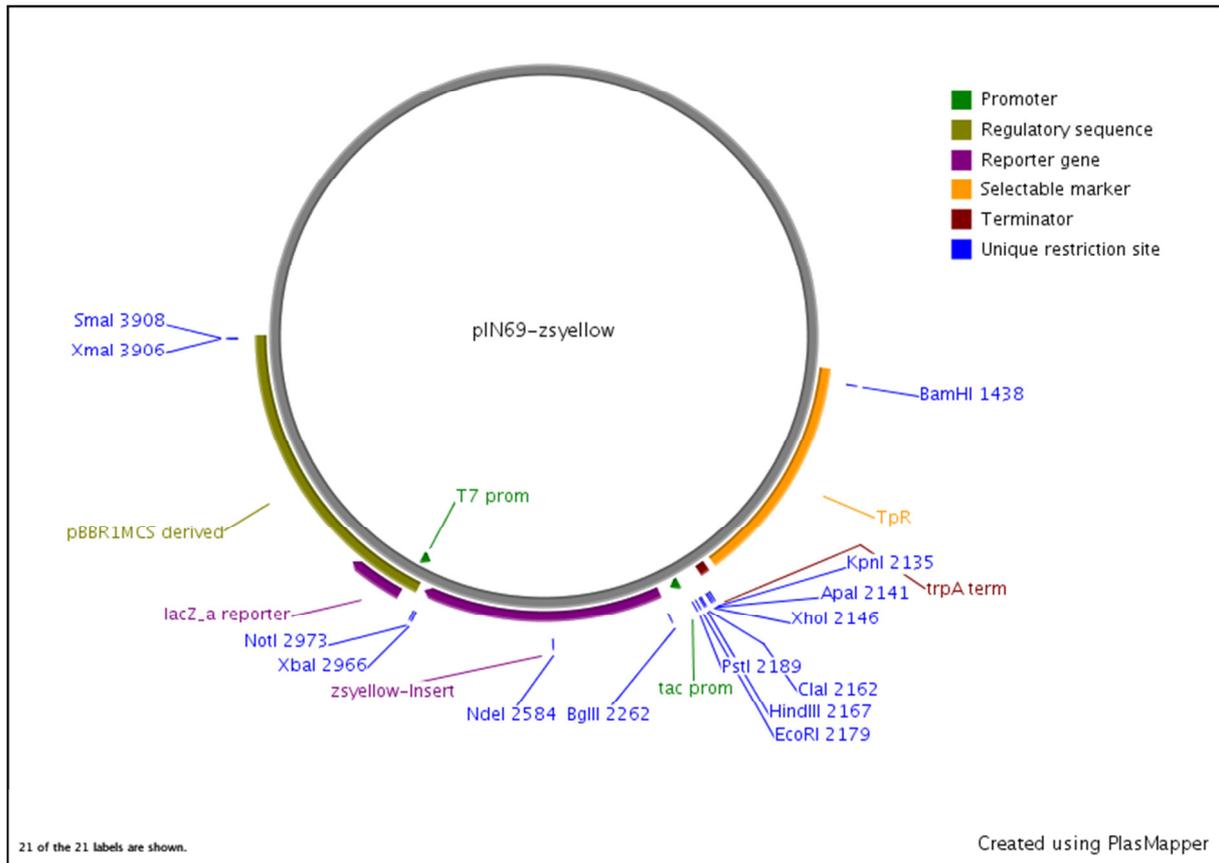


Abbildung 19: Schematische Darstellung des pIN69-ZsYellow-Plasmids in PlasMapper Version 2.0 (Dong, *et al.*, 2004).

3.1.4 Transformationen der *Serratia plymuthica* Stämme

Bei der Isolierung der pIN69-Plasmide aus *E. coli* 5α wurden die in Tabelle 17 dargestellten Mengen Plasmid pro µl aufgereinigt.

Tabelle 17: Ergebnisse der NanoDrop-Vermessung nach den Plasmidisolierungen

pIN69-	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
DsRed2*	90,7	1,814	0,914	1,99	2,47
mNeptune*	108,0	-	-	-	-
GFP	42,0	0,840	0,405	2,07	1,73
eBFP2	126,0	2,519	1,263	1,99	1,69
ZsYellow	46,8	-	-	1,98	-

* isolierter Vektor inklusive Insert von Kollegen Octavian Murgu bereitgestellt

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wird eine Kultur benötigt, die sich gerade in der Wachstumsphase befindet. In Abbildung 20 wird hier beispielsweise die Wachstumskurve von *S. plymuthica* S13 Zellen startend von einer optischen Dichte (OD) von 0,05 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 dargestellt. Nach zirka 190 Minuten bei 30 °C war bei allen *Serratia*-Stämme die notwendige Zelldichte an noch jungen Zellen vorhanden.

Ergebnisse

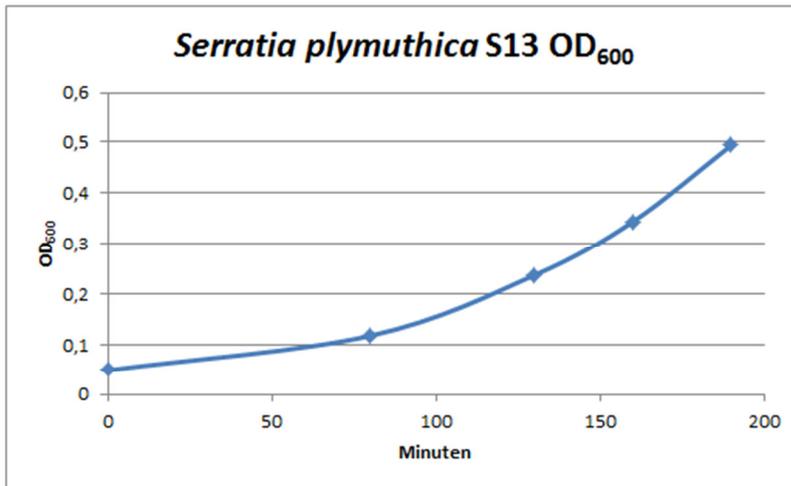


Abbildung 20: Wachstumskurve von *S. plymuthica* S13 bis zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD von 0,5.

Die Transformationseffizienz schwankte abhängig von der Qualität der elektrokompetenten Zellen und der Plasmidkonzentration. Das Plasmid pIN69-GFP lag beispielsweise in einer Konzentration von nur 42 ng/μl vor. Bei Einsatz von 5 μl Plasmid war die Transformation nicht erfolgreich. Wurden jedoch 10 beziehungsweise 15 μl Plasmid eingesetzt, konnte Transformanten erzeugt werden. Die Transformationsrate (cfu/μg) berechnet sich, indem die auf den Platte gezählten Kolonien mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch die μg eingesetztes Plasmid dividiert werden. Die zugrunde liegenden Daten sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Auswertung der Transformationsraten (cfu/μg DNA) für die Transformationen der pIN69-Vektoren in verschiedene *S. plymuthica* Stämme

Stamm/Vektor-Kombination	ng/μl Plasmid	μl Plasmid	cfu/ml	cfu/μg DNA
S13-GFP	42,0	5	0	0
S13-GFP	42,0	10	5	12
S13-GFP	42,0	15	4	6
3Rp5-GFP	42,0	10	0	0
3Rp5-GFP	42,0	15	1	1
3Re4-18-mNeptune	108,0	5	120	222
4Rx13-mNeptune	108,0	5	174	322
S13-eBFP2	126,0	5	0	0
3Rp5-eBFP2	126,0	5	~ 10 ⁴	~ 1,6*10 ⁴
4Rx13-eBFP2	126,0	5	18	29
3Re4-18-eBFP2	126,0	5	49	78
3Re4-18-ZsYellow	46,8	5	30	64
3Re4-18-ZsYellow	46,8	10	10	21
S13-ZsYellow	46,8	5	20	85

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, kann der Erfolg einer Transformation mit den Vektoren pIN69-GFP sowie pIN69-DsRed2 mit Hilfe des Motic AE31 Mikroskops überprüft werden.

Ergebnisse

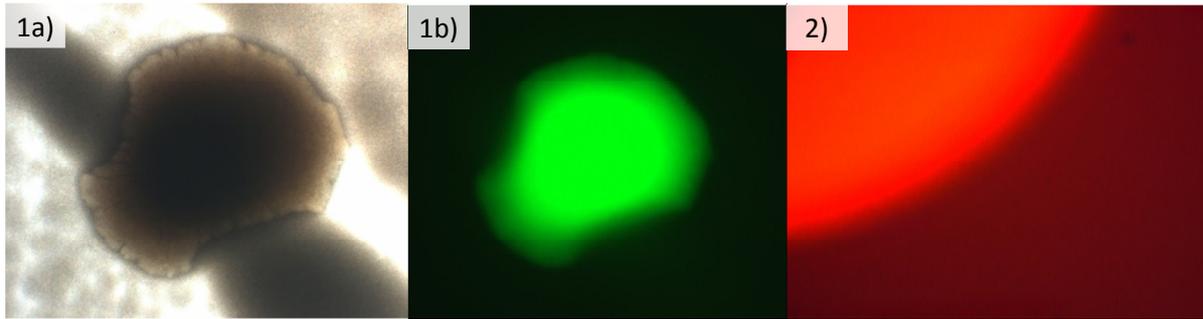


Abbildung 21: Kolonien von pIN69-transformierten *S. plymuthica* S13 Zellen auf LB-Agar-Platten: 1) S13-GFP unter dem Durchlichtmikroskop (Teil 1a) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Teil 1b) in 10-facher Vergrößerung sowie S13-DsRed2 unter dem Fluoreszenzmikroskop (Teil 2), 40-fache Vergrößerung.

Abbildung 22 zeigt einen Bildausschnitt einer Mischkultur aus S13-GFP sowie 3Rp8-DsRed2, die aus einem mit einer Mischkultur dieser Stämme geprimten Samen reisoliert wurde. Die Stämme scheinen sich gegenseitig nicht im Wachstum zu hemmen.

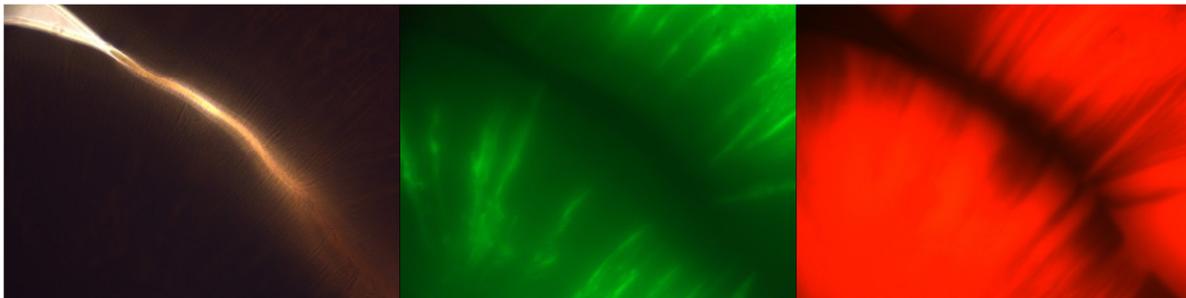


Abbildung 22: Selber Bildausschnitt einer Mischkultur von S13-GFP und 3Rp8-DsRed2 mit DIA-ILL- (links), GFP- (Mitte) sowie TRITC-Filter (rechts) in 40-facher Vergrößerung.

Eine Überprüfung der Fluoreszenz pIN69-eBFP2-transformierter Stämme ist unter dem Motic AE31 Mikroskop nicht eindeutig möglich. Auch mit Hilfe des Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System ist eine Unterscheidung von anderen Fluoreszenzproteinen nicht immer eindeutig. Abbildung 23 zeigt ein Bild von vier Platten mit unterschiedlichen Stämmen, welches mit einer „blue epi“ Belichtung und dem 530/283 Filter erstellt wurde. Während der untransformierte Stamm und der mit pIN69-DsRed2 transformierte Stamm kein positives Signal abgeben, ist das Signal des pIN69-GFP transformierten Stammes um ein vielfaches stärker als das Signal des pIN69-eBFP2 transformierten Stammes. Eine Unterscheidung von GFP- und eBFP2-transformierten Stämmen ist somit nicht möglich.

Ergebnisse

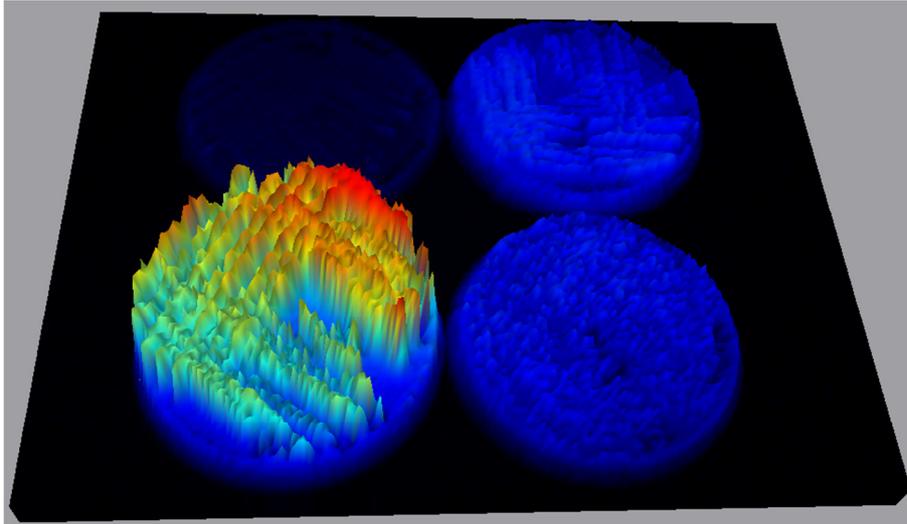


Abbildung 23: Analyse der Fluoreszenz von vier Stämmen im Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System mit „blue epi“ Belichtung und 530/283 Filter: links oben: 3Rp8 Umweltstamm; rechts oben: 3Rp8-DsRed2; links unten: S13-GFP; rechts unten: 3Rp8-eBFP2. Image Lab AusgabeEinstellung „Spektrum“.

Wird jedoch – wie in Abbildung 24 gezeigt – eine gute Negativkontrolle verwendet (hier ein untransformierter Umweltstamm) und ist kein stärkeres Signal - wie zum Beispiel das von GFP - vorhanden, wird auch eBFP2 als starkes Signal detektiert.

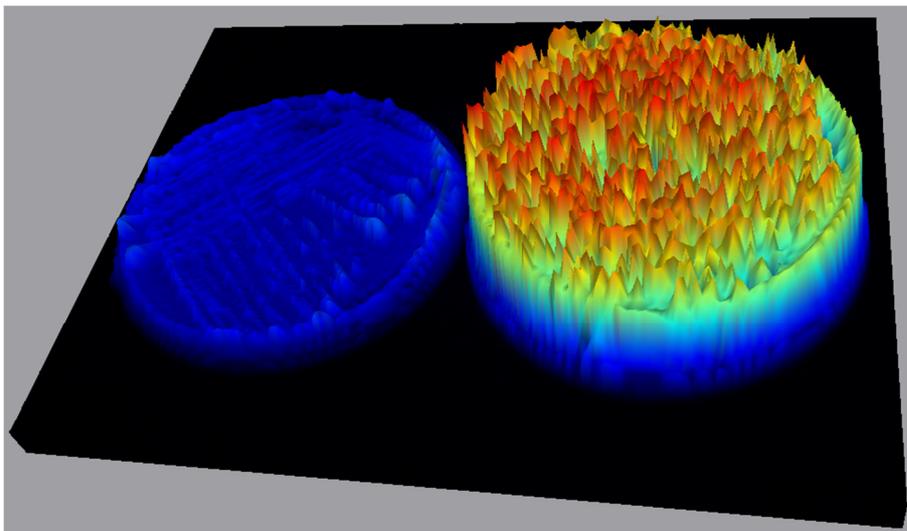


Abbildung 24: Analyse der Fluoreszenz von zwei Stämmen im Bio-Rad ChemiDoc™ XRS System mit „blue epi“ Belichtung und 530/283 Filter: links 3Rp8 Umweltstamm, rechts: 3Rp5-eBFP2.

Die Unterscheidung der mNeptune-Proteine von DsRed2-, GFP-, eBFP2 und ZsYellow-Proteinen ist mit Hilfe des Bio-Rad mit den im Material- und Methodenteil beschriebenen Einstellungen zweifelsfrei möglich, wohingegen die Unterscheidung von ZsYellow und GFP sowie ZsYellow in eBFP2 mit den zur Verfügung stehenden Bio-Rad-Einstellungen sehr schwierig ist. Zur zweifelsfreien Überprüfung von ZsYellow-Transformanten muss das konfokale Laser Scanning Mikroskop verwendet werden. Tabelle 19 fasst die zur Verfügung stehenden, mit pIN69 transformierten Stämme zusammen.

Tabelle 19: Tabelle der zur Verfügung stehenden pIN69 transformierten Stämme

Fluoreszenzprotein Stamm	eBFP2	GFP	ZsYellow	DsRed2	mNeptune
<i>S. plymuthica</i> 3Re4-18	✓		✓		✓
<i>S. plymuthica</i> S13		✓	✓	✓	
<i>S. plymuthica</i> 3Rp5	✓	✓		✓	
<i>S. plymuthica</i> 3Rp8				✓	
<i>S. plymuthica</i> 4rx13	✓				✓
<i>E. coli</i> 5α	✓	✓	✓	✓	✓

3.2 Effekt bakterieller Isolate auf die Pflanzen

3.2.1 cfu/ml in Übernachtskulturen und bei Applikation

In den für das Samentauchbad vorbereiteten ONCs konnten die in Tabelle 20 gezeigten cfu/ml mittels auszählen von Verdünnungen auf LB-Agar-Platten (Ermittlungsmethode siehe Abbildung 25) ermittelt werden.

Tabelle 20: Cfu/ml in den Kulturen bei Inkubation bei 30 °C und 100 rpm über Nacht

Behandlung/ cfu/ml	V1	V2	V3	V4	V5 - V7	V10	V12	V13	V14
3Re4-18	4,1*10 ⁹	3,4*10 ⁹	7,5*10 ⁹	4,9*10 ⁹	-	-	-	-	-
S13	9,5*10 ⁹	4,2*10 ⁹	1,1*10 ¹⁰	2,7*10 ⁹	4,0*10 ⁹	-	-	-	-
3Rp5	1,1*10 ¹⁰	2,7*10 ⁹	-	-	-	-	-	-	-
3Rp8	7,3*10 ⁹	2,7*10 ⁹	1,9*10 ⁹	1,1*10 ⁹	3,6*10 ⁹	-	-	-	-
4rx13	5,9*10 ⁹	1,5*10 ⁹	-	-	-	-	-	-	-
P69	3,8*10 ⁹	1,4*10 ⁹	7,2*10 ⁹	1,2*10 ⁹	-	-	-	-	-
eP17	3,7*10 ⁹	1,1*10 ⁹	5,5*10 ⁹	-	-	-	-	-	-
B2G	2,6*10 ⁷	-	9,8*10 ⁸	1,3*10 ⁸	-	-	-	-	-
S13-GFP	-	-	-	-	3,8*10 ⁹	7,4*10 ⁹	5,8*10 ⁹	3,2*10 ⁹	5,2*10 ⁹
3Rp8- DsRed2	-	-	-	-	2,8*10 ⁹	6,3*10 ⁹	3,5*10 ⁹	4,0*10 ⁹	4,8*10 ⁹
4rx13-mNeptune	-	-	-	-	-	4,7*10 ⁹	-	-	3,4*10 ⁹
3Rp5-eBFP2	-	-	-	-	-	8,0*10 ⁹	4,3*10 ⁹	-	-
3Rp5-GFP	-	-	-	-	-	-	-	-	5,8*10 ⁹
4rx13- eBFP2	-	-	-	-	-	-	2,2*10 ⁹	-	-

- Stamm in diesem Versuch nicht inkludiert

Für die Versuche V8 und V9 werden keine Daten dargestellt, da bei der Durchführung der Verdünnungsreihen der ONCs für die Zellzahlbestimmung ein Fehler passiert ist. Die 3Rp8-DsRed2-Kultur in Versuch V11 erreichte eine Dichte von 3,1*10⁹ cfu/ml.

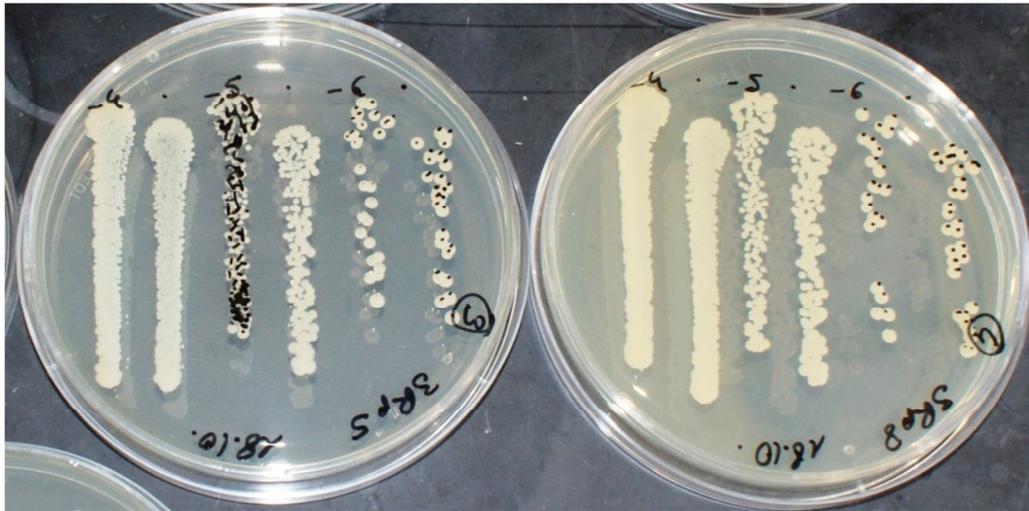


Abbildung 25: Austropfen einer Verdünnungsreihe auf LB-Agar-Platten zur Bestimmung der cfu/ml.

Die ONCs der Umweltstämme wurden für das Samentauchbad 10-fach verdünnt, mit Ausnahme der ONC von P69, welche immer 100-fach verdünnt wurde. In den Dosis-Wirkungs-Tests wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt. Die für das Samentauchbad in einem Versuch eingesetzten cfu/ml werden in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21: CfU/ml in den für das Samentauchbad verwendeten verdünnten Suspensionen

Behandlung	V1	V2	V3	V4	V5 - V7	V10	V12	V13	V14
3Re4-18	$4,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	-	-	-	-	-
S13	$9,5 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	-	-	-	-
3Rp5	$1,1 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^8$	-	-	-	-	-	-	-
3Rp8	$7,3 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	-	-	-	-
4rx13	$5,9 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	-	-	-	-	-	-	-
P69	$3,8 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	-	-	-	-	-
eP17	$3,7 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^8$	-	-	-	-	-	-
B2G	$2,6 \cdot 10^6$	-	$9,8 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	-	-	-	-	-
S13-GFP	-	-	-	-	$3,8 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^5$ bis 10^8	$5,8 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^5$ $3,2 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^5$ $5,2 \cdot 10^8$
3Rp8- DsRed2	-	-	-	-	$2,8 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^5$ bis 10^8	$3,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^5$ $4,0 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^5$ $4,8 \cdot 10^8$
4rx13-mNeptune	-	-	-	-	-	$4,7 \cdot 10^5$ bis 10^8	-	-	$3,4 \cdot 10^8$
3Rp5-eBFP2	-	-	-	-	-	$8,0 \cdot 10^5$ bis 10^8	$4,3 \cdot 10^8$	-	-
3Rp5-GFP	-	-	-	-	-	-	-	-	$5,8 \cdot 10^8$
4rx13-eBFP2	-	-	-	-	-	-	$2,2 \cdot 10^8$	-	-

Für den Steirischen Ölkürbis sollten für das **Samentauchbad** andere Gefäße mit einer größeren Menge Suspension verwendet werden anstatt Petrischalen oder Erlenmeyer-Kolben, da sich in den Petrischalen die Samen oftmals übereinander schoben und so nicht gleichmäßig mit Suspension versorgt wurden und auch in den Erlenmeyer-Kolben keine gute Durchmischung zustande kam.

Ergebnisse

Obwohl beim Steirischen Ölkürbis nur unverletzte Samen verwendet wurden war das ST nicht optimal, da sich dabei Zellmaterial ablöste welches, die Bakteriensuspension deutlich grün anfärbte und die dünne Samenhaut verletzt wurde. An den Spitzen der meisten Keimblätter waren Nekrosen sichtbar, die aus einer Verletzung des Samens entstanden sein mussten.

3.2.2 Topfexperimente zur Analyse des Auflaufs und Gewichts der oberirdischen Pflanzenteile

Alle Rohdaten sind in beiliegendem Excel „Daten.xlsx“ einsehbar. In den folgenden Grafiken wurden zwecks Übersichtlichkeit jedoch nur die Daten von zwei bis drei Zeitpunkten nach Auflauf der Pflanzen im jeweiligen Versuch dargestellt (ein sehr früher Zeitpunkt, zum Teil ein mittlerer Zeitpunkt und jener Tag, an dem der Versuch beendet wurde).

3.2.2.1 Effekte auf den Steirischen Ölkürbis

Die Grafik links in Abbildung 26 zeigt die Summe des Gewichts der Sprosse in g der aufgelaufenen Pflanzen der drei Wiederholungen einer Behandlung von Versuch 1 in Form von Balken. In der Grafik rechts wird das durchschnittliche Sprossgewicht einer aufgelaufenen Pflanze dargestellt. Die Punkte sowie Kästchen geben die Prozent der aufgelaufenen Pflanzen zu bestimmten Tage nach dem Samentauchbad an. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

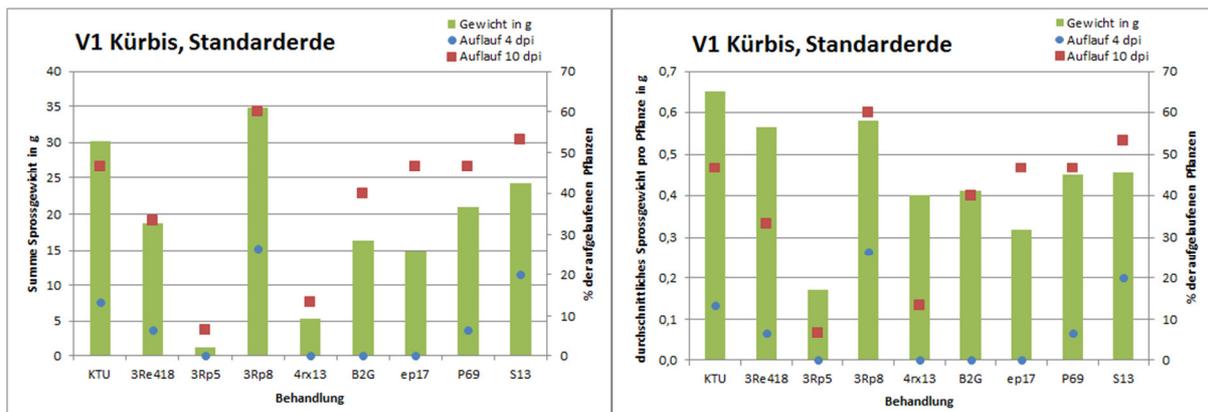


Abbildung 26: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs vier sowie zehn dpi (days post inoculation/Tage nach Inokulation) in Experiment V1 Kürbis in Standarderde.

Samen mit den Behandlungen 3Rp8 und S13 liefen am schnellsten (26 beziehungsweise 20 % vier Tage nach Inokulation) und in diesen beiden Behandlungen liefen bis zum Abbruch des Versuchs (zehn Tage nach der Inokulation) auch am meisten Pflanzen auf (60 beziehungsweise 53 %). Die Pflanzen mit der Behandlung mit 3Rp8 erreichten auch das höchste Sprossgesamtgewicht.

Ergebnisse

In Versuch 2, welcher wie Versuch 1 angelegt wurde, jedoch auf stark belasteter Erde aus Gleisdorf (Bel.E) stattfand, lief keine einzige Pflanze auf. Da als Ursache die zu große Eingießmenge und/oder zu wenig rückgetrocknete Samen vermutet wurden, wurde der Versuch wiederholt (V3) wobei die beiden schlechtesten Behandlungen aus V1 (3Rp5 und 4rx13) weggelassen wurden und eine Variante mit Originalsaatgut ohne Priming hinzugefügt wurde. Die Samen von V3 wurden 4,5 Stunden unter einer Laminar-Flow-Einheit und anschließend 37 Stunden bei RT rückgetrocknet. Wie in Tabelle 22 ersichtlich, konnten im gesamten Versuchsansatz nur 5 % der Pflanzen auflaufen, was äußerst unzureichend ist. In den Behandlungen P69, ep17, KTU und ORI gab es keinerlei Auflauf.

Tabelle 22: Prozentueller Auflauf und Sprossgewicht der drei Wiederholungen und durchschnittliches Sprossgewicht pro Pflanze in V3, Kürbis auf belasteter Erde aus Gleisdorf

Behandlung	6 dpi	7 dpi	11 dpi	15 dpi	18 dpi	Gesamtgewicht in g	Ø Gewicht/Pflanze in g
3Rp8	7	13	13	13	13	5,88	2,94
S13	0	0	13	13	13	1,97	0,99
B2G	0	7	7	7	7	4,09	4,09
3Re4-18	0	0	0	7	7	0,66	0,66
P69, ep17, KTU, ORI	0	0	0	0	0	0	0

Auch in Versuch 4 mit weniger stark belasteter Erde aus Niederösterreich war der Auflauf, wie in Tabelle 23 ersichtlich, mit 3 % der gesäten Samen äußerst unbefriedigend.

Tabelle 23: prozentueller Auflauf, Sprossgewicht der drei Wiederholungen und durchschnittliches Sprossgewicht/Pflanze in V4 Kürbis auf Erde aus Niederösterreich, aufbereitet von der Firma Kwizda

Behandlung	% Auflauf		Gewicht in g bei 20 dpi
	11 dpi	20 dpi	
3Rp8	0	0	0
S13	7	7	4,56
3Rp8+S13	0	7	0,84
KTU	0	0	0

Der Versuch V4 - Kürbis in Standarderde – zeigte, dass die Behandlungen mit 3Rp8 sowie S13 eine Verbesserung des Auflaufs sowie des Gewichts im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkten, die Kombination aus 3Rp8+S13 jedoch wieder ähnliche Werte wie die Negativkontrolle erreichte. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

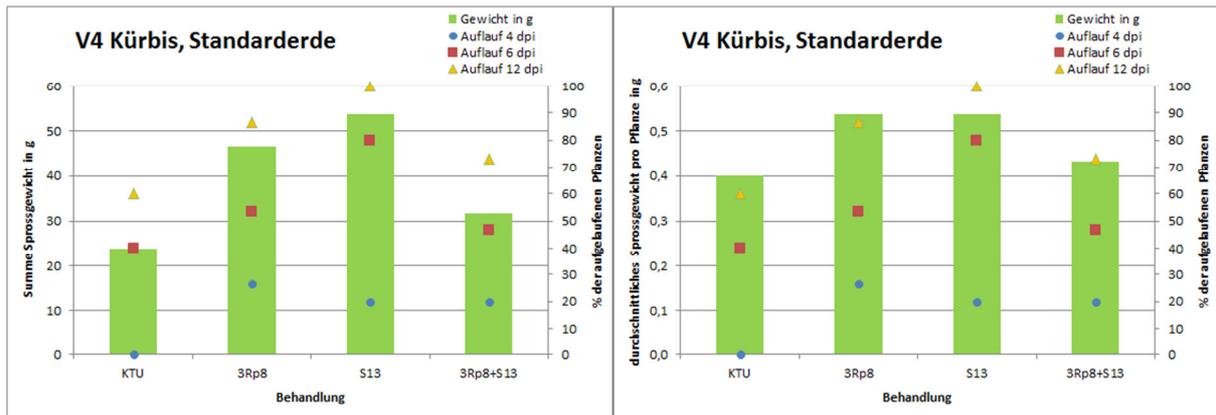


Abbildung 27: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V4, Kürbis in Standarderde.

Abbildung 28 zeigt ein Foto der Pflanzen aus der Kontrollbehandlung KTU sowie der Pflanzen aus der Behandlung 3Rp8 kurz vor dem Abbau des Versuchs V4.



Abbildung 28: V4 mit Kürbis in Standarderde, zwölf Tage nach Inokulation; links: die drei Wiederholungen der Kontrollbehandlung KTU, rechts jene der 3Rp8-Behandlung.

Der Versuch V5 - Kürbis in Standarderde – war eine Wiederholung von Versuch V4. Die Einzelbehandlungen mit S13 und 3Rp8 sowie die Mischbehandlung mit 3Rp8 und S13 bewirkten eine Verbesserung des Auflaufs, die Unterschiede im Gewicht der Sprosse im Vergleich zu KTU waren jedoch nicht so gut ausgeprägt wie in V4. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

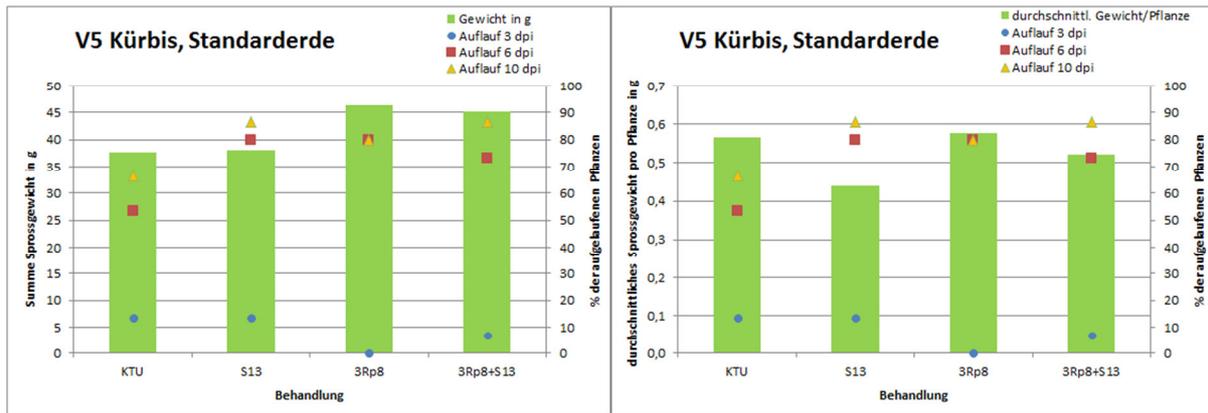


Abbildung 29: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V5, Kürbis in Standarderde.

Der Versuch V6 - Kürbis auf steriler Standarderde und Applikation der bakteriellen Isolate mittels eingießen (anstatt des Samentauchbades) - zeigte sehr starke Ähnlichkeiten zu V4. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

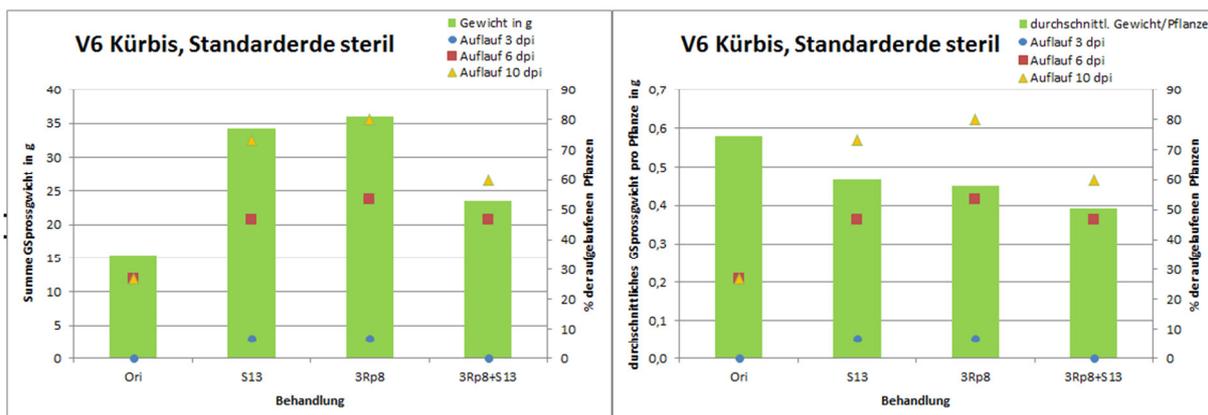


Abbildung 30: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs der Gießvariante in V6, Kürbis auf doppelt sterilisierter Standarderde.

Abbildung 31 zeigt ein Foto der Pflanzen aus der Kontrollbehandlung ORI sowie der Pflanzen aus der Behandlung S13 kurz vor dem Abbau des Versuchs V6.



Abbildung 31: V6 mit Kürbis auf steriler Standarderde, 10 Tage nach dem Eingießen des Versuchs mit Bakterien-Suspension; links: die drei Wiederholungen der ORI-Kontrollbehandlung, rechts jene der S13-Behandlung.

Wie in Abbildung 32 ersichtlich ist, litten die Pflanzen in V6 unter diversen Stress- beziehungsweise Krankheits-Symptomen, die in den anderen Versuchen nicht beobachtet werden konnten. Die Probleme an den Blatträndern würden unter Feldbedingungen entweder auf einen Spritzschaden (eventuell Rückstände von der Reinigung mit Bacillol) oder auf eine akute Randinfektion der Blätter mit Bakterien oder Pilzen über die Hydathoden hinweisen. Eine weitere mögliche Ursache könnte sein, dass trotz der hohen Luftfeuchtigkeit unter der transparenten Haube zu wenig verfügbares Wasser für die Pflanzen bereit stand. Der Versuch könnte mit transformierten Stämmen wiederholt und die Bakterienlast an den Blatträndern unter dem CLSM evaluiert werden.



Abbildung 32: Stress- beziehungsweise Krankheits-Symptome der Pflanzen in V6 mit Kürbis auf steriler Standarderde, 10 Tage nach dem Eingießen des Versuchs mit Bakterien-Suspension.

Abbildung 33 zeigt Pilzmyzel, das aus Resten der Samenhaut beziehungsweise aus den Keimblättern wächst. Da der Versuch V6 steril angelegt wurde, ist davon auszugehen, dass sich die Pilze am Samen befanden. Dieses Bild zeigte sich auch in anderen – nicht sterilen – Versuchen mit Kürbis.

Ergebnisse



Abbildung 33: Pilzmyzel auf Resten der Samenhaut (links) beziehungsweise an einem Keimblatt (rechts) in V6 mit Kürbis auf steriler Standarderde.

In Versuch 9 wurde getestet, ob die negativen Effekte der Stämme 4Rx13 und 3Rp5 durch die positiven Effekte der Stämme 3Rp8 und S13 kompensiert werden können. Die Applikation erfolgte mittels Samentauchbad und die Aussaat fand in Standarderde statt. Wie in Abbildung 34 ersichtlich, konnte eine Verbesserung im Auflauf erzielt werden, in einigen Mischbehandlungen eines positiven und eines negativen Stammes konnte eine größere Anzahl an Pflanzen auflaufen als in der Kontrollbehandlung. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

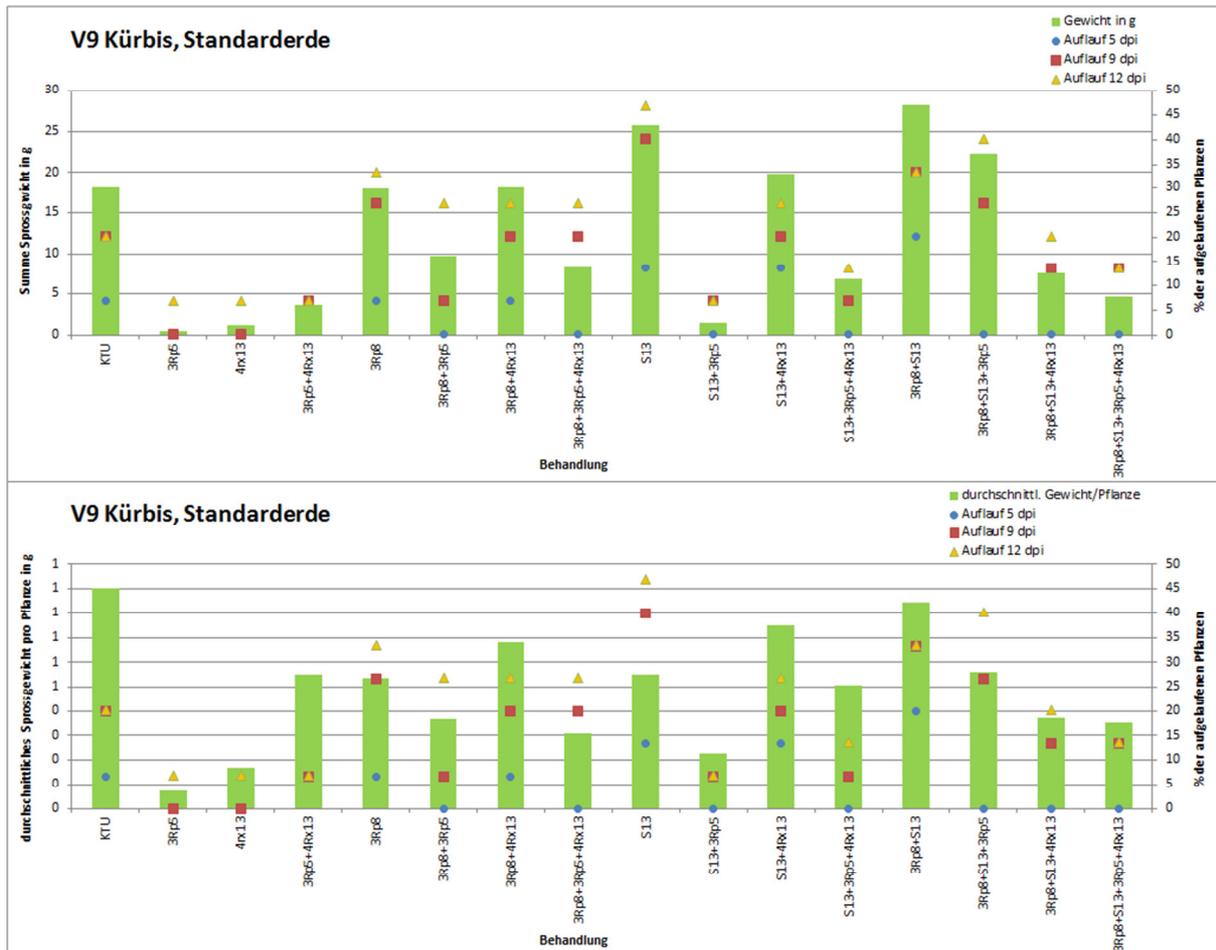


Abbildung 34: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V9, Kürbis in Standarderde.

Abbildung 35 fasst die wichtigsten Aussagen aus den Versuchen mit Kürbis in Standarderde zusammen: durch das Priming mit *S. plymuthica* S13 konnte der Auflauf im Vergleich zur Kontrollbehandlung im Schnitt von 48 % auf 72 % gesteigert werden. Durch die Behandlung mit *S. plymuthica* 3Rp8 sowie der Mischbehandlung von 3Rp8 und S13 wurde im Schnitt jeweils ein Auflauf von 65 % erzielt, wohingegen die Behandlungen mit 4Rx13 und 3Rp5 zu einer signifikanten Reduktion auf 10 beziehungsweise 7 % Auflauf führten.

