

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft
Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6803

**Entwicklung und Anwendung von Isolierungs-
und Quantifizierungsmethoden für epiphytische
Mikroorganismen auf Blattoberflächen der
Stieleiche (*Quercus robur* L.)**

Thomas Heuser

Institut für Meteorologie und Klimaforschung

von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2003

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn PD Dr. Wolfgang Zimmer betreut worden.

Thomas Heuser

Die vorliegende Arbeit wurde sowohl als elektronische Dissertation der Universität zu Köln (<http://www.ub.uni-koeln.de/ediss/>) sowie als Wissenschaftlicher Bericht des Forschungszentrums Karlsruhe, Berichtsnummer FZKA 6803 veröffentlicht (<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6803.pdf>).

Außerdem wurden folgende Teile der Arbeit veröffentlicht:

Heuser T., Zimmer W. (2002) Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. FEMS Microbiol. Lett. 209: 295-299

Heuser T., Zimmer W. (2003) Genus and isolate specific real-time PCR quantification of *Erwinia* on leaf surfaces of English oaks. Curr. Microbiol., accepted

Folgende Sequenzen wurden in die EMBL Datenbank gegeben:

AJ417495: *Cladosporium* spec., (ascomyc1), 18S-23S rDNA Spacer Region

AJ417496: *Ramularia* spec., (ascomyc2), 18S-23S rDNA Spacer Region

AJ417497: *Microsphaera alphitoides*, (ascomyc3), 18S-23S rDNA Spacer Region

AJ417498: *Microsphaera alphitoides*, (ascomyc4), 18S-23S rDNA Spacer Region

AJ489441: *Erwinia* spec. (Erwin2), 16S-23S rDNA Spacer Region

AJ489442: *Erwinia* spec. (Erwin3), 16S-23S rDNA Spacer Region

AJ489443: *Erwinia* spec. (Erwin4), 16S-23S rDNA Spacer Region

AJ489444: *Erwinia* spec. (Erwin1), 16S-23S rDNA Spacer Region

AJ489445: *Erwinia* spec. (Erwin6), 16S-23S rDNA Spacer Region

AJ489446: *Erwinia* spec. (Erwin5), 16S-23S rDNA Spacer Region

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Bayerischen Forschungsverbunds "Erhöhte UV-Strahlung in Bayern" (BAYFOR-UV) mit Geldern des Bayerischen Staatsministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst gefördert.

Zusammenfassung

Epiphytische Mikroorganismen besiedeln Oberflächen von Pflanzen. Sie sind auf allen Pflanzen vorhanden und beeinflussen die Gesundheit ihres Wirts. Während einige Mikroorganismen nützlich für ihren Wirt sind, haben Andere schädliche Wirkung. Der Einfluß von epiphytischen Mikroorganismen auf ihren Wirt – positiv oder negativ – hängt oftmals von Umweltfaktoren ab. Obwohl Pflanzen und Mikroorganismen am gleichen Ort leben, kann eine Veränderung der Umweltbedingungen beide Partner unterschiedlich beeinflussen. Über epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.), einem wichtigen Baum deutscher Wälder, ist wenig bekannt. So ist der Mehltaubefall, verursacht von dem obligat parasitischen Pilz *Microsphaera alphitoides*, unter Eichen weit verbreitet aber schwer zu quantifizieren, da *M. alphitoides* nicht kultivierbar ist.

Die bisherigen Methoden für die Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche auf der Ebene von Zell- bzw. Kopienzahlen sind schlecht geeignet. Daher wurden zwei neue Quantifizierungsmethoden entwickelt. Die erste, eine auf der "leaf washing"-Technik basierende, mikrobiologische Methode, wurde zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen sowie der Anteile von Bakterien, Pilzen und autotrophen Ammonium- und Nitritoxidierern genutzt. Eine zweite, molekularbiologische Methode wurde zur DNA-Isolation von epiphytischen Mikroorganismen von Blattoberflächen entwickelt. Durch PCR-Ansätze, welche die isolierte DNA und gattungsspezifische Oligonukleotide der "internal spacer region" von Prokaryoten [16S – 23S rDNA] bzw. der "intergenic spacer region" von Eukaryoten [18S – 28S rDNA] enthielten, war es möglich, sowohl die filamentösen Pilze *Cladosporium* spec., *Microsphaera alphitoides* und *Ramularia* spec. als auch das epiphytische Bakterium *Erwinia* spec. zu identifizieren. Ausgehend von diesen Sequenzen wurden Syber® Green Real Time PCR-Systeme zur Quantifizierung von DNA-Kopienzahlen dieser Organismen aufgebaut. Ein phylogenetischer Vergleich der sechs isolierten Sequenzen von *Erwinia* spec. führte so zur Identifizierung zweier Gruppen. Mit Hilfe von spezifischen TaqMan® Real Time PCR-Sonden wurde eine Differenzierung und Quantifizierung dieser beiden Gruppen ermöglicht.

Von Frühling bis Herbst 2000 und 2001 wurden Eichen an zwei verschiedenen Standorten [Berg und Tal] unter verschiedenen UV-B Strahlungsniveaus kultiviert. Mit Hilfe der entwickelten Methoden wurden epiphytische Mikroorganismen auf den Blättern dieser Pflanzen quantifiziert. Mit Ausnahme der autotrophen Ammoniumoxidierer wurden alle beschriebenen Gruppen detektiert und ihre Zell- bzw. DNA-Kopienzahl monatlich bestimmt. Ein Vergleich von Zell- und Kopienzahlen epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen von Eichen, welche mit und ohne UV-B Strahlung angezogen wurden, zeigte in den meisten Proben keine statistisch signifikanten Unterschiede. Daher kann ein drastischer Einfluß der UV-B Strahlung auf epiphytische Mikroorganismen ausgeschlossen werden. Die beobachtete hohe Variabilität zwischen verschiedenen Blattproben erlaubt zur Zeit keine weiteren Schlußfolgerungen zur Wirkung von UV-B Strahlung auf epiphytische Mikroorganismen. Weitere Untersuchungen mit einer deutlich erhöhten Probenanzahl sind daher zur Beantwortung dieser Fragestellung nötig. Im Gegensatz hierzu zeigte ein Standortwechsel der Versuchspflanzen deutlichere Effekte. Blätter von Eichen, welche im Tal angezogen und dann zum Bergstandort transportiert wurden, zeigten im Vergleich zu Pflanzen, die ausschließlich im Tal inkubiert wurden, eine statistisch signifikante bis höchst signifikante Verringerung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie der Anteile von Pilzen. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß eine Veränderung der Umweltbedingungen, z.B. durch einen Standortwechsel, einen drastischen Einfluß auf die Zellzahl epiphytischer Mikroorganismen haben kann.

Abstract

Development and Application of Isolation- and Quantification Methods for epiphytic Microorganisms on Leaf Surfaces of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.)

Epiphytic microorganisms colonize the outer surfaces of plants. They are present on all plants and often influence the health of their host. While some microorganisms are beneficial to their hosts, others are pathogenic. The effect of epiphytic microorganisms on their host – positive or negative – often depends on environmental conditions. Though the plants and the microorganisms share the same space, a change in the environmental conditions may affect both partners in different ways. Less is known about epiphytic microorganisms on the leaves of pedunculate oak (*Quercus robur* L.), an important tree of German forests. Powdery mildew, caused by the obligate parasitic fungi *Microsphaera alphitoides*, occurs widely but is difficult to quantify, as *M. alphitoides* cannot be grown in culture.

The existing methods are not well suited for the quantification of epiphytic microorganisms on leaves on the level of cell or DNA copy numbers. Therefore two new methods were developed for the quantification of epiphytic microorganisms on leaf surfaces of pedunculate oak. The first one, a microbiological method based on leaf washing, was used to determine cell numbers of total heterotrophic microorganisms, bacteria, fungi, autotrophic ammonium- and nitrite oxidizers. A second method, based on molecular biology, was developed for the isolation of DNA of epiphytic microorganisms on leaf surfaces. Using PCR samples containing the isolated DNA and genus specific oligonucleotides of the internal spacer region of prokaryotes [16S – 23S rDNA] and of the intergenic spacer region of eukaryotes [18S – 28S rDNA] it was possible to identify the filamentous fungi *Cladosporium* sp., *Microsphaera alphitoides* and *Ramularia* sp. as well as the epiphytic bacterium *Erwinia* sp.. Based on these sequences Syber® Green Real Time PCR systems were developed for quantification of copy numbers of those organisms. A phylogenetic comparison of six isolated sequences of *Erwinia* sp. led to the identification of two groups. Specific TaqMan® Real time PCR probes were designed, which were suitable for a differentiation and quantification of these two groups.

From spring to autumn in 2000 and 2001 oaks were grown at two different locations [mountain and valley] under different UV-B levels. Epiphytic microorganisms living on leaves of the plants were quantified using the developed methods. Except for autotrophic ammonium oxidizers all described groups were detected and their cell and copy numbers were measured monthly. A comparison of cell and copy numbers of epiphytic microorganisms on oaks, which were grown with and without UV-B light, showed no significant difference [$p > 0.05$] in most samples. Therefore, a drastic influence of UV-B radiation on epiphytic microorganisms can be excluded. The observed high variability between leaves does not allow further conclusions concerning the effect of UV-B on epiphytic microorganisms at this point of time. Further research using a higher number of samples is needed to answer this question. Contrary to these results the effect of a change of location on epiphytic microorganisms showed more distinct results. Leaves of oaks, which were grown in the valley and then transferred to the mountain, showed a significant to highly significant decrease [$p < 0.05$ to $p < 0.001$] in numbers of fungi and total numbers of heterotrophic microorganisms compared to the number of microorganisms on the leaves of plants which were solely grown in the valley. These results clearly show that a change in environmental conditions, e.g. a change of location, may dramatically change the numbers of epiphytic microorganisms.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Epiphytische Mikroorganismen	1
1.2 Einfluß von Umweltfaktoren auf das System Blatt - epiphytische Mikroorganismen	2
1.3 Epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (<i>Quercus robur</i> L.)	5
1.4 Ziele dieser Arbeit	6
2 Material und Methoden	7
2.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Medien	7
2.1.1 Eingesetzte Chemikalien und Kits	7
2.1.2 Verwendete Lösungen und Medien	8
2.2 Pflanzenmaterial und Bodensubstrat	9
2.2.1 Pflanzenmaterial	9
2.2.2 Bodensubstrat und Dünger	10
2.3 Charakterisierung der Meßstandorte	10
2.3.1 Standort Berg	10
2.3.2 Standort Tal	12
2.3.3 Charakterisierung der verwendeten Folien	13
2.4 Beprobung der Versuchspflanzen	14
2.5 Versuchsbegleitende Erfassung von Klimadaten	15
2.6 Mikrobiologische Methoden zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen	17
2.6.1 Most Probable Number-Technik	17
2.6.1.1 MPN-Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen und heterotropher Nitrifizierer	18
2.6.1.2 MPN-Methode zur Bestimmung von Denitrifizierern	19
2.6.1.3 MPN-Methode zur Bestimmung autotropher Ammoniumoxidierer	20
2.6.1.4 MPN-Methode zur Bestimmung autotropher Nitritoxidierer	20
2.6.1.5 Reproduzierbarkeit der Most Probable Number-Methodik	21
2.6.2 Ausplattieren	22
2.6.2.1 Suche eines geeigneten Festmediums zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen	22
2.6.2.2 Verwendung selektiver Hemmstoffe	25

2.7	Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen	26
2.7.1	Verwendeter Vektor und eingesetzte Bakterienstämme	26
2.7.2	Sequenzvergleiche und Suche in der Datenbank	27
2.7.3	Amplifizierung von DNA-Segmenten mittels Polymerasekettenreaktion	27
2.7.3.1	Isolierung von DNA zum Einsatz als Template in Polymerasekettenreaktionen	27
2.7.3.2	Optimierung der PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von DNA-Segmenten verschiedener Mikroorganismen	28
2.7.4	Ligation von PCR-Produkten	29
2.7.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> TG1-Zellen	29
2.7.6	Transformation von <i>E. coli</i> TG1 und Selektion positiver Klone	30
2.7.7	Minipräparation von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly	30
2.7.8	Restriktion von Plasmid-DNA	31
2.7.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA	31
2.7.10	Isolierung hochreiner Plasmid-DNA	33
2.7.11	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Menge	34
2.7.12	Berechnung der Kopienzahl	34
2.7.13	Agarosegelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA-Segmenten	35
2.7.14	Verwendung eines internen Standards zur Bestimmung von Verlusten und zur Berechnung von Wiederfindungsraten während der DNA-Isolation von epiphytischen Mikroorganismen	36
2.7.15	Vergleich unterschiedlicher Methoden der DNA-Isolation epiphytischer Mikroorganismen	37
2.7.15.1	DNA-Isolation nach einer veränderten Minipräparations-Vorschrift von Birnboim & Doly	37
2.7.15.2	DNA-Isolation nach einer verkürzten Minipräparations-Vorschrift von Birnboim & Doly	38
2.7.15.3	DNA-Isolation nach einer Minipräparation für Gesamt-DNA	38
2.7.15.4	Bestimmung von Wiederfindungsraten zum Vergleich unterschiedlicher Methoden zur DNA-Isolation epiphytischer Mikroorganismen	39
2.7.16	Real Time PCR	39
2.7.16.1	Syber® Green-Methode	40
2.7.16.2	TaqMan®-Methode	41
2.7.16.3	Optimierung der Bedingungen für Real Time PCR-Untersuchungen	43
2.8	Flächenbestimmung und mikroskopische Untersuchung von Blättern	44
2.8.1	Bestimmung der Blattflächen	44
2.8.2	Untersuchungen von Blattoberflächen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	44
2.9	Neutralzucker-Bestimmung und -Reduzierung in Extraktionslösungen	45
2.9.1	Spektralphotometrische Untersuchungen der Extraktionslösungen zur Bestimmung der Neutralzuckerkonzentration	45
2.9.2	Auswahl einer geeigneten Methode zur Reduzierung des Neutralzucker-gehaltes in Extraktionslösungen	45

3 Ergebnisse	49
3.1 Entwicklung einer Extraktionsmethode zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen	49
3.1.1 Auswahl einer geeigneten Ablösemethode für epiphytische Mikroorganismen zur Bestimmung der Lebendzellzahl	49
3.1.2 Auswahl eines geeigneten Nährmediums zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen durch Ausplattieren	51
3.2 Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blättern der Stieleiche (<i>Quercus robur</i> L.) mittels der gewählten Extraktionsmethode	52
3.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und heterotropher Nitrifizierer mittels MPN-Technik	53
3.2.2 Quantifizierung von Denitrifizierern mittels MPN-Technik	56
3.2.3 Quantifizierung autotropher Ammoniak- und Nitritoxidierer mittels MPN-Technik	56
3.2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und der Anteile an Bakterien und Pilzen mittels Ausplattieren	56
3.3 Entwicklung einer anzuchtsfreien, molekularbiologischen Quantifizierungsmethode für epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (<i>Quercus robur</i> L.)	59
3.3.1 Entwicklung einer Technik zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche ["Abhebeteknik"]	59
3.3.2 Mikroskopische Untersuchungen der Blattoberseite von Eichenblättern (<i>Quercus robur</i> L.) zum Vergleich verschiedener Ablösetechniken von epiphytischen Mikroorganismen	60
3.3.3 DNA-Isolation aus epiphytischen Mikroorganismen von Blattoberflächen	61
3.3.4 Auswahl geeigneter Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Segmenten mittels Polymerasekettenreaktion [PCR]	62
3.3.4.1 Auswahl von Oligonukleotiden zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Pilze	63
3.3.4.2 Auswahl von Oligonukleotiden zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Bakterien	64
3.3.5 Sequenzierung und Identifizierung von PCR-Amplifikaten epiphytischer Mikroorganismen von Eichenblättern	66
3.3.6 Auswahl geeigneter Oligonukleotide für die Quantifizierung unterschiedlicher mikrobieller Gattungen mittels Real Time PCR	69
3.3.7 Kalibrierung der Real Time PCR-Systeme zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen	72
3.3.8 Validierung des entwickelten Real Time PCR-Systems für <i>Erwinia spec.</i>	74
3.4 Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche mittels Real Time PCR	76
3.4.1 Epiphytische Pilze	76
3.4.2 Epiphytische Bakterien	78

4 Diskussion	79
4.1 Vergleich der Untersuchungsstandorte	79
4.2 Methodenentwicklung	81
4.2.1 Entwicklung einer mikrobiologischen Quantifizierungsmethode für die Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen ["Extraktionsmethode"]	81
4.2.2 Entwicklung einer anzuchtsfreien, molekularbiologischen Quantifi- zierungsmethode für die Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen ["Abhebetechnik"]	85
4.2.2.1 Quantifizierung phytopathogener Pilze	87
4.2.2.2 Quantifizierung epiphytischer Bakterien.....	89
4.3 Quantifizierung von epiphytischen Mikroorganismen der Stieleiche im Jahresverlauf	92
4.3.1 Zeitliche Entwicklung	94
4.3.2 UV-B Einfluß	95
4.3.3 Standort-Einfluß	96
4.4 Ausblick	97
5 Literaturverzeichnis	99
Lebenslauf	107
Danksagung	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Solardome auf dem Wank [Standort Berg].....	11
Abb. 2.2:	Phytokammern am Standort Tal	13
Abb. 2.3:	Spektralphotometrische Untersuchung der UV-B durchlässigen und UV-B undurchlässigen Folie	14
Abb. 2.4:	Erfassung von Lufttemperatur und UV-B Strahlung an den Expositions- standorten	16
Abb. 2.5:	Bestimmung der C _T -Werte einer Real Time PCR	41
Abb. 2.6:	Prinzip der Real Time PCR mittels TaqMan®-Methode	42
Abb. 2.7:	Kalibrationsgerade der Neutralzuckerbestimmung nach	46
	DUBOIS et al. (1956)	
Abb. 3.1:	Vergleich verschiedener Ablösemethoden zur Quantifizierung epi- phytischer Mikroorganismen	50
Abb. 3.2:	Vergleich verschiedener Medien zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels Ausplattieren	52
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung der entwickelten Extraktionsmethode zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen	53
Abb. 3.4:	Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen, hetero- tropher Nitrifizierer und Denitrifizierer auf Blattoberflächen von Stiel- eichen (<i>Quercus robur</i> L.) mittels MPN-Technik	54
Abb. 3.5:	Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und der Anteile an Bakterien und Pilzen auf Blattoberflächen der Stieleichen (<i>Quercus robur</i> L.) durch Ausplattieren	57
Abb. 3.6:	Mikroskopische Aufnahmen von epiphytischen Mikroorganismen auf Eichenblättern zum Vergleich verschiedener Ablösetechniken	61
Abb. 3.7:	Schematische Übersicht der entwickelten Abhebetechnik zur DNA-Iso- lierung aus epiphytischen Mikroorganismen	62
Abb. 3.8	Ausgewählte Oligonukleotide zur Amplifizierung eines DNA-Segments aus <i>Microsphaera</i> spec. mittels PCR	63
Abb. 3.9	Gelelektrophoretische Analyse von PCR-Ansätzen zur Amplifizierung eines Mehltau-DNA-Segments	64
Abb. 3.10	Vergleich der "intergenic spacer region" verschiedener Enterobakterien zur Auswahl gattungsspezifischer Oligonukleotide	65
Abb. 3.11:	Nukleotidsequenzen von rDNA-Segmenten epiphytischer Mikroorga- nismen von Blattoberflächen der Stieleiche	67
Abb. 3.12:	Vergleich sechs unterschiedlicher Sequenzen von <i>Erwinia</i> spec. zur Auswahl von spezifischen TaqMan®-Sonden zur Quantifizierung unter- schiedlicher Gruppen innerhalb der Gattung <i>Erwinia</i>	70
Abb. 3.13:	Kalibrationsgeraden von Syber® Green Real Time PCR-Systemen	72

Abb. 3.14: Kalibrationsgeraden von TaqMan® Real Time PCR-Systemen	73
Abb. 3.15: Bestimmung der Kopienzahlen von rDNA-Segmenten verschiedener <i>Erwinia</i> -Gruppen auf der Oberseite von Eichenblättern	75
Abb. 3.16: Quantifizierung der Kopienzahlen genomischer DNA von epiphytischen Mikroorganismen auf Eichenblättern	77
Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum der von Eichenblättern isolierten <i>Erwinia</i> -Sequenzen	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Beprobungstermine der Versuchspflanzen	15
Tab. 2.2: Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit	21
Tab. 2.3: Wichtige Parameter zur Auswahl geeigneter Real Time PCR-Oligo-.....	40
Tab. 2.4: Wiederfindungsraten von <i>Escherichia coli</i> TG1 in Extraktionslösungen	47
Tab. 2.5: Spektralphotometrische Neutralzuckerbestimmung in Extraktionslösungen	48
Tab. 3.1 Sequenzen aller Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Segmen-	66
Tab. 3.2: Sequenzen aller Oligonukleotide zur Quantifizierung epiphytischer Mikro-.....	71
Tab. 3.3: Querempfindlichkeiten der verwendeten TaqMan®-Sonden zur Quantifi-	75
Tab. 4.1: Vergleich von Zell- und rDNA-Kopienzahl von <i>Escherichia coli</i> TG1.	93

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	m	molar
bp	Basenpaare	M	Molekulargewicht
C	Cytosin	MED	Minimale Erythem-Dosis
CAO	Chemolithoautotrophe Ammoniumoxidierer	MPN	Most Probable Number
CFU	Colony Forming Units	NBCI	National Center for Bio- technology Information / USA
CNO	Chemolithoautotrophe Nitritoxidierer	NN	Normal Null
C_T-Wert	Threshold Cycle	PCR	Polymerase Chain Reaction
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid	rDNA	ribosomale DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	RNA	Ribonuclein Acid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	RTS	Rinden-Torf-Substrat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat	SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	SRS	Sequence Retrieval System (Sequenz-Datenbank von EMBL)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	T	Thymin
DNA	Desoxyribonuclein Acid	TAE	Tris-Acetat-EDTA
dNMP	Desoxynukleosidmono- phosphat	TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin (Quencher)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	TES	Tris-EDTA-Salz
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	U	Unit /Einheit
EREB	Easily Removable Epiphytic Bacteria	U	Uracil
FAM	6-Carboxyfluorescein (Fluoreszenz-Farbstoff)	UV	Ultraviolette Strahlung (100 – 400 nm)
FP - Medium	Fleisch-Pepton Medium	UV-A	Ultraviolette Strahlung (315 – 400 nm)
G	Guanin	UV-B	Ultraviolette Strahlung (280 – 315 nm)
g	Erdbeschleunigung	UV-C	Ultraviolette Strahlung (100 – 280 nm)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid	v/v	volume per volume
ITS	Internal Transcribed Spacer	w/v	weight per volume
kb	Kilo-Basenpaare	WFR	Wiederfindungsrate
LB-Medium	Luria-Bertani Medium	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid

1 Einleitung

Pflanzen sind an ihren natürlichen Standorten einer Fülle von biotischen und abiotischen Umweltfaktoren ausgesetzt, mit denen sie in Wechselwirkung stehen. Ein wichtiger biotischer Faktor sind epiphytische Mikroorganismen, die Thema dieser Arbeit sind.

1.1 Epiphytische Mikroorganismen

Als epiphytische Mikroorganismen werden Viren, Bakterien, Pilze, Algen und Protozoen bezeichnet, die auf überirdischen, Luft umgebenen Pflanzenteilen vorkommen (HIRANO & UPPER, 2000, JACQUES & MORRIS, 1995). Ihr Name leitet sich von den griechischen Silben 'epi': 'auf' und 'phyton': 'Pflanze' ab (JACQUES & MORRIS, 1995) und beschreibt Mikroorganismen, die auf Pflanzen aufsitzen. Einige Autoren bezeichnen dieses Habitat auch als Phyllosphäre oder Phylloplane, wobei diese Begriffe im engeren Sinne Blätter und aufsitzende Mikroorganismen beschreiben (JACQUES & MORRIS, 1995, PARBERY et al., 1981).

Epiphytische Mikroorganismen werden den endophytischen Mikroorganismen gegenüber gestellt, welche innerhalb von pflanzlichen Geweben vorkommen (CARROL, 1988, JACQUES & MORRIS, 1995). Diese beiden Gruppen lassen sich jedoch nicht immer scharf trennen, wenn man die Besiedlung von Interzellularen oder substomatärer Räume berücksichtigt (JACQUES & MORRIS, 1995). Epiphytische Mikroorganismen sind ubiquitär verbreitet und können nahezu alle pflanzlichen Oberflächen besiedeln (HIRANO & UPPER, 2000). Sie kommen auf Samen, Stämmen, Knospen, Blättern, Blüten und Früchten vor (CHAND-GOYAL & SPOTTS, 1996, ERCOLANI, 1991, LIN et al., 1992, PEROMBELON, 1981, WARREN, 1976). Ihr Einfluß auf die Pflanze ist sehr unterschiedlich und reicht von Parasitismus (KUNOH, 1981) über Neutralismus (BRUNEL et al., 1994) bis hin zu Mutualismus [Symbiose im engeren Sinne] (CLAY, 1994). Allerdings sind die "Rollen" nicht immer fest verteilt. Bei vielen epiphytischen Mikroorganismen der Gattungen *Erwinia* und *Pseudomonas* bestimmen Umweltfaktoren und Entwicklungszyklus, ob und wann diese Bakterien neutral oder phytopathogen wirken (HIRANO & UPPER, 2000, JOHNSON & STOCKWELL, 1998, PEROMBELON, 1981).

Eine Reihe von Bodenmikroorganismen, zu denen auch *Rhizobium spec.* zählt, werden als "plant beneficial bacteria" oder auch "plant growth promoting bacteria" bezeichnet, da sie durch symbiontische Stickstoff-Fixierung in der Wurzel die Nährstoffversorgung von Pflanzen verbessern (BASHAN, 1998, SCHLOTTER et al., 1997). Auch auf oberirdischen Pflanzenteilen gibt es epiphytische Mikroorganismen, die einen positiven Effekt auf die Pflanzengesundheit haben. Als "biocontrol" bezeichnet man die Fähigkeit bestimmter Mikroorganismenarten, den Pathogenbefall auf Pflanzenoberflächen zu kontrollieren bzw. zu verringern (BLAKEMAN & BRODIE, 1976, SKIDMORE, 1976, TOMBOLINI et al., 1999, VÖLKSCH & MAY, 2001). Hierfür verantwortlich sind Konkurrenz um Nährstoffe und Raum, aber auch eine Wachstumshemmung pathogener Mikroorganismen durch Freisetzung von Säuren, lytischen Enzymen oder Antibiotika (BLAKEMAN & ATKINSON, 1981, BLAKEMAN & BRODIE, 1976). SULLIVAN und WHITE (2000) beschreiben eine Verringerung des Mehltaubefalls auf Platanenblättern (*Platanus occidentalis* L.) bei Anwesenheit von *Phoma glomerata*, einem parasitisch auf Mehltau wachsenden Pilz. Die Bekämpfung eines Parasiten [Mehltau] durch einen weiteren Parasiten (*Phoma glomerata*) zeigt die Komplexität der Vorgänge in der Phyllosphäre.

Einige epiphytische Mikroorganismen, wie beispielsweise *Pseudomonas syringae*, besitzen die Fähigkeit, durch Kristallisationskeime unterkühltes Wasser zu gefrieren ["ice nucleation activity"] (HIRANO & UPPER, 2000). Hierdurch können Frostschäden an empfindlichen Pflanzen auftreten. Auch wenn Funktion und Nutzen für die Bakterien noch nicht verstanden sind (BEATTIE & LINDOW, 1994), so können Auftreten und Ausmaß von Frostschäden doch mit dem Vorkommen von bestimmten Stämmen von *Pseudomonas syringae* korreliert werden (HIRANO & UPPER, 2000). Eine weitere wichtige Gruppe von epiphytischen Mikroorganismen sind Organismen, die am Stickstoffumsatz beteiligt sind. Während das Vorkommen von Stickstoff-Fixierern auf Pflanzenoberflächen gut untersucht ist (HIRANO & UPPER, 2000, JONES, 1976), gibt es wenige Untersuchungen über die Verbreitung von Denitrifizierern oder Nitrifizierern in der Phyllosphäre (PAPEN et al., 2002). Die Verfügbarkeit von Stickstoff auf Pflanzenoberflächen ist ein wichtiger Faktor für das Wachstum von Pathogenen und beeinflusst somit auch die Blattgesundheit (SNOEIJERS et al., 2000).

Allgemein wird häufig im Verlauf der Vegetationsphase eine Sukzession mehrerer Gruppen von epiphytischen Mikroorganismen beobachtet. Während Bakterien oft auf jungen, sich entwickelnden Blättern vorherrschen, werden sie später von Hefen verdrängt, wohingegen zum Ende der Vegetationsperiode filamentöse Pilze den größten Anteil der epiphytischen Mikroorganismen ausmachen (JACQUES & MORRIS, 1995, KINKEL, 1997).

1.2 Einfluß von Umweltfaktoren auf das System Blatt – epiphytische Mikroorganismen

Epiphytische Mikroorganismen stehen nicht nur in Wechselwirkung zu Pflanzenoberflächen, auf denen sie sitzen, sondern beide Teile dieses Systems sind auch einer Vielzahl von Umweltfaktoren ausgesetzt. Schon die erste Besiedlung von Pflanzenoberflächen durch Mikroorganismen ist abhängig von der umgebenden Vegetation und Keimgehalten der Luft (KINKEL, 1997). Durch Wind, Regen und Insekten erreichen Mikroorganismen verschiedene Pflanzenoberflächen (LEVEAU & LINDOW, 2001). Ob und wie schnell sie dort wachsen können, wird von einer Vielzahl an Parametern bestimmt. Die Nährstoffe auf Pflanzenoberflächen stammen einerseits aus exogenen Quellen, wie Staub, Pollen oder Exkrementen von Blattarthropoden (LEVEAU & LINDOW, 2001, MERCIER & LINDOW, 2000). Insbesondere die Exkremente von Blattläusen ["Honigtau"] können ein rasches Wachstum bestimmter Mikroorganismen bewirken (MERCIER & LINDOW, 2000). Andererseits tritt ein kleiner Teil der in den pflanzlichen Leitungsbahnen transportierten Nährstoffe an die Blattoberfläche und kann von Mikroorganismen genutzt werden (GODFREY, 1976, LEVEAU & LINDOW, 2001, MERCIER & LINDOW, 2000). Bei stark verringerter Transpiration geben Pflanzen Wasser in Tropfenform ab, um ihren Wasserstrom aufrecht zu erhalten, was als Guttation bezeichnet wird (STRASBURGER et al., 1998). Diese Guttationsflüssigkeit enthält ebenfalls eine Reihe von Nährstoffen, die von Mikroorganismen genutzt werden können (FROSSARD, 1981). Die Konkurrenz um Nährstoffe und Raum (KINKEL, 1997) ebenso wie der Einfluß von Fraßfeinden regulieren die Populationsgröße (CARROLL, 1981, STADLER & MÜLLER, 2000). Insbesondere einige Mikroarthropoden können eine deutliche Reduzierung epiphytischer Mikroorganismen bewirken (CARROLL, 1981). Die Populationsgröße wird weiterhin auch von Pathogenen beeinflusst, die nicht nur pflanzliches Gewebe, sondern auch andere Mikroorganismen schädigen können (KUNOH, 1981, SKIDMORE, 1976, SULLIVAN & WHITE, 2000).

Neben diesen biotischen Streßfaktoren sind epiphytische Mikroorganismen, ebenso wie die Pflanzen, auf denen sie sitzen, auch einer Reihe von abiotischen Umweltfaktoren ausgesetzt. Temperatur und Feuchte stellen zwei wichtige Größen dar, die großen Einfluß auf das Wachstum von Mikroorganismen haben (BEATTIE & LINDOW, 1994, HIRANO & UPPER, 2000, KINKEL, 1997). Beide Faktoren unterliegen auch in kurzen Zeitintervallen großen Schwankungen, die zu einem schnellen Wechsel der Umweltbedingungen auf Pflanzenoberflächen führen. Jedoch wirken sich diese Veränderungen nicht an allen Stellen der Pflanzenoberfläche gleich stark aus. Auf Blattoberflächen beispielsweise gibt es eine Reihe von geschützten Stellen ["protected sites"], die in deutlich geringerem Maße Temperatur- oder Feuchtigkeitsschwankungen ausgesetzt sind (BEATTIE & LINDOW, 1994, JACQUES & MORRIS, 1995). Solche Stellen befinden sich beispielsweise entlang von Leitungsgefäßen ["Blattadern"], im substomatären Raum oder an Trichomen (BEATTIE & LINDOW, 1994, JACQUES & MORRIS, 1995, WILSON et al., 1999). Auch die epikutikuläre Wachsschicht ist sehr heterogen und besitzt eine Fülle von mikroskopischen Vertiefungen und Nischen, die Mikroorganismen Schutz bieten können (CUTTER, 1976, KNOLL & SCHREIBER, 1998). Mikroorganismen sind nicht gleichmäßig auf der Blattoberfläche verteilt, sondern treten an solchen Stellen stark gehäuft auf (KINKEL, 1997). Oft bieten diese Stellen nicht nur besseren Schutz vor klimatischen Schwankungen, sondern auch eine verbesserte Nährstoffsituation, wie z.B. entlang von Blattadern. Viele epiphytische Mikroorganismen sind beweglich und können sich aktiv zu solchen Stellen bewegen, was ihnen große Vorteile gegenüber unbeweglichen Bakterien oder Pilzen verschafft (BEATTIE & LINDOW, 1994). Durch Ausbildung von Pili, Cellulosefibrillen oder extrazellulärer Polysaccharide können sich einige Mikroorganismen fest an geeigneten Standorten auf der Pflanzenoberfläche verankern und reduzieren so die Gefahr, durch Wind oder Regen wegtransportiert zu werden (BEATTIE & LINDOW, 1994, KINKEL, 1997). Ein großer Teil der epiphytischen Mikroorganismen auf Blattflächen ist durch ein kompliziertes Netzwerk von extrazellulären Polysacchariden in eine Matrix eingebunden (BEATTIE & LINDOW, 1994). Viele Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch von Biofilmen auf Blattoberflächen (KINKEL, 1997, MORRIS et al., 1998). Diese Matrix bietet ihren Bewohnern zahlreiche Vorteile. Zum einen sind sie besser vor Umwelteinflüssen wie ungünstigen Temperaturen und Feuchtigkeit geschützt, und zum anderen kann hinsichtlich pH-Wert und Ionenstärke ein günstiges Milieu etabliert werden (BEATTIE & LINDOW, 1994, WATNICK & KOLTER, 2000). MORRIS et al. (1998) sind der Meinung, daß ca. 10 bis 40 % der epiphytischen Mikroorganismen auf Endivienblättern (*Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) in einem Biofilm aggregiert sind.

Regen hat vielfältige Einflüsse auf die Phyllosphäre. Stark-Regen-Ereignisse können innerhalb kurzer Zeit zu einer deutlichen Reduzierung der Besiedlungsdichte von Blättern mit epiphytischen Mikroorganismen führen (KINKEL, 1997). Andererseits berichten HIRANO und UPPER (2000) von einer Zunahme epiphytischer Bakterien nach Regen-Ereignissen. Die Autoren erklären diese Beobachtung mit günstigeren Feuchtebedingungen auf der Blattoberfläche. Starker Regen kann auch Mikroarthropoden, welche wiederum Mikroorganismen fressen, von der Pflanzenoberfläche waschen, sowie pH-Wert und Nährstoffsituation auf dem Blatt variieren, so daß ein kurzer Regenschauer durchaus die Artenzusammensetzung und -häufigkeiten stark verändern kann (LEPP & FAIRFAX, 1976).

Ein weiterer, möglicherweise wichtiger abiotischer Umweltfaktor, der gleichermaßen Pflanzen wie epiphytische Mikroorganismen betrifft, ist der **Einfluß der UV-B Strahlung auf das System Blatt – epiphytische Mikroorganismen**. Licht der Wellenlängen 100 - 400 nm wird als Ultraviolette [UV] Strahlung bezeichnet. Diese kann in drei Bereiche unterteilt werden. UV-A Strahlung [315 - 400 nm] ist der langwelligste und somit energieärmste Anteil des UV-Spektrums (WELLBURN, 1997). Der Blaulicht/UV-A Rezeptor

einiger Pflanzen, der beispielsweise die Öffnung von Stomata reguliert, reagiert auf Licht dieser Wellenlänge (STRASBURGER et al., 1998). UV-A Strahlung führt in der Regel zu keiner Schädigung von biologischen Systemen (WELLBURN, 1997). Der biologisch bedeutendste Anteil des UV-Lichts ist der UV-B Bereich [280 - 315 nm], der nur teilweise von der Ozonschicht abgehalten wird, wohingegen der energiereichste und somit potentiell gefährlichste Spektralbereich, der UV-C Bereich [100 - 280 nm], vollständig von der Atmosphäre zurückgehalten wird (WELLBURN, 1997).

Die auf der Erdoberfläche meßbare UV-B Strahlung beträgt lediglich 0,1 % der Globalstrahlung (MAYER, 1997). Dennoch ist sie von sehr großer Bedeutung, da sie eine Vielzahl biologischer Systeme beeinflusst.

Auf molekularer Ebene ist UV-B Strahlung in der Lage, photochemisch mit DNA, RNA, Proteinen, Lipiden oder anderen Molekülen zu reagieren (CALDWELL, 1981, CALDWELL et al., 1998). Moleküle mit Doppel- und/oder Dreifachbindungen werden angeregt und durch Photokatalyse in andere Moleküle umgewandelt. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Bildung von Thymin-Dimeren in der DNA (STRYER, 1996). Die Veränderung einzelner Moleküle kann Auswirkungen bis auf die Ebene von Geweben oder des gesamten Organismus haben (CALDWELL et al., 1998). So wird beispielsweise durch ein Thymin-Dimer in der DNA eine fehlerhafte Sequenzinformation an die RNA weitergegeben, welche die Bildung eines defekten Proteins bedingt, das schließlich zu veränderten Zellen oder Geweben führen kann. Die meisten Organismen verfügen zur Beseitigung solcher Schäden über Reparatursysteme, die jedoch in ihrer Leistungsfähigkeit begrenzt sind.

Auf Ebene des Organismus [Mikroorganismus, Pflanze, Tier] sind eine Vielzahl von UV-Einflüssen beschrieben. Je nach UV-B Strahlungsniveau können sich z.B. bei Pflanzen bestimmte Inhaltsstoffe, Blattflächen, Blütezeitpunkt, Photosyntheseleistung oder Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen ändern (CALDWELL et al., 1998, PAUL, 2000). Ebenso werden auch Mikroorganismen durch UV-B Strahlung beeinflusst. So kann beispielsweise die Sporulation einiger epiphytischer Pilze durch UV-B Strahlung verändert werden (PAUL, 2000).

Der Einfluß von UV-B Strahlung kann auch auf der Ökosystem-Ebene betrachtet werden (CALDWELL et al., 1998). Treten Beeinflussungen nicht nur bei einzelnen Individuen auf, sondern gehäuft innerhalb einer Population, so kann dies auch Folgen für andere Arten dieses Ökosystems haben. PAUL (2000) beschreibt die Verringerung pflanzlicher Biomasse unter erhöhter UV-B Strahlung, was sich durch ein verringertes Nahrungsangebot auf Primärkonsumenten und weitere Glieder der Nahrungskette sowie schließlich auf das gesamte Ökosystem auswirken kann.

Vor diesem Hintergrund wirkt der in der Vergangenheit beobachtete und für die Zukunft noch weiter prognostizierte Anstieg der UV-B Strahlung alarmierend (CALDWELL et al., 1998, REUDER et al., 2001, WELLBURN 1997). Beobachtungen von CALDWELL (1981, CALDWELL et al., 1998) zeigen, daß ein Anstieg der UV-Strahlung größte Auswirkungen im biologisch relevanten Wellenlängenbereich mit sich bringt. Ein Anstieg der UV-Strahlung im Wellenbereich zwischen 280 und 400 nm um nur 1 % bewirkt eine erhöhte DNA-Schädigung um 47 % (CALDWELL, 1981)! Um das biologisch relevante Ausmaß einer erhöhten UV-B Strahlung zu erkennen, sind somit biologische Wirkungsspektren von großer Bedeutung (CALDWELL, 1981, CALDWELL et al., 1998).

UV-B Strahlung beeinflusst ebenfalls das System Blatt – epiphytische Mikroorganismen. Pflanzen besitzen eine Reihe von Schutzmechanismen, welche die Entstehung von Strahlungsschäden verhindern sollen. Von besonderer Bedeutung sind UV-Schirmpigmente,

die durch Absorption der UV-Strahlung in der Epidermis eine Schädigung von tieferliegenden Geweben verhindern (CALDWELL et al., 1998, ROZEMA et al., 2002). Auch bei epiphytischen Mikroorganismen sind solche Schirmpigmente beschrieben (BEATTIE & LINDOW, 1994, JAQUES & MORRIS, 1995). Viele Mikroorganismen, welche von lichtexponierten Standorten isoliert wurden, besitzen eine auffällige Pigmentierung. Jedoch kann nicht grundsätzlich von dieser Färbung auf einen intakten UV-Schutz geschlossen werden (BEATTIE & LINDOW, 1994, JAQUES & MORRIS, 1995). Eine weitere Möglichkeit zum Schutz vor UV-B Strahlung liegt in der Wahl eines geeigneten Standorts. Dies kann innerhalb eines Biofilms oder an geschützten Stellen der Blattoberfläche erfolgen (BEATTIE & LINDOW, 1994). Epiphytische Mikroorganismen zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber UV-B Strahlung. Bei *Pseudomonas syringae* wurden mehrere Gene identifiziert, die für leistungsstarke DNA-Reparatursysteme kodieren und so zu einer deutlich erhöhten Toleranz des Bakteriums gegenüber UV-B Strahlung beitragen (HICKMAN et al., 1987, SUNDIN & MURILLO, 1999).

1.3 Epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Eichen sind in ganz Europa verbreitet und gehören zu den bestandsbildenden Waldbaumarten (HECKER, 1995). Die Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) und die Stieleiche (*Quercus robur* L.) sind die bedeutendsten Arten in Deutschland (BUTIN, 1989). Eichen bedecken etwa 9 % der Waldfläche in Deutschland (BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT, 2001). Beide Eichenarten, die Stieleiche stärker als die Traubeneiche, können vom Eichenmehltau (*Microsphaera alphitoides*) befallen werden. 1907 wurde erstmals dessen epidemisches Auftreten in Mitteleuropa beschrieben (BUTIN, 1989). *Microsphaera alphitoides* zählt zur Ordnung der echten Mehltapilze (*Erysiphales*) und ist ein obligater Parasit (ESSER, 2000). Ein Befall mit Mehltau kann die Holzqualität seines Wirts verändern (GADOURY et al., 2001). Bei der Stieleiche ist ein Einfluß auf Photosynthese und Isoprenemission durch Mehltaubefall beschrieben (NEWSHAM et al., 1997, 2000, BRÜGGEMANN & SCHNITZLER, 2001).