Ergebnisse

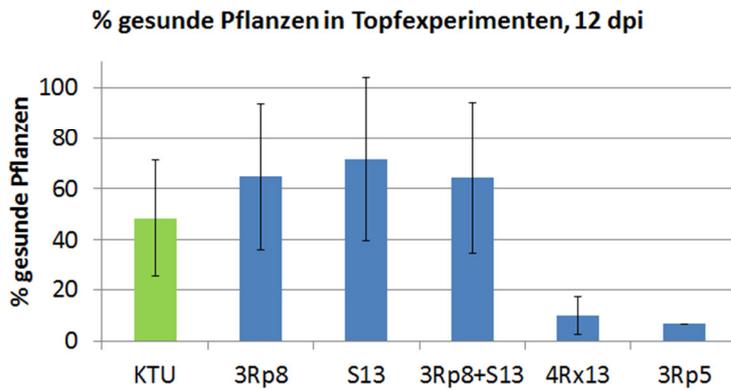


Abbildung 35: Zusammenfassung des prozentuellen Anteils gesunder Pflanzen in den Versuchen V1, V4, V5 und V9 mit Kürbis in Standarderde.

3.2.2.2 Effekte auf Maispflanzen

Abbildung 36 zeigt, dass im Mais-Versuch 1 in Standarderde die mit B2G und P69 behandelten Samen am schnellsten aufliefen. Die mit B2G behandelten Samen erreichten weiters das höchste Gesamtgewicht und das höchste durchschnittliche Gewicht/Pflanze. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

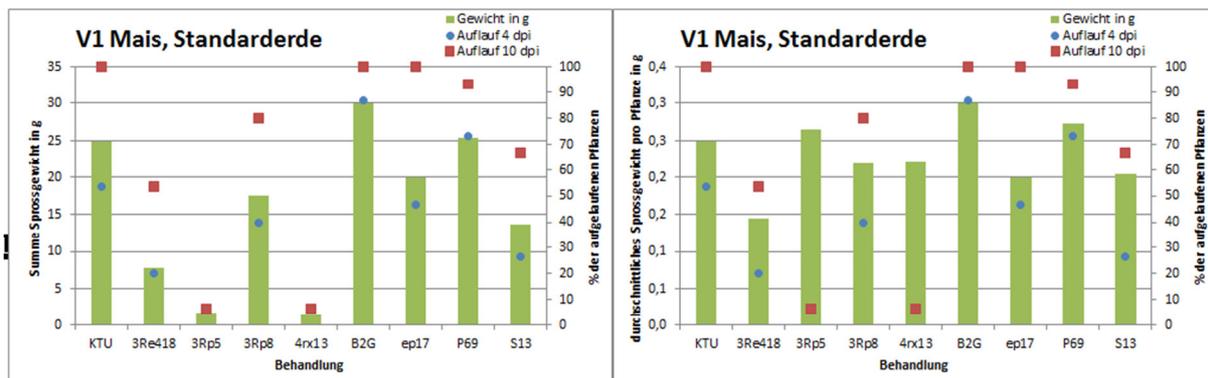


Abbildung 36: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V1, Mais in Standarderde.

In Abbildung 37 ist ersichtlich, dass auf belasteter Erde Maissamen mit P96- sowie 3Re4-18-Behandlung am schnellsten und bei den Behandlungen P96, 3Re4-18 sowie B2G auch die meisten Samen aufliefen. Diese drei Behandlungen erreichten auch das höchste Gesamtgewicht. Beim durchschnittlichen Gewicht/Pflanze erreichten Pflanzen mit Behandlungen mit den drei *S. plymuthica*-Stämmen (3Re4-18, 3Rp5 und 3Rp8) ein etwas höheres Gewicht als Pflanzen aus Samen, die mit anderen Stämmen behandelt wurden. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

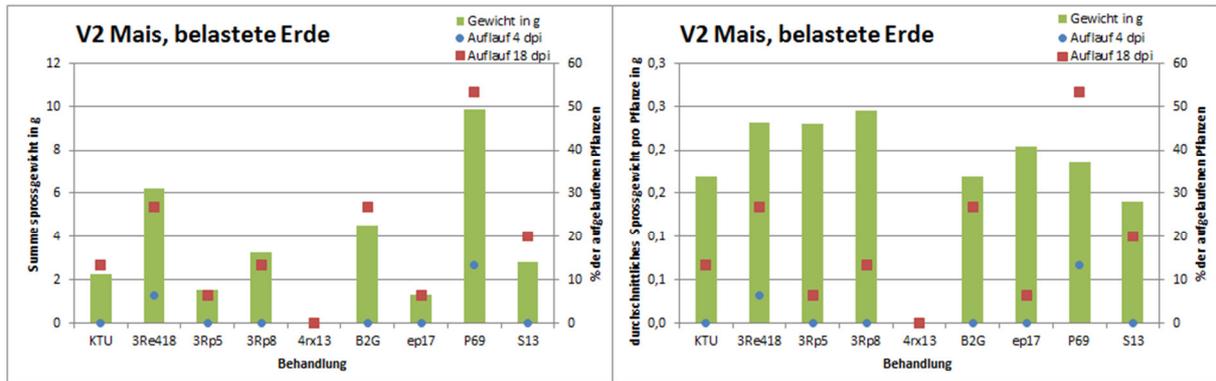


Abbildung 37: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Aufbaus in V2, Mais auf belasteter Erde.

Abbildung 38 zeigt ein Foto von Versuch 2, auf welchem die Negativkontrolle KTU sowie P69-behandelte Pflanzen zu sehen sind.



Abbildung 38: Vergleich der drei Wiederholungen von KTU (links) mit denen von P69-behandelten Samen (rechts) in Versuch 2, 18 Tage nach der Inokulation.

In V4 – Mais auf belasteter Erde – waren die Unterschiede zwischen den Behandlungen nicht besonders stark ausgeprägt. Einzig die Kombination B2G+P69 erzielte leichte Vorteile im Gesamt- sowie im Durchschnittsgewicht im Vergleich zur Kontrollbehandlung sowie den anderen Behandlungen. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

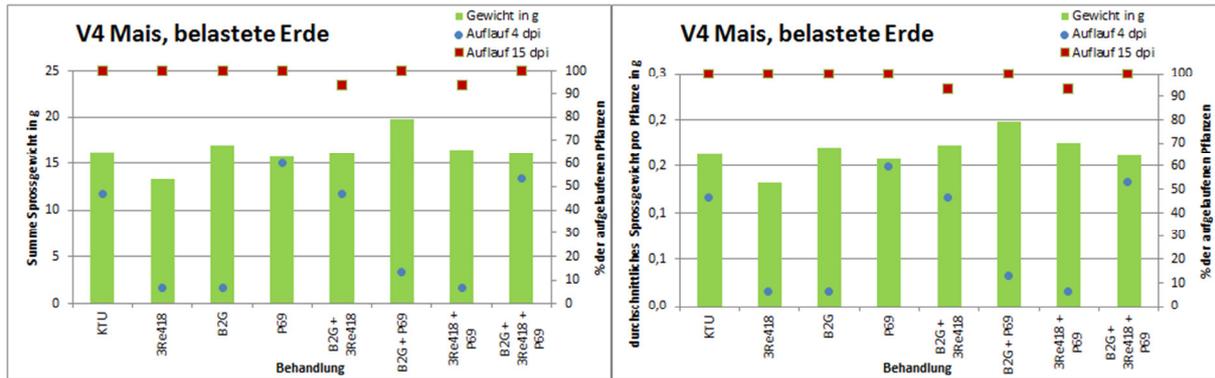


Abbildung 39: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V4, Mais auf belasteter Erde.

3.2.2.3 Effekte auf Tomatenpflanzen

Tomaten in Standarderde (leicht aufgedüngt) hatten bis zum Abbruch des Versuchs, 17 Tage nach Inokulation mehrere Laubblätter ausgebildet. Tomaten auf Kokos-Substrat kamen, offensichtlich aufgrund mangelnder Nährstoffe, in allen Behandlungen nicht über das Keimblatt-Stadium hinaus. Trotzdem zeigten sich, wie in Abbildung 40 ersichtlich, starke Ähnlichkeiten bezüglich der erreichten Gewichte der Pflanzen. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

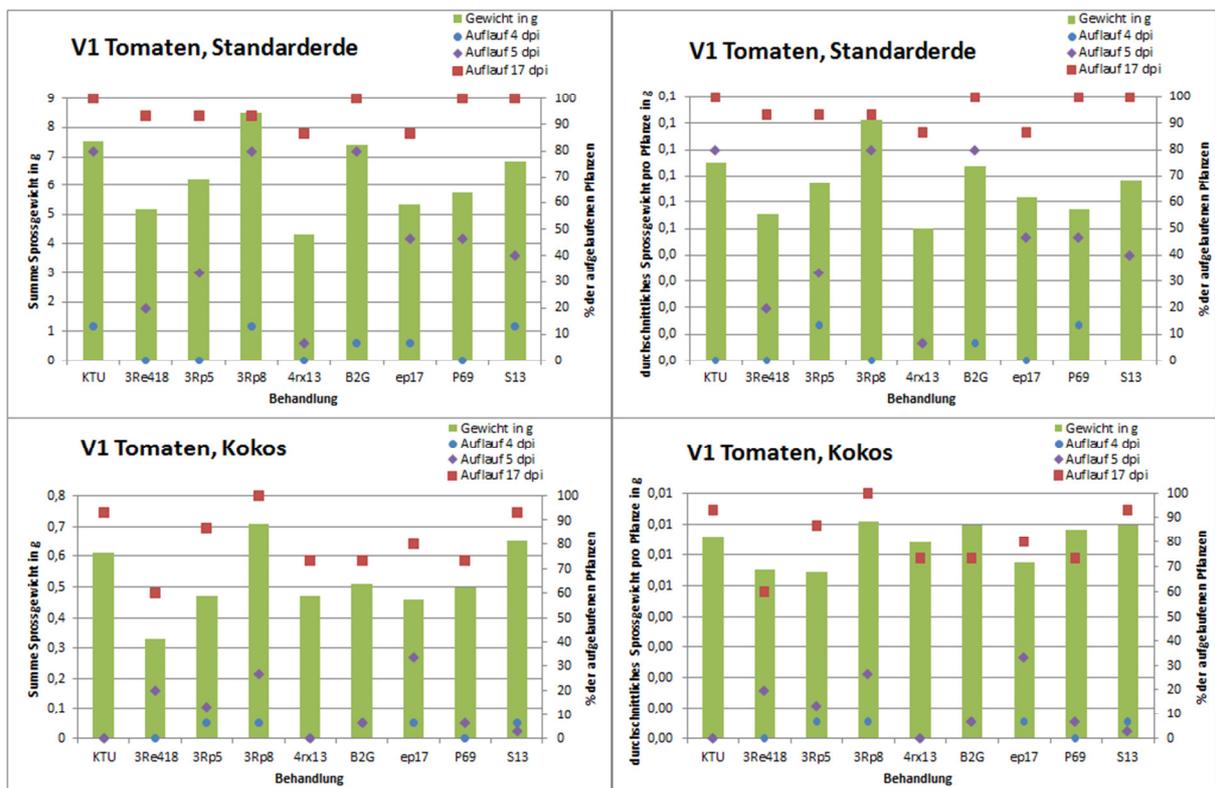


Abbildung 40: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V1 mit Tomaten in Standarderde sowie auf Kokos-Substrat.

Ergebnisse



Abbildung 41: Teil von V1 mit Tomaten; rechts auf Kokos-Substrat, links in Standarderde jeweils 17 Tage nach Inokulation.

In V2 auf belasteter Erde zeigte sich, dass Tomaten hier auf vier der fünf *S. plymuthica*-Stämme sehr positiv reagierten und die anderen Stämme ebenfalls eine Verbesserung bezüglich des erreichten Gewichts der oberirdischen Pflanzenteile bewirkten. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

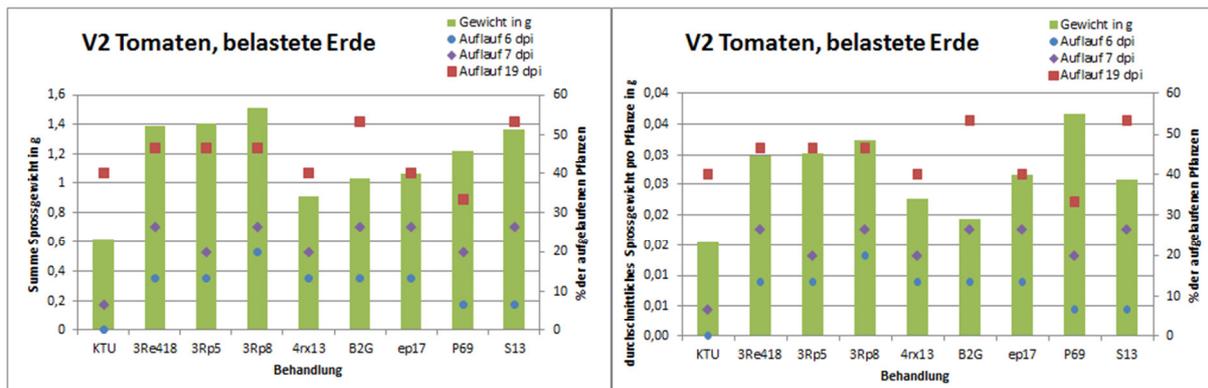


Abbildung 42: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V2, Tomaten auf belasteter Erde.

In V4 – Tomaten auf belasteter Erde konnte durch das Priming mit zwei ausgewählten *S. plymuthica*-Stämmen eine Verbesserung im Auflauf erzielt werden. Bezüglich des erreichten Gewichts der oberirdischen Pflanzenteile war kein Trend ersichtlich. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je fünf Samen gesetzt.

Ergebnisse

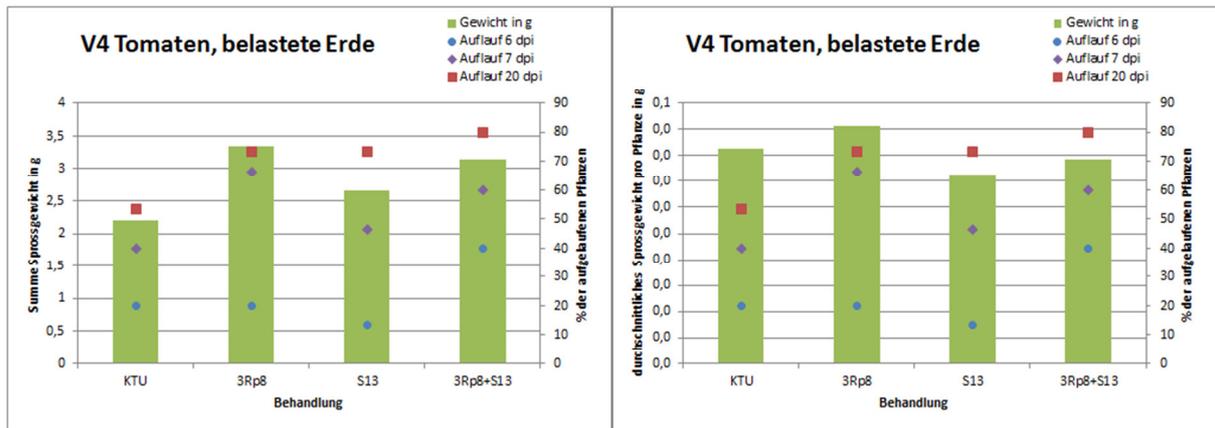


Abbildung 43: Auswertung des Sprossgewichtes sowie des prozentuellen Auflaufs in V4, Tomaten auf belasteter Erde.

3.2.2.4 Zusammenfassung der Versuche im Gewächshaus

In den folgenden Tabellen wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuche gewichtet, wobei positive Zahlen eine vorteilhafte Veränderung und +2 eine stark positive Veränderung angeben (Kombination aus Verbesserung der Anzahl der aufgelaufenen Pflanzen sowie des Gewichts der oberirdischen Pflanzenteile). -1 beziehungsweise -2 zeigen erkennbare beziehungsweise sehr starke Verschlechterungen der Pflanzengesundheit durch eine Behandlung im Vergleich zur Negativkontrolle an.

Wie in Tabelle 24 ersichtlich, reagierte der Ölkürbis durchwegs positiv auf S13 und 3Rp8 sowie auf die Kombination von S13 und 3Rp8, wobei die Kombination beider nie besser als die beste Einzelbehandlung war. 3Rp5 und 4rx13 hatten stark negative Auswirkungen, bei den anderen Stämmen traten weder deutlich positive noch deutlich negative Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle auf.

Tabelle 24: Gewichtung der Resultate aus den Versuchen V1 bis V6 (Topfexperimente) für Kürbis

	V1	V3	V4	V4	V5	V6-Gieß	V9
	Std.ET	Bel.E	Std.E	NÖ-E	Std.E	Std.E	Std.E
3Re4-18	-1	+0,5	-	-	-	-	-
S13	0	+1	+2	+0,5	+1	+2	+2
3Rp5	-2	-	-	-	-	-	-2
3Rp8	+1	+1	+2	x	+2	+2	+1
4rx13	-2	-	-	-	-	-	-2
P69	-1	x	-	-	-	-	-
ep17	-1	x	-	-	-	-	-
B2G	-1	+0,5	-	-	-	-	-
3Rp8+S13	-	-	0	+0,5	+2	+1	+2

-: diese Kombination wurde in diesem Versuch nicht getestet.

x = nicht bewertbar, da in der Negativkontrolle und die jeweilige Behandlung keine Pflanzen aufliessen. Der gesamte Versuch 2 war nicht bewertbar.

Wie in Tabelle 25 ersichtlich, reagierten auch die Tomatensamen durchwegs positiv auf S13 und 3Rp8 sowie auf die Kombination von S13 und 3Rp8, wobei die Kombination nicht besser als die Einzelbehandlung war. 4rx13, P69 und ep17 hatten negative Auswirkungen, bei den anderen Stämmen konnten weder deutlich positive noch deutlich negative Trends erkannt werden.

Tabelle 25: Gewichtung der Resultate aus den Versuchen V1, V2 und V4 für Tomaten

	V1	V1	V2	V4
	Std.ET	Kokos	Bel.E	Bel.E
3Re4-18	-1	-2	+2	-
S13	0	0	+2	+1
3Rp5	0	-1	+2	-
3Rp8	+0,5	+1	+2	+2
4rx13	-1	-1	0	-
P69	-1	-1	0	-
ep17	-1	-1	0	-
B2G	0	-1	+1	-
S13+3Rp8	-	-	-	+1

-: diese Kombination wurde in diesem Versuch nicht getestet.

Wie in Tabelle 26 ersichtlich, reagierten die Maissamen positiv auf P69 und B2G. Die einzige Kombination, die eine leicht positive Veränderung brachte war B2G+P69 in V4, obwohl in diesem Versuch diese beiden Einzelstämme keine Verbesserung im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten. 4rx13 und 3Rp5 hatten negative Auswirkungen, bei den anderen Stämmen wurden weder deutlich positive noch deutlich negative Trends festgestellt.

Tabelle 26: Gewichtung der Resultate aus den Versuchen V1, V2 und V4 für Mais

	V1	V2	V4
	Std.ET	Bel.E	Bel.E
3Re4-18	-2	1	0
S13	-1	0	-
3Rp5	-2	0	-
3Rp8	-1	0	-
4rx13	-2	-2	-
P69	0	2	0
ep17	-1	0	-
B2G	1	1	0
B2G+3Re4-18	-	-	0
B2G+P69	-	-	1
3Re4-18 +P69	-	-	0
B2G+3Re4-18 +P69	-	-	0

:- diese Kombination wurde in diesem Versuch nicht getestet.

Eine Zusammenfassung der Resultate nach Isolaten gruppiert ergibt folgendes Bild:

- die Behandlung mit **3Re4-18** zeigte in allen getesteten Kulturen weder positive noch negative Effekte
- die Behandlungen mit **S13** und **3Rp8** bewirkten am Kürbis und an den Tomaten positive Effekte, am Mais jedoch weder positive noch negative Veränderungen
- die Behandlung mit **3Rp5** bewirkte sowohl im Kürbis als auch im Mais Verschlechterungen, bei den Tomaten jedoch weder positive noch negative Veränderungen
- die Behandlung mit **4rx13** bewirkte in allen Kulturen negative Veränderungen
- die Behandlung mit **P69** bewirkte am Kürbis weder positive noch negative Veränderungen, an den Tomaten Verschlechterungen und am Mais Verbesserungen
- die Behandlung mit **ep17** bewirkte am Kürbis und am Mais weder positive noch negative Veränderungen, an den Tomaten jedoch Verschlechterungen
- die Behandlung mit **B2G** bewirkte am Kürbis und an den Tomaten weder positive noch negative Veränderungen, am Mais jedoch Verbesserungen
- mit Ausnahme der **Kombination B2G+P69** in Versuch 4 waren Kombinationen von Stämmen nie besser als die beste Einzelbehandlung mit demselben Stamm im selben Versuch.

Tabelle 27 fasst diese Punkte noch einmal zusammen.

Tabelle 27: Resultate aus den Versuchen V1 bis V7 für die drei Kulturpflanzen

	Kürbis	Tomaten	Mais
S13	positiv	positiv	neutral
3Rp8	positiv	positiv	neutral
P69	neutral	negativ	positiv
B2G	neutral	neutral	positiv
3Re4-18	neutral	neutral	neutral
ep17	neutral	negativ	neutral
3Rp5	negativ	neutral	negativ
4rx13	negativ	negativ	negativ

Für fünf Stück Samen von Mais und Tomaten waren Töpfe mit 10 cm Durchmesser völlig ausreichend, für Kürbis sollten aber besser größere Töpfe verwendet werden, da die Aussaat in kleineren Töpfen schwierig ist, die Keimlinge durch den begrenzten Platz Probleme beim „Umdrehen“ hatten und die Keimblätter sehr groß sind und nachkommende Pflanzen im Wachstum unterdrücken.

Besser ist es, auch schon beim ersten Eingießen jeden Topf separat mit Untersetzter zu bestücken und bereits von Beginn an schon **separat zu gießen**, für den Fall, dass lange Zeit das eingegossene Wasser nicht aufgesogen wird und sich so eventuell schon Vermischungen der bakteriellen Isolate mit dem Wasser ergeben.

3.2.3 Alternative Testmethoden in Erde

Sowohl Mais als auch Tomaten-Keimlinge konnten ohne jede Perforation des Filterpapiers dieses mit ihrem Trieb durchstoßen. Es lief jedoch kein Kürbissamen bei diesem Test mit Filterpapier auf. Die Erdmenge in einer Petrischale ist ausreichend, damit die Pflanzen auch noch mehrere Laubblätter ausbilden können. Bei Zuhilfenahme von Filtern konnte am Boden der Petrischale beobachtet werden, ob ein Samen gar nicht ankeimt (Keimhemmung durch das Inokulum oder andere Pathogene in der Erde) oder ob der bereits ankeimende Samen von Pilzen und/oder Bakterien zerstört wurde.

Mais wuchs sogar in 2 ml Eppendorf-Gefäßen heran, jedoch nur, wenn der Samen in der richtigen Orientierung (Caruncula nach unten zeigend) platziert wurde. Tomaten wuchsen hingegen nicht heran, da die Keimlinge/Samen durch die Bewässerung offensichtlich erstickt wurden.

Ergebnisse



Abbildung 44: Untersicht des Ankeimtests mit Mais mit großem Filter (links), kleinem Filter (Mitte) und ohne Filter (rechts). Mitte: „Keimsperr“.



Abbildung 45: Unterschiedliche Varianten für Ankeimtest in Erde (links), von Pilzen zerstörte Kürbissamen (Mitte); in einem Eppendorf-Gefäß angewachsene Mais-Pflanze (rechts).

Es konnte beobachtet werden, dass nicht auflaufende Maissamen lange Zeit völlig intakt im Boden lagen, wohingegen nicht auflaufende Kürbissamen schon nach weniger als zwei Tagen von Pilzen oder Bakterien stark angegriffen und zersetzt wurden.

3.2.4 Experimente mit transformierten Stämmen in Keimfiltern

Die Verwendung von Keimfiltern zeichnete sich dadurch aus, dass auch das Gewicht der Wurzeln ermittelt werden konnte und eine Reisolation der Bakterien von den Wurzeln einfach möglich war.

Versuch 7 wurde mit drei Samen pro Keimfilter und drei Wiederholungen pro Behandlung angelegt. Die Auswertung der elf Tage nach Inokulation von den Wurzeln der Pflanzen reisolierten Bakterien ist in Tabelle 28 dargestellt. Die in der Tabelle angegebenen Gramm Pflanzenmaterial wurden in 5 ml 0,85%igen NaCl zerrieben. Für S13-GFP, 3Rp8-DsRed2 sowie die Mischbehandlung war jeweils nur die 10^{-4} -Verdünnung auszählbar (zu hohe Zellzahl in der 10^{-3} sowie 10^{-2} Verdünnung), bei KTU waren die 10^{-3} sowie die 10^{-2} -Verdünnung auszählbar. Eine Überprüfung, ob es sich bei den reisolierten Bakterien um die transformierten Stämme handelte fand unter dem Motic AE31-Mikroskop mit den

Ergebnisse

beiden Filterwürfeln GFP beziehungsweise TRITC Rhodamine statt. Bei der Mischbehandlung wurden die Stämme ebenfalls aufgrund ihres Fluoreszenzsignals unterschieden.

Tabelle 28: Cfu/ml beziehungsweise cfu/g Wurzelfrischgewicht der elf Tage nach der Inokulation in V7 reisolierten transformierten Bakterienstämme

Behandlung	cfu/ml	g Wurzeln verwendet	cfu/g	Anmerkung
KTU	$2,5 \cdot 10^5$	1,432	$8,7 \cdot 10^5$	hierbei handelt es sich um eine Trimethoprim-resistente Kontamination (alle Kolonien waren gleichförmig)
S13-GFP	$1,2 \cdot 10^8$	2,058	$2,9 \cdot 10^8$	
3Rp8-DsRed2	$1,9 \cdot 10^8$	2,786	$3,4 \cdot 10^8$	
				davon S13-GFP davon 3Rp8-DsRed2
S13-GFP + 3Rp8-DsRed2	$1,1 \cdot 10^8$	2,042	$2,7 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^7$ cfu/ml $7,9 \cdot 10^7$ cfu/ml $8,1 \cdot 10^7$ cfu/g $1,9 \cdot 10^8$ cfu/g

Versuch 8 wurde gleich wie Versuch 7 angelegt, um mit transformierten Mischkulturen besiedelte Wurzeln für die Mikroskopie zu erhalten. Im Gegensatz zu Versuch 9, wo dieselben Kombinationen von positiv und negativ wirkenden Stämmen in Standarderde gesetzt wurden, lief in diesem Versuch in Keimfiltern kein Samen auf, der mit 3Rp5 oder 4Rx13 als Einzelbehandlung oder in einer Kombination dieser beiden Stämme mit 3Rp8 geprint war. Tabelle 29 und Tabelle 30 zeigen die Daten und Ergebnisse zu diesem Versuch.

Tabelle 29: Prozentueller Auflauf in Versuch 8, Kürbis in Keimfiltern

Behandlung	% Auflauf 8 dpi	% Auflauf 12 dpi
KTU	56 %*	0*
3Rp8-DsRed2	78 %	78 %
Einzelbehandlungen 3Rp5-GFP sowie 4Rx13-mNeptune und die Mischbehandlungen 3Rp5-GFP + 4Rx13-mNeptune, 3Rp8-DsRed2+ 4Rx13-mNeptune, 3Rp8-DsRed2+ 3Rp5-GFP, 3Rp8-DsRed2 + 4Rx13-mNeptune + 3Rp5-GFP	0	0

* in dieser Negativkontrolle bildeten die Pflanzen zwar grüne Keimblätter aus, jedoch keine Wurzeln.

In diesem Versuch wurden exemplarisch auch die cfu/g direkt nach der Inokulation beziehungsweise von nicht aufgelaufenen Samen 9 dpi ermittelt. Die Berechnung der cfu/g Pflanzenmaterial in diesem sowie in allen folgenden Experimenten erfolgte analog zu der in Tabelle 28 dargestellten Weise. Ab Versuch 8 wurde die Unterscheidung der transformierten Stämme in einer Mischbehandlung unter Zuhilfenahme des Bio-Rad ChemiDoc™ Systems durchgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 30: Cfu/g Pflanzenmaterial in Versuch 8, neun beziehungsweise zwölf Tage nach der Inokulation

Behandlung	cfu/g Samen 0 dpi	cfu/g Samen 9 dpi	cfu/g Wurzeln 12 dpi	cfu/g Sprosse 12 dpi
3Rp8-DsRed2	n. ermittelt	$8,1 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^9$
3Rp5-GFP	n. ermittelt	$9,2 \cdot 10^8$	-	-
3Rp8-DsRed2 und 3Rp5-GFP	$1,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^9$	-	-
	$1,3 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^8$		

Versuch 10 wurde als Dosis-Wirkungs-Test angelegt, um einerseits zu überprüfen, ob die Stämme 3Rp5 und 4Rx13 in niedrigeren Konzentrationen ein Auflaufen der Pflanzen zulassen, und andererseits, um eventuelle Unterschiede in der Besiedelungsdichte der Pflanzen abhängig von der Ausgangskonzentration an Bakterien darzustellen. Pro Behandlung wurden sechs Samen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen geprint, der prozentuelle Auflauf ist in Tabelle 31 dargestellt. Es wurde deutlich, dass auch niedrige Konzentrationen von 3Rp5 und 4Rx13 im Samentauchbad ein Auflaufen der Pflanzen behindern. Bei den positiv wirkenden Stämmen 3Rp8 und S13 konnten keine Unterschiede im Auflauf abhängig von der Konzentration festgestellt werden.

Tabelle 31: Prozentueller Auflauf und Gewicht der aufgelaufenen Pflanzen im Dosis-Wirkungs-Test V10

Behandlung	cfu/ml im Samentauchbad	% Keimung 2 dpi	% Auflauf 13 dpi	Ø Gewicht Wurzeln in g	Ø Gewicht Sprosse in g
3Rp8-DsRed2	$6,3 \cdot 10^8$	17	83	1,37	1,92
	$6,3 \cdot 10^7$	0	67	1,22	1,58
	$6,3 \cdot 10^6$	33	100	1,24	1,62
	$6,3 \cdot 10^5$	33	100	1,26	1,92
S13-GFP	$7,4 \cdot 10^8$	33	83	1,05	1,58
	$7,4 \cdot 10^7$	33	83	0,93	1,95
	$7,4 \cdot 10^6$	50	83	1,12	1,87
	$7,4 \cdot 10^5$	17	67	0,66	1,54
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	$3,2 \cdot 10^8 + 3,7 \cdot 10^8$	67	100	1,03	1,64
	$3,2 \cdot 10^7 + 3,7 \cdot 10^7$	33	100	1,01	1,65
	$3,2 \cdot 10^6 + 3,7 \cdot 10^6$	67	100	1,31	1,50
	$3,2 \cdot 10^5 + 3,7 \cdot 10^5$	50	100	0,90	1,64
4rx13-mNeptune	$4,7 \cdot 10^8, 10^7, 10^6,$ 10^5	0	0	-	-
3Rp5-eBFP2	$8,0 \cdot 10^8, 10^7, 10^6$	0	0	-	-
3Rp5-eBFP2	$8,0 \cdot 10^5$	17	17	-	-
KTU	-	57	71	0,94	1,34

Die Reisolation der an die Samen geprinten Stämme erfolgte auf Agar-Platten ohne Hinzugabe von Trimethoprim, um einen Überblick über andere an der Pflanze lebende Mikroorganismen zu erhalten, die durch die Ethanol-Behandlung der Samen vor dem Samentauchbad nicht entfernt werden konnten. Die in Tabelle 32 als „samenbürtig-1“ angegebenen cfu beziehen sich auf auffällig

Ergebnisse

dottergelbe Kolonien, als „samenbürtig-2“ wurden alle anderen Kolonien gewertet, welche nicht 3Rp8-DsRed2, S13-GFP oder samenbürtig-1 zuzuordnen waren. Aus dieser Tabelle geht hervor, dass 3Rp8 als Einzelbehandlung die samenbürtigen Bakterien weiter zurückdrängte als S13 in Einzelbehandlung und dieser Effekt in der Mischbehandlung von 3Rp8 und S13 verloren ging.

Tabelle 32: Cfug Pflanzenmaterial im Dosis-Wirkungs-Test V10, 13 dpi

Behandlung	cfu/ml im ST	Pflanzenmaterial	cfu/g 3Rp8-DsRed2	cfu/g S13-GFP	cfu/g 3Rp8+S13	cfu/g samenbürtig-1	cfu/g samenbürtig-2	Gesamt-Summe cfu/g
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁸	Sprosse	9,3*10 ⁸	-	-	0	1,4*10 ⁸	1,1*10 ⁹
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁸	Wurzeln	4,9*10 ⁸	-	-	0	1,7*10 ⁷	5,1*10 ⁸
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁷	Sprosse	7,0*10 ⁸	-	-	0	5,4*10 ⁷	7,5*10 ⁸
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁷	Wurzeln	7,4*10 ⁸	-	-	0	3,0*10 ⁷	7,7*10 ⁸
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁶	Wurzeln	5,7*10 ⁸	-	-	0	6,3*10 ⁷	6,3*10 ⁸
3Rp8-DsRed2	6,3*10 ⁵	Wurzeln	6,9*10 ⁸	-	-	1,0*10 ⁸	1,2*10 ⁸	9,2*10 ⁸
S13-GFP	7,4*10 ⁸	Sprosse	-	9,0*10 ⁸	-	0	2,9*10 ⁹	3,8*10 ⁹
S13-GFP	7,4*10 ⁸	Wurzeln	-	5,9*10 ⁸	-	0	1,1*10 ⁹	1,7*10 ⁹
S13-GFP	7,4*10 ⁷	Sprosse	-	4,1*10 ⁸	-	0	1,5*10 ⁹	1,9*10 ⁹
S13-GFP	7,4*10 ⁷	Wurzeln	-	1,9*10 ⁸	-	0	6,5*10 ⁸	8,4*10 ⁸
S13-GFP	7,4*10 ⁶	Wurzeln	-	1,1*10 ⁸	-	5,7*10 ⁸	2,4*10 ⁸	9,2*10 ⁸
S13-GFP	7,4*10 ⁵	Wurzeln	-	1,2*10 ⁸	-	4,6*10 ⁸	4,4*10 ⁸	1,0*10 ⁹
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁸	Sprosse	1,9*10 ⁸	1,6*10 ⁸	3,5*10 ⁸	3,2*10 ⁷	9,9*10 ⁸	1,4*10 ⁹
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁸	Wurzeln	3,6*10 ⁸	1,8*10 ⁸	5,4*10 ⁸	2,2*10 ⁸	2,9*10 ⁸	1,1*10 ⁹
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁷	Sprosse	1,9*10 ⁸	9,4*10 ⁷	2,8*10 ⁸	0	7,3*10 ⁸	1,0*10 ⁹
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁷	Wurzeln	7,3*10 ⁷	8,3*10 ⁷	1,6*10 ⁸	4,7*10 ⁶	2,1*10 ⁸	3,7*10 ⁸
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁶	Wurzeln	3,2*10 ⁷	5,3*10 ⁷	8,5*10 ⁷	1,8*10 ⁸	1,3*10 ⁸	3,9*10 ⁸
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	6,9*10 ⁵	Wurzeln	8,4*10 ⁷	1,3*10 ⁸	2,1*10 ⁸	1,7*10 ⁷	3,9*10 ⁸	6,1*10 ⁸
KTU	-	Sprosse, Wurzeln	-	-	-	-	-	nicht auszählbar

In Tabelle 33 werden die cfu/g Wurzel- beziehungsweise Sprossmasse der einzigen nach einem Samentauchbad mit dem Stamm 3Rp5 in einem Keimfilter aufgelaufenen Pflanze dargestellt. In den Wurzeln wurde mit je 10⁹ cfu/g des Stammes 3Rp5 und des Stammes „samenbürtig1“ eine sehr dichte Kolonisierung ermittelt, in den Blättern wurde mit 10¹⁰ cfu/g die höchste Zellzahl/g aller Experimente errechnet.

Tabelle 33: Cfug Pflanzenmaterial im Dosis-Wirkungs-Test V10 mit Behandlung 3Rp5, 13 dpi

Behandlung	cfu/ml im ST	Pflanzenmaterial	cfu/g 3Rp5-eBFP2	cfu/g samenbürtig1	cfu/g samenbürtig2	Gesamt-Summe cfu/g
3Rp5-eBFP2	8,0*10 ⁵	Sprosse	1,2*10 ¹⁰	1,0*10 ⁹	0	1,3*10 ¹⁰
3Rp5-eBFP2	8,0*10 ⁵	Wurzeln	2,3*10 ⁹	1,6*10 ⁹	0	3,9*10 ⁹

Ergebnisse

Der Dosis-Wirkungs-Test von Versuch V13 war eine Wiederholung eines Teils von V10 um die Ergebnisse abzusichern wobei vier Samen pro Keimfilter platziert wurden. Der prozentuelle Auflauf und das Gewicht der aufgelaufenen Pflanzen sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Prozentueller Auflauf und Gewicht der aufgelaufenen Pflanzen im Dosis-Wirkungs-Test V13

Behandlung	cfu/ml im Samentauchbad	% Keimung 3 dpi	% Auflauf 13 dpi	Ø Gewicht Wurzeln in g	Ø Gewicht Sprosse in g
3Rp8-DsRed2	4,0*10 ⁸	75	100	3,483	2,783
	4,0*10 ⁵	100	100	2,611	2,409
S13-GFP	3,2*10 ⁸	75	75	2,605	2,410
	3,2*10 ⁵	100	100	2,214	2,938
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	2,0*10 ⁸ + 1,6*10 ⁸	75	75	2,292	2,507
	2,0*10 ⁵ + 1,6*10 ⁵	75	100	2,125	2,297
KTU	-	75	100	1,516	2,325

Wie in V10 traten auch in diesem Versuch bei den Reisolationen diverse samenbürtige Bakterien in Erscheinung, welche in der Ergebnis-Tabelle 35 mit angeführt werden.

Tabelle 35: Cfug Pflanzenmaterial im Dosis-Wirkungs-Test V13, 13 dpi

Behandlung	cfu/ml im ST	Pflanzenmaterial	cfu/g 3Rp8-DsRed2	cfu/g S13-GFP	cfu/g samenbürtig1	cfu/g samenbürtig2	Gesamt-Summe cfu/g
3Rp8-DsRed2	4,0*10 ⁸	Sprosse	2,52*10 ⁸	-	0	6,29*10 ⁷	3,14*10 ⁸
		Wurzeln	2,95*10 ⁸	-	4,31*10 ⁶	3,45*10 ⁸	6,44*10 ⁸
3Rp8-DsRed2	4,0*10 ⁵	Sprosse	3,40*10 ⁸	-	1,25*10 ⁷	1,53*10 ⁸	5,05*10 ⁸
		Wurzeln	1,52*10 ⁸	-	5,41*10 ⁸	2,00*10 ⁸	8,93*10 ⁸
S13-GFP	3,2*10 ⁸	Sprosse	-	1,16*10 ⁸	6,22*10 ⁶	7,90*10 ⁸	9,13*10 ⁸
		Wurzeln	-	4,8*10 ⁷	8,83*10 ⁷	1,15*10 ⁸	2,51*10 ⁸
S13-GFP	3,2*10 ⁵	Sprosse	-	2,21*10 ⁷	0	1,00*10 ⁸	1,23*10 ⁸
		Wurzeln	-	1,84*10 ⁸	2,26*10 ⁶	5,76*10 ⁸	7,62*10 ⁸
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	2,0*10 ⁸ / 1,6*10 ⁸	Sprosse	5,98*10 ⁸	1,79*10 ⁸	1,99*10 ⁷	1,42*10 ⁹	2,22*10 ⁹
		Wurzeln	1,96*10 ⁸	3,05*10 ⁷	0	3,05*10 ⁸	5,32*10 ⁸
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	2,0*10 ⁵ / 1,6*10 ⁵	Sprosse	1,28*10 ⁸	1,96*10 ⁷	1,57*10 ⁸	8,05*10 ⁷	3,85*10 ⁸
		Wurzeln	4,99*10 ⁸	7,76*10 ⁷	8,71*10 ⁷	4,33*10 ⁸	1,10*10 ⁹
KTU	-	Sprosse	-	-	0	5,97*10 ⁸	5,97*10 ⁸
		Wurzeln	-	-	3,30*10 ⁶	1,13*10 ⁹	1,13*10 ⁹

Der Anteil der applizierten Stämme am Gesamtanteil der auf LB-Platten reisolierten Stämme ist in Abbildung 46 beispielsweise für die Wurzeln dargestellt. Es wird deutlich, dass die maximale Kolonisierungsdichte von 10⁹ cfu/g Wurzelfrischgewicht in der Negativkontrolle KTU durch samenbürtige Bakterien aufgefüllt wird, wohingegen in den mit 3Rp8 oder S13 geprimten Behandlungen diese Stämme einen deutlichen Anteil an der Gesamtkolonisierung stellen.

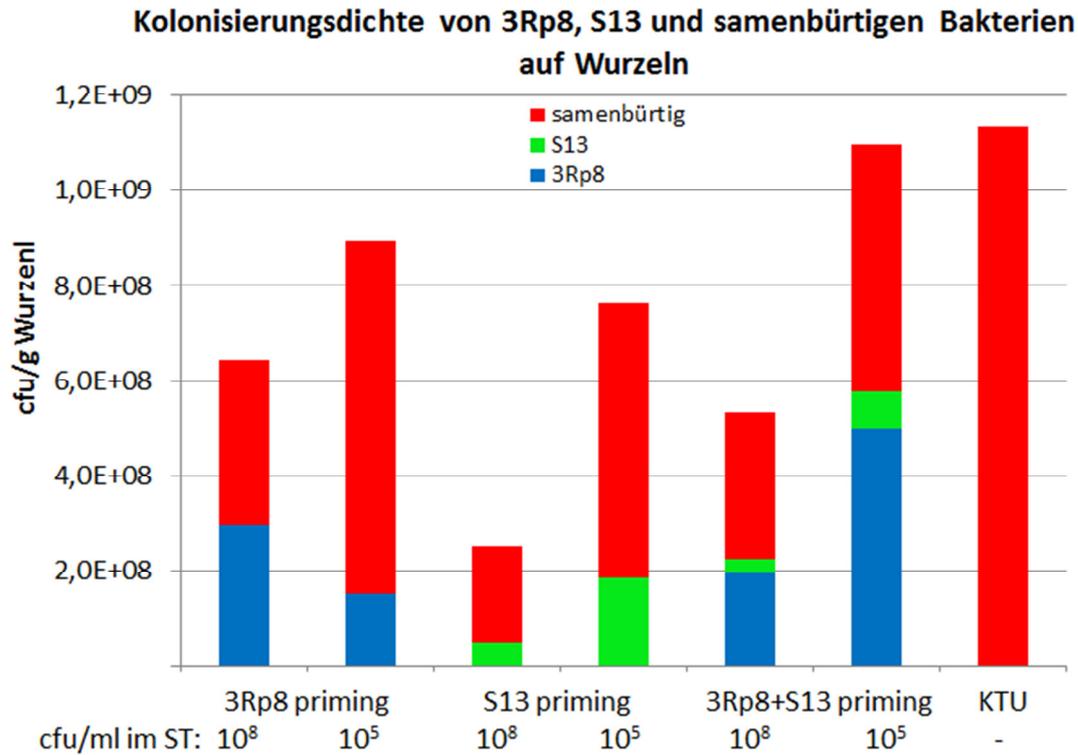


Abbildung 46: Anteil der applizierten Stämme 3Rp8 und S13 an der auf LB-Platten detektierten Gesamtbesiedelung der Wurzeln in Versuch 13.

Versuch 14 war die dritte unabhängige Wiederholung des Dosis-Wirkungs-Tests für das Priming mit 3Rp8-DsRed2, S13-GFP und einer Mischung dieser sowie ein Konfrontations-Test von 3Rp8-DsRed2 gegen 3Rp5-GFP und 4Rx13-mNeptune. Pro Behandlung wurden drei Wiederholungen zu je drei Samen getestet. Wie in Tabelle 36 dargestellt, konnte durch die Behandlung mit S13-GFP und 3Rp8-DsRed2 wiederum die Keimung beschleunigt werden. Die vollständige Unterdrückung der Keimung durch 3Rp5-GFP und 4Rx13-mNeptune konnte auch durch eine Mischbehandlung mit 3Rp8-DsRed2 nicht aufgehoben werden.

Tabelle 36: Prozentueller Auflauf und Gewicht der aufgelaufenen Pflanzen in der Testserie V14

Behandlung	cfu/ml im Samentauchbad	Keimung 4 dpi	Pflanzen 13 dpi	Ø Gewicht Wurzeln in g	Ø Gewicht Sprosse in g
3Rp8-DsRed2	$4,8 \cdot 10^8$	78	100	1,679	1,726
	$4,8 \cdot 10^5$	78	89	2,445	1,78
S13-GFP	$5,2 \cdot 10^8$	78	89	2,805	2,383
	$5,2 \cdot 10^5$	78	100	2,861	2,165
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	$2,4 \cdot 10^8 +$	89	89	3,819	2,721
	$2,6 \cdot 10^8$ $2,4 \cdot 10^5 +$ $2,6 \cdot 10^5$	89	100	2,096	1,899
4rx13-mNeptune	$3,4 \cdot 10^8$	0	0	-	-
3Rp5-GFP	$5,8 \cdot 10^8$	0	0	-	-
3Rp8-DsRed2 + 3Rp5-GFP	$2,4 \cdot 10^8 / 2,9 \cdot 10^8$	0	0	-	-
3Rp8-DsRed2 + 4rx13-mNeptune	$2,4 \cdot 10^8 / 1,7 \cdot 10^8$	0	0	-	-
KTU	-	56	89	2,507	2,375

Wie in V10 und V14 traten auch in diesem Versuch bei den Reisolationen diverse samenbürtige Bakterien in Erscheinung, welche in der Ergebnis-Tabelle 37 mit angeführt werden.

Tabelle 37: Cfug Pflanzenmaterial in der Testserie V14, 13 dpi

Behandlung	cfu/ml im ST	Pflanzenmaterial	cfu/g 3Rp8-DsRed2	cfu/g S13-GFP	cfu/g samenbürtig2	Gesamt-Summe cfu/g
3Rp8-DsRed2	$4,8 \cdot 10^8$	Sprosse	$1,91 \cdot 10^9$	-	0	$1,91 \cdot 10^9$
		Wurzeln	$1,01 \cdot 10^9$	-	0	$1,01 \cdot 10^9$
3Rp8-DsRed2	$4,8 \cdot 10^5$	Sprosse	$2,81 \cdot 10^9$	-	0	$2,81 \cdot 10^9$
		Wurzeln	$2,04 \cdot 10^9$	-	0	$2,04 \cdot 10^9$
S13-GFP	$5,2 \cdot 10^8$	Sprosse	-	$9,02 \cdot 10^8$	0	$9,02 \cdot 10^8$
		Wurzeln	-	$2,85 \cdot 10^9$	0	$2,85 \cdot 10^9$
S13-GFP	$5,2 \cdot 10^5$	Sprosse	-	$3,23 \cdot 10^8$	0	$3,23 \cdot 10^8$
		Wurzeln	-	$3,67 \cdot 10^8$	0	$3,67 \cdot 10^8$
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	$2,4 \cdot 10^8 +$ $2,6 \cdot 10^8$	Sprosse	$2,21 \cdot 10^8$	$9,00 \cdot 10^8$	0	$1,12 \cdot 10^9$
		Wurzeln	$2,23 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^8$	0	$3,40 \cdot 10^8$
3Rp8-DsRed2 + S13-GFP	$2,4 \cdot 10^5 +$ $2,6 \cdot 10^5$	Sprosse	$1,58 \cdot 10^8$	$5,79 \cdot 10^8$	0	$7,37 \cdot 10^8$
		Wurzeln	$1,77 \cdot 10^8$	$2,12 \cdot 10^8$	0	$3,89 \cdot 10^8$
KTU	-	Sprosse	0	0	$4,00 \cdot 10^7$	$4,00 \cdot 10^7$
		Wurzeln	0	0	$9,37 \cdot 10^7$	$9,37 \cdot 10^7$

Um eine Besiedelung der Blätter und Wurzel mit den geprimten Stämmen in Erde abschätzen zu können, wurde in Versuch 14 ein Nebenversuch mit einer Mischkultur aus 3Rp8-DsRed2 und S13-GFP in einer geschlossenen Box in steriler Standarderde durchgeführt. Die Reisolation erfolgte von Blattproben sowie von der Rhizosphäre, das heißt, es wurden Wurzeln inklusive der gut anhaftenden

Ergebnisse

Erde beprobt. Der weitere Versuchsablauf erfolgte gleich wie bei den Reisolationen von Proben aus Keimfiltern. Die errechneten cfu pro Gramm Pflanzenmaterial sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Cfu 3Rp8-DsRed2 und S13-GFP pro g Pflanzenmaterial im Nebenversuch von V14 auf Standarderde, 10 dpi

Pflanzenmaterial	cfu/g 3Rp8-DsRed2	cfu/g S13-GFP	Gesamt-Summe cfu/g
Sprosse	$4,95 \cdot 10^6$	$4,95 \cdot 10^7$	$5,45 \cdot 10^7$
Wurzeln	$1,92 \cdot 10^8$	$7,67 \cdot 10^7$	$2,69 \cdot 10^8$

In einem weiteren Nebentest von V14 wurden in den Keimfiltern zu den Samen (entsprechend einer Negativkontrolle KTU) mit G1/8 beziehungsweise SP2 bewachsene Agarscheiben mit zirka 5 mm Durchmesser platziert. Die Pflanzen liefen normal auf, bis diese sechs dpi erste Krankheitssymptome zeigten. Im Falle von SP2 sind, wie in Abbildung 47 ersichtlich, bis zum Abbruch des Experiments bei 12 dpi 50 % der Pflanzen vollständig zusammengebrochen. Das Krankheitsbild mit zum Teil aus der Pflanze austretenden Exsudaten erinnert stark an die durch *Didymella bryoniae* ausgelöste Gummistängelkrankheit (Babadoost & Zitter, 2009).



Abbildung 47: Kürbispflanzen zwölf Tage nachdem ein mit *Didymella bryoniae* SP2 kolonisiertes Agar-Stück neben den Samen platziert wurde.

Im Folgenden werden die wichtigsten Daten aus den drei unabhängigen Testserien V10, V13 und V14 zusammengefasst. Abbildung 48 zeigt den prozentuellen Aufruf der Pflanzen vier Tage nach Behandlung mit den bakteriellen Stämmen und gibt daher Auskunft über die Veränderung in der

Ergebnisse

Keimgeschwindigkeit beziehungsweise über die sehr frühe Jugendentwicklung der Pflanzen. Die Mischbehandlung mit 3Rp8 und S13 bewirkte sowohl in einer Ausgangskonzentration von 10^8 sowie 10^5 cfu/ml eine deutliche Beschleunigung der Keimung, wohingegen die Behandlungen mit 4Rx13 und 3Rp5 in allen drei Experimenten zu einer vollständigen Unterdrückung der Keimung führten.

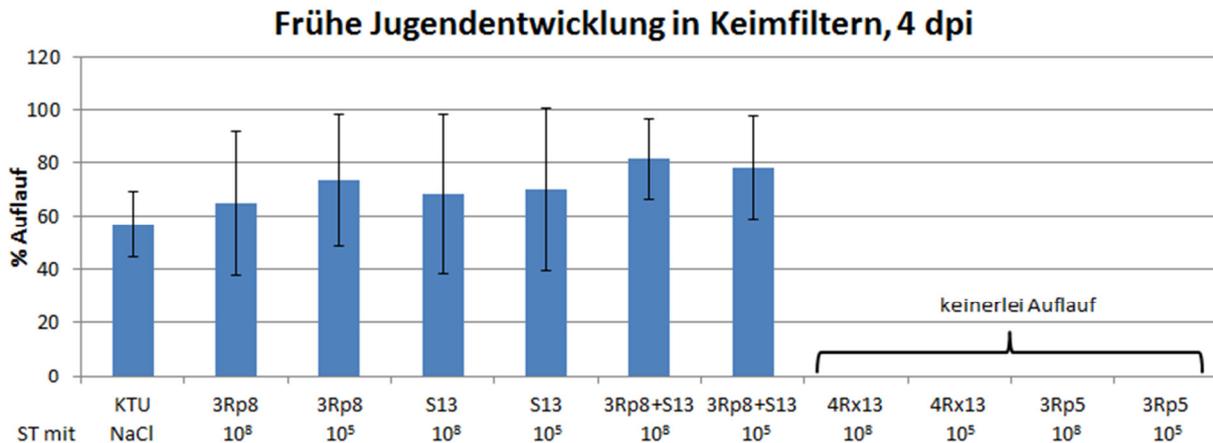


Abbildung 48: Zusammengefasste Daten der Testserien V10, V13 und V14 zur frühen Jugendentwicklung der Kürbispflanzen unter sterilen Bedingungen in Keimfiltern, 4 dpi.

Abbildung 49 zeigt das durchschnittliche Wurzel- und Sprossfrischgewicht pro Pflanze einer Behandlung und verdeutlicht, dass sowohl die Einzelbehandlungen mit 3Rp8 und S13 als auch die Mischbehandlung von 3Rp8 und S13 eine Erhöhung des Wurzelfrischgewichts bewirkten. Der positive Effekt auf das Wurzelfrischgewicht war bei der Behandlung mit 3Rp8 mit einer Konzentration von 10^8 Zellen im ST mit durchschnittlich 58 % am ausgeprägtesten. Eine Erhöhung des Sprossfrischgewichtes wurde lediglich in den Behandlungen mit S13 mit einer Konzentration von 10^5 cfu/ml im ST sowie in der Mischbehandlung 3Rp8 und S13 mit einer Konzentration von 10^8 cfu/ml im ST erreicht. Aus den Daten geht weiters hervor, dass Wurzel- und Sprossmasse nicht miteinander korrelieren müssen.

Durchschnittliches Wurzel- und Sprossfrischgewicht in Keimfiltern, 12 dpi

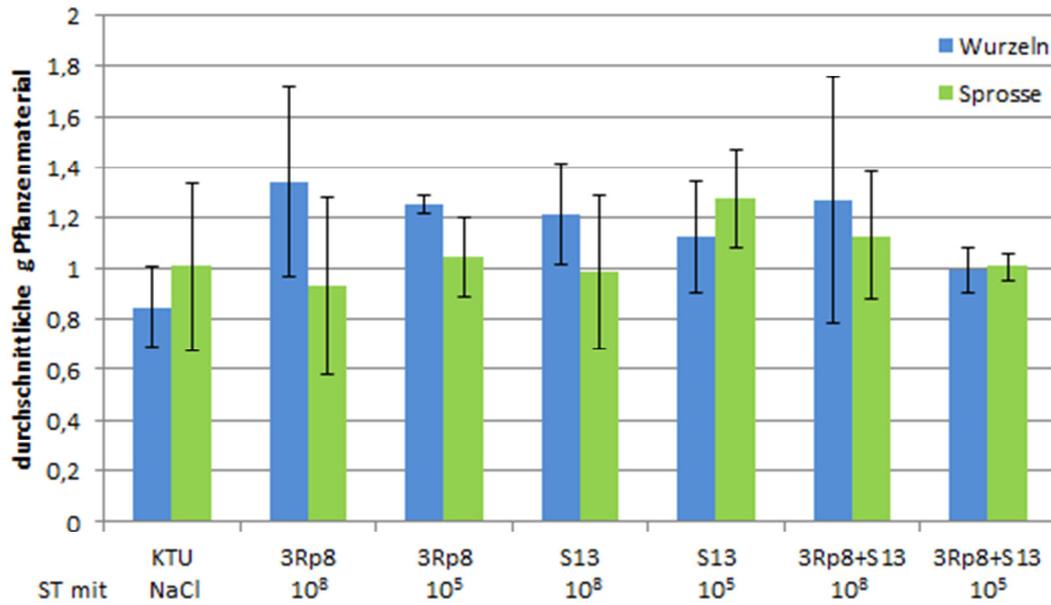


Abbildung 49: Zusammengefasste Daten der Testserien V10, V13 und V14 zum durchschnittlichen Wurzel- und Sprossfrischgewicht der Kürbispflanzen unter sterilen Bedingungen in Keimfiltern bei Abbruch der Experimente, 12 dpi.

Die durchschnittliche Kolonisationsdichte der Blätter und Wurzeln von Pflanzen, die in sterilen Keimfiltern gezogen wurden, war, wie in Abbildung 50 gezeigt, unabhängig von der ursprünglichen Ausgangskonzentration der Stämme im ST.

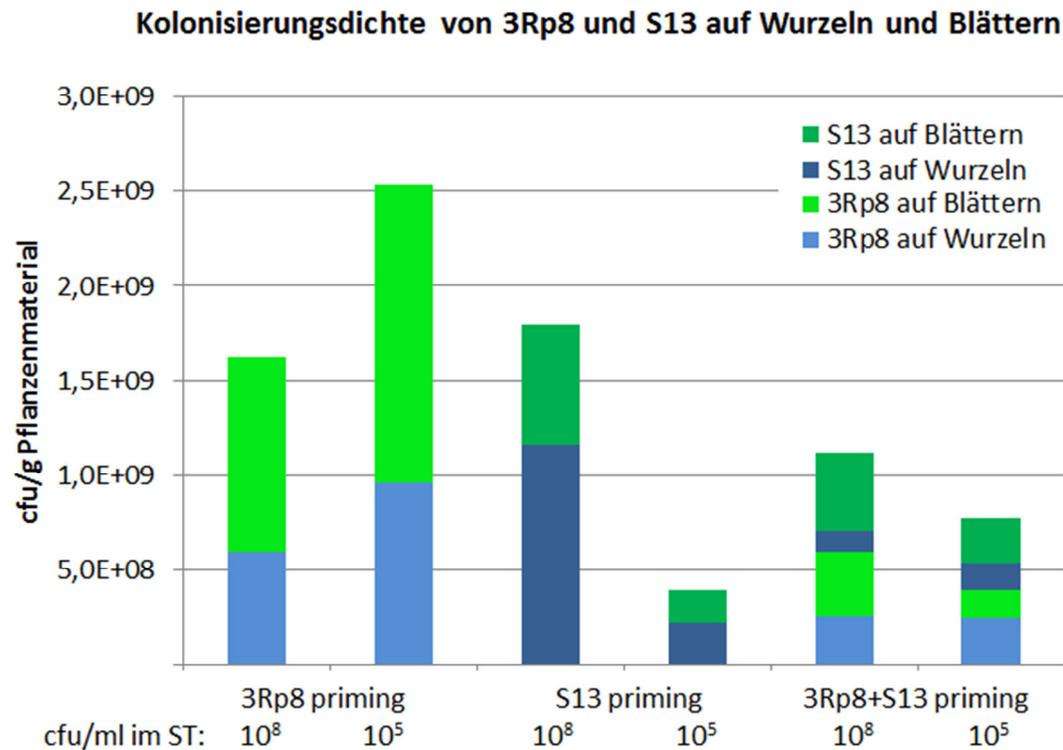


Abbildung 50: Zusammengefasste Daten der Testserien V10, V13 und V14 zur durchschnittlichen Kolonisierungsdichte der Stämme 3Rp8 und S13 auf Kürbispflanzen unter sterilen Bedingungen in Keimfiltern bei Abbruch der Experimente, 12 dpi.

3.2.5 Experimente mit Wurzeltauchbad

Neben dem Test einer weiteren Applikationsmethode sollte der Versuch V12 auch darüber Aufschluss geben, ob die Stämme 3Rp5 und 4Rx13 nur die Keimung unterdrücken oder auch in einem späteren Stadium für den Kürbis schädlich sind. Aufgrund einer sehr hohen Anzahl samenbürtiger Bakterien waren die Reisolationsdaten nicht gut auswertbar und sind die in Tabelle 39 angegebenen cfu/g nur als Größenordnung zu verstehen. Deutlich wird jedoch, dass die Besiedelung der Wurzeln und Pflanzen um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als nach einem Samentauchbad war. Auch war durch die Applikation von 3Rp5 und 4Rx13 kein Einfluss auf das Gewicht der Sprosse und Wurzeln nachweisbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese beiden Stämme zwar die Keimung unterdrücken, in einem späteren Stadium für die Pflanze jedoch keine stark negativen Effekte mehr verursachen.

Tabelle 39: CfU/g und g Pflanzenmaterial im Test V12 nach dem Wurzeltauchbad, 13 dpi

Behandlung	cfu/ml im Wurzeltauchbad	Pflanzenmaterial	g Pflanzenmaterial	cfu/g
3Rp5-eBFP2	$4,3 \cdot 10^8$	Sprosse	1,896	10^7
		Wurzeln	2,336	
3Rp8-DsRed2	$3,5 \cdot 10^8$	Sprosse	1,771	10^7
		Wurzeln	1,874	10^7
4Rx13-eBFP2	$2,2 \cdot 10^8$	Sprosse	1,166	
		Wurzeln	2,105	
S13-GFP	$5,8 \cdot 10^8$	Sprosse	3,588	10^6
		Wurzeln	2,582	10^8
KTU	-	Sprosse	2,16	
		Wurzeln	2,691	
3Rp8-DsRed2 +S13-GFP +4Rx13-eBFP2	$3,8 \cdot 10^8$	Sprosse	1,918	
		Wurzeln	2,246	
3Rp8-DsRed2 +S13-GFP +3Rp5-eBFP2	$4,5 \cdot 10^8$	Sprosse	2,458	$10^6/10^6/10^6$
		Wurzeln	2,183	

3.2.6 Experimente mit Mikronährstoffen in Pflanzenagar

In Versuch V11 härteten die Pflanzenagar-Platten mit 10-facher Mikronährstoffkonzentration nicht aus. Trotzdem wurden in der gelartigen Flüssigkeit je drei Samen platziert. Neben der Negativkontrolle KTU wurden auch völlig unbehandelte Samen (ORI), die auch nicht mit Ethanol gewaschen wurden ausgelegt. Wie in Abbildung 51 ersichtlich ist, blieben die Agar-Platten der mit Ethanol gewaschenen Samen steril, wohingegen sich in den Platten der ungewaschenen Originalsamens schnell umfangreiche Pilzmyzelien ausbildeten.

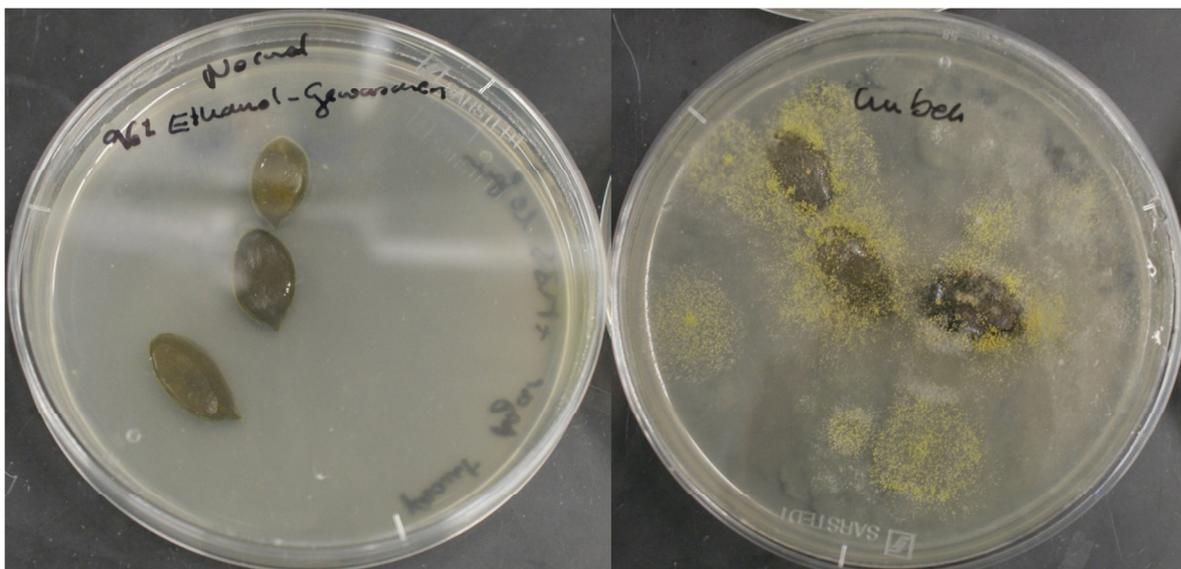


Abbildung 51: Samen, von denen das Samenhäutchen abgerieben wurde und welche zirka 20 Sekunden in 70%igen Ethanol geschwenkt und steril rückgetrocknet wurden (links); Samen, welche ungewaschen in steriles Medium (gallertartiger Pflanzenagar mit Mikronährstoffen in 10-facher Konzentration) gelegt wurden (rechts).

Ergebnisse

In den gallertartigen Platten mit 10-facher Mikronährstoffkonzentration keimte kein einziger Samen an, auf den Platten ohne oder mit normaler Mikronährstoffkonzentration – beispielhaft gezeigt in Abbildung 52 - lediglich zwei von 18 Samen.

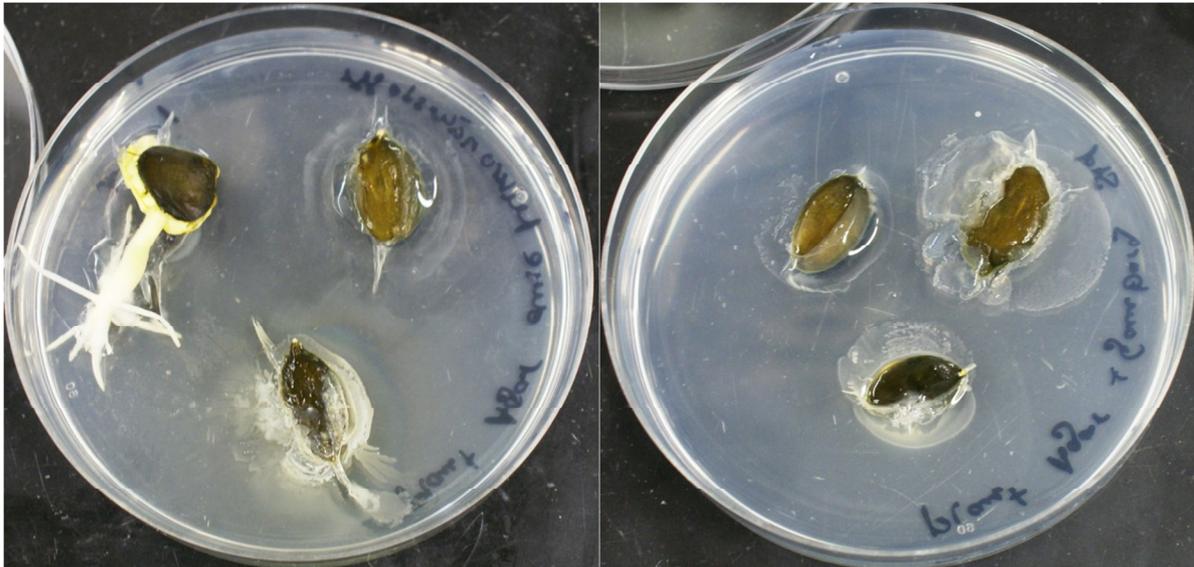


Abbildung 52: Samen, die leicht in den Pflanzenagar mit einfacher Mikronährstoff-Konzentration gedrückt wurden.

Entweder war das im Pflanzenagar gebundene Wasser für die Samen nicht verfügbar, oder im Pflanzenagar sind Stoffe enthalten, die die Keimung des Kürbissamens verhindern. Für Folgeexperimente kann ein Vorkeimen auf Filterpapier oder ein Gießen der Pflanzenagar-Platten in Erwägung gezogen werden. Um einige mit 3Rp8-DsRed2 geprimte Samen bildete sich im Pflanzenagar ein 3Rp8-DsRed2 -Film aus.

3.2.7 Sterilitätskontrolle der Samen, Besiedelung und Reisolierung vom Samen

Drei mit Ethanol oberflächensterilisierte ungeprimte Kürbis-Samen (ORI) wurden auf je eine LB-Agar-Platte gelegt, die Platten geschüttelt und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Auf Platte 1 wurden 17 Tage nach Inokulation 17 cfu, auf Platte 2 wurden 32 cfu gezählt, wobei sich drei verschiedenartige Typen an Kolonien zeigten (weiße sowie gelbe runde Kolonien und weiße, bereits nach wenigen Tagen stark ausgefranzte Kolonien). Die Samen waren somit nach Besprühen mit 96%igen Ethanol nicht völlig steril.

Auf LB-Platten, auf welchen einen Tag nach Inokulation Teile der Samenhaut sowie des Keimblattes geprimter Samen ausgestrichen wurde, fand sich lediglich auf einer Platte von dreien eine einzelne abweichende Kolonie – alle anderen Kolonien waren den applizierten Stämmen zuzuordnen.

Ergebnisse

Abbildung 53 zeigt ein Beispiel, wie das Verhältnis verschieden markierter Stämme zueinander in einer Mischkultur mit Hilfe des Bio-Rad ChemiDoc™ XRS Systems ermittelt werden kann.

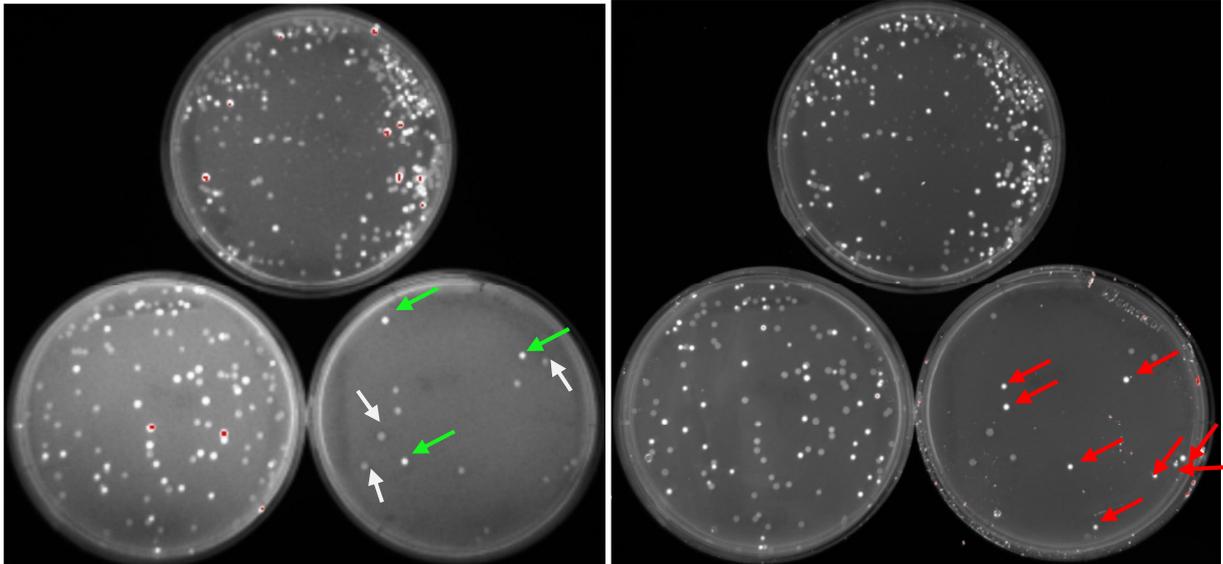


Abbildung 53: Analyse von drei Agar-Platten mit einer reisolierten Mischkultur aus 3Rp8-DsRed2- sowie 3Rp5-GFP-geprägten Samen; links: ein mit blue epi light und Filter 4 (530/28) erstelltes Bild (3Rp5-GFP erscheint heller); rechts: ein mit green epi light und Filter 3 (605/50) erstelltes Bild (3Rp8-DsRed2 erscheint heller). Auf der Platte rechts unten sind beispielsweise 3Rp5-GFP-Kolonien mit einem grünen und 3Rp8-DsRed2-Kolonien mit einem roten Pfeil markiert. Die mit einem weißen Pfeil markierten Kolonien konnten nicht korrekt zugeordnet werden.

Die drei in Abbildung 53 weiß markierten Kolonien konnten mit Hilfe des Bio-Rad ChemiDoc™ XRS Systems nicht eindeutig zugeordnet werden. Diese sollten separat mit einer anderen Methode, zum Beispiel mit dem MotiC AE31 überprüft werden. Zur Reisolierung wurden teilweise LB Platten mit und teilweise ohne Trimethoprim verwendet, um einen Überblick über die sonstige Kolonisierung der Pflanze zu erhalten. Kolonien, die auf LB Medien ohne Antibiotika-Druck wachsen und nicht fluoreszieren, müssen jedoch nicht zwangsläufig Kontaminationen bedeuten. Auf Platten ohne Trimethoprim begannen einige Kolonien erst nach sieben Tagen unter dem Bio-Rad System zu fluoreszieren. Erst ein Ausstrich solcher Kolonien auf LB mit Trimethoprim bringt Klarheit ob es sich um einen transformierten Stamm oder eine Kontamination handelt. Die besten Signale wurden erhalten, nachdem die Reisolationsplatten über Nacht bei 30 °C und anschließend mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass auch auf der Pflanze einige transformierte Zellen aufgrund des fehlenden Antibiotika-Drucks kein oder nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal aussenden. Für zukünftige Experimente wird empfohlen, die Reisolierung jeweils sowohl auf Platten mit als auch auf Platten ohne Antibiotika-Druck auszuwerten um den bestmöglichen Gesamteindruck von der Besiedelung der Pflanze zu erhalten.

3.3 Transportversuche mit Pilzen als Vektor

Die verwendeten Pilzisolat zeigten ein deutlich unterschiedlich schnelles Wachstum. Dennoch wurde innerhalb eines Transportversuchs die bakterielle Inokulation immer am selben Tag nach der Inokulation des Pilzmyzels durchgeführt, unabhängig davon wie groß die Fläche des Pilzmyzels zu diesem Zeitpunkt war.

Tabelle 40: Längenwachstum der Pilze auf PDA in cm/Tag in den ersten vier Tagen nach Inokulation sowie Beschreibung des Myzels

Pilzliches Isolat	cm/Tag	Beschreibung Myzel
G1/8	1,6	weiß, relativ flach, sporuliert sehr spät grün und nicht im Dunkeln
P1	2,3	weiß, mehr Masse als G1/8, sporuliert sehr schnell mit anfangs leichtem Gelbstich, dann grün
A220-2b	0,3	fluffig
GL1(2)	0,8	weiß, fluffig, hell- und dunkelbraune Verfärbungen in älteren Myzelien, die teilweise wie zwei unterschiedliche Pilzisolat aussehen
SP2	0,6	fluffig
BE3-1-10	0,6	rosa-weißes Myzel, rosa Grund
RR3-5-16	0,3	weißes Myzel, gelblicher Grund
1OCV3	0,3	fluffiges, leicht rosa Myzel, sporuliert schnell
1OCV4	0,5	bildet wolkenförmige, flache Myzelien
1OCV15	0,3	weißes, hohes, fluffiges Myzel
1OCV17	0,5	weißes, mittelhohes, fluffiges Myzel, sporuliert schnell braun
1PSM2	0,9	mittelhohes, fluffiges Myzel, sporuliert schnell grün
1OCM2	-	sehr langsames Wachstum, daher aus weiteren Versuchen ausgeschieden

3.3.1 Dualkulturplattentests in Standard-Petrischalen

Transportversuch VT1

Da das bakterielle und das pilzliche Isolat am selben Tag platziert wurden, erlangten die bakteriellen Stämme bezüglich des frühen Wachstums einen deutlichen Vorsprung gegenüber dem Pilzpartner und hemmten diesen generell stark. Auch das Ausstreichen des bakteriellen Partners durch Übertragung einer Kolonie mit einer Impföse erscheint suboptimal, da hier keine exakte Aussage über die Konzentration des Inokulum getroffen werden kann und die Verteilung entlang der Strecke womöglich ungleichmäßig ist. Abbildung 54 zeigt links eine Platte mit Luftspalt mit Pilzpartner P1, jedoch ohne bakterielles Inokulum und rechts eine starke Hemmung des Pilzpartner durch den Stamm S13. Da auf dieser Platte nie ein Kontakt zwischen den beiden Partnern stattfand, war folglich auch kein Transport des Bakteriums über die Pilzhyphen möglich.

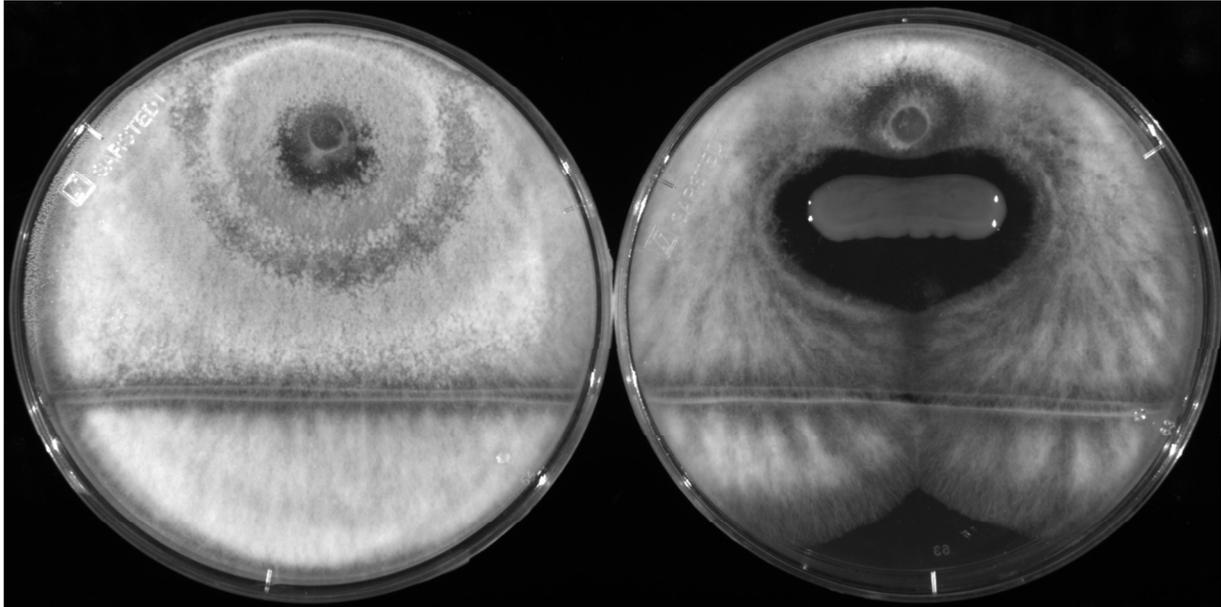


Abbildung 54: Beispielfoto aus Transportversuch VT1: links: Pilzisolat P1 ohne bakterielles Isolat, rechts: Pilzisolat P1 und bakterieller Stamm S13, beide acht Tage nach Inokulation. Es ist ein deutlicher Hemmhof und eine Hemmung des Wachstums des Pilzes durch S13 erkennbar.

Bis zum Abbruch des Experiments, 62 Tage nach gemeinsamer Inokulation der Stämme fand in einigen Kombinationen dennoch ein Kontakt zwischen Pilz und Bakterium statt. Tabelle 41 gibt einen Überblick über die Ergebnisse und zeigt in der letzten Spalte, ob das Bakterium letztendlich in den Bereich des Pilzes vorgedrungen ist und sich über diesen fortbewegt hat. Weiters ist ersichtlich, dass in den Negativkontrollen mit Pilz-, jedoch ohne bakteriellen Inokulum alle Pilz-Isolate den Luftspalt überqueren konnten, in allen Ansätzen mit bakteriellen Inokulum die Isolate GL1 und SP2 jedoch soweit gehemmt wurden, dass diese den Spalt nicht überquerten.

Tabelle 41: Ergebnisse Transportversuch VT1, Status bei Abbruch des Experimentes 62 dpi

Pilzpartner	Bakterium	Hemmung	Luftspalt überbrückt	Transport
P1	3Rp8	ja	ja	ja
P1	S13	ja	ja	nein
P1	3Rp5	ja	ja	ja
P1	4Rx13	ja	ja	ja
G1/8	3Rp8	ja	ja	ja
G1/8	S13	ja	ja	nein
G1/8	3Rp5	ja, leicht	ja	ja
G1/8	4Rx13	ja, leicht	ja	ja
A220-2b	3Rp8	ja	ja	ja
A220-2b	S13	ja	Ja	nein
A220-2b	3Rp5	komplett	nein	nein
A220-2b	4Rx13	komplett	nein	nein
GL1	3Rp8	ja	nein	nein
GL1	S13	ja	nein	nein
GL1	3Rp5	stark	nein	nein
GL1	4Rx13	stark	nein	nein
SP2	3Rp8	stark	nein	nein
SP2	S13	stark	nein	nein
SP2	3Rp5	komplett	nein	nein
SP2	4Rx13	komplett	nein	nein
P1, G1/8, A220-2b, GL1, SP2	keines	-	ja	-
keiner	3Rp8, S13, 3Rp5, 4Rx13	-	nein	-

Transportversuch VT2

Durch den Wachstums-Vorsprung von zwei Tagen für den Pilzpartner und das Auftropfen einer geringeren Anzahl an Bakterien in Suspension (10 µl mit zirka 10^5 cfu/ml) auf das bestehende Pilzmyzel konnte ein Transport in bestimmten Bakterien-Pilz-Kombinationen auf der Agar-Oberfläche eindeutig nachgewiesen werden. Obwohl die Pilz-Isolate in vielen Fällen den 1 cm breiten Luftspalt mühelos überquerten, fand kein Transport von Bakterien über diesen Spalt statt. Offensichtlich war diese Distanz zu groß für eine Überbrückung im Zeitraum des Experiments. Tabelle 42 fasst die Ergebnisse des Transportversuches VT2 zusammen.

Tabelle 42: Ergebnisse Transportversuch VT2, Status bei Abbruch des Experimentes 65 dpi

Pilzpartner	Bakterium	Hemmung	Luftspalt überbrückt	Transport & Anmerkungen
G1/8	S13	nein	4 dpi	Transport
	3Rp8	nein	5 dpi	Transport
P1	S13	nein	4 dpi	unklar; auf Reisolationsplatte Transport
	3Rp8	nein	4 dpi	unklar
A220-2b	S13	nein	nein	Transport; Pilzwachstum wurde komplett abgestoppt
	3Rp8	nein	8 dpi	Transport
SP2	S13	nein	nein	Transport
	3Rp8	leicht	nein	nein
Be3-1-10	S13	nein	4 dpi	hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"; auf Reisolationsplatte Transport
	3Rp8	nein	4 dpi	hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"; auf Reisolationsplatte Transport
RR3-5-16	S13	nein	4 dpi	hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"; auf Reisolationsplatte Transport
	3Rp8	nein	4 dpi	hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"; auf Reisolationsplatte Transport
1OCV3	S13	leicht	9 dpi	Transport
	3Rp8	leicht	nein	Transport
1OCV4	S13	nein	6 dpi	nein; hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"
	3Rp8	nein	7 dpi	nein; hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"
1OCV15	S13	leicht	12 dpi	nein; hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"
	3Rp8	nein	8 dpi	nein; hydrophobes Myzel - der Tropfen wurde "fixiert"
1OCV17	S13	nein	10 dpi	nein
	3Rp8	nein	8 dpi	nein
1PSM2	S13	nein	4 dpi	nur auf Reisolationsplatten Transport des Bakteriums
	3Rp8	nein	4 dpi	nein

Abbildung 55, Abbildung 56 und Abbildung 57 zeigen Beispiele von Bio-Rad-Bildern von Dualkulturplatten zu verschiedenen Zeitpunkten, auf welchen ein bakterieller Transport stattgefunden hat.

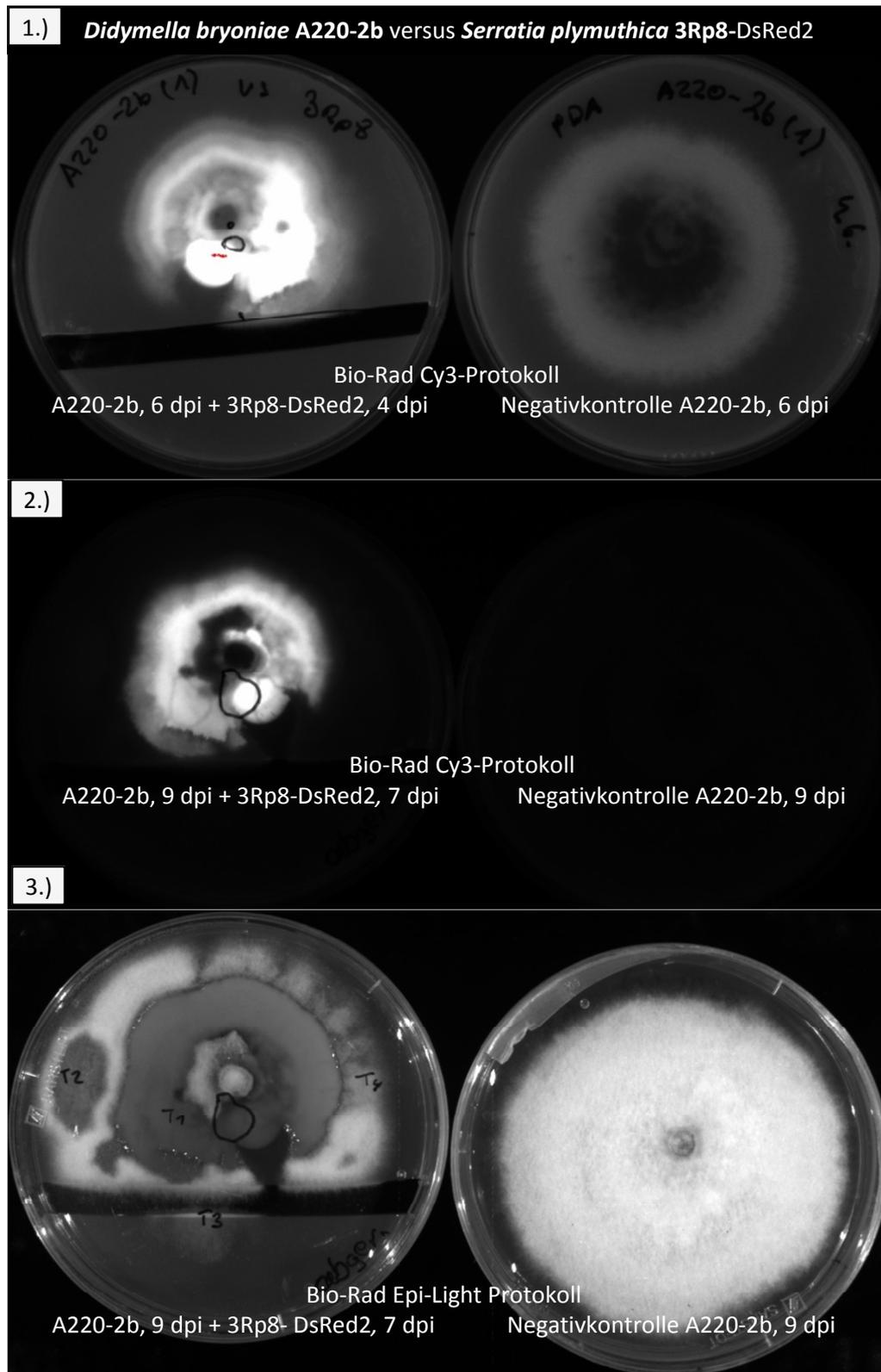


Abbildung 55: *Didymella bryoniae* A220-2b versus *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Transportversuch VT2. Die in Teil 1 und 2 der Abbildung sichtbaren weißen Bereiche sind Fluoreszenz-Signale der DsRed2-markierten 3Rp8-Zellen. Die ursprüngliche Inokulationsstelle der Bakteriensuspension ist mit einem Kreis auf der Platte angezeichnet.