Nur wenige Arbeiten beschäftigen sich mit epiphytischen Mikroorganismen der Stieleiche. NEWSHAM et al. (1997, 2000) konzentrieren ihre Untersuchungen auf eine makroskopische Abschätzung des Mehltaubefalls. Es existieren nahezu keine Informationen zu vorkommenden Arten, zu Zellzahlen oder jahreszeitlichen Populationsdynamiken. Auch der Einfluß der UV-B Strahlung auf die Gesamtheit der epiphytischen Mikroorganismen sowie auf die Wechselwirkungen zwischen Blatt und Mikroorganismen ist nicht bekannt. Zudem sind die zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden ungenügend, da spezifische Sonden für eine molekularbiologische Betrachtung fehlen und die vorhandenen Kultivierungsmethoden nur einen Bruchteil, schätzungsweise weniger als 1 % (KAEBERLEIN et al. 2002), der epiphytischen Mikroorganismen erfassen. Da der Eichenmehltau als obligater Parasit nicht kultivierbar ist, sind noch nicht einmal von diesem wichtigen phytopathogenen Pilz Zell- oder DNA-Kopienzahl auf der Blattoberfläche bekannt.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, detailliertere Erkenntnisse über die Beeinflussung von epiphytischen Mikroorganismen auf Blättern der Stieleiche (*Quercus robur* L.) durch verschiedene Umweltfaktoren zu gewinnen. Von besonderem Interesse sind dabei die Auswirkungen von Standorteigenschaften und UV-B Strahlung sowie die Änderungen der Populationsdichten im Jahresverlauf. Hierzu sollten zunächst geeignete Untersuchungsmethoden entwickelt werden. Um ein möglichst breites Spektrum an Mikroorganismen erfassen zu können, war der Aufbau einer mikrobiologischen und einer molekularbiologischen Methode geplant. Zunächst sollten klassische Kultivierungstechniken zur Quantifizierung von am N-Umsatz beteiligten Mikroorganismen auf Stieleichenblättern angewendet werden, da die Stickstoffverfügbarkeit auf der Blattoberfläche eine wichtige Rolle insbesondere bei der Besiedlung von Pathogenen spielt.

Da ein besonderes Interesse an pathogenen Organismen wie z.B. Mehltau bestand, welche nicht mit mikrobiologischen Quantifizierungstechniken kultivierbar sind, war die Entwicklung einer anzuchtsfreien, molekularbiologischen Methode ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Hierzu war der Aufbau einer Quantifizierungsmethode mittels Real Time PCR geplant. Zur Entwicklung von spezifischen Gensonden für *Erwinia* spec. und *Microsphaera* spec. war zunächst der Nachweis dieser Organismen auf der Blattoberfläche und die Sequenzierung charakteristischer Genomsegmente erforderlich.

Mit diesen Methoden sollte anschließend die jahreszeitliche Entwicklung von epiphytischen Mikroorganismen auf Blättern von Stieleichen untersucht werden, die an zwei unterschiedlichen Standorten unter verschiedenen UV-B Strahlungsexpositionen angezogen wurden.

2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mikroorganismen auf Blattoberflächen von Pflanzen, die unterschiedlichen UV-B Expositionen ausgesetzt waren, untersucht. Die Versuche beinhalteten zum einen die Neu- bzw. Weiterentwicklung aktueller, mikrobiologischer und molekularbiologischer Quantifizierungsmethoden und zum anderen deren Anwendung zur Zell- bzw. Kopienzahlbestimmung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen von Stieleichen (*Quercus robur* L.), die während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 unter verschiedenen Umweltbedingungen angezogen wurden.

Im folgenden werden nach der Beschreibung der verwendeten Materialien (2.1) zunächst der Versuchsansatz erläutert und die beprobten Standorte charakterisiert (2.2-5). Anschließend werden die verwendeten mikrobiologischen und molekularbiologischen Techniken dargestellt (2.6-7).

Wichtige Bereiche der Neu- oder Weiterentwicklung von Methoden werden im Ergebnisteil (3.1, 3.3) behandelt, da sie im Rahmen dieser teilweise methodisch orientierten Doktorarbeit als Ergebnisse zu verstehen sind.

2.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Medien

2.1.1 Eingesetzte Chemikalien und Kits

Agar-Agar, dänisch, pulverisiert	Roth, Karlsruhe
Agarose, hoch rein	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Bengalrosa B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BigDye Terminator Cycle Sequencing RR Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bromocresol Grün	Merck Eurolab, Darmstadt
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Casein nach Hammarstein	Merck Eurolab, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Czapek-Dox Agar	Merck Eurolab, Darmstadt
DAPI [4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid]	Merck Eurolab, Darmstadt
Dextrin aus Kartoffelstärke	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dichloran [2,6-Dichlor-4-nitroanilin]	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA Größenstandard 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Größenstandard 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fleischextrakt	Merck Eurolab, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IPTG [Isopropylthio- β -galaktosid]	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roche Diagnostics, Mannheim
Malzextrakt	Merck Eurolab, Darmstadt

Penicillin G Kaliumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Fleisch, peptisch verdaut	Merck Eurolab, Darmstadt
Pepton aus Gelatine, pankreatisch verdaut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton aus Sojabohnenmehl, enzymatisch verdaut	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol, puffergesättigt	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym <i>Eco</i> RI	Invitrogen, Karlsruhe
<i>RNAse</i> A	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS [Sodiumdodecylsulfate = Natriumlaurylsulfat]	Merck Eurolab, Darmstadt
Stärke, löslich	Merck Eurolab, Darmstadt
Standard I Agar	Merck Eurolab, Darmstadt
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Syber® Green Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
<i>Taq</i> DNA Polymerase, nativ	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan® PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Tris [Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan]	Roth, Karlsruhe
Tween® 80 [Polyoxyethylensorbitanmonooleat]	Roth, Karlsruhe
X-Gal [5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid]	Roth, Karlsruhe

Alle weiteren, nicht in obiger Liste aufgeführten Chemikalien wurden entweder von Merck Eurolab (Darmstadt) oder von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Sofern nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung sämtlicher wäßriger Lösungen und Medien doppelt entionisiertes Wasser verwendet (Milli-Q Water System, Millipore, Schwalbach), im folgenden als Bidest bezeichnet.

2.1.2 Verwendete Lösungen und Medien

LB Medium (Luria-Bertani Medium) zur Anzucht von *Escherichia coli*:

(SAMBROOK et al., 1989)

10 g Pepton aus Casein

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

ad 1000 ml H₂O

pH-Wert 7

LB Agar zur Anzucht von *Escherichia coli*:

(SAMBROOK et al., 1989)

15 g l⁻¹ Agar-Agar in LB Medium

pH-Wert 7

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (25:24:1)

500 ml puffergesättigtes Phenol

480 ml Chloroform

20 ml Isoamylalkohol

SOC Medium (Invitrogen, Karlsruhe)
(Fertiglösung, Zusammensetzung laut Hersteller)
20 g Pepton
5 g Hefeextrakt
3,6 g Glukose (= 20 mM)
1,2 g MgSO₄ (= 10 mM)
0,953 g MgCl₂ (= 10 mM)
0,585 g NaCl (= 10 mM)
0,187 g KCl (= 2,5 mM)

TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer)
40 mM Tris
1 mM EDTA
pH-Wert Einstellung auf 8 mit konzentrierter Essigsäure

TES Puffer (Tris-EDTA-Salz Puffer)
100 mM NaCl
10 mM Tris
1 mM EDTA
pH-Wert Einstellung auf 8 mit HCl

Alle für keimfreies Arbeiten benötigten Medien, Lösungen, Gerätschaften und Verbrauchsmittel wurden durch 20 minütige Dampfsterilisation (Vapoklav 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) bei 121 °C und 1,2 bar Überdruck sterilisiert.

2.2 Pflanzenmaterial und Bodensubstrat

2.2.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen epiphytischer Mikroorganismen wurden auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.) durchgeführt, einer in Deutschland weit verbreiteten und forstwirtschaftlich bedeutenden Baumart (HECKER, 1995). Alle Pflanzen wurden im April 2000 von der Staatlichen Samenklengelaufen bezogen und stammten aus dem bayerischen Voralpenland. Die Eichen wurden seit 1998 in Höhenlagen um 420 Meter aufgezogen und waren während der untersuchten Vegetationsperioden 2000 und 2001 somit zwei bzw. drei Jahre alt.

Die Eichen wurden jeweils in 57 x 7 cm messende PVC-Röhren gepflanzt. Jeweils zwölf dieser Röhren wurden in eine handelsübliche Getränkebox gesetzt, welche in eine mit Wasser gefüllte Kunststoffbox (53 x 35 x 23 cm) gestellt wurde. Durch Löcher im Boden der PVC-Röhren wurde die Wasserversorgung der Pflanzen gewährleistet.

2.2.2 Bodensubstrat und Dünger

Für alle Pflanzen wurde ein Rindentorfsubstrat (RTS, Ökohum, Herbertingen) verwendet, das laut Herstellerangaben folgende Eigenschaften besitzt:

- Zusammensetzung: Rindenhumus, Weißtorf und Grünkompost
- pH-Wert: 5,4 – 6,4
- Salzgehalt: 1,3 – 2,2 g l⁻¹
- Nährstoffgehalte: N: 230 – 430 mg l⁻¹
P: 190 – 360 mg l⁻¹
K: 560 – 800 mg l⁻¹

Bereits in der Staatlichen Samenklengelaufen wurde dem Bodensubstrat im April 2000 3,8 g l⁻¹ Langzeitdünger Osmocote® Plus (Scotts Celaflor, Ingelheim) zugemischt. Nach einem Jahr wurde am 03.05.2001 eine erneute Düngung mit Beeren-Langzeitdünger (Compo, Münster) durchgeführt. Pro Pflanzentopf wurden 10 g Dünger zugegeben. Beide verwendeten Dünger sind sogenannte NPK-Dauerdünger, die nach Herstellerangaben über folgende Zusammensetzung verfügen:

Produktname:	Osmocote® Plus	Beeren-Langzeitdünger
Gesamtstickstoffgehalt (N):	16 %	15 %
verfügbares Phosphat (P ₂ O ₅):	8 %	8 %
wasserlösliches Kaliumoxid (K ₂ O):	12 %	12 %
wasserlösliches Magnesiumoxid (MgO):	2 %	2 %
Wirkungsdauer:	8-9 Monate	6 Monate

2.3 Charakterisierung der Meßstandorte

Die Versuchspflanzen wurden an zwei Standorten unterschiedlichen UV-B Strahlungsintensitäten ausgesetzt.

2.3.1 Standort Berg

Auf dem Wank [1780 m ü. NN], einem Berg in Garmisch-Partenkirchen, wurden 1997 zwei Pflanzenanzuchtskammern, im folgenden als Solardome bezeichnet, eingerichtet (Abb. 2.1). Die Außenhülle der Solardome besteht aus 4 mm dickem Spezialacrylglas (Plexiglas® GS 2458, Röhm, Darmstadt), welches für UV-B Strahlung durchlässig ist. Sie wird von einem Gerüst aus Aluminiumstreben gestützt. Zwischen Außenhülle und Innenraum wurden zur Herstellung unterschiedlicher UV-B Strahlungsniveaus spezielle Folien eingezogen. Ein Solardom wurde mit einer UV-B durchlässigen Folie ausgestattet [Berg UV+], während in den zweiten Solardom eine für UV-B Strahlung undurchlässige Folie eingezogen wurde [Berg UV-] (2.3.3). Im Boden der Solardome wurde die Meß- und Regeltechnik installiert.

Der Kammerinnenraum wurde mit Hilfe mehrerer Lüfter klimatisiert, um einer Überhitzung der Pflanzen entgegenzuwirken. Eine ebenfalls im Boden installierte Heizung verhinderte das Auftreten von Frostereignissen im Innern der Solardome. Berechnungen von BRÜGGEMANN (1999) ergaben, daß im Innern des Solardoms mit UV-B durchlässiger Folie durchschnittlich 54 % bzw. mit UV-B undurchlässiger Folie 12 % des im Wank-Freiland gemessenen UV-B Strahlungsniveaus erreicht wurden. Eine kontinuierliche Aufzeichnung der UV-B Strahlung im Innern der Solardome wurde durch gelegentliche Beschattung der Sensoren durch die Aluminiumstreben der Außenhülle behindert. Daher wurden die angegebenen UV-B Strahlungsniveaus (Abb. 2.4) aus den Daten der UV-B Freiland-Messungen auf dem Wank unter Berücksichtigung der prozentualen Transmission berechnet.

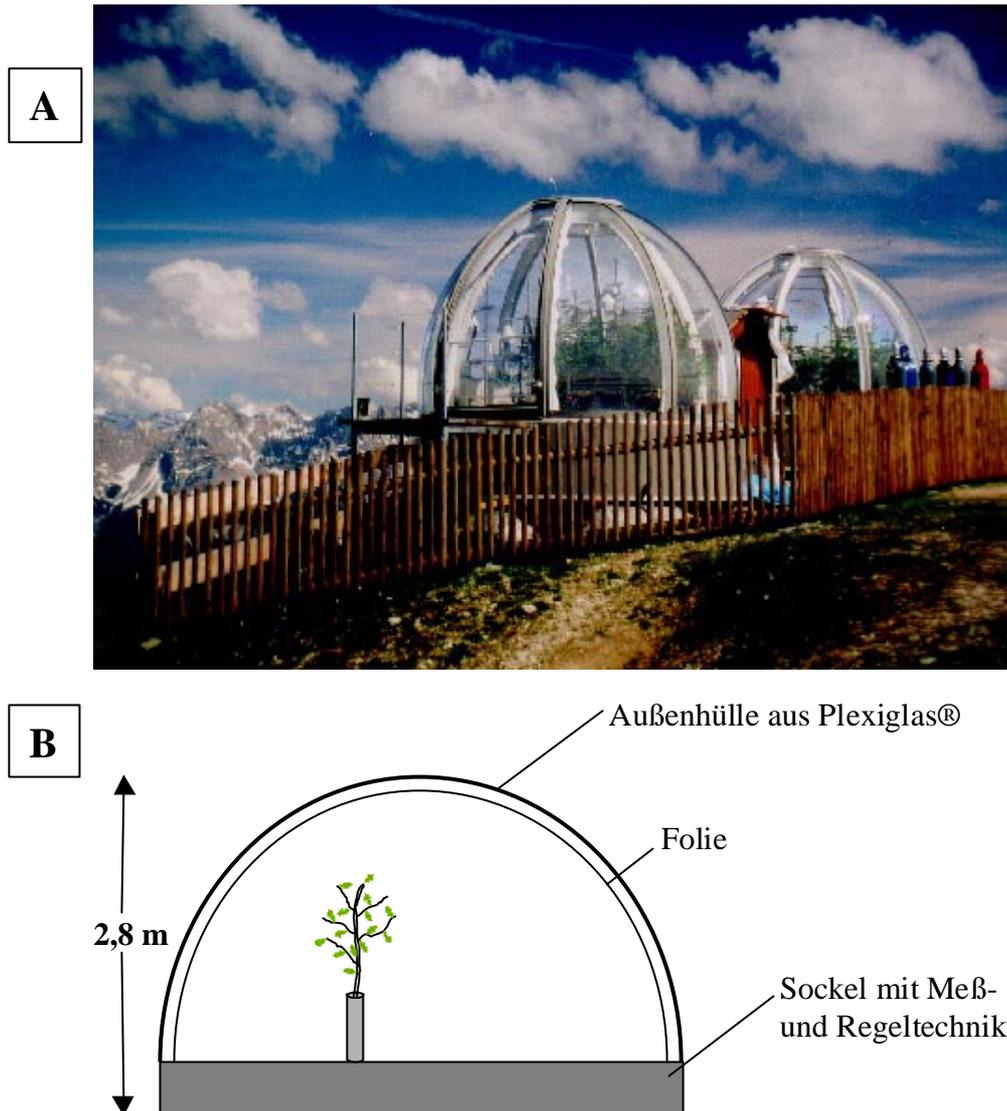


Abb. 2.1: Solardome auf dem Wank [Standort Berg]. Fotografie [J.-P. Schnitzler] [A] und Schemazeichnung [B] der Solardome auf dem Wank [1780 m ü. NN]. Zur Herstellung unterschiedlicher UV-B Expositionen wurden spezielle Folien mit verschiedenen spektralen Durchlässigkeiten (2.3.3) eingesetzt. In den Vegetationsperioden 2000 und 2001 wurden je Solardom zwölf Stieleichen (*Quercus robur* L.) auf epiphytische Mikroorganismen untersucht.

Während beider Vegetationsperioden wurden UV-B Strahlung und Lufttemperatur sowohl im Innern beider Solardome als auch im Freiland gemessen [s.o.]. In jedem Solardom wurden zwölf Eichen (2.2.1) bei unterschiedlichen UV-B Expositionen angezogen und beprobt. Im Gegensatz zum Standort Tal (2.3.2) wurde aufgrund der extremen Umweltbedingungen am Wank keine Freilandkontrolle eingerichtet.

2.3.2 Standort Tal

Für die Untersuchungen am Standort Tal wurden zwei Pflanzenanzuchtskammern auf dem Gelände des Instituts für Meteorologie und Klimaforschung [IMK-IFU] in Garmisch-Partenkirchen [750 m ü. NN], im folgenden als Phytokammern bezeichnet, genutzt (Abb. 2.2). In diesen Kammern wurden die gleichen Materialien wie am Standort Berg verwendet (2.3.1). Die Außenhülle bestand aus 4 mm dickem Plexiglas® (GS 2458 Röhm, Darmstadt), welches von einem Aluminiumgerüst gestützt wurde. Zur Herstellung unterschiedlicher UV-B Strahlungsniveaus wurden die gleichen Folien (2.3.3) wie in den Solardomen (2.3.1) eingesetzt. Eine Charakterisierung der Phytokammern wurde von PANTEN (1998) vorgenommen. Für die Versuche im Jahr 2000 und 2001 wurden einige bauliche Veränderungen durchgeführt, um eine möglichst naturnahe Anzucht der Versuchspflanzen zu ermöglichen. Zum einen wurden an den Südseiten der Phytokammern die unteren Hälften der Außenabdeckung entfernt, wodurch ein 60 cm großer Belüftungsspalt entstand (Abb. 2.2 B). Die im Innenraum der Kammern eingezogenen Folien wurden bis 30 cm über den Kammerboden geführt, so daß eine direkte Sonnenbestrahlung der Pflanzen [ohne Transmission der Folien] verhindert wurde. Zum anderen wurden die Nordwände der Phytokammern vollständig, d.h. sowohl Plexiglas® als auch Folien, entfernt. Die so geschaffenen Öffnungen ermöglichten eine ausreichende Belüftung der Kammern, ohne daß Sonnenlicht ungefiltert auf die Versuchspflanzen treffen konnte. Hierdurch war es möglich, auf den Einsatz von Ventilatoren zu verzichten.

Am Standort Tal wurde je eine Phytokammer mit einer UV-B durchlässigen Folie [Tal UV+] bzw. einer UV-B undurchlässigen Folie [Tal UV-] ausgestattet. Zusätzlich wurde direkt neben den Kammern eine Freilandkontrolle [Tal Freiland] angezogen. In jeder Phytokammer wurden zwölf Stieleichen angezogen und regelmäßig beprobt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Lufttemperatur im Freiland und in den Kammern sowie die UV-B Strahlung im Freiland aufgezeichnet (2.5). Eine kontinuierliche Aufzeichnung der UV-B Strahlung im Innern der Phytokammern erschien nicht sinnvoll, da – wie in den Solardomen auf dem Wank – mit periodischer Beschattung der Sensoren durch das Aluminiumgerüst zu rechnen war. Statt dessen wurde an verschiedenen Tagen in den Jahren 2000 und 2001 die in den umgebauten Phytokammern auf Bestandshöhe wirksame UV-B Strahlung gemessen und mit den im Freiland gemessenen Werten verglichen. Durchschnittlich wurden in der UV-B durchlässigen Kammer 69 % und in der UV-B undurchlässigen Kammer 14 % des Freilandniveaus erreicht. Diese Werte wurden zur Berechnung der UV-B Strahlungsniveaus innerhalb der Phytokammern herangezogen (Abb. 2.4). Vergleichbare Untersuchungen von PANTEN (1998) vor dem Umbau der Kammern ergaben UV-B Strahlungsniveaus von 66 % bzw. 8 % des Freilandwertes. Demzufolge führten die Umbaumaßnahmen nur zu einer minimalen Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Phytokammern.

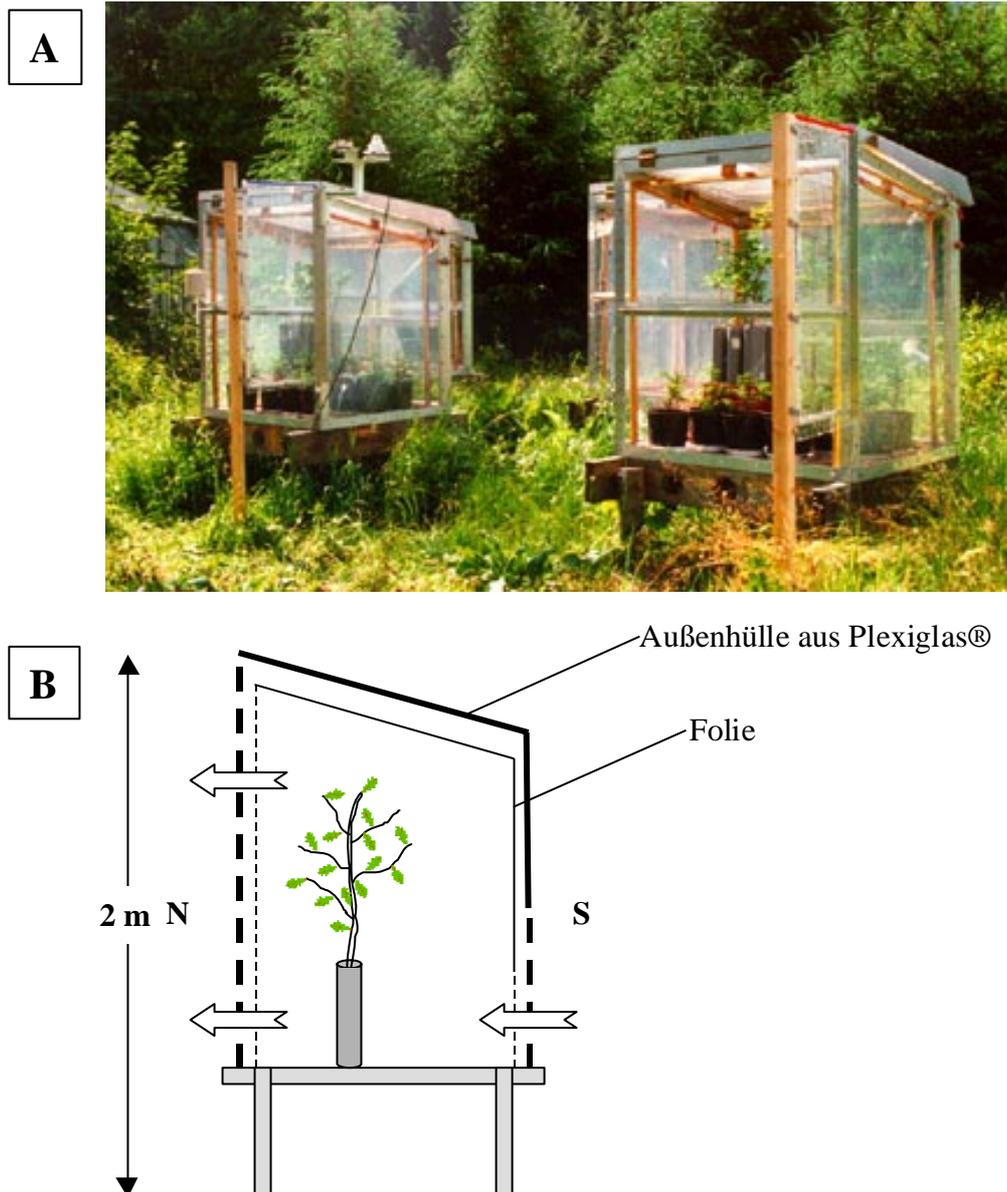


Abb. 2.2: Phytokammern am Standort Tal. Fotografie [A] und Schemazeichnung [B] der Phytokammern auf dem Gelände des Instituts für Meteorologie und Klimaforschung [IMK-IFU] in Garmisch-Partenkirchen [750 m ü. NN]. Unter Verwendung spezieller Folien, die über verschiedene spektrale Durchlässigkeiten (2.3.3) verfügten, wurden in den Phytokammern unterschiedliche UV-B Strahlungsintensitäten erreicht. Je Kammer wurden 12 Stieleichen (*Quercus robur* L.) während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 auf epiphytische Mikroorganismen untersucht.

2.3.3 Charakterisierung der verwendeten Folien

Das in den Pflanzenanzuchtskammern (2.3.1-2) verwendete Plexiglas® sowie die eingesetzten Folien wurden von PANTEN (1998) eingehend charakterisiert. Die zu Versuchsbeginn und -ende durchgeführten eigenen Untersuchungen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse.

Als UV-B durchlässige Folie wurde ein 25 µm dickes Tetrafluorethylen-Ethylenkopolymer eingesetzt (Nowoflon ET 6235, Nowofol, Siegsdorf), während zur weitgehenden Abschirmung der UV-B Strahlung eine 50 µm dicke Polyesterfolie (Folanorm, Folex, Köln) verwendet wurde.

Eine spektralphotometrische Untersuchung (Lambda 2 UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) beider Folien jeweils bei Versuchsbeginn und bei Versuchsende zeigte die unterschiedlichen Durchlässigkeiten der Folien im UV-B Bereich deutlich (Abb.2.3).

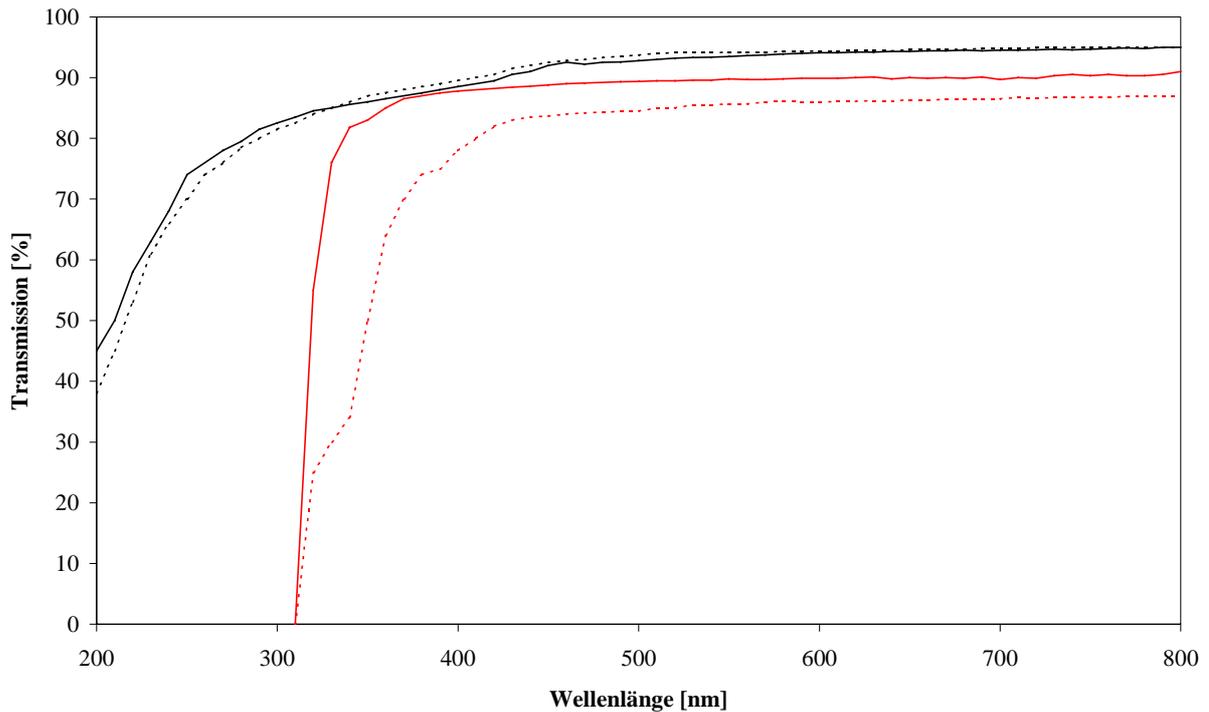


Abb. 2.3: Spektralphotometrische Untersuchung der UV-B durchlässigen und UV-B undurchlässigen Folie. Dargestellt ist die gemessene Transmission gegen Luft. Als UV-B durchlässige Folie wurde Nowoflon ET 6235 (Nowofol, Siegsdorf) und als undurchlässige Folie Folanorm (Folex, Köln) eingesetzt. Beide Folien wurden jeweils vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende vermessen [Gesamtexpositionsdauer: 50 Wochen; in der Winterpause 2000/2001 wurden die Folien vor UV-B Strahlung geschützt aufbewahrt]. Untersucht wurde der Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm mittels eines Spektralphotometers (Lambda 2 UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim). Erklärungen: UV-B durchlässige Folie, Versuchsbeginn [—]; UV-B durchlässige Folie, Versuchsende [---]; UV-B undurchlässige Folie, Versuchsbeginn [—]; UV-B undurchlässige Folie, Versuchsende [---].

2.4 Beprobung der Versuchspflanzen

Die Versuchspflanzen wurden in Garmisch-Partenkirchen an zwei Standorten unterschiedlicher Höhe angezogen. Am Standort Tal [750 m ü. NN] auf dem Gelände des Instituts für Meteorologie und Klimaforschung [IMK-IFU] wurden die Pflanzen drei unterschiedlichen UV-B Strahlungsintensitäten ausgesetzt (2.3.2), während am Standort Berg [1780 m ü. NN] Pflanzen bei zwei unterschiedlichen UV-B Expositionen angezogen wurden (2.3.1). Die verschiedenen UV-B Strahlungsstärken wurden durch Verwendung von

speziellen Folien in den Pflanzenanzuchtskammern erreicht, welche über unterschiedliche Transmissionswerte im UV-B Wellenlängenbereich verfügten (2.3.3).

Zu Beginn der beiden untersuchten Vegetationsperioden [April bis Juni] wurden alle Pflanzen am Standort Tal auf dem Institutsgelände im Freiland angezogen, um eine einheitliche und natürliche Besiedlung der Blattoberflächen mit Mikroorganismen zu ermöglichen. Am 05.06.2000 [Julianischer Tag 157] bzw. 04.06.2001 [Julianischer Tag 155] wurde eine Probennahme zur Bestimmung der Ausgangszellzahlen durchgeführt [Nullprobe]. Anschließend wurden je zwölf Pflanzen den fünf Behandlungsvarianten zugeteilt und in regelmäßigen Abständen beprobt (Tab. 2.1). Zu allen Beprobungsterminen wurden die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie die Anteile an Bakterien und Pilzen auf den Blattoberflächen bestimmt. Weiterhin wurden die Zellzahlen von Denitrifizierern und autotrophen sowie heterotrophen Nitrifizierern ermittelt. Zusätzlich wurden in der Vegetationsphase 2001 Kopienzahlen von rDNA Genomsegmenten von Eubakterien, *Erwinia spec.*, *Cladosporium spec.*, *Microsphaera spec.* und *Ramularia spec.* auf Blattoberflächen bestimmt. Ende Oktober 2000 bzw. 2001 wurden alle Pflanzen zur Überwinterung in ein ungeheiztes Gewächshaus auf dem Institutsgelände gebracht.

Tab. 2.1: Beprobungstermine der Versuchspflanzen. Aufgelistet sind die Daten und die entsprechenden Julianischen Tage, an denen alle Pflanzen während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen beprobt wurden. P: Probennahme.

Probennahme	Vegetationsperiode 2000		Vegetationsperiode 2001	
	Datum	Julianischer Tag	Datum	Julianischer Tag
P 0	05.06.00	157	04.06.01	155
P 1	04.07.00	186	25.06.01	176
P 2	24.07.00	206	16.07.01	197
P 3	21.08.00	234	14.08.01	226
P 4	25.09.00	269	11.09.01	254
P 5	23.10.00	297	16.10.01	289

Während beider Vegetationsperioden wurden alle Versuchspflanzen mit Ausnahme der Freilandkontrolle alle drei Wochen mit einer sterilen synthetischen Regenlösung besprüht. Diese enthielt die für Niederschlag in Garmisch-Partenkirchen üblichen Konzentrationen an Ammonium und Nitrat ($3,65 \text{ mg l}^{-1} \text{ KNO}_3$ und $2,26 \text{ mg l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$) (HAHN, 2000). Hierdurch sollten die durch Niederschlagsereignisse hervorgerufene Befeuchtung der Blattoberfläche sowie ein möglicher Nährstoffeintrag für epiphytische Mikroorganismen simuliert werden.

2.5 Versuchsbegleitende Erfassung von Klimadaten

Während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 wurden Lufttemperatur und UV-B Strahlung aller Pflanzenstandorte gemessen bzw. berechnet. Die Messung der Lufttemperatur in den Solardomen auf dem Wank erfolgte mit je fünf Sensoren des Typs HMP 143 (Vaisala, Helsinki, Finnland), während an den Versuchsstandorten im Tal Temperaturfühler des Typs HP 101A (Rotronic Meßgeräte, Ettlingen) eingesetzt wurden.

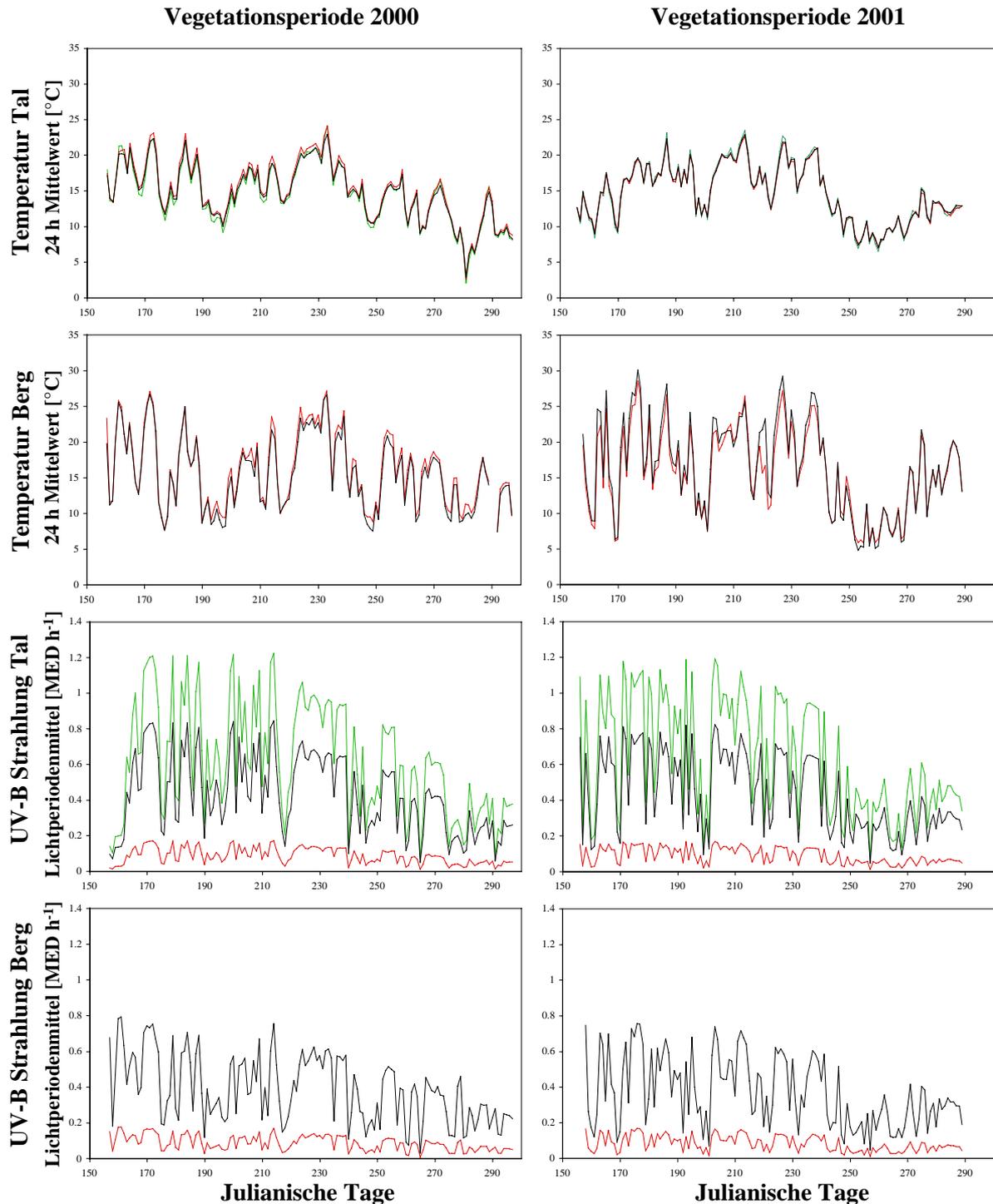


Abb. 2.4: Erfassung von Lufttemperatur und UV-B Strahlung an den Expositionsstandorten. Versuchsbegleitend wurden die Lufttemperatur [24 h Mittelwert] und die UV-B Strahlung [Lichtperiodenmittelwert als MED h^{-1} : Minimale Erythem-Dosis pro Stunde] an allen Expositionsstandorten gemessen bzw. berechnet. Die angegebenen UV-B Strahlungswerte in den Solardomen und in den Phytokammern wurden gemäß der gemessenen Transmission aus den im Freiland gemessenen Strahlungswerten berechnet (2.3). Die Erfassung und Auswertung der Klimadaten am Standort Berg wurden von BRÜGGEMANN (2002) und MAYRHOFER (2002) durchgeführt. Erklärungen: Freiland [—], Pflanzenanzuchtskammer mit UV-B durchlässiger Folie [—], Pflanzenanzuchtskammer mit UV-B undurchlässiger Folie [—].

Für die Messung der UV-B Strahlung wurden an beiden Standorten baugleiche UV-Biometer Typ 501 (Solar Light, Philadelphia, USA) eingesetzt. Diese Weiterentwicklung des Robertson-Berger-Biometers (BERGER, 1976) ist ein Breitbandstrahlungssensor mit einem Empfindlichkeitsbereich von 280 bis 400 nm (User Manual UV-Biometer 501, SOLAR LIGHT COMPANY, 1991), der gemäß dem Erythemwirkungsspektrum der menschlichen Haut (MCKINLEY & DIFFEY, 1987) gewichtet wird. Hierbei werden die verschiedenen Wellenlängen anhand ihrer Fähigkeit bewertet, eine Rötung der menschlichen Haut hervorzurufen. Der berücksichtigte Meßbereich ist somit nicht nur auf den UV-B Strahlungsanteil beschränkt, sondern reicht bis in den UV-A Bereich hinein, was einen Nachteil des Meßprinzips darstellt. Jedoch liegt die gewichtete Empfindlichkeit im UV-B Bereich deutlich über der des UV-A Strahlungsanteils. So wird beispielsweise die spektrale Empfindlichkeit bei 370 nm [UV-A Bereich] um einen Faktor 10 000 geringer bewertet als die spektrale Empfindlichkeit bei 290 nm [UV-B Bereich] (User Manual UV-Biometer 501, SOLAR LIGHT, 1991). Die gemessene UV-B Strahlung wurde in MED h⁻¹ [Minimale Erythem-Dosis pro Stunde] angegeben. 1 MED entspricht der Strahlendosis, die auf der menschlichen Haut eine minimale Rötung auslöst. Für einen durchschnittlichen Menschen des Hauttyps II beträgt diese Strahlungsdosis 210 J m⁻², was einer Bestrahlungsstärke von 0,0538 W m⁻² gleichkommt (User Manual UV-Biometer 501, SOLAR LIGHT, 1991).

2.6 Mikrobiologische Methoden zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen

In diesem Kapitel werden die eingesetzten mikrobiologischen Methoden zur Quantifizierung von Mikroorganismen auf Oberflächen von Eichenblättern dargestellt. Ausgenommen ist die Entwicklung der Extraktionsmethode, welche im Ergebnisteil (3.1) behandelt wird.

Zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt und verglichen. Zum einen wurde die "most probable number" [MPN]-Technik (ALEF, 1991, BAST, 1999) zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie der Anteile autotropher und heterotropher Nitrifizierer und Denitrifizierer eingesetzt. Zum anderen wurden die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie die Anteile an Bakterien und Pilzen mittels Ausplattieren [Spatelplattenverfahren] (ALEF, 1991, BAST, 1999) bestimmt. Die Gesamtzellzahl diente hierbei als Bezugsgröße zum Vergleich beider methodischer Ansätze. Beide Ansätze liefern Lebendzellzahlen und ermöglichen nur die Erfassung von in den eingesetzten Medien kultivierbaren Mikroorganismen.

2.6.1 Most Probable Number-Technik

Die MPN-Technik zählt zu den klassischen Methoden der mikrobiologischen Quantifizierung und arbeitet mit Flüssignährmedien (ALEF, 1991). Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst eine Dezimalverdünnungsreihe aus der zu untersuchenden Probe hergestellt. In drei Parallelen wurden Aliquots aus jeder Verdünnungsstufe in Nährmediumröhrchen pipettiert und diese nach Inkubation auf mikrobiellen Bewuchs bzw. mikrobielle Stoffwechselaktivität untersucht. Zur Auswertung wurden die pro Verdünnungsstufe positiv bewerteten Röhrchen gezählt. Mit Hilfe spezieller MPN-Tabellen (ALEF, 1991) wurde aus der Anzahl positiv

bewerteter Nährmediumröhrchen in drei aufeinander folgenden Verdünnungsreihen eine sogenannte Stichzahl ermittelt. Diese, multipliziert mit der kleinsten Verdünnungsstufe, in der noch Bewuchs nachgewiesen wurde, ergab die höchst wahrscheinlichste Zellzahl der zu untersuchenden Probe.

Beispiel:

Es wurde eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe, bestehend aus vier Konzentrationsstufen, hergestellt und je Verdünnungsstufe Aliquots à 1 ml in drei Parallelen untersucht. Bei der Auswertung von bewachsenen ["positiven"] Nährmediumröhrchen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

10^{-1} Verdünnung	: 3 Positive	}	zur Ermittlung der Stichzahl herangezogen
10^{-2} Verdünnung	: 3 Positive		
10^{-3} Verdünnung	: 2 Positive		
10^{-4} Verdünnung	: 0 Positive		

Unter dem Eintrag **320** wurde in der benutzten MPN-Tabelle (ALEF, 1991) die Stichzahl "9" ermittelt. Das heißt, das eingesetzte Aliquot [1 ml] der Verdünnungsstufe 10^{-2} enthielt 9 Zellen. Hieraus ergab sich eine Zellzahl von $9 \times 10^2 = 900$ Zellen ml^{-1} für die zu untersuchende Probe. Dieses Ergebnis stellt die "höchst wahrscheinlichste Zellzahl" dar. Zusätzlich kann aus den MPN-Tabellen ein Konfidenzintervall berechnet werden, in welchem die "tatsächlichen Werte" mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegen. Dieses Intervall ist abhängig von der Anzahl der pro Verdünnungsstufe eingesetzten Parallelen und berechnet sich für obiges Beispiel [3 Parallelansätze] durch Addition bzw. Subtraktion von 0,670 zum bzw. vom dekadischen Logarithmus der berechneten Zellzahl (ALEF, 1991):

Höchst wahrscheinliche Zellzahl	: $900 \approx 10^{2,954}$ Zellen ml^{-1}
Untergrenze des Konfidenzintervalls	: $10^{(2,954-0,670)} = 10^{2,284} \approx 192$ Zellen ml^{-1}
Obergrenze des Konfidenzintervalls	: $10^{(2,954+0,670)} = 10^{3,624} \approx 4207$ Zellen ml^{-1}

Für die unterschiedlichen Fragestellungen wurden vier MPN-Systeme in analoger Weise angewandt. Jeweils 5 ml [bzw. 9 ml des Denitrifikationsmediums, s.u.] der entsprechenden Medien (2.6.1-4) wurden in Reagenzgläser gefüllt, mit Labocap-Kappen (Roth, Karlsruhe) verschlossen und autoklaviert. Im Verlauf der Vegetationsperioden wurden unterschiedliche Verdünnungen der Extraktionslösung (3.1) eingesetzt [unverdünnt bis 10^{-5}], da die Gesamtzellzahlen sowohl im Verlauf der Vegetationsperiode als auch zwischen den einzelnen Standorten deutliche Unterschiede aufwiesen (Abb. 3.4). Je Beprobungstermin wurden vier Konzentrationsstufen untersucht. In drei Parallelansätzen wurde jeweils 1 ml der Verdünnungsstufen zu den Nährmediumröhrchen pipettiert und diese anschließend - je nach Medium unterschiedlich lange - inkubiert.

2.6.1.1 MPN-Methode zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen und heterotropher Nitrifizierer

Das verwendete Fleisch-Pepton-Medium [FP-Medium] (PAPEN & VON BERG, 1998) ermöglichte, die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen und die Anzahl heterotropher Nitrifizierer in einem Versuchsansatz gleichzeitig zu bestimmen.

Zusammensetzung des FP-Mediums

(PAPEN & VON BERG, 1998):

5 g Pepton aus Fleisch

3 g Fleischextrakt

1 g Agar-Agar

H₂O ad 1000 ml

pH 7

Bei der Herstellung wurde das Medium kurz erhitzt, um den enthaltenen Agar-Agar in Lösung zu bringen. Nach Beimpfung der Röhren wurden alle Ansätze für drei Wochen bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung wurden alle Röhren wöchentlich aufgeschüttelt.

Zur Bestimmung der Anzahl heterotropher Nitrifizierer wurden wöchentlich jeder gewachsenen Kultur 20 µl entnommen und mittels Teststäbchen (Roth, Karlsruhe) auf Bildung von Nitrit und Nitrat untersucht. Das Vorkommen von Nitrit oder Nitrat wurde als positiver Nachweis heterotroph nitrifizierender Mikroorganismen gewertet (ALEF, 1991). Die wöchentliche Wiederholung dieser Untersuchung wurde durchgeführt, um sicher zu stellen, daß keine zwischenzeitlich herangewachsenen Nitrifizierer übersehen wurden, die bis zum Versuchsende unter Umständen von anderen Organismen "überwachsen" worden sein könnten. PAPEN & VON BERG (1998) konnten im FP-Medium keine meßbaren Stoffmengen Nitrit oder Nitrat nachweisen. Dieses Ergebnis wurde durch eigene Untersuchungen der bei allen Ansätzen mitgeführten Mediumskontrollen [ohne Inokulum] bestätigt.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen wurde die Anzahl bewachsener Kulturen am Ende der Inkubationszeit bestimmt.

2.6.1.2 MPN-Methode zur Bestimmung von Denitrifizierern

Zum Nachweis denitrifizierender Mikroorganismen wurde ein modifiziertes Fleisch-Pepton-Medium eingesetzt (PAPEN & VON BERG, 1998).

Zusammensetzung des Denitrifikationsmediums

(verändert nach PAPEN & VON BERG, 1998):

5 g Pepton aus Fleisch

3 g Fleischextrakt

1 g Glukose

3 g KNO₃

H₂O ad 1000 ml

pH 7

Es wurden jeweils 9 ml Denitrifikationsmedium in 16 cm hohe Reagenzgläser gefüllt, ein Probengefäß [2 ml Volumen, Roth, Karlsruhe] mit der offenen Seite nach unten zugegeben und die Reagenzröhren anschließend mit Labocap-Kappen (Roth, Karlsruhe) verschlossen. Nach dem Autoklavieren waren die zugegebenen Probengefäße [Funktionsweise als Durham-Röhren] vollständig und ohne Luftblasen mit umgebenem Medium gefüllt. In drei Parallelansätzen wurde jeweils 1 ml jeder Verdünnungsstufe der Extraktionslösung (3.1) in ein Nährmediumröhrchen pipettiert. Es wurden vier Konzentrationsstufen [unverdünnt, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³] jeder Probe getestet. Anschließend wurden alle Reagenzgläser mit Gummistopfen mit umstülpbarem Rand (15 mm Durchmesser, Fisher Scientific, Schwerte) luftdicht verschlossen und für sechs Wochen bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Diese Voraussetzungen

boten geeignete Wachstumsbedingungen für Denitrifizierer. Alle Ansätze, die nach sechs Wochen eine Gasblase in den Probengefäßen aufwiesen, wurden als positiv für die Detektion von Denitrifizierern gewertet. DAUM (1999) zeigte, daß in der Gasblase hohe Konzentrationen an N_2O enthalten waren, welches eines der charakteristischen Produkte der Denitrifikation darstellt.

2.6.1.3 MPN-Methode zur Bestimmung autotropher Ammoniumoxidierer

Zur Untersuchung chemolithoautotropher Ammoniumoxidierer [CAO] wurde folgendes Minimalmedium eingesetzt:

Zusammensetzung des CAO-Mediums

(verändert nach PAPEN et al., 1991):

0,5 g NH_4Cl

0,2 g KH_2PO_4

0,04 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$

0,002 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$

0,01 g $FeSO_4$

0,01 g EDTA-Dinatriumsalz

H_2O ad 1000 ml

pH 7,4 [eingestellt mit 5 %iger $NaCO_3$ -Lösung]

Alle Ansätze wurden nach Beimpfung für neun Wochen bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Unter diesen Bedingungen waren nur chemolithoautotrophe Bakterien wachstumsfähig, da nur diese fähig sind, durch Oxidation von Ammonium zu Nitrit Energie zu gewinnen. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden alle Nährmedienröhrchen wöchentlich aufgeschüttelt. Alle Ansätze wurden nach Ende der Inkubationszeit mittels Nitrit-Nitrat-Teststäbchen (Roth, Karlsruhe) auf Nitritbildung untersucht. Alle Nährmediumröhrchen, in denen Nitrit nachgewiesen wurde, wurden als positiv gewertet.

2.6.1.4 MPN-Methode zur Bestimmung autotropher Nitritoxidierer

Die Quantifizierung chemolithoautotropher Nitritoxidierer [CNO] erfolgte analog zur Bestimmung chemolithoautotropher Ammoniumoxidierer (2.6.1.3). Es wurde jedoch ein CNO-Minimalmedium eingesetzt, welches sich vom CAO-Medium im pH-Wert sowie in der Verwendung von Natriumnitrit an Stelle von Ammoniumchlorid als Elektronenendakzeptor unterscheidet.

Zusammensetzung des CNO-Mediums

(verändert nach PAPEN et al., 1991):

0,5 g $NaNO_2$

0,2 g KH_2PO_4

0,04 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$

0,002 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$

0,01 g $FeSO_4$

0,01 g EDTA-Dinatriumsalz

H_2O ad 1000 ml

pH 7 [eingestellt mit 5 %iger $NaCO_3$ -Lösung]

Zum Nachweis von Nitritoxidierern wurden 20 µl der zu untersuchenden Kultur mit 1 µl 10 %iger Amidoschwefelsäure gemischt, um Nitritionen abzufangen, welche den Nitratnachweis stören. Anschließend wurden die Kulturen mittels Nitrit-Nitrat-Teststäbchen (Roth, Karlsruhe) untersucht. Alle Nährmediumröhrchen, in denen Nitrat nachweisbar war, wurden als positiv gewertet.

2.6.1.5 Reproduzierbarkeit der Most Probable Number-Methodik

Das erwähnte Beispiel zur Berechnung der höchst wahrscheinlichsten Zellzahl (2.6.1) zeigte eine große Spannweite zwischen unterer [192 Zellen ml⁻¹] und oberer Grenze des Konfidenzintervalls [4207 Zellen ml⁻¹] auf Basis des 95 % Vertrauensbereichs. Daher wurden weitere Versuche zur Reproduzierbarkeit der Methode durchgeführt. Hierzu wurde dieselbe Extraktionslösung (3.1) in neun unabhängigen MPN-Ansätzen auf die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen untersucht (2.6.1.1), wobei die Konzentrationsstufen 10⁻² bis 10⁻⁴ untersucht wurden (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Untersuchungen zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der MPN-Technik. Dieselbe Extraktionslösung (3.1) wurde in neun unabhängigen MPN-Ansätzen (n = 9) auf die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen untersucht (2.6.1.1). Je Ansatz wurden die Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁴ in drei Parallelansätzen analysiert. Angegeben sind die höchst wahrscheinlichsten Zellzahlen, die Grenzen der Konfidenzintervalle sowie Mittelwert und Standardabweichung.

Ansatz	MPN-Stichzahl	Höchst wahrscheinlichste Zellzahl [Zellen ml ⁻¹]	untere Grenze des Konfidenzintervalls [Zellen ml ⁻¹]	obere Grenze des Konfidenzintervalls [Zellen ml ⁻¹]
1	320	900	192,3	4207,3
2	320	900	192,3	4207,3
3	320	900	192,3	4207,3
4	320	900	192,3	4207,3
5	310	400	85,5	1870,7
6	310	400	85,5	1870,7
7	310	400	85,5	1870,7
8	320	900	192,3	4207,3
9	311	700	149,6	3273,4
Mittelwert		711,1		
Standardabweichung		242,1		

2.6.2 Ausplattieren

Eine weitere klassische Quantifizierungsmethode der Mikrobiologie ist das Ausplattieren [Spatelplattenverfahren (BAST, 1999)]. Hierbei wird ein Aliquot der zu untersuchenden Probe auf einer Nährmedienplatte mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt, bis die Flüssigkeit vollständig in das Medium eingezogen ist. Alle Mikroorganismen, die unter diesen Bedingungen kultivierbar sind, vermehren sich während der Inkubationszeit und bilden so makroskopisch sichtbare Kolonien. Diese werden anschließend gezählt, und unter Berücksichtigung der eingesetzten Aliquotmenge kann die Lebendzellzahl der untersuchten Probe als "Kolonien bildende Einheiten" ["colony forming units", CFU] angegeben werden.

2.6.2.1 Suche eines geeigneten Festmediums zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen

Für die Kultivierung und Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen wurde zunächst ein geeignetes Festmedium gesucht. Es wurden 19 unterschiedliche Medien getestet, die in der Literatur zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen genutzt wurden (ANDREWS et al., 1987, ATLAS & PARKS, 1993, BRUNEL et al., 1994, CHAND-GOYAL & SPOTTS, 1996, JACQUES et al., 1995, KINKEL et al., 1989a, LIN et al., 1992, MORRIS et al., 1998, NEWSHAM et al., 1997, POPLAWSKY & CHUN, 1998, STARMER et al., 1987, THOMPSON et al., 1993, TOMBOLINI et al., 1999). So fern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Medien entsprechend der von ATLAS und PARKS (1993) angegebenen Zusammensetzung eingesetzt. Alle Medien wurden dampfsterilisiert und anschließend in Petrischalen gegossen. Für eine erste Untersuchung wurden jeweils 50 µl einer Extraktionslösung, die epiphytische Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche enthielt (3.1), auf zwei Petrischalen jedes Mediums ausplattiert. Alle Petrischalen wurden für zehn Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, und nach fünf, sieben und zehn Tagen wurde die Anzahl von Kolonien bildenden Einheiten [CFU] bestimmt. Acht der eingesetzten Medien erwiesen sich als ungeeignet, da sie verglichen mit den elf anderen Medien eine deutlich geringere CFU-Anzahl oder Nachteile in der Handhabung aufwiesen. Als optimale Anzuchsbedingung wurde eine Inkubation von sieben Tagen bei Raumtemperatur ermittelt, die für alle weiteren Versuche beibehalten wurde.

Die elf verbliebenen Medien wurden für eine zweite, genauere Untersuchung eingesetzt. Jedes Medium wurde in vier Parallelen untersucht. Nach Inkubation für sieben Tage wurde die Anzahl von Kolonien bildenden Einheiten bestimmt. Beste Ergebnisse [hohe CFU-Zahl, gute Handhabung und gute Reproduzierbarkeit] wurden mit dem Sojabohnen-Agar erzielt (Abb. 3.2), der für alle weiteren Versuche benutzt wurde.

Auflistung der untersuchten Medien:

Cycloheximid-Agar:

verändert nach ATLAS und PARKS (1993)

50 g Glukose
15 g Agar-Agar
5 g Pepton aus Casein
4 g Hefeextrakt
0,55 g KH_2PO_4
0,425 g KCl
0,125 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,125 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
22 mg Bromocresolgrün
2,5 mg FeCl_3
2,5 mg MnSO_4
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 5,6

Czapek-Dox-Agar:

nach Merck Eurolab, Darmstadt
48 g Czapek-Dox Agar Fertigmedium
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 7,3

Bengalrot-Agar:

verändert nach ATLAS und PARKS (1993)
15 g Agar-Agar
10 g Glukose
5 g Pepton aus Sojabohnenmehl
1 g KH_2PO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,05 g Bengalrot
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Dichloran-Bengalrot-Agar:

verändert nach ATLAS und PARKS (1993)
15 g Agar-Agar
10 g Glukose
5 Pepton aus Casein
1 g KH_2PO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,025 g Bengalrot
0,0025 g Dichloran
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 5,6

Dichloran-Glycerin-Agar:

180 g Glycerin
15 g Agar-Agar
10 g Glukose
5 g Pepton aus Casein
1 g KH_2PO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
2 mg Dichloran
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 5,6

Fleisch-Pepton-Agar:

PAPEN und VON BERG (1998)
15 g Agar-Agar
5 g Pepton aus Fleisch
3 g Fleischextrakt
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Glukose-Pepton-Agar:

verändert nach ATLAS und PARKS (1993)
20 g Pepton aus Casein
15 g Agar-Agar
10 g Glukose
5 g NaCl
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 4,8

Kartoffel-Stärke-Agar:

300 g Kartoffeln wurden in 500 ml H_2O
für 30 Minuten gekocht, durch mehrere
Lagen Mull (Hans Hepp Medizintechnik,
Hamburg) gefiltert.
20 g Glukose
15 g Agar-Agar
 H_2O ad 1000 ml
pH-Wert 5,6

LB-Agar:

nach SAMBROOK ET AL. (1989)

15 g Agar-Agar
10 g Pepton aus Casein
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Malzextrakt-Agar:

30 g Malzextrakt
15 g Agar-Agar
5 g Pepton aus Casein
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 5,4

MT42-Agar:

(eigene Vorschrift)

15 g Agar-Agar
5 g Glukose
5 g Pepton aus Casein
2 g NaCl
1 g Malzextrakt
1 g Hefeextrakt
1g Fleischextrakt
0,5 g KH₂PO₄
0,1 g MgSO₄ x 7 H₂O
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Nährstoff-Agar:

15 g Agar-Agar
5 g Pepton aus Casein
5 g NaCl
2 g Hefeextrakt
1 g Fleischextrakt
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7,4

Sabouraud-Maltose-Agar:

verändert nach ATLAS und PARKS (1993)

40 g Maltose
15 g Agar-Agar
10 g Pepton aus Casein
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 5,6

Stärke-Casein-Agar:

15 g Agar-Agar
10 g lösliche Stärke
2 g K₂HPO₄
2 g KNO₃
2 g NaCl
0,3 g Casein
0,05 g MgSO₄ x 7 H₂O
0,02 g CaCO₃
0,01 g FeSO₄ x 7 H₂O
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Standard I-Agar:

nach Merck Eurolab, Darmstadt
37 g Standard I Agar Fertigmedium
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7,5

Standard Plate Count-Agar:

15 g Agar-Agar
5 g Pepton aus Casein
2,5 g Hefeextrakt
1 g Glukose
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7

Sojabohnen-Agar:

17 g Pepton aus Casein
15 g Agar-Agar
5 g NaCl
3 g Pepton aus Sojabohnenmehl
2,5 g Glukose
2,5 g K₂HPO₄
pH-Wert 7,3

Verdünnter Sojabohnen-Agar:

15 g Agar-Agar
1,7 g Pepton aus Casein
0,5 g NaCl
0,3 g Pepton aus Sojabohnenmehl
0,25 g Glukose
0,25 g K₂HPO₄
H₂O ad 1000 ml
pH-Wert 7,3

Wort-Agar:

15 g Agar-Agar
 15 g Malzextrakt
 12,75 g Maltose
 2,75 g Dextrin
 2,35 g Glycerin
 1 g K₂HPO₄
 1 g NH₄Cl
 0,78 g Pepton aus Gelatine
 H₂O ad 1000 ml
 pH-Wert 4,8

2.6.2.2 Verwendung selektiver Hemmstoffe

Durch die Zugabe verschiedener, selektiver Hemmstoffe zu dem verwendeten Sojabohnen-Agar (2.6.2.1) wurden bestimmte Organismen gezielt in ihrem Wachstum gehemmt. Der gezielte Einsatz selektiver Hemmstoffe ermöglichte die Kultivierung von unterschiedlichen Mikroorganismen-Gruppen:

- Heterotrophe Organismen: unveränderter Sojabohnen-Agar zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen.
- Bakterien: Zusatz des Eukaryoten-Hemmstoffs Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Endkonzentration von 50 mg l⁻¹ Sojabohnen-Agar (MORRIS et al., 1998). Cycloheximid hemmt die *Peptidyltransferase* der eukaryotischen 60S-Ribosomenuntereinheit und blockiert so die Proteinsynthese (STRYER, 1996).
- Pilze: Zusatz einer Antibiotikallösung in einer Endkonzentration von 83 mg l⁻¹ Penicillin G Kaliumsalz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 30 mg l⁻¹ Streptomycinsulfat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) im Sojabohnen-Agar (LIN et al., 1992). Penicillin hemmt die *D-Alanin-Transpeptidase* von Gram-positiven Bakterien, welche die Quervernetzung des Peptidoglukans bewirkt, und verhindert so die Zellwandsynthese wachsender Bakterien (STRYER, 1996). Im Gegensatz hierzu bindet Streptomycin an das Protein S12 der 30S-Ribosomenuntereinheit Gram-negativer Bakterien, wodurch die Initiation der Proteinbiosynthese gestört wird. Zusätzlich kann Streptomycin eine Fehlablesung der mRNA verursachen, was eine Mißgestaltung der synthetisierten Proteine bewirkt (STRYER, 1996).
- Resistente Organismen: Zugabe von Cycloheximid, Penicillin und Streptomycin in oben angegebenen Konzentrationen zur Ermittlung der Anzahl resistenter Mikroorganismen.

Alle selektiven Hemmstoffe wurden dem Medium in Form einer 50-fach konzentrierten, sterilfiltrierten Stammlösung unmittelbar vor dem Gießen der Agarplatten zugesetzt. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden in Bidest gelöst, während die Cycloheximid-Stammlösung in Ethanol angesetzt wurde. Die Cycloheximid-Endkonzentration im Medium von 50 mg l⁻¹ war wasserlöslich.

2.7 Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen

In diesem Kapitel werden allgemeine Standardmethoden, wie Polymerasekettenreaktion ["polymerase chain reaction", PCR], Transformation und die Sequenzierung von Genomsegmenten beschrieben. Weiter werden das Prinzip der quantitativen PCR kurz erläutert und die durchgeführten Untersuchungen und Berechnungen zur Bestimmung der Kopienzahl dargestellt. Die Entwicklung der Abhebetechnik zur DNA-Isolation von epiphytischen Mikroorganismen sowie der Aufbau von Real Time PCR-Systemen werden im Ergebnisteil beschrieben (3.3).

2.7.1 Verwendeter Vektor und eingesetzte Bakterienstämme

Für alle Ligationen von PCR-Segmenten wurde der Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser 3,9 kb große Vektor wird vom Hersteller in linearisierter Form geliefert. An den Vektorenden befindet sich je ein überhängendes T [Deoxythymidin] sowie eine kovalent gebundene *Topoisomerase I*. Unter Verwendung der *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Karlsruhe) wurden PCR-Segmente mit an den Enden überhängenden A [Deoxyadenosin] amplifiziert. Beim Zusammentreffen beider Komponenten erfolgt die Ligation des PCR-Amplifikats in den Vektor.

Der Vektor besitzt ein *lacZ α* -Fragment, welches durch die multiple Klonierungsstelle unterbrochen ist. Religieren beide Vektorenden ohne Einbau des PCR-Inserts, ist das translatierte Enzym funktionsfähig und kann bei Anwesenheit des Induktors IPTG das Substrat X-Gal zu dem Produkt 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umsetzen. Dieses Produkt verursacht eine tief blaue Färbung der entsprechenden Kolonie und kann somit als Selektionsmarker genutzt werden. Ligiert ein PCR-Amplifikat mit dem Vektor, so wird das *lacZ α* -Fragment unterbrochen und kein funktionsfähiges Protein translatiert. Diese Kolonien sind farblos. Des Weiteren enthält der pCR2.1-TOPO-Vektor zwei Resistenzgene gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin. Nach der Transformation des Vektors in kompetente Bakterienzellen erfolgt mit Hilfe der Antibiotikaresistenzen sowie der Koloniefärbung die Selektion geeigneter Klone (2.7.6). Für die Transformationen wurden kompetente Zellen zweier Bakterienstämme verwendet:

Escherichia coli TG1: Wildtyp-Stamm

Genotyp: *supE hsd Δ 5 thi Δ (lac-proAB)*; F' [*traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15*] (SAMBROOK et al. 1989). Bevor *E. coli* TG1-Zellen zur Transformation eingesetzt werden konnten, war die Herstellung kompetenter Zellen erforderlich (2.7.5)

Escherichia coli TOP10F[']: (Invitrogen, Karlsruhe):

Genotyp: F' [*lacI^f Tn10(Tet^R)*] *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*. Dieser Bakterienstamm wurde vom Hersteller bereits in Form kompetenter Zellen geliefert.

2.7.2 Sequenzvergleiche und Suche in der Datenbank

Ermittelte Sequenzdaten wurden mit Sequenzen der Datenbanken SRS [Sequence Retrieval System] von EMBL [European Molecular Biology Laboratory] und GenBank von NCBI [National Center for Biotechnology Information der USA] verglichen. Hierzu wurden die Programme Blast 2.2.2 (ALTSCHUL et al., 1997) und Fasta 3.3 (PEARSON & LIPMAN, 1988) eingesetzt. Zum Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen untereinander wurde das Softwareprogramm Clustal W 1.8 herangezogen, während für die phylogenetischen Untersuchungen das Softwareprogramm PAUP 3.0 genutzt wurde.

2.7.3 Amplifizierung von DNA-Segmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Meßsysteme zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels Real Time PCR entwickelt. In den folgenden Kapiteln werden die verwendeten Methoden, wie Gewinnung geeigneter Template-DNA für PCR-Ansätze, Ligation, Transformation und Sequenzierung, beschrieben.

2.7.3.1 Isolierung von DNA zum Einsatz als Template in Polymerasekettenreaktionen

Für den Aufbau von Real Time PCR-Systemen zur Quantifizierung von epiphytischen Pilzen und Bakterien (3.3.6) wurden zunächst spezifische Sequenzinformationen dieser Organismen benötigt. Hierzu wurde genomische DNA epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche isoliert und mittels PCR geeignete Genomsegmente amplifiziert. Die Isolierung dieser DNA erfolgte auf unterschiedliche Weisen.

Die für die Amplifizierung von Genomsegmenten phytopathogener Pilze [*Cladosporium* spec., *Microsphaera* spec. und *Ramularia* spec.] benötigte DNA wurde nicht mit Hilfe der Abhebetechnik (3.3.1) gewonnen, da diese Methode zu diesem Zeitpunkt noch im Entwicklungsstadium war. Statt dessen wurde ein Stück Pilzmycel herbstlicher Eichenblätter mit einem sterilen Skalpell von der Blattoberfläche entfernt und in 200 µl sterilem Wasser suspendiert. Durch anschließendes fünfminütiges Kochen wurden die Pilzzellen aufgeschlossen und diese Lösung als Ausgangs-DNA für PCR-Ansätze (2.7.3.2) verwendet.

Zum Zeitpunkt der Entwicklung eines Quantifizierungssystems für *Erwinia* spec. war die Abhebetechnik (3.3.1) einsatzbereit. Diese Technik ermöglichte die Isolierung von PCR-fähiger DNA epiphytischer Mikroorganismen von Eichenblättern der Freilandbäume (2.2, 2.3.2).

Zur Quantifizierung von Eubakterien wurde ein bereits etabliertes Real Time PCR-System (BACH et al., 2002) angewandt. Die für die Kalibrierung dieses Systems benötigte Standard-DNA wurde aus *Escherichia coli* TG1 (2.7.1) gewonnen. Hierzu wurde 1 ml einer in LB-Medium (2.1.2) frisch gewachsenen Übernachtskultur von *E. coli* TG1 zum Zellaufschluß fünf Minuten in kochendem Wasser inkubiert und anschließend 1:1000 mit sterilem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde als Ausgangs-DNA für Polymerasekettenreaktionen eingesetzt.

2.7.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von DNA-Segmenten verschiedener Mikroorganismen

Die Auswahl geeigneter Oligonukleotide für eine Amplifizierung der gewünschten DNA-Segmente wird im Ergebnisteil (3.3.4) beschrieben. Mit Hilfe dieser Primer (Tab. 3.1) und der isolierten DNA epiphytischer Mikroorganismen (2.7.3.1) wurden die PCR-Bedingungen der verschiedenen Ansätze optimiert. Alle hierfür benötigten Reagenzien wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Ausgangspunkt für alle Amplifizierungsversuche war folgender Standard-PCR-Ansatz:

Komponente und Konzentration der Stammlösung:	Eingesetztes Volumen:	Endkonzentration im 50 μ l PCR-Ansatz:
PCR-Puffer [10 x]	5 μ l	1 x
MgCl ₂ [50 mM]	2 μ l	2 mM
dNTP-Mix [je 10 mM]	1 μ l	je 0,2 mM
DNA-Template [unbekannt]	1 μ l	unbekannt
Detergenz W-1 [1 %] optional	1 μ l	0,02 %
Forward Primer [100 μ M]	1 μ l	2 μ M
Reverse Primer [100 μ M]	1 μ l	2 μ M
H ₂ O	ad 50 μ l	
<i>Taq</i> DNA Polymerase [1 U μ l ⁻¹]	1 μ l	0,02 U μ l ⁻¹

Alle PCR-Ansätze wurden in einem TRIO Thermoblock (Biometra, Göttingen) inkubiert. Die verwendete *Taq* DNA Polymerase wurde erst nach einer zehnmütigen Denaturierung des PCR-Ansatzes zugegeben [s.u.]. Für alle Ansätze wurde mit Ausnahme der Annealing-Temperatur und der Polymerisationszeit immer das gleiche Temperaturprogramm genutzt:

36 mal	1. Schritt: einmaliges Denaturieren	10 Minuten bei 95 °C
	2. Schritt: Zugabe <i>Taq</i> DNA Polymerase	10 Minuten bei 85 °C
	3. Schritt: Denaturieren	30 Sekunden bei 94 °C
	4. Schritt: Annealing	30 Sekunden bei 48 – 66 °C
	5. Schritt: Polymerisation	30 – 60 Sekunden bei 72 °C
	6. Schritt: Ende	bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C

Von diesen Bedingungen ausgehend wurden durch Variation der Magnesiumkonzentration, der Annealing-Temperatur und durch An- oder Abwesenheit eines Detergenz [W-1 %], welches zur Erhöhung der Thermostabilität der verwendeten *Taq* DNA Polymerase eingesetzt wurde, die PCR-Bedingungen für eine bestmögliche Amplifizierung des gewünschten DNA-Segments optimiert.

Beste Ergebnisse zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Pilze wurden mit der Primerkombination "ITS1 for" und "Mic rev" (Tab. 3.1) bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 2 mM im Ansatz und einer Annealing-Temperatur von 58 °C erreicht. In diesem Ansatz wurde kein Detergenz verwendet, und die Polymerisationszeit betrug eine Minute. Geeignete Amplifikate von *Erwinia* spec. wurden in PCR-Ansätzen mit den Primern "Erwin for2" und "Erwin rev2" (Tab. 3.1) unter Verwendung von 2 mM MgCl₂, 0,02 % Detergenz W-1 bei einer Annealing-Temperatur von 53 °C und 30 Sekunden Polymerisationszeit synthetisiert. Eine optimale Amplifizierung von *Escherichia coli* TG1-

Genomsegmenten wurde bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 2 mM, einer Annealing-Temperatur von 55 °C, einer Minute Polymerisationszeit und Verwendung der Primer "Ecoli16S for" und "Ecoli16S rev" (Tab. 3.1) verwirklicht. Alle genannten Primer (Tab. 3.1) wurden in einer Endkonzentration von 2 μM eingesetzt. Die Größe der amplifizierten Segmente wurde anschließend mittels Gelelektrophorese bestimmt (2.7.13).

2.7.4 Ligation von PCR-Produkten

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Amplifikate (2.7.3.2) in den Vektor pCR2.1-TOPO (2.7.1) ligiert. Beim Zusammentreffen des PCR-Amplifikats, welches an beiden Enden ein überhängendes Deoxyadenosin besaß, mit dem Vektor, der an beiden Enden über überhängende Deoxythymidine verfügte, wurden beide Komponenten durch die kovalent gebundene *Topoisomerase I* ligiert (2.7.1). Folgender Ligationsansatz wurde für alle Versuche verwendet (alle Reagenzien aus TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen, Karlsruhe):

0,5 – 4 μl PCR-Produkt
1 μl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$)
1 μl pCR2.1-TOPO Vektor
ad 5 μl H_2O

Nach dem Mischen aller Komponenten und einer Inkubationszeit von 30 Sekunden bis 30 Minuten wurden 2 μl dieses Ansatzes zur Transformation kompetenter Zellen genutzt.

2.7.5 Herstellung kompetenter *E. coli* TG1-Zellen

Bakterienzellen, die zur Aufnahme externer DNA fähig sind, werden als kompetent bezeichnet. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde das Hitzeschock-Verfahren nach SAMBROOK et al. (1989) angewandt. Hierzu wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* TG1 [16 Stunden Inkubation bei 37 °C] in LB-Medium (2.1.2) mit frischem Medium 1:100 verdünnt und erneut für zwei Stunden in einem Wasserbadschüttler (Julabo SW-20C, Seelbach) bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Eisbad für 30 Minuten. Bei allen weiteren Arbeitsschritten wurde auf eine ununterbrochene Kühlung der Bakterien geachtet. Zur Sedimentation der Zellen wurde für zehn Minuten bei 8 000 x g und 4 °C zentrifugiert (JA14 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Beckman-Coulter, München). Der Überstand wurde verworfen und dem Pellet 25 ml eiskalte 50 mM $CaCl_2$ -Lösung zugegeben. Durch diesen Reinigungsschritt wurden einerseits Mediumreste entfernt, und andererseits erhöhte $CaCl_2$ die Durchlässigkeit der Zellmembran. Zur erneuten Sedimentation wurde bei gleichen Bedingungen [s.o.] zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 1 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen von *E. coli* TG1 waren für ca. 24 Stunden in der Lage, externe DNA aufzunehmen.

2.7.6 Transformation von *E. coli* TG1 und Selektion positiver Klone

Für Transformationen wurden entweder kompetente Zellen von *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, Karlsruhe) oder von *E. coli* TG1 verwendet (2.7.1, 2.7.5). Die Durchführung der Transformation war für beide *E. coli*-Stämme ähnlich: 2 µl des Ligationsansatzes (2.7.4) wurden mit 50 µl eisgekühlter, kompetenter *E. coli* TOP10F' bzw. 100 µl *E. coli* TG1-Zellen (2.7.5) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung für 30 [für TOP10F'-Zellen] bzw. 40 Sekunden [für TG1-Zellen] bei 42 °C. Hierdurch wurde die Durchlässigkeit der Bakterienzellwand und somit die Effektivität der Aufnahme externer DNA erhöht. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium (2.1.2) zu den TOP10F'-Zellen bzw. 1 ml LB-Medium (2.1.2) zu den TG1-Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um im Vektor enthaltene Resistenzgene zu aktivieren. 50 und 250 µl TOP10F'-Zellen bzw. 200 und 900 µl TG1-Zellen wurden auf je eine LB-Agarplatte (2.1.2), der 100 µg ml⁻¹ Ampicillin und je 32 µg ml⁻¹ X-Gal und IPTG zugesetzt waren, ausplattiert. Unter diesen Bedingungen wuchsen nur Zellen, welche durch die Aufnahme des Vektors ampicillinresistent geworden waren. Nach zwölf bis 16 Stunden Inkubation bei 37 °C erschienen blaue und weiße Kolonien auf den Agarplatten. Blaue Kolonien deuteten auf Zellen mit insertlosem Vektor hin, wohingegen weiße Zellen für Klone mit insertragenden Vektoren sprachen (2.7.1) und weiter untersucht wurden.

2.7.7 Minipräparation von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly

Durch die Transformation (2.7.6) wurden insertragende Vektoren in *E. coli*-Zellen eingebracht. Nach Kultivierung der Bakterien wurden die Plasmide mit einem von BIRNBOIM und DOLY (1979) beschriebenen Verfahren isoliert. Zunächst wurden Inokula ausgewählter Klone (2.7.6) in Reagenzgläser mit 5 ml LB-Medium (2.1.2) und 25 µg ml⁻¹ Kanamycin überführt. Nach zwölf bis 16 Stunden Inkubation bei 37 °C in einem Wasserbadschüttler (Julabo SW-20C, Seelbach) wurden 1,5 ml dieser Kultur durch zweiminütige Zentrifugation bei 4 °C und 22 000 x g (Tischzentrifuge 3K15, Sigma, Laborzentrifugen, Osterode am Harz) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl BD1-Lösung [50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 4 mg ml⁻¹ Lysozym] resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl BD2-Lösung [0,2 M NaOH, 1 % SDS] und fünf Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein alkalischer Zellaufschluß. Anschließend wurden 150 µl BD3-Lösung [3 M NaCH₃COO, pH 5] zur Neutralisation und zum Ausfällen von Salzen zugesetzt. Nach Mischen der Lösung durch mehrfaches Invertieren wurde für fünf Minuten auf Eis inkubiert, bevor Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile durch zehnminütige Zentrifugation [s.o.] sedimentiert wurden. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße mit 500 µl vorgelegter Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1, 2.1.2) überführt, mehrfach invertiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch wurden Proteine und SDS aus der wäßrigen Phase entfernt. Zur Phasentrennung wurde anschließend für 15 Minuten zentrifugiert [s.o.]. Die wäßrige Phase [Oberphase] wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml reinem Ethanol versetzt, durch Invertieren gemischt und zur Fällung der Plasmid-DNA zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 16 Minuten zentrifugiert [s.o.]. Der Überstand wurde entfernt und 0,5 ml 70 %iges Ethanol zum Waschen der sedimentierten DNA zugefügt. Nach Zentrifugation [fünf Minuten, s.o.] wurde der Überstand entfernt und die Plasmid-DNA durch fünfminütige Inkubation im Vakuumexsikkator (Eppendorf Concentrator 5301, Köln) bei 30 °C getrocknet. Abschließend

wurde das DNA-Pellet in 50 μl H_2O resuspendiert und mittels Restriktion und Agarosegelelektrophorese (2.7.8, 2.7.13) überprüft, ob das isolierte Plasmid das gewünschte Insert enthielt.

2.7.8 Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind in der Lage, wenige Basen lange DNA-Sequenzen zu erkennen und dort spezifisch zu schneiden. Bei den hier beschriebenen Ansätzen wurde ausschließlich das Restriktionsenzym *Eco* RI (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Der verwendete Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) enthält zwei *Eco* RI-Schnittstellen, die jeweils nur wenige Basen vor und hinter der Insertionsstelle des PCR-Amplifikats liegen. Durch Verwendung des unten aufgeführten Restriktionsansatzes wurde das PCR-Insert um insgesamt 17 Basen verlängert aus dem Vektor herausgetrennt. Dieser Versuch war eine wichtige Kontrolle, um zu überprüfen, ob die zuvor isolierte Plasmid-DNA (Kap. 2.7.7) über ein Insert erwarteter Größe verfügte.

Restriktionsansatz:

2 μl REakt III Puffer [1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8; 0,1 M MgCl_2]
2 μl *RNAse* Lösung [0,1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$]
1-10 μl Plasmid-DNA-Lösung [ca. 0,3 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$]
1 μl *Eco* RI [10 U μl^{-1}]
ad 20 μl H_2O

Obige Komponenten wurden gemischt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.13) untersucht. Ansätze, in denen Banden der gesuchten Größe sichtbar waren, wurden sequenziert.

2.7.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Bestimmungen von Basensequenzen der untersuchten epiphytischen DNA-Segmente erfolgte unter Verwendung eines automatischen Sequenziergeräts (ABI PRISM™ 310, Applied Biosystems, Weiterstadt) und dem hierzu passenden Sequenzierkit (BigDye Terminator Cycle Sequencing RR Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt). Für alle untersuchten Proben wurde folgende Sequenzreaktion angesetzt:

1 μl Plasmid-DNA [ca. 200 - 500 ng]
3,5 μl M13 Forward oder Reverse Primer [5 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$] (Invitrogen, Karlsruhe)
4 μl Terminator-Mix (s.u., Applied Biosystems, Weiterstadt)
ad 20 μl H_2O

Alle Reaktionen wurden mit folgendem Temperaturprogramm in einem Thermoblock (Personal Cyler 3.01, Biometra, Göttingen) durchgeführt:

25 mal	[1. Schritt: Einmaliges Denaturieren	1 Minuten bei 96°C
		2. Schritt: Denaturieren	30 Sekunden bei 96 °C
		3. Schritt: Annealing	15 Sekunden bei 50 °C
		4. Schritt: Polymerisation	4 Minuten bei 60 °C
		5. Schritt: Ende	bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C

Bei den hier verwendeten M13 Primern handelt es sich um allgemeine Sequenzierungsprimer, die komplementär zu Sequenzabschnitten auf dem Vektor pCR2.1-TOPO sind. Die Primerbindungsstellen sind für den "M13 (-20) forward Primer" 93 Basen bzw. für den "M13 reverse Primer" 90 Basenpaare von dem Insertbereich des Vektors entfernt.

Im Gegensatz zur PCR wurde beim Sequenzierungsansatz jeweils nur ein Primer [forward oder reverse] eingesetzt, so daß keine exponentielle Vermehrung, sondern lediglich eine lineare Vervielfältigung der Template-DNA erfolgte. Für jedes zu sequenzierende Plasmid wurden zwei Sequenzreaktionen angesetzt, einmal unter Verwendung des "M13 forward Primers" und einmal unter Einsatz des "M13 reverse Primers".

Der in der Sequenzreaktion verwendete Terminator-Mix beinhaltet nach Herstellerangaben Tris-HCl pH 9, MgCl₂, *Ampli Taq DNA Polymerase*, FS mit hitzestabiler *Diphosphatase*, dNTPs und BigDye markierte Didesoxy-Nukleosidtriphosphate [ddNTPs] (Applied Biosystems, Weiterstadt). Als Markierungen der ddNTPs wurden vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe auf Rhodaminbasis verwendet, so daß jede Base nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge emittierte. Durch die fehlende Hydroxylgruppe an der 3' Position der Didesoxyribose führte der Einbau von ddNTPs zu einem Abbruch der Polymerisationsreaktion ["Terminator"]. Dadurch entstanden DNA-Segmente unterschiedlicher Größe, die jeweils am Ende eine fluoreszenzmarkierte Base besaßen.

Im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion wurde eine Ethanol-fällung zur Entfernung der *Taq DNA Polymerase* und ungebundener Nukleotide durchgeführt. Hierzu wurden dem Sequenzansatz 80 µl H₂O, 10 µl 3 M NaCH₃COO [pH 5] und 250 µl reines Ethanol zugesetzt und gemischt. Zur Sedimentation der DNA wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C und 22 000 x g zentrifugiert [Tischzentrifuge 3K15, Sigma, Laborzentrifugen, Osterode am Harz]. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 250 µl 70 %igem Ethanol nachgereinigt. Nach erneuter Zentrifugation [5 Min., s.o.] wurde der Überstand entfernt und die DNA durch fünfminütige Inkubation in einem Rotationsexsikkator (Eppendorf Concentrator 5301, Köln) bei 30 °C getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 25 µl Template Suppression Reagent (Applied Biosystems) resuspendiert, durch zweiminütige Inkubation in kochendem Wasser denaturiert und anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde in spezielle Sequenziergefäße mit Septen (Applied Biosystems) überführt und in den Probenaufgeber des Sequenzers gestellt.

Zur Sequenzanalyse wurden die DNA-Proben durch Anlegen einer Spannung von 2 kV für 90 Sekunden elektrokinetisch auf eine 61 cm lange Kapillarsäule (Applied Biosystems) aufgetragen, die auf 50 °C temperiert wurde. Diese war mit einem Spezialpolymer (Performance Optimized Polymer 6, Applied Biosystems) gefüllt, das vor jeder neuen Probenaufgabe automatisch erneuert wurde. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Trennung der unterschiedlich großen DNA-Segmente, indem eine Spannung von 12 kV und ein Strom von 5 µA angelegt wurde. Das eingesetzte System war in der Lage, DNA-Segmente, deren Größe sich lediglich in einer Base unterschied, zu trennen. Nach Anregung mit einem Laser emittierten die fluoreszenzmarkierten Basen an den Enden der DNA-Stränge

Licht unterschiedlicher Wellenlänge, welches detektiert wurde und die Identifizierung der entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe und somit auch der entsprechenden Basen ermöglichte. Alle untersuchten DNA-Proben wurden stets von beiden Leserichtungen sequenziert, um durch den Vergleich der komplementären DNA-Stränge Lesefehler zu eliminieren.