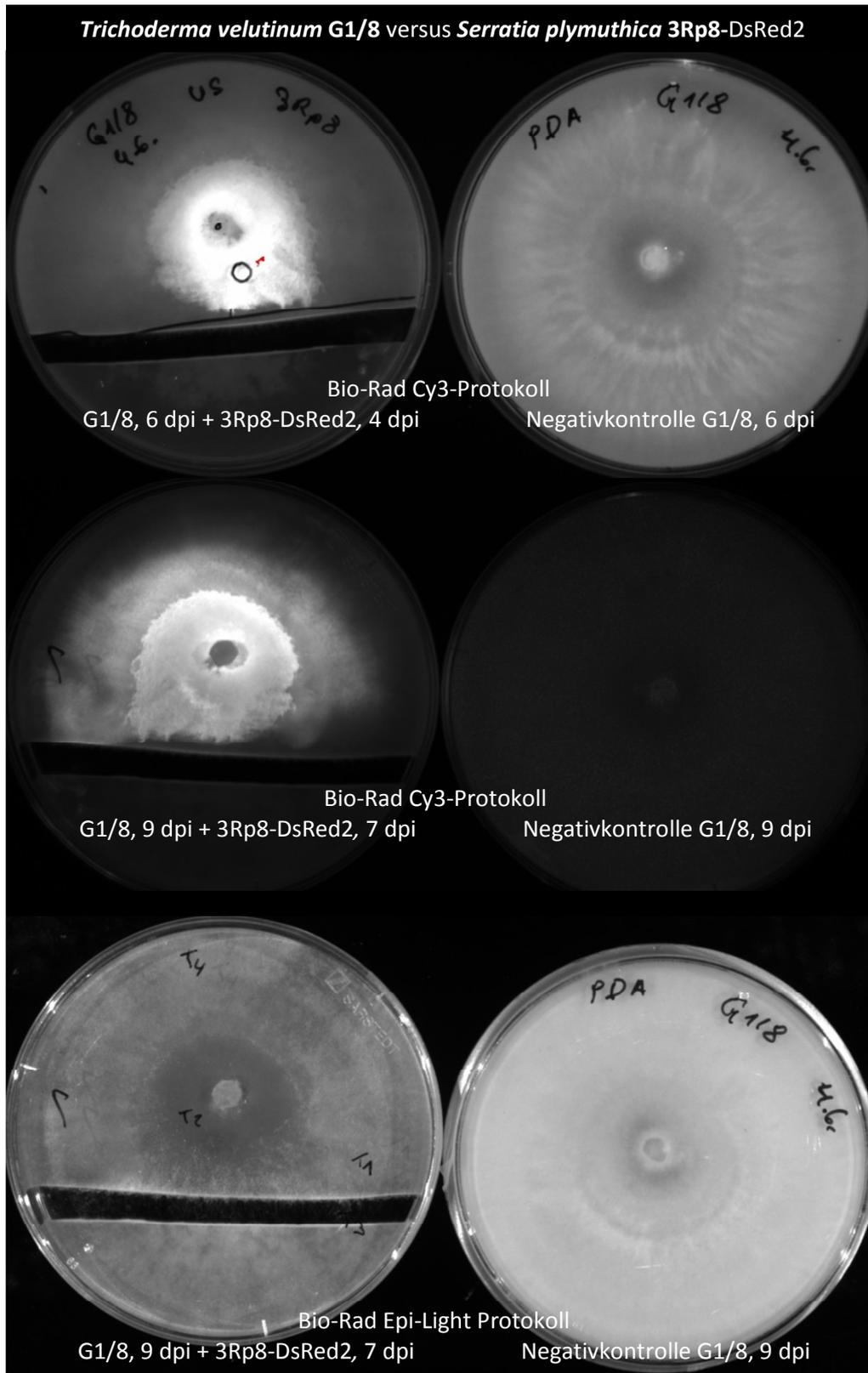


Abbildung 56: *Trichoderma velutinum* G1/8 versus *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Transportversuch VT2.

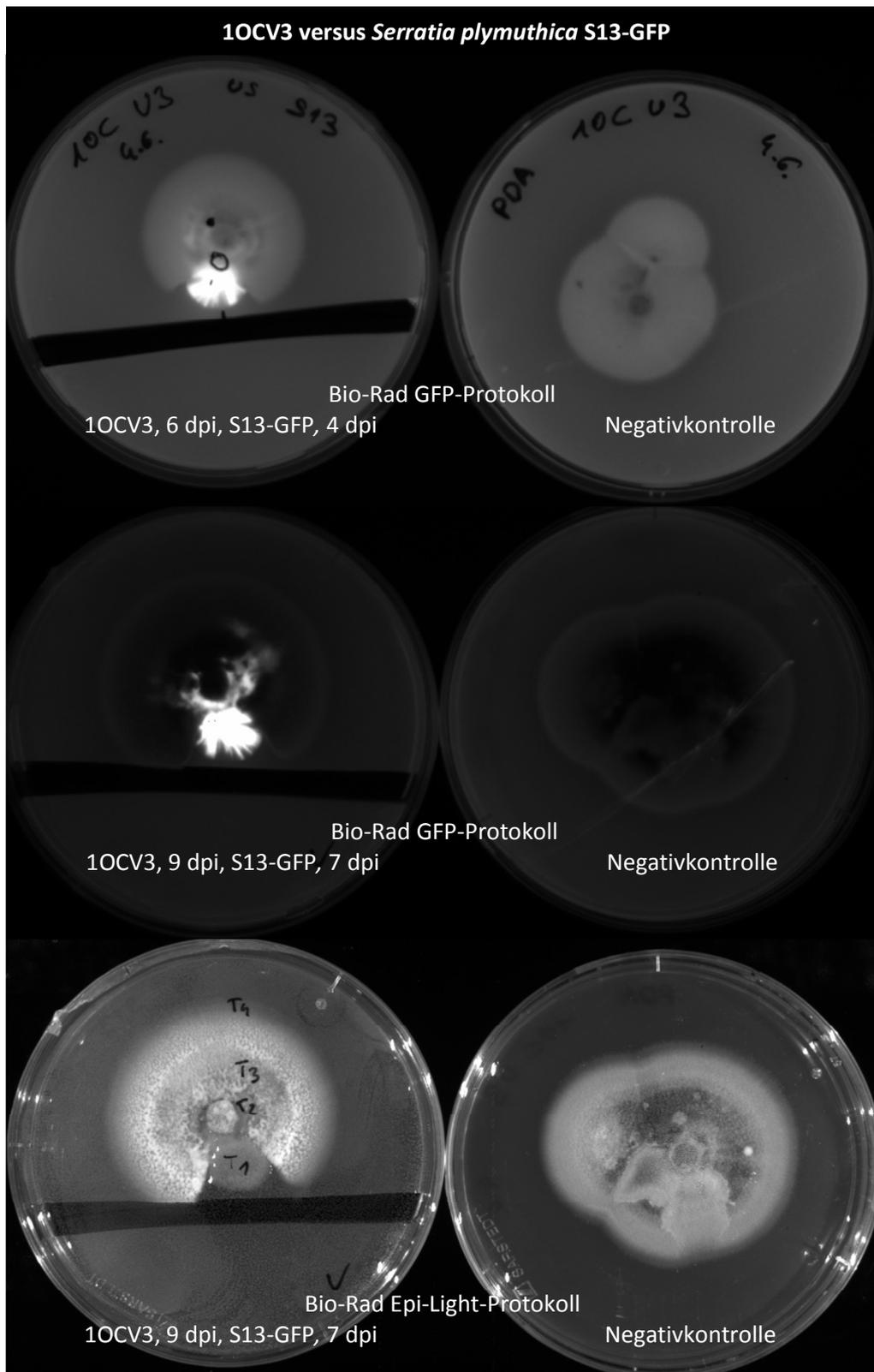


Abbildung 57: 1OCV3 versus *Serratia plymuthica* S13-GFP zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Transportversuch VT2.

Ergebnisse

Um einen Transport der Bakterien und die Detektion mittels Bio-Rad mit einer weiteren Methode abzusichern wurde von bestimmten Stellen abseits der Inokulationsstelle und mit starkem Fluoreszenz-Signalen aus den Dualkulturplattentests Material entnommen und neu auf PDA ausgestrichen. Diese Überprüfungen zeigten durchwegs, dass die Signale tatsächlich eine Fluoreszenz der transformierten Bakterien darstellten. Von jenen Platten, wo ein Transport nicht nachgewiesen wurde, wurde auch an der ursprünglichen Inokulationsstelle Material entnommen und neu ausgestrichen. Nun zeigte sich in einigen dieser Reisolationsplatten doch ein Transport der Bakterien über die Pilzhyphen. Dieses Verhalten trat sowohl bei Pilz-Isolaten auf, die ein sehr hydrophobes Myzel bilden und im Dualkulturplattentest den Tropfen mit dem Bakterien-Inokulum permanent „fixierten“, als auch in anderen Kombination mit weniger hydrophoben Myzelien, in denen im Original-Ansatz kein Transport stattfand. Drei Beispiele dieser Reisolationsplatten sind in Abbildung 58 gezeigt.

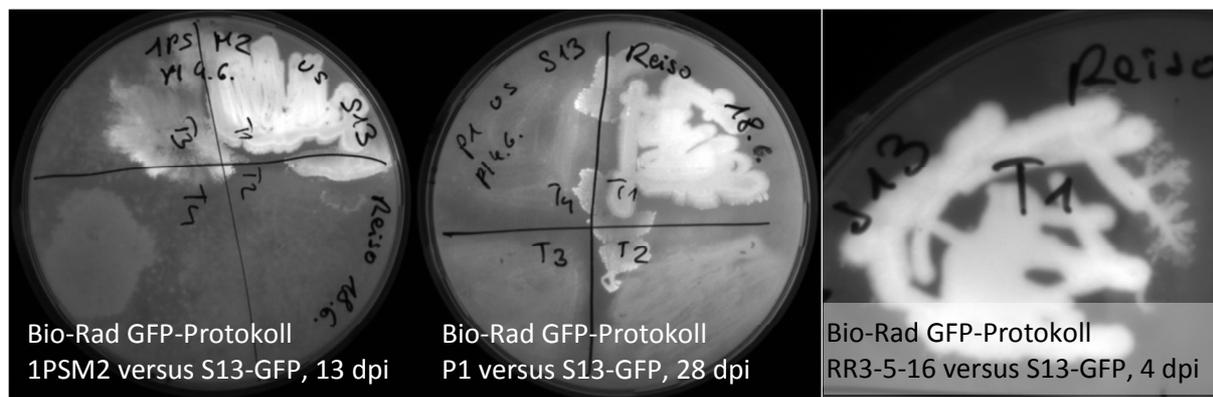


Abbildung 58: Reisolationsplatten aus VT2, in welchen Transport der Bakterien stattfand.

Transportversuch VT4

Während in Transportversuch VT4 in den Ansätzen ohne Zahnstocher wiederum kein Transport über den einen Zentimeter breiten Spalt detektiert wurde, überbrückten in den Ansätzen mit Zahnstocher in vielen Fällen die *Serratia plymuthica* Stämme den Luftspalt gemeinsam mit dem Pilzisolat. Abbildung 59 zeigt einen Zeitverlauf der Ausbreitung von *S. plymuthica* 3Rp8-DsRed2 über den Luftspalt und die Agarplatte.

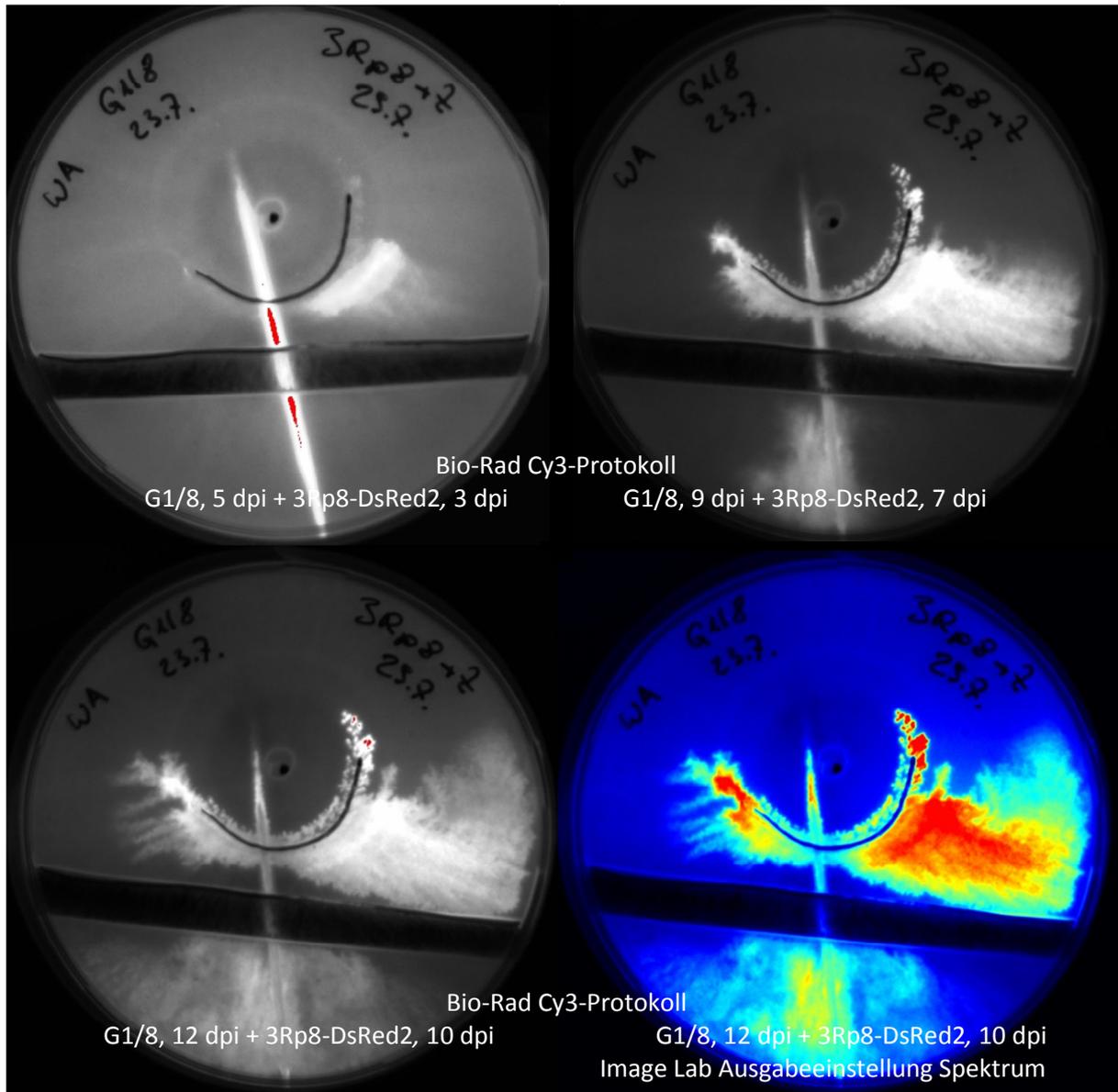


Abbildung 59: Transport von *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 über einen ein Zentimeter breiten Luftspalt mit Hilfe eines Zahnstochers in Kombination mit *Trichoderma velutinum* G1/8. Die ursprüngliche Inokulationsstelle ist mit einem Halbkreis auf der Platte angezeichnet.

Abbildung 60 zeigt zwei weitere Beispiele der Ausbreitung von *S. plymuthica* 3Rp8-DsRed2 über den Luftspalt und die Platte, wobei darauf hingewiesen werden soll, dass das Bild rechts 30 Tage nach Inokulation des Pilzisolates und 28 Tage nach Inokulation der Bakteriensuspension entstand.

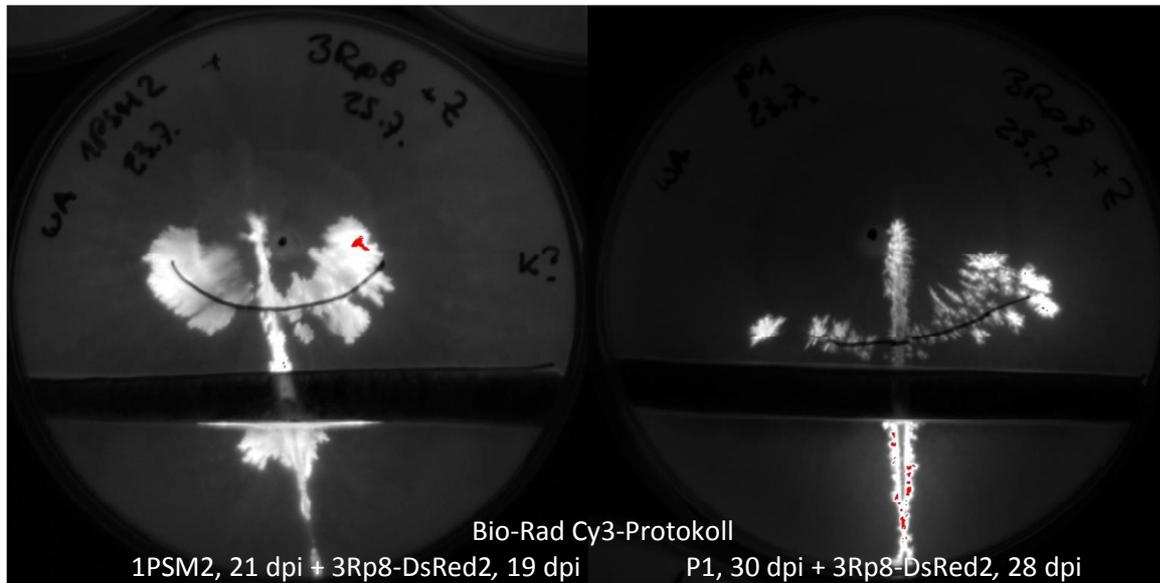


Abbildung 60: Transport von *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 über einen ein Zentimeter breiten Luftspalt mit Hilfe eines Zahnstochers in Kombination mit 1PSM2 (links) und P1 (rechts).

Erstaunlicherweise überbrückten die *Serratia*-Stämme jedoch auch in den Negativkontrollen ohne Pilzisolat mit Hilfe der Zahnstocher den einen Zentimeter breiten Luftspalt, wohingegen dies auf den Platten ohne Zahnstocher nie beobachtet wurde. Abbildung 61 zeigt zwei Paare von Negativkontrollen ohne Pilzisolat jeweils einmal mit und einmal ohne Zahnstocher.

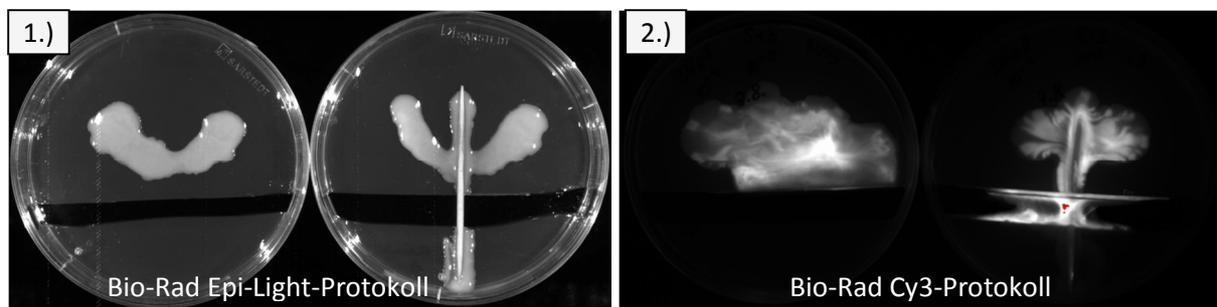


Abbildung 61: Negativkontrollen aus VT4 mit und ohne Zahnstocher (rechts und links im jeweiligen Bild): Teil 1) Mischkultur aus 3Rp8-DsRed2 und S13-GFP, 9 dpi; Teil 2) Einzelstamm 3Rp8-DsRed2, 30 dpi.

Transportversuche VT5, VT7 und VT8

In Versuchsansatz VT5 fand erstmals ein Transport von S13-GFP durch G1/8 über einen 5 mm breiten Luftspalt statt. Im Ansatz von RR3-5-16 mit 3Rp8-DsRed2 schienen die 3Rp8-DsRed2-Kolonien von dem Pilzmyzel regelrecht verschoben zu werden und wanderten, wie in Abbildung 62 Teil 1 gezeigt, zumindest zwei bis drei Millimeter in den Luftspalt ein.

In Transportversuch VT7 konnte wiederholt ein Transport von 3Rp8-DsRed2 durch GL1 gezeigt werden. Wie in Abbildung 62 Teil 3 ersichtlich, schienen hier die 3Rp8-Zellen an den Hyphen angeheftet zu sein, wohingegen in Transportversuch VT2 das Isolat GL1 von 3Rp8 regelrecht überwuchert wurde und lediglich als „Pfad“ diente (vergleiche Abbildung 55). Teil 4 von Abbildung 62 zeigt die Fluoreszenz des G1/8-GFP-Isolates im entsprechenden Bio-Rad-Protokoll im Vergleich zu

Ergebnisse

dem untransformierten G1/8-Isolat. Im Versuchsssetup VT8 konnte schließlich in vier von sechs Wiederholungen der Ansätze von G1/8 versus 3Rp8-DsRed2 ein Transport über den 5 mm Luftspalt eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 62 Teil 2). In allen Wiederholungen von GL1 beziehungsweise BE3-1-10 versus 3Re4-18-ZsYellow fand ein Transport auf der Agar-Oberfläche, jedoch kein Transport über den Luftspalt statt.

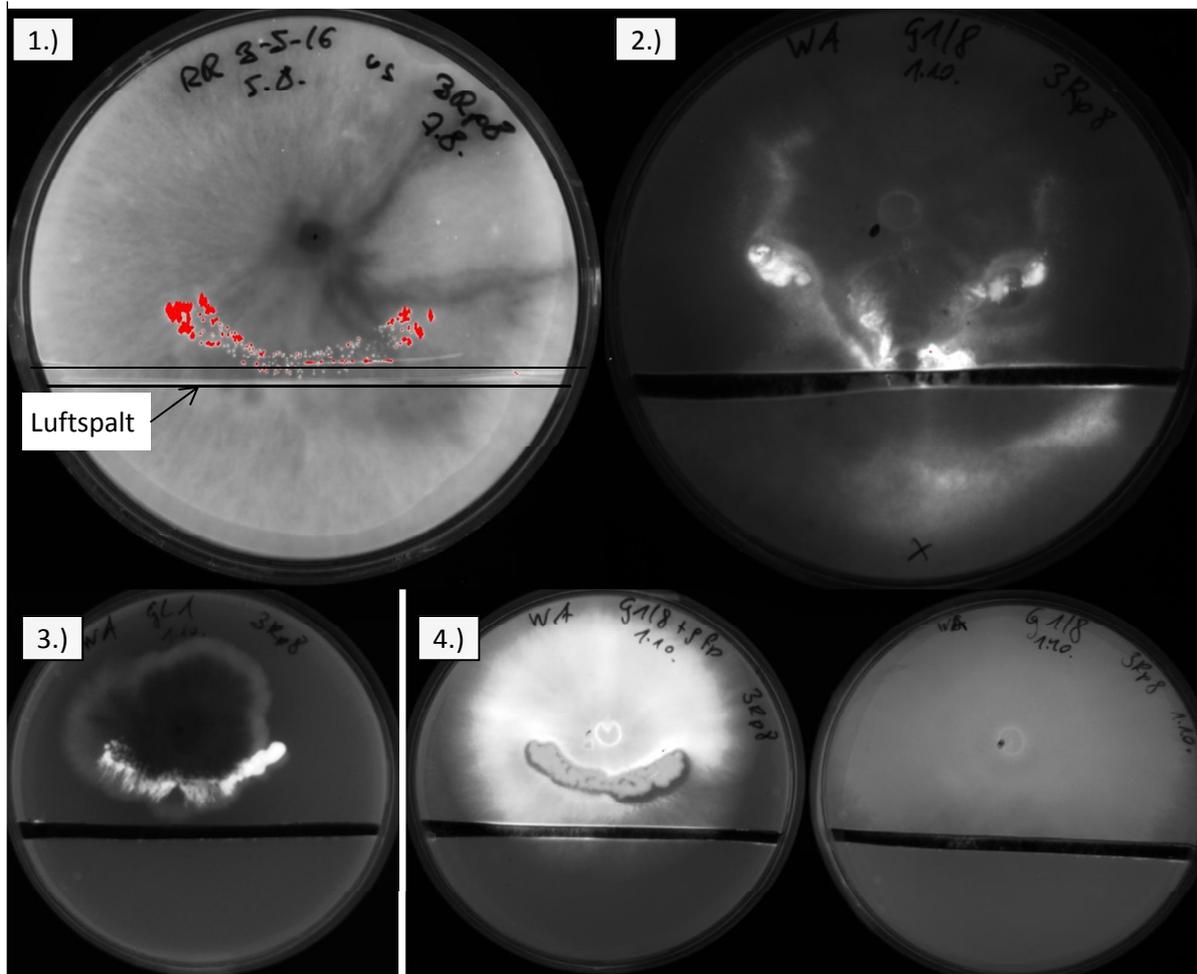


Abbildung 62: Teil 1) Transport von *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 durch RR3-5-16 in den Luftspalt, 22 beziehungsweise 20 dpi; Teil 2) Transport von *S. plymuthica* 3Rp8-DsRed2 durch G1/8 über den Luftspalt, 28 beziehungsweise 26 dpi; Teil 3) Transport von *S. plymuthica* 3Rp8-DsRed2 durch GL1, 5 beziehungsweise 3 dpi und Teil 4) Fluoreszenzsignal des G1/8-GFP-Isolates im Vergleich zu dem G1/8-Umweltstamm (5 dpi).

Dualkulturplattentests V9

Hier wurde, wie in Tabelle 43 angegeben, überprüft, zu welchem Anteil das pilzliche Pathogen bei Abbruch des Versuchs 13 Tage nach Inokulation durch die Biokontrollstämmen abgetötet wurde. Es geht eindeutig hervor, dass nur in den Ansätzen mit G1/8 als Komponente das Pathogen zu einem sehr großen Teil beziehungsweise vollständig im Wachstum gestoppt und abgetötet wurde. In den Ansätzen, in welchen nur bakterielle Stämme eingesetzt wurden war das Myzel über einen längeren Zeitraum noch zu großen Teilen vital.

Tabelle 43: Ergebnisse Dualkulturplattentest V9, Status bei Abbruch des Experimentes 13 dpi

Pathogen	Biokontrollstämmen	Auftragungs cfu/ml	% abgetötet
GL1	- / Negativkontrolle	-	10
GL1	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁸	50
GL1	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁷	50
GL1	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁶	50
GL1	S13+G1/8-Mix, 3Rp8+G1/8-Mix, S13+3Rp8+G1/8-Mix, PB71+G1/8-Mix	10 ⁸	95
GL1	S13+G1/8-Mix, 3Rp8+G1/8-Mix, S13+3Rp8+G1/8-Mix, PB71+G1/8-Mix	10 ⁷	95
GL1	2 x G1/8, 2 x PB71	10 ⁷	95
GL1	3 x PB71+G1/8 Sporenmix	10 ⁶	100
SP2	- / Negativkontrolle	-	0
SP2	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁸	70
SP2	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁷	75
SP2	S13, 3Rp8, S13+3Rp8-Mix, PB71	10 ⁶	70
SP2	S13+G1/8-Mix, 3Rp8+G1/8-Mix, S13+3Rp8+G1/8-Mix, PB71+G1/8-Mix	10 ⁸	100
SP2	S13+G1/8-Mix, 3Rp8+G1/8-Mix, S13+3Rp8+G1/8-Mix, PB71+G1/8-Mix	10 ⁷	100
SP2	2 x G1/8, 2 x PB71	10 ⁷	100
SP2	3 x PB71+G1/8 Sporenmix	10 ⁶	100

Wie in Abbildung 63/Teil 1 beispielhaft gezeigt, bildete sich von den getesteten bakteriellen Isolaten nur um PB71 ausgeprägte Hemmhöfe, wohingegen die Wachstumsfronten der pilzlichen Pathogene bei den 3Rp8 und S13-Stämmen bis an die Grenzen der Kolonisierung heranreichten. Zu späteren Zeitpunkten drangen 3Rp8- und S13-Zellen jedoch in die Bereiche des Pilzes ein und parasitierten diesen. Im Vergleich von PB71 mit G1/8 (Abbildung 63/Teil 2) zeigte sich, dass G1/8 durchwegs in der Lage ist, das pilzliche Pathogen im Wachstum zu stoppen, jedoch nicht durch eine Hemmung über flüchtige organische Substanzen, wie dies bei PB71 der Fall zu sein scheint, sondern durch schlichte Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe. Zu späteren Zeitpunkten überwucherte G1/8 die Pathogene vollständig.

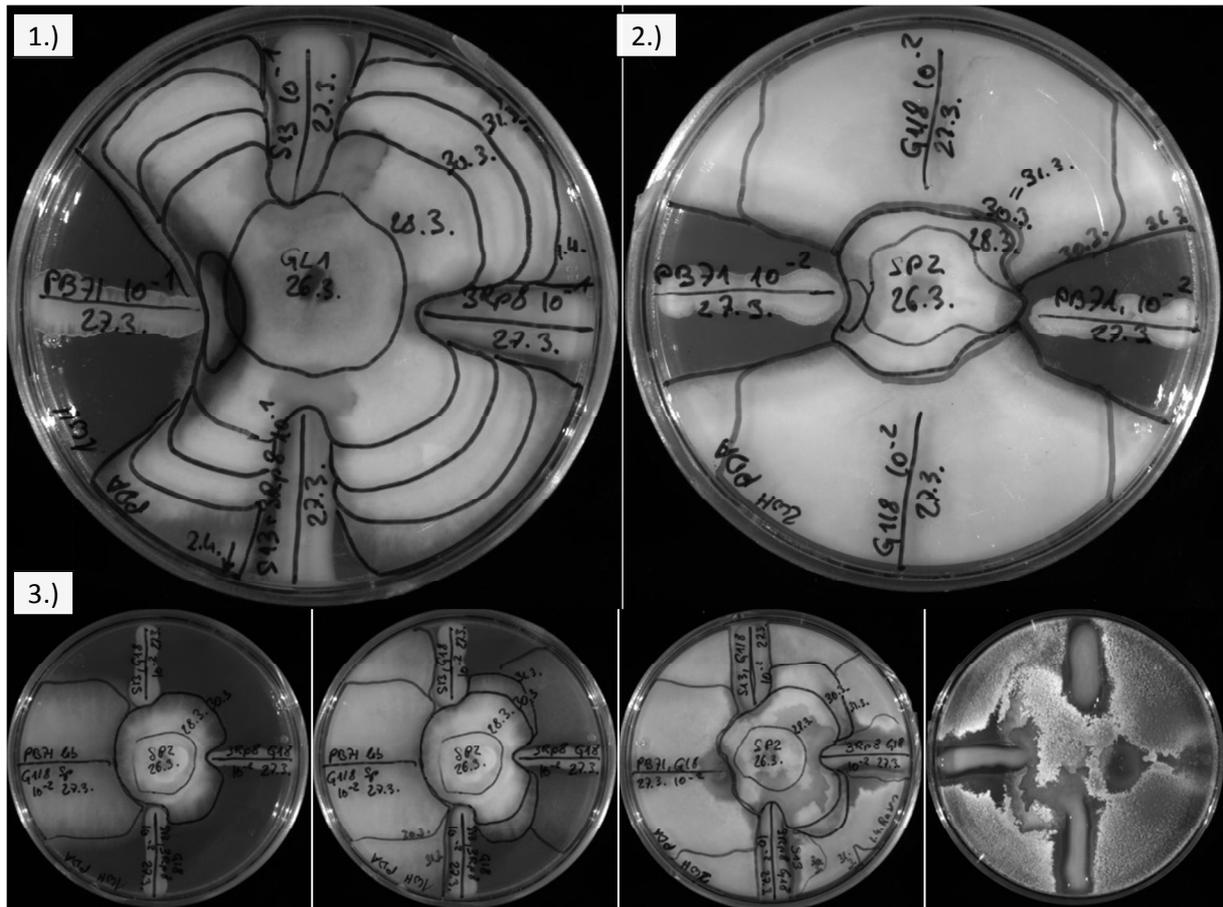


Abbildung 63: Dualkulturplattentests mit Einzelstämmen beziehungsweise Mischungen von Stämmen; Teil 1) GL1 versus 3Rp8, S13, PB71 sowie einer Mischung aus 3Rp8 und S13; Teil 2) SP2 versus PB71 und G1/8; Teil 3) Zeitraffer eines Tests über mehrere Tage. Die Markierungen auf der Platte zeigen die Wachstumsfront der Pilzisolat zu verschiedenen Zeitpunkten an.

Abbildung 63/Teil 3 zeigt beispielhaft, dass bei gemeinsamer Auftragung einer Mischung aus 3Rp8, S13 oder einer Mischung dieser mit G1/8 jeweils das G1/8-Isolat stark oder vollständig im Wachstum gehemmt wurde, wohingegen diese Hemmung bei Mischungen von PB71 mit G1/8 nur zu geringem Maße auftrat.

Dualkulturplattentests V10

Die durch die Biokontrollstämmen herbeigeführte Reduktion der Ausbreitungsfläche des pilzlichen Pathogens sowie der prozentuelle Anteil des völlig zerstörten Myzels bei Abbruch des Versuchs ist in Tabelle 44 dargestellt. Es wurde eine Abhängigkeit der Reduktion der Fläche von der verwendeten Konzentration der applizierten Biokontrollstämmen festgestellt. Die stärkste Reduktion der Ausbreitungsfläche konnte sowohl bei den Tests mit GL1 als auch SP2 als Pathogen bei der äquivalenten Mischbehandlung von G1/8 und PB71 in einer Konzentration von 10^6 cfu/ml festgestellt werden.

Tabelle 44: Ergebnisse Dualkulturplattentest V10, Status bei Abbruch des Experimentes 13 dpi

Pathogen	Biokontrollstämme	Auftragungs- menge cfu/ml	cm ² Myzel Pathogen 4 dpi	% Reduktion 4 dpi	% Pathogen abgestorben 12 dpi
GL1	-	-	31,3	Referenz	0
GL1	G1/8 Sporen	10 ⁴	17,1	45,37	90
GL1	G1/8 Sporen	10 ⁵	9,4	69,97	100
GL1	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁴	16,3	47,92	10
GL1	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁵	12,1	61,34	10
GL1	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁶	6,7	78,59	90
GL1	G1/8 + PB71 Sporen 2:1	10 ⁴	20,2	35,46	20
GL1	G1/8 + PB71 Sporen 2:1	10 ⁵	11,4	63,58	70
GL1	PB71 Sporen	10 ⁴	13,2	57,83	20
GL1	PB71 Sporen	10 ⁵	10,9	65,18	5
SP2	-	-	4,9	Referenz	0
SP2	G1/8 Sporen	10 ⁴	3,8	22,45	100
SP2	G1/8 Sporen	10 ⁵	5,1	-4,08	100
SP2	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁴	2,8	42,86	100
SP2	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁵	2,2	55,10	100
SP2	G1/8 + PB71 Sporen 1:1	10 ⁶	2	59,18	90
SP2	G1/8 + PB71 Sporen 2:1	10 ⁴	3,8	22,45	90
SP2	G1/8 + PB71 Sporen 2:1	10 ⁵	4,7	4,08	90
SP2	PB71 Sporen	10 ⁴	2,9	40,82	100
SP2	PB71 Sporen	10 ⁵	2,3	53,06	100

Wie in Abbildung 64 beispielhaft gezeigt, ist auch PB71 in der Lage, sich über G1/8 auszubreiten.

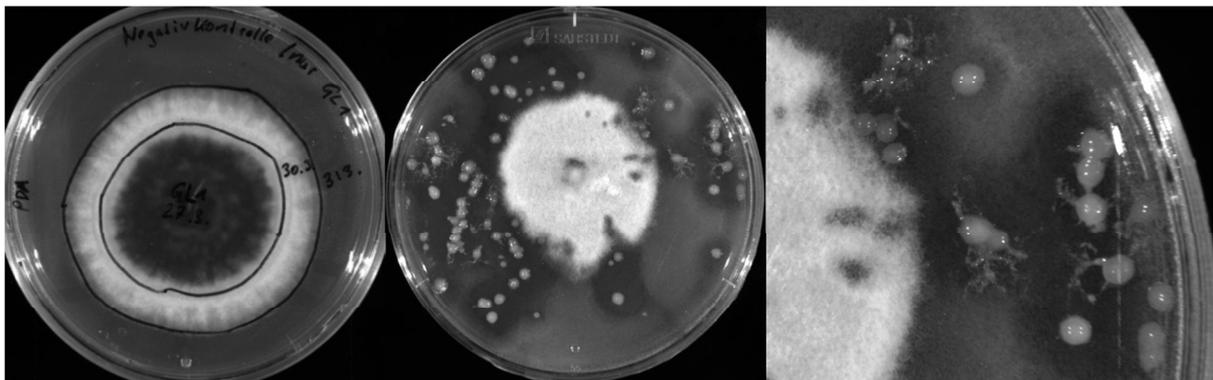


Abbildung 64: Dualkulturplattentest mit flächiger Auftragung der Biokontrollstämme. Links: GL1 Negativkontrolle, Mitte und rechts: GL1 versus einer Mischkultur aus G1/8 und PB71, alle 4 dpi.

3.3.2 Dualkulturplattentests in Zwei- und Drei-Kompartiment Petrischalen

Transportversuch VT3

Da pro Bakterien-Pilz-Kombination jeweils nur eine Platte angelegt wurde, werden im Folgenden nur allgemeine Beobachtungen, gruppiert nach dem Pilzpartner, beschrieben. Aus Tabelle 45 ist ersichtlich, dass alle Pilzisolat die Plastik-Abgrenzung zwischen den Kompartimenten und zirka einen

Ergebnisse

Zentimeter Erde überquerten und spätestens acht Tage nach Inokulation den Samen erreichten. Weiters ist ersichtlich, dass die Samen in den Platten mit P1 als Pilzpartner bereits nach vier Tagen keimten, wohingegen die Samen in den anderen Platten erst nach sechs beziehungsweise acht Tagen keimten.

Tabelle 45: Ergebnisse Transportversuch VT3

Pilzpartner	Bakterium	Samen erreicht bei	Samen keimt bei	Anmerkungen
G1/8	S13	8 dpi	-	
	3Rp8	4 dpi	-	
	3Rp8+ S13	6 dpi	8 dpi	
P1	S13	4 dpi	4 dpi	Pilz besiedelt den Samen sehr stark, scheint jedoch die Keimung und Wurzelbildung zu beschleunigen
	3Rp8	4 dpi	4 dpi	
	3Rp8+ S13	4 dpi	6 dpi	
Be3-1-10	S13	4 dpi	-	Pilz wächst gerichtet auf den Samen zu, besiedelt diesen stark und scheint diesen als Substrat zu nutzen
	3Rp8	4 dpi	-	
RR3-5-16	S13	6 dpi	-	
	3Rp8	6 dpi	6 dpi	
1PSM2	S13	4 dpi	6 dpi	
	3Rp8	4 dpi	6 dpi	
-	S13	-	8 dpi	
-	3Rp8	-	-	
-	-	-	8 dpi	

Abbildung 65 zeigt eine starke Besiedelung des Samens mit *Trichoderma atroviride* P1, welche die Keimung und Wurzelbildung der jungen Pflanzen offensichtlich beschleunigte.

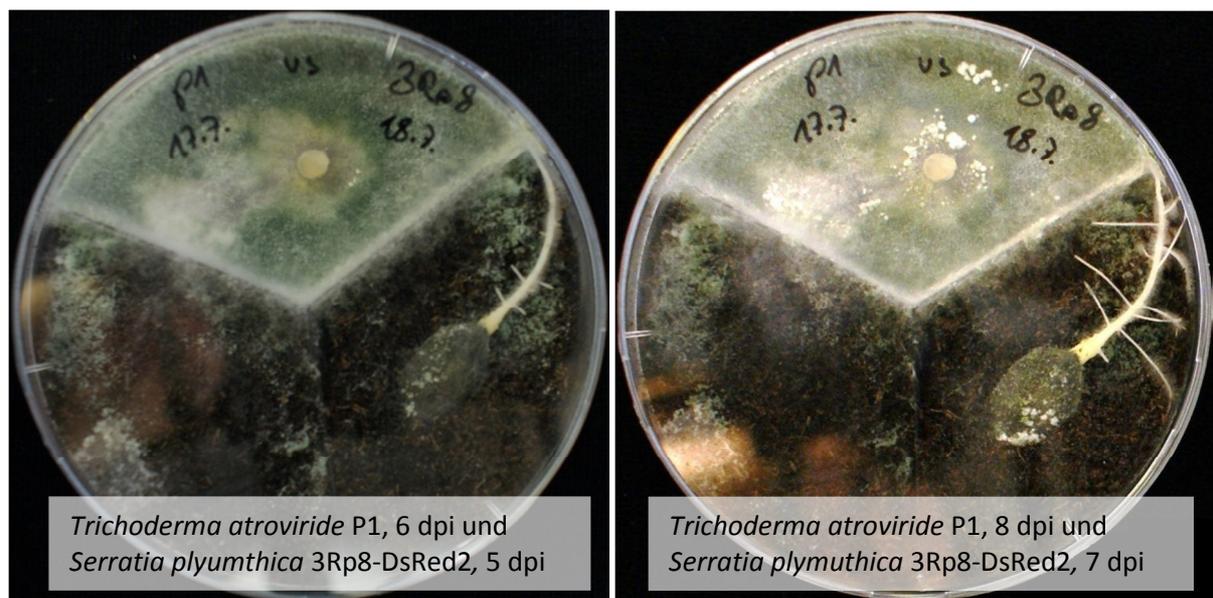


Abbildung 65: Starke Besiedelung des Kürbissamens mit *Trichoderma atroviride* P1.

Ergebnisse

Abbildung 66 zeigt eine starke Besiedelung des Kürbissamens mit dem Isolat BE3-1-10 11, welche eine Keimung des Samens jedoch offensichtlich verhinderte.

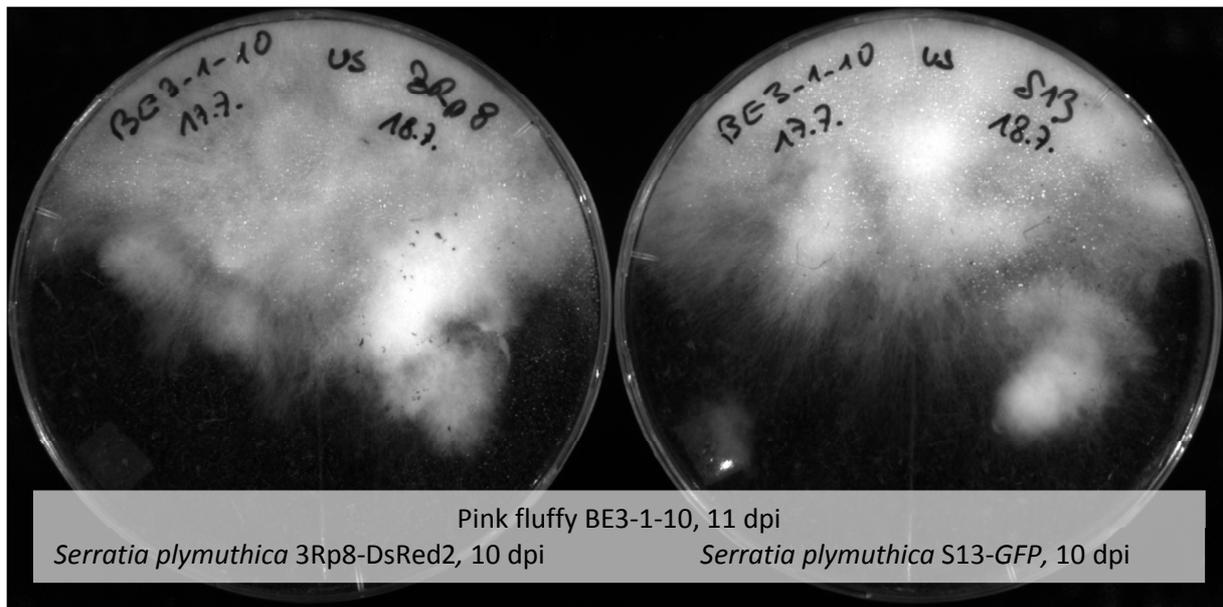


Abbildung 66: Starke Besiedelung des Kürbissamens mit BE3-1-10, 11 dpi.