Die Steuerung des Sequenziergeräts sowie die Aufnahme der Rohdaten erfolgte anhand des Softwareprogramms "ABI PRISM™ 310 Collection 1.0.4" (Applied Biosystems). Die Datenauswertung wurde mit dem Programm "Sequencing Analysis 3.0" (Applied Biosystems) durchgeführt.

2.7.10 Isolierung hochreiner Plasmid-DNA

Für eine quantitative Untersuchung von DNA-Segmenten epiphytischer Mikroorganismen (2.7.11-12) war die mittels Minipräparation von Plasmid-DNA nach BIRNBOIM und DOLY (1979) gewonnene DNA (2.7.7) nicht geeignet, da diese RNA-Verunreinigungen enthielt. Die Isolation hochreiner, RNA-freier Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung eines Reinigungskits (Plasmid Mini Purification Kit, Qiagen, Hilden). Hierzu wurde ein Inokulum der zu untersuchenden Klone in 5 ml LB-Medium (2.1.2) mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin oder $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin für zwölf bis 16 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Wasserbadschüttler (Julabo SW-20C, Seelbach) inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden für zwei Minuten zentrifugiert [$4 \text{ }^\circ\text{C}$, $22\,000 \times g$, Tischzentrifuge 3K15, Sigma, Laborzentrifugen, Osterode am Harz]. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $300 \mu\text{l}$ Puffer 1 [$50 \text{ mM Tris-HCl pH } 8$, 10 mM EDTA , $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A, Qiagen, Hilden] resuspendiert. Nach Zugabe von $300 \mu\text{l}$ Puffer 2 [200 mM NaOH , 1% SDS, Qiagen, Hilden] erfolgte ein alkalischer Zellaufschluß während einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die anschließende Zugabe von $300 \mu\text{l}$ eiskaltem Puffer 3 [$3 \text{ M KCH}_3\text{COO}$, $\text{pH } 5,5$, Qiagen, Hilden] neutralisierte die Lösung. Durch Inkubation für fünf Minuten auf Eis wurden Salze und SDS ausgefällt, danach wurde die Lösung für zehn Minuten zentrifugiert [s.o.]. Der Überstand wurde auf ein Qiagen-tip 20 Säulchen aufgetragen, welches zuvor durch Zugabe von 1 ml QBT-Puffer [750 mM NaCl , $50 \text{ mM MOPS pH } 7$, 15% Triton X-100, 15% Isopropanol, Qiagen, Hilden] equilibriert wurde. Durch die viermalige Zugabe von je 1 ml QC-Puffer [1 M NaCl , $50 \text{ mM MOPS pH } 7$, 15% Isopropanol, Qiagen, Hilden] wurden RNA-Moleküle, Detergenz- und Proteinreste entfernt und die im Säulenpackbett gebundene Plasmid-DNA gereinigt. Durch Zugabe von $800 \mu\text{l}$ QF-Puffer [$1,25 \text{ M NaCl}$, $50 \text{ mM Tris-HCl pH } 8,5$, 15% Isopropanol, Qiagen, Hilden] wurde die Plasmid-DNA eluiert. Zur Entfernung von Salzen wurde die DNA gefällt. Hierzu wurden dem Eluat $560 \mu\text{l}$ Isopropanol zugegeben und für 30 Minuten zentrifugiert [s.o.]. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal durch Zugabe von $1 \text{ ml } 70 \%$ igem Ethanol nachgereinigt. Anschließend wurde das Pellet für fünf Minuten in einem Rotationsexsikkator (Eppendorf Concentrator 5301, Köln) bei Raumtemperatur getrocknet und in $20 \mu\text{l H}_2\text{O}$ resuspendiert. Sofern mittels gelelektrophoretischer Analyse (2.7.13) keine Anzeichen einer Verunreinigung erkannt wurden, erfolgte die spektrophotometrische Quantifizierung der DNA-Menge dieser Plasmid-Lösung.

2.7.11 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Menge

Für die quantitative Bestimmung von epiphytischen Mikroorganismen mittels Real Time PCR (3.4) war die Kalibrierung dieses Systems mit DNA-Lösungen bekannter Kopienzahl unabdingbare Voraussetzung. Hierzu wurde die DNA-Menge der hochreinen Plasmidisolierungen (2.7.10) bestimmt. Ausgehend von dieser Messung wurde die DNA-Kopienzahl in den Plasmid-Lösungen berechnet.

DNA- und RNA-Moleküle können durch UV-Licht der Wellenlänge 260 nm angeregt werden. Diese Eigenschaft kann zur spektralphotometrischen Bestimmung der Nukleinsäuremenge genutzt werden. Eine relative Absorption [oder Optische Dichte] von 1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (SAMBROOK et al., 1989).

Zur Bestimmung der DNA-Menge wurden jeweils 10 μl der gereinigten Plasmid-DNA (2.7.10) mit 590 μl H_2O gemischt und 500 μl dieser Lösung in eine Quarzglasküvette (Suprasil Quarzglas, Hellma, Müllheim) gefüllt. Die Absorption bei 260 nm wurde an einem Spektralphotometer (Lambda 2 UV/VIS Spectrometer, Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim) gegen H_2O gemessen. Die verbleibenden 100 μl Lösung wurden als Stammlösung zur Herstellung von Standardlösungen definierter Kopienzahlen für die Kalibrierung der Real Time Systeme verwendet (2.7.12).

2.7.12 Berechnung der Kopienzahl

Für die Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels Real Time PCR war die Kalibrierung dieser Systeme mit DNA-Lösungen bekannter Kopienzahlen erforderlich. Ausgehend von der spektralphotometrisch bestimmten Menge hochreiner Plasmid-DNA (2.7.11) wurden die Kopienzahlen dieser Proben berechnet, was hier am Beispiel eines Klons von *Erwinia spec.* ["Erwin3"] erläutert werden soll.

Durchschnittliches Molekulargewicht von Desoxy-Nukleosidmonophosphaten (dNMP):

dAMP: $313,2 \text{ g mol}^{-1}$
 dCMP: $289,2 \text{ g mol}^{-1}$
 dGMP: $329,2 \text{ g mol}^{-1}$
 dTMP : $304,2 \text{ g mol}^{-1}$
dNMP : $308,95 \text{ g mol}^{-1}$

Berechnung des Vektormolekulargewichts:

Basenpaare des Vektors pCR2.1-TOPO	: 3908
Basenpaare des Inserts "Erwin3"	: 262
Basenpaare des Vektors mit Insert	: 4170
Basenpaare des doppelsträngigen Vektors mit Insert	: 8340
Molekulargewicht des doppelsträngigen Vektors mit Insert	: $308,95 \text{ g mol}^{-1} \times 8340$ = $2\ 576\ 643 \text{ g mol}^{-1}$

Stoffmenge [mol] der Stammlösung von "Erwin3" (2.7.11):

Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Menge von "Erwin3" (2.7.11)	: 1,45 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1 mol doppelsträngiger Vektor mit Insert	: 2 576 643 g
1 g doppelsträngiger Vektor mit Insert	: 3,88102 10^{-7} mol
1,45 μg doppelsträngiger Vektor mit Insert	: 5,62748 10^{-13} mol

Umrechnung Stoffmenge zu Teilchenzahl [= Kopienzahl]:

1 Mol = 6,023 10^{23} Teilchen [Avogadro-Konstante]
 5,62748 10^{-13} mol = **3,38943 10^{11} Kopien**

Die Stammlösung des Klons "Erwin3" enthält 1,45 $\mu\text{g DNA ml}^{-1}$, das entspricht ca. 3,39 10^{11} Kopien ml^{-1} .

In analoger Weise wurden die Kopienzahlen für alle Ansätze berechnet. Zur Kalibrierung der verwendeten Real Time Systeme wurden üblicherweise 10^3 bis 10^6 Kopien pro Ansatz eingesetzt. Um Fehler durch mögliche DNA-Abbauprozesse bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wurden alle hergestellten Verdünnungen aliquotiert und nur einmal aufgetaut.

2.7.13 Agarosegelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA-Segmenten

Für alle durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchungen zur Bestimmung der Größe von DNA-Segmenten wurde ausschließlich hochreine Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Üblicherweise wurden 1 %ige Agarosegele hergestellt, lediglich zur Untersuchung sehr kleiner DNA-Stücke [kleiner als 200 bp] wurden auch 2 %ige Gele verwendet. Die entsprechenden Agarosemengen wurden jeweils in 80 ml TAE-Lösung (2.1.2) durch Erhitzen gelöst und mit 4 μl einer Ethidiumbromidlösung [10 mg ml^{-1}] gemischt. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und macht diese bei Anregung mit UV-Licht [312 nm] sichtbar. Die Lösung wurde in 15 x 11 cm große Gelhalter mit wahlweise 14 bzw. 28 Geltaschen gegossen. Zum Aushärten wurde das Agarosegel mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gelhalter in mit TAE-Puffer (2.1.2) gefüllte Elektrophoresekammern überführt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Lösung [14 mg Bromphenolblau, 10 ml Glycerin, 10 ml TES (2.1.2)] gemischt und luftblasenfrei in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der DNA Segmente wurde auf jedem Agarosegel ein 100 bp bzw. 1 kb DNA-Größenstandard (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung der DNA-Segmente erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 120 V (Elektrophoresis Power Supply PS3002, Invitrogen, Karlsruhe) für eine Stunde. Anschließend wurde das Agarosegel aus der Elektrophoresekammer genommen, mit H_2O abgewaschen und zur Auswertung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm angeregt. Unter Verwendung einer Geldokumentationsanlage (Intas, Göttingen) wurde eine Fotografie des Agarosegels bei UV-Anregung angefertigt.

2.7.14 Verwendung eines internen Standards zur Bestimmung von Verlusten und zur Berechnung von Wiederfindungsraten während der DNA-Isolation von epiphytischen Mikroorganismen

Sowohl für den Vergleich unterschiedlicher DNA-Isolationsmethoden als auch für die quantitative Bestimmung epiphytischer Mikroorganismen in einer Probe war es essentiell, die Verluste während der Aufarbeitung zu quantifizieren. Hierzu wurde ein interner Standard verwendet, der weder in den untersuchten Blättern der Stieleiche noch in den zu quantifizierenden epiphytischen Mikroorganismen vorkommt. Allen Ansätzen wurden vor Beginn der Aufarbeitung 10^8 Kopien eines Plasmids zugesetzt, welches das Myrcensynthase-Gen [AJ304839] aus der Steineiche (*Quercus ilex* L.) enthielt (FISCHBACH, 2001, FISCHBACH et al., 2001). Anhand eines entwickelten Real Time PCR-Systems (3.3.6-7) wurde die Anzahl der enthaltenden Myrcensynthase-Gen-Kopien nach der Aufarbeitung in jedem Ansatz quantifiziert. Dies ermöglichte nicht nur einen Vergleich der untersuchten Isolationsmethoden, sondern auch die Berechnung von Wiederfindungsraten, wodurch Aufarbeitungsverluste bestimmt werden konnten.

Bei den Untersuchungen zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche wurden bis zu 72,55 % des eingesetzten Standards wiedergefunden. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 17,58 %. Proben, deren Wiederfindungsraten unter 0,02 % lagen, wurden verworfen, da aufgrund der großen Verluste nachfolgende Berechnungen zu ungenau erschienen.

Im folgenden Beispiel wurde die Kopienzahl genomischer rDNA-Segmente von *Microspheera* spec. auf einem Eichenblatt bestimmt, welches am 14.08.01 [Julianischer Tag 226; dritte Probennahme] im Freiland geerntet wurde.

Formel zur Berechnung der **Wiederfindungsrate [WFR]**:

$$\text{WFR} = \frac{\text{Myr}_P \times V_G \times 100 \%}{\text{Myr}_S \times V_P} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Myr_P : mittels Real Time PCR gemessene Kopienzahl des Myrcensynthase-Plasmids in der Probe

V_G : Gesamtvolumen [μl] der DNA-Lösung nach DNA-Isolation epiphytischer Mikroorganismen

Myr_S : eingesetzte Kopienzahl des Myrcensynthase-Plasmids [bei allen Proben 10^8]

V_P : eingesetztes Volumen [μl] der DNA-Lösung zur Untersuchung der Probe mittels Real Time PCR [bei allen Proben 5 μl]

$$\frac{1494877 \times 140 \mu\text{l} \times 100 \%}{10^8 \times 5 \mu\text{l}} \approx 41,86 \%$$

Die **Berechnung der Kopienzahl** genomischer DNA von *Microsphaera* spec. erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Kopienzahl} = \frac{\text{Mic} \times V_G \times 100 \%}{V_P \times \text{WFR} \times \text{BF}} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Mic : gemessene Kopienanzahl der genomischen DNA von *Microsphaera* spec. in der Probe

WFR : Wiederfindungsrate [%]

BF : Blattfläche [m²] des Eichenblatts, von dessen Oberfläche DNA epiphytischer Mikroorganismen isoliert wurde.

Für obiges Beispiel ergab sich:

$$\frac{1469680 \text{ Kopien} \times 140 \mu\text{l} \times 100 \%}{5 \mu\text{l} \times 41,86 \% \times 0,001964 \text{ m}^2} \approx 5,01 \cdot 10^{10} \text{ Kopien m}^{-2}$$

2.7.15 Vergleich unterschiedlicher Methoden der DNA-Isolation epiphytischer Mikroorganismen

Es wurden drei Methoden zur Isolation von DNA epiphytischer Mikroorganismen verglichen. Ausgangspunkt aller Untersuchungen war die mittels Abhebetechnik (3.3.1) gewonnene epikutikuläre Wachsschicht, welche epiphytische Mikroorganismen enthielt. Um Verluste während der Aufarbeitung quantifizieren zu können, wurde allen Ansätzen ein interner Standard [Myrcensynthase-Gen] zugesetzt (2.7.14).

Je nach Blattfläche variierte die Menge des gefrorenen Wassers, welches nach dem Festfrieren und Abheben der Blätter zur quantitativen Erfassung der Wachsschicht in die Zentrifugengefäße überführt wurde (3.3.1). Daher wurden in den anschließenden Methodenbeschreibungen zur DNA-Isolation keine absoluten, sondern nur relative Volumenangaben angegeben. Da die Blätter in reinem Wasser [1 g = 1 ml] festgefroren wurden, erfolgte die Volumenbestimmung jeder Probe durch Wiegen der Zentrifugengefäße vor und nach Einfüllen der zerkleinerten Eisstücke.

2.7.15.1 DNA-Isolation nach einer veränderten Minipräparations-Vorschrift von Birnboim & Doly

Diese Methode zur DNA-Isolation aus epiphytischen Mikroorganismen baute auf der bereits beschriebenen Minipräparation von Plasmid-DNA (2.7.7) nach BIRNBOIM und DOLY (1979) auf.

Nach Ablösung der epikutikulären Wachsschicht mittels Abhebetechnik (3.3.1) und Überführung in Zentrifugengefäße [50 ml Zentrifugengefäße aus Polyallomer mit

Schraubverschluß, Beckman-Coulter, München] wurde die gefrorene Untersuchungslösung bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Invertieren aufgetaut. Es wurde 1/50 Volumenanteil eines Tris-EDTA Puffers [1,25 M Tris-HCl pH 8; 0,5 M EDTA] zur Stabilisierung der DNA und 1/14 Volumenanteil einer 10 %igen SDS-Lösung zugegeben. SDS bewirkte die Zellyse und führte zur teilweisen Auflösung der Wachsschicht. Zum alkalischen Zellaufschluß wurde 1/77 Volumenanteil einer 10 M NaOH-Lösung zugefügt und nach wiederholtem Invertieren für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1/2 Volumenanteil 3 M NaCH₃COO-Lösung [pH 5] zugesetzt und nach gründlichem Mischen für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde eine Trübung der Lösung durch ausfallende Salze beobachtet. Durch 25 Minuten Zentrifugation [JA20 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Beckman-Coulter, München] bei 25 000 x g und 0 °C wurden Zelltrümmer sowie ausgefallene oder unlösliche Bestandteile sedimentiert und der Überstand in neue Zentrifugengefäße [s.o.] überführt. Zur Proteinfällung und Beseitigung von SDS-Resten wurde der Lösung ein gleicher Volumenanteil einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung [25:24:1] (2.1.2) zugegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Zur Phasentrennung wurde für 15 Minuten bei 25 000 x g und 0 °C zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde entnommen und in neuen Zentrifugengefäßen [s.o.] mit dem zweifachen Volumen Ethanol zur DNA-Fällung versetzt. Die Lösung wurde nach zehnmütiger Inkubation auf Eis für 25 Minuten zentrifugiert [s.o.]. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 2 ml 70 %igem Ethanol nachgereinigt. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten [s.o.] wurde der Überstand entfernt und das Pellet zehn Minuten an der Luft getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen. Anschließend wurde die DNA in 150 µl H₂O resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.7.15.2 DNA-Isolation nach einer verkürzten Minipräparations-Vorschrift von Birnboim & Doly

Die zweite hier dargestellte Methode zur DNA-Isolation von epiphytischen Mikroorganismen entspricht dem geschilderten Protokoll zur Minipräparation von DNA (2.7.15.1), jedoch mit zwei entscheidenden Veränderungen: Zum einen erfolgte nach der Zugabe des Tris-EDTA Puffers und der SDS-Lösung ein zweiminütiger Kochschritt für eine verbesserte Auflösung der Wachsschicht und einen effektiveren Zellaufschluß. Zum anderen wurde auf die Phenol-Chloroform-Extraktion verzichtet, da nur mit geringen Proteinkonzentrationen in der zu untersuchenden Lösung gerechnet wurde. Abgesehen von diesen beiden Veränderungen erfolgte die DNA-Isolation analog der beschriebenen Methode (2.7.15.1).

2.7.15.3 DNA-Isolation nach einer Minipräparation für Gesamt-DNA

Mittels Abhebetechnik (3.3.1) wurde die epikutikuläre Wachsschicht inklusive der in ihr eingeschlossenen epiphytischen Mikroorganismen in Zentrifugengefäße [50 ml, Polyallomer mit Schraubverschluß, Beckman-Coulter, München] überführt. Zu der gefrorenen Lösung wurde 1/9 Volumenanteil einer 10 %igen SDS-Lösung zugegeben, um einerseits einen Zellaufschluß und andererseits das Auflösen der Wachsschicht zu erreichen. Zur Stabilisierung der DNA während der Isolation wurde 1/50 Volumenanteil eines Tris-EDTA Puffers [1,25 M Tris-HCl pH 8; 0,5 M EDTA] zugegeben. Innerhalb von 15 Minuten wurden die Zentrifugengefäße in einem Wasserbadschüttler (Julabo SW-20C, Seelbach) von

Raumtemperatur auf 65 °C aufgeheizt und die zu untersuchende Probe hierdurch aufgetaut. Anschließend wurde die Lösung für zwei Minuten bei 65 °C inkubiert, um den Grad der Zellyse zu erhöhen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Lösung ein gleicher Volumenanteil einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1] Lösung (2.1.2) zugegeben und mehrfach invertiert. Während einer Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Ausfällung von Proteinen und SDS. Anschließend wurde zur Phasentrennung für 15 Minuten bei 18 000 x g und 0 °C zentrifugiert [JA20 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Beckman-Coulter, München]. Die Oberphase wurde entnommen und erneut mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung in einem neuen Zentrifugengefäß vermischt. Nach Inkubation und Zentrifugation [s.o.] wurde die Oberphase in einem neuen Zentrifugengefäß mit 1/8 Volumenanteil 3 M NaCH₃COO-Lösung [pH 5] sowie der 2,5fachen Menge Ethanol gemischt. Während zehnmütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der DNA, welche durch anschließende Zentrifugation für 25 Minuten bei 0 °C und 18 000 x g [s.o.] sedimentiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 400 µl H₂O resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol sowie 45 µl 3 M NaCH₃COO-Lösung vermischt. Es folgte eine erneute DNA-Fällung während einer zehnmütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 22 000 x g in einer Tischzentrifuge (Modell 3K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch fünfminütige Inkubation in einem Vakuumexsikkator (Eppendorf Concentrator 5301, Köln) bei 30 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 150 µl H₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.7.15.4 Bestimmung von Wiederfindungsraten zum Vergleich unterschiedlicher Methoden zur DNA-Isolation epiphytischer Mikroorganismen

Die Bestimmung der Kopienzahl des Myrcensynthase-Gens mittels Real Time PCR (3.3.6-7) in den isolierten DNA-Lösungen, die mit Hilfe der drei untersuchten Methoden (2.7.15.1-3) gewonnen worden waren, ergab, daß lediglich mit der Methode zur Isolierung von Gesamt-DNA (2.7.15.3) ein Teil des eingesetzten internen Standards (2.7.14) detektiert wurde. Es wurde eine Wiederfindungsrate von 5,7 % berechnet (2.7.14). In beiden DNA-Isolationsmethoden nach abgeänderten Minipräparations-Vorschriften von Birnboim und Doly (2.7.15.1-2) wurden keine Kopien des Myrcensynthase-Gens wiedergefunden. Für alle weiteren Untersuchungen epiphytischer Mikroorganismen wurde daher die DNA nach dem Protokoll zur Minipräparation von bakterieller Gesamt-DNA (2.7.15.3) isoliert.

2.7.16 Real Time PCR

Die Real Time PCR, auch quantitative PCR genannt, erlaubt die Bestimmung der Kopienzahl eines DNA- (oder RNA-) Segments in einer Probe. Voraussetzungen hierfür sind einerseits die Auswahl spezifischer Oligonukleotide und andererseits die Kalibrierung dieses Systems mit DNA-Lösungen bekannter Kopienzahl. In diesem Kapitel werden das zugrunde liegende Prinzip sowie Standardansätze beschrieben, während die Entwicklung der eingesetzten Quantifizierungssysteme sowie die damit erzielten Ergebnisse im Ergebnisteil (3.3-4) beschrieben werden.

Alle Untersuchungen wurden mit dem Real Time PCR-Gerät "Sequence Detection System 5700" (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, welches mit Hilfe des Softwareprogramms "GeneAmp 5700 SDS 1.3" (Applied Biosystems) gesteuert wurde. Alle verwendeten Materialien und Lösungen [96-well-Platten, Verschlusskappen, Primer, Sonden, *Taq* DNA Polymerase, PCR-Reagenzien] wurden von Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen. Die eingesetzten TaqMan-Sonden enthielten am 5' Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM [6-Carboxyfluorescein] und am 3' Ende den Quencher TAMRA [6-Carboxytetramethylrhodamin].

Zur Auswahl geeigneter Primer für die Real Time PCR wurde das Softwareprogramm "Primer Express 2.0" (Applied Biosystems) eingesetzt, welches aus einer eingegebenen Basensequenz eine Liste mit möglichen Oligonukleotiden generierte, die den Anforderungen der Real Time PCR hinsichtlich Schmelzpunkt, Amplikonlänge usw. (Tab. 2.3) entsprachen.

Tab. 2.3: Wichtige Parameter zur Auswahl geeigneter Real Time PCR-Oligonukleotide. Dargestellt sind die wichtigsten Einstellungen des Software Programms "Primer Express 2.0" (Applied Biosystems, Weiterstadt), nach denen eine gegebene Sequenz hinsichtlich geeigneter Primer und Sonden zur Quantifizierung mittels Real Time PCR untersucht wird.

Parameter	Sollgröße
Primer	
Länge	9 – 40 bp [optimal 20 bp]
Schmelzpunkt	58 – 60 °C
GC-Gehalt	20 – 80 %
Nukleotidsequenz	maximal 3 G in Folge
TaqMan Sonde	
Länge	9 – 40 bp [optimal 20 bp]
Schmelzpunkt	68 – 70 °C
GC-Gehalt	20 – 80 %
Nukleotidsequenz	maximal 3 G in Folge kein G am 5' Ende
Amplikon	
Länge	50 – 150 bp
Schmelzpunkt	maximal 85 °C

Es lassen sich zwei Techniken der Real Time PCR unterscheiden, die im folgenden kurz erläutert werden.

2.7.16.1 Syber® Green-Methode

Die Syber® Green-Methode baut auf einem herkömmlichen PCR-Ansatz auf, dem ein Fluoreszenzfarbstoff (Syber® Green, Applied Biosystems, Weiterstadt) zugesetzt ist. Ein Fluoreszenzsignal ist jedoch nur meßbar, wenn Syber® Green in doppelsträngige DNA interkaliert, so daß die Stärke des Fluoreszenzsignals direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz aller Proben durch eine CCD-Kamera ["charge-coupled device"] gemessen. Durch einen Vergleich mit bei jedem PCR-Lauf

mitgeführten Kontrollen ohne Template-DNA ["no template control"] bzw. ohne Primer ["no amplification control"] wird ein Schwellenwert ["Threshold"] ermittelt, der Rauschen von Signal trennt. Die Nummer des PCR-Zyklus, der diesen Schwellenwert erstmals überschreitet, wird als C_T -Wert bezeichnet (Abb. 2.5). Mit Hilfe von bei jedem PCR-Lauf mitgeführten Standards [Lösungen mit bekannter DNA-Kopienzahl] können aus den gemessenen C_T -Werten Kopienzahlen berechnet werden.

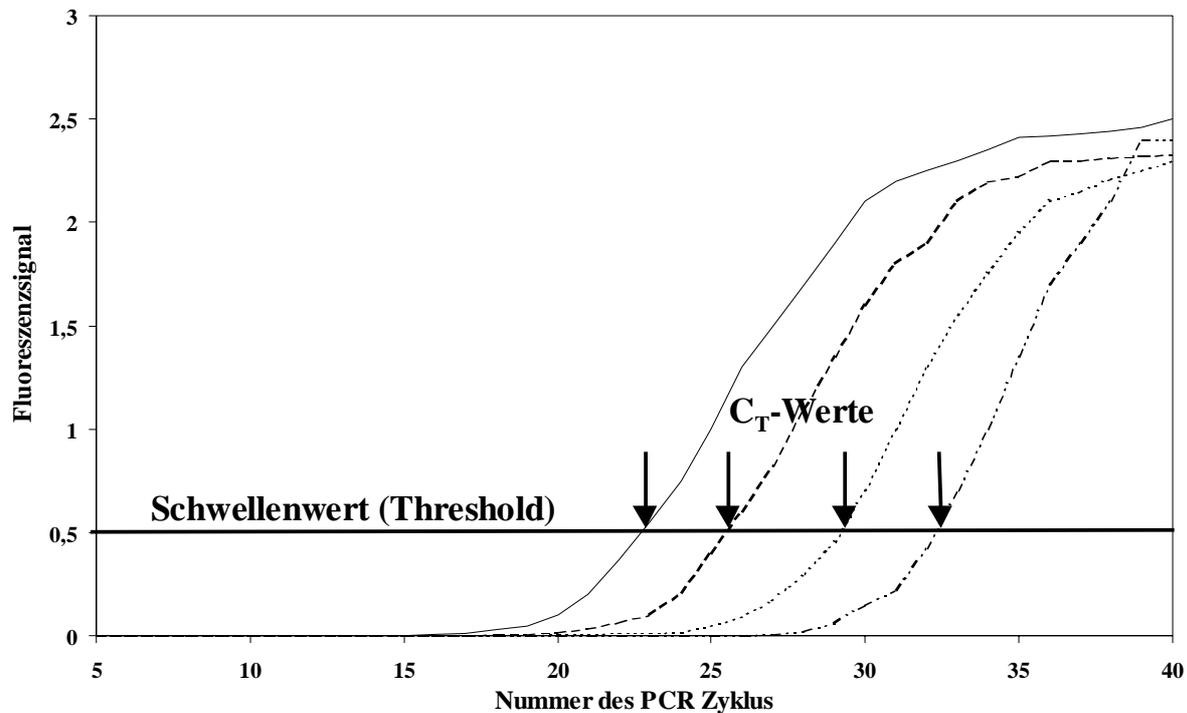


Abb. 2.5: Bestimmung der C_T -Werte einer Real Time PCR. Dargestellt sind die Rohdaten von vier Real Time PCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Kopienzahlen: 10^6 Kopien [—], 10^5 Kopien [— —], 10^4 Kopien [· · · ·], 10^3 Kopien [- · · · -]. Durch mitgeführte Kontrollen wird ein Schwellenwert ["Threshold"] definiert, der Rauschen und Signal trennt. Der C_T -Wert ["Threshold Cycle"] ist die Nummer des ersten PCR-Zyklus, der ein Fluoreszenzsignal aussendet, das größer als der Schwellenwert ist. Je mehr Kopien des zu untersuchenden DNA-Segments in einer Probe enthalten sind, desto kleiner ist der zugrunde liegende C_T -Wert.

2.7.16.2 TaqMan®-Methode

Die TaqMan®-Methode benutzt ein ähnliches Prinzip wie die Syber® Green-Methode, jedoch ist der Fluoreszenzfarbstoff bei diesem Ansatz an eine Sonde gebunden. Diese Sonde kann als dritter Primer angesehen werden und bindet zwischen dem Forward und Reverse Primer. Neben der Fluoreszenzmarkierung enthält die Sonde weiterhin einen Quencher, der das Aussenden eines Fluoreszenzsignals verhindert, solange Farbstoff und Quencher dicht beieinander sind (Abb. 2.6). Erst wenn die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten *Taq* DNA Polymerase zerstört wird und Quencher und Fluoreszenzfarbstoff räumlich getrennt werden, wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, das ebenfalls direkt mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert. Auch bei dieser Technik wird das Prinzip der C_T -Werte (2.7.16.1, Abb. 2.5) zur Berechnung der Kopienzahl angewendet.

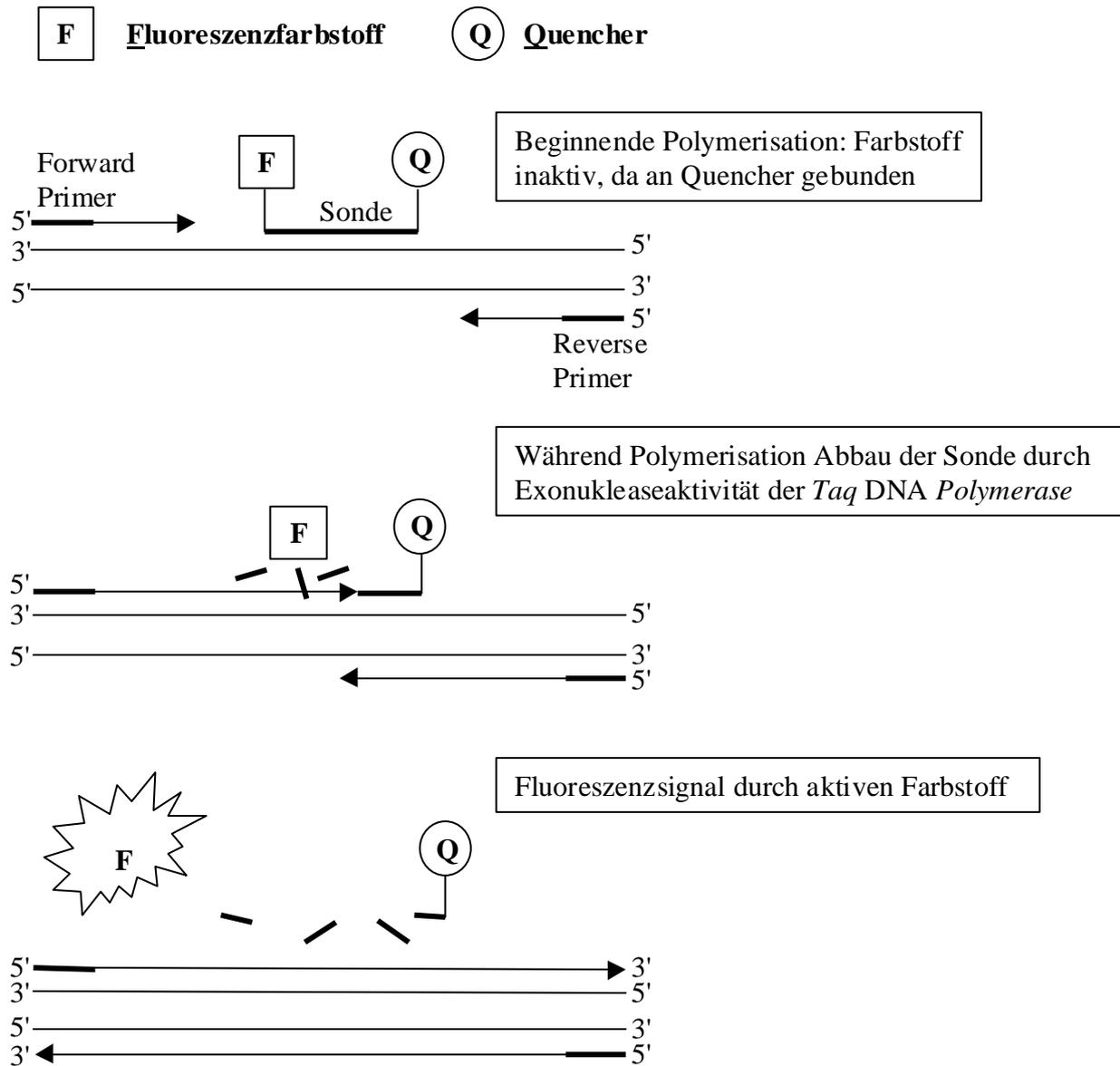


Abb. 2.6: Prinzip der Real Time PCR mittels TaqMan®-Methode. Schematisch dargestellt ist die Funktionsweise der Real Time-Quantifizierung mittels TaqMan®-Methode. Durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten *Taq* DNA Polymerase wird die eingesetzte Sonde während der Amplifizierung abgebaut. Durch die Trennung von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher kommt es zur Aussendung eines Fluoreszenzsignals. Die Stärke dieses Signals ist korreliert mit der Anzahl amplifizierter DNA-Segmente und ermöglicht die Bestimmung der vorhandenen Kopienzahl.

2.7.16.3 Optimierung der Bedingungen für Real Time PCR-Untersuchungen

Für alle Real Time PCR-Ansätze wurden ein universelles PCR-Programm genutzt, das folgende Schritte umfaßte:

	1. Schritt: Initiierung	2 Minuten bei 50 °C
	2. Schritt: Aktivierung der <i>AmpliTaq Gold Polymerase</i>	10 Minuten bei 95 °C
45 mal □	3. Schritt: Denaturierung	15 Sekunden bei 95 °C
	4. Schritt: Annealing/Polymerisation	eine Minute bei 60 °C

Alle Real Time PCR-Untersuchungen wurden in Dreifachansätzen in 96-well Platten (Applied Biosystems, Weiterstadt) in je 25 µl Volumen durchgeführt. Für jeden PCR-Lauf wurden eine neue Kalibrationsgerade aus mindestens drei verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Plasmids erstellt sowie zwei Kontrollen angesetzt. Die "no template control" enthielt keine DNA, während die "no amplification control" weder Primer noch Sonde enthielt. Anhand dieser beiden Kontrollen wurden unspezifische Signale erkannt, die für die Festsetzung des Schwellenwertes ["Threshold"], der Rauschen von Signal trennt, bedeutend waren. In allen untersuchten Real Time-Systemen [Syber® Green und TaqMan®] wurden Primer-Konzentrationen von 50, 300 und 900 nM in allen Kombinationsmöglichkeiten eingesetzt. Höhere Primer-Konzentrationen erlaubten in der Regel effektivere Amplifizierungen, jedoch stieg gleichzeitig die Menge unspezifisch amplifizierter DNA-Segmente. Beste Ergebnisse wurden mit Primer-Konzentrationen von 300 nM erreicht, so daß diese Menge in allen folgenden Versuchen beibehalten wurde.

In Real Time-Systemen zur Quantifizierung von Genomkopien von *Erwinia*-Gruppen mittels TaqMan®-Methodik (2.7.16.2) wurden Sonden-Konzentrationen von 50, 125 und 250 nM eingesetzt. Übereinstimmend wurden in sämtlichen Ansätzen beste Ergebnisse mit einer Sonden-Konzentration von 125 nM erzielt, welche für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde. Die Konzentrationen aller weiteren Komponenten wurden gemäß der vom Hersteller (Applied Biosystems, Weiterstadt) vorgeschlagenen Zusammensetzung des TaqMan® PCR Master Mix eingesetzt. Ein kompletter Real Time PCR-Ansatz, welcher aus den verschiedenen Bestandteilen des TaqMan® PCR Core Reagent Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) zusammen pipettiert wurde, enthielt 3,5 mM MgCl₂, 1 x TaqMan® Puffer, 0,025 U µl⁻¹ *AmpliTaq® Gold DNA Polymerase*, sowie jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dUTP [abweichend von Angaben des Herstellers, der 0,4 mM dUTP empfiehlt]. Zusätzlich wurden je Ansatz 5 µl DNA eingesetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Lediglich das von BACH ET AL. (2002) entwickelte TaqMan® System zur Quantifizierung von Eubakterien wurde nach Angaben der Autoren unter Verwendung von 4,5 mM MgCl₂, einer Primerkonzentration von 200 nM und einer Sondenkonzentration von 150 nM eingesetzt. Alle anderen Angaben deckten sich mit den für *Erwinia spec.* verwendeten Konzentrationen im TaqMan®-Ansatz [s.o.].

Für Real Time PCR-Untersuchungen auf Basis der Syber® Green-Methode (2.7.16.1) wurde ein zweifach konzentrierter Syber® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Je Ansatz wurden 12,5 µl Master Mix verwendet und nach Zugabe von 0,3 µM Primern und 5 µl DNA mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Soweit bekannt, enthielt dieser Ansatz die gleichen Komponenten und Konzentrationen wie der TaqMan® PCR Master Mix.

Nach Beendigung der PCR-Läufe wurde in Syber® Green-Ansätzen eine Schmelzpunktanalyse der amplifizierten DNA-Segmente durchgeführt. Diese ermöglichte über einen Vergleich mit den Schmelzpunkten der Standard-DNA eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Amplifizierung. Alle PCR-Ansätze, bei denen keine klare Aussage über die Spezifität getroffen werden konnte, wurden auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Anregung betrachtet. Anhand der Bandengröße wurde zwischen spezifischen und unspezifischen Amplifizierungen unterschieden.

2.8 Flächenbestimmung und mikroskopische Untersuchung von Blättern

2.8.1 Bestimmung der Blattflächen

Alle mittels mikrobiologischer (3.1) oder molekularbiologischer (3.3) Methoden ermittelten Zell- bzw. Kopienzahlen wurden auf Blattflächen bezogen. Die untersuchten Eichenblätter wurden auf einem Flachbildscanner (Scan Jet 4 C, Hewlett Packard, Böblingen) als „scharfes schwarz-weiß Foto“ eingescannt. Aus den entsprechenden tif-Dateien wurden mittels des Softwareprogramms LSM Image Examiner 2.30.011 (Carl Zeiss, Jena) die Blattflächen bestimmt. Zur Umrechnung der programminternen Größenskala in Quadratzentimeter wurde eine Kalibrierung mit mehreren Papierquadraten definierter Größe unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.8.2 Untersuchungen von Blattoberflächen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Bei der Entwicklung geeigneter Methoden zur Untersuchung von mikrobiellen Blattepiphyten war die Effektivität und Reproduzierbarkeit der Ablösung von Mikroorganismen von der Blattoberfläche bedeutend. Daher wurde die Oberseite von Stieleichenblättern (*Quercus robur* L.) mikroskopisch auf mikrobielle Besiedlung untersucht. Zum einen wurden unbehandelte Blätter von Freilandbäumen (2.2.1, 2.3.2) analysiert, um den Grad der natürlichen Besiedlung zu erfassen, und zum anderen wurden Blätter, die mittels der entwickelten Ablösemethoden (Extraktionsmethode und Abhebetechnik, 3.1.1, 3.3.1) behandelt wurden, mikroskopiert. Hierbei stand die Abschätzung von Größenordnungen der mit beiden Methoden ablösbaren epiphytischen Mikroorganismen im Vordergrund.

Die zu untersuchenden Blätter wurden für zehn Minuten im Dunkeln in einer DAPI-Lösung der Konzentration $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ inkubiert. Nach Waschen in H_2O zur Entfernung von nicht gebundenem DAPI wurden die gefärbten Blattstücke mikroskopiert. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert in die DNA epiphytischer Mikroorganismen und kann durch Licht der Wellenlänge 364 nm angeregt werden. Nach Anregung emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Licht der Wellenlängen größer 470 nm und ermöglicht so die Detektion von Mikroorganismen (BAST, 1999).

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Die Steuerung des Mikroskops und die

Bildbearbeitung erfolgten mit dem Software-Programm LSM 510 2.3 (Carl Zeiss, Jena). Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde Licht der Wellenlänge 364 nm eines UV-Lasers sowie Licht der Wellenlängen 543 nm und 633 nm zweier Helium-Neon-Laser zur Anregung genutzt. Durch Kombination mehrerer gerätespezifischer Filtersets war es möglich, aus dem Emissionsspektrum entsprechende Wellenlängenbereiche der Autofluoreszenz von Chlorophyll sowie der DAPI-Fluoreszenz in zwei verschiedenen Kanälen zu detektieren. Durch Kombination der Informationen beider Kanäle konnte ein mikroskopisches Bild generiert werden, das Mikroorganismen auf der Blattoberfläche zeigt (Abb. 3.6).

2.9 Neutralzucker-Bestimmung und -Reduzierung in Extraktionslösungen

Durch Schütteln von Blattproben in 0,9 %iger NaCl-Lösung wurden epiphytische Mikroorganismen von der Blattoberfläche abgelöst und in die Extraktionslösung überführt (3.1.1). Diese Lösung wurde nun mit mehreren Methoden untersucht, um verschiedene mikrobielle Gruppen zu quantifizieren. Die Bestimmung autotropher Nitrifizierer erfolgte mittels MPN-Methoden (2.6.1.3-4) unter Verwendung eines Selektivmediums. Um das Wachstum heterotropher Organismen zu verhindern, war die Entfernung von Zuckern und anderer leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen erforderlich. Der nachgewiesene Neutralzuckeranteil der Extraktionslösung stand der selektiven Anzucht autotropher Organismen entgegen (2.9.1). Deshalb war es erforderlich, eine geeignete Methode zur Reduzierung der Neutralzuckeranteile in der Extraktionslösung zu entwickeln (2.9.2).

2.9.1 Spektralphotometrische Untersuchungen der Extraktionslösungen zur Bestimmung der Neutralzuckerkonzentration

Für die Bestimmung des Neutralzuckeranteiles der Extraktionslösung wurde ein von DUBOIS et al. (1956) entwickeltes spektralphotometrisches Analyseverfahren angewandt. 400 µl der zu untersuchenden Extraktionslösung wurden mit 10 µl 90 %igem (w/v) Phenol in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Durch die Zugabe von 1 ml konzentrierter H₂SO₄ wurden vorhandene Zucker hydrolysiert. Nach zehnmündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung in eine Halb-Mikro-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und die Absorption bei 490 nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurden Glukosekonzentrationen von 5 bis 50 mg l⁻¹ analog untersucht. Für die so ermittelte Kalibrationsgerade (Abb. 2.7) wurde ein Regressionskoeffizient von $R^2 = 0,993$ ermittelt. Alle Untersuchungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.9.2 Auswahl einer geeigneten Methode zur Reduzierung des Neutralzuckeranteiles in Extraktionslösungen

Zur Untersuchung autotropher Nitrifizierer wurde eine Aufarbeitungsmethode gefordert, welche lösliche Zucker aus der Extraktionslösung entfernt, ohne die Zellzahl der vorhandenen Mikroorganismen zu verändern. Hierzu wurden drei unterschiedliche Techniken – Überdruck-

und Vakuumfiltration sowie Zentrifugation – miteinander verglichen. Um einheitliche und somit vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erreichen, wurden diese Versuche nicht mit der beschriebenen Extraktionslösung (3.1.1), sondern mit einer Bakteriensuspension bekannter Zellzahl durchgeführt. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 0,5 ml einer *E. coli* TG1 Übernachtskultur in LB-Medium (2.7.1, 2.1.2) in 500 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Für alle Ansätze wurden Aliquots von 50 ml in drei Parallelen untersucht.

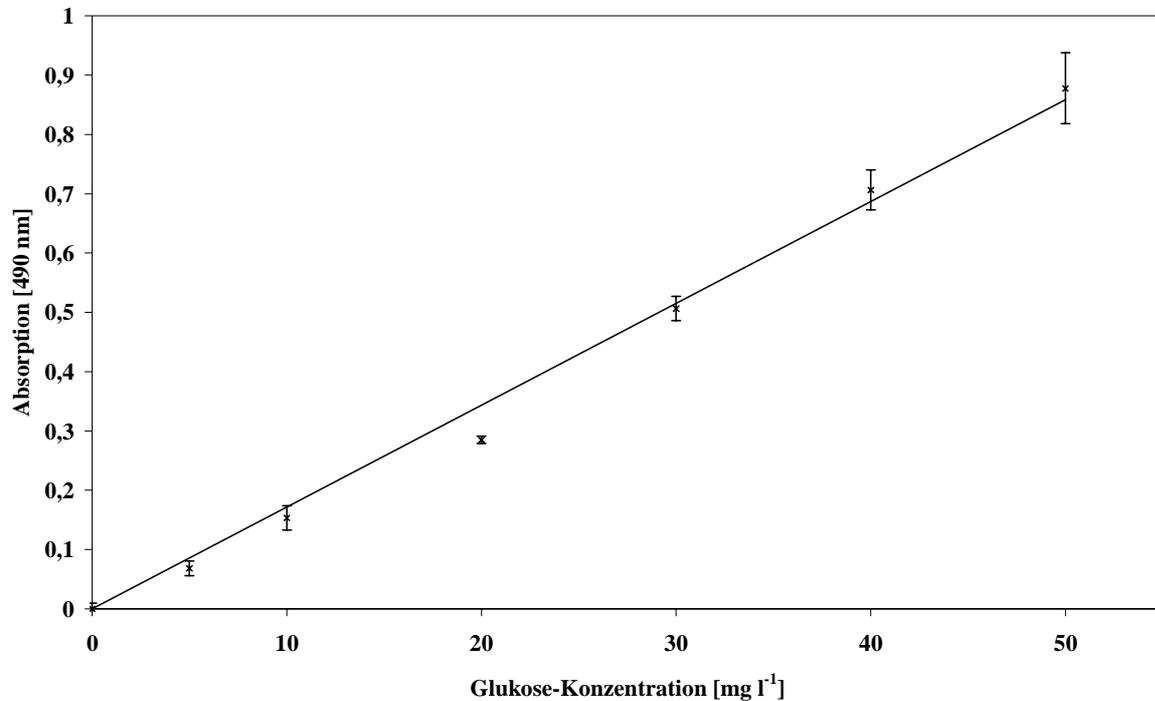


Abb.2.7: Kalibrationsgerade der Neutralzuckerbestimmung nach DUBOIS et al. (1956). Jeweils 400 μ l Extraktionslösung wurden mit 10 μ l 90 %igem Phenol und 1 ml konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Es wurden Glukosekonzentrationen von 5 bis 50 $mg\ l^{-1}$ eingesetzt. Alle Bestimmungen wurden in drei Parallelansätzen durchgeführt. Es wurde ein Regressionskoeffizient von $R^2 = 0,993$ bestimmt.

Bei der Überdruckfiltration wurden 50 ml dieser Lösung in einen Proteinkonzentrator (Stirred Ultrafiltration Cell 8050, Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) gefüllt und durch Anlegen eines Überdrucks durch einen Cellulosenitrat-Filter (Micron Sept, 0,22 μ m Porengröße, 47 mm Durchmesser, Osmonics, Minnetonka, USA) gepreßt. Der Überdruck wurde durch Begasung mit sterilfiltriertem Stickstoff (N_2 5.0, Messer Griesheim, Krefeld) erzeugt. Zum Nachreinigen der zurückgehaltenen Bakterien wurden 25 ml Kochsalzlösung in den Proteinkonzentrator gefüllt und mittels Überdruck durch denselben Cellulosenitrat-Filter gepreßt. Anschließend wurde der Filter unter gleichmäßigem Rühren für zwei Stunden in 50 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung inkubiert, um die Bakterien zu resuspendieren. Jeweils 50 μ l dieser Lösung wurden in Zweifachansätzen zur Bestimmung der Lebendzellzahl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden Kolonien bildende Einheiten [CFU] gezählt.

Bei der Untersuchung mittels Vakuumfiltration wurden analog 50 ml Bakteriensuspension in ein Vakuumfiltrationsgefäß gefüllt und die Flüssigkeit durch Erzeugung eines Unterdrucks

durch einen Cellulosenitrat-Filter [s.o.] gesaugt. Anschließend wurden 25 ml Kochsalzlösung zum Nachreinigen des Filtrerrückstandes vakuumfiltriert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Überdruckfiltration [s.o.] beschrieben.

Für die Zentrifugationsmethode wurden 50 ml Bakteriensuspension in einen Zentrifugenbecher gefüllt und für zehn Minuten bei 4 °C und 8 000 x g zentrifugiert (JA14 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Beckman-Coulter, München). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 25 ml Kochsalzlösung nachgereinigt und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Bakteriensediment in 50 ml Kochsalzlösung resuspendiert und zwei 50 µl Aliquots dieser Lösung zur Bestimmung der Lebendzellzahl ausplattiert.

Zur Berechnung von Wiederfindungsraten war es erforderlich, auch die Lebendzellzahl der für alle Ansätze verwendeten Bakteriensuspension zu bestimmen. Daher wurden sechs Aliquots der Suspension à 50 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert und die Anzahl Kolonien bildender Einheiten bestimmt [s.o.]. Diese Zellzahl wurde als 100 % Wiederfindungsrate definiert, und die ermittelten CFUs der drei untersuchten Methoden wurden auf diesen Wert bezogen (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Wiederfindungsraten von *Escherichia coli* TG1 in Extraktionslösungen nach unterschiedlichen Aufarbeitungen zur Reduzierung des Neutralzuckergehalts. 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* TG1 in LB-Medium (2.7.1, 2.1.2) wurden in 500 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Jeweils 50 ml dieser Bakteriensuspension wurden mit drei unterschiedlichen Methoden untersucht. Bei Anwendung der Überdruck- bzw. Vakuumfiltration wurden die Bakteriensuspensionen mittels Überdruck bzw. Vakuum durch einen Cellulosenitrat-Filter [Porengröße 0,45 µm] filtriert. Zur Nachreinigung wurden die Filter mit 25 ml NaCl-Lösung filtriert. Anschließend wurden die Membranen in 50 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung für zwei Stunden unter Rühren inkubiert, um sedimentierte Bakterien zu resuspendieren. Bei der Zentrifugationsmethode wurden 50 ml Bakteriensuspension für zehn Minuten bei 8 000 x g zentrifugiert, das Bakterienpellet in 25 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung nachgereinigt und erneut zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 50 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. In allen Versuchsansätzen und der Bakteriensuspension wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Hierzu wurden in Doppelbestimmungen 50 µl der Lösung auf LB-Agarplatten ausplattiert und nach 18-stündiger Inkubation bei 37 °C die Anzahl Kolonien bildender Einheiten [CFU] bestimmt. Zur Berechnung der Wiederfindungsraten wurden alle Zellzahlen in Relation zur eingesetzten Bakteriensuspension [entspricht 100 %] gesetzt. Alle Untersuchungen wurden in drei Parallelen durchgeführt.

Ansatz	CFU ml ⁻¹	Wiederfindungsrate [%]
Überdruckfiltration	(0,17 ± 0,09) x 10 ⁵	2,2 ± 1,1
Vakuumfiltration	(0,54 ± 0,29) x 10 ⁵	7,0 ± 3,8
Zentrifugation	(8,00 ± 2,38) x 10 ⁵	103,1 ± 30,6
Bakteriensuspension	(7,76 ± 2,96) x 10 ⁵	100 ± 38,2

Alle drei untersuchten Methoden schienen für die Entfernung löslicher Zucker aus einer Lösung geeignet, da die Flüssigkeitsphase [inklusive gelöster Zucker] vollständig verworfen wurde, während Mikroorganismen [und andere unlösliche Substanzen] zurückgehalten wurden. Die Wiederfindungsraten der resuspendierten Bakterien unterschieden sich jedoch stark. Während mittels beider Filtrationsmethoden weniger als 10 % der eingesetzten *E. coli*-Zellen wiedergefunden wurden [7,0 ± 3,8 % bei Vakuumfiltration und 2,2 ± 1,1 % mittels Überdruckzentrifugation], erlaubte die Zentrifugationsmethode eine quantitative Wiederfindung [berechnete Wiederfindungsrate: 103,1 ± 30,6 %] der eingesetzten Biomasse (Tab. 2.4). Vor der Untersuchungen autotropher Nitrifizierer wurden daher alle

Extraktionslösungen mit dieser Zentrifugationsmethode behandelt. Hierdurch wurde die Neutralzuckerkonzentration in den Extraktionslösungen bis zu einem Faktor 11 verringert (Tab. 2.5). Die so behandelten Extraktionslösungen wurden anschließend zur Untersuchung autotropher Nitrifizierer eingesetzt (2.6.1.3-4).

Tab. 2.5: Spektralphotometrische Neutralzuckerbestimmung in Extraktionslösungen. Es wurden fünf Extraktionslösungen von Eichenproben auf den Gehalt an Neutralzuckern vor und nach der Aufarbeitung mit der Zentrifugationsmethode (2.9.2) untersucht. Nach vorheriger Kalibrierung wurde die Zuckerkonzentration [als Glukoseäquivalente] der Lösung anhand der Absorptionswerte bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 490 nm berechnet (2.9.1). Jede Zuckerbestimmung wurde in drei Parallelen durchgeführt.

Probe	Zuckerkonzentration [mg l ⁻¹]	
	vor Aufarbeitung	nach Aufarbeitung
Probe A	34,27 ± 0,90	3,10 ± 0,19
Probe B	32,22 ± 3,08	7,56 ± 1,85
Probe C	33,18 ± 7,27	7,99 ± 3,50
Probe D	20,41 ± 0,68	3,89 ± 1,19
Probe E	12,73 ± 0,64	3,48 ± 1,24

3 Ergebnisse

Zentrales Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche, welche unter verschiedenen UV-B Strahlungsniveaus angezogen wurden. Zur Erfassung von Änderungen im jahreszeitlichen Verlauf war zunächst die Entwicklung geeigneter Quantifizierungsmethoden erforderlich. Im folgenden werden der Aufbau einer klassischen Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Lebendzellzahl beschrieben sowie der einer molekularbiologischen Methode, die ohne vorherige Anzucht eine Quantifizierung von Genomkopien ermöglicht.

3.1 Entwicklung einer Extraktionsmethode zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen

Die Entwicklung einer Extraktionsmethode zur mikrobiologischen Untersuchung von Pilzen und Bakterien auf Blättern der Stieleiche (*Quercus robur* L.) erforderte eine geeignete Technik zur Ablösung dieser epiphytischen Mikroorganismen von der Blattoberfläche sowie die Auswahl brauchbarer Nährmedien.

3.1.1 Auswahl einer geeigneten Ablösemethode für epiphytische Mikroorganismen zur Bestimmung der Lebendzellzahl

Ausgangspunkt für die Entwicklung einer geeigneten Ablösemethode war eine als "leaf washing" bezeichnete Technik (MORRIS et al., 1998, JACQUES & MORRIS, 1995), welche epiphytische Mikroorganismen durch Schütteln der Blattproben in einer Extraktionslösung von der Blattoberfläche ablöst. Zur Optimierung dieser Methode wurden unterschiedliche Zusammensetzungen bzw. Behandlungen dieser Extraktionslösung untersucht. Hierzu wurden fünf Blattproben, die jeweils aus vier Eichenblätter von Freilandbäumen des Standorts Tal (2.3.2) bestanden, in Glasflaschen gegeben und mit 40 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt. Die Proben wurden im Dunkeln auf einem Rotationsschüttler (Typ 3020, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 120 Umdrehungen pro Minute auf Eis geschüttelt. In den ersten 15 Minuten wurden alle fünf untersuchten Proben gleich behandelt. Nach 15 Minuten wurden die unterschiedlichen Behandlungen begonnen. Es wurde untersucht, wie die Ablösung von Mikroorganismen von Blattoberflächen durch Zugabe eines Detergenz, durch Zugabe von Ethanol als organisches Lösungsmittel, sowie durch Ultraschallbehandlung beeinflusst wurde: Ansatz 1 wurde das Detergenz Tween® 80 (Roth, Karlsruhe) zugegeben [Endkonzentration 0,1 %] (PÉRISSOL et al., 1993), Ansatz 2 wurde für fünf Minuten in einem Ultraschallbad (Sonorex RK100, Bandelin Electronic, Berlin) inkubiert, während die Ansätze 3 und 4 mit einer Endkonzentration von 5 bzw. 10 % v/v Ethanol versetzt wurden. Ansatz 5 wurde unbehandelt [d.h. 0,9 %ige NaCl-Lösung] weitergeführt. Nach fünf, zehn, 15, 20, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten wurden diesen fünf Proben je 100 µl Extraktionslösung steril entnommen und in drei Parallelen jeweils 20 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Anzahl

Kolonien bildender Einheiten auf allen Platten bestimmt und die Lebendzellzahl der Extraktionslösung berechnet. Da aufgrund der natürlichen Variabilität Zellzahlen auf Blattoberflächen starken Schwankungen unterliegen (POPLAWSKY & CHUN 1998), war eine Normierung notwendig, um die einzelnen Behandlungsvarianten vergleichen zu können. Hierzu wurde die ermittelte Zellzahl nach 15 Minuten für jeden Ansatz als 100 % definiert und alle weiteren bestimmten Zellzahlen auf diesen Wert bezogen (Abb. 3.1). Bei Betrachtung der Blattproben aus Ansatz 2 [Ultraschallbehandlung] war eine dunkle Verfärbung der Blätter erkennbar, die auf Infiltration des Interzellularraums hindeutete. Außerdem wurde eine leichte Grünfärbung der Extraktionslösung beobachtet, welche auf ausgetretenes Chlorophyll aus zerstörten Pflanzenzellen zurückzuführen war. Da die zu entwickelnde Methode nur epiphytische Mikroorganismen, jedoch keine Endophyten, die sich innerhalb des Blattgewebes befinden, erfassen sollte, war dieser Ansatz ungeeignet.

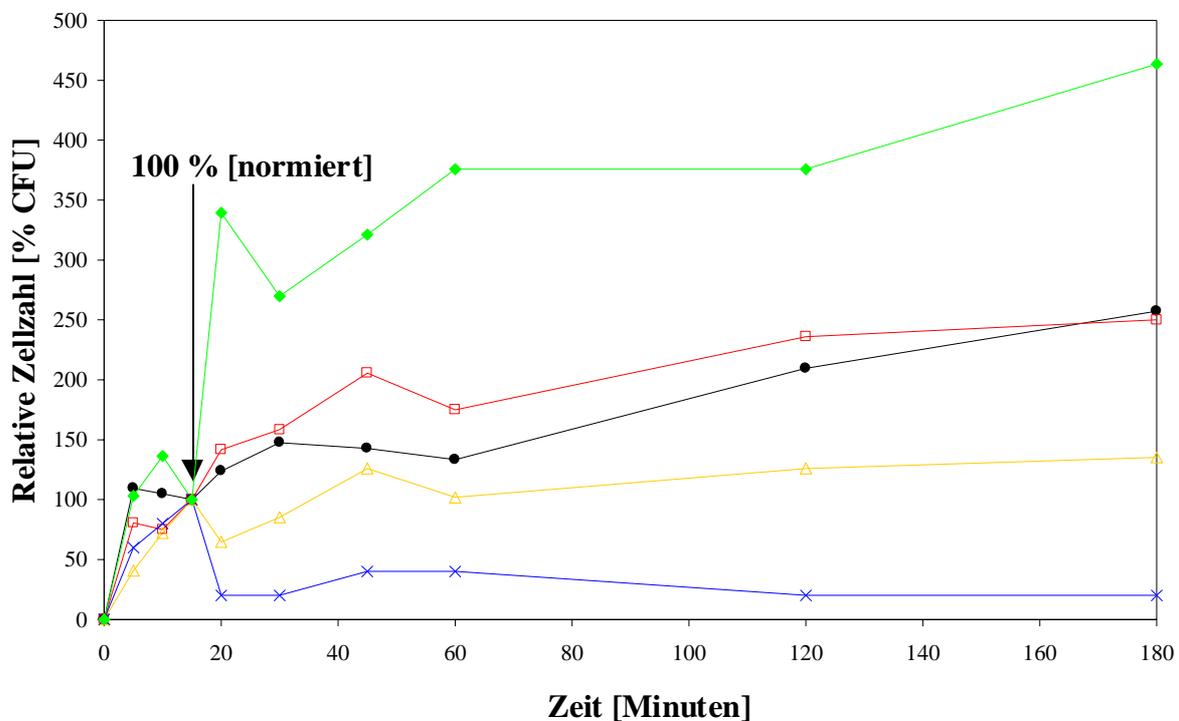


Abb. 3.1: Vergleich verschiedener Ablösemethoden zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen. Blattproben, die aus Eichenblättern von Freilandbäumen des Standorts Tal stammten (2.2.1, 2.3.2), wurden mit fünf unterschiedlichen Techniken in einer Extraktionslösung auf Eis für drei Stunden geschüttelt. Nach definierten Zeitabständen [siehe Text] wurden Aliquots entnommen, um die Zellzahlen als Kolonien bildende Einheiten zu bestimmen. Zum Vergleich der Proben wurden alle Ansätze in den ersten 15 Minuten gleich behandelt [0,9 %ige NaCl-Lösung] und die ermittelten Zellzahlen nach 15 Minuten als 100 % definiert. Alle weiteren Zellzahlbestimmungen wurden auf diesen Wert bezogen. Anschließend wurden die unterschiedlichen Behandlungen begonnen: Zugabe von 0,1 % Detergenz [■], 5 % [▲] und 10 % Ethanol [×], fünf Minuten Ultraschallbehandlung [◆] sowie unbehandelte 0,9 %ige NaCl-Lösung [●]. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in drei Parallelen durch Ausplattieren von jeweils 20 µl Extraktionslösung auf LB-Agarplatten und Auswertung der Kolonien bildenden Einheiten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C.

In den Ansätzen 3 und 4 wurden nach Ethanolzugabe geringere Zellzahlen als in der unbehandelten Kochsalz-Variante gefunden. Die eingesetzten Ethanolkonzentrationen [5 bzw. 10 % v/v] hatten toxische Wirkung auf die Mikroorganismen, so daß diese beiden Behandlungen ebenfalls ungeeignet erschienen. Beste Ergebnisse wurden in den Ansätzen 1 [0,1 % Tween® 80 in 0,9 % NaCl] und 5 [0,9 % NaCl] erreicht. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurden in beiden Varianten nahezu gleiche Zellzahlen erreicht. Da der Einsatz des nicht ionischen Detergenz Tween® 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Roth, Karlsruhe) keine verbesserte Ablösung von Mikroorganismen von der Blattoberfläche ermöglichte, jedoch eine negative Beeinflussung der Membranstabilität durch Einlagerung des Detergenz in das Bilayersystem der Zellmembran nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden für alle weiteren Versuche Blattproben in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung ohne weitere Zusätze [Ansatz 5] für drei Stunden auf Eis im Dunkeln bei 120 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Die so gewonnene Extraktionslösung wurde zur Bestimmung von Lebendzellzahlen mittels Ausplattieren und MPN-Technik untersucht (2.6). Zur Quantifizierung von autotrophen Nitrifizierern (2.6.1.3-4) war eine vorherige Reduzierung des Neutralzuckergehaltes der Extraktionslösung erforderlich (2.9.2).

3.1.2 Auswahl eines geeigneten Nährmediums zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen durch Ausplattieren

Epiphytische Mikroorganismen von Blättern der Stieleiche wurden mit Hilfe der entwickelten Extraktionsmethode (3.1.1) von der Blattoberfläche in eine Extraktionslösung überführt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Aliquots dieser Lösung sowohl mit unterschiedlichen MPN-Techniken (2.6.1.1-4) als auch durch Ausplattieren [Spatelplattenverfahren (BAST, 1999)] untersucht. Zur Auswahl eines geeigneten Festmediums für die Quantifizierung heterotropher Mikroorganismen wurden elf Medien (2.6.2.1) genauer untersucht. In Vierfachbestimmungen wurden 50 µl derselben Extraktionslösung (3.1.1) auf Nährmedienplatten ausgestrichen und Kolonien bildende Einheiten [CFU] nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen bei Raumtemperatur im Dunkeln ausgezählt (Abb. 3.2). In diesem Vergleich erwies sich der untersuchte Sojabohnen-Agar (2.6.2.1) als am besten geeignet, da mit diesem Medium nicht nur reproduzierbar die höchsten CFU-Werte erreicht wurden, sondern die Nährmedienplatten auch problemlos in der Handhabung waren. Der Sojabohnen-Agar wurde für alle weiteren Versuche unter den beschriebenen Anzuchtbedingungen [sieben Tage Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln] eingesetzt.

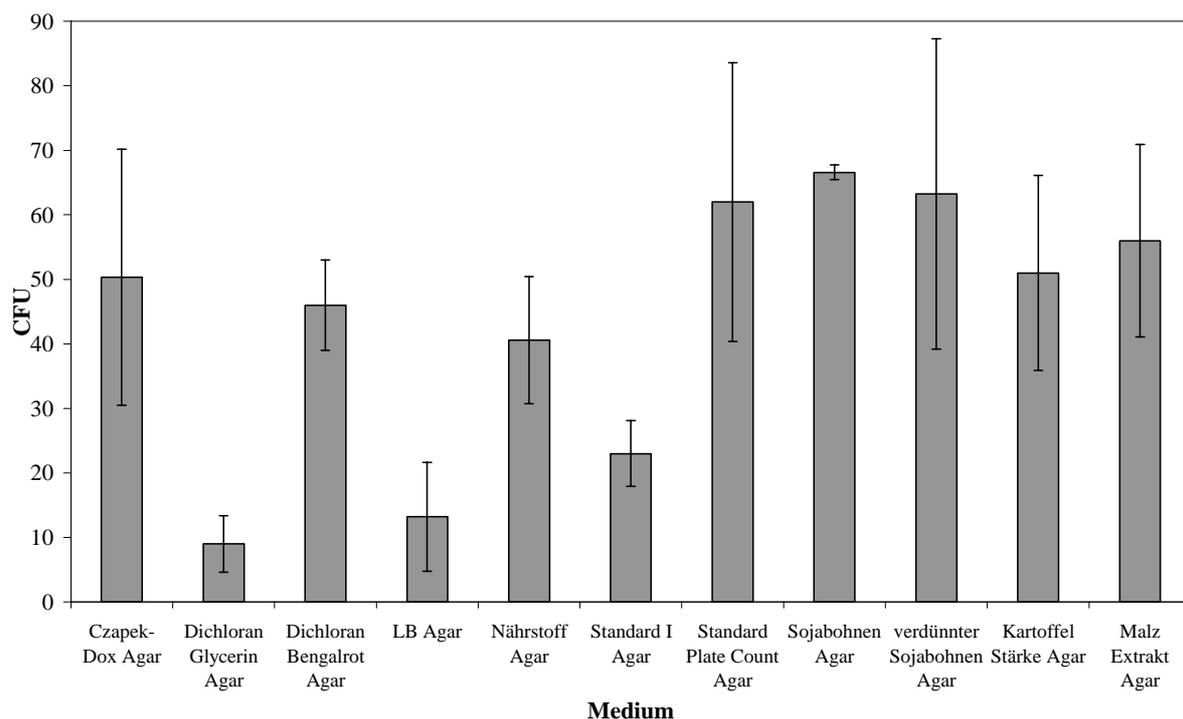


Abb. 3.2: Vergleich verschiedener Medien zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels Ausplattieren. Jeweils 50 µl einer Extraktionslösung, welche epiphytische Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche enthielt (3.1.1), wurden in Vierfachbestimmungen auf elf unterschiedliche Nährmedien ausplattiert. Nach sieben Tagen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden Kolonien bildende Einheiten pro Nährmediumplatte ausgezählt.

3.2 Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blättern der Stieleiche (*Quercus robur* L.) mittels der gewählten Extraktionsmethode

Während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 wurden an zwei Standorten Blätter von Stieleichen (*Quercus robur* L.) untersucht, die unterschiedlichen UV-B Strahlungsniveaus ausgesetzt waren. Durch Verwendung von Folien mit unterschiedlichen Durchlässigkeiten für UV-B Strahlung (2.3.3) wurden am Standort Berg (2.3.1) sowie am Standort Tal (2.3.2) Eichen in je einer Pflanzenanzuchtskammer mit und einer ohne UV-B Strahlung angezogen. Zusätzlich wurden am Standort Tal Pflanzen im Freiland untersucht, was am Standort Berg aufgrund der klimatischen Bedingungen nicht möglich war (2.3.1). Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen ermöglichte die Anzucht und anschließende Bestimmung der Lebendzellzahlen unterschiedlicher Mikroorganismengruppen (Abb. 3.3). Durch Einsatz unterschiedlicher Selektivmedien und Techniken (2.6.1.1-4, 2.6.2., 3.1.2) wurden die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie die Anteile an Bakterien, Pilzen, denitrifizierender und heterotroph nitrifizierender Organismen in der gewonnenen Extraktionslösung (3.1.1) bestimmt. Zur Untersuchung autotropher Nitrifizierer war eine vorherige Aufarbeitung der Extraktionslösung mittels einer Zentrifugationsmethode nötig, um störende Neutralzucker zu entfernen (2.9.2).

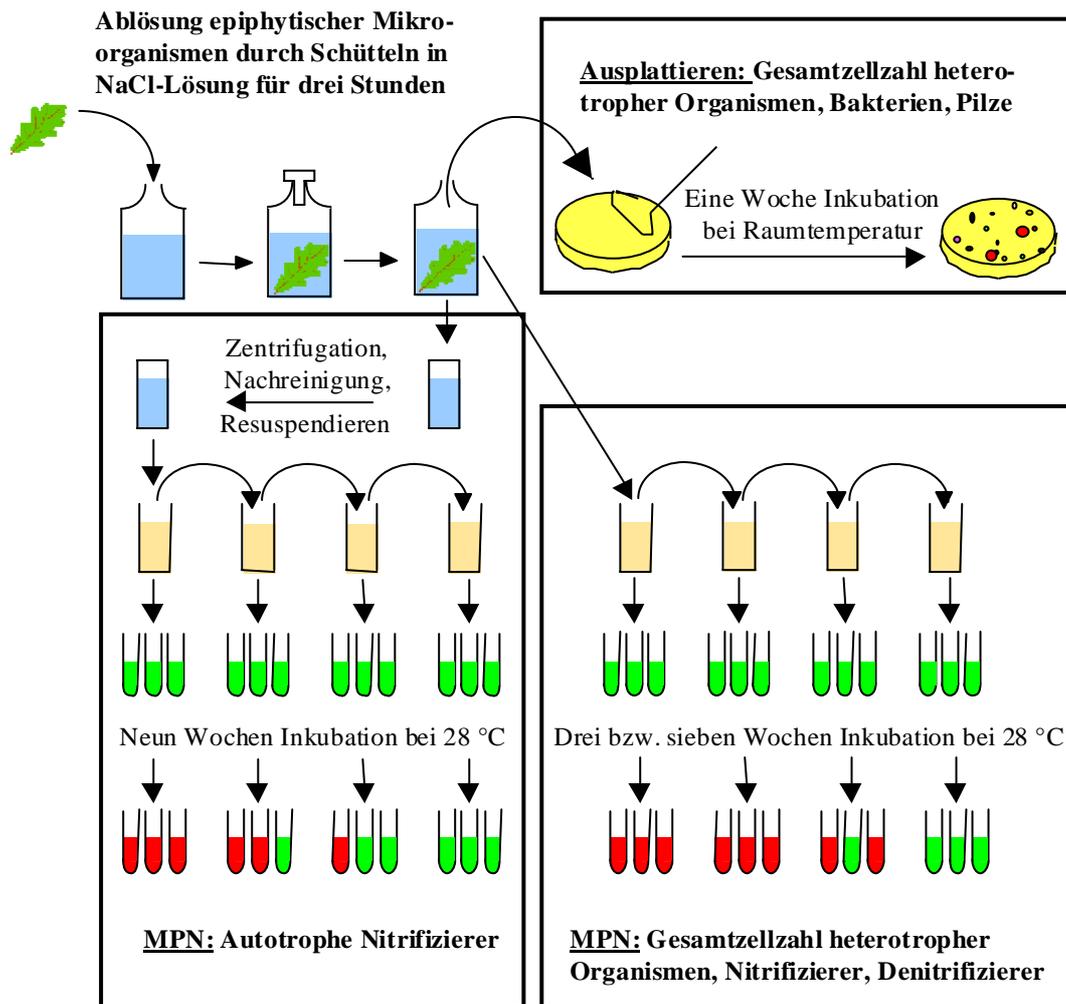


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der entwickelten Extraktionsmethode zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen. Blätter von Stieleichen, welche unterschiedlichen UV-B Strahlungsexpositionen ausgesetzt waren (2.3-4), wurden in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung geschüttelt, wodurch epiphytische Mikroorganismen von der Blattoberfläche abgelöst wurden (3.1.1). Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen sowie der Anteile an Pilzen, Bakterien, Denitrifizierern und heterotrophen Nitrifizierern wurde diese Extraktionslösung ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt (2.6.1.1-2, 2.6.2, 3.1.2). Autotrophe Nitrifizierer (2.6.1.3-4) wurden nach Entfernung löslicher Neutralzucker durch Zentrifugation der Extraktionslösung (2.9.2) quantifiziert.

3.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und heterotropher Nitrifizierer mittels MPN-Technik

Die Quantifizierung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen sowie die Bestimmung des Anteils heterotropher Nitrifizierer erfolgten gleichzeitig im selben MPN-Ansatz (2.6.1.1). Heterotrophe Nitrifizierer wurden durchschnittlich nur in jeder fünften untersuchten Probe nachgewiesen, während eine Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen in nahezu allen Proben möglich war.

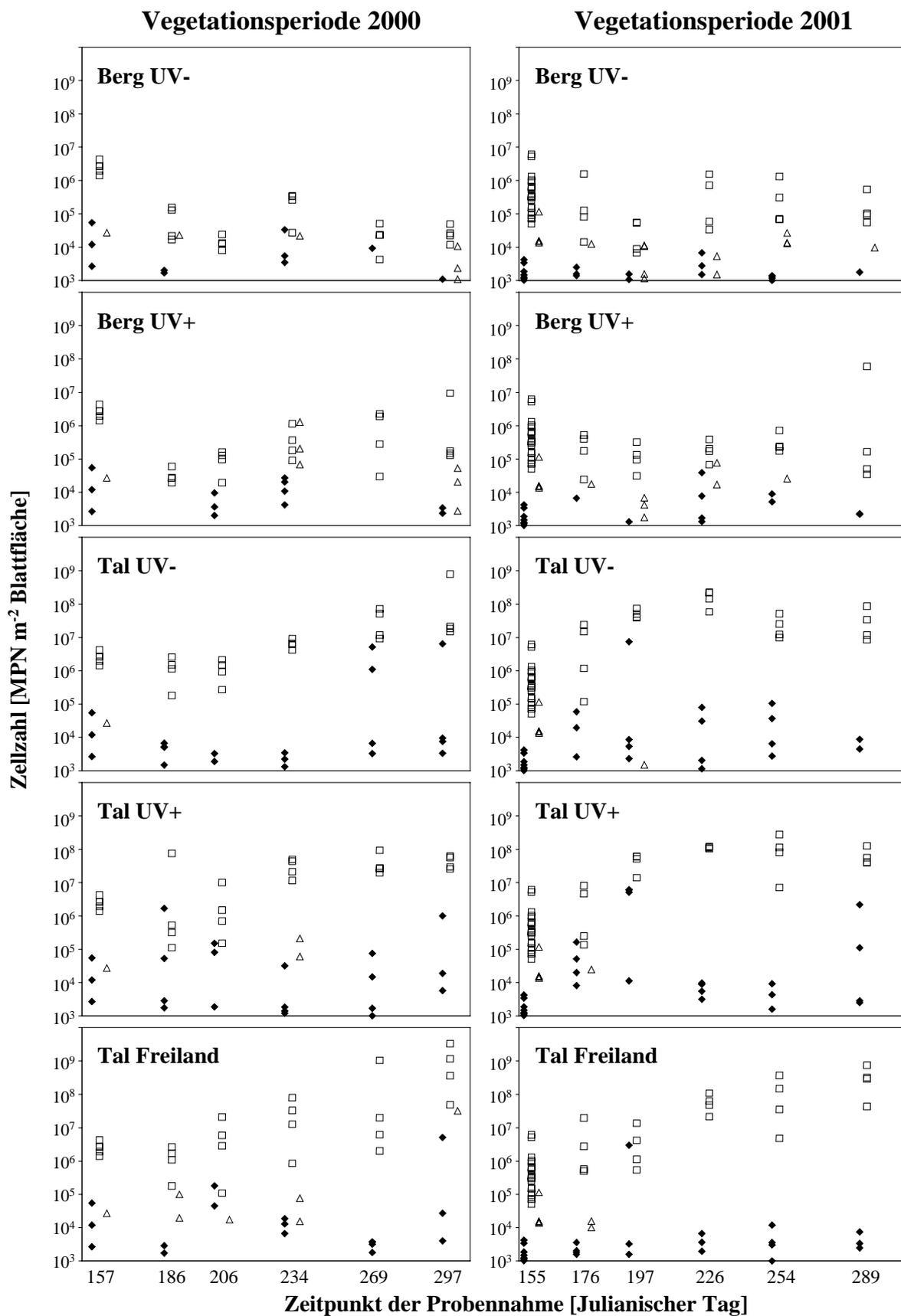


Abb. 3.4: [Legende siehe nächste Seite]

Abb. 3.4: Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen, heterotropher Nitrifizierer und Denitrifizierer auf Blattoberflächen von Stieleichen (*Quercus robur* L.) mittels MPN-Technik. Blätter von Eichen, welche bei unterschiedlichen UV-B Strahlungsniveaus angezogen wurden (2.3-4), wurden in den Jahren 2000 und 2001 auf epiphytische Mikroorganismen untersucht. Mit Hilfe einer entwickelten Extraktionsmethode (3.1.1) wurden Mikroorganismen von Blattoberflächen abgelöst und mittels zweier MPN-Methoden (2.6.1.1-2) die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen [□] sowie die Mengen heterotropher Nitrifizierer [Δ] und Denitrifizierer [◆] bestimmt. Alle Bestimmungen wurden in vier Parallelen zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten [P1 – P5] in beiden Vegetationsperioden durchgeführt. Zusätzlich wurde vor Beginn der unterschiedlichen Behandlungen eine Nullprobe [P0] aus der Gesamtheit aller Versuchspflanzen gezogen, um einen Ausgangswert der Zellzahl epiphytischer Mikroorganismen auf den untersuchten Pflanzen zu bestimmen.

Vor Versuchsbeginn [Nullprobe, Julianischer Tag 157] wurden in der Vegetationsperiode 2000 auf Eichenblättern Gesamtzellzahlen heterotropher Organismen in einer Größenordnung von 10^6 bis 10^7 Zellen m^{-2} Blattfläche ermittelt (Abb. 3.4). Die Pflanzen wurden anschließend auf unterschiedliche Standorte mit verschiedenen UV-B Strahlungsintensitäten aufgeteilt (2.3-4). Am Standort Berg reduzierten sich die Organismenzahlen bereits bis zur nächsten Probennahme [P1, Julianischer Tag 186] auf 10^4 bis 10^5 Zellen m^{-2} Blattfläche. Im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode wurden gleich bleibende Zellzahlen dieser Größenordnung bestimmt, welche zwischen minimal $4,2 \times 10^3$ und maximal $9,4 \times 10^7$ Zellen m^{-2} Blattfläche schwankten. Im Gegensatz hierzu zeigten die ermittelten Zellzahlen epiphytischer Mikroorganismen von Pflanzen aus den Tal-Standorten im Verlauf der Vegetationsphase einen Anstieg der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen. Es wurden Werte zwischen $1,1 \times 10^5$ und $3,3 \times 10^9$ Zellen m^{-2} Blattfläche ermittelt. Am Ende der Vegetationsperiode [P5, Julianischer Tag 297] wurden Zellzahlen um 10^7 bis 10^8 , am Freilandstandort sogar bis 10^9 Zellen m^{-2} Blattfläche bestimmt (Abb. 3.4).

Zu Beginn der Vegetationsperiode 2001 [Nullprobe, Julianischer Tag 155] wurden 10^5 bis 10^6 heterotrophe Organismen m^{-2} Blattfläche nachgewiesen (Abb. 3.4). In Extraktionslösungen von Blättern des Berg-Standorts wurde während der nächsten beiden Probennahmen eine leichte Reduzierung der Zellzahlen auf ca. 10^4 bis 10^5 Zellen m^{-2} festgestellt. Im weiteren Versuchsverlauf erfolgte ein geringer Anstieg der Zelldichten, so daß am Versuchsende nahezu das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Die Zellzahlen am Standort Berg schwankten zwischen $6,7 \times 10^3$ und 6×10^7 Zellen m^{-2} Blattfläche. Wie im Vorjahr stieg die Anzahl heterotropher Organismen auf Blättern von Eichen des Tal-Standorts auch während der Vegetationsperiode 2001 deutlich an. Es wurde eine Variationsbreite der Zellzahlen von $7,1 \times 10^4$ bis $7,5 \times 10^8$ Zellen m^{-2} Blattfläche bestimmt, und zu Versuchsende [P5, Julianischer Tag 289] wurden 10^7 bis 10^8 Zellen m^{-2} Blattfläche ermittelt.

Der Nachweis heterotropher Nitrifizierer war nicht in allen Proben möglich, so daß keine statistisch abgesicherte Bewertung der Zellzahlen erfolgen konnte. Bei Pflanzen, die in der Vegetationsperiode 2000 im Tal ohne UV-B Strahlung kultiviert wurden, waren keine heterotroph nitrifizierenden Mikroorganismen nachweisbar. Die während der Vegetationsperiode bestimmten Zellzahlen schwankten zwischen 1×10^3 und $3,3 \times 10^7$ Nitrifizierern m^{-2} Blattfläche (Abb. 3.4), wobei in der Mehrzahl der untersuchten Proben 10^3 bis 10^5 Nitrifizierer m^{-2} Blattfläche bestimmt wurden. In beiden untersuchten Vegetationsperioden waren auf Blättern von Eichen aus den Solardomen am Standort Berg häufiger heterotrophe Nitrifizierer nachweisbar als auf Blättern von Pflanzen des Tal-Standorts (Abb. 3.4).

3.2.2 Quantifizierung von Denitrifizierern mittels MPN-Technik

Epiphytische Mikroorganismen von Blattoberflächen wurden mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode in eine 0,9 %ige NaCl-Lösung überführt (3.1.1) und diese mit einer geeigneten MPN-Methode zur Bestimmung denitrifizierender Organismen (2.6.1.2) untersucht. Da Denitrifizierer nicht auf allen Pflanzen unterschiedlicher Standorte und UV-B Expositionen nachweisbar waren, wurde die Beschreibung von jahreszeitlichen Verläufen erschwert. In der Vegetationsperiode 2000 wurden auf Eichenblättern $9,4 \times 10^2$ bis $6,4 \times 10^6$ und im Jahr 2001 $8,6 \times 10^2$ bis $7,4 \times 10^6$ Denitrifizierer m^{-2} Blattfläche bestimmt (Abb. 3.4).

Die quantitative Bestimmung der Zellzahlen von Denitrifizierern auf Blattoberflächen ergab – unabhängig vom Jahr und von der UV-B Strahlungsexposition – in der Mehrzahl der untersuchten Blätter eine Größenordnung von 10^3 bis 10^5 Denitrifizierern m^{-2} Blattfläche, ohne daß genauere Aussagen hinsichtlich einer jahreszeitlichen Entwicklung oder eines UV-B Einflusses möglich waren.

3.2.3 Quantifizierung autotropher Ammoniak- und Nitritoxidierer mittels MPN-Technik

Nach Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen (3.1.1) und Entfernung löslicher Zucker aus diesen Extraktionslösungen (2.9.2) wurde die so aufgearbeitete Lösung mittels zweier MPN-Techniken auf Anwesenheit von autotrophen Ammoniak- und Nitritoxidierern untersucht (2.6.1.3-4).