Elf Tage nach Inokulation des Pilzpartners und Aussaat des Samens wurde von den Ansätzen mit P1, G1/8 und 1PSM2 als Pilzpartner an der ursprünglichen Inokulationsstelle des Bakteriums, dem Rand der Agar-Platte, dem Myzel auf der Plastik-Abtrennung zwischen den Kompartimenten, der Erde direkt nach der Plastik-Abtrennung, dem Stück Waksman-Agar, dem Keimling und von Wurzeln Zellmaterial entnommen, in 0,85%igem NaCl zerrieben und neu ausgestrichen. In allen drei Ansätzen mit P1 und 1PSM2 als Pilzpartner konnten nicht einmal an der ursprünglichen Inokulationsstelle die *Serratia*-Stämme reisoliert werden, was sich mit den Bio-Rad-Auswertungen deckte. In den Ansätzen mit G1/8 konnten die Stämme sowohl von ihrer ursprünglichen Inokulationsstelle, als auch dem Rand des Agar-Kompartiments reisoliert werden. Bei den restlichen Reisolationen gab es nur zwei weitere positive Ergebnisse: in dem Mikrokosmos-Experiment mit der Mischbehandlung aus 3Rp8-DsRed2 und S13-GFP wurden sowohl vom Keimling als auch von Wurzelstücken, welche sich nahe der Plastikabtrennung befanden, *S. plymuthica* S13 Zellen reisoliert. Wie in Abbildung 67 ersichtlich, berührte der Keimling jedoch die Plastik-Abtrennung, weswegen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die *Serratia*-Zellen hier direkt ohne vorherigen Transport durch die Erde zur Pflanze übergetreten sind. In der Negativkontrolle ohne Pilzpartner jedoch mit S13-GFP wurden ebenfalls von Wurzelstücken die inokulierten *S. plymuthica*-Zellen reisoliert. In diesem Ansatz ragten die Wurzeln des Keimlings bereits in den Bereich des PDA mit dem Inokulum und der Kontakt fand hier ebenfalls direkt und ohne Pilzpartner statt. Alle anderen beprobten Stellen waren frei von den inokulierten Bakterien.



Abbildung 67: Mikrokosmos-Experiment mit *Trichoderma velutinum* G1/8, 11 dpi und einer Mischung aus *Serratia plymuthica* 3Rp8-DsRed2 und *S. plymuthica* S13-GFP, 10 dpi.

Mit derartigen Mikrokosmos-Experimenten lässt sich schnell überprüfen, ob ein potentieller pilzlicher Biokontroll-Stamm positive oder negative Effekte auf die Keimung hat. Damit können Stämme mit stark negativen Auswirkungen ausgeschlossen werden bevor diese zum Beispiel in Gewächshausversuchen weiter getestet werden.

Transportversuch VT6

In diesem Experiment konnte ein Transport der Bakterien auf in Erde gewachsenen Pflanzen von den Wurzeln in die Blätter erstmals gezeigt werden, da die Speicherkotyledonen der Samen (welche sich bei der Keimung in die Keimblätter umwandeln) nicht - wie zum Beispiel beim ST – direkt bei der Inokulation in Kontakt mit den bakteriellen Stämmen gebracht wurden. Abbildung 68 zeigt das Versuchssetup in sterilen Plastikboxen.

Ergebnisse

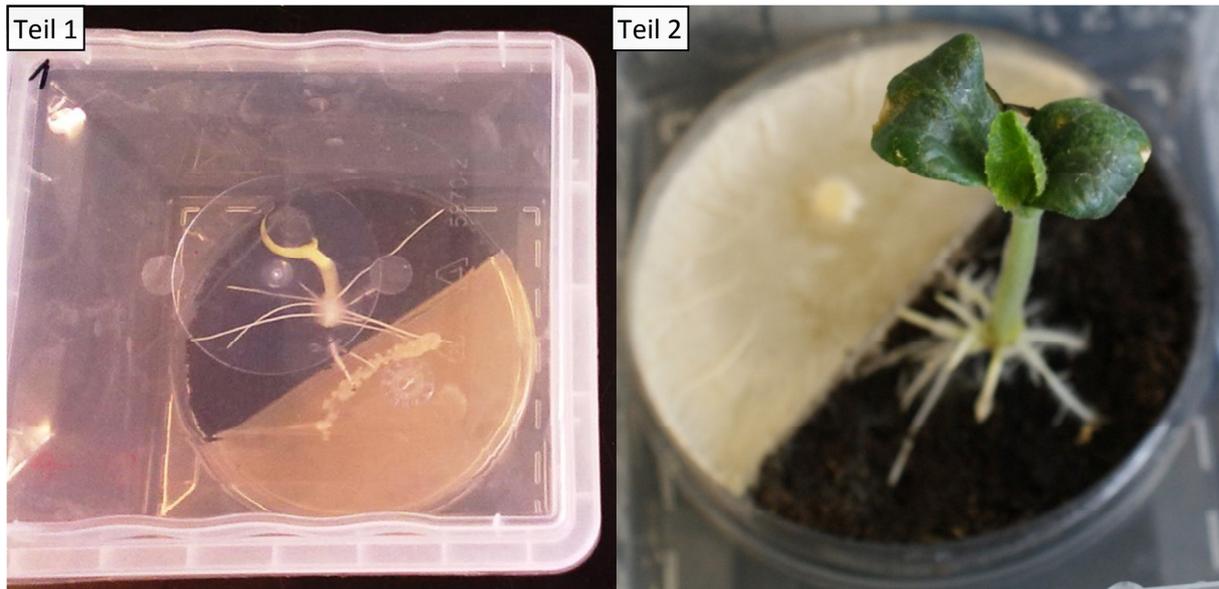


Abbildung 68: Versuchsaufbau von VT6 in sterilen Plastikboxen: links Mikrokosmos-Experiment mit 3Rp8-DsRed2 auf dem PDA-Kompartiment (4 dpi) ohne Pilzpartner; rechts: Mikrokosmos-Experiment mit G1/8 (13 dpi) und S13-GFP (11 dpi) auf dem PDA-Kompartiment zum Test eines Transports in das Erd-Kompartiment beziehungsweise auf die Pflanze.

Aus den Blättern der in Abbildung 68 Teil 1 gezeigten Pflanze wurden sechs Tage nach dem ersten Kontakt einer Wurzel mit 3Rp8-DsRed2 auf dem Agar-Kompartiment 3Rp8-DsRed2-Zellen isoliert. Ebenso konnte aus den Blättern einer weiteren Pflanze 3Rp8-DsRed2-Zellen isoliert werden, bei welcher die Inokulation an der Hauptwurzel gemeinsam mit dem G1/8-Isolat stattfand.

Abbildung 69 zeigt die Besiedelung der fluoreszenzmarkierten Stämme nach Inokulation an der Hauptwurzel in großen Teilen des Wurzelsystems der Pflanze.

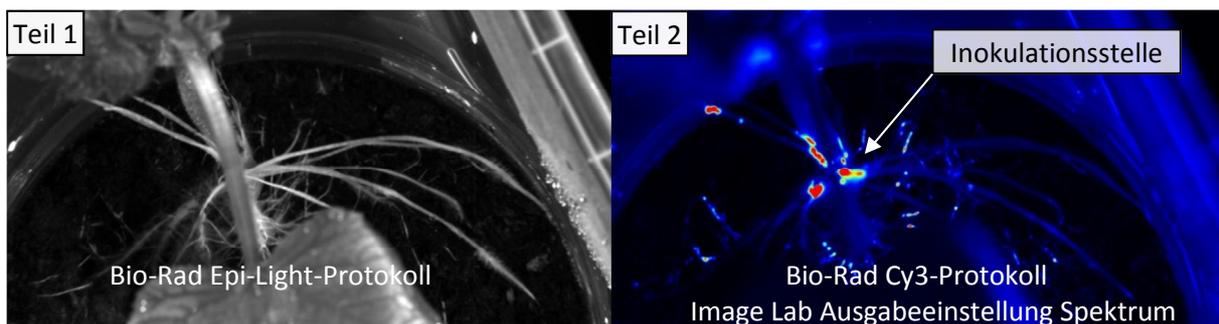


Abbildung 69: Besiedelung des Wurzelsystems 13 Tage nach Inokulation mit 10 μ l einer 3Rp8-DsRed2-Suspension (10^4 cfu/ml) an der Hauptwurzel. Die hellen Signale in Teil 2 der Abbildung zeigen die Stellen mit sehr hoher Besiedelungsdichte von 3Rp8-DsRed2-Zellen an.

Abbildung 70 zeigt typische Symptome einer *Didymella*-Infektion, 19 Tage nachdem ein GL1-Isolat am Agar platziert wurde und acht Tage nach dem ersten direkten Kontakt der Pflanze mit dem Isolat.



Abbildung 70: Typische Symptome einer *Didymella bryoniae*-Infektion an Wurzeln und Blättern, acht Tage nach Infektion der Pflanze mit dem *D. bryoniae* Isolat GL1.

Allerdings traten auch in vielen Fällen ohne künstlich zugesetzte Pathogene schwere Schäden an Pflanzen auf, die vermutlich durch eine zu starke Besiedelung mit den applizierten Stämmen oder Isolaten in Kombination mit einer hohen Luftfeuchtigkeit in den Boxen entstanden.

Transportversuch VT7

In diesem Versuch konnte durch die Verwendung des mit einem Fluoreszenzprotein und einer Antibiotikaresistenz markierten Isolates G1/8-GFP auch die Besiedelung des Pilzes auf der Pflanze durch die Möglichkeit einer selektiven Reisolierung überprüft werden. Abbildung 71 zeigt zwei PDA-Reisolationsplatten mit Hygromycin B wobei auf der linken Platte mit hoher Wahrscheinlichkeit das G1/8-GFP-Isolat nachgewiesen wurde. Von vier mit G1/8-GFP inokulierten Mikrokosmos-Experimenten konnte 20 Tage nach Inokulation des Pilzisolates in allen Ansätzen der Stamm aus der Rhizosphäre reisoliert werden und in einem Fall zusätzlich auch aus den Blättern.

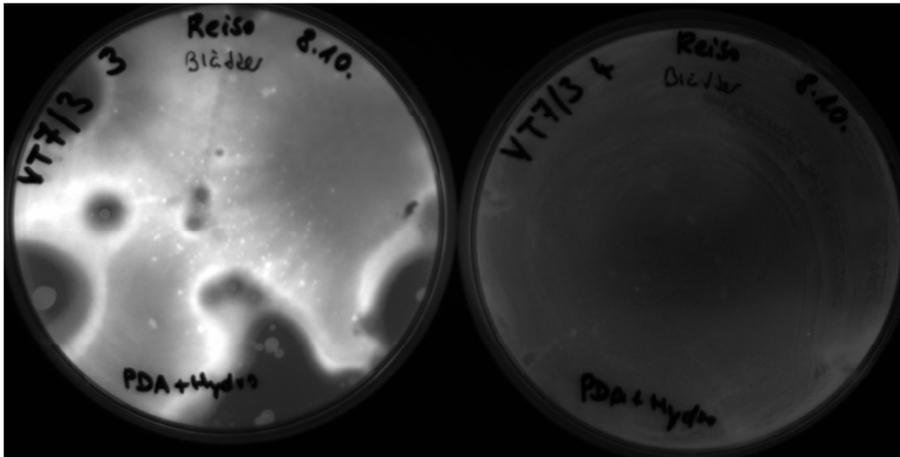


Abbildung 71: PDA-Reisolutionsplatten mit Hygromycin B unter Verwendung des Bio-Rad GFP-Protokolls. Die hell dargestellten Bereiche auf der linken Platte sind Signale des Myzels des G1/8-GFP-Isolates, die rechte Platte zeigt ein negatives Ergebnis der Reisolation.

3.4 *In situ* Visualisierung

3.4.1 Mikroskopie der Kürbis-Samen, Wurzeln und Blätter

Eine Mikroskopie der Samenhaut beziehungsweise der Speicherkotyledonen von geprüften Kürbissamen ein beziehungsweise drei Tage nach Inokulation zeigte eine sehr starke Besiedelung der Samen mit den Stämmen 3Rp8-DsRed2 und S13-GFP (siehe z.B. Abbildung 72).

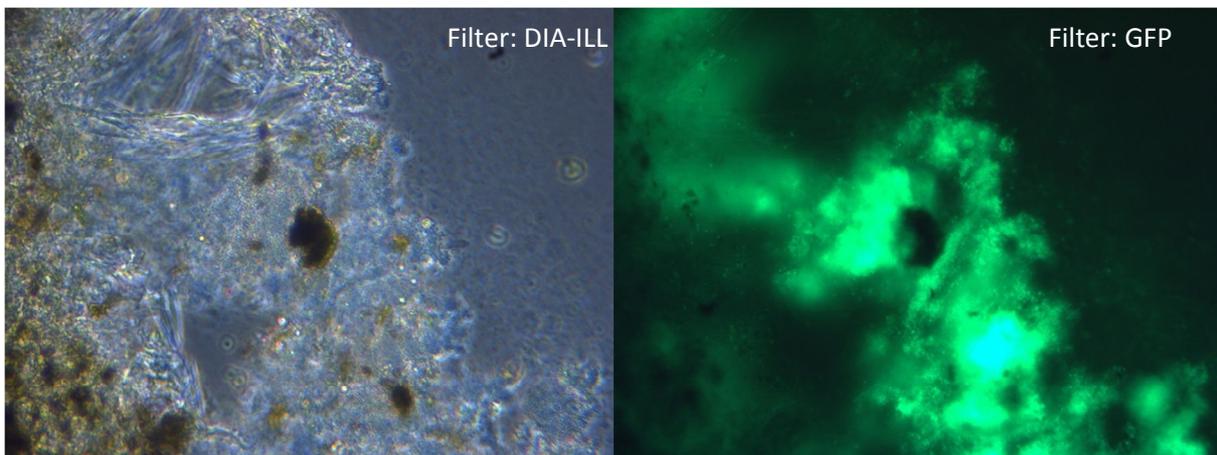


Abbildung 72: S13-GFP-Besiedelung auf einem Stück Samenhaut drei Tage nach dem Samentauchbad, 40-facher Vergrößerung unter dem Motic AE31-Mikroskop links im Durchlicht-Modus, rechts unter Verwendung des GFP-Filters. Die S13-GFP-Zellen sind rechts als grünes Signal dargestellt.

Die Mikroskopie von Wurzeln mit dem Leica DM550Q-Mikroskop zeigte eine gute Besiedelung der Wurzeln nach den Samentauchbädern sowohl mit S13-GFP als auch mit 3Rp8-DsRed2, wobei die Besiedelung mit 3Rp8, wie beispielsweise in Abbildung 73 gezeigt, meist stärker erschien. Die Besiedelung der Wurzeln nach dem 20-minütigen Wurzeltauchbad in V12 war deutlich schlechter ausgeprägt.

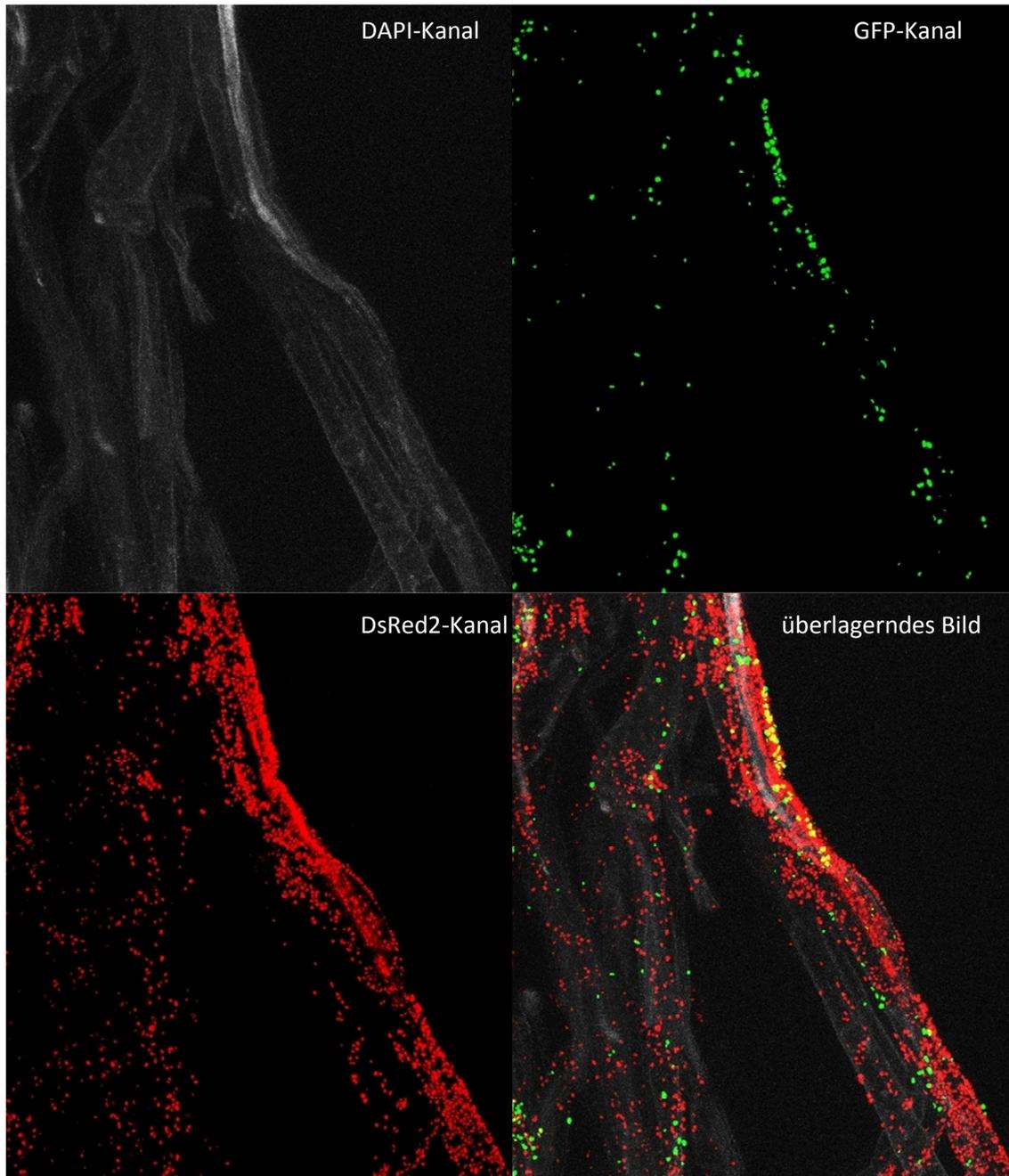


Abbildung 73: Wurzel einer Kürbispflanze elf Tage nach einem Samentauchbad mit einer Mischkultur aus S13-GFP sowie 3Rp8-DsRed2; oben links: Kanal zur Darstellung des Pflanzengewebes, oben rechts: Kanal zur Darstellung des GFP-Signals (S13-GFP-Zellen grün dargestellt), unten links: Kanal zur Darstellung des DsRed2-Signals (3Rp8-DsRed2-Zellen rot dargestellt), unten rechts: überlagerndes Bild der drei Kanäle, 40-fache Vergrößerung.

Wie in Abbildung 74 beispielsweise ersichtlich, zeigten die Negativkontrollen keine Fluoreszenz-Signale in den für GFP und DsRed2 verwendeten Kanälen, welche Strukturen ähnlich einer Bakterienbesiedelung glichen.

Ergebnisse

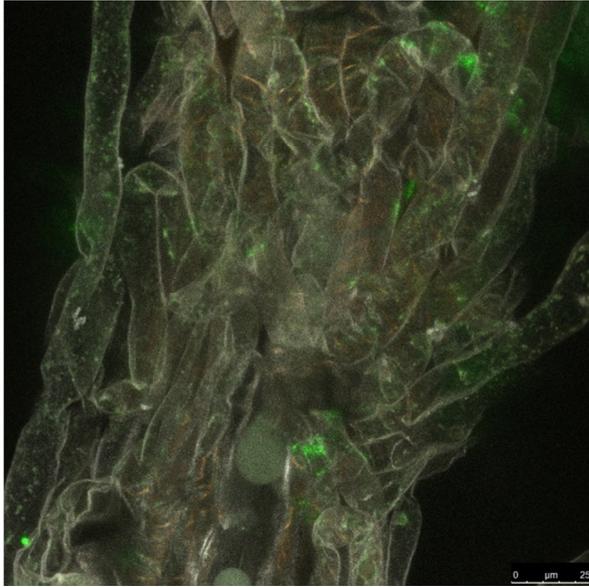


Abbildung 74: Wurzelstück einer unbehandelten Pflanze (Negativkontrolle ORI), überlagerndes Bild der Kanäle DAPI, GFP und DsRed2, 40-fache Vergrößerung.

Die *Serratia*-Stämme waren - wie in Abbildung 73 gezeigt - meist lose verteilt an den Wurzeln angesiedelt, ohne dicht gepackte oder strukturierte Kolonien zu bilden. Nur in wenigen Fällen konnte eine scharf abgegrenzte Koloniebildung beobachtet werden. Abbildung 75 und Abbildung 76 zeigen Wurzelstücke, welche mit transformierten *Serratia*-Stämmen besiedelt sind, die sich kolonieförmig angesiedelt haben. Abbildung 77 zeigt ein Wurzelstück, in welchem die Bakterien mit Hilfe der FISH-Methode visualisiert wurden. Auch hier konnte eine leichte Koloniebildung beobachtet werden.

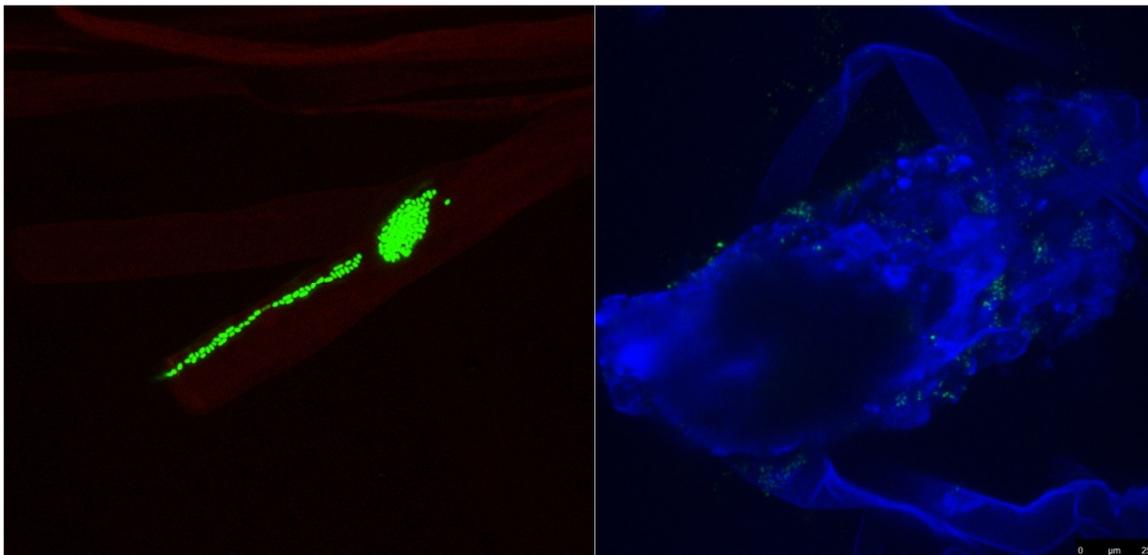


Abbildung 75 links: Wurzelstück (rot dargestellt) einer mit S13-GFP (grün dargestellt) geprimten Pflanze (40-fache Vergrößerung); rechts: von einer Wurzel umschlungenes Erdpartikel (beide blau dargestellt) und Besiedelung beider mit S13+GFP (grün dargestellt).

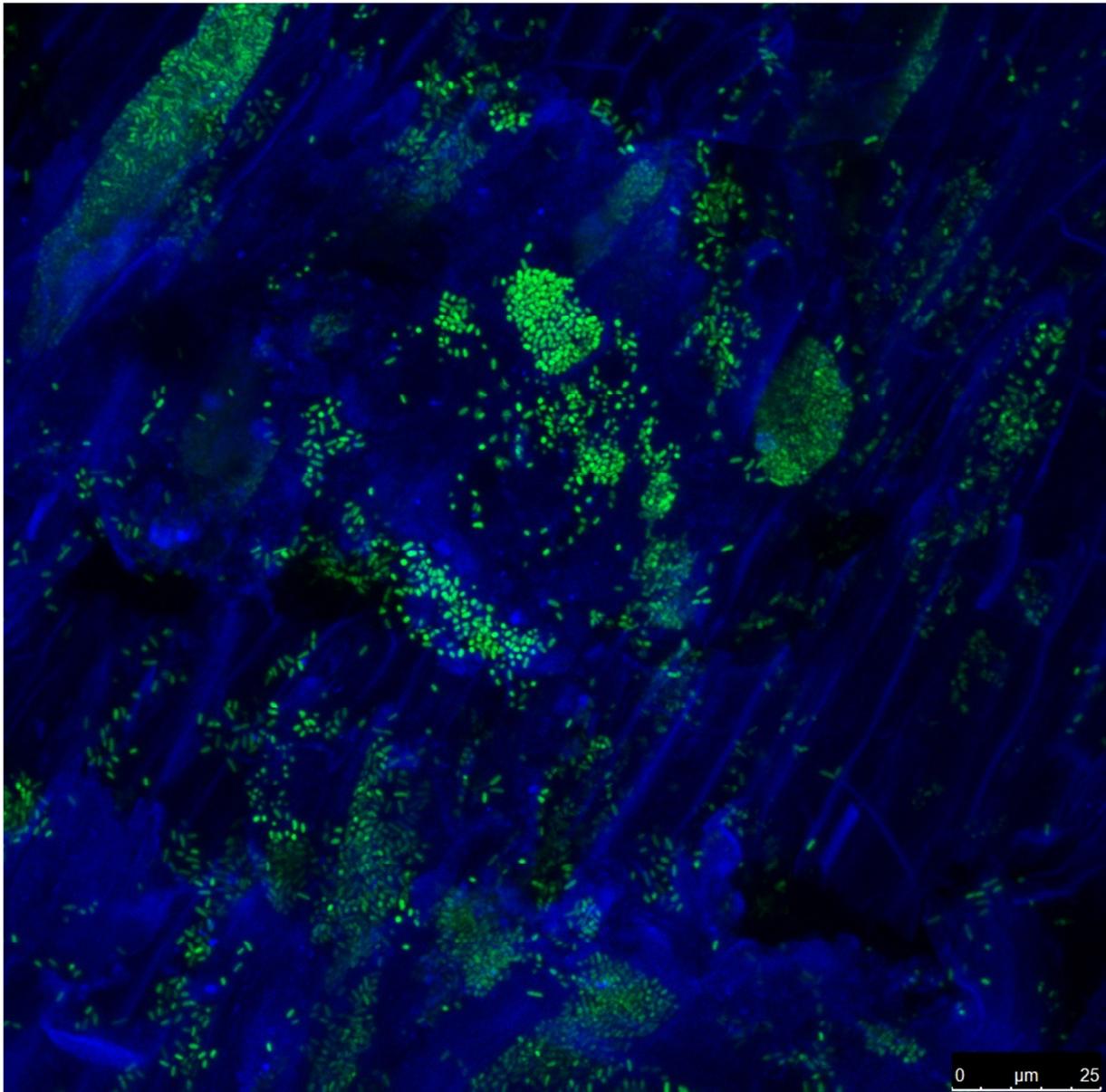


Abbildung 76: Stark mit S13+GFP (grün dargestellt) besiedelte Wurzel einer in steriler Erde gewachsenen Kürbispflanze.

Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist es möglich, neben den applizierten Bakterien auch weitere, noch nicht näher charakterisierte Bakterien an der Pflanze darzustellen. So ist in Abbildung 77 ersichtlich, dass sich neben den gelb dargestellten Gammaproteobakterien (bei denen es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die applizierten *S. plymuthica* Zellen handelt) auch Bakterien anderer Klassen an der Wurzel angesiedelt hatten. Einige Beispiele sind auf dem Bild mit einem grünen Pfeil hervorgehoben.

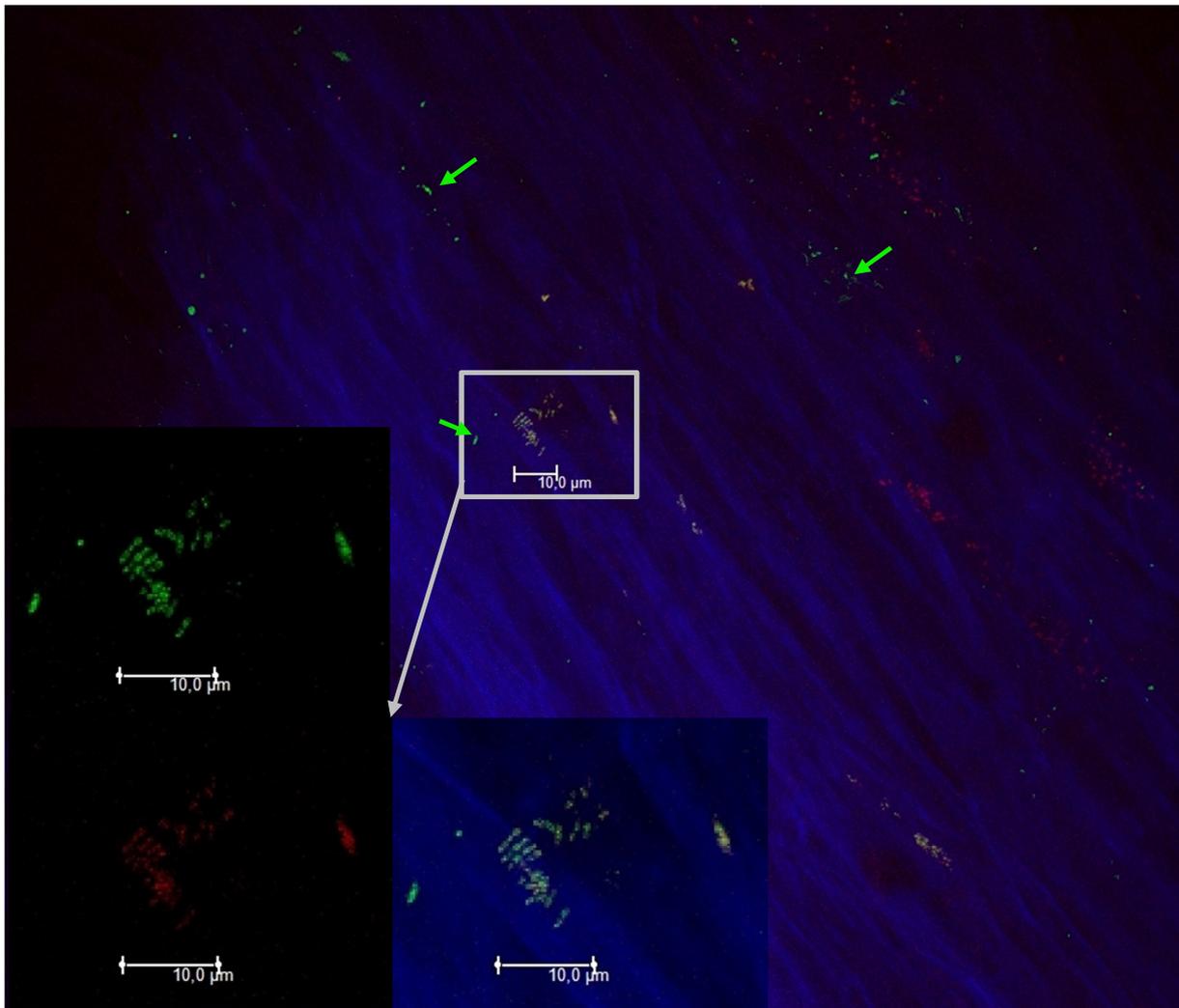


Abbildung 77: FISH an einer Kürbiswurzel einer Pflanze aus V6, welche mit einer bakteriellen Suspension von 3Rp8-DsRed2 gegossen wurde. Im Detailausschnitt rot dargestellt ist das Signal des Cy5-Farbstoffes (Gammaproteobakterien), grün das Signal des Cy3-Farbstoffes (Eubakterien-Mix). Bei Überlagerung der Kanäle für Cy3 und Cy5 ergibt sich für Gammaproteobakterien eine gelbe Mischfarbe als überlappendes Signal. Bakterien anderer Klassen sind auch am überlappenden Bild weiterhin grün dargestellt. Beispiele hiervon sind im Bild mit grünen Pfeilen markiert.

Ergebnisse

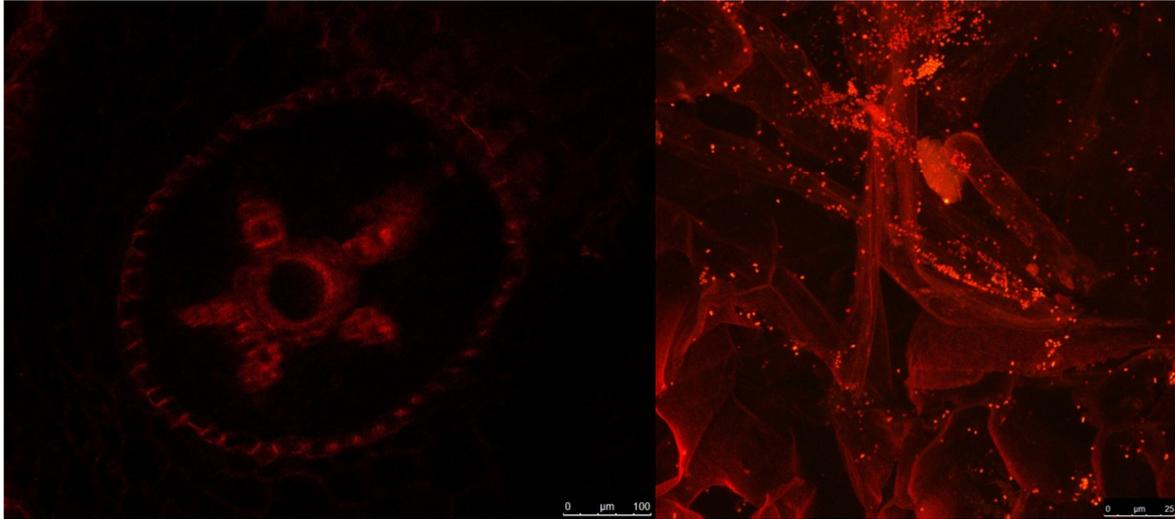


Abbildung 78 links: Autofluoreszenz eines Wurzelquerschnitts in 10-facher Vergrößerung, rechts: Ausschnitt vom äußeren Rand dieses Wurzelquerschnitts in 40-facher Vergrößerung mit starker Besiedelung durch 3Rp8-DsRed2-Zellen (als hellrot leuchtende Punkte dargestellt).

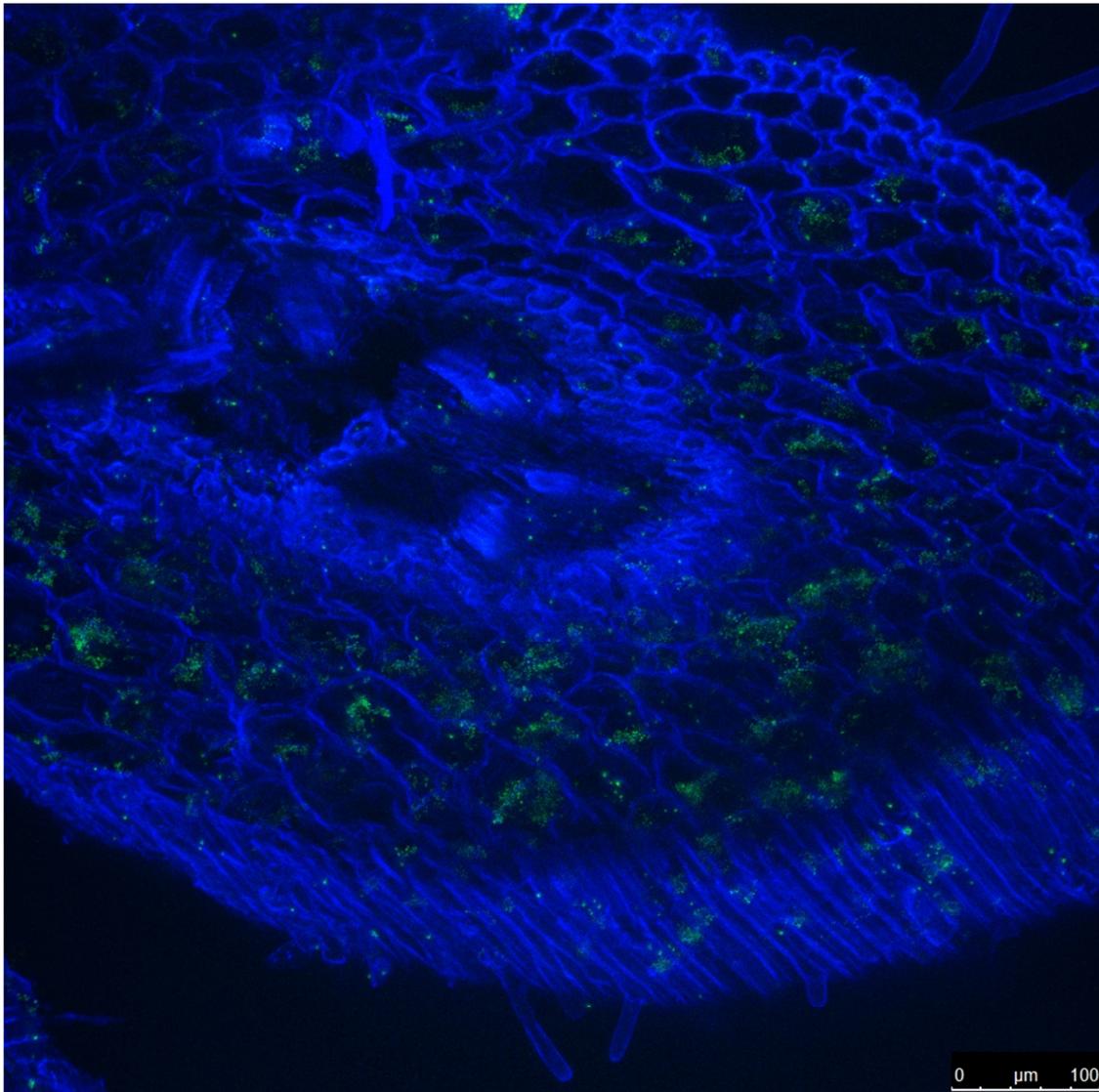


Abbildung 79: 10-fache Vergrößerung eines Wurzelquerschnitts einer in steriler Erde gewachsenen Pflanze. Die Zellen im Cortex sind stark mit S13+GFP (grün dargestellt) besiedelt.

Ergebnisse

Eine Darstellung der Besiedelung des gesamten Wurzelsystems ist für Pflanzen, welche beispielsweise in Keimfiltern gezogen wurden, mit Hilfe des Bio-Rad möglich (Beispiel siehe Abbildung 80). Die stärkste Besiedelung wurde meist an den oberen Teilen des Wurzelsystems entlang der Hauptwurzel detektiert.

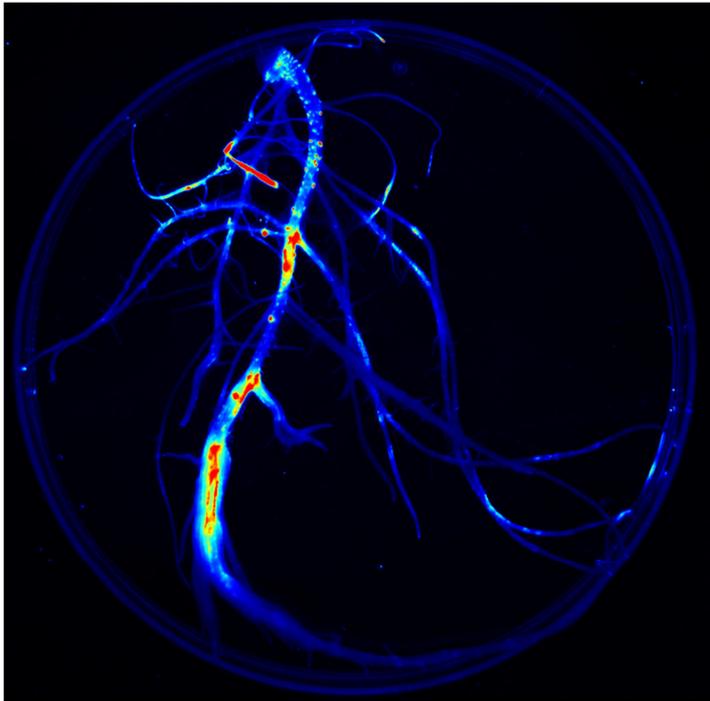


Abbildung 80: Bio-Rad-Bild, erzeugt mittels Cy3-Protokoll und der Image Lab Ausgabeeinstellung Spektrum, einer Pflanze aus einem sterilen Keimfilter von einem mit 3Rp8-DsRed2 geimpften Samen. Die stärkste Besiedelung fand entlang der Hauptwurzel statt.

Die Mikroskopie von Blättern war deutlich schwieriger als die der Wurzeln, da eine sehr starke Autofluoreszenz der Blattproben Probleme beim Suchen von besiedelten Stellen bereitete und weiters nur ein Teil der Blätter auch tatsächlich mit den applizierten Mikroorganismen besiedelt war. Trotzdem konnten, wie in Abbildung 81 und Abbildung 82 beispielhaft gezeigt, Bilder von Blättern mit zum Teil sehr starker Besiedelung sowohl von 3Rp8-DsRed2 als auch S13-GFP erzeugt werden.