In der Vegetationsperiode 2000 konnten in keiner Probe autotrophe Ammoniakoxidierer nachgewiesen werden. Autotrophe Nitritoxidierer wurden vereinzelt nachgewiesen. Um sicherzustellen, daß die positiven Nitratnachweise auch tatsächlich auf mikrobiologische Nitratproduktion zurückzuführen waren, wurden Aliquots dieser Proben in frische Nährmediumröhrchen überimpft und erneut inkubiert. In diesen Kontrollen wurde in allen Fällen eindeutig mikrobielle Nitratproduktion nachgewiesen (2.6.1.3-4). Autotrophe Nitritoxidierer wurden in einer Größenordnung von 10^3 bis 10^4 Zellen m^{-2} Blattfläche nachgewiesen. Da die untere Nachweisgrenze der eingesetzten Methode bei ca. 10^3 Zellen m^{-2} Blattfläche lag, erschien dieser Ansatz nur bedingt geeignet. Autotrophe Nitritoxidierer wurden meistens nur in jeweils einer der vier untersuchten Parallelen (2.4) nachgewiesen, so daß keine statistische Absicherung der ermittelten Zellzahlen möglich war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ausgeschlossen, daß autotrophe Nitrifizierer zahlenmäßig einen bedeutenden Anteil an der epiphytischen Gesamtpopulation stellen, weshalb keine weitere Untersuchung in der Vegetationsperiode 2001 erfolgte.

3.2.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und der Anteile an Bakterien und Pilzen mittels Ausplattieren

Nach dem Ablösen epiphytischer Mikroorganismen von der Oberflächen von Eichenblättern mit Hilfe der entwickelten Extraktionsmethode (3.1.1) wurden Aliquots der gewonnenen Extraktionslösung auf Nährmedienplatten eines Sojabohnen-Agars ausplattiert (2.6.2, 3.1.2).

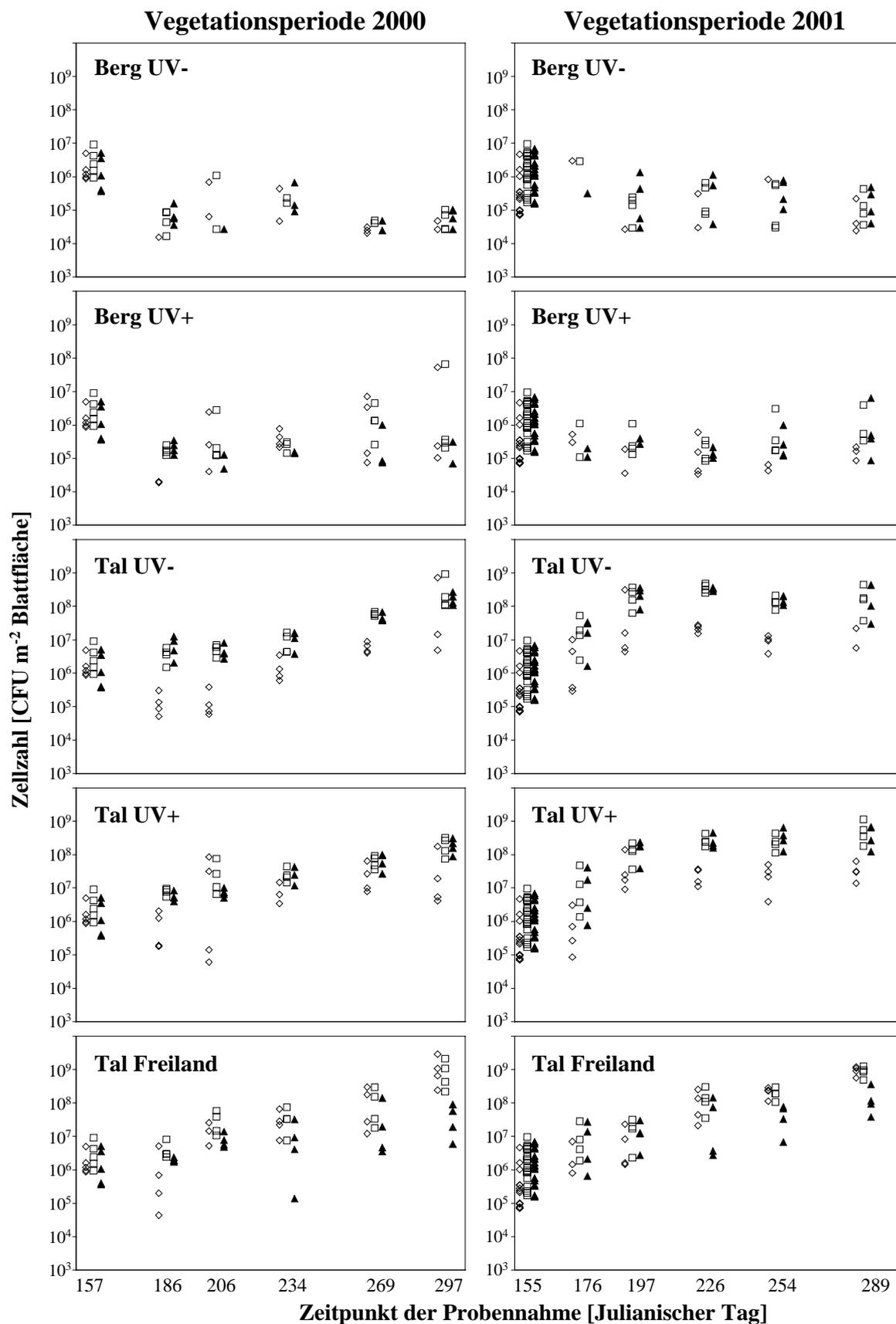


Abb. 3.5: [Legende siehe nächste Seite]

Abb. 3.5: Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Mikroorganismen und der Anteile an Bakterien und Pilzen auf Blattoberflächen der Stieleichen (*Quercus robur* L.) durch Ausplattieren. Epiphytische Mikroorganismen auf Blättern von Eichen, welche verschiedenen UV-B Strahlungsexpositionen ausgesetzt waren (2.3-4), wurden mit Hilfe einer entwickelten Extraktionsmethode (3.1.1) abgelöst. Aliquots dieser Lösung wurden durch Ausplattieren auf einem Sojabohnen-Agar (2.6.2, 3.1.2), dem selektive Hemmstoffe zugesetzt wurden (2.6.2.2), ausplattiert. Durch Auszählung Kolonien bildender Einheiten [CFU] wurden die Anzahl heterotropher Organismen [□] und die Anteile an Bakterien [◇] und Pilzen [▲] ermittelt. In beiden untersuchten Jahren wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten [P1 – P5] vier unabhängige Proben aller Anzuchtvarianten untersucht. Vor Beginn der unterschiedlichen Behandlungen wurde eine Nullprobe [P0] aus der Gesamtheit aller Versuchspflanzen geerntet, um einen Ausgangswert epiphytischer Mikroorganismen auf Blättern dieser Pflanzen zu bestimmen.

Durch Zusatz selektiver Hemmstoffe (2.6.2.2) wurden Wachstumsbedingungen generiert, die ausschließlich für Bakterien bzw. Pilze geeignet waren. Nach einer Inkubation von sieben Tagen bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden Kolonien bildende Einheiten [CFU] auf den Nährmediumplatten ausgezählt.

Bevor die zu untersuchenden Eichen im Versuchsjahr 2000 auf die verschiedenen Standorte mit unterschiedlichen UV-B Expositionen verteilt wurden, erfolgte die Bestimmung eines Ausgangswertes der mikrobiellen Besiedlung [Nullprobe, Julianischer Tag 157]. Sowohl für die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen als auch für die Anteile an Bakterien und Pilzen wurde eine Größenordnung von 10^6 CFU m⁻² Blattfläche ermittelt (Abb. 3.5). Unabhängig von der UV-B Strahlungsexposition verringerte sich die Zellzahl epiphytischer Mikroorganismen von Pflanzen des Standorts Berg bereits bis zur nächsten Probennahme [P1, Julianischer Tag 186] um eine Größenordnung. Dieses Niveau wurde im Verlauf der Vegetationsperiode gehalten bzw. nur minimal überschritten. Für Pflanzen des Standorts Berg wurden $1,5 \times 10^4$ bis $6,7 \times 10^7$ CFU m⁻² Blattfläche bestimmt. Am Ende der Vegetationsperiode 2000 [P5, Julianischer Tag 297] wurde auf den meisten Blättern eine Gesamtzellzahl von 10^5 CFU m⁻² Blattfläche mit etwa gleicher Verteilung von Bakterien und Pilzen bestimmt. Die Zellzahl epiphytischer Mikroorganismen von Pflanzen des Tal-Standorts erhöhten sich im Vergleich zur Nullprobe unabhängig von der ausgesetzten UV-B Strahlungsexposition. Während der Vegetationsphase wurde eine Variationsbreite von $4,3 \times 10^4$ bis $2,9 \times 10^9$ CFU m⁻² Blattfläche ermittelt, wobei die höchsten Werte in der letzten Probennahme [P5, s.o.] gefunden wurden [10^8 bis 10^9 CFU m⁻² Blattfläche]. Auf Blättern von Eichenpflanzen, die in den beiden Phytokammern im Tal kultiviert wurden [Tal UV-, Tal UV+], wurden mehr Pilze als Bakterien nachgewiesen, während auf Eichenblättern von Pflanzen, die im Freiland kultiviert wurden, das umgekehrte Verhältnis bestimmt wurde (Abb. 3.5).

Im Versuchsjahr 2001 wurden die Beobachtungen des Vorjahrs bestätigt. Untersuchungen bei Versuchsbeginn [Nullprobe, Julianischer Tag 155] ergaben einen vergleichbaren Ausgangswert an heterotrophen Organismen in einer Größenordnung von 10^6 CFU m⁻² Blattfläche (Abb. 3.5). Am Standort Berg wurden im Verlauf der Vegetationsperiode meistens geringere Zellzahlen bestimmt, die zwischen $2,4 \times 10^4$ und $6,8 \times 10^6$ CFU m⁻² Blattfläche variierten. In der letzten Probennahme [P5, Julianischer Tag 289] wurde für den Standort Berg eine Gesamtzellzahl heterotropher Organismen in einer Größenordnung von 10^5 bis 10^6 CFU m⁻² Blattfläche bestimmt mit ähnlichen Anteilen an Bakterien und Pilzen. Auf Blättern von Eichen des Tal-Standorts wurden im Verlauf der Vegetationsphase steigende Zellzahlen ermittelt. Die Variationsbreite der gemessenen Werte betrug $2,0 \times 10^5$ bis $1,3 \times 10^9$ CFU m⁻² Blattfläche. Zu Versuchsende wurden Gesamtzellzahlen in einer Größenordnung von 10^8 bis

10^9 CFU m⁻² Blattfläche ermittelt. Wie im Vorjahr wurde auf Blättern von Eichen aus den Phytokammern im Tal ein größerer Pilz- als Bakterienanteil bestimmt, während auf Blattoberflächen von Eichen aus dem Freiland der bakterielle Anteil überwog.

3.3 Entwicklung einer anzuchtsfreien, molekularbiologischen Quantifizierungsmethode für epiphytische Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.)

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete mikrobiologische Untersuchungsmethode (3.1) ermöglichte die Bestimmung der Lebendzellzahl verschiedener Gruppen von Mikroorganismen nach Kultivierung in einem geeigneten Fest- oder Flüssignährmedium (3.2). Dieser klassische Ansatz ist oftmals material- und zeitaufwendig. So werden zum Beispiel für die Quantifizierung autotropher Nitritoxidierer mittels MPN-Technik (2.6.1.4) für jede Blattprobe vier Verdünnungsstufen, zwölf Nährmediumröhrchen sowie neun Wochen Inkubationszeit benötigt. Darüber hinaus ist nur eine geringe Anzahl von Mikroorganismen unter den beschriebenen Bedingungen kultivierbar. Einige wichtige pflanzenpathogene Pilze, wie beispielsweise der Eichenmehltau *Microsphaera alphitoides*, können nicht getrennt von ihrem Wirt kultiviert werden (ESSER, 2000). Zur Untersuchung solcher Spezies wurde daher eine neue, molekularbiologische Untersuchungsmethode entwickelt, welche die gattungs- oder sogar speziesspezifische Quantifizierung der Kopienzahl genomischer DNA ermöglichte. Hierzu war zunächst die Entwicklung einer geeigneten Methode zur quantitativen Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von der Blattoberfläche und zur Isolation von DNA dieser Organismen erforderlich. Anschließend war geplant, die isolierte DNA epiphytischer Mikroorganismen unter Verwendung gattungs- bzw. speziesspezifischer Primer in PCR-Ansätze einzusetzen, um rDNA-Genomsegmente zu erhalten, die nach Sequenzierung eine Identifizierung der auf Eichenblättern vorkommenden Mikroorganismen erlaubte. Auf den Sequenzdaten aufbauend war die Entwicklung von Real Time PCR-Systemen zur Quantifizierung ausgewählter epiphytischer Mikroorganismen möglich.

3.3.1 Entwicklung einer Technik zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche ["Abhebetchnik"]

Mikroskopische Untersuchungen von Eichenblättern (3.3.2), welche mit der entwickelten Extraktionsmethode (3.1) behandelt worden waren, ergaben, daß nicht alle epiphytischen Mikroorganismen von der Blattoberfläche mit dieser Methode entfernt wurden (Abb. 3.6). Für die neu zu entwickelnde molekularbiologische Untersuchungsmethode wurde daher eine neue Ablösetechnik entwickelt. Ausgangspunkt für diesen Ansatz war eine aus der Wachsanalytik stammende Methode zur Untersuchung der Kutikula auf Blattoberflächen (ENSİKAT et al., 2000, JETTER et al., 2000, JETTER & SCHÄFFER, 2001), welche von SCHREIBER und SCHEINPFLUG (2000) modifiziert wurde. Diese Methode wurde für die Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche weiterentwickelt.

25 ml steriles Wasser wurden in eine Edelstahlwanne [120 x 80 x 6 mm] gefüllt und ein Eichenblatt mit der Blattoberseite nach unten auf die Flüssigkeit gelegt. Durch Abkühlen der Edelstahlwanne in flüssigem Stickstoff frohr die Blattoberfläche auf dem Wasser fest. Mit

einem sterilen Spatel wurde das Blatt von der Eisschicht abgehoben ["Abhebetechnik"], wobei die epikutikuläre Wachsschicht auf dem gefrorenen Wasser zurückblieb. Diese Technik war prädestiniert für die Ablösung epiphytischer Mikroorganismen, da diese sich auf bzw. in dieser Wachsschicht befinden. Der Teil der gefrorenen Wasserschicht, über dem sich das Blatt befunden hatte [erkennbar an einem Blattabdruck im Eis], wurde mit einem Spatel zerkleinert und in gefrorenem Zustand für die anschließende DNA-Isolation aus epiphytischen Mikroorganismen (3.3.3) in Zentrifugenröhrchen überführt (Abb. 3.7). Ein vorheriges Auftauen der Eisschicht war nicht sinnvoll, da die auf der Flüssigkeit schwimmende Wachsschicht große Affinität zu Oberflächen zeigte und so große Verluste beim Umfüllen der aufgetauten Lösung auftraten. In weiteren Untersuchungen wurden den 25 ml Wasser in der Edelstahlwanne unterschiedliche Konzentrationen einer Tris-HCl-Pufferlösung [pH 8] sowie verschiedener Detergenzien [Tween® 80, SDS] zugesetzt, jedoch wurde hiermit keine verbesserte Ablösung der Wachsschicht erreicht, so daß die Ablösung epiphytischer Mikroorganismen für alle weiteren Untersuchungen wie oben beschrieben durchgeführt wurde (Abb. 3.7).

3.3.2 Mikroskopische Untersuchungen der Blattoberseite von Eichenblättern (*Quercus robur* L.) zum Vergleich verschiedener Ablösetechniken von epiphytischen Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Techniken zur Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche eingesetzt. Während für die mikrobiologische Methode (3.1) Blattproben in einer Extraktionslösung geschüttelt wurden ["leaf washing"], wurde im molekularbiologischen Ansatz die Abhebetechnik (3.3.1) angewandt. Um die Effizienz beider Ablösetechniken zu vergleichen, wurden Oberseiten von Eichenblättern (*Quercus robur* L.) mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden Blattproben aus dem Freiland (2.3.2) unbehandelt und nach Ablösung durch die Extraktions- bzw. Abhebemethode mikroskopiert.

Durch zehnminütige Inkubation von Eichenblättern in einer DAPI-Lösung wurden epiphytische Mikroorganismen angefärbt und nach Abwaschen der Färbelösung mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskops (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) sichtbar gemacht (2.8.2). Die Blattoberseiten wurden mit Licht der Wellenlängen 364 nm, 543 nm und 633 nm verschiedener Laser angeregt und durch Wahl geeigneter Filtersets die Emissionen der Wellenlängenbereiche der DAPI-Fluoreszenz [> 470 nm] sowie der Autofluoreszenz des Chlorophylls [660 – 700 nm] gemessen (2.8.2). Die so entstandenen mikroskopischen Aufnahmen zeigten deutliche Unterschiede in der mikrobiellen Besiedlung der unterschiedlich behandelten Blätter (Abb. 3.6). Während unbehandelte Blätter eine dichte Besiedlung mit Bakterien und Pilzen erkennen ließen, war die mikrobielle Biomasse auf Blattproben, die mittels Extraktionsmethode (3.1) behandelt worden waren, deutlich reduziert (Abb. 3.6). Allerdings wurde keine vollständige Ablösung epiphytischer Mikroorganismen erreicht. Insbesondere entlang von Leitungsgefäßen ["Blattadern"] auf der Blattoberseite blieb ein Teil der Mikroorganismen haften (Abb. 3.6 B). Hingegen wurde mit der Abhebetechnik (3.3.1) eine quantitative Ablösung der mikrobiellen Biomasse von der Blattoberfläche erreicht. In den betrachteten mikroskopischen Aufnahmen waren nahezu keine verbliebenen Mikroorganismen auf der Blattoberseite erkennbar.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Vorteile der Abhebetechnik gegenüber klassischen Ablösemethoden wie der Extraktionsmethode ["leaf washing"].

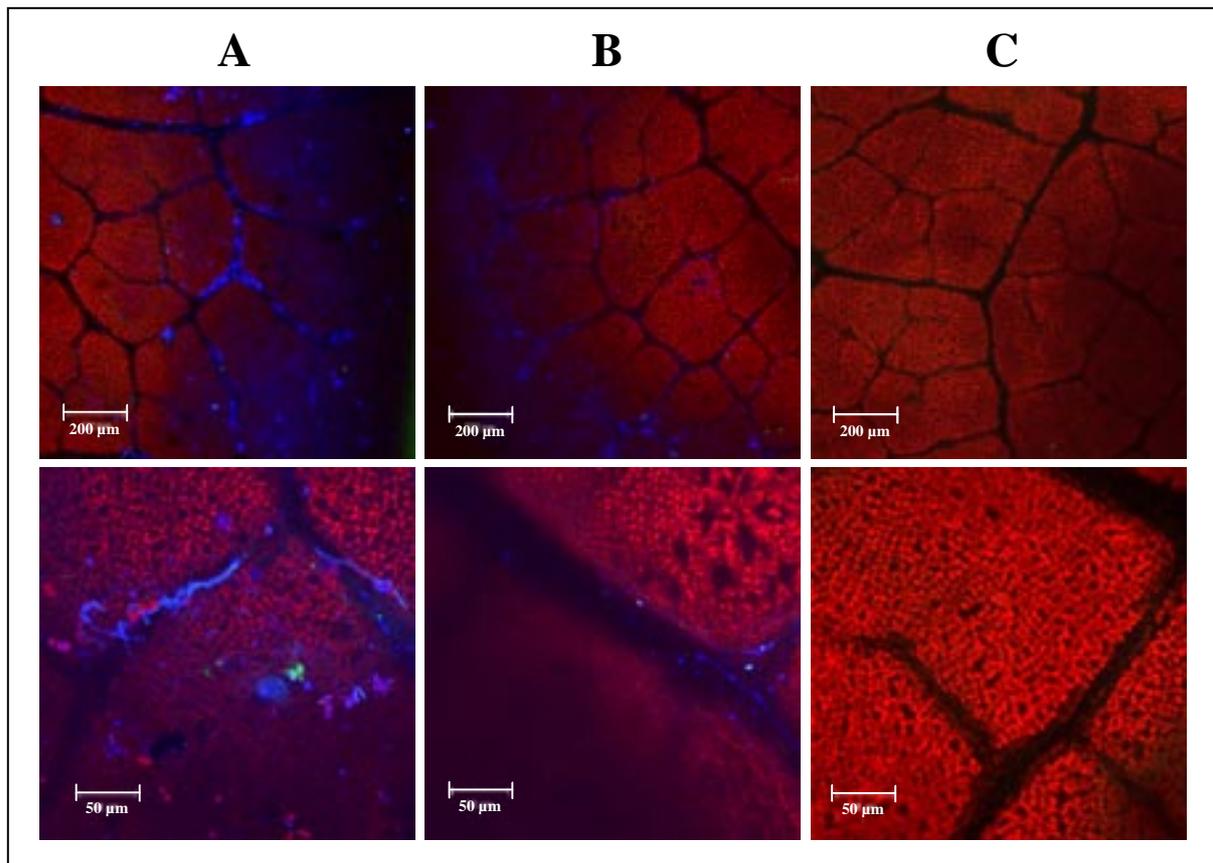


Abb. 3.6: Mikroskopische Aufnahmen von epiphytischen Mikroorganismen auf Eichenblättern zum Vergleich verschiedener Ablösetechniken. Die Oberseiten von Eichenblättern aus dem Freiland (2.3) wurden für zehn Minuten in einer DAPI-Lösung [$1 \mu\text{g ml}^{-1}$] zur Färbung epiphytischer Mikroorganismen inkubiert und nach Abwaschen in H_2O an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) untersucht. Die Blattfläche wurde mit Licht der Wellenlängen 364 nm, 543 nm und 633 nm verschiedener Laser angeregt und durch Einsatz entsprechender Filtersets die Emissionsbereiche der DAPI-Fluoreszenz [$> 470 \text{ nm}$, blau dargestellt] und der Autofluoreszenz des Chlorophylls [660 – 700 nm, rot dargestellt] detektiert (2.8.2). Abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen unbehandelter Blätter [A] sowie Blattproben nach Behandlung mit der Extraktionsmethode [B] (3.1) und der Abhebetechnik [C] (3.3.1).

3.3.3 DNA-Isolation aus epiphytischen Mikroorganismen von Blattoberflächen

Es wurden drei Methoden zur DNA-Isolation aus epiphytischen Mikroorganismen verglichen (2.7.15). Beste Ergebnisse wurden mit einer Aufarbeitung gemäß eines Protokolls zur Isolation von bakterieller Gesamt-DNA erzielt. Diese Methode wurde für alle weiteren Untersuchungen in Kombination mit der Abhebetechnik eingesetzt. Um Verluste während der Aufarbeitung quantifizieren zu können, wurden allen Ansätzen 10^8 Kopien eines Myrcensynthase-Gens aus der Steineiche (*Quercus ilex* L.) zugesetzt (FISCHBACH 2001, FISCHBACH et al., 2001). Mit Hilfe dieses internen Standards (2.7.14) war es möglich, Wiederfindungsraten zu berechnen (2.7.14). Da DNA unspezifisch an Oberflächen bindet, wurden allen Ansätzen noch im gefrorenen Zustand (3.3.1) Träger-DNA [DNA aus Heringssperma, Invitrogen, Karlsruhe] in einer Endkonzentration von $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ zugesetzt. Die Menge an eingesetzter Träger-DNA übertraf die DNA-Menge epiphytischer

Mikroorganismen um mehrere Größenordnungen, so daß Verluste von DNA epiphytischer Mikroorganismen durch Adsorption an die Gefäßwände minimiert wurden.

Die mit dieser Methode (Abb. 3.7) gewonnene DNA wurde anschließend in Polymerasekettenreaktionen zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Mikroorganismen eingesetzt.

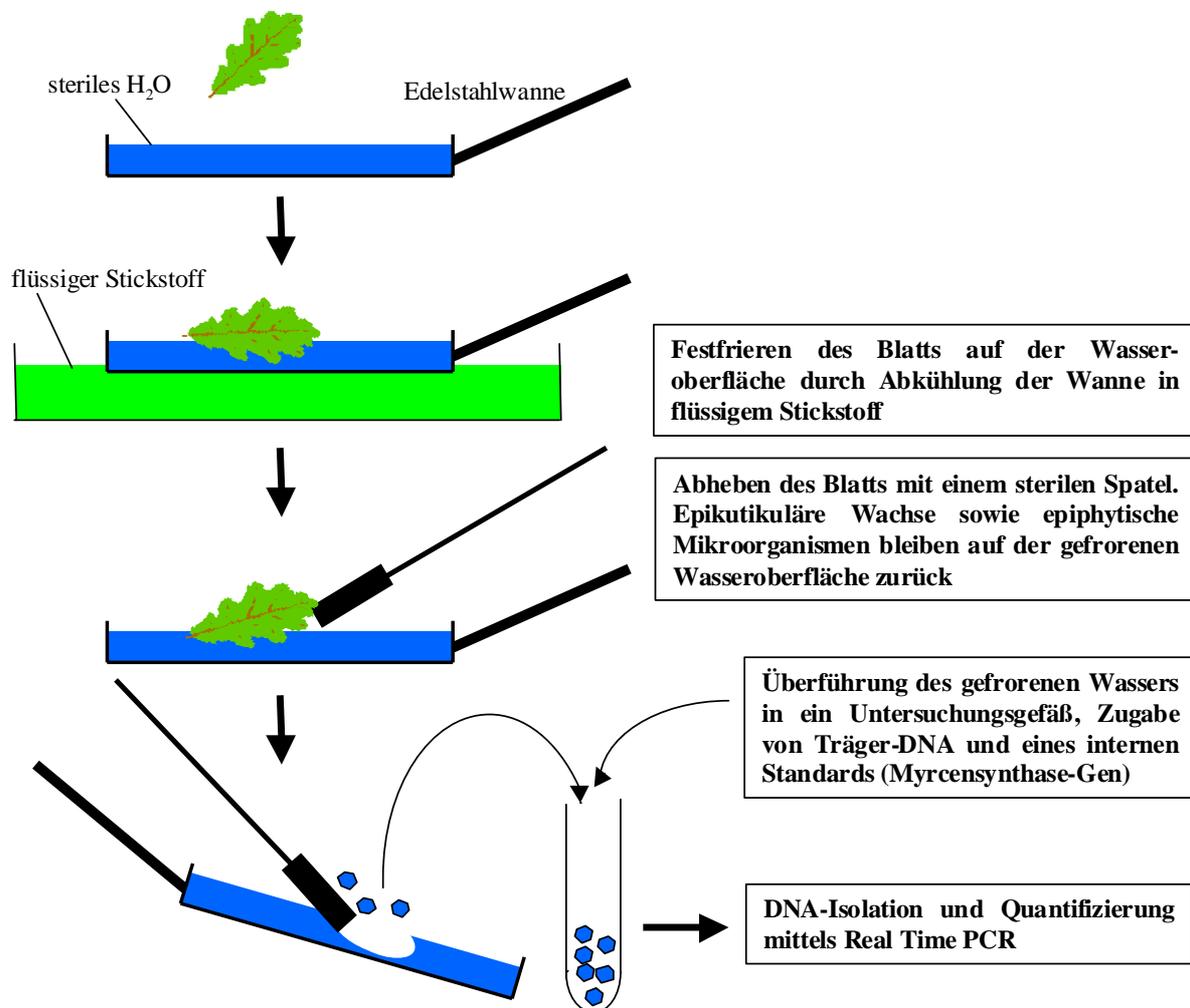


Abb. 3.7: Schematische Übersicht der entwickelten Abhebeteknik zur DNA-Isolierung aus epiphytischen Mikroorganismen. Blätter von Stieleichen wurden mit der Blattoberseite nach unten in eine mit 25 ml H₂O gefüllte Edelstahlwanne gelegt. Durch Kühlen der Wanne in flüssigen Stickstoff froz die Blattoberseite im Wasser fest. Das Eichenblatt wurde mit einem Spatel entfernt, wobei die epikutikuläre Wachsschicht inklusive epiphytischer Mikroorganismen in der gefrorenen Lösung zurückblieben. Der Teil der Eisschicht, über dem sich das festgefrorene Blatt befand, wurde mit einem Spatel zerkleinert und in ein Untersuchungsgefäß überführt. Nach der Zugabe von Träger-DNA [DNA aus Heringssperma] sowie eines internen Standards [Myrcensynthase-Gen] erfolgte die Isolation der DNA aus epiphytischen Mikroorganismen.

3.3.4 Auswahl geeigneter Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Segmenten mittels Polymerasekettenreaktion [PCR]

Mit Hilfe der beschriebenen Abhebeteknik (3.3.1) war es möglich, epiphytische Mikroorganismen von der Blattoberfläche abzulösen und ihre DNA zu isolieren. Für die

Entwicklung von Real Time PCR-Systemen zur Quantifizierung bestimmter Arten oder Gattungen war es zunächst erforderlich, die gesuchten Arten auf der Blattoberfläche der Eiche mittels PCR-Amplifizierung nachzuweisen. Die Sequenzierung dieser PCR-Amplifikate ermöglichte anschließend die Auswahl geeigneter Oligonukleotide zum Aufbau von Real Time PCR-Systemen (3.3.6).

3.3.4.1 Auswahl von Oligonukleotiden zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Pilze

Mehltau (*Microsphaera spec.*) ist ein bedeutender phytopathogener Pilz auf Blättern der Stieleiche (BUTIN, 1989). Zur Amplifizierung von DNA-Segmenten von *Microsphaera spec.* mittels PCR war die Auswahl spezifischer Oligonukleotide essentiell. Hierzu wurden die Datenbanken von EMBL und GenBank (2.7.2) nach Sequenzdaten der ITS-Region [internal transcribed spacer region] von *Microsphaera spec.* durchsucht. Die ITS-Region ist ein hoch variabler, Organismen-spezifischer, nicht kodierender Bereich zwischen der 18S und 28S rDNA (WHITE et al., 1990). Er wird von der 5,8S rDNA in zwei ITS-Bereiche geteilt. Insgesamt wurden 15 verschiedene Mehltausequenzen dieser Region in den Datenbanken gefunden. Durch Sequenzvergleiche dieser Arten wurden konservierte Regionen innerhalb der Gattung *Microsphaera* identifiziert, die als Vorlage zur Synthese der Oligonukleotide "Mic for" und "Mic rev" (Abb. 3.8, Tab 3.1) genutzt wurden. Zusätzlich wurden vier ITS-Primer (Abb. 3.8, Tab 3.1), welche für die Amplifizierung einer breiten Gruppe von Pilzen geeignet waren (WHITE et al., 1990), verwendet [freundlicherweise von Herrn Günther Bahnweg, GSF, Neuherberg zur Verfügung gestellt] und in allen sinnvollen Kombinationsmöglichkeiten in PCR-Versuchen eingesetzt.

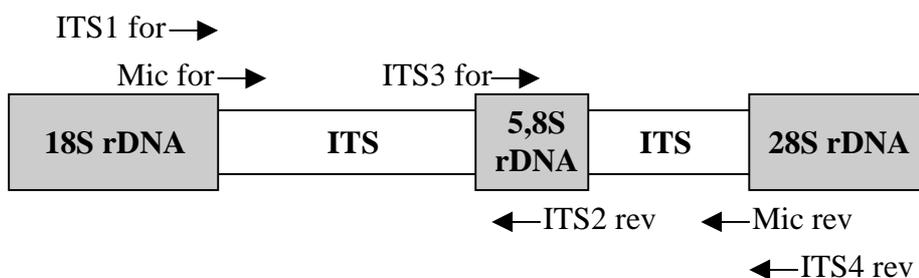


Abb. 3.8 Ausgewählte Oligonukleotide zur Amplifizierung eines DNA-Segments aus *Microsphaera spec.* mittels PCR. Schematische Darstellung der eukaryotischen ITS-Regionen und Bindungsstellen eingesetzter Primer. Die Primer wurden in allen sinnvollen Kombinationen eingesetzt (verändert nach WHITE et al., 1990).

Nach Optimierung der PCR-Bedingungen (2.7.3.2) und gelelektrophoretischer Analyse der PCR-Amplifikate (2.7.13) wurden unter Verwendung der Primerkombination "ITS1 for" und "Mic rev" PCR-Produkte der erwarteten Größe amplifiziert (Abb. 3.9), welche anschließend sequenziert wurden (3.3.5).

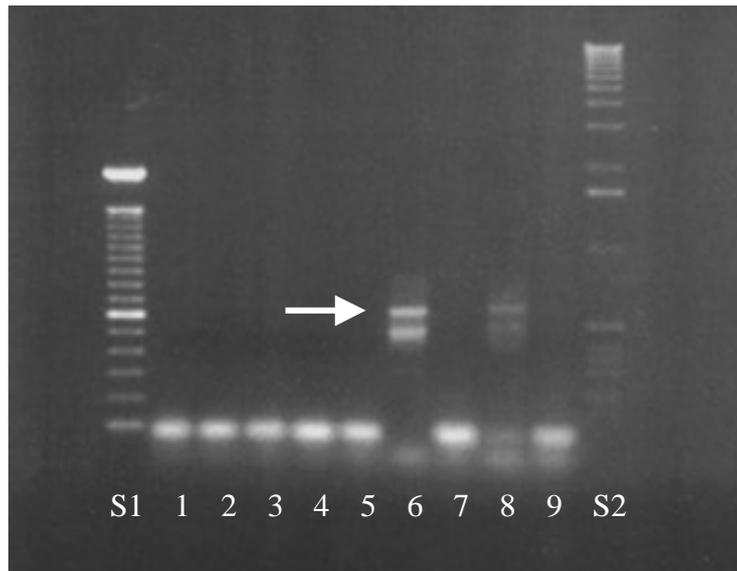


Abb. 3.9 Gelelektrophoretische Analyse von PCR-Ansätzen zur Amplifizierung eines Mehltau-DNA-Segments. Jeweils 10 μ l der PCR-Ansätze wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese getrennt (2.7.13). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm fotografiert. S1: 100 bp Standard; S2: 1 kb Standard; 1-9: PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen bezüglich $MgCl_2$ -Konzentrationen [1-3: 1mM; 4-6: 2 mM; 7-9: 4mM] und Annealing-Temperaturen [1, 4, 7: 52 °C; 2, 5, 8: 55 °C; 3, 6, 9: 58 °C]. Alle PCR-Ansätze enthielten die Oligonukleotide "ITS1 for" und "Mic rev" unter angegebenen PCR-Bedingungen (2.7.3.2). Die erwartete Amplikongröße betrug ca. 600 bp (Pfeil).

3.3.4.2 Auswahl von Oligonukleotiden zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Bakterien

Erwinia spec.

Zur Auswahl geeigneter Oligonukleotide für den Nachweis von epiphytischen *Erwinia*-Bakterien auf der Blattoberfläche von Eichenblättern mittels PCR wurden mehrere Nukleotidsequenzen von *Erwinia spec.* aus der Genbank miteinander verglichen (2.7.2), um konservierte Sequenzbereiche zu identifizieren. Um ein möglichst breites Spektrum von Bakterien innerhalb der Gattung *Erwinia* zu erfassen, wurden sowohl Sequenzen aus der 16S Region als auch aus der "intergenic spacer region" berücksichtigt. Die "intergenic spacer region" ist ein mit Ausnahme der t-RNA-Glu (Abb. 3.10) nicht kodierender Bereich zwischen der 16S und 23S rDNA von Prokaryoten. Um zu gewährleisten, daß die zur Oligonukleotid-Auswahl herangezogenen Sequenzbereiche innerhalb der Gattung *Erwinia* konserviert, jedoch gegenüber anderen Enterobakterien ausreichend verschieden waren, wurde die Sequenz der "intergenic spacer region" von zwei *Erwinia pyrifoliae*-Stämmen [AJ132969 und AJ009930] und von *Erwinia rhapontici* [AF232678] mit der Genbank verglichen (2.7.2) und *Escherichia vulneris* [AF047421] als nächster Verwandter außerhalb der Gattung *Erwinia* ermittelt [79,2 % Übereinstimmung zu *Erwinia rhapontici*]. Sequenzbereiche, in denen es Übereinstimmung zwischen den *Erwinia*-Sequenzen und Unterschiede zu *Escherichia vulneris* gab, wurden zur Auswahl von Oligonukleotiden herangezogen (Abb. 3.10, Tab. 3.1.).

erforderlich, um sicher zu stellen, daß die Bindungsstellen der Primer und Sonden im Genom von *Escherichia coli* TG1 enthalten waren.

Zur Auswahl von Oligonukleotiden wurden die für *Erwinia spec.* beschriebenen Arbeitsschritte [s.o.] in analoger Weise durchgeführt. Aus der Genbank (2.7.2) wurden mehrere 16S rDNA-Sequenzen von *E. coli* K12-Stämmen, zu denen auch der eingesetzte *E. coli* TG1 zählte, auf konservierte Bereiche untersucht. Hieraus wurden die Oligonukleotidsequenzen "Ecoli16S for" und "Ecoli16S rev" abgeleitet (Tab. 3.1). Nach Optimierung der PCR-Bedingungen (2.7.3.2) wurde ein geeignetes Amplifikat erhalten, welches anschließend sequenziert wurde.

Tab. 3.1 Sequenzen aller Oligonukleotide zur Amplifizierung von DNA-Segmenten von *Microsphaera spec.*, *Escherichia coli* TG1 und *Erwinia spec.*. Dargestellt sind Bezeichnung und Basensequenz in 5' → 3' Leserichtung.

Oligonukleotid Bezeichnung	Basensequenz
<i>Microsphaera spec.</i>	
Mic for	ATT AC(AC) GAG (CT)G(CT) GAG GCT CAG TCG
Mic rev	CTA CCT GA(AT) TCG AGG TCA ACC TGT G
ITS1 for	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS2 rev	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
ITS3 for	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC
ITS4 rev	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
<i>E. coli</i> TG1	
Ecoli16S for	TGG GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC
Ecoli16S rev	AAC CCA ACA TTT ACA AAC ACG AGC
<i>Erwinia spec.</i>	
Erwin for1	CCT CAC ACC ATC GGA TGT GC
Erwin rev1	GTC AAG GCC AGG TAA GGT TC
Erwin for2	AAA GTC ACA CCA GAG TCC CCA TC
Erwin rev2	GAA CAT ATC GTT A(AG)(CT) TTC ATT C

3.3.5 Sequenzierung und Identifizierung von PCR-Amplifikaten epiphytischer Mikroorganismen von Eichenblättern

Unter Verwendung der aus konservierten Regionen abgeleiteten Oligonukleotide (3.3.4) und der isolierten DNA epiphytischer Mikroorganismen von Stieleichen (2.7.3.1, 3.3.1) wurden mittels Polymerasekettenreaktionen (2.7.3) DNA-Segmente amplifiziert und anschließend sequenziert (2.7.4-9). Die Basensequenz der untersuchten rDNA-Regionen (Abb. 3.11) erlaubte zum einen die Identifizierung der Proben durch einen Vergleich mit den Datenbanken von EMBL und GenBank (2.7.2). Zum anderen waren die Sequenzdaten essentielle Voraussetzung zum Aufbau hoch spezifischer Real Time PCR-Systeme. Insgesamt wurden elf unterschiedliche rDNA-Sequenzen der Gattungen *Cladosporium*, *Microsphaera*, *Ramularia* und *Erwinia* identifiziert (Abb. 3.11). Die sequenzierten rDNA-Segmente der filamentösen Pilze *Cladosporium spec.* und *Ramularia spec.* stammten aus dem gleichen PCR-Ansatz, aus dem auch die Genomabschnitte von *Microsphaera spec.* isoliert wurden und

erklärten die Anwesenheit einer in der gelelektrophoretischen Untersuchung dieses PCR-Ansatzes sichtbaren, zweiten DNA-Bande [ca. 500 bp] (Abb. 3.9).

Das aus dem Laborstamm *Escherichia coli* TG1 isolierte rDNA-Segment besaß eine 100 %ige Übereinstimmung zu anderen *E. coli* K12-Stämmen und war somit zur Eichung des Real Time PCR-Systems zur Quantifizierung von Eubakterien geeignet.

A: Epiphytische Bakterien

Erwinia spec.:

Erwin1 [AJ489444; 262 bp]:

```

1 AAAGTCACAC CAGAGTCCCC ATCGTCTAGA GGCCAGGAC ACTGCCCTTT CACGGCTGTA 60
61 ACAGGGGTTT GAATCCCCTT GGGGACGCCA TCTCCTGATA ATGAGTGAAA GACATTATCA 120
121 ACCCGTATCT CAAAACCTGAT TCTCTCCGCA AGGACGAGTC ACGTTTGAGA TATTTGCTCT 180
181 TTAACAATCC GGAACAAGCT GAAAATTGAA ACGACATGTC GTTTTCATTC TCCGTAATAA 240
241 GAATGAAACT AACGATATGT TC

```

92,7 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

Erwin2 [AJ489441; 262 bp]:

```

1 AAAGTCACAC CAGAGTCCCC ATCGTCTAGA GGCCAGGAC ACTGCCCTTT CACGGCTGTA 60
61 ACAGGGGTTT GAATCCCCTT GGGGACGCCA TCTCCTGATA ATGAGTGAAA GACATTATCA 120
121 ACCCGTATCT CAAAACCTGAT TCTCTCCGCA AGGACGAGTC ACGTTTGAGA TATTTGCTCT 180
181 TTAACAATCC GGAACAAGCT GAAAATTGAA ACGACATGTC GTTTTCATTC TCCGTAATAA 240
241 GAATGAAATT AACGATATGT TC

```

92,7 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

Erwin3 [AJ489442; 252 bp]:

```

1 AAAGTCACAC CAGAGTCCCC ATCGTCTAGA GGCCAGGAC ACTGCCCTTT CACGGCTGTA 60
61 ACAGGGGTTT GAATCCCCTT GGGGACGCCA CACCGGTAAC GACGTGAAAAG ACGTTGCCAC 120
121 TCAGTATCTC AAAGCTGACT TTAACGAGTC ACGTTTGAGA TATCTGCTCT TTAACAATCC 180
181 GGAACAAGCT GAAAATTGAA ACGACATGTC GTTTTCATTC TCCGTAATAA GAATGAAATT 240
241 AACGATATGT TC

```

92,1 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

Erwin4 [AJ489443; 252 bp]:

```

1 AAAGTCACAC CAGAGTCCCC ATCGTCTAGA GGCCAGGAC ACTGCCCTTT CACGGCTGTA 60
61 ACAGGGGTTT GAATCCCCTT GGGGACGCCA CACCGGTAAC GACGTGAAAAG ACGTTGCCAC 120
121 TCAGTATCTC AAAGCTGACT TTAACGAGTC ACGTTTGAGA TATTTGCTCT TTAACAATCC 180
181 GGAACAAGCT GAAAATTGAA ACGACATGTC GTTTTCATTC TCCGTAATAA GAATGAAATT 240
241 AACGATATGT TC

```

92,5 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

Erwin5 [AJ489446; 173 bp]:

```

1 AACTGCCCT TTCACGGCTG TAACAGGGGT TCGAATCCCC TTGGGGACGC CATCTCCTGA 60
61 TAATGAGTGA AGGACATTAT CAACCCGTAT CTCAAAACTG ATTCTCTCCG CAAGGACGAG 120
121 TCACATTTGA GATATTTGCT CTTTAACAAT CCGGAACAAG CTGAAAATTG AAA

```

86,5 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

Erwin6 [AJ489445; 173 bp]:

```

1 AACTGCCCT TTCACGGCTG TAACAGGGGT TCGAATCCCC TTGGGGACGC CATCTCCTGA 60
61 TAATGAGTGA AAGACATTAT CAACCCGTAT CTCAAAACTG ATTCTCTCCG CAAGGACGAG 120
121 TCACATTTGA GATATTTGCT CTTTAACAAT CCGGAACAAG CTGAAAATTG AAA

```

87,2 % Übereinstimmung mit *Erwinia rhapontici* [AF232678]

B: Epiphytische Pilze***Cladosporium spec.:***Clado [AJ417495; 506 bp]:

```

1 TCCGTAGCTG AACCTGCGGA GGGATCATT A TATGACGCC CAGGCTTGTA CAGCTGGGAA 60
61 CGCACAAACC TTTGTTTTCC GACTCTGTTG CCTCCGGGGC GACCCTGCCT TCGGGCGGGG 120
121 GCTCCGGGTG GACACTTCAA ACTCTTGCGT AACTTTGCAG TCTGAGTAAA CTTAATTAAT 180
181 AAATTA AAAAC TTTTAACAAC GGATCTCTTG GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA 240
241 TGCGATAAGT AATGTGAATT GCAGAATTCA GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG 300
301 CGCCCCCTGG TATTCCGGGG GGCATGCCTG TTTCGAGCGTC ATTTACCAC TCAAGCCTCG 360
361 CTTGGTATTG GGCGCCGCGA GTCTCTCGCG CGCCTCAAAG TCTCCGGCTA GGCGGTTTCGT 420
421 CTCCCAGCGT TGTGGCAACT ATTTCGAGAG GAGTTCGAGT CGTCGAGGCC GTTAAATCTT 480
481 GAGTTCGAGT CGTCGAGGCC GTTAAATCTT TCACAGGTTG ACCTCGATT C AGGTAG

```

91,1 % Übereinstimmung zu *Cladosporium spec.* [AJ300336]***Microsphaera spec.:***Micro1 [AJ417497; 605 bp]:

```

1 TCCGTAGCTG AACCTGCGGA AGGATCATT A CAGAGTGTGA GGCTCAGTCG TGGCATCTGC 60
61 TGCGTGCTGG GCCGACCCTC CCACCCGTGT CGATTTGTAT CTTGTTGCTT TGGCGGGCCG 120
121 GGCCGCGTCG TCGCTGCTCC GCAAGGACAT GCGTCGGCCG CCCACCGGTT TCGGCTGGAG 180
181 CGCGCCCGCC AAAGACCCAA CCAAACTCA TGTTGTTTTT GTCGTCTTAG CTTTATTATT 240
241 GAAATTGATA AAACCTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC 300
301 GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTTAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC 360
361 ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GAGGGGCATG CCTGTTTCGAG CGTCATAACA CCCCTCCAG 420
421 CTGCCTTTGT GTGGCTGCGG TGTTGGGGCT CGTCGCGATG CGGCGGCCCT TAAAGACAGT 480
481 GGCGGTCCCG GCGTGGGCTC TACGCGTAGT AACTTGCTTC TCGCGACAGA GTGACGACGG 540
501 TGGCTTGCCA GAACAACCCA CTTGCTCCAG TCACATGGAT CACAGGTTGA CCTCGAATCA 600
601 GGTAG

```

100 % Übereinstimmung zu *Microsphaera alphitoides* [AF298538]Micro2 [AJ417498; 604 bp]:

```

1 TCCGTAGCTG AACCTGCGGA AGGATCATT A CAGAGTGTGA GGCTCAGTCG TGGCATCTGC 60
61 TGCGTGCTGG GCCGACCCTC CCACCCGTGT CGATTTGTAT CTTGTTGCTT TGGCGGGCCG 120
121 GGCCGCGTCG TCGCTGCTCC GCAAGGACAT GCGTCGGCCG CCCACCGGTT TCGGCTGGAG 180
181 CGCGCCCGCC AAAGACCCAA CCAAACTCA TGTTGTTATT GTCGTCTTAG CTTTATTATT 240
241 GAAATTGATA AAACCTTCAA CAACGGATCT CTTGGCTCTG GCATCGATGA AGAACGCAGC 300
301 GAAATGCGAT AAGTAATGTG AATTGCAGAA TTTAGTGAAT CATCGAATCT TTGAACGCAC 360
361 ATTGCGCCCC TTGGTATTCC GAGGGGCATG CCTGTTTCGAG CGTCATAACA CCCCTCCAG 420
421 CTGCCTTTGT GTGGCTGCGG TGTTGGGGCT CGTCGCGATG CGGCGGCCCT TAAAGACAGT 480
481 GGCGGTCCCG GCGTGGGCTC TACGCGTAGT AACTTGCTTC TCGCGACAGA GTGACGACGG 540
541 TGGCTTGCCA GAACAACCCA CTTGCTCCAG TCACATGGAT CACAGTTGAC CTCGATTTCAG 600
601 GTAG

```

99,8 % Übereinstimmung zu *Microsphaera alphitoides* [AF298538]

Ramularia spec.:

Ramu1 [AJ417496; 495 bp]

```

1 TCCGTAGCTG AACCTGCGGA GGGATCATT A CTGAGTTAGG GAGCAATCCC GAACCTCCAA 60
51 CCCTTTGTGA ACACATCTAG TTGCTTCGGG GGGCACCCTG CCGTTTCGAC GGCATTCCCC 120
121 CCGGAGGTCA TCAAAACACT GCATTCTTAC GTCGGAGTAT AAAGTTAATT TAATAAAACT 180
181 TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA 240
241 ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTCGAA CGCACATTGC GCCCCCTGGT 300
301 ATTCCGGGGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTTCACTACT CAAGCCTCGC TTGGTATTGG 360
361 GCGTCGCGAG TCTCTCGCGC GCCTCAAAGT CTCCGGCTAG GCGGTTCGTC TCCCAGCGTT 420
421 GTGGCAACTA TTCGCAGAGG AGTTCGAGTC GTCGCGGCCG TTAAATCTTT CACAGGTTGA 480
481 CCTCGAATCA GGTAG

```

96,2 % Übereinstimmung zu *Ramularia collo-cygni* [AF173310]

Ramu2 [495 bp]

```

1 TCCGTAGCTG AACCTGCGGA GGGATCATT A CTGAGTTAGG GAGCAATCCC GAACCTCCAG 60
51 CCCTTTGTGA ACACATCTTG TTGCTTCGGG GGGCACCCTG CCGTTTCGAC GGCATTCCCC 120
121 CCGGAGGTCA TCAAAACACT GCATTCTTAC GTCGGAGTAT AAAGTTAATT TAATAAAACT 180
181 TTCAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA 240
241 ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCCCTGGT 300
301 ATTCCGGGGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTGCACCACT CAAGCCTCGC TTGGTATTGG 360
361 GCGTCGCGAG TCTCTCGCGC GCCTCAAAGT CTCCGGCTAG GCGGTTCGTC TCCCAGCGTT 420
421 GTGGCAACTA TTCGCAGAGG AGTTCGAGTC GTCGTGGCCG TTAAATCTTT CACAGGTTGA 480
481 CCTCGAATCA GGTAG

```

96,0 % Übereinstimmung zu *Ramularia collo-cygni* [AF173310]

Abb. 3.11: Nukleotidsequenzen von rDNA-Segmenten epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche. Unter Verwendung gattungsspezifischer Oligonukleotide (3.3.4) und DNA epiphytischer Mikroorganismen von Blättern der Stieleiche (2.7.3.1, 3.3.1) wurden mittels PCR (2.7.3) verschiedene rDNA-Regionen amplifiziert. Diese wurden ligiert, kloniert und sequenziert (2.7.4-9) und mit Sequenzen der Datenbank (2.7.2) verglichen. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen der untersuchten epiphytischen Bakterien [A] und Pilze [B] sowie die größte Übereinstimmung zu Sequenzen der Datenbanken von EMBL und GenBank. [Ein Sequenzvergleich der unterschiedlichen *Erwinia*-Isolate ist in Abb. 3.12 dargestellt].

3.3.6 Auswahl geeigneter Oligonukleotide für die Quantifizierung unterschiedlicher mikrobieller Gattungen mittels Real Time PCR

Die Nukleotidsequenzen von rDNA-Segmenten der Gattungen *Cladosporium*, *Microsphaera*, *Ramularia* und *Erwinia* (3.3.5) wurden auf geeignete Sequenzbereiche zum Aufbau von Real Time PCR-Systemen untersucht. Für diese vier Systeme wurde die kostengünstigere Syber® Green-Technik (2.7.16.1) eingesetzt, während bei der von BACH et al. (2002) übernommenen Real Time-Methode zur Quantifizierung von Eubakterien die TaqMan®-Technik genutzt wurde (2.7.16.2). Zusätzlich wurde ein weiteres Real Time PCR-System auf Syber® Green-Basis zur Quantifizierung des als internem Standard verwendeten Myrcensynthase-Gens (FISCHBACH, 2001, FISCHBACH ET AL., 2001) entwickelt.

Bei der Auswahl geeigneter Oligonukleotide mußten sowohl Anforderungen der Real Time PCR-Technik hinsichtlich Schmelzpunkt, Amplikonlänge usw. als auch ausreichende Spezifität berücksichtigt werden. Die Vorgehensweise sei am Beispiel der Primer-Auswahl für *Erwinia spec.* kurz erläutert: Analog zur Auswahl von Oligonukleotiden für eine herkömmliche PCR (3.3.4.2) wurden alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Sequenzen von

Erwinia-Arten aus der Genbank miteinander verglichen (2.7.2), um konservierte Regionen zu lokalisieren. Durch Vergleich der so gefundenen Sequenzen von zwei *Erwinia pyrifoliae*-Stämmen [AJ132969; AJ009930] und von *Erwinia rhapontici* [AF232678] mit der Sequenz von *Escherichia vulneris* [AF047421], dem nächsten Verwandten außerhalb der Gattung *Erwinia* [79,2 % Übereinstimmung zu *Erwinia rhapontici*], war es möglich, Regionen, die innerhalb der Enterobakterien konserviert sind, von Regionen, die spezifisch für die Gattung *Erwinia* sind, zu unterscheiden (3.3.4.2, Abb. 3.10). Mit Hilfe des Softwareprogramms "Primer Express 2.0" (Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden die Sequenzen bezüglich Schmelzpunkt, Amplikonlänge, GC-Gehalt usw. (Tab. 2.3) untersucht (2.7.16) und eine Liste möglicher Primer und Sonden-Kombinationen ermittelt. Aus diesen drei Kriterien [konserviert innerhalb der Gattung *Erwinia*, verschieden zu anderen Enterobakterien, Anforderungen der Real Time PCR] wurde nun ein Kompromiß gesucht, der möglichst allen Bedingungen gerecht wurde, und entsprechende Oligonukleotide synthetisiert (Tab. 3.2). In ähnlicher Weise wurde bei der Auswahl von Real Time PCR-Primern für die Gattungen *Cladosporium*, *Microsphaera* und *Ramularia* verfahren. Für die Untersuchung von Eubakterien mittels Real Time PCR wurden die Nukleotidsequenzen der Primer und der TaqMan-Sonde von BACH et al. (2002) übernommen (Tab. 3.2).

```

Erwin1      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCATCTCCTGA
Erwin2      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCATCTCCTGA
Erwin3      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCAC--ACCGG
Erwin4      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCAC--ACCGG
Erwin5      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCATCTCCTGA
Erwin6      ACACTGCCCTTTTCACGGCTGTAACAGGGGTTCTGAATCCCCTTGGGGACGCCATCTCCTGA
*****
*****

TAATGA-GTGAAAGACATTATCAACCCGTATCTCAAAACTGATTCTCTCCGCAAGGACGAGTCACGTTTGA
TAATGA-GTGAAAGACATTATCAACCCGTATCTCAAAACTGATTCTCTCCGCAAGGACGAGTCACGTTTGA
TAACGACGTGAAAGACGTTGCACTCAGTATCTCAAAGCTGACT-TT-----AACGAGTCACGTTTGA
TAACGACGTGAAAGACGTTGCCACTCAGTATCTCAAAGCTGACT-TT-----AACGAGTCACGTTTGA
TAATGA-GTGAAGGACATTATCAACCCGTATCTCAAAACTGATTCTCTCCGCAAGGACGAGTCACATTTGA
TAATGA-GTGAAAGACATTATCAACCCGTATCTCAAAACTGATTCTCTCCGCAAGGACGAGTCACATTTGA
*** ** ***** ** * * * ***** * * * ***** *****

GATATTTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
GATATTTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
GATATCTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
GATATTTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
GATATTTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
GATATTTGCTCTTTAACAATCCGGAACAAGCTGAAAATTGAAA
*****

```

Abb. 3.12: Vergleich sechs unterschiedlicher Sequenzen von *Erwinia spec.* zur Auswahl von spezifischen TaqMan®-Sonden zur Quantifizierung unterschiedlicher Gruppen innerhalb der Gattung *Erwinia*.

Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Nukleotidsequenzen von epiphytischen *Erwinia*-Bakterien von Blattoberflächen der Stieleiche isoliert (3.3.1), mittels PCR amplifiziert (2.7.3) und schließlich sequenziert (2.7.4-9). Mit Hilfe des Software-Programms Clustal W 1.8 wurde ein Sequenzvergleich (2.7.2) der "intergenic spacer"-Regionen zwischen der 16S und 23S rDNA dieser sechs Amplifikate durchgeführt. Übereinstimmende Basenpositionen wurden mit * gekennzeichnet. Dargestellt ist ausschließlich der für alle Isolate bekannte Sequenzbereich zwischen den Primern "Erwin RT for" und "Erwin RT rev". Zur Auswahl spezifischer Sonden wurden Bereiche ausgewählt, in denen sich die betrachteten Sequenzen unterschieden. Die entsprechenden Sequenzen der Sonden wurden fett gedruckt. Aus dem Amplifikat "Erwin3" wurde Sonde "Erwin P1" abgeleitet [spezifisch für "Erwin3" und "Erwin4"], die Sequenz von Sonde "Erwin P2" stammt aus "Erwin5" und ist nur für diesen Klon spezifisch. Sonde "Erwin P3" wurde aus dem Klon "Erwin1" abgeleitet und stimmt außerdem mit der Sequenz von "Erwin2" überein (Tab. 3.2).

Neben diesem Syber® Green-System [s.o.] zur Quantifizierung der Kopienzahlen von "Gesamt *Erwinia*" wurden weitere Real Time PCR-Systeme auf Basis der TaqMan®-Methode (2.7.16.2) aufgebaut, um eine genauere Unterscheidung innerhalb der Gattung *Erwinia* zu erreichen. Für diese Untersuchungen wurden die sechs unterschiedlichen Sequenzen von *Erwinia*-Klonen herangezogen, welche von Blattoberflächen der Eiche isoliert worden waren (3.3.1-5, Abb. 3.11). Für diese Systeme wurden die gleichen Primer des Syber® Green-Ansatzes verwendet, jedoch in Kombination mit einer hoch spezifischen TaqMan®-Sonde. Ein Nukleotidsequenzvergleich aller Isolate von *Erwinia spec.* (Abb. 3.12) zeigte, daß es innerhalb der Gattung zwei unterschiedliche Gruppen von Species gibt. Gruppe A umfaßte die Sequenzen "Erwin3" und "Erwin4", die sich lediglich in einer Basenposition unterschieden. Die deutlich unterschiedliche Gruppe B beinhaltete die Klone "Erwin1", "Erwin2", "Erwin5" und "Erwin6". Diese vier Isolate besaßen an drei Stellen unterschiedliche Basensequenzen.

Tab. 3.2: Sequenzen aller Oligonukleotide zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels Real Time PCR. Alle Basensequenzen wurden in 5' → 3' Leserichtung dargestellt.

*: Die Nukleotidsequenzen zur Untersuchung von Eubakterien wurden von BACH et al. (2002) übernommen.
FAM: Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein; TAMRA: Quencher 6-Carboxytetramethylrhodamin.

Oligonukleotid	Basensequenz
Myrcensynthase (interner Standard)	
Myr1 for	AAC CAT TCC TTG GAG TTC CCA
Myr1 rev	TGC TTC CAA CCT AGG CAT CCT
<i>Cladosporium spec.</i>	
Clado for	GCG CGC CTC AAA GTC TCC
Clado rev	TGA AAG ATT TAA CGG CCT CGA C
<i>Microsphaera spec.</i>	
Micro for	CGC TGC TCC GCA AGG AC
Micro rev	GCG CTC CAG CCG AAA CC
<i>Ramularia spec.</i>	
Ramu for	ATC ATT ACT GAG TTA GGG AGC AAT CC
Ramu rev	GGG GAA TGC CGT CGA AAC
Eubakterien	
Eubak for*	GGT AGT C(CT)A (CT)GC (AC)(GC)T AAA CG
Eubak rev*	GAC A(AG)C CAT GCA (GC)CA CCT G
Eubak Sonde*	FAM T(GT)C GCG TTG C(AGT)T CGA ATT AA(AT) CCA C TAMRA
<i>Erwinia spec.</i>	
Erwin RT for	ACA CTG CCC TTT CAC GGC T
Erwin RT rev	TTT CAA TTT TCA GCT TGT TCC G
Erwin P1	FAM ACC GGT AAC GAC GTG AAA GAC GTT GC TAMRA
Erwin P2	FAM ACG CCA TCT CCT GAT AAT GAG TGA AGG ACA TAMRA
Erwin P3	FAM ACG TGA CTC GTC CTT GCG GAG AGA ATC TAMRA

Durch einen Vergleich der sechs Sequenzen wurden Regionen ausgewählt, die innerhalb der Gattung *Erwinia* eine genauere Unterscheidung von Gruppen und einzelnen Klonen ermöglichte. Durch Verwendung der TaqMan®-Sonde "Erwin P1" (Tab 3.2) [spezifisch für

"Erwin3" und "Erwin4"] wurden beide Isolate der Gruppe A erfaßt. Für die Gruppe B wurden zwei weitere Sonden konstruiert. Die Sonde "Erwin P2" (Tab 3.2) deckte sich ausschließlich mit der Nukleotidsequenz des Klon "Erwin5", während die Sonde "Erwin P3" spezifisch war für "Erwin1" und "Erwin2" (Tab 3.2). Die Kombination dieser entwickelten Real Time PCR-Systeme erlaubte die Bestimmung der Gesamtkopienzahl von *Erwinia spec.* mittels Syber Green®-Methode sowie eine genauere Unterscheidung verschiedener Gruppen innerhalb der Gattung *Erwinia*.

3.3.7 Kalibrierung der Real Time PCR-Systeme zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen

Vor der Quantifizierung von Genomkopien epiphytischer Mikroorganismen wurden die unterschiedlichen Real Time PCR-Systeme zunächst optimiert (2.7.16.3) und kalibriert. Für diese Untersuchungen wurde von den sequenzierten Klonen hochreine Plasmid-DNA isoliert (2.7.10) und die DNA-Menge spektralphotometrisch bestimmt (2.7.11).

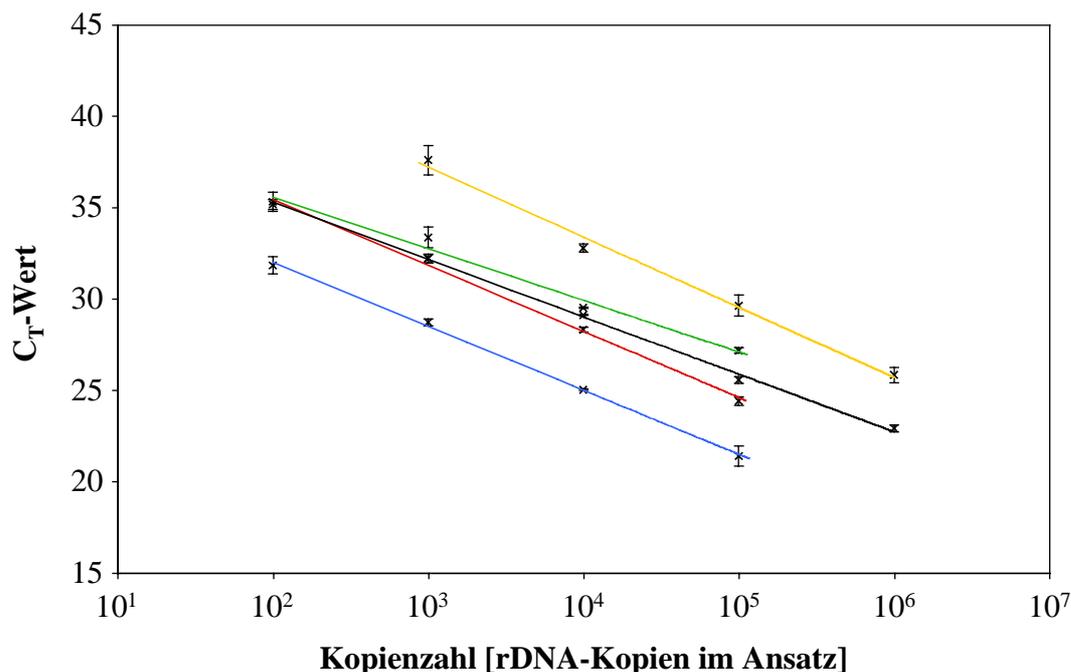


Abb. 3.13: Kalibrationsgeraden von Syber® Green Real Time PCR-Systemen. Aufgetragen wurden die eingesetzten Kopienzahlen verschiedener Standard-DNA-Lösungen gegen die C_T -Werte. Der C_T -Wert ["Threshold Cycle"] gibt die Nummer des ersten PCR-Zyklus an, in dem ein Fluoreszenzsignal detektiert wird, das über dem Schwellenwert ["Rauschen"] liegt (2.7.16). Als Standards wurden hochreine Plasmid-DNA-Lösungen mit klonierten DNA-Segmenten epiphytischer Mikroorganismen eingesetzt, welche von der Blattoberfläche der Stieleiche isoliert wurden (3.3.1-5). Die Kopienzahl wurde nach spektralphotometrischer Messung der DNA-Menge berechnet (2.7.11-12). Alle Datenpunkte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt. Dargestellt sind die Kalibrationsgeraden der Syber® Green-Systeme von *Erwinia spec.* [—]: $R^2 = 0,993$; *Microsphaera spec.* [—]: $R^2 = 0,985$; Myrcensynthese [—]: $R^2 = 0,997$; *Ramularia spec.* [—]: $R^2 = 0,996$ und *Cladosporium spec.* [—]: $R^2 = 0,999$.

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Molekulargewichte der Vektoren wurde die Kopienzahl der Plasmide berechnet (2.7.12). Durch entsprechende Verdünnungen wurden von allen hochreinen Plasmiden Kalibrationslösungen mit definierten Kopienzahlen hergestellt, die für die Optimierung und Kalibrierung der Real Time-Systeme eingesetzt wurden.

Sowohl für die fünf entwickelten Syber® Green-Ansätze [*Cladosporium spec.*, *Erwinia spec.*, *Microsphaera spec.*, *Ramularia spec.* und Myrcensynthase-Gen] als auch für die vier TaqMan®-Systeme ["Erwin P1", "Erwin P2", "Erwin P3" und Eubakterien] wurden Kalibrationsgeraden mit sehr hohen Regressionskoeffizienten [$0,949 \leq R^2 \leq 0,999$] ermittelt, was eindeutig die Funktionalität und Genauigkeit der entwickelten Real Time PCR-Systeme zeigte (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). In weiteren Versuchen wurde eine untere Nachweisgrenze von kleiner 100 Kopien und eine obere Grenze von über 10^8 Kopien pro Ansatz bestimmt.

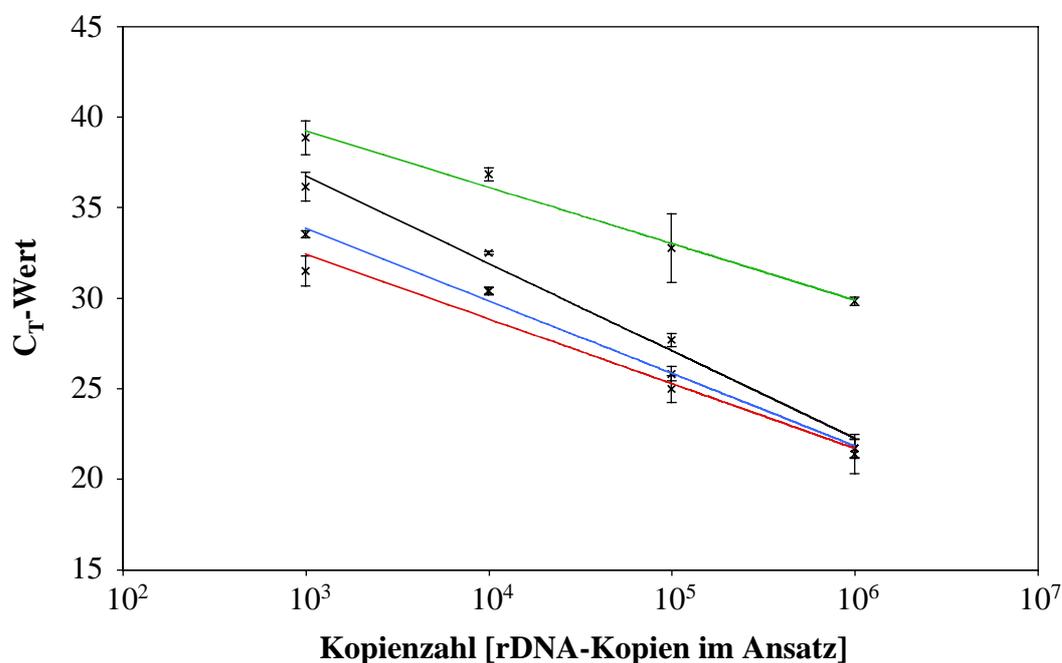


Abb. 3.14: Kalibrationsgeraden von TaqMan® Real Time PCR-Systemen. Dargestellt sind die entwickelten Systeme zur Quantifizierung der *Erwinia*-Gruppen. "Erwin3" [—]: $R^2 = 0,995$ mit Sonde "Erwin P1", "Erwin5" [—]: $R^2 = 0,988$ mit Sonde "Erwin P2", sowie "Erwin1" [—]: $R^2 = 0,949$ mit Sonde "Erwin P3". Zusätzlich wurde ein von BACH et al. (2002) etabliertes TaqMan®-System zur Quantifizierung eubakterieller Kopienzahlen mit einem Genomsegment von *E. coli* TG1 kalibriert [—]: $R^2 = 0,985$. Aufgetragen wurden die vorgelegten Kopienzahlen der unterschiedlichen Standard-DNAs gegen die C_T-Werte ["Threshold Cycle"], welche die Nummer des ersten PCR-Zyklus' angeben, in dem erstmals ein Fluoreszenzsignal über dem Schwellenwert ["Rauschen"] detektiert wird (2.7.16). Als Standards wurden hochreine Plasmid-DNA-Lösungen mit klonierten DNA-Segmenten epiphytischer Mikroorganismen eingesetzt. Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte nach spektralphotometrischer Messung der DNA-Menge (2.7.11-12). Alle Datenpunkte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt.

3.3.8 Validierung des entwickelten Real Time PCR-Systems für *Erwinia spec.*

Anhand der Kalibrationsgeraden (Abb. 3.13, Abb. 3.14) wurde die Funktionalität der entwickelten Syber® Green- und TaqMan® Real Time PCR-Systeme gezeigt. Jedoch waren die Kalibrationsgeraden kein Beleg für die Spezifität der entwickelten Methode. Die Auswahl der Oligonukleotidsequenzen anhand konservierter Regionen ließ eine Spezifität vermuten, welche jedoch überprüft werden mußte. Da für die Auswahl konservierter Regionen innerhalb der Gattung *Erwinia* lediglich drei Sequenzen von *Erwinia spec.* zur Verfügung standen, waren die hiervon abgeleiteten Oligonukleotide mit einiger Unsicherheit behaftet. Daher wurde eine Validierung des Syber® Green-Systems zur Quantifizierung von *Erwinia*-Species durchgeführt, da auf diesen Oligonukleotiden drei weitere TaqMan®-Systeme zur genaueren Quantifizierung von Gruppen innerhalb der Gattung *Erwinia* aufbauten.

Ausgangspunkt für die Validierung war eine Eichenblattprobe, die am 04.06.01 [Nullprobe, Julianischer Tag 155] von einem Baum aus dem Freiland geerntet wurde. Die Untersuchung dieser Probe mit Hilfe des Syber® Green-Systems zur Quantifizierung von *Erwinia spec.* hatte ein eindeutig positives Ergebnis ergeben [Real Time PCR, Amplifikatgröße, Schmelzpunkt]. Dieses DNA-Amplifikat sollte nun kloniert und sequenziert werden. Da bei einer gelelektrophoretischen Analyse des Amplifikats nur eine schwache Bande erkennbar war, wurde 1 µl aus diesem Real Time PCR-Ansatz als Template in eine herkömmliche PCR (2.7.3) eingesetzt, um die Menge des Amplifikats zu erhöhen ["Re-PCR"]. Das Temperaturprogramm sowie die Konzentrationen an MgCl₂ und dNTPs wurden den Real Time PCR-Bedingungen angepaßt (2.7.16.3). Dieses Amplifikat wurde in den pCR2.1-TOPO Vektor ligiert und in *E. coli* TG1 transformiert (2.7.4-8). Es wurden fünf Ansätze sequenziert (2.7.9) und mit der Genbank (2.7.2) verglichen. Alle Klone wurden eindeutig als Mitglieder der Gattung *Erwinia* identifiziert. Größte Übereinstimmung [87 % identische Basen] bestand zu *Erwinia rhapontici* [AF232678]. Die sequenzierten Klone entsprachen den Sequenzen "Erwin5" und "Erwin6" (Abb. 3.11). Diese Untersuchung zeigte, daß das entwickelte Real Time PCR-System zur Quantifizierung von *Erwinia spec.* mittels Syber® Green-Technik spezifisch für Organismen der Gattung *Erwinia* ist. Die Real Time-Systeme wurden nun zur Quantifizierung von epiphytischen Mikroorganismen auf Blattoberflächen eingesetzt.

Die drei verwendeten TaqMan® Real Time PCR-Systeme zur Quantifizierung von *Erwinia spec.* wurden ebenfalls kritisch untersucht. Zum einen wurden sie auf Querempfindlichkeiten (Tab. 3.3) und zum anderen auf ihre Verwendbarkeit in der Praxis getestet (Abb. 3.15).

Die drei entwickelten TaqMan® PCR-Systeme (3.3.3-6) ermöglichten eine genauere Untersuchung von Gruppen und Stämmen innerhalb der Gattung *Erwinia*. Hierbei wurden die selben Primer wie im beschriebenen Syber® Green-System zur Quantifizierung von *Erwinia spec.* eingesetzt, jedoch jeweils in Kombination mit einer hoch spezifischen TaqMan®-Sonde (Tab. 3.2). Alle DNA-Proben des Beprobungstermins P0 [Nullprobe; 04.06.01; Julianischer Tag 155] wurden zur Quantifizierung epiphytischer *Erwinia*-Bakterien mit diesen Systemen eingesetzt (n = 19).

Mit allen drei entwickelten TaqMan®-Sonden wurden *Erwinia*-Stämme oder -Gruppen auf den untersuchten Eichenblättern nachgewiesen (Abb. 3.15). Insgesamt war eine Detektion in fünf der 19 untersuchten Proben möglich. In diesen Proben betrug der Anteil mittels TaqMan®-Sonden nachweisbarer *Erwinia*-Stämme zwischen 2 und 100 % der Gesamtkopienzahl von *Erwinia spec.*.

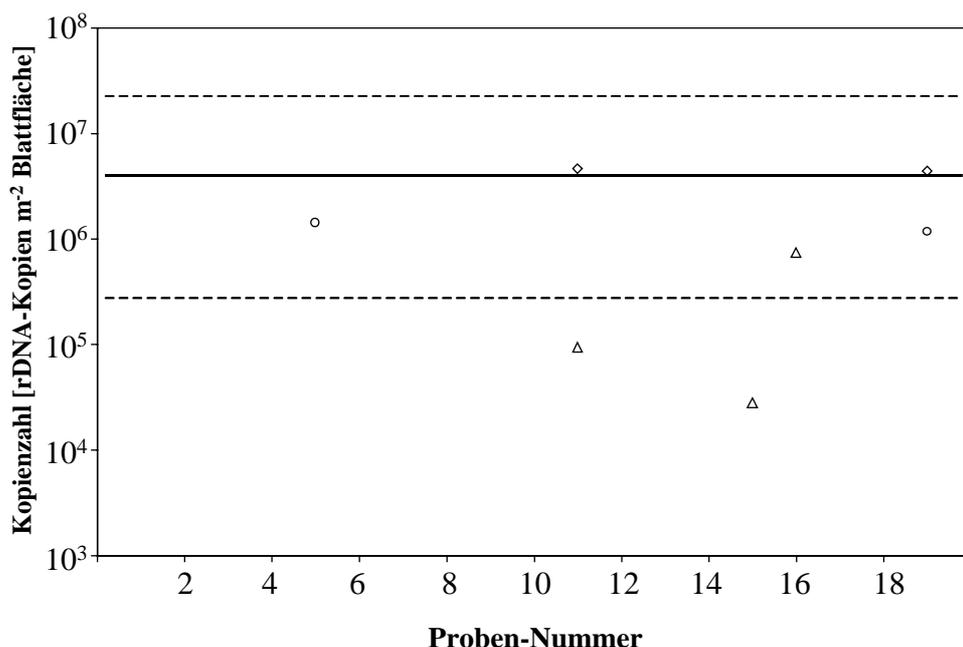


Abb. 3.15: Bestimmung der Kopienzahlen von rDNA-Segmenten verschiedener *Erwinia*-Gruppen auf der Oberseite von Eichenblättern. Am 04.06.01 [Julianischer Tag 155] wurden Blattproben von Eichenpflanzen (*Quercus robur* L.) aus dem Freiland (2.3) geerntet und DNA epiphytischer Mikroorganismen isoliert (3.3.3). Anhand einer entwickelten Real Time PCR-Methode auf Syber® Green-Basis (3.3.4-7) wurden die Gesamtkopienzahl von rDNA-Segmenten von *Erwinia* spec. quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert [—] sowie Minimum und Maximum [----] der Gesamtkopienzahl von rDNA-Segmenten von *Erwinia* spec.. Mit Hilfe entwickelter TaqMan® PCR-Sonden (Tab. 3.2) wurden zusätzlich drei Gruppen innerhalb der Gattung *Erwinia* unterschieden und die jeweiligen Kopienzahlen bestimmt (3.3.4-7). Die eingesetzte TaqMan®-Sonde "Erwin P1" ermöglichte die Quantifizierung von "Erwin3" und "Erwin4" [△], mit Sonde "Erwin P2" wurde Isolat "Erwin5" nachgewiesen [○], und Sonde "Erwin P3" war spezifisch für "Erwin1" [◇]. Es wurde DNA aus 19 Blattproben (n = 19) isoliert, und alle Real Time PCR-Messungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Querempfindlichkeiten der drei verwendeten TaqMan®-Sonden wurden jeder Sonde je drei unterschiedliche rDNA-Segmente von *Erwinia*-Klonen ["Erwin1", "Erwin3", "Erwin5"] als Template-DNA vorgelegt. In drei Parallelansätzen wurden jeweils 100 000 Kopien vorgelegt und unter optimierten Bedingungen quantifiziert. Die Ergebnisse (Tab. 3.3) zeigten, daß die beiden *Erwinia*-Gruppen [A und B] eindeutig unterschieden wurden, jedoch innerhalb der Gruppe B Querempfindlichkeiten auftraten.

Tab. 3.3: Querempfindlichkeiten der verwendeten TaqMan®-Sonden zur Quantifizierung von Genomkopien von *Erwinia* spec.. In drei Parallelansätzen wurden jeweils 100 000 Kopien von rDNA-Segmenten dreier unterschiedlicher *Erwinia*-Sequenzen (3.3.5) als Template-DNA für drei TaqMan®-Sonden (3.3.6) eingesetzt und mittels TaqMan® Real Time PCR quantifiziert (2.7.16). Sonde "Erwin P1" war homolog zur DNA-Sequenz von "Erwin3", Sonde "Erwin P2" zu "Erwin5" und Sonde "Erwin P3" zu "Erwin1".

TaqMan® Sonde	Detektierte Kopien pro Ansatz		
	Erwin3 (Gruppe A)	Erwin1 (Gruppe B)	Erwin5 (Gruppe B)
Erwin P1	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^5$	0	0
Erwin P2	0	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^5$
Erwin P3	0	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^5$	$(0,4 \pm 0,2) \times 10^5$

3.4 Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche mittels Real Time PCR

In der Vegetationsperiode 2001 wurden Eichenpflanzen, die unter unterschiedlichen UV-B Expositionen kultiviert wurden, auf epiphytische Mikroorganismen untersucht (2.4). Zu vier Beprobungsterminen wurden Eichenblätter in vier unabhängigen Proben ($n = 4$) von allen Expositionsvarianten (2.3-4) entnommen und die DNA epiphytischer Mikroorganismen isoliert (3.3). Verluste während der DNA-Isolierung wurden durch Einsatz eines internen Standards [Myrcensynthase-Gen], der allen Proben zugesetzt wurde, bestimmt und durch Berechnung einer Wiederfindungsrate berücksichtigt (2.7.14). Zur Quantifizierung der wiedergefundenen Myrcensynthase-Plasmide wurde ein entwickeltes Real Time PCR-System auf Syber® Green-Basis verwendet (3.3.3-6). Anhand vier weiterer entwickelter Syber® Green Real Time-Systeme (3.3.3-6) wurden die Kopienzahlen genomischer DNA von *Cladosporium spec.*, *Microsphaera spec.*, *Ramularia spec.* und *Erwinia spec.* in allen Proben bestimmt (Abb. 3.16). Zusätzlich wurde die Anzahl genomischer DNA-Kopien von Eubakterien mit einer von BACH et al. (2002) entwickelten TaqMan® PCR-Methode ermittelt (Abb. 3.16). Alle Real Time PCR-Untersuchungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4.1 Epiphytische Pilze

Zu Versuchsbeginn [P0; 04.06.01; Julianischer Tag 155] wurden durchschnittlich 10^{10} bis 10^{11} Kopien m^{-2} Blattfläche an rDNA-Genomsegmenten von *Microsphaera spec.* auf Oberseiten von Eichenblättern ermittelt (Abb. 3.16). Nach Verteilung der Eichenpflanzen auf die unterschiedlichen UV-B Strahlungsexpositionen der Standorte Berg und Tal wurden während der Vegetationsperiode $4,1 \times 10^8$ bis $3,2 \times 10^{12}$ Kopien m^{-2} Blattfläche gemessen. Dieses hohe Niveau wurde bis zum Versuchsende aufrecht erhalten, so daß in der letzten Probennahme [P5; 16.10.01; Julianischer Tag 289] ca. 10^{11} Kopien m^{-2} Blattfläche an beiden Standorten unabhängig von der UV-B Strahlungsexposition bestimmt wurden.

Sowohl die Kopienzahlen von rDNA-Segmenten von *Cladosporium spec.* als auch von *Ramularia spec.* lagen deutlich unterhalb der für Mehltau bestimmten Werte. Übereinstimmend für beide phytopathogenen Pilze wurde ein Startwert [P0, s.o.] von 10^7 Kopien m^{-2} Blattfläche ermittelt (Abb. 3.16). Auf Eichenblättern des Standorts Berg wurden im Verlauf der Vegetationsperiode sinkende Kopienzahlen der rDNA beider Arten zwischen 3×10^4 bis $1,1 \times 10^7$ Kopien m^{-2} Blattfläche gemessen. Zu Versuchsende wurden nur noch 10^5 bis 10^6 Kopien m^{-2} Blattfläche bestimmt. Ein anderes Bild ergab sich – unabhängig von der UV-B Exposition – im Tal. Hier wurden für die erste Probennahme [P1; 25.06.01; Julianischer Tag 176] Werte zwischen $1,1 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^9$ Kopien m^{-2} Blattfläche bestimmt, und es wurde ein leichter Anstieg der Kopienzahlen im Verlauf der Vegetationsperiode beobachtet, so daß in der letzten Probennahme [P5, s.o.] ca. 10^8 Kopien m^{-2} Blattfläche ermittelt wurden.