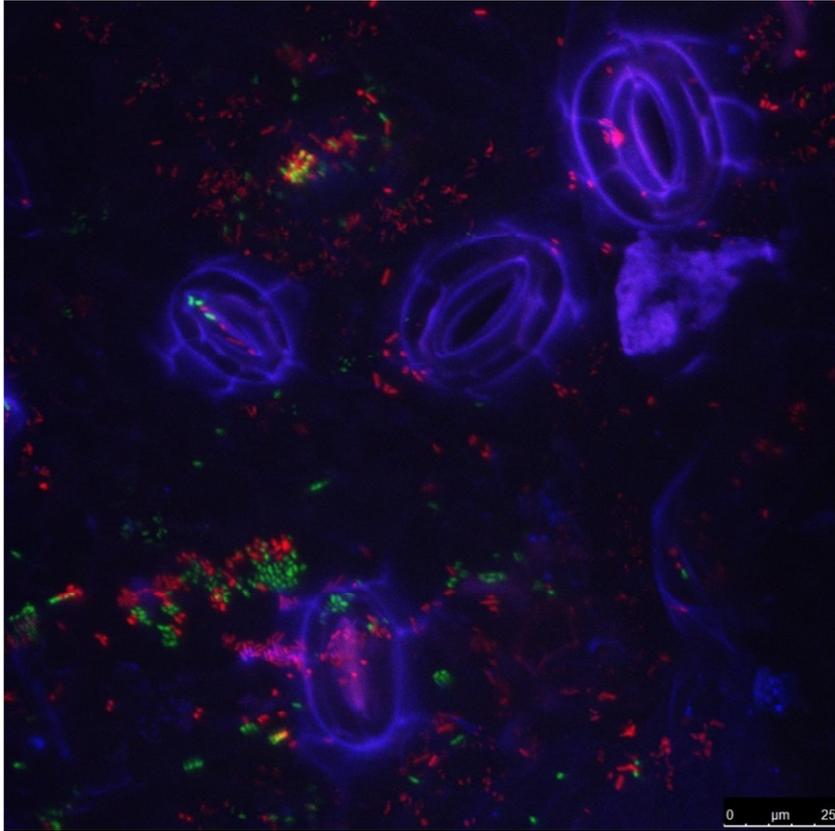


Abbildung 81: Besiedelung der Blattunterseite des ersten Laubblattes einer mit S13+GFP (grün dargestellt) und 3Rp8+DsRed2 (rot dargestellt) geimpften Pflanze, gewachsen unter sterilen Bedingungen in einem Keimfilter.

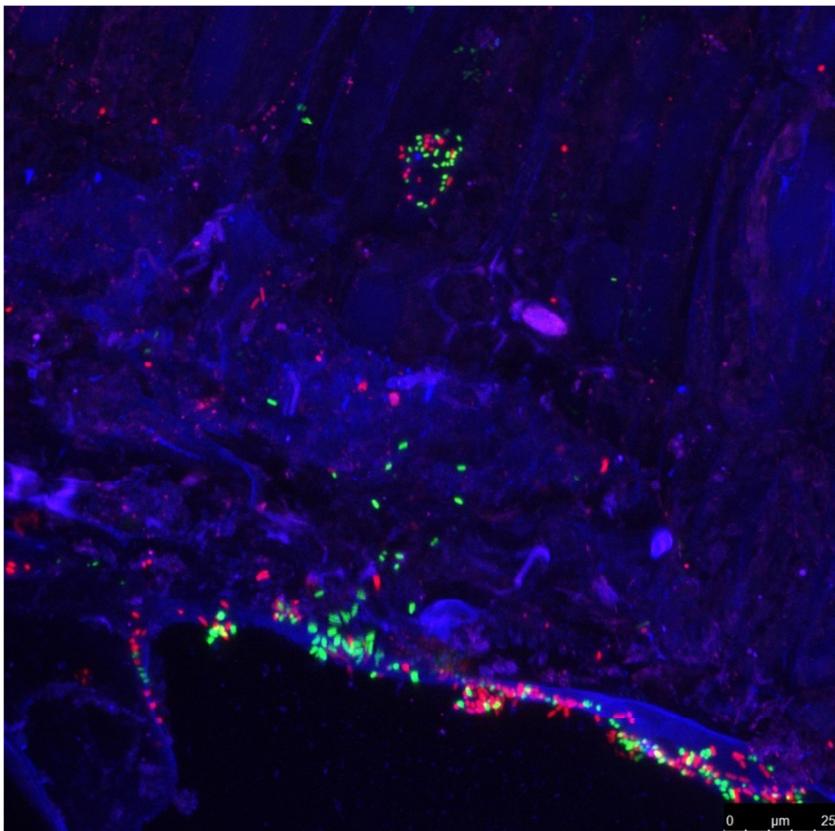


Abbildung 82: Blattquerschnitt des Keimblattes einer mit S13+GFP (grün dargestellt) und 3Rp8+DsRed2 (rot dargestellt) geimpften Pflanze, gewachsen unter sterilen Bedingungen in einem Keimfilter.

3.4.2 Mikroskopie der Transportversuche

Zur Absicherung der Bio-Rad-Ergebnisse wurde auch Platten und Material aus den Transportversuchen mit dem Motic AE31-Mikroskop sowie mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie überprüft. Bei den Platten mit Luftspalt wurde, wie in Abbildung 83 beispielsweise gezeigt, festgestellt, dass *S. plymuthica* Zellen den Agar-freien Boden der Petrischalen nur dann besiedelten, wenn dieser stark mit Myzel bewachsen war. Zum Teil wurde auch eine Besiedelung entlang einzelner Hyphen sichtbar. Bei Negativkontrollen ohne Pilzpartner wurde der Agar-freie Boden der Petrischalen nie besiedelt.

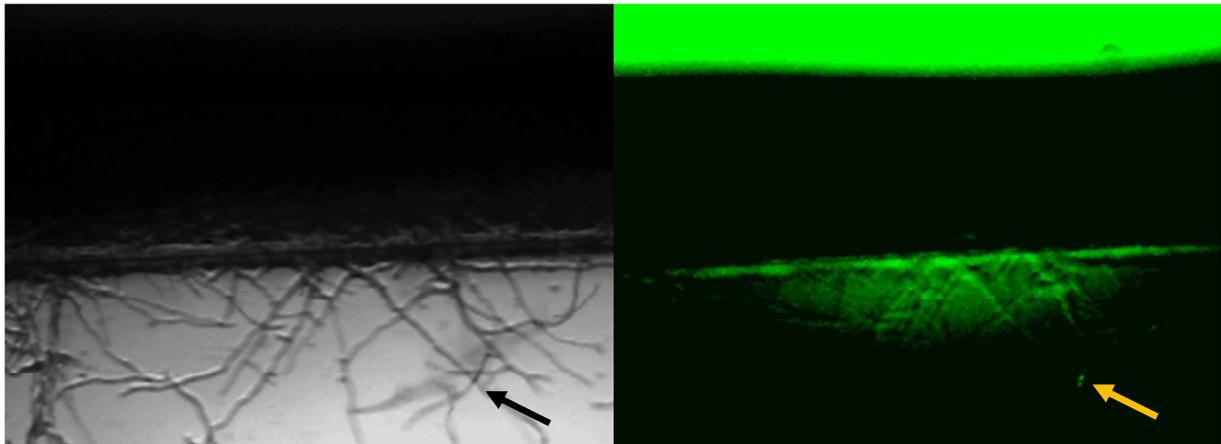


Abbildung 83: Motic AE31-Bild eines Transportversuches mit G1/8 und S13+GFP. Derselbe Bildausschnitt einmal im Durchlicht (links) und mit GFP-Filter (rechts): der stark grün fluoreszierende Bereich rechts oben zeigt eine dichte Besiedelung der Oberfläche des Waksman-Agars, der schwarze Bereich in der Bildmitte ist die Schnittfläche des Agar-Stücks, und der schwächer grün fluoreszierende Bereiche in der unteren Bildhälfte zeigt die Besiedelung des Agar-freien Bodens der Petrischale mit S13+GFP sowie die Besiedelung entlang einer Hyphe (gelber Pfeil).

Eine Überprüfung von aus den Luftspalten entnommenen Myzelien mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie zeigte durchwegs eine lockere Besiedelung der Hyphen mit den *S. plymuthica* Stämmen.

Ergebnisse

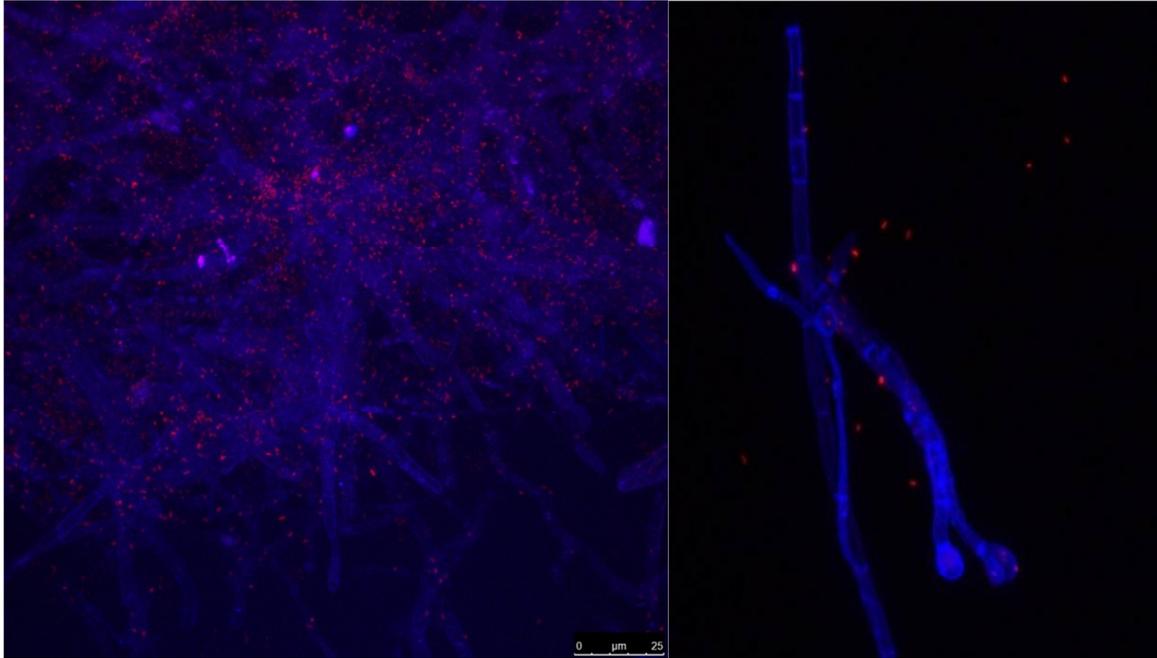


Abbildung 84: Aus einem Luftspalt entnommenes Myzel von G1/8, welches locker mit 3Rp8-DsRed2 besiedelt ist.

Auch wurden in den Agar eingebetteten Hyphen gefunden, welche mit bakteriellen Stämmen ummantelt waren, wie beispielsweise in Abbildung 85 gezeigt.

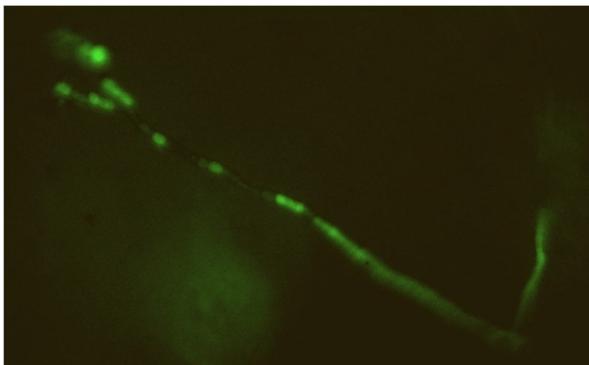


Foto: Kathrin Hölzl, BSc

Abbildung 85: Hyphe von GL1 in Waksman-Agar, welche mit 3Re4-18-ZsYellow (grün dargestellt) ummantelt ist.

Ein möglicherweise für den Transport-Effekt verantwortlicher Mechanismus könnte die Bildung von Wassertropfen beziehungsweise von Wasserfilmen entlang von Hyphen sein, welche von den Bakterien als Migrationshilfe verwendet werden könnten. So zeigt Abbildung 86 beispielsweise in den Luftspalt hineinragende GL1-Hyphen, welche mit Wassertropfen beziehungsweise einem Wasserfilm überzogen sind.

Ergebnisse

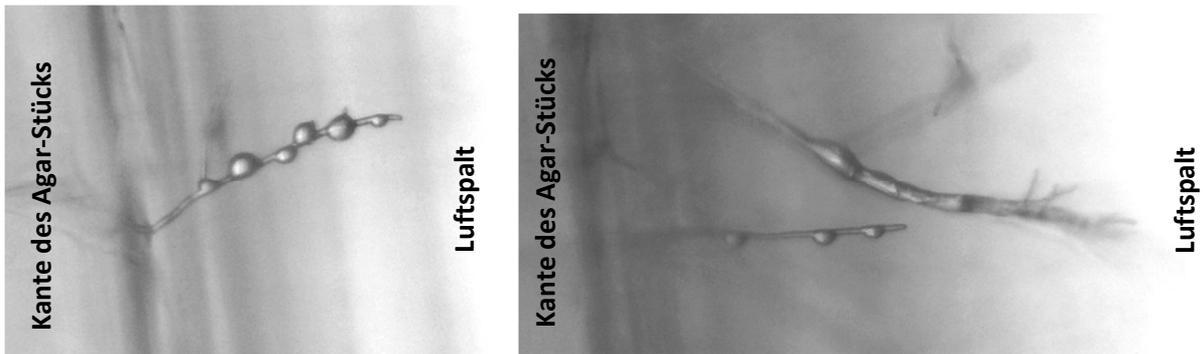


Abbildung 86: Luftmyzel von GL1 mit mehreren Wassertropfen (links) beziehungsweise einem Wasserfilm (rechts).

Da zur Charakterisierung von Pilzisolaten nach wie vor auch morphologische Merkmale herangezogen werden, sollen in Abbildung 87 und Abbildung 88 die Konidiophoren des Isolates G1/8 sowie Asci des GL1-Isolates gezeigt werden

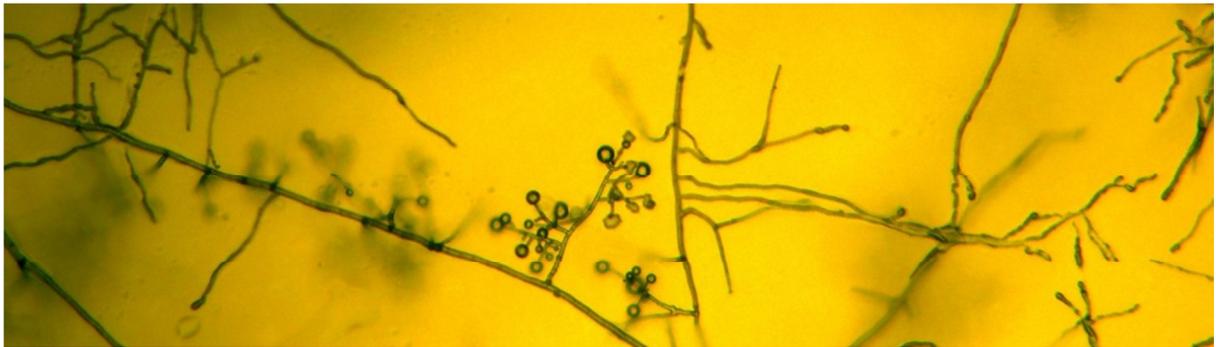


Abbildung 87: Luftmyzel von *Trichoderma velutinum* G1/8 mit Konidiophoren mit mehreren Phialiden in der Bildmitte.

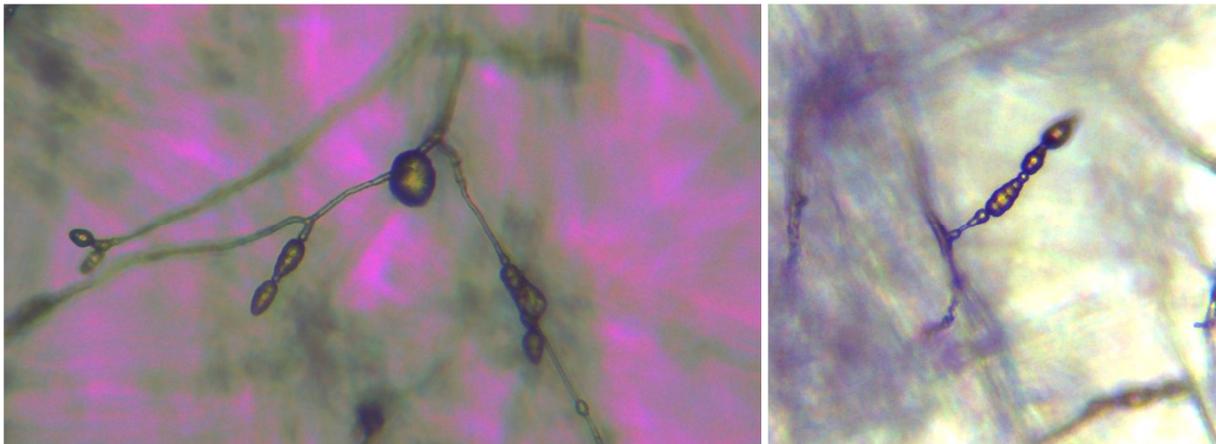


Abbildung 88: Luftmyzel von *Didymella bryoniae* GL1 mit Asci.

3.5 *In silico* Analyse der *Serratia plymuthica* Stämme

Genom-Sequenzierung und Assemblierung

Die Sequenzierung mit PacBio RSII Technologie wurde erfolgreich abgeschlossen und die *de novo* Genom-Assemblierung mit dem Celera Assembler und dem „Hierarchical genome assembly process v. 2.2.0“ erzielte bei *S. plymuthica* 3Rp8 ein Genome Coverage von 81x und bei *S. plymuthica* 3Re4-18 ein Genome Coverage von 110x.

3.5.1.1 NCBI Veröffentlichung und Annotationen

Das Bioprojekt und die Biosamples wurden wie im Folgenden angegeben in NCBI erfasst:

Bioproject PRJNA289082 - *Serratia plymuthica* genome sequencing (TaxId: 82996)

Submitter:	Eveline Adam/eveline.adam@gmx.at
Submitting organization:	Graz University of Technology
Description:	The <i>Serratia plymuthica</i> strains are applied as biological control agents for seed treatments. The isolates were sequenced to reveal genetic features responsible for their plant growth promoting effects and the ability to protect seeds against fungal threats during germination.
Relevance:	Agricultural
Grant ID:	836466
Agency:	Austrian Research Promotion Agency
Abbr.	FFG
Title:	Novel biotechnological processes for seed and root applications
Sample scope:	Multiisolate
Target description:	complete genome sequence of 2 biocontrol strains with strong plant growth promoting abilities and antagonistic effects against fungal pathogens
Organism name (taxid):	<i>Serratia plymuthica</i> (82996@serratia plymuthica@82996)
Locus tag prefix:	Autogenerate
Publications	
PubMed	12089011
PubMed	16329870

Biosamples

Für die Eingabe der Daten in NCBI wurde für beide Stämme das Package „MIGS: cultured bacteria/archaea, plant-associated; version 4.0“ verwendet und die Umweltdaten mit ‚agricultural site‘ (Biom), ‚field‘ (Feature) und ‚organic material‘ (Material) erfasst. Alle weiteren Details wurden wie im Folgenden angegeben erfasst:

Ergebnisse

Biosample SAMN03841799

Sample name	<i>Serratia plymuthica</i> 3Rp8
Collection date	1998
Geographic location	Germany: Braunschweig
Host	<i>Brassica napus</i>
Isolation and growth conditions	11571180
Latitude longitude	52.27 N 10.57 E
Reference for biomaterial	12089011

Biosample SAMN03841798

Sample name	<i>Serratia plymuthica</i> 3Re4-18
Collection date	2001
Geographic location	Germany: Bonn
Host	<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Cilena
Isolation and growth conditions	12455609
Latitude longitude	50.72 N 7.09 E
Reference for biomaterial	16329870

Die Sequin-Dateien wurden erfolgreich bei NCBI eingereicht. Die Köpfe der daraus resultierenden Genbank-Files von *S. plymuthica* 3Rp8 und 3Re4-18 sind im Folgenden dargestellt.

Kopf des Genbank-Files von *S. plymuthica* 3Rp8

LOCUS	CP012096	5546041 bp	DNA	circular	BCT 20-JUL-2015
DEFINITION	<i>Serratia plymuthica</i> strain 3Rp8, complete genome.				
ACCESSION	CP012096				
VERSION	CP012096				
DBLINK	BioProject: PRJNA289082 BioSample: SAMN03841799				
KEYWORDS	.				
SOURCE	<i>Serratia plymuthica</i>				
ORGANISM	<i>Serratia plymuthica</i> Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; <i>Serratia</i> .				
REFERENCE	1 (bases 1 to 5546041)				
AUTHORS	Adam,E., Mueller,H. and Berg,G.				
TITLE	Complete Genome Sequence of <i>Serratia plymuthica</i> Strain 3Rp8, a rhizosphere Bacterium with Antagonistic Activity toward Plant Pathogens and Plant Growth Promoting Abilities				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 5546041)				
AUTHORS	Adam,E., Mueller,H. and Berg,G.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (14-JUL-2015) Institute of Environmental Biotechnology, Graz University of Technology, Petersgasse 12, Graz 8010, Austria				
COMMENT	LocalID: 3Rp8 FileID: 3Rp8.sqn/3Rp8 Source bacteria deposited in the Strain Collection of Antagonistic Microorganisms at Graz University of Technology, Institute for Environmental Biotechnology, Austria.				

Ergebnisse

Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be found here: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##

Assembly Method :: Hierarchical genome assembly process v. 2.2.0
Genome Coverage :: 81x
Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##

Annotation Provider :: NCBI
Annotation Date :: 07/15/2015 10:01:16
Annotation Pipeline :: NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline
Annotation Method :: Best-placed reference protein set;
GeneMarkS+
Annotation Software revision :: 2.10
Features Annotated :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA; repeat_region
Genes :: 5,130
CDS :: 4,954
Pseudo Genes :: 68
rRNAs :: 22 (5S, 16S, 23S)
tRNAs :: 85
ncRNA :: 1
Frameshifted Genes :: 21
##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES

	Location/Qualifiers
Source	1..5546041 /organism="Serratia plymuthica" /mol_type="genomic DNA" /strain="3Rp8" /isolation_source="organic material" /host="Brassica napus" /db_xref="taxon:82996" /country="Germany: Braunschweig" /lat_lon="52.27 N 10.57 E" /collection_date="1998"
gene	complement(27..503) /locus_tag="ADP72_00005"
CDS	complement(27..503) /locus_tag="ADP72_00005" /inference="EXISTENCE: similar to AA sequence:RefSeq:WP_004943607.1" /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology." /codon_start=1 /transl_table=11 /product="hypothetical protein" /protein_id="PRJNA289082:ADP72_00005" /translation="MKKFLLLVCLPLLPVAAQADVSIDINVPGVSVHLGDQDRRGYYWDGYDWR PPQWWHAHQGRGMGERNNHGMYYWDGGRWQPKPPPGYEHGRPDRDGNPFRGERDNH DNGNRHDNGGRDNGRNGQGGRSNDQGRGNDNGRNGHNGEPYPPNGNGPRP"

Kopf des Genbank-Files von *S. plymuthica* 3Re4-18

LOCUS CP012097 5439574 bp DNA circular BCT 20-JUL-2015
 DEFINITION *Serratia plymuthica* strain 3Re4-18, complete genome.
 ACCESSION CP012097
 VERSION CP012097
 DBLINK BioProject: PRJNA289082
 BioSample: SAMN03841798
 KEYWORDS .
 SOURCE *Serratia plymuthica*
 ORGANISM *Serratia plymuthica*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
 Enterobacteriaceae; *Serratia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5439574)
 AUTHORS Adam,E., Mueller,H. and Berg,G.
 TITLE Complete Genome Sequence of *Serratia plymuthica* Strain 3Re4-18, an
 endophytic Bacterium with Antagonistic Activity toward Plant
 Pathogens and Plant Growth Promoting Abilities
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 5439574)
 AUTHORS Adam,E., Mueller,H. and Berg,G.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-JUL-2015) Institute of Environmental Biotechnology,
 Graz University of Technology, Petersgasse 12, Graz 8010, Austria
 COMMENT LocalID: 3Re4-18
 FileID: 3Re418.sqn/3Re4-18
 Source bacteria deposited in the Strain Collection of Antagonistic
 Microorganisms at Graz University of Technology, Institute for
 Environmental Biotechnology, Austria.
 Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
 Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be
 found here: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: Hierarchical genome assembly process v. 2.2.0
 Genome Coverage :: 110x
 Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
 Annotation Provider :: NCBI
 Annotation Date :: 07/15/2015 09:49:50
 Annotation Pipeline :: NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline
 Annotation Method :: Best-placed reference protein set;
 GeneMarkS+
 Annotation Software revision :: 2.10
 Features Annotated :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA; repeat_region
 Genes :: 5,005
 CDS :: 4,845
 Pseudo Genes :: 51
 rRNAs :: 22 (5S, 16S, 23S)
 tRNAs :: 86
 ncRNA :: 1

Ergebnisse

Frameshifted Genes :: 19
##Genome-Annotation-Data-END##

```
FEATURES             Location/Qualifiers
  Source              1..5439574
                     /organism="Serratia plymuthica"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="3Re4-18"
                     /isolation_source="organic material"
                     /host="Solanum tuberosum L. cv. Cilena"
                     /db_xref="taxon:82996"
                     /country="Germany: Bonn"
                     /lat_lon="50.72 N 7.09 E"
                     /collection_date="2001"
  gene                join(5439557..5439574,1..678)
                     /locus_tag="ADP73_00005"
  CDS                 join(5439557..5439574,1..678)
                     /locus_tag="ADP73_00005"
                     /EC_number="2.1.1.34"
                     /inference="EXISTENCE: similar to AA
                     sequence:RefSeq:WP_004953390.1"
                     /note="specifically modifies tRNA at position G18; Derived
                     by automated computational analysis using gene prediction
                     method: Protein Homology."
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="tRNA guanosine-2'-O-methyltransferase"
                     /protein_id="PRJNA289082:ADP73_00005"
                     /translation="MSPERYARICEMLATRQPDLTVCLEQVHKPHNVSAIIRTADAVGVHQQVHAV
                     WPTSRMRTLVSAAAGSNSWVNVKTHRTISDAVTHLKDQGMQILATHLSARAVDFREVDYTR
                     PTCVLLGQEKGTGITEEALALADQDIIPMIGMVQSLNVSVASALILYEAQRQRHNAGMYLRTRS
                     ALDEEEQQRLLFEGGYPVLANVAKRKRGLPRPQIDQQGQVVADA EW WATMQATVRR"
```

Die vollständigen Genbank-Files inklusive aller Annotationen werden unter den oben angegebenen Akzessionsnummern spätestens mit 8. Juli 2016 in NCBI veröffentlicht.

3.5.1.2 Blastn Alignments

Eine MegaBLAST-Suche (highly similar sequences) mit der gesamten *S. plymuthica* 3Rp8-Nukleotid-Sequenz sowie nur mit der 16S rDNA-Sequenz gegen die in NCBI veröffentlichten Daten ergab die in Tabelle 46 dargestellten Ergebnisse. Zum Vergleich mit der bis dahin ebenfalls unveröffentlichten Sequenz des 3Re4-18 wurden die beiden Sequenzen separat gegeneinander in einem blastn-Job abgeglichen.

Tabelle 46: Vergleich der genomischen Daten der *Serratia plymuthica* Stämme 3Rp8, 3Re4-18, S13 und 4Rx13

<i>S. plymuthica</i>	3Rp8	3Re4-18	S13	4Rx13	Plasmid P75 4Rx13
NCBI Akzessionsnr.	CP012096 unpubliziert	CP012096 unpubliziert	NC_021659.1 (CP006566.1)	NC_021591.1 (CP006250.1)	NC_021594.1 (CP006251.1)
bp Chromosom	5.546.041	5.439.574	5.467.306	5.328.010	75721
% GC-Gehalt (RAST)	56,07	56,24	56,20	56,25	48,17
NCBI Gene	5.130	5.005	5.013	4.931	57
NCBI CDS	4.954	4.845	4.868	4.724	57
BASys Gene identifiziert	5.825	5.624	5.675	5.427	102
BASys Gene annotiert	5.823	5.622	3.978	3.885	35
vollst. rRNAs	22	22	22	22	-
Zus. 5S rRNA	1	1	1	1	-
tRNA loci	85	86	85	81	-
Frameshifted genes	21	19	18	87	Keine Angabe
16S rRNA Identität NCBI	Referenz	100 %	99 %	99 %	-
Gesamtgenom Abdeckung NCBI	Referenz	94 %	95 %	87%	-
Identität NCBI	Referenz	99 %	99 %	99 %	-

Die Gesamtgenom-Abfrage zeigte eine Identität von 99 % für die Stämme 3Re4-18, S13 und 4Rx13 im Vergleich zu 3Rp8, jedoch eine geringere Abdeckung der Sequenzen von 94 %, 95 % und 87 %. Auch ein all-against-all-Vergleich mit Hilfe von Gegenees (Ågren, *et al.*, 2012) zeigte, wie in Tabelle 47 dargestellt, dass der Stamm 4Rx13 am weitesten von den anderen Stämmen abweicht.

Tabelle 47: All-against-all-Vergleich der genomischen Daten der *Serratia plymuthica* Stämme 3Rp8, 3Re4-18, S13 und 4Rx13 mit Gegenees

	3Rp8	3Re4-18	S13	4Rx13+P75
3Rp8	100	93	94	84
3Re4-18	94	100	95	86
S13	95	94	100	86
4Rx13+P75	86	87	87	100

3.5.1.3 BASys Annotationen und Darstellung

Die BASys-Daten werden, wie in Abbildung 89 beispielsweise gezeigt, grafisch auf der Weboberfläche aufbereitet. Alle Daten sind jedoch auch in den .ecard-Files enthalten und wurden aus diesen mittels eines Python-Skripts nach Excel importiert um dort als Zusatzinformation zu den in NCBI vorhandenen Annotationen zu dienen.

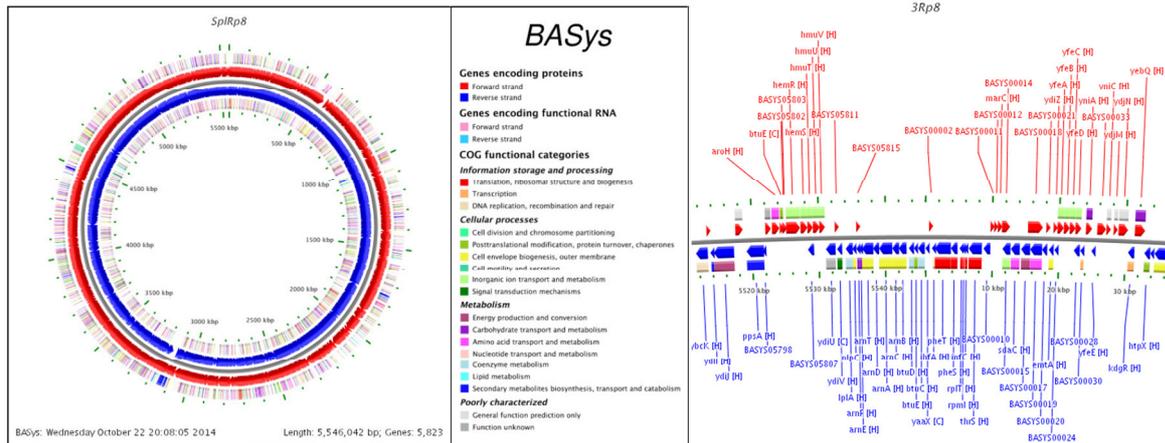


Abbildung 89: BASys-Übersicht und Detailausschnitt des Chromosoms des *S. plymuthica* Stammes 3Rp8.

3.5.1.4 Phylogenetische Analysen

3.5.1.4.1 Analysen der 16S rDNA

Es wurde ein Vergleich der 16S rDNA von 3Rp8, 3Re4-18, S13, 4Rx13 und 3Rp5 gegen ausgewählte weitere 16S-rDNA-Sequenzen in einem multiplen blastn-Alignment mit nachfolgender Darstellung im NCBI Tree Viewer 1.6 erstellt. Dieser verdeutlicht die phylogenetische Nähe der Stämme 3Rp8, 3Re4-18 und S13 sowie die nahe Verwandtschaft der beiden auf den Kürbis stark negativ wirkenden Stämme 4Rx13 und 3Rp5. Eine kreisförmige Darstellung dieser Berechnung ist in Abbildung 90 dargestellt.

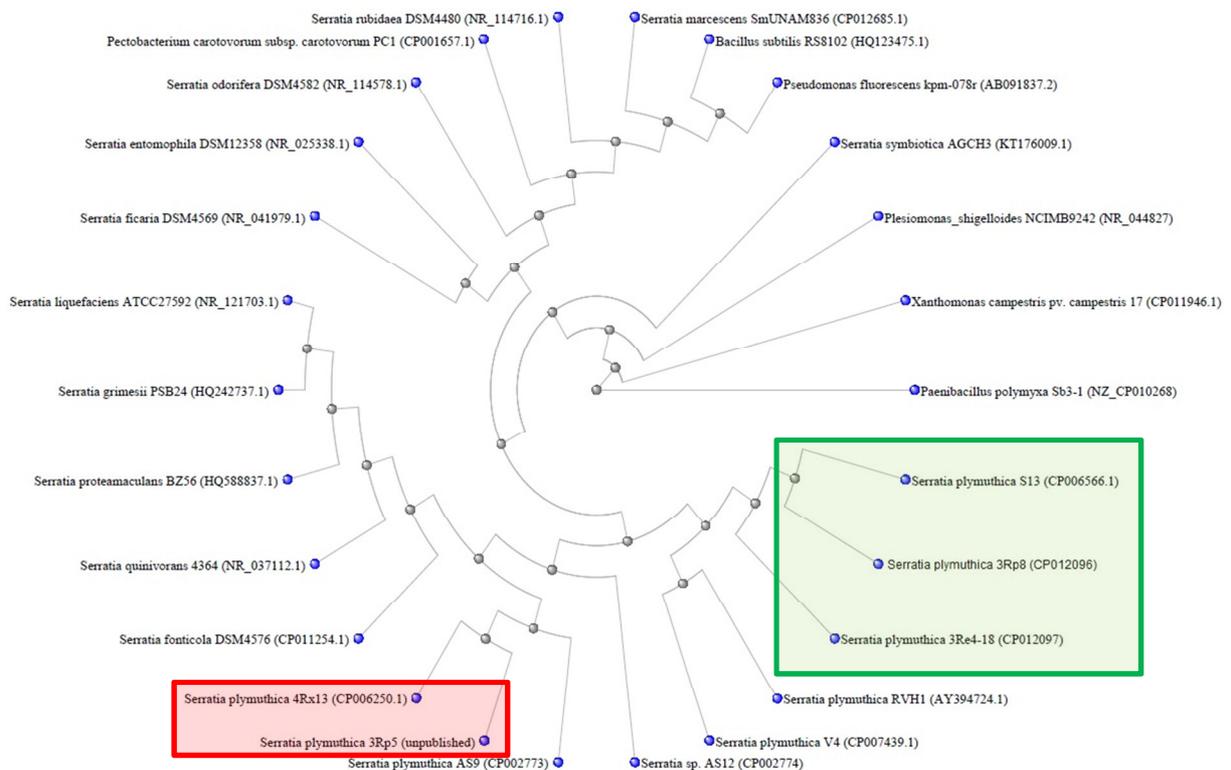


Abbildung 90: Mittels NCBI Tree Viewer 1.6 kreisförmig dargestellter, phylogenetischer Stammbaum auf Grundlage der 16S-rDNA ausgewählter Stämme. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind farblich eingefasst.

Ergebnisse

Eine Analyse der selben 16S-rDNA-Sequenzen in MegaV7 auf Grundlage eines ClustalW Alignments mit 100 Bootstrap-Wiederholungen ergab sehr ähnliche Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 91.

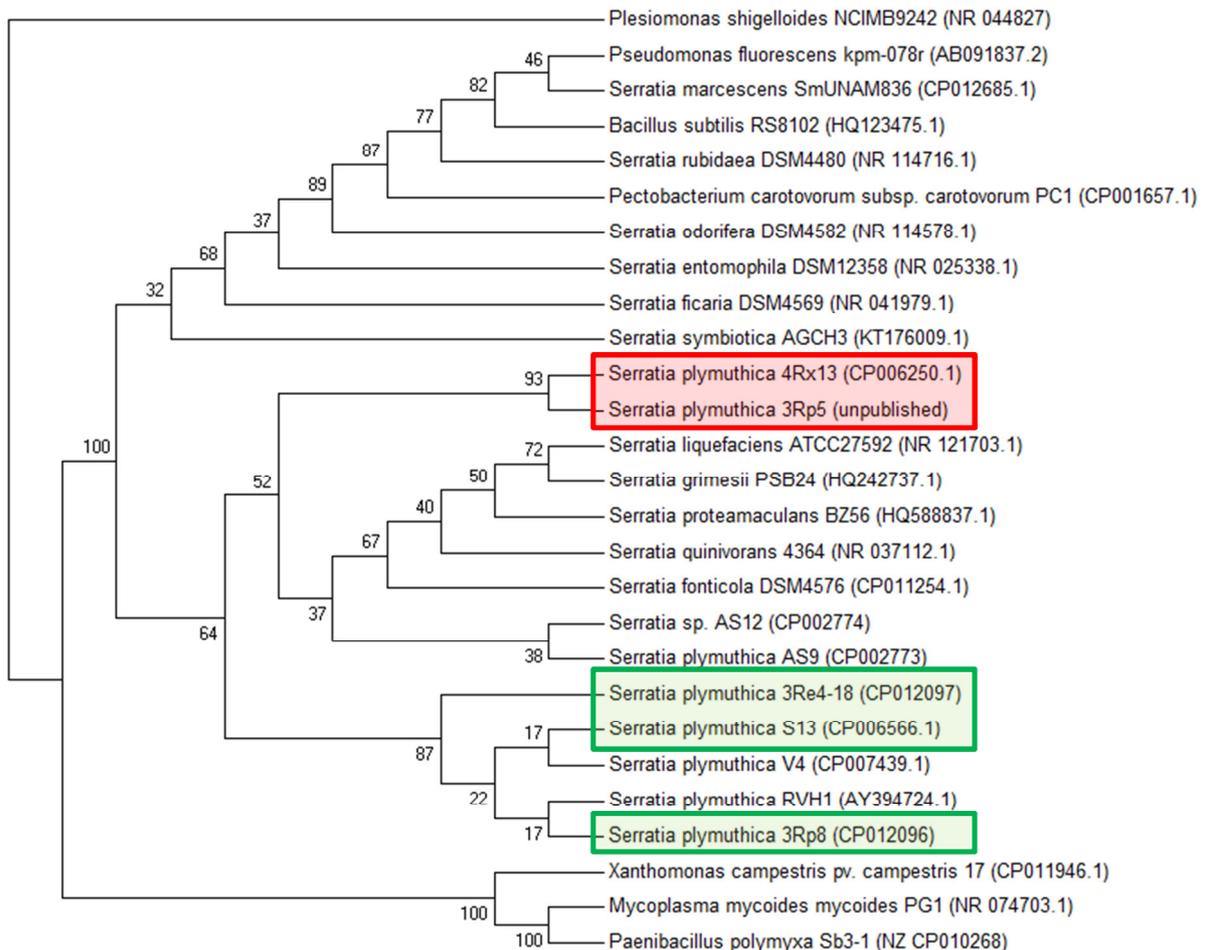


Abbildung 91: Bootstrap consensus Baum einer molekularen phylogenetischen Analyse der 16S rDNA mittels der Maximum Likelihood Methode, basierend auf dem Tamura-Nei Model (Tamura & Nei, 1993), berechnet in MEGA7 (Kumar, *et al.*, 2015). Der bootstrap consensus Baum wurde von 100 Wiederholungen abgeleitet (Felsenstein, 1985). Zweige, die zu Partitionen gehören welche in weniger als 50 % der bootstrap Wiederholungen reproduziert wurden, wurden zusammengelegt. Der Prozentsatz von wiederholten Bäumen, in welchen die assoziierten Taxa in dem bootstrap Test (100 Wiederholungen) zusammengefasst wurden, wird neben den Zweigen angezeigt (Felsenstein, 1985). Der Ausgangsbaum für die heuristische Suche wurde automatisch durch die Anwendung von Neighbor-Join und BioNJ Algorithmen auf eine Matrix von paarweisen Distanzen erstellt, welche mit dem Maximum Composite Likelihood (MCL) Ansatz abgeschätzt wurden und einer anschließenden Auswahl der Topologie mit dem ranghöchsten logarithmischen likelihood Wert unterlagen. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind färbig eingefasst.

Für den Stamm 3Rp5 lagen keine weiteren DNA-Sequenzen vor, weswegen dieser auf Grundlage der 16S rDNA-Analyse aufgrund seiner starken Verwandtschaft zu *S. plymuthica* 4Rx13 als ein Vertreter der *Serratia plymuthica*-Spezies eingeordnet wird.

3.5.1.4.2 Analyse des *gyrB*-Gens

Phylogenetische Analysen basierend auf dem *Gyrase B*-Gen sind für sehr nah verwandte Spezies zuverlässiger als 16S rDNA basierende Analysen. Die Nutzung der *gyrB*-Sequenz wurde bereits für die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse unter *Serratia*-Stämmen beschrieben (Dauga, 2002), (Van Houdt, *et al.*, 2005) und wurde daher auch in dieser Arbeit mit den in Tabelle 48 angegebenen Sequenzen angewendet.

Tabelle 48: Gen-Bezeichnungen und -Position der für die phylogenetische Analyse verwendeten *gyrB*-DNA-Sequenzen

Stamm	Gen-Bezeichnung	Gen-Position <i>gyrB</i>
<i>Serratia plymuthica</i> RVH1	AY787168 DNA gyrase B subunit (<i>gyrB</i>) gene	4590 - 5500
<i>Serratia plymuthica</i> 3Rp8	gene <i>gyrB</i>	2282544 – 2284958 (complement)
<i>Serratia plymuthica</i> 3Re4-18	gene <i>gyrB</i>	86564 - 88978 (complement)
<i>Serratia plymuthica</i> S13	M621_RS25180 <i>gyrB</i> DNA gyrase subunit B	3928 - 6342 (forward)
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	SOD_RS00020 <i>gyrB</i> DNA gyrase subunit B	3857 - 6271 (forward)
<i>Serratia plymuthica</i> V4	AHY05051 DNA gyrase subunit B	52510 - 53421

Eine Analyse der *gyrB*-Sequenzen in MegaV7 auf Grundlage eines ClustalW Alignments mit 100 Bootstrap-Wiederholungen ergab den in Abbildung 92 dargestellten phylogenetischen Stammbaum.

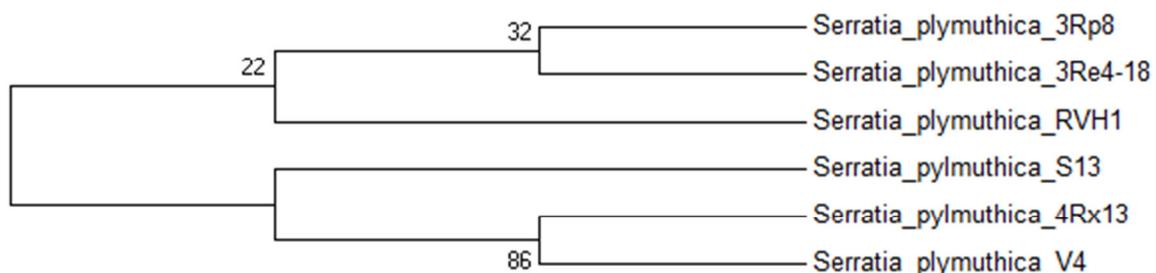


Abbildung 92: Molekulare phylogenetische Analyse des *gyrB*-Gens mittels der Maximum Likelihood Methode, basierend auf dem Tamura-Nei Model (Tamura & Nei, 1993), berechnet in MEGA7 (Kumar, *et al.*, 2015). Der bootstrap consensus Baum wurde von 100 Wiederholungen abgeleitet (Felsenstein, 1985). Zweige, die zu Partitionen gehören welche in weniger als 50 % der bootstrap Wiederholungen reproduziert wurden, wurden zusammengelegt. Der Prozentsatz von wiederholten Bäumen, in welchen die assoziierten Taxa in dem bootstrap Test (100 Wiederholungen) zusammengefasst wurden, wird neben den Zweigen angezeigt (Felsenstein, 1985). Der Ausgangsbaum für die heuristische Suche wurde automatisch durch die Anwendung von Neighbor-Join und BioNJ Algorithmen auf eine Matrix von paarweisen Distanzen erstellt, welche mit dem Maximum Composite Likelihood (MCL) Ansatz abgeschätzt wurden und einer anschließenden Auswahl der Topologie mit dem ranghöchsten logarithmischen likelihood Wert unterlagen.

3.5.1.4.3 Vergleich der Gesamtgenom Proteindaten mit CVTree3

Bei einem Vergleich der Protein-Daten der Stämme 3Rp8 und 3Re4-18 gegen in CVTree3 vorhandene Sequenzen zeigte sich, wie in Abbildung 93 ersichtlich, eine starke phylogenetische Verwandtschaft des Stammes 3Rp8 mit *S. plymuthica* S13 und eine Clusterbildung mit den anderen beiden betrachteten Stämme 4Rx13 und 3Re4-18, wobei der Stamm 3Re4-18 am weitesten von den anderen Stämmen entfernt liegt.

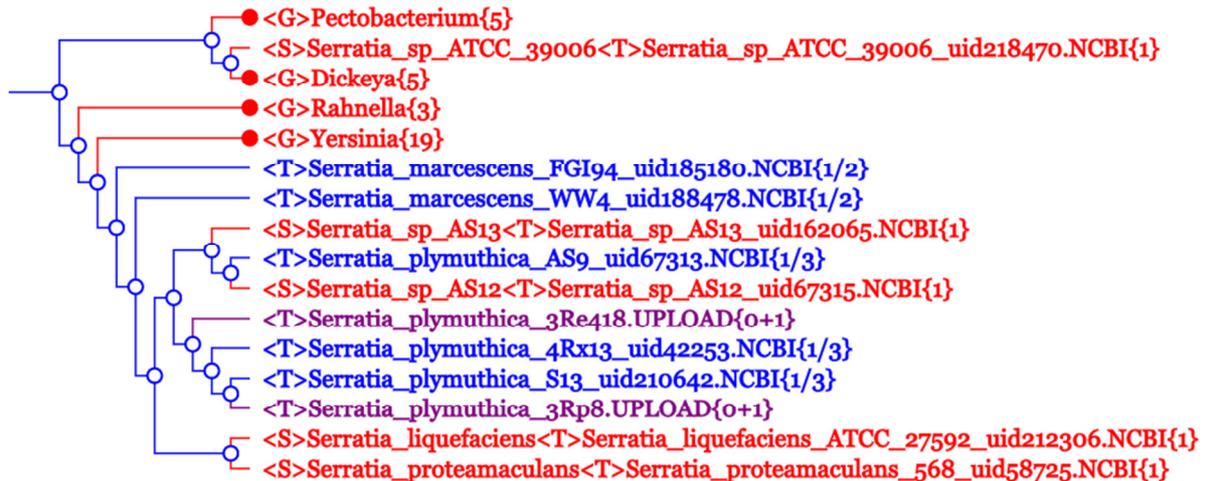


Abbildung 93: Phylogenetischer Vergleich der Gesamtgenome auf Grundlage der Protein-Daten mit Hilfe von CVTree3.

Aufgrund dieser Ergebnisse können sowohl 3Rp8 als auch 3Re4-18 eindeutig der Subspezies *Serratia plymuthica* zugeordnet werden.

3.5.1.5 Multiples Genom-Alignment mit Mauve

Für einen gut darstellbaren Genomvergleich mit den vorhandenen Nukleotid-Sequenzen von *S. plymuthica* S13 und 4Rx13 musste für die Sequenz des Stammes 3Rp8 ein Reverse Complement erstellt werden sowie anschließend die ursprüngliche Sequenz an Position 3257156 getrennt und der zweite Teil an erste Stelle der Sequenz gestellt werden. Die Sequenz des Stammes 3Re4-18 wurde an der ursprünglichen Position 85395 getrennt und der erste Teil an das Ende der Sequenz verschoben. Die DNA des P75-Plasmides von 4Rx13 wurde an das Ende des Chromosoms von 4Rx13 angehängt.

Ergebnisse

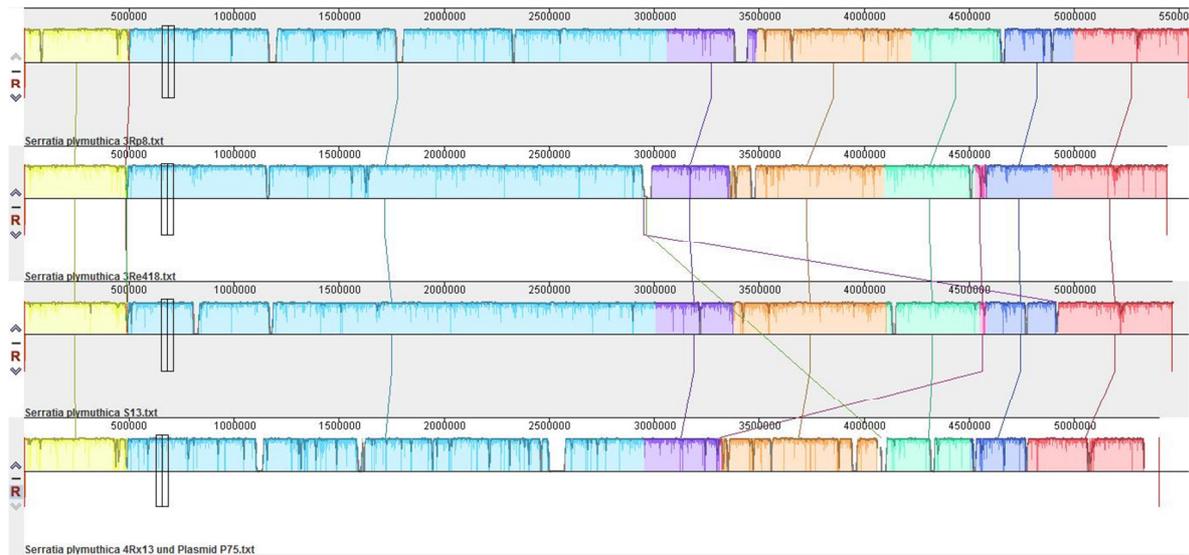


Abbildung 94: Vergleich der gesamten Nukleotid-Sequenzen von 3Rp8, 3Re4-18, S13 und 4Rx13 in Mauve.

Die farbige dargestellten Blöcke in Abbildung 94 stellen Locally Collinear Blocks (LCBs) dar, welche von Mauve als konservierte Segmente identifiziert wurden, die in sich frei von Genom-Rearrangements (Verschiebung oder Invertierung orthologer Regionen durch Rekombination relativ zu einem anderen Genom) sind. Innerhalb der vier Genome fand mit Ausnahme einer Region von Transporterproteinen in 4Rx13 (dargestellt in Abbildung 95) keine Verschiebung größerer LCBs statt.

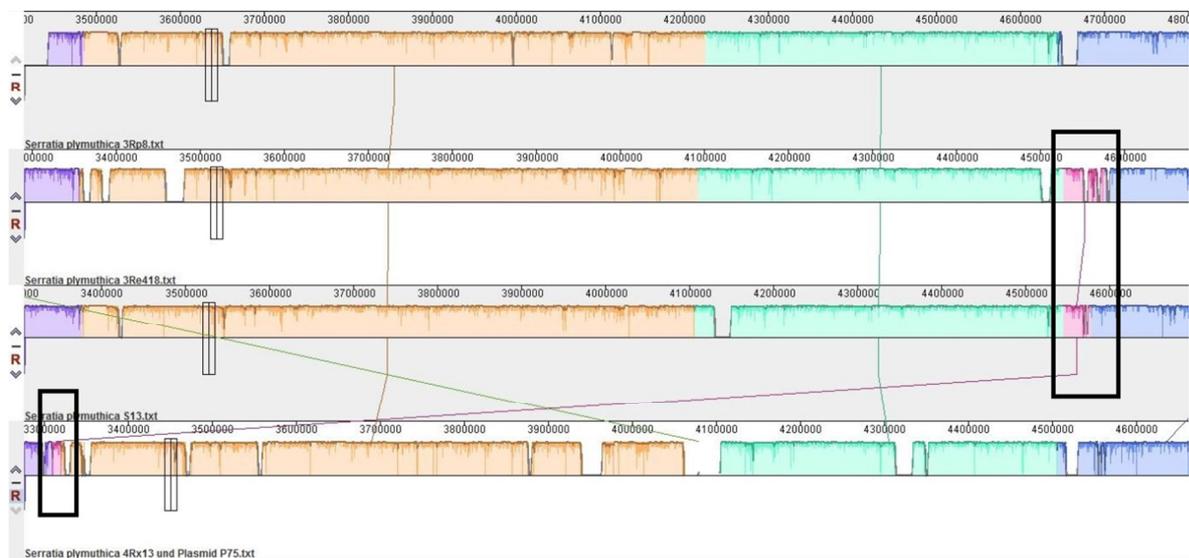


Abbildung 95: Verschiebung eines Locally Collinear Blocks in 4Rx13 im Vergleich zu 3Re4-18 und S13.

Von besonderem Interesse bei Genomvergleichen sind die in einem Stamm im Vergleich zu den anderen einzigartigen Gene, welche sich in Mauve als leere Bereiche zwischen ansonsten zueinander ausgerichteten Blöcken darstellen. Abbildung 96 zeigt beispielsweise einen im Vergleich zu den anderen drei Genomen nur in 3Rp8 vorkommenden Bereich um ein Typ VI Sekretions-System.

Ergebnisse



Abbildung 96: Typ VI Sekretionssystem in 3Rp8 ohne Entsprechung in 3Re4-18, S13 und 4Rx13, dargestellt in Mauve.

Viele für einen Stamm spezifische Gene liegen in Regionen, welche vermutlich aus Phagen übernommen wurden. Innerhalb der Phagen-Regionen finden sich jedoch wieder mit anderen Stämmen überlappende Gene, zum Beispiel der in Abbildung 97 eingeblendete Bereich in S13 (Position 4911741 bis 4912020), welcher ein phage tail assembly protein (NCBI-Annotation) darstellt und eine Entsprechung in 3Re4-18 hat. Eine BASys-Annotation eines spezifischen S13 Gens kurz downstream dieses Bereiches (Position 4913364 bis 4914407 - P21 prophage-derived major head protein) lässt ebenfalls auf einen Ursprung aus einem Prophagen schließen. Die in der Abbildung grün dargestellten Bereiche (Position 4078855 in 4Rx13) wurden von NCBI als Peptidase S14 annotiert und liegen in der Nähe eines „Probable lysozyme from lambdoid prophage DLP12“ Gens (BASys-Annotation) welche beide eine Entsprechung im Stamm 3Re4-18 aufweisen.

Ergebnisse

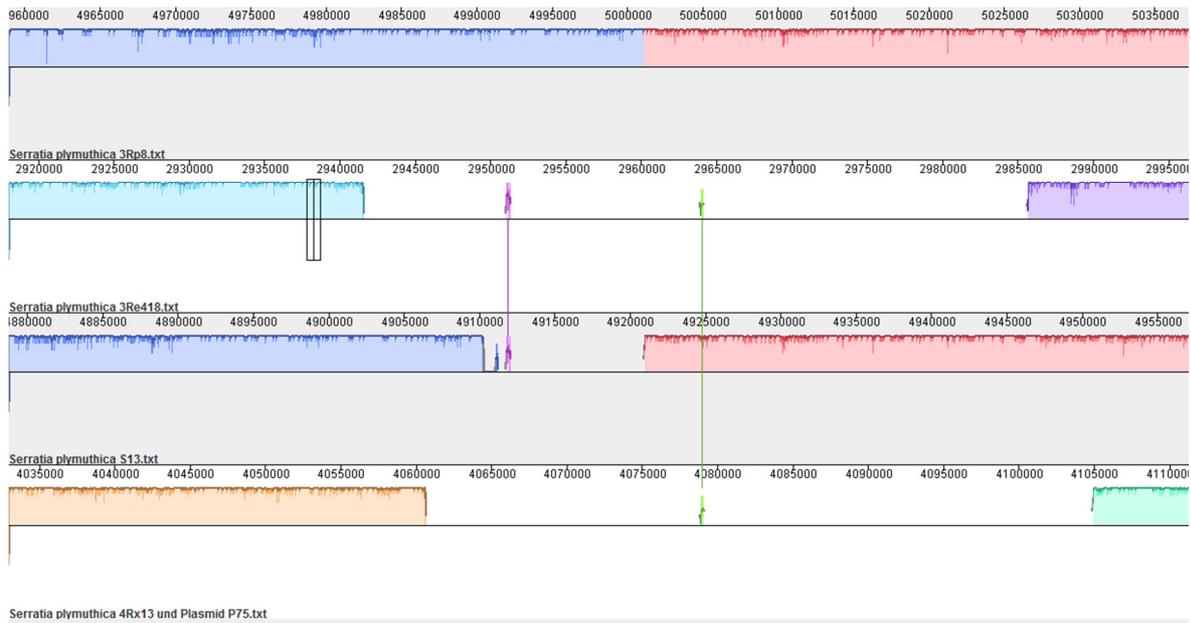


Abbildung 97: Regionen mit Phagen-Proteinen in den Stämmen 3Re4-18, S13 und 4Rx13, dargestellt in Mauve.

3.5.1.6 Vergleich der orthologen Gruppen mit OrthoMCL DB

Die mit Hilfe von OrthoMCL errechneten orthologen Gruppen sowie die in einem Stamm einzigartigen Gene sind in Abbildung 98 grafisch in Form eines erweiterten Venn-Diagramms aufbereitet.

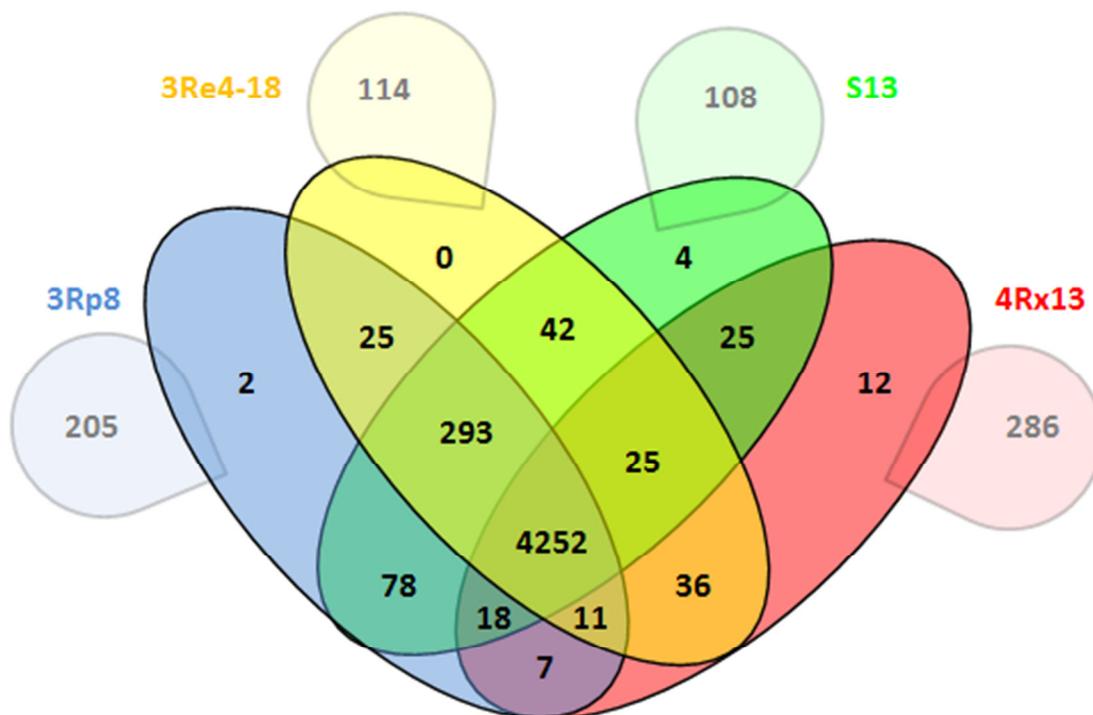


Abbildung 98: Venn-Diagramm der orthologen Gruppen (dunklere Flächen) sowie Darstellung der sonstigen, einzigartigen Gene eines Stammes (hellere Tropfen in den Randbereichen der Grafik) erstellt mit den Daten der OrthoMCL-Analyse.

Ergebnisse

Allen vier Genomen ist ein Core von 4252 orthologen Genclustern gemeinsam. Zu beachten ist weiters, dass den zwei positiv auf den Kürbis wirkenden Stämmen 3Rp8 und S13 sowie dem neutral wirkenden Stamm 3Re4-18 weitere 293 orthologe Gencluster gemeinsam sind, welche nicht in dem stark negativ auf den Kürbis wirkenden Stamm 4Rx13 vorkommen. Dieser Stamm hat wiederum zwölf einzigartige Gencluster sowie 286 einzigartige Gene, welche in keinem der anderen Stämme aufscheinen. Auch der besonders positiv wirkende Stamm 3Rp8 weist zwei einzigartige orthologe Gencluster sowie 205 einzigartige Gene auf.

In den annotierten Genen wurde nach bekannten Biokontrollfunktionen gesucht und die in Tabelle 49 angegebenen Gencluster gezählt. Es sind keine besonders ausgeprägten Unterschiede zwischen den vier Stämmen aufgrund dieser Analyse erkennbar.

Tabelle 49: Vorkommen bekannter Biokontrollfunktionen in den *Serratia plymuthica* Stämmen. Die in den Spalten angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der Gencluster der angegebenen Funktion

Gene, vermutlich involviert in	3Rp8	3Re4-18	S13	4Rx13
pilzliche Zellwanddegradation				
Chitinasen	5	5	4	6
sekretierte Proteasen	4	5	5	4
Glucanasen	2	2	2	2
nichtribosomale Peptid-Synthetasen	3	3	3	2
Polyketid-Synthase Gencluster	2	2	2	2
osmolytischen Schutz				
Trehalose-P-Synthase	1	1	1	1
iron scavenging siderophores	1	1	1	1
Pflanzenwachstumsförderung				
Spermidine Synthase	2 (14)	2 (14)	2 (17)	2 (17)
indole-3-pyruvat Decarboxylase (IAA-Produktion)	2	2	2	2
Diacetyl reductase (S-Acetoin Bildung → 2, 3-Butanediol)	1	1	1	1

Im Stamm 3Rp8 wurden jedoch zwei besonders interessante Regionen unter den einzigartigen Genen gefunden, welche im Folgenden genauer dargestellt werden. Zum einen handelt es sich um die Region von den Genen ADP72_14810 bis ADP72_14885 (Gen-Position: 3168418 – 3186524). Das darin enthaltene Gen ADP72_14855 wurde beispielsweise in NCBI als „amino acid adenylation protein“ und in BASys als „Plipastatin synthase subunit B“ annotiert. Plipastatin wird als starkes antifungales Metabolit von *Bacillus subtilis* beschrieben (Batool, *et al.*, 2011). Eine NCBI blastn-Suche nach weniger ähnlichen Genen (discontiguous megablast) mit der DNA-Sequenz ergab das in

Ergebnisse

Abbildung 99 dargestellte Resultat, wonach die größte Ähnlichkeit mit einem Genomsegment von *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 besteht.

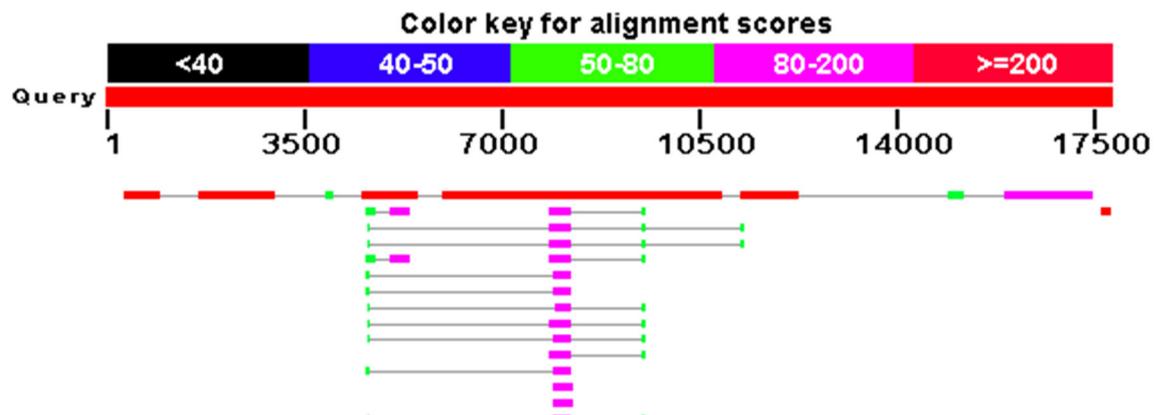


Abbildung 99: Blastn-Suche mit der 3Rp8-Sequenz von Gen-Position 3168418 – 3186524. Die gesamte erste Treffer-Zeile bezieht sich auf Gensegmente von *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1.

Eine blastp-Suche mit der Protein-Sequenz ergab das in Abbildung 100 dargestellte Resultat, welches Treffer für Proteine aus verschiedenen *Serratia*-Stämmen zeigt.

Ergebnisse

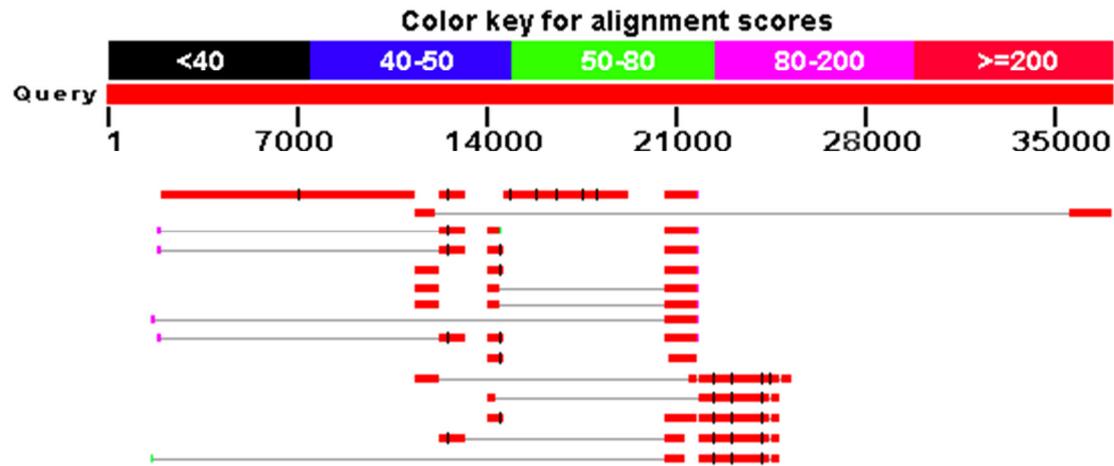


Abbildung 101: Blastn-Suche mit der 3Rp8-Sequenz von Position 4393243 – 4453753. Die erste lange Sequenz zeigt eine Ähnlichkeit zu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Sloterdijk str. ATCC 15791, die mittlere Sequenz zu einem *Shigella* sp. MO17 Plasmid pMO17_54 und die dargestellten kürzeren Sequenzen zu verschiedensten weiteren Organismen wie *Pectobacterium* sp. SCC3193, oder Plasmid pKPN-80a von *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain KPNH29.

Auch eine blastp-Abfrage dieser Region brachte zu den Proteinen Treffer für unterschiedlichste Organismen wie *Pectobacterium carotovorum*, *Salmonella enterica*, *Brenneria goodwinii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxtoca* und vielen weiteren, jedoch keinen *Serratia plymuthica* Stämmen.

3.5.1.7 Analyse genomischer Inseln mit IslandViewer 3

Die Analyse mit Hilfe des IslandViewer 3 zeigte, wie in Abbildung 102 ersichtlich, dass jedes der vier Genome mehrere genomische Inseln beherbergt.

Ergebnisse

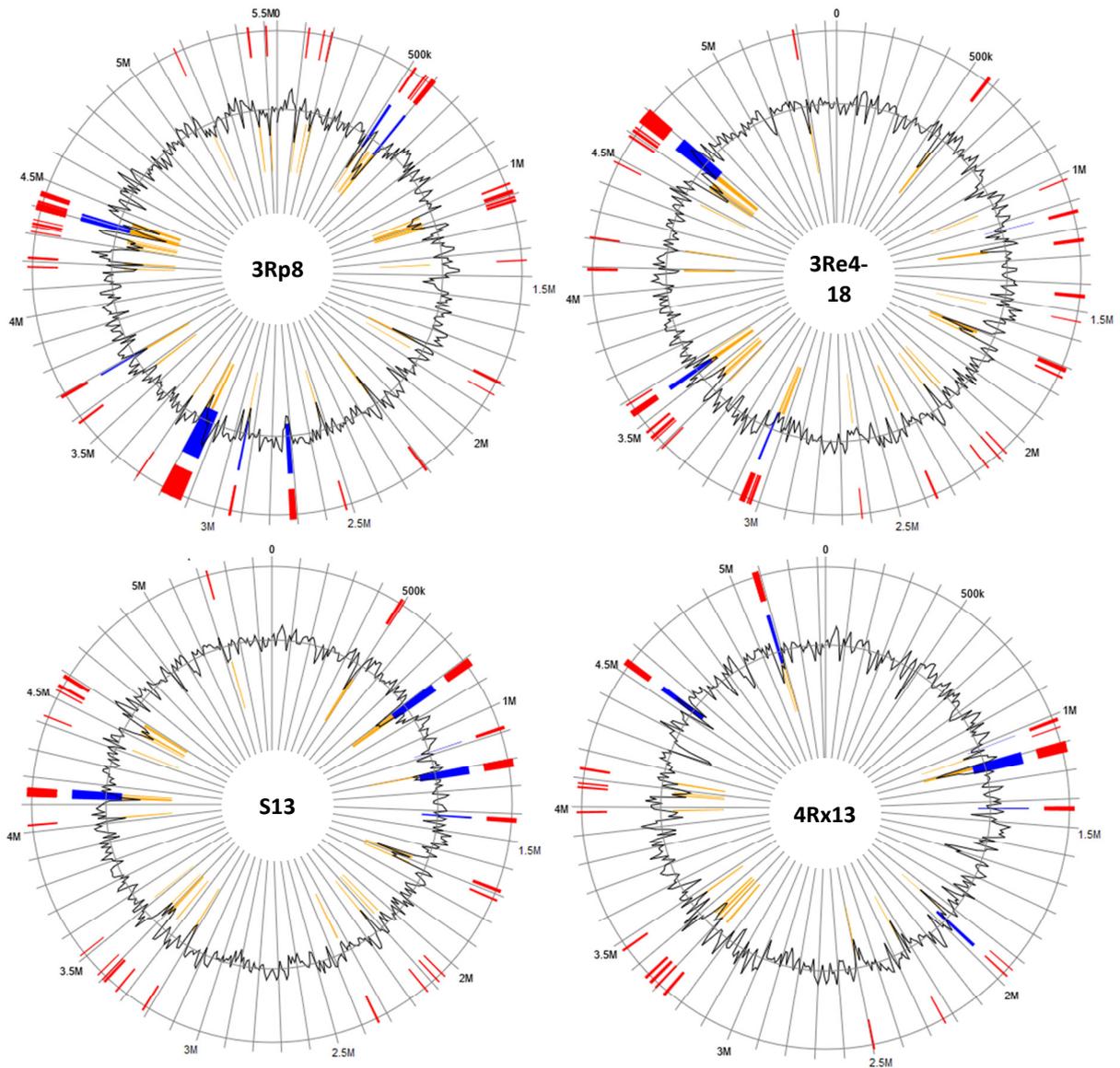


Abbildung 102: Grafische Auswertung der genomischen Inseln (färbig dargestellt) von *S. plymuthica* 3Rp8, 3Re4-18, S13 und 4Rx13 mit Hilfe des IslandViewer 3.

Tabelle 50 zeigt eine Auswahl an annotierten Genen von 3Rp8, welche von Island Viewer 3 als genomische Insel angegeben wurden, laut OrthoMCL nicht im Core der vier Genome vorkommen und nicht typische Phagen-Proteine sind. In den Spalten dahinter wird angegeben, ob diese Gene laut OrthoMCL-Analyse eine Entsprechung in einem oder zwei der anderen drei Genomen finden.

Tabelle 50: Auswahl annotierter Gene in genomische Inseln von 3Rp8 und Angabe über das Vorhandensein orthologer Cluster in 3Re4-18, S13 und 4Rx13; in der DNA-Sequenz nebeneinander liegende Gene, welche sich in einer gemeinsamen genomischen Insel befinden, sind mit derselben Farbe hinterlegt

Stamm/Gen	Ausgewählte Gene in 3Rp8	3Re4-18	S13	4Rx13
ADP72_00560	polysaccharide synthesis protein GtrA	+	+	-
ADP72_00565	glycosyltransferase	+	+	-
ADP72_00805	merozoite surface protein 3b	+	+	-
ADP72_00965	ligand-gated channel protein	+	+	-
ADP72_00970	ATPase	+	+	-
ADP72_02750	galactosyl transferase	+	+	-
ADP72_02755	glycosyl transferase family 2	+	+	-
ADP72_02760	UDP-galactopyranose mutase	+	+	-
ADP72_02765	glycosyl transferase	+	+	-
ADP72_02810	glycosyl transferase	-	+	-
ADP72_02895	glycosyl transferase	+	+	-
ADP72_05270	exonuclease	-	+	-
ADP72_05275	2-methylthioadenine synthetase	-	+	-
ADP72_05390	peptidase M15	-	-	-
ADP72_05485	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-	-	-
ADP72_05490	methyltransferase	-	-	-
ADP72_08625	restriction endonuclease	-	-	-
ADP72_08630	recF/RecN/SMC N terminal domain protein	-	-	-
ADP72_08635	XRE family transcriptional regulator	-	-	+
ADP72_08660	LuxR family transcriptional regulator	+	+	-
ADP72_08855	GCN5 family acetyltransferase	-	-	-
ADP72_08860	acetyltransferase	-	-	-
ADP72_08865	chloramphenicol acetyltransferase	-	-	-
ADP72_10560	ATP-dependent helicase	-	+	-
ADP72_10565	methyltransferase	-	+	-
ADP72_14695	beta-ketoacyl synthase	+	+	-
ADP72_14705	3-oxoacyl-ACP reductase	+	+	-
ADP72_14710	thioester reductase	+	+	-
ADP72_14715	amidohydrolase	+	+	-
ADP72_14735	condensation protein	+	+	-
ADP72_14740	ABC transporter ATP-binding protein	+	+	-
ADP72_14745	ABC transporter	+	+	-
ADP72_14770	PrnB	+	+	-
ADP72_14810	acyl carrier protein	-	-	-
ADP72_14825	acyl-CoA dehydrogenase	-	-	-
ADP72_14830	matE family protein	-	-	-
ADP72_14835	aminopeptidase	-	-	-
ADP72_14840	RND transporter	-	-	-
ADP72_14850	3-oxoacyl-ACP synthase	-	-	-
ADP72_14855	amino acid adenylation protein	-	-	-
ADP72_14880	3-oxoacyl-ACP synthase	-	-	-
ADP72_14890	diaminopimelate decarboxylase	+	+	-

Ergebnisse

Stamm/Gen	Ausgewählte Gene in 3Rp8	3Re4-18	S13	4Rx13
ADP72_14895	dienelactone hydrolase	+	+	-
ADP72_14935	Virulence factor VirK	+	+	-
ADP72_14940	short-chain dehydrogenase	+	+	-
ADP72_14950	MFS transporter	+	+	-
ADP72_14955	LuxR family transcriptional regulator	+	+	-
ADP72_14960	relaxase	-	+	-
ADP72_15400	LysR family transcriptional regulator	+	+	-
ADP72_15405	permease	+	+	-
ADP72_15410	phosphoglycerate kinase	+	+	-
ADP72_16710	antibiotic biosynthesis monooxygenase	+	+	-
ADP72_16725	dihydroxyacetone kinase	+	+	-
ADP72_17230	GCN5 family acetyltransferase	+	-	-
ADP72_20025	diacetylchitobiose-6-phosphate hydrolase	-	+	-
ADP72_20030	thioredoxin	-	+	-
ADP72_20040	phosphatidylethanolamine-binding protein	-	+	-
ADP72_20060	osmotically inducible protein OsmC	-	+	-
ADP72_20070	membrane protein	-	+	-
ADP72_20075	aminotransferase	-	+	-
dsbG	disulfide isomerase	-	+	-
ADP72_20085	DeoR family transcriptional regulator	-	+	-
ADP72_20090	PTS galactitol transporter subunit IIA	-	+	-
ADP72_20095	PTS galactitol transporter subunit IIB	-	+	-
ADP72_20100	PTS galactitol transporter subunit IIC	-	+	-
ADP72_20105	ribulose-phosphate 3-epimerase	-	+	-
ADP72_20345	ATP-binding protein	-	-	-
ADP72_20365	DNA primase	+	+	-
ADP72_20395	AraC family transcriptional regulator	-	-	-
ADP72_20415	isochorismatase	-	-	-
ADP72_20420	MFS transporter	-	-	-
ADP72_20425	ArsR family transcriptional regulator	-	-	-
ADP72_20430	arsenic resistance protein	-	-	-
ADP72_20445	isomerase	-	-	-
ADP72_20450	NADH:flavin oxidoreductase	-	+	-
ADP72_20455	thioredoxin	-	-	-
ADP72_20460	alkylhydroperoxidase	-	-	-
ADP72_20550	transglycosylase	-	-	-
ADP72_20555	ATP-binding protein	-	-	-
ADP72_20625	hydrolase	-	-	-
lacY	galactoside permease	+	+	-
ADP72_23935	alpha-galactosidase	+	+	-
ADP72_25455	adenine methyltransferase	+	-	-

Es ist anzunehmen, dass in den zahllosen als „hypothetische“ Proteine annotierten Gene (welche in der Tabelle nicht angeführt wurden) weitere interessante Funktionen liegen können, welche bis heute jedoch noch nicht annotiert oder erforscht wurden.

4 Diskussion

Bis zur Marktreife eines biologischen Pflanzenschutzmittels müssen verschiedenste Schritte der Produktentwicklung zum Teil wiederholt durchlaufen werden, wobei die Analyse der Wirkungsweise eines Mikroorganismus an der Pflanze nur den Beginn des Prozesses darstellt. Um die Stabilität der Wirkung unter natürlichen Bedingungen zu verbessern, sollten die Mechanismen der Wirkung ebenso wie die Interaktionen mit anderen Stämmen verstanden werden. Die Einbeziehung von Additiven und weiteren effektverstärkenden Mikroorganismen kann zu einer Verbesserung der Wirkung eines einzelnen Stammes beitragen. Die Fermentation und Formulierung der ausgewählten Organismen und Additive stellt einen letzten praktischen Flaschenhals dar, bevor das Produkt einer Risikoabschätzung und Registrierung zugeführt werden kann. Diese Schritte werden in Abbildung 103 zusammengefasst.

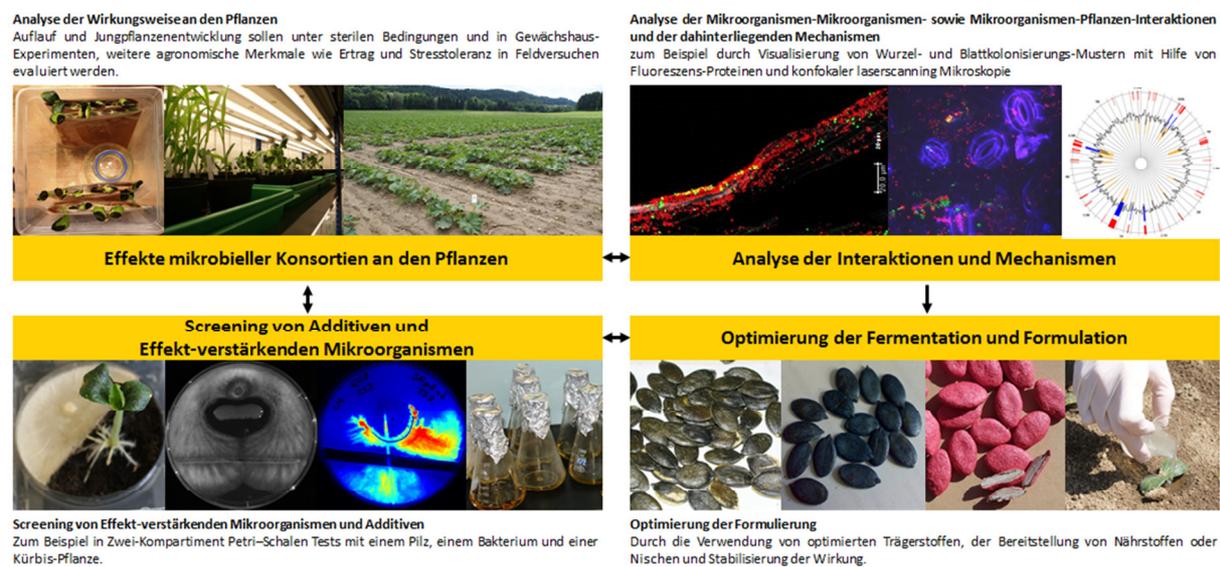


Abbildung 103: Zusammenfassung eines Entwicklungsprozesses für biologische Pflanzenschutzmittel.

Mit Ausnahme von *Serratia plymuthica* 4Rx13, welcher in allen Experimenten negative Einflüsse auf die Pflanzen hatte, variierte der Einfluss der anderen getesteten Stämme von positiv über neutral und negativ abhängig von der gewählten Kulturpflanzenspezies. Eine Sortenspezifität in der Wirkung auch innerhalb der einzelnen Kulturpflanzen wird angenommen (Drogue, *et al.*, 2012), (Haney, *et al.*, 2015) und in einem Folgeprojekt aufgearbeitet. Als erfolgversprechendste bakterielle Kandidaten für den Steirischen Ölkürbis erwiesen sich in dieser Arbeit die *Serratia plymuthica* Stämme 3Rp8 und S13, welche sowohl in Topfexperimenten als auch unter sterilen Bedingungen in Keimfiltern zu positiven Effekten auf den prozentuellen Auflauf der Pflanzen sowie zu einer Wachstumsförderung führten. Die Mischbehandlung mit 3Rp8 und S13 bewirkte sowohl in einer Ausgangskonzentration von 10^8 sowie 10^5 cfu/ml eine messbare Beschleunigung der Keimung in Keimfiltern. Der positive Effekt auf eine Erhöhung des Wurzelfrischgewichts war bei der Behandlung mit 3Rp8 mit einer

Diskussion

Konzentration von 10^8 Zellen im Samentauchbad mit durchschnittlich plus 58 % am ausgeprägtesten. Eine Erhöhung des Sprossfrischgewichtes wurde lediglich in den Behandlungen mit S13 mit einer Konzentration von 10^5 cfu/ml im Samentauchbad sowie in der Mischbehandlung von 3Rp8 und S13 mit einer Konzentration von 10^8 cfu/ml erreicht.

Die Mikroskopie von geprinten oder mit Bakteriensuspensionen gegossenen Pflanzen zeigte durchwegs eine starke Besiedelung der Samen, der Rhizosphäre und auch der Blätter mit den Stämmen 3Rp8 und S13. Die Fähigkeit, eine Pflanze gut besiedeln zu können ist oftmals Voraussetzung um gute Effekte in der Biokontrolle oder der Wachstumsförderung ausprägen zu können (de Weert & Bloemberg, 2006). Zum einen kann eine dichte Besiedelung als „Schutzhülle“ gegen andere, möglicherweise weniger positiv wirkenden Bakterien dienen, indem die applizierten Stämme zum Beispiel in Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen treten. Zum anderen werden beispielsweise pflanzenwachstumsfördernde Signale in räumlicher Nähe zum Wirt weitergegeben (Vacheron, *et al.*, 2013).

Die mögliche Funktion von Pilzen als Transportvektor in der Pflanzen-Bakterien-Interaktion wurde bereits beschrieben. Zum Beispiel kann die Pathogenese der Fruchtfäule am Steirischen Ölkürbis durch eine spezifische Assoziation von phytopathogenen Bakterien und dem Pilz *Didymella bryoniae* gefördert werden (Grube, *et al.*, 2011). Die Verwendung eines Pilzisolates als Additiv für die biologische Kontrolle erscheint aus mehreren Gründen sinnvoll (Warmink, *et al.*, 2011). Einerseits zeigten Pilzisolat wie P1 oder G1/8 eine schnelle Ausbreitung über den gesamten zur Verfügung stehenden Raum, was bakteriellen Stämmen aufgrund ihrer eingeschränkten Mobilität nicht möglich ist. Zudem können die Isolate Luftbrücken oder andere Hindernisse zum Beispiel in porösem Substrat überwinden, was bei Bakterien ebenfalls nicht der Fall ist, da diese durchgängige Oberflächen für eine Kolonisierung benötigen. Durch die schnelle großflächige Ausbreitung von Pilzen können auch eindringende Pathogene schneller und auf einer größeren Fläche gestoppt werden. Zum anderen kann das pilzliche Isolat selbst ebenfalls direkte positive Effekte auf die Pflanze haben. Die Nutzung eines Pilzisolates in einem Konsortium von Mikroorganismen als Vektor für Bakterien scheint möglich, wenn auch unter sehr eingeschränkten Bedingungen. Ein Transport von Bakterien über G1/8 war stark abhängig von der Konzentration und dem Entwicklungsstadium der Partner zu dem Zeitpunkt, an welchem diese aufeinander trafen. Lagen die *Serratia*-Stämme in zu hoher Konzentration vor, hemmten diese den Pilz so stark, dass kein direkter Kontakt zustande kam. Wurden die Zellen in gleicher Konzentration wie G1/8 Sporen aufgebracht, unterdrückten diese die Keimung der G1/8 Sporen vollständig. Nur wenn S13 oder 3Rp8 in niedrigeren Konzentrationen als G1/8 vorlagen, war ein Transport möglich. In Kombinationen von PB71 und G1/8 konnte G1/8 auch noch keimen, wenn PB71 in gleich hoher Konzentration aufgetragen wurde. War PB71 jedoch bereits

Diskussion

gut auf der Agar-Oberfläche etabliert, hemmte er G1/8 ebenfalls sehr stark. Andere Isolate wie P1 oder BE3-1-10 transportierten Bakterien zwar über kurze Distanzen, bremsten diese aber sehr stark in ihrem Wachstum. Die Verträglichkeit der Partner muss auch im Zeitverlauf berücksichtigt werden und kann nicht durch einfache Dualkulturplattentests mit kurzer Dauer ausreichend ergründet werden. Zudem stehen in Substraten in natürlichen Bedingungen keine derart hohen und ausgewogenen Nährstoffkonzentrationen wie auf Agar-Platten zur Verfügung, was ebenfalls zu einer Veränderung der Interaktionen der Partner führen wird.

Die Nutzung von mit Fluoreszenzproteinen markierten Bakterienstämmen für die Mikroskopie und die gleichzeitige Nutzung einer Antibiotikaresistenz zur Zellzahlbestimmung an Pflanzen sind sehr praktikable Methoden, mit der relativ einfach gute Mikroskopie Bilder erzeugt werden können und mit welcher die applizierten Stämme selektiv von den Pflanzengeweben reisoliert werden können (Cardinale, 2014). Allerdings lässt dieses Vorgehen alle anderen Mikroorganismen, die sich ebenfalls an Pflanzen ansiedeln, außer Acht. Unter (semi-)sterilen Bedingungen wurden immer wieder „Kontaminationen“ festgestellt, zum Beispiel wenn zum Reisolieren Platten ohne Antibiotikazugabe verwendet wurden oder wenn die Pflanzenteile mit FISH mikroskopiert wurden. Zum einen könnte es sich hierbei tatsächlich um Kontaminationen handeln, die bei der Durchführung der Versuche zustande kamen (zum Beispiel beim Gießen oder Fotografieren), zum anderen könnten es aber durchaus auch samenbürtige Mikroorganismen sein, welche durch das Waschen mit Ethanol nicht entfernt wurden. In Hinblick auf biologischen Pflanzenschutz oder einen Einsatz der Antagonisten unter Praxisbedingungen sollten aber genau diese samenbürtigen Organismen ebenso studiert werden. Es ist daher anzuraten, auch auf die aufwändigere FISH-Methode zurückzugreifen, um ein besseres Gesamtbild der Besiedelung der Pflanze zu erhalten.

Die Kürbis-Saatgut-Charge SGR 9/12 war stark mit Pilzen, jedoch weniger stark mit Bakterien belastet, die Saatgut-Charge der Ernte 2013 war umgekehrt stärker mit Bakterien, aber weniger stark mit Pilzen. Das Reinigen der Samen mit Desinfektionsmitteln sollte in zukünftigen Studien daher als eigene Saatgutbehandlungsmethode betrachtet und gewertet werden. So zeigten (Koch, *et al.*, 2012) dass eine Saatgutbehandlung von Gerste und Weizen mit Ethanol sowohl Einfluss auf die Keimfähigkeit als auch auf die samenbürtigen Sporen von *Ustilago nuda* hat.

Wie in Kapitel 3.2.7 gezeigt, werden durch eine Oberflächensterilisation nicht alle Keime am Samen entfernt. Durch das Priming mit einer hohen Dichte an S13 beziehungsweise 3Rp8-Zellen wurden jedoch offensichtlich andere noch auf den Samen befindliche Umwelt-Stämme in ihrem Wachstum zurückgedrängt. Dies zeigte sich deutlich bei den Reisolationen auf Platten ohne Antibiotikazugabe: für die auf LB-Platten reisolierbaren Bakterien galt durchwegs eine Obergrenze in der Gesamt-Besiedelung der Pflanzen von maximal 10^9 cfu/g Frischgewicht. Wurden die Pflanzen mit 3Rp8 oder

Diskussion

S13 geprimt, entfiel ein großer Anteil der Gesamtbesiedelung auf diese Stämme. In den ungeprimten Negativkontrollen besiedelten samenbürtigen Bakterien die Wurzeln in gleicher Dichte.

Die Genome der *Serratia plymuthica*-Gruppe sind grundsätzlich sehr ähnlich (Saraswoti, 2013). Durch Vergleich der Genomdaten der vier *Serratia*-Stämme konnte bisher die Unterschiede in der Wirkung auf die Pflanzen nicht im Detail begründet werden. Die Genome der untersuchten Isolate sind mit 84 bis 95 % homologen Gene sehr ähnlich und unterscheiden sich vorrangig durch die Präsenz genomischer Inseln. Die in diesen genomischen Inseln liegenden Sequenzen sind noch nicht ausreichend charakterisiert. Hier wären weitere Untersuchungen notwendig, um korrekte Aussagen über die Funktion dieser Gene treffen zu können. Es wurden jedoch auch zahlreiche Gene annotiert, die bereits für ihre antagonistische Wirkung oder Interaktion mit der Wirtspflanze bekannt sind.

Um ein passendes Konsortium von Mikroorganismen zusammenstellen zu können, muss daher vorerst noch auf die Überprüfung der Wirkung auf die Pflanze in Experimenten oder Feldversuchen sowie auf *in vitro* Interaktionsstudien zurückgegriffen werden. Für den Steirischen Ölkürbis wird die in Tabelle 51 angegebene Kombination von Mikroorganismen vorgeschlagen.

Tabelle 51: Vorgeschlagenes Konsortium an Mikroorganismen zum biologischen Schutz des Steirischen Ölkürbis vor Auflaufkrankheiten und zur Verbesserung der Pflanzengesundheit

Stamm	Wirkungsweise
<i>Trichoderma velutinum</i> G1/8	Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe gegen andere pilzliche Pathogene durch schnelles Wachstum, Parasitismus gegenüber pilzlichen Pathogenen, verbesserte Verteilung von bakteriellen Stämmen in porösen Materialien
<i>Serratia plymuthica</i> 3Rp8	Erhöhung des Wurzelfrischgewichtes der Pflanzen, Parasitismus gegenüber pilzlichen Pathogenen
<i>Serratia plymuthica</i> S13	Erhöhung des prozentuellen Auflaufs von Steirischem Ölkürbis, Parasitismus gegenüber pilzlichen Pathogenen
<i>Paenibacillus polymyxa</i> PB71	Hemmung pilzlicher Pathogene durch flüchtige organische Substanzen, Erhöhung des Erntegewichtes des Steirischen Ölkürbis in Feldversuchen und signifikante Reduzierung des Mehлтаubefalls an Blättern (Fürnkranz, <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lysobacter gummosus</i> L101	Erhöhung des Erntegewichtes des Steirischen Ölkürbis in Feldversuchen und signifikante Reduzierung des Mehлтаubefalls an Blättern (Fürnkranz, <i>et al.</i> , 2012)

Als Konzept für die Applikation eines Konsortiums an den Steirischen Ölkürbis wird eine Pelletierung des Saatgutes vorgeschlagen, in welcher Mikroorganismen, die sich gegenseitig behindern, jeweils in einer eigenen Nische verpackt werden. So sollten lebende bakterielle Zellen nicht in Mischung gemeinsam formuliert werden, sondern jede Kultur separat, zum Beispiel in einer Alginatmatrix, verkapselt werden. Das Pulver mit den entsprechenden Stämmen könnte im Anschluss in separaten Schichten auf den Samen aufgetragen werden. So könnten pflanzenwachstumsfördernde Stämme in

Diskussion

der innersten Schicht nahe des Samens appliziert werden, wohingegen Stämme oder Isolate mit stark parasitärer Wirkung gegen andere bodenbürtige Pathogene in den äußeren Schichten der Pelletierung eingelagert werden könnten. Selbst die Zugabe von Additiven wie Kohlenstoffquellen oder Mikronährstoffen könnte pro Schicht auf den jeweiligen Mikroorganismus oder den Samen angepasst werden. In einem Schichtkonzept kann eine lebende Umwelt um den Samen aufgebaut werden, in welcher jeder Partner unabhängig von den anderen applizierten Mikroorganismen Zeit hat, sich in der neuen Umgebung zu etablieren bevor er in Konkurrenz mit den anderen Organismen treten muss. Abbildung 104 fasst das Konzept grafisch noch einmal zusammen.

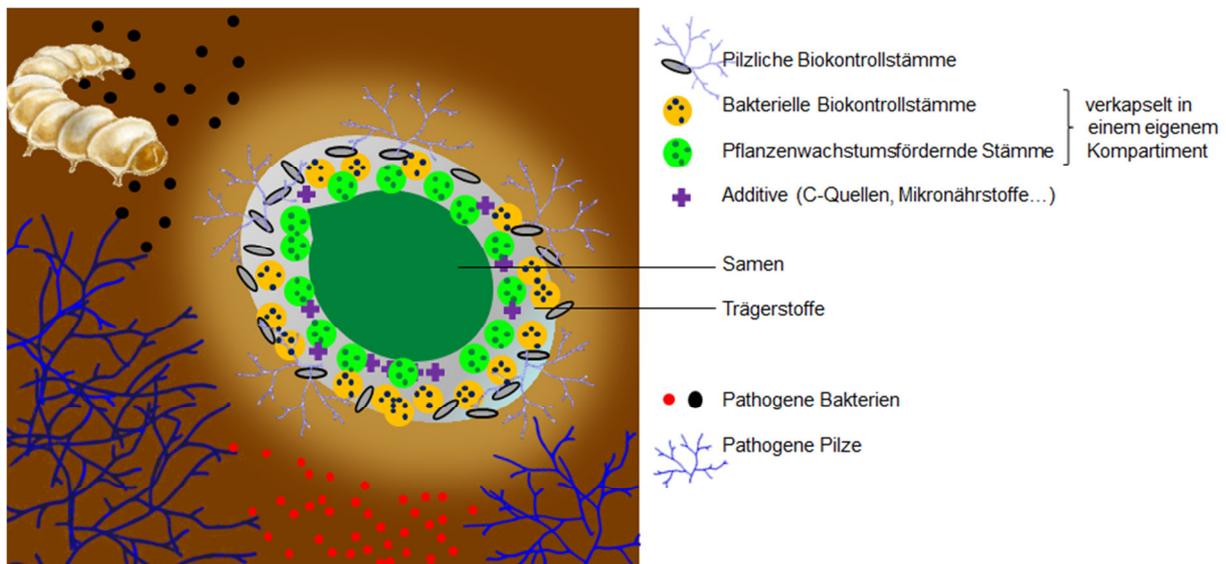


Abbildung 104: Konzept für die Saatgutbehandlung mittels eines Konsortiums an Mikroorganismen. Sich gegenseitig behindernde Stämme sollen separat verkapselt und in unterschiedlichen Schichten auf den Samen aufgetragen werden, um diesen eine stabile Etablierung in der neuen Umgebung zu erleichtern.

Das Potential von biologischen Pflanzenschutzmitteln wird zukünftig durch die Nutzung von besser auf die Bedürfnisse der Mikroorganismen abgestimmten Formulierungs- und Applikationstechniken sowie der Nutzung fein abgestimmter mikrobieller Konsortien anstatt von Einzelstämmen sicherlich besser in praktische Anwendungen umgesetzt werden können, als dies bisher der Fall war (Berg, *et al.*, 2013) (Berg, 2015).

5 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CDS	gene coding sequences (codierende Sequenzen)
cfu	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (konfokale Laser Scanning Mikroskopie)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	days post inoculation (Tage nach Inokulation)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
LCB	Locally Collinear Block
min	Minuten
ONC	over night culture
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	potato dextrose agar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
pH	pH-Wert; negative dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
Std	Stunden
Tp	Trimethoprim

6 Literaturverzeichnis

- Ågren, J., Sundström, A., Håfström, T., & Segerman, B. (2012). Gegenees: Fragmented Alignment of Multiple Genomes for Determining Phylogenomic Distances and Genetic Signatures Unique for Specified Target Groups. *PLOS One*, 7(6), S. e3910.
- Alavi, P., Starcher, M., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2013). Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405(T.). *Frontiers in plant science*, 4(141), S. 1-10.
- Amann, R., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devereux, R., & Stahl, D. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56, S. 1919-1925.
- Babadoost, M., & Zitter, T. (2009). Fruit rots of pumpkin - a serious threat to the pumpkin industry. *Plant Disease*, 39(8), S. 772-782.
- Barrett, T. (2013). BioSample. In M. Bethesda, *The NCBI Handbook* (2. Ausg.). National Center for Biotechnology Information.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*, 378, S. 1-33.
- Batool, M., Hassan Khalid, M., Hassan, M., & Hafeez, F. (2011). Homology modeling of an antifungal metabolite plipastatin synthase from the *Bacillus subtilis* 168. *Bioinformatics*, 7(8), S. 384-387.
- Bedlan, G., & Huss, H. (2005). Falscher Mehltau erstmals am Ölkürbis. *Der Pflanzenarzt*(4), S. 7-8.
- Berendsen, R., Pieterse, C., & Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), S. 478-486.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Microbiol Biotechnol*, 84(1).
- Berg, G. (2015). Beyond borders: investigating microbiome interactivity and diversity for advanced biocontrol technologies. *Microbial Biotechnology*, 8(1), S. 5-7.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R., Ulrich, A., & Hallmann, J. (2005). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, S. 215-229.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., & Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* Host Plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(7), S. 3328-3338.
- Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Phillips, J., & Tilcher, R. (2013). Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*, 3(4), S. 648 - 656.
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., & Bonfante, P. (1996). Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma*, 193(1-4), S. 123-131.
- Boonchan, S., Britz, M., & Stanley, G. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-cultures. *Appl Environ. Microbiol.*, 66, S. 1007-1019.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S., Lorito, M., Kubicek, C., & Mach, R. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *AEM*, 71(7), S. 3959-3965.
- Cardinale, M. (2014). Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Front Microbiol.*, 5(94).

- Cardinale, M., de Castro Jr, J., Müller, H., Berg, G., & Grube, M. (2008). *In situ* analysis of bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. 66(1), S. 63-71.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K., & 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. *Syst Appl Microbiol*, 22, S. 434-444.
- Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2003-2009). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research*, 14(7), S. 1394-1403.
- Dauga, C. (2002). Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(52), S. 531-547.
- de Weert, S., & Bloemberg, G. (2006). Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol in Plant-associated bacteria. (S. S. Gnanamanickam, Hrsg.) S. 317-333.
- Dhillon, B., Chiu, T., Laird, M., Langille, M., & Brinkman, F. (2013). IslandViewer update: improved genomic island discovery and visualization. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), S. 129-132.
- Dhillon, B., Laird, M., Shay, J., Winsor, G., Lo, R., Nizam, F., . . . Brinkman, F. (2015). IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), S. W104-W108.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I., & Wishart, D. (2004). PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Research*(32), S. W660–W664.
- Droge, B., Dore, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.*(163), S. 500–510.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, S. 783-791.
- Fürnkranz, M., Adam, E., Müller, H., Grube, M., Huss, H., & Berg, G. (2012). Promotion of growth, health and stress tolerance of Styrian oil pumpkins by bacterial endophytes. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), S. 509-519.
- Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., & Berg, G. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb Ecol*, 63, S. 418-428.
- Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 1, S. 151-158.
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., & Berg, G. (2006). Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycol Res*(110), S. 1464-1474.
- Grube, M., Fürnkranz, M., Zitzenbacher, S., & Huss, H. (2011). Emerging multi-pathogen disease caused by *Didymella bryoniae* and pathogenic bacteria on Styrian oil pumpkin. *Eur J Plant Pathol*(131), S. 539-548.
- Guanghong, Z., & Bailin, H. (2015). CVTree3 web server for whole-genome-based and alignment-free prokaryotic phylogeny and taxonomy. *Genomics Proteomics & Bioinformatics* (being submitted).
- Haas, D., Blumer, C., & Keel, C. (2000). Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Current Opinion in Biotechnology*(11), S. 290–297.

- Haney, C., Samuel, B., Bush, J., & Ausubel, F. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*(1), S. Article number: 15051.
- Heitefuss, R. (2000). *Grundlagen der praktischen Phytomedizin*. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87, S. 4-10.
- Huss, H. (2011). Krankheiten und Schädlinge im Ölkürbisanbau. *Der fortschrittliche Landwirt*(3), S. 30-33.
- Huss, H., & Mavridis, A. (2007). Neue Blattfleckenkrankheit am Steirischen Ölkürbis. *Der Pflanzenarzt*(11), S. 8-9.
- Huss, H., & Pucher, R. (2007). Warum fault der Steirische Ölkürbis? *Der fortschrittliche Landwirt*(20), S. 24-25.
- Huss, H., Krenn, J., & Adam, E. (2011). Sclerotiniaschäden bei Kartoffel und Ölkürbis. *Der Pflanzenarzt*(11), S. 13-14.
- Ji, Q., Bin, W., & Bailin, H. (2004). Whole proteome prokaryote phylogeny without sequence alignment: a K-string composition approach. *J Mol Evol*, S. 1-11.
- Koch, E., Slusarenko, A., Wunderle, J., Zink, P., Oberlik, M., & Gebremedhin, L. (2012). Optimierung von Saatgutbehandlungsmitteln mit Wirkung gegen Flugbrand an Gerste und Weizen (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) unter Nutzung verbesserter Verfahren zum Nachweis der Erreger. Abschlussbericht Verbundprojekt.
- Kohlmeier, S., Smits, T., Ford, R., Keel, C., Harms, H., & Wick, L. (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environmental Science & Technology*, 39(12), S. 4640-4646.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (S. 155-175). New York: Wiley.
- Langille, M., & Brinkman, F. (2009). IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics*.
- Leica Microsystems CMS GmbH. (kein Datum). TCS SPE Betriebsanleitung. 2, 24.
- Li, L., Stoeckert, Jr, C., & Roos, D. (2003). OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Res.*, S. 2178-2189.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol*, 15, S. 593-600.
- Marten, P., Smalla, K., & Berg, G. (2000). Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *Journal of applied microbiology*, 89(3), S. 463–471.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Andrew, P., Prudhomme, M., . . . Clavery, J. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 20, S. 3479-3483.
- Martinez, B., Perez, J., Infante, D., Duarte, Y., & Moreno, M. (2013). Antagonism of *Trichoderma* ssp. isolates against *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Rev. Protección Veg.*, 28(3), S. 192-198.

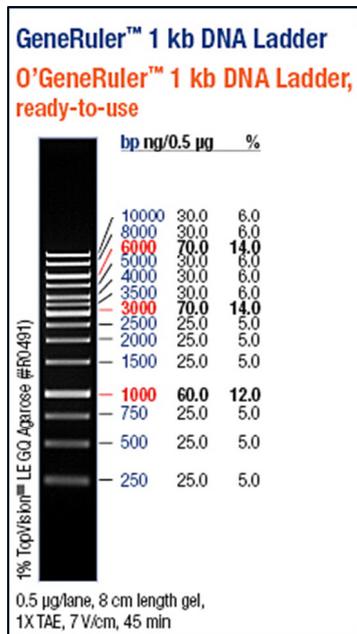
- Maurer, K., Zachow, C., Seefelder, S., & Berg, G. (2013). Initial Steps towards Biocontrol in Hops: Successful Colonization and Plant Growth Promotion by Four Bacterial Biocontrol Agents. *Agronomy*, 3(4), S. 583–594.
- Müller, H., Fürnkranz, M., Grube, M., & Berg, G. (2013). Genome Sequence of *Serratia plymuthica* Strain S13, an Endophyte with Germination- and Plant-Growth-Promoting Activity from the Flower of Styrian Oil Pumpkin. *Genome Announc*, 4.
- Müller, M., Scheu, S., & Jousset, A. (2013). Protozoa Drive the Dynamics of Culturable Biocontrol Bacterial Communities. *PLOS One*.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *Physiologia Plantarum*, 3, S. 473-497.
- Murgu, O. (2014). Masterarbeit "Interactions of beneficial bacteria with fungi and their host plants". Technische Universität Graz.
- Obersteiner, C. (1996). Der steirische Ölkürbis *Cucurbita pepo* L. var *styriaca* GREB. Entwicklung einer alternativen Methode der Saatgutprüfung. Dissertation Karl Franzens Universität Graz.
- Perotto, S., & Bonfante, P. (1997). Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol*, 5, S. 496-501.
- Rasband, W. (2015). ImageJ. (U. National Institutes of Health, Produzent) Abgerufen am 2015 von <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Saraswoti, N. (2013). Genomics and transcriptomics of plant beneficial *Serratia* spp. (A. U. Sueciae, Hrsg.) Doktorarbeit an der Swedish University of Agricultural Sciences, 44.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, S. 512-526.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Ciufu, S., & Li, W. (2013). Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. In M. Bethesda, *The NCBI Handbook* (2. Ausg.). National Center for Biotechnology Information.
- Thuermer, A., Kai, M., Weise, T., Voss, J., Lehmann, R., Gottschalk, G., . . . Piechulla, B. (2009). Whole genome sequence of *Serratia plymuthica* 4Rx13. NCBI Online.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., . . . Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*, 4(356).
- Van Domselaar, G., Stothard, P., Shrivastava, S., Cruz, J., Guo, A., Dong, X., . . . Wishart, D. (2005). BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue), S. 455-459.
- Van Houdt, R., Moons, P., Kristof Vanoirbeek, A. J., & Michiels, C. (2005). Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*.
- Vergunst, A. C., Meijer, A. H., Renshaw, S. A., & O'Callaghan, D. (2010). *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infection and Immunity*, 78/4, S. 1495-1508.
- Verordnung (EG) Nr. 889/2008. (05. September 2008). Kommission der Europäischen Gemeinschaften.
- Verordnung (EWG) Nr. 2092/91. (24. Juni 1991). Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel.

Literaturverzeichnis

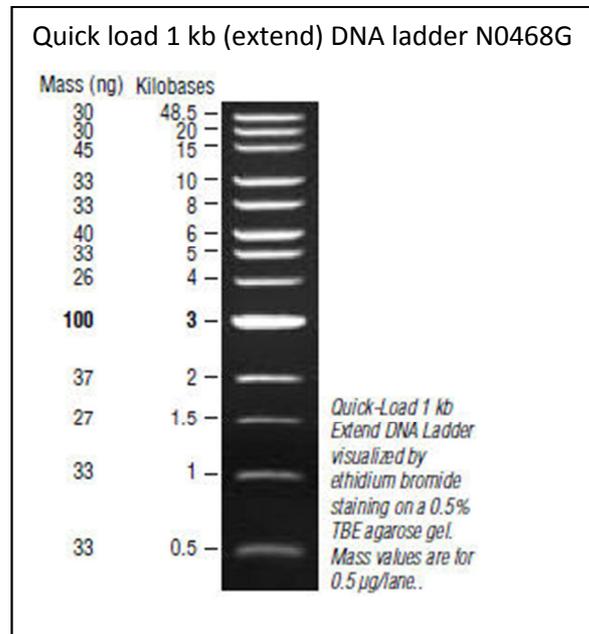
- Wallner, G., Amann, R., & Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14, S. 136-143.
- Wang, Y., Coleman-Derr, D., Chen G, G., & Gu, Y. (2015). OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res.*, S. Web Server issue: W78-W84.
- Warmink, J., & van Elsas, J. (2009). Migratory Response of Soil Bacteria to *Lyophyllum* sp. Strain Karsten in Soil Microcosms. (A. S. Microbiology, Hrsg.) *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, S. 2820–2830.
- Warmink, J., Nazir, R., Corten, B., & van Elsas, J. (2011). Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil biology & biochemistry*, 43(4), S. 760-765.
- Whipps, J. (2000). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Oxford Journal of Experimental Botany*, S. 487-511.
- Winkler, J., Freistetter, B., & Huss, H. (2008). Sortenabhängige und zeitliche Entwicklung von Fruchtfäule bei Ölkürbis (*C. pepo* var. *styriaca*). 59. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, S. 137-138.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., & Berg, G. (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, S. 1937-1944.
- Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R., & Berg, G. (2010). Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS Microbiol Ecol*, 74, S. 124-135.
- Zitter, T., Hopkins, D., & Thomas, C. (1996). *Compendium of Cucurbit Diseases*. Minnesota/USA: The American Phytopathological Society.

7 Anhang

7.1 Verwendete DNA-Leitern



<http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-250-to-10000-bp/>



<https://www.neb.com/products/n3239-quick-load-1kb-extend-dna-ladder>

7.2 Poster zur Arbeit

Poster 1 „Effekte verschiedener *Serratia*-Genotypen auf Keimung und frühe Pflanzenentwicklung des Steirischen Ölkürbis sowie Visualisierung der Wurzelbesiedelung“

Vorgestellt bei folgenden Veranstaltungen:

- IS-MPMI-Tagung in Rhodos, 07.07.2014
- ÖGMBT Jahrestagung in Wien, 17.09.2014
- Eröffnungsfeier anlässlich der Erweiterung der Saatzucht Gleisdorf GmbH, 17.10.2014
- Lettuce-Workshop in Graz, 27.10.2014

Poster 2 „Pflanzen-Mikroben-Interaktionen als Ansatzpunkt für biologischen Pflanzenschutz“

Vorgestellt bei den Eröffnungsfeierlichkeiten anlässlich der Erweiterung der Saatzucht Gleisdorf GmbH am 17.10.2014.

Poster 3 „Pflanzen-Mikroben-Interaktionen als Ansatzpunkt für biologischen Pflanzenschutz“

Vorgestellt am Feldtag der RWA in Lannach am 19. und 21.06.2015.

Effects of different *Serratia* genotypes on germination and early plant development of Styrian oil pumpkin and visualization of root colonization patterns



Eveline Adam, Henry Müller, Gabriele Berg
Graz University of Technology, Institute of Environmental Biotechnology, Petersgasse 12, A-8010 Graz, Austria



Introduction

Due to the lack of lignification of the seed coat the Styrian oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) is highly susceptible to various fungal and bacterial pathogens during germination (Fig. 1). When seeded without chemical strippers against fungal diseases, yield losses up to 100 % are possible. To control this problem by biological means we tested different bacterial isolates under greenhouse as well as field conditions. To better understand the bacterial mode of action and the interactions between the plant and bacterial strains, pumpkin seeds were inoculated with one of four different *Serratia* genotypes or with a combination thereof. Apart from effects on seed germination and plant development, root colonization patterns were studied involving determination of cell counts and visualization of fluorescent strains by confocal laser scanning microscopy (CLSM). For microscopic analysis strains were transformed with a rhizosphere-stable vector hosting different fluorescent proteins and applied to the seeds using seed priming.



Fig. 1: Seeds of Styrian oil pumpkin lacking lignification of the seed coat.

Mode of action, cell counts and colonization patterns

The bacterial strains *Serratia plymuthica* S13 and 3Rp5, *S. sp.* 3Rp8 and *S. odorifera* 4Rx13 were chosen for their antagonistic potential against common oil pumpkin pathogens, evaluated in dual culture experiments (Fig. 2). *S. plymuthica* S13 was isolated from the flower of Styrian oil pumpkin. An emission of antifungal volatile compounds as well as an *ad planta* reduction of disease severity caused by *Didymella bryoniae* was detected (Fürnkranz et al., 2012). The strains 3Rp8, 3Rp5 and 4Rx13 were chosen for their potential against *Verticillium dahliae* and other pathogenic fungi (Berg et al., 2002).

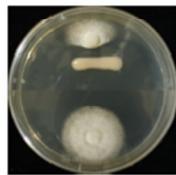


Fig. 2: Dual culture test of a *Didymella bryoniae* isolate and *S. sp.* 3Rp8 (upper panel) and growth of *D. bryoniae* isolate without bacterial antagonist (lower part).

For all *ad planta* experiments, pumpkin seeds were inoculated with 10^5 or 10^8 CFUs ml^{-1} using seed priming and grown for up to 12 days under greenhouse conditions or up to 4 month in the field trials.

CFU/g plant material, 12 dpi

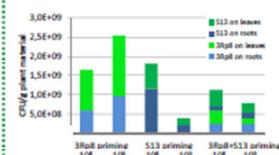


Fig. 3: Under axenic conditions, different concentrations used for seed inoculation resulted in similar cell densities on roots and leaves 12 days post inoculation (dpi). When inoculated with a mixed culture, no increase in total CFU/g plant material was observed.

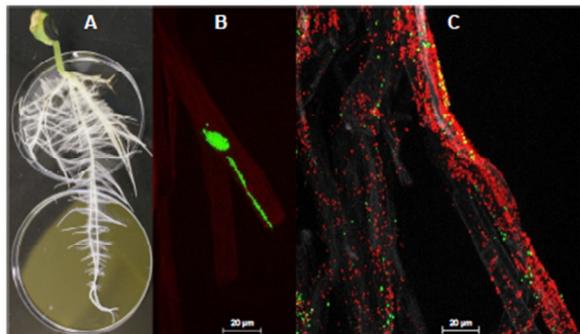


Fig. 4: (A) Styrian oil pumpkin grown in a germination pouch, 8 dpi. (B) Colonization of the roots after priming with GFP-labeled S13 cells (green) and (C) after priming with an equal mix of GFP-labeled S13 (green) and DsRed2-labeled 3Rp8 cells (red). Yellow: overlapping signal of labeled S13 and 3Rp8 cells. Images were acquired by CLSM.

Effects on germination and early plant development

Experiments under sterile conditions (pouches) and greenhouse experiments (pots with peat soil)

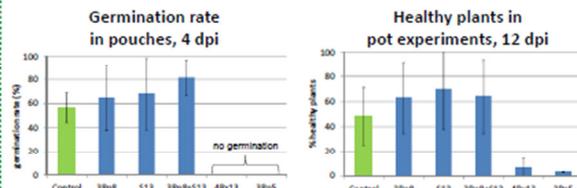


Fig. 5: The *Serratia* strains *S. plymuthica* S13 and *S. sp.* 3Rp8 improved germination rate and speed whereas the treatment with *S. plymuthica* 3Rp5 and *S. odorifera* 4Rx13 resulted in a distinct decrease in germination rate compared to the control (treated with 0.85 % NaCl).

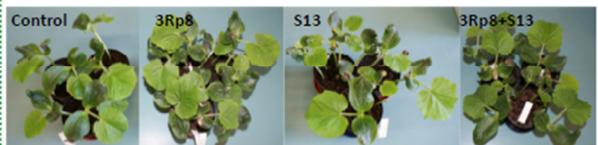


Fig. 6: Plants of Styrian oil pumpkin grown in peat soil 10 days after inoculation with 3Rp8, S13 and an equal mixture of 3Rp8 and S13 compared to the non-inoculated control (sterile 0.85 % NaCl).

Average fresh weight of roots in pouches, 12 dpi

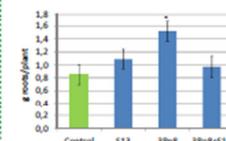


Fig. 7: Evaluation of plant growth promoting abilities by measuring the fresh weight of the roots (plants grown in pouches, 12 dpi). 3Rp8 enhanced the fresh weight of roots by 80 % compared to the control treatment (p-value: 0.01369).

Field experiments with *Serratia plymuthica* S13

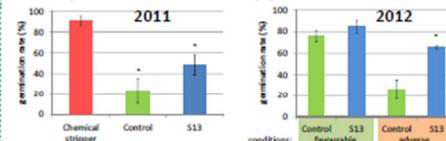


Fig. 8: In 2011 the treatment with S13 resulted in an increased seedling emergence of field-grown pumpkins by up to 100 % in comparison to the untreated control in a trial with 450 seeds/treatment. Nevertheless, the S13 treatment did not reach a germination rate competing with a chemical stripper (Maxim XL[®]) (p-value: 0.00053).

In 2012, the biological treatment lead to better results under adverse conditions (waterlogging) than under favourable conditions in two field trials (p-value: 0.03793).

Summary, Discussion and Perspectives

- The *Serratia* strains S13 and 3Rp8 promote germination and plant growth whereas 3Rp5 and 4Rx13 suppress germination of the Styrian oil pumpkin.
- When S13 and 3Rp8 were jointly applied, no improvement of plant beneficial traits compared to single treatments could be observed.
- Cell densities of the respective populations on plant roots reveal that the strains compete for the same niche.
- The beneficial strains show better results under adverse conditions than under favourable, artificial or sterile conditions.
- Further tests with 3Rp8 and S13 in combination with beneficial fungi and micronutrients will be performed.

References:

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3320-3338.

Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., Berg, G. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microbial Ecology* 63, 418-428.

The authors gratefully acknowledge support from The Austrian Research Promotion Agency (FFG, Project No.:836466), NAWI Graz, Saatzzucht Gleisdorf GmbH and Alwera AG.

Pflanzen-Mikroben-Interaktionen als Ansatzpunkt für biologischen Pflanzenschutz

Technische Universität Graz
Institut für Umweltmikrobiologie
Petersgasse 12, A-8010 Graz



Ansprechpartner:

Gabriele Berg Henry Müller Christin Zachow Eveline Adam



Einleitung

Die Etablierung einer umweltfreundlichen und nachhaltigen Lebensmittelproduktion ist nach wie vor eine große Herausforderung in der modernen Landwirtschaft.

Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen erfüllen hier wichtige Funktionen in der Pflanzengesundheit und für das Pflanzenwachstum. Direkte Pflanzenwachstumsförderung durch Mikroorganismen basiert auf verbesserter Nährstoffaufnahme und hormoneller Stimulation. Verschiedene andere Mechanismen sind bei der Unterdrückung pflanzlicher Pathogene involviert, was wiederum indirekt mit dem Pflanzenwachstum korreliert.

Basierend auf diesen nützlichen Pflanzen-Mikroben-Interaktionen können mikrobielle Präparate wie biologische Dünger, Pflanzenstärkungsmittel, Phytoestimulatoren und Biopestizide für den Einsatz in der Landwirtschaft entwickelt werden [1].

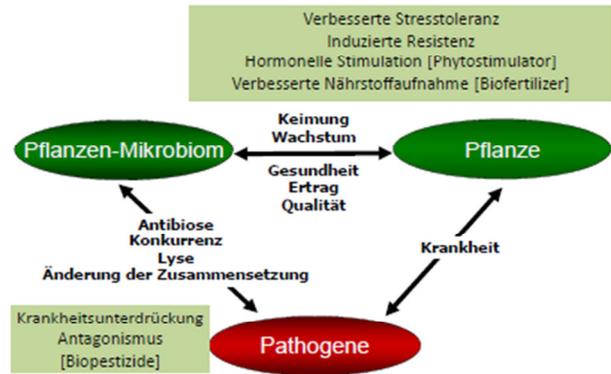


Abb. 1: Pflanzen-Mikroben-Interaktionen, die Pflanzenwachstum und Gesundheit fördern. Wirkungsmechanismus und möglicher Einsatz in biotechnologischen Anwendungen [1].

Pflanzen-Pathogene	Antagonisten
<p>Verursacher der Schwarzfäule am Steirischen Ölkürbis ist der Pilz <i>Didymella bryoniae</i>, der oftmals gemeinsam mit bakteriellen Schaderregern wie <i>Pectobacterium carotovorum</i>, <i>Pseudomonas viridiflava</i>, <i>Xanthomonas cucurbitae</i> und anderen Schaderregern auftritt [2].</p>	<p><i>Trichoderma</i> Isolate sind dafür bekannt, Hyphen, Sklerotien und andere pilzliche Strukturen zu parasitieren sowie antifungale Metabolite zu produzieren [4]. Ebenso zeigen viele bakterielle Isolate antagonistische Aktivität sowohl gegen andere pilzliche als auch andere bakterielle Isolate.</p>
<p>Abb. 2: Pilzliche Isolate auf Kartoffel-Dextrose-Agar: (1) <i>Didymella bryoniae</i> A220-2b [2]. (2) <i>Didymella bryoniae</i> G11 [2]. (3) <i>Verticillium longisporum</i> ELV25 [3].</p>	<p>Abb. 3: Pilzliche und bakterielle Isolate auf Kartoffel-Dextrose-Agar: (1) <i>Trichoderma velutinum</i> G1/8 [4]. (2) Pink fluffy BE3-1-10 (Stammesammlung TU Graz). (3) <i>Serratia plymuthica</i> 513 [5].</p>

Interaktionen, Transporte, Besiedelung der Pflanze

Pilze, Bakterien und Pflanzen interagieren stark miteinander, wobei unzählige externe Faktoren sowie die Konzentration der einzelnen Partner das Wechselspiel zusätzlich beeinflussen. Die Interaktionen reichen von wechselseitiger Hemmung oder vollständiger Eliminierung einer Seite bis zu einem Transport von Bakterien durch Pilze an der Pflanze.

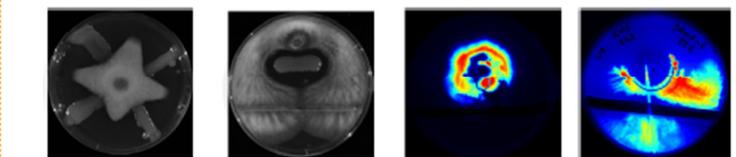


Abb. 4: Dual-Kultur-Platten-Tests von *Serratia plymuthica* 3Rp8 gegen *Didymella bryoniae* G11 bzw. *Trichoderma velutinum* G1/8. Abb. 5: Transport von *S. plymuthica* 3Rp8 (sichtbar als helles Signal) links: durch *Didymella bryoniae* A220-2b, rechts: durch *Trichoderma velutinum* G1/8.



Abb. 6 links: Testsystem zur Analyse der Interaktionen von Pflanze, Pilz und Bakterium. Rechts: die Besiedelung der Wurzel mit 3Rp8 wird im Bild unten durch die hellen Signale sichtbar gemacht.

Perspektiven

- Der Erfolg biologischer Pflanzenschutzmittel wird sowohl von interdisziplinärer Forschung - zum Beispiel im Bereich der Massenproduktion, Formulierung, Interaktion und Signaling – als auch von Produktmarketing und Öffentlichkeitsarbeit profitieren.
- Der Einsatz von Mikroorganismen und die Erforschung nützlicher Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen bietet vielversprechende umweltfreundliche Strategien sowohl für die konventionelle als auch die biologische Landwirtschaft.

Literatur:

[1] Berg, et al. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Microbiol Biotechnol.*
 [2] Grube, et al. (2011). Emerging multi-pathogen disease caused by *Didymella bryoniae* and pathogenic bacteria on Styrian oil pumpkin. *Eur J Plant Pathol.* 539-548.
 [3] Messner, et al. (1996). Molecular characterization of the plant pathogen *Verticillium dahliae* Kleb. using RAPD-PCR and sequencing of the 18S rRNA-gene. *J Phytopathol* 144, 347-354.
 [4] Grosch, et al. (2006). Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycol Res.* 1464-1474.
 [5] Fürnkranz, et al. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microbial Ecology* 63, 418-428.

Pflanzen-Mikroben-Interaktionen als Ansatzpunkt für biologischen Pflanzenschutz

Eveline ADAM^{1,2}, Henry MÜLLER¹, Johanna WINKLER², Gabriele BERG¹

¹Technische Universität Graz, Institut für Umweltmikrobiologie, Petersgasse 12, A-8010 Graz (henry.mueller@tugraz.at)

²Saatzucht Gleisdorf GmbH, Am Tieberhof 33, 8200 Gleisdorf (eveline.adam@saatzuchtgleisdorf.at)

Einleitung

Die Etablierung einer umweltfreundlichen und nachhaltigen Lebensmittelproduktion ist nach wie vor eine große Herausforderung in der modernen Landwirtschaft.

Pflanzen-assoziierte Mikroorganismen erfüllen hier wichtige Funktionen in der Pflanzengesundheit und für das Pflanzenwachstum. Direkte Pflanzenwachstumsförderung durch Mikroorganismen basiert auf verbesserter Nährstoffaufnahme und hormoneller Stimulation. Verschiedene andere Mechanismen sind bei der Unterdrückung pflanzlicher Pathogene involviert, was wiederum indirekt mit dem Pflanzenwachstum korreliert.

Basierend auf diesen nützlichen Pflanzen-Mikroben-Interaktionen können mikrobielle Präparate wie biologische Dünger, Pflanzenstärkungsmittel, Phytoöstrogenen und Biopestizide für den Einsatz in der Landwirtschaft entwickelt werden (Berg et al. 2009).

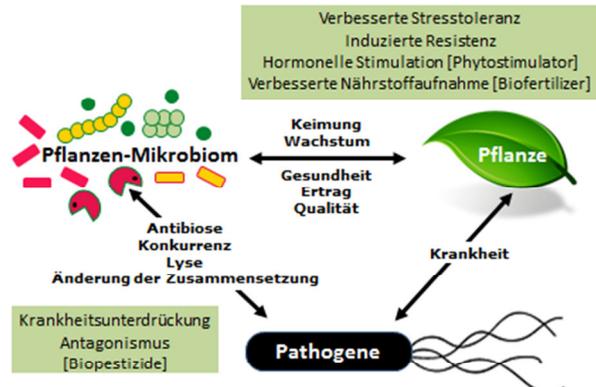


Abb. 1: Pflanzen-Mikroben-Interaktionen, die Pflanzenwachstum und -gesundheit fördern, Wirkungsmechanismen und möglicher Einsatz in biotechnologischen Anwendungen (Berg et al. 2009).

Beispiel: das „Peposan“-Projekt am Steirischen Ölkürbis

Aufbauprobleme im Biolandbau

Aufgrund der fehlenden Verholzung der Samen ist der Steirische Ölkürbis während der Keimung besonders anfällig gegenüber verschiedenen Pathogenen. Ziel des Projekts ist, ein Konzept zu etablieren um den stabilen Aufbauf chemisch ungebeizter Samen zu ermöglichen und die allgemeine Stresstoleranz durch Applikation eines maßgeschneiderten mikrobiellen Konsortiums über eine Samenbehandlung zu steigern.

Analyse der Wirkungsweise an den Pflanzen

Aufbau und Jungpflanzenentwicklung werden unter sterilen Bedingungen (Abb. 2) und in Gewächshaus-Experimenten (Abb. 3), weitere agronomische Merkmale wie Ertrag und Stresstoleranz in Feldversuchen (Abb. 4) evaluiert.



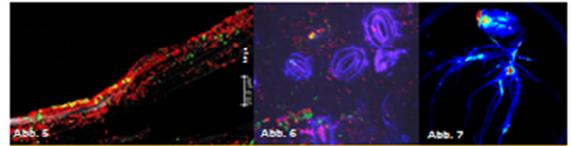
Effekte mikrobieller Konsortien an den Pflanzen

Applikation von Antagonisten

Für verschiedene bakterielle und pilzliche Stämme wurden bereits positive Effekte in Feldversuchen nachgewiesen (Furnkranz et al., 2012, Berg et al. 2002). Im nächsten Schritt sollen die Mikroorganismus-Mikroorganismus- sowie die Pflanze-Mikroorganismus-Interaktionen dieser Isolate durch einen mehrphasigen Ansatz erforscht werden. Weiters werden Lösungen entwickelt um eine stabile und einfache Anwendung zu ermöglichen.

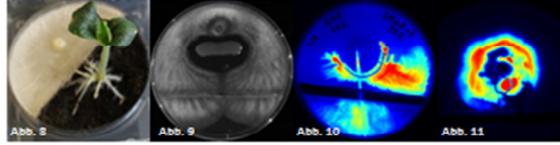
Analyse der Interaktionen und Mechanismen

Mit Hilfe von Fluoreszenz-Proteinen werden zum Beispiel Wurzel- und Blattkolonisierungsmuster visualisiert. Abb. 5, 6: Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie-Bilder einer dicht besiedelten Wurzel und eines Blattes. Abb. 7: Visualisierung der Besiedelung des Gesamt-Wurzelsystems.



Analyse der Interaktionen und Mechanismen

Screening von Additiven und Effekt-verstärkenden Mikroorganismen



Screening von Effekt-verstärkenden Mikroorganismen

Abb. 8: Zwei-Kompartiment Petri-Schalen Tests mit einem Pilz, einem Bakterium und einer Kürbis-Pflanze. Abb. 9: Hemmung von *Trichoderma reesei* durch *Serratia plymuthica*. Abb. 10, 11: Transport von *S. plymuthica* (helle Signale) durch *T. reesei* und *Diatyella bryonifera*.

Optimierung der Fermentation und Formulierung



Optimierung der Formulierung

Abb. 12: Unbehandelte sterilisierte Samen des Steirischen Ölkürbis. Abb. 13, 14: Beispiele von Samen, die mit Mikroorganismen in unterschiedlichen Trägerstoffen behandelt wurden. Abb. 15: Eingießen einer jungen Pflanze mit einer bakteriellen Suspension in einem Feldversuch.

Produkt-Entwicklung und Optimierung

Perspektiven

- Der Erfolg biologischer Pflanzenschutzmittel wird sowohl von interdisziplinärer Forschung - zum Beispiel im Bereich der Massenproduktion, Formulierung, Interaktion und Signaling – als auch von Produktmarketing und Öffentlichkeitsarbeit profitieren.
- Der Einsatz von Mikroorganismen und die Erforschung nützlicher Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen bietet vielversprechende umweltfreundliche Strategien sowohl für die konventionelle als auch die biologische Landwirtschaft.

Literatur:

Berg, et al. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Microbiol Biotechnol.*
Berg, et al. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic microorganisms isolated from different *Varietatum* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3328-3338.
Furnkranz, et al. (2012). Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microbiol Ecology* 63, 418-428.