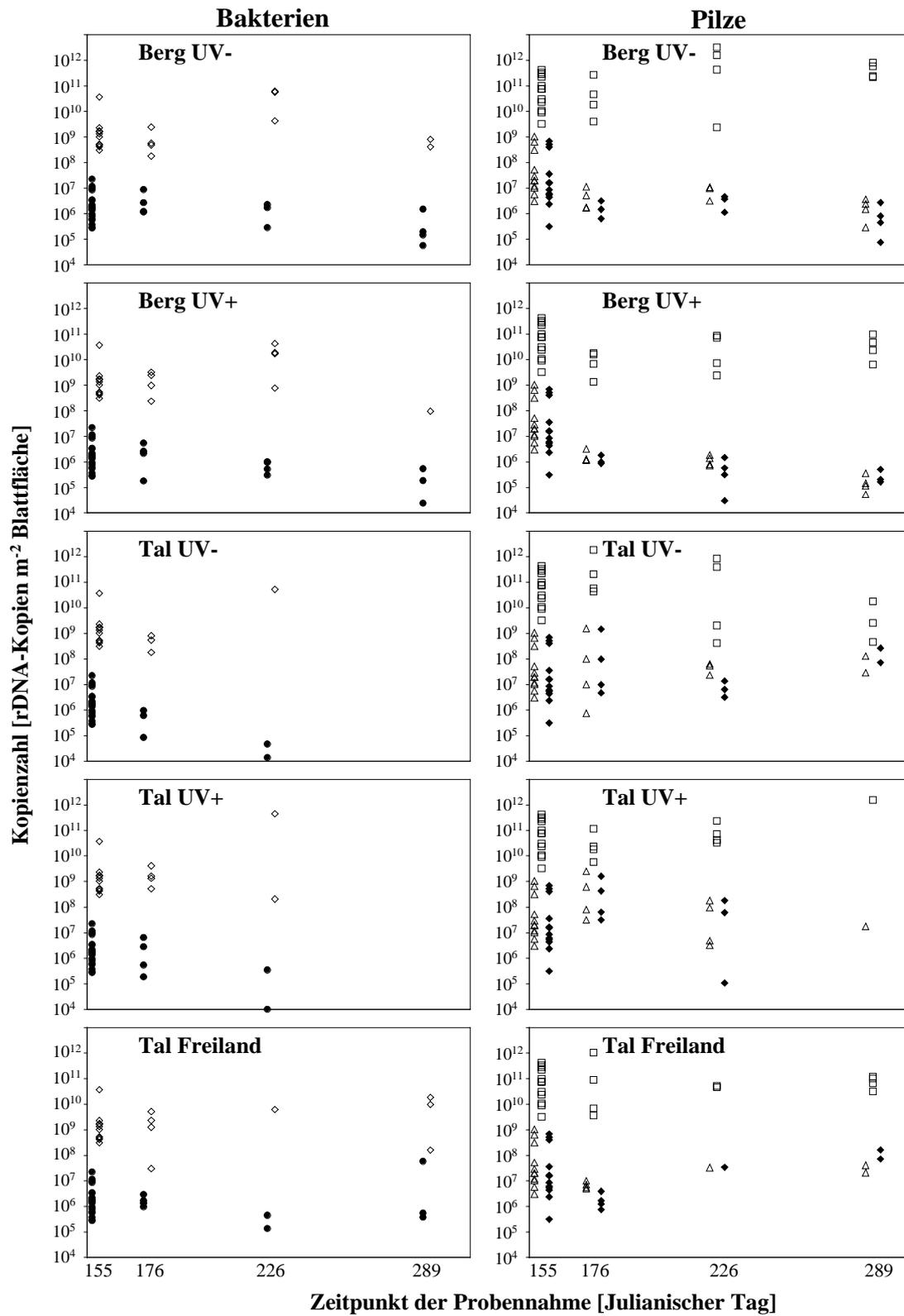


Abb. 3.16: [Legende siehe nächste Seite]

Abb. 3.16: Quantifizierung der Kopienzahlen genomischer DNA von epiphytischen Mikroorganismen auf Eichenblättern. Die DNA epiphytischer Mikroorganismen auf Blättern von Eichen (*Quercus robur* L.), welche in der Vegetationsperiode 2001 bei verschiedenen UV-B Expositionen angezogen wurden (2.3), wurde isoliert (3.3.3) und die Kopienzahlen genomischer rDNA-Segmente mittels entwickelter Real Time PCR-Systeme (3.3.4-7) quantifiziert. Es wurden Kopienzahlen der phytopathogenen Pilze *Cladosporium* spec. [Δ], *Microsphaera* spec. [□], *Ramularia* spec. [◆] sowie epiphytischer *Erwinia*-Bakterien [●] bestimmt. Zusätzlich wurden Genomkopien von Eubakterien [◇] mit einer bereits etablierten Real Time PCR-Methode quantifiziert (BACH et al. 2002). Es wurden vier unabhängige Proben (n = 4) je Behandlungsvariante untersucht. Vor Versuchsbeginn wurde ein Startwert [Nullprobe, 04.06.01; Julianischer Tag 155] aus der Gesamtheit aller Versuchspflanzen ermittelt. Anschließend wurden die Eichenpflanzen auf die fünf verschiedenen UV-B Strahlungsexpositionen verteilt und zu drei unterschiedlichen Probennahmeterminen [P1, P3, P5 (Tab. 2.1)] untersucht, wobei jede Real Time PCR-Messung wiederum in Dreifachansätzen durchgeführt wurde.

3.4.2 Epiphytische Bakterien

Bevor die Eichenpflanzen auf die Standorte mit unterschiedlichen UV-B Strahlungsexpositionen verteilt wurden, wurde auf Oberseiten von Eichenblättern ein Startwert [P0; 04.06.01; Julianischer Tag 155] in der Größenordnung von 10^9 Kopien m^{-2} Blattfläche des untersuchten rDNA-Bereichs von Eubakterien ermittelt (Abb. 3.16). Im Verlauf der Vegetationsphase wurden Werte zwischen $3,0 \times 10^7$ und $4,5 \times 10^{11}$ Kopien m^{-2} Blattfläche gemessen, wobei innerhalb der vier Parallelen Unterschiede von mehreren Größenordnungen erkennbar waren. Da insbesondere in der letzten Probennahme [P5; 16.10.01; Julianischer Tag 289] wenig Datenpunkte zur Verfügung standen, war keine klare Aussage zum Verlauf von Kopienzahlen während der Vegetationsperiode erkennbar. Die ermittelten Kopienzahlen der rDNA-Segmente epiphytischer Eubakterien lassen keine Unterschiede zwischen Pflanzen beider Standorte sowie zwischen den unterschiedlichen UV-B Strahlungsintensitäten erkennen. Die DNA-Kopienzahl bewegte sich bis zum Versuchsende in einer Größenordnung von 10^9 Kopien m^{-2} Blattfläche.

Untersuchungen der Kopienzahl des entsprechenden rDNA-Genomsegments von *Erwinia* spec. ergaben einen Startwert [P0; 04.06.01; Julianischer Tag 155] zwischen 10^5 und 10^6 Kopien m^{-2} Blattfläche, der somit drei bis vier Größenordnungen unterhalb der gemessenen Kopienzahlen von Eubakterien lag (Abb. 3.16). Während des Untersuchungszeitraumes wurden Kopienzahlen von $6,7 \times 10^4$ bis $5,7 \times 10^7$ Kopien m^{-2} Blattfläche bestimmt. Unabhängig von der UV-B Exposition und vom Standort der Pflanzen wurden sinkende Kopienzahlen im Verlauf der Vegetationsphase gemessen. In der letzten Probennahme wurden Kopienzahlen von *Erwinia* rDNA-Segmenten um 10^5 Kopien m^{-2} Blattfläche ermittelt. Während im Tal-Freiland rDNA-Kopienzahlen von 10^6 Kopien m^{-2} Blattfläche für *Erwinia* spec. bestimmt wurden, ließen sich auf Blättern von Eichen, die in den Phytokammern im Tal inkubiert wurden, keine rDNA-Kopien nachweisen.

4 Diskussion

Epiphytische Mikroorganismen kommen auf allen Blattflächen von Freilandpflanzen vor. Die verschiedenen mikrobiellen Gruppen und Arten beeinflussen sich nicht nur untereinander, sondern stehen auch in Wechselwirkung zu den Blättern, auf denen sie aufsitzen. Ihr Einfluß – positiv oder negativ – ist neben einer Reihe anderer Größen ein wesentlicher Faktor, der über die Blattgesundheit der Wirtspflanze entscheidet. Epiphytische Mikroorganismen auf Blättern der Stieleiche (*Quercus robur* L.), einer wichtigen, bestandsbildenden Baumart in Deutschland (BUTIN, 1989, HECKER, 1995), sind wenig untersucht. Über die Auswirkungen von Umweltfaktoren auf die Wechselwirkungen zwischen epiphytischen Mikroorganismen und ihrem Wirt ist wenig bekannt. Aufgrund des zu erwartenden Anstiegs der UV-B Strahlung in den nächsten Jahrzehnten (CALDWELL et al., 1998, REUDER et al., 2001, WELLBURN, 1997) ist die Auswirkung der UV-B Strahlung auf das System Blatt-Mikroorganismen von besonderer Bedeutung. Um den Einfluß von UV-B Strahlung und anderen Umweltfaktoren auf epiphytische Mikroorganismen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit geeignete Methoden zur Quantifizierung von Bakterien und Pilzen auf Blattoberflächen entwickelt.

In diesem Kapitel werden sowohl die einzelnen Schritte der Neu- und Weiterentwicklung der eingesetzten Methoden sowie die erzielten Ergebnisse diskutiert und ein Ausblick auf mögliche Nachfolgeuntersuchungen gegeben.

4.1 Vergleich der Untersuchungsstandorte

In der vorliegenden Arbeit wurden Eichen unter verschiedenen UV-B Strahlungsniveaus an zwei Standorten untersucht, die rund 1000 Meter Höhendifferenz aufwiesen (2.3). Generell können zur Generierung unterschiedlicher UV-Strahlungsniveaus UV-Lampen und / oder Folienfilter eingesetzt werden (NEWSHAM et al., 1997, PANTEN, 1998, SCHNITZLER et al., 1999, TUVESON et al., 1988, ZINSER et al., 2000). Um möglichst naturnahe Bedingungen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz von UV-Lampen verzichtet und statt dessen durch Verwendung geeigneter Folienfilter der UV-B Anteil der natürlichen Sonnenstrahlung stark reduziert [UV-] bzw. wenig verändert [UV+]. Die verwendete UV-B undurchlässige Folie (2.3.3) führte im Vergleich zu Freilandwerten zu einer Reduzierung des UV-B Anteils innerhalb der Pflanzenanzuchtskammern auf 14 % am Standort Tal bzw. 12 % am Standort Berg. Auch wenn die UV-B Strahlung nicht vollständig eliminiert wurde, so rechtfertigte die deutliche Reduzierung des UV-B Anteils um mehr als 4/5 die Bezeichnung der Expositionsvarianten als "Tal UV-" bzw. "Berg UV-". Die zu Vergleichszwecken verwendete UV-B durchlässige Folie (2.3.3) führte zu UV-B Strahlungsexpositionen von 69 % in der Expositionsvariante "Tal UV+" bzw. 54 % in der Expositionsvariante "Berg UV+" im Vergleich zu den an beiden Standorten gemessenen UV-B Strahlungsintensitäten im Freiland. Ein nicht zu unterschätzender Strahlungsanteil [bis zu 46 %] wurde demzufolge durch die Folien bzw. das als Wetterschutz umgebende Plexiglas® zurückgehalten. Um dieser Abschwächung der UV-Strahlung entgegen zu wirken, werden oftmals UV-Versuche an hoch gelegenen Beprobungsflächen durchgeführt (PANTEN, 1998). Mit zunehmender Höhe verringert sich die Dicke der Luftschicht über einem Standort. Insbesondere durch die geringeren Anteile an Aerosolen und Ozon kommt es mit zunehmender Höhe zu einem Anstieg der UV-Strahlung (KÖPKE, 2000). Dieser Höheneffekt kann die beim Einsatz von

Folienfiltern unvermeidlich auftretende Abschwächung der einfallenden UV-Strahlung zumindest teilweise kompensieren. Aus diesem Grund wurden Pflanzenanzuchtskammern auf dem Gipfel des Wank errichtet [ca. 1000 m Höhendifferenz zum Tal]. Freilandmessungen ergaben am Standort Berg deutlich höhere UV-B Strahlungswerte als am Standort Tal [Daten nicht gezeigt]. Vergleicht man jedoch die in der vorliegenden Arbeit an beiden Standorten versuchsbegleitend erfaßten UV-B Strahlungswerte innerhalb der Pflanzenanzuchtskammern (Abb. 2.4), so sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Lichtperiodenmittelwerten der UV-B Strahlung in den Expositions-kammern "Berg UV+" und "Tal UV+" bzw. zwischen "Berg UV-" und "Tal UV-" erkennbar. Verantwortlich hierfür sind die unterschiedlich konzipierten Pflanzenanzuchtskammern beider Standorte. In den Phytokammern im Tal wurde eine möglichst naturnahe Anzucht der Versuchspflanzen verwirklicht. Hierzu wurden die Süd-wände der Kammern halbseitig und die Nord-wände vollständig entfernt (Abb. 2.2), so daß keine zusätzliche Klimatisierung der Kammern erforderlich war. Allerdings konnte Streulicht einfallen, was zu einer leichten Erhöhung der UV-B Strahlung führte. Aufgrund der deutlich extremeren klimatischen Bedingungen mußten am Standort Berg geschlossene Pflanzenanzuchtskammern verwendet werden (Abb. 2.1). Lüfter und Heizungen temperierten die geschlossenen Kammern, um Überhitzung sowie das Auftreten von Frostereignissen zu verhindern. Durch die Verwendung von geschlossenen Anzuchtskammern wurde jedoch der Einfall von Streulicht verhindert, so daß die im Innern der Expositions-kammern gemessene UV-B Strahlung vergleichbar zu Werten im Tal war.

Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch in der an beiden Standorten gemessenen Lufttemperatur (Abb. 2.4). Am Standort Berg wurden in den Solardomen trotz Klimatisierung im Verlauf beider Vegetationsperioden deutlich größere Temperaturschwankungen gemessen als im Tal. Auf dem Wank wurden keine Versuchspflanzen im Freiland angezogen, da die klimatischen Bedingungen einerseits eine vitale Entwicklung von Eichen in Frage stellten und diese andererseits nicht in dieser Höhe [1780 m ü. NN] natürlich vorkommen (HECKER, 1995). Die im Innern der Solardome kultivierten Eichen zeigten keine äußerlich erkennbaren Unterschiede zu Pflanzen im Tal und waren bis zum Versuchsende vital. Die gemessenen Lufttemperaturen zeigten keine Unterschiede zwischen den Expositionsvarianten eines Standortes, so daß durch Einsatz der Folienfilter lediglich das UV-B Strahlungsniveau verändert wurde, während alle übrigen Umweltfaktoren unbeeinflusst bzw. in gleichem Maße verändert wurden.

Jedoch gilt es zu berücksichtigen, daß die Anzahl epiphytischer Mikroorganismen durch Regen beeinflusst wird. Regen kann einerseits eine Reduzierung der Mikroorganismenzahlen durch Abwaschung bewirken (KINKEL, 1997), aber andererseits durch Befeuchtung der Blattoberfläche und Eintrag von Nährstoffen wachstumsfördernd wirken (HIRANO & UPPER, 2000). Durch regelmäßiges Besprühen der Blattoberflächen aller Eichen, die in Pflanzenanzuchtskammern kultiviert wurden, mit einer synthetischen Regenlösung (2.4) wurde Regen simuliert.

Zusammenfassend erforderte der Vergleich beider Standorte die Berücksichtigung folgender Punkte: Eichen am Standort Berg wurden in geschlossenen und mittels Lüfter klimatisierten Pflanzenanzuchtskammern kultiviert und waren stärker vom umgebenden Freiland abgeschirmt als Pflanzen am Standort Tal. Stieleichen kommen nicht natürlich in Höhenlagen des Wankgipfels [1780 m ü. NN] vor, so daß die Anzucht von Eichen in diesen Höhen ein artifizielles System darstellt. Zwar wurden durch die Kultivierung im Innern der Solardome das Strahlungsniveau sowie die Lufttemperaturen abgemildert, aber hinsichtlich Luftdruck und Zusammensetzung der Luft herrschten verglichen mit dem Tal rauhere klimatische Bedingungen am Berg-Standort.

4.2 Methodenentwicklung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden - eine mikrobiologische und eine molekularbiologische - zur Quantifizierung von epiphytischen Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (*Quercus robur* L.) entwickelt, deren Vor- und Nachteile im folgenden diskutiert werden. Abgesehen von methodischen Unterschieden ist zu berücksichtigen, daß die Isolierung der DNA epiphytischer Mikroorganismen mittels molekularbiologischer Methode ausschließlich von der Blattoberseite erfolgte, während die mikrobiologische Extraktionsmethode Organismen von beiden Blattseiten erfaßte. Da die Anzahl an Mikroorganismen abhängig von der Blattposition und -seite ist (CARROL, 1981, KINKEL, 1997), können hierdurch Unterschiede auftreten.

4.2.1 Entwicklung einer mikrobiologischen Quantifizierungsmethode für die Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen ["Extraktionsmethode"]

Zur **Ablösung epiphytischer Mikroorganismen** von Blattoberflächen wurde die sogenannte "leaf washing"-Technik eingesetzt (JACQUES & MORRIS, 1995, MORRIS et al., 1998). Durch Schütteln einer Blattprobe in einer Lösung werden Mikroorganismen von der Blattoberfläche abgelöst und gelangen in die umgebende Lösung, die anschließend untersucht wird. In der Literatur werden viele Extraktionslösungen unterschiedlicher Zusammensetzung beschrieben. MORRIS et al. (1998) verwendeten reinen Kaliumphosphat-Puffer, während PÉRISSOL et al. (1993) eine Extraktionslösung mit 0,1 % des Detergenz Tween® 80 einsetzten. HELANDER & RANTIO-LEHTIMÄKI (1990) verwendeten hingegen reines Wasser, um Mikroorganismen von Blattoberflächen zu waschen. Um die in der Extraktionslösung enthaltenen Mikroorganismen möglichst wenig zu beeinflussen, aber ein Platzen der Zellen durch hypotonische Lösungen zu verhindern, wurde in der vorliegenden Arbeit eine 0,9 %ige NaCl-Lösung eingesetzt. Extraktionslösungen auf Kochsalz-Basis wurden auch von anderen Autoren zur Untersuchung von Blatt- oder Bodenmikroorganismen verwendet (ERCOLANI, 1991, PAPEN et al., 1991). Um die Benetzbarkeit der Blattoberfläche zu erhöhen bzw. Mikroorganismen besser ablösen zu können, wurde der Extraktionslösung versuchsweise entweder 0,1 % Tween® 80 oder 5 % bzw. 10 % Ethanol zugesetzt (3.1.1). Diese Zusätze führten jedoch zu keiner meßbaren Erhöhung der Zellzahl (Abb. 3.1). Entweder führte die Verwendung von Detergenz nur zu einer minimal verbesserten Ablösung der Mikroorganismen, oder die erfolgte Ablösung wurde durch zelltoxische Wirkungen von Ethanol und Detergenz nivelliert. Durch eine Ultraschallbehandlung der untersuchten Blattproben wurde eine erhöhte Zellzahl in der Extraktionslösung detektiert. Diese Behandlung führte zu einer Verfärbung der Blätter und einer Grünfärbung der Extraktionslösung (Abb. 3.1). Diese Anzeichen deuteten darauf hin, daß zum einen Extraktionslösung in die Blattinterzellularen eingedrungen war und daß einige Zellen durch die Ultraschallbehandlung verletzt worden waren. Um sicher zu gehen, daß ausschließlich epiphytische Zellen mit der Extraktionsmethode erfaßt wurden und eine Kontamination mit endophytischen Blattmikroorganismen vermieden wurde, wurde diese Behandlung nicht weiter angewendet.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden Blattproben in 0,9 %iger NaCl-Lösung über einen Zeitraum von drei Stunden auf Eis geschüttelt und Aliquots der Extraktionslösung zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurden innerhalb dieses Zeitraumes steigende Zellzahlen bestimmt, die den Verlauf einer Sättigungskurve beschrieben (Abb. 3.1). Eine Ausweitung der Inkubation über drei Stunden hinaus erschien

nicht sinnvoll, da mit zunehmender Extraktionszeit sich auch die Populationsdichte der epiphytischen Mikroorganismen in der Extraktionslösung durch Absterben oder Vermehrung ändern kann. PARBERY et al. (1981) zeigten durch Untersuchung epiphytischer Pilze auf Eukalyptusblättern (*Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng.), daß bei der "leaf washing"-Technik die Inkubationsdauer nicht nur die Gesamtzahl abgelöster Organismen beeinflusst, sondern auch die relative Zusammensetzung der Mikroorganismen in der Extraktionslösung. Je nach Zeitpunkt der Untersuchung änderte sich der Anteil bestimmter Pilzarten an der Gesamtpopulation um mehr als eine Größenordnung, was zeigt, daß verschiedene Arten unterschiedlich schnell von der Blattoberfläche abgelöst werden. Zur Erfassung aller vorkommenden Organismenarten auf der Blattoberfläche scheinen somit generell längere Inkubationszeiten [in der Größenordnung von Stunden] besser geeignet zu sein. Um eine reproduzierbare Ablösung der Mikroorganismen zu gewährleisten, wurden alle folgenden Untersuchungen unter gleichen Bedingungen [Schütteln der Blattproben bei 0 °C für drei Stunden im Dunkeln bei 120 Umdrehungen pro Minute] durchgeführt.

Eine mikroskopische Untersuchung der Blattoberfläche (Abb. 3.6) zeigte, daß durch dreistündiges Schütteln der Blattproben in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung die Anzahl von Mikroorganismen auf der Blattoberfläche deutlich verringert wurde, jedoch keine vollständige Ablösung erreicht wurde. Dieser Schwachpunkt der "leaf washing"-Technik wurde auch von anderen Autoren erkannt. POPLAWSKY und CHUN (1998) beschränkten sich in ihren Untersuchungen auf den Anteil an leicht ablösbaren epiphytischen Bakterien [easily removable epiphytic bacteria: EREB], die mittels dieser Technik gewonnen werden konnten. Im Gegensatz hierzu berichten MORRIS et al. (1998) über eine vollständige Ablösung von epiphytischen Mikroorganismen von Endivienblättern (*Cichorium endivia* L. var. *latifolia*) durch eine zweiminütige Ultraschallbehandlung. In dieser Arbeit wurden jedoch keine mikroskopischen Untersuchungen der Blattoberfläche durchgeführt, welche die beschriebene vollständige Ablösung epiphytischer Organismen bestätigen könnten. Angaben bezüglich einer Infiltration der Endivienblätter mit Extraktionslösung oder einer Verletzung von pflanzlichem Gewebe durch die Ultraschallanwendung wurden nicht gegeben, so daß eine potentielle Vermischung von epiphytischen und endophytischen Mikroorganismen möglich ist. MORRIS et al. (1998) vermuten, daß die durch die beschriebene Ultraschallbehandlung abgelösten Mikroorganismen etwa 10 bis 40 % der gesamten epiphytischen Population dieser Blätter ausmachen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte, ebenfalls zweiminütige Ultraschallbehandlung von Blättern der Stieleiche führte zu einer Zellzahl-Erhöhung von 50 % (Abb. 3.1). Die in beiden Arbeiten (MORRIS et al., 1998 und diese Arbeit) beschriebene Steigerung der durch Ultraschallbehandlung ablösbaren Mikroorganismen ist somit sehr ähnlich, wobei die Ergebnisse unterschiedlich interpretiert wurden. Durch Homogenisierung von Blattproben in einer Lösung ["blending"- oder "grinding"- Methode] war JACQUES et al. (1995) und LIN et al. (1992) eine vollständige Erfassung von Blattmikroorganismen möglich. Dieser Ansatz erlaubte jedoch keine Unterscheidung zwischen epiphytischen und endophytischen Bakterien und Pilzen und war daher zur Bearbeitung des in dieser Arbeit gestellten Themas ungeeignet.

Viele Autoren führen den Anteil schwer ablösbarer Mikroorganismen auf Blattflächen auf **Biofilme** zurück (KINKEL, 1997, MORRIS et al., 1998, WATNICK & KOLTER, 2000). Solche Biofilme bestehen in der Regel aus einem Zusammenschluß vieler Mikroorganismen unterschiedlicher Arten, die durch Pili, Fibrillen oder extrazelluläre Polysaccharide sowohl untereinander als auch mit der Blattoberfläche verbunden sind (BEATTIE & LINDOW 1994, WATNICK & KOLTER, 2000). Oftmals sind diese Mikroorganismen in eine Matrix aus extrazellulären Polysacchariden, wie beispielsweise Alginat, eingebettet. Durch die Biofilmbildung kann ein geeignetes Mikroklima hinsichtlich pH-Wert oder Nährstoffversorgung sowie ein besserer Schutz vor Fraßfeinden und Strahlung erreicht werden (BEATTIE

& LINDOW, 1994, WATNICK & KOLTER, 2000). Um Bakterien aus schwer ablösbaren Biofilmen kultivieren zu können, inkubierten PÉRISSOL et al. (1993) Blattsegmente ohne vorherige Behandlung auf Nährmedienplatten und untersuchten nach Inkubation die am Rand der Blattstücke gewachsenen Kolonien. Diese Methode erlaubte zwar die Isolation und Bestimmung einzelner Arten epiphytischer Mikroorganismen, war jedoch für eine Quantifizierung ungeeignet.

Nach Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen mittels der dargestellten Extraktionsmethode (3.1.1) wurde die Zellzahl mittels **MPN-Technik und Ausplattieren** (2.6.1-2) bestimmt. Beide Methoden basieren auf der Erfassung der Lebendzellzahl nach Kultivierung. Im Gegensatz zu mikroskopischen Quantifizierungsverfahren, welche oftmals durch tote Bakterien- oder Pilzzellen verfälscht werden und zu einer Überschätzung von Organismenzahlen in einer Probe führen, umgehen beide verwendeten, mikrobiologischen Methoden dieses Problem (BAKER, 1981). Zudem wird bei mikroskopischer Betrachtung lediglich ein geringer Ausschnitt der Blattoberfläche von Bruchteilen eines Quadratzentimeters untersucht. Da Mikroorganismen nicht gleichmäßig über die Blattfläche verteilt sind (KINKEL, 1997), ist es notwendig, eine Vielzahl von mikroskopischen Bildausschnitten zu untersuchen, um auf Zellzahlen eines Blattes, einer Pflanze oder eines Bestandes schließen zu können. Andererseits können gerade durch die hohe räumliche Auflösung mittels Mikroskopie wichtige Aussagen über räumliche Verteilung von Mikroorganismen auf der Blattfläche gewonnen werden (BAKER, 1981). Ein großer Vorteil klassischer Quantifizierungsmethoden, welche auf der Anzucht der zu untersuchenden Organismen basieren, ist der Nachweis von Stoffwechselprodukten in der herangewachsenen mikrobiellen Kultur. Anhand von mikrobiell gebildetem Nitrit, Nitrat und Lachgas war es möglich, mittels unterschiedlicher MPN-Methoden (2.6.1) Nitrifizierer und Denitrifizierer auf der Blattfläche nachzuweisen und zu quantifizieren (ALEF, 1991). Vergleichbare Aussagen können weder durch mikroskopische oder molekularbiologische Untersuchungen gewonnen werden. Durch Verwendung von Gensonden, die spezifisch sind für Segmente des Ammoniummonooxygenase- oder Nitritreduktase-Gens, ist es zwar möglich, charakteristische Gene von Ammoniakoxidierern oder Denitrifizierern nachzuweisen (BRAKER et al., 1998, SINIGALLIANO et al., 1995), jedoch kann aus der Anwesenheit bestimmter Gene nicht zwingend auf die entsprechenden Stoffwechselleistungen geschlossen werden, da die Aktivität der entsprechenden Enzyme z.B. durch Transkription und Translation reguliert wird.

Ein großer Nachteil bei der Verwendung klassischer mikrobiologischer Methoden, wie der eingesetzten MPN-Technik oder dem Spatelplattenverfahren, liegt in der notwendigen Anzucht der entsprechenden Mikroorganismen. Diese ist nicht nur material- und zeitaufwendig, sondern ermöglicht lediglich die Erfassung eines kleinen Teils der gesamten Mikroorganismen-Populationen. Die Kultivierung von Mikroorganismen ist abhängig von den gewählten Anzuchtbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Inkubationsdauer, Wassergehalt, Nährstoffangebot oder Sauerstoffkonzentration (SCHLEGEL, 1992). Die Anzucht derselben Probe auf verschiedenen Nährmedien zeigte große Unterschiede in der Anzahl gewachsener Kolonien (Abb.3.2). WILSON und LINDOW (1992) ermittelten bei der Untersuchung von *Pseudomonas syringae*-Kulturen mittels Mikroskopie und Ausplattieren [Spatelplattenverfahren] einen Anteil von bis zu 75 %, der nicht kultivierbar war. AMANN et al. (1995) beschreiben, daß in unterschiedlichen Umweltproben 85 bis 99,999 % der vorkommenden Mikroorganismen nicht kultivierbar sind. Über ähnliche Ergebnisse berichten KAEBERLEIN et al. (2002), die einen nicht kultivierbaren Anteil von über 99 % in der Umwelt nennen. Selbst Arten, die in ihrer Wachstumsphase kultivierbar sind, können bei Erreichen eines Ruhezustandes nicht mehr angezogen werden (WILSON & LINDOW, 1992). Diese Zahlen machen deutlich, daß die mittels Anzucht bestimmten Zellzahlen vermutlich lediglich "die Spitze des Eisbergs" darstellen und nur die Erfassung eines kleinen Teils der Gesamtheit

mikrobieller Organismen auf der Blattoberfläche ermöglichen. Dennoch erlaubte diese Methode den relativen Vergleich der Zellzahlen epiphytischer Mikroorganismen auf Blättern von Eichen, die unterschiedlichen UV-B Expositionen ausgesetzt waren.

In dieser Arbeit wurden vier **MPN-Methoden** zur Bestimmung auto- und heterotropher Nitrifizierer, Denitrifizierer sowie der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen eingesetzt (2.6.1). Alle Methoden hatten sich zur Quantifizierung von Bodenmikroorganismen bewährt (PAPEN & VON BERG, 1998, PAPEN et al., 2002) und wurden auch erfolgreich zur Untersuchung epiphytischer Blattmikroorganismen angewendet (3.2.1-3). Um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Methode zu testen, wurde die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen derselben Extraktionslösung (3.1.1) in neun parallelen MPN-Ansätzen untersucht (2.6.1.5). Die so ermittelten höchst wahrscheinlichen Zellzahlen schwankten zwischen 400 und 900 Zellen ml⁻¹ und zeigten, daß diese Methode reproduzierbar und mit einer ausreichenden Genauigkeit arbeitet (Tab. 2.2). Die untere Nachweisgrenze der MPN-Technik betrug ca. 10³ Zellen m⁻² Blattfläche. Betrachtet man jedoch den 95 % Vertrauensbereich, der zwischen 86 und 4207 Zellen ml⁻¹ lag, so werden die Grenzen dieser Technik deutlich (Tab. 2.2). Diese Methode erlaubt nur eine grobe Bestimmung der Zellzahl und wird in der Regel zur Abschätzung von Größenordnungen eingesetzt (PAPEN & VON BERG, 1998). Ihr großer Vorteil liegt in einem sehr breiten Meßspektrum. Auch ohne Kenntnis der zu erwarteten Größenordnung der zu bestimmenden Zellzahlen kann diese Methode angewendet werden, da sie mehrere Verdünnungsstufen untersucht.

Für die Auswahl eines geeigneten Festmediums zur Quantifizierung epiphytischer Mikroorganismen mittels **Ausplattieren** wurden 19 unterschiedliche Medien getestet (2.6.2.1, 3.1.2), die von anderen Autoren zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen genutzt wurden (ANDREWS et al., 1987, ATLAS & PARKS, 1993, BRUNEL et al., 1994, CHAND-GOYAL & SPOTTS, 1996, JACQUES et al., 1995, KINKEL et al., 1989A, LIN et al., 1992, MORRIS et al., 1998, NEWSHAM et al., 1997, POPLAWSKY & CHUN, 1998, STARMER et al., 1987, THOMPSON et al., 1993, TOMBOLINI et al., 1999). Der ausgewählte Sojabohnen-Agar war nicht nur einfach in der Handhabung [Herstellung, Konsistenz], sondern auch für die Anzucht epiphytischer Mikroorganismen am besten geeignet. Nach Ausplattieren eines Aliquots einer Extraktionslösung (3.1.1) und Inkubation wurden auf diesem Nährmedium die größte Anzahl Kolonien bildender Einheiten [CFU] bestimmt (Abb. 3.2), was darauf hindeutet, daß der verwendete Sojabohnen-Agar bessere Wachstumsbedingungen für epiphytische Mikroorganismen bietet als die anderen getesteten Festmedien. Obwohl diese Ergebnisse in mehreren Parallelen bestätigt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei Untersuchung einer Extraktionslösung mit Eichenblättern, die zu einem anderen Zeitpunkt geerntet wurden, ein anderes Nährmedium besser geeignet wäre aufgrund anderer Mikroorganismen mit anderen Ansprüchen. Um jedoch verschiedene Proben vergleichen zu können, wurden alle Versuche mit dem Sojabohnen-Agar durchgeführt, der auch von anderen Autoren verwendet wurde (BRUNEL et al., 1994, JACQUES et al., 1995, MORRIS et al., 1998). Durch Zusatz von 50 mg l⁻¹ Cycloheximid (MORRIS et al., 1998), einem selektiven Hemmstoff für Eukaryoten, wurde der Anteil an Bakterien bestimmt, und durch Zugabe zweier Antibiotika [83 mg l⁻¹ Penicillin G Kaliumsalz und 30 mg l⁻¹ Streptomycinsulfat] wurde der Pilz-Anteil ermittelt (LIN et al., 1992). Bei allen Untersuchungen wurde durch Einsatz beider Hemmstofflösungen der Anteil resistenter Mikroorganismen bestimmt. Resistente Bakterien wurden nur vereinzelt in geringer Anzahl nachgewiesen, so daß ihr Anteil vernachlässigt werden konnte. Für das Ausplattieren ist es erforderlich, die ungefähren Größenordnungen der zu erwartenden Zellzahlen zu wissen, um geeignete Verdünnungen der zu untersuchenden Proben herzustellen. Aufgrund der gegenseitigen Beeinflussung von Mikroorganismen nimmt die Anzahl gewachsener Kolonien auf einer Nährmediumplatte nicht gemäß ihrer Verdünnung ab (ALEF, 1991). Für eine genaue Auswertung wurden daher nur Agarplatten

berücksichtigt, welche zwischen 20 und 200 CFU enthielten. Ist die zu erwartende Größenordnung der Zellzahlen einer Probe nicht bekannt, müssen mehrere Verdünnungen untersucht werden. Die Auswertung des Spatelplattenverfahrens basiert auf der Annahme, daß jede gewachsene Kolonie aus einem einzelnen Mikroorganismus hervorgegangen ist. Liegen die Bakterien oder Pilze in der zu untersuchenden Lösung jedoch aggregiert vor, so unterschätzt die mittels Ausplattieren bestimmte Zellzahl die tatsächliche Organismenzahl. Ungeeignet ist diese Methode für die Untersuchung beweglicher Mikroorganismen, die sich auf der Oberfläche der Nährmedien bewegen und durch die Bildung von Schleimen oder Filmen die Auswertung verfälschen (BAST, 1999). Ein weiterer Vorteil des Ausplattierens liegt in der Gewinnung von Einzelkolonien. Durch wiederholtes Ausstreichen von Einzelkolonien ist es möglich, bestimmte Arten zu isolieren, wohingegen die Isolierung von Arten aus Flüssigkulturen deutlich aufwendiger ist.

Die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen wurde mittels MPN und Ausplattieren bestimmt und erlaubte daher einen direkten Vergleich beider Techniken (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Mit beiden Methoden wurden sehr ähnliche Ergebnisse erzielt, so daß sowohl beide Techniken allgemein als auch die beiden verwendeten Medien im speziellen für die Untersuchung von epiphytischen Mikroorganismen der Eiche geeignet waren. In der Mehrzahl der untersuchten Ansätze zeigten die jeweils vier unabhängigen Proben bei der Zellzahlbestimmung mittels Ausplattieren eine geringere Variationsbreite als bei den entsprechenden Untersuchungen mittels MPN-Methodik, was auf eine höhere Genauigkeit des Spatelplattenverfahrens hindeutet.

Durch Kombination beider mikrobiologischer Methoden war es möglich, Lebendzahlen von einigen wichtigen Mikroorganismen-Gruppen zu bestimmen und wertvolle Informationen über Größenordnungen und Änderungen von Populationsdichten im jahreszeitlichen Verlauf zu erhalten. Da aber ein großer Teil der Mikroorganismen nicht kultivierbar war und keine vollständige Ablösung der epiphytischen Bakterien und Pilze mit der Extraktionsmethode erreicht wurde (Abb. 3.6), wurde eine weitere Methode entwickelt, die auch diesen bisher nicht erfaßten Anteil epiphytischer Mikroorganismen berücksichtigt.

4.2.2 Entwicklung einer anzuchtsfreien, molekularbiologischen Quantifizierungsmethode für die Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen ["Abhebetechnik"]

Ausgehend von einer aus der Wachsanalytik stammenden Methode zur Untersuchung der epikutikulären Wachsschicht (ENSİKAT et al., 2000, JETTER et al., 2000, JETTER et al., 2001) und einiger von SCHREIBER und SCHEINPFLUG (2000) durchgeführter Verbesserungen war es möglich, eine Technik zur vollständigen Ablösung epiphytischer Mikroorganismen von Blattoberflächen der Stieleiche zu entwickeln (3.3.1). Die beschriebene Abhebetechnik entfernte die epikutikuläre Wachsschicht inklusive der auf und in ihr enthaltenen Mikroorganismen. Eine mikroskopische Betrachtung der Blattoberfläche nach erfolgter Ablösung zeigte, daß nahezu keine epiphytischen Mikroorganismen auf der Blattoberfläche zurückblieben (Abb. 3.6). Diese Methode ermöglicht eine quantitative Erfassung epiphytischer Pilze und Bakterien und ist in diesem Punkt der entwickelten Extraktionsmethode (2.6, 3.1, 4.2.1) deutlich überlegen, welche auf dem Prinzip der "leaf washing"-Technik basierte. Eine Untersuchung der so abgelösten Mikroorganismen mittels der beschriebenen mikrobiologischen Methoden wurde unterlassen, da durch das Einfrieren Mikroorganismen abgetötet worden sein könnten (BAST, 1999). Daher wurden die mit der Abhebetechnik isolierten Mikroorganismen ausschließlich mit molekularbiologischen Methoden analysiert.

Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Isolation mikrobieller DNA in ausreichender Reinheit (2.7.15.3). In Vorversuchen wurde beobachtet, daß die im Eis festgefrorenen epikutikulären Wachse nach dem Auftauen in Form eines dünnen Wachsfilms auf der Wasseroberfläche schwammen. Diese Wachsschicht war bei Raumtemperatur nur teilweise mit dem Detergenz SDS auflösbar und zeigte eine hohe Affinität zu Oberflächen. Mittels der beschriebenen Aufarbeitung (2.7.15.3), welche Inkubation bei 65 °C, mehrfaches Invertieren und Zugabe von SDS einschloß, war es möglich, DNA epiphytischer Mikroorganismen aus dieser Wachsschicht zu isolieren. Die mittels dieser Methode isolierte DNA wurde in PCRs zur Amplifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Mikroorganismen und zum Aufbau von Real Time PCR-Systemen eingesetzt (3.3.6-8), welche die Quantifizierung von DNA-Kopien epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche (3.4) ermöglichten. Um Verluste, welche während der Aufarbeitung unvermeidbar auftraten, quantifizieren zu können, wurde eine definierte DNA-Menge eines internen Standards zugesetzt und nach DNA-Isolation die wiedergefundene Menge bestimmt (2.7.14, 3.3.6). Als interner Standard wurde ein Myrcensynthase-Gen [AJ304839] aus der im mediterranen Raum verbreiteten Steineiche (*Quercus ilex* L.) eingesetzt (FISCHBACH, 2000, FISCHBACH et al., 2001). Dieses Gen existiert nach heutigem Kenntnisstand weder in der Stieleiche noch in epiphytischen Mikroorganismen. In zwei weiteren untersuchten Methoden zur DNA-Isolation wurde kein interner Standard wiedergefunden, so daß diese ungeeignet waren. Bei der Bestimmung von Aufarbeitungsverlusten mit Hilfe des internen Standards wird von der Annahme ausgegangen, daß die Verluste des zugesetzten internen Standards anteilmäßig genau so groß sind wie die Verluste der DNA epiphytischer Mikroorganismen. Dies erscheint nicht selbstverständlich, da der interne Standard in Form hochreiner Plasmid-DNA zugesetzt wurde, während DNA epiphytischer Mikroorganismen erst aus den Zellen der Organismen extrahiert werden mußte, welche zuvor aus bzw. von der Wachsschicht herausgelöst wurden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist weder bekannt, ob dieser Unterschied überhaupt Einfluß auf die anteilmäßigen Verluste hat und – falls ja – in welchem Maße.

Nicht ganz auszuschließen war, daß ein Teil der in der Wachsschicht eingeschlossenen mikrobiellen DNA zumindest in einigen Proben nicht isoliert werden konnte. Ein Teil der Wachsschicht könnte durch die unspezifische Oberflächenaffinität an die Kunststoffwände der verwendeten Zentrifugenröhrchen oberhalb der Flüssigphase binden und so die enthaltene mikrobielle DNA nur unzureichend während der Aufarbeitung erfaßt worden sein. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum in einigen Proben zur Quantifizierung von epiphytischen Mikroorganismen auf Blättern der Stieleiche (Abb. 3.16) keine Genomkopien epiphytischer Mikroorganismen nachweisbar waren (4.3).

Der Einsatz molekularbiologischer Techniken zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen eröffnet eine Reihe neuer Möglichkeiten. Vor- und Nachteile – im Vergleich zu klassischen Methoden – werden im folgenden diskutiert. Ein großer Vorteil molekularbiologischer Techniken liegt darin, daß sie anzuchtsfrei arbeiten. Im Gegensatz zu wochenlangen Inkubationszeiten von Nährmedienröhrchen und -platten liefert die Quantifizierung von Genomsegmenten epiphytischer Mikroorganismen Ergebnisse innerhalb weniger Stunden (3.3.6-7, 2.7.16). Die Untersuchung von Mikroorganismen mittels klassischer Kultivierungsverfahren erfaßt nur einen sehr geringen Teil der Organismen (4.2.1). Schätzungsweise 15 bis weniger als 1 % aller Mikroorganismen sind kultivierbar (AMANN et al., 1995, KAEBERLEIN et al., 2002), und auch generell kultivierbare Mikroorganismen können in bestimmten Entwicklungsphasen nicht wachstumsfähig sein (WILSON & LINDOW, 1992). Im Gegensatz hierzu können mit molekularbiologischen Methoden alle Mikroorganismen untersucht werden. Je nach Spezifität der verwendeten

Oligonukleotide erfolgt die Bestimmung der Gesamtzahlen von Eubakterien (BACH et al., 2002), von Organismengruppen, wie beispielsweise Nitrifizierern (MOBARRY et al., 1996) sowie einzelner Arten oder Unterarten (TOTH et al., 1999). In gleicher Weise können Symbionten oder Pathogene (AMANN et al., 1995), die oftmals nicht unabhängig von ihrem Partner bzw. Wirt kultivierbar sind, erfaßt werden. Alternativ ist der Nachweis charakteristischer Gene eines Organismus oder einer ganzen Gruppe möglich (BRAKER et al., 1998, SINIGALLIANO et al., 1995). BRAKER et al. (1998) schließen aus der Anwesenheit von Nitritreduktase-Genen auf denitrifizierende Stoffwechselleistung, was ohne Untersuchung von Transkription, Translation und Aktivität der entsprechenden Enzyme jedoch nur unter Vorbehalt möglich ist. Für Aussagen dieser Art sind Untersuchungen von Stoffwechselprodukten nach Kultivierung besser geeignet, was einen Schwachpunkt molekularbiologischer Methoden aufzeigt. Ein weiterer Nachteil molekularbiologischer Quantifizierungsmethoden ist eine mögliche Überschätzung von Kopienzahlen durch abgestorbene Mikroorganismen, deren DNA noch nicht vollständig abgebaut wurde.

Für die molekularbiologische Unterscheidung bestimmter Arten oder Gattungen von Organismen eignen sich spezielle Bereiche der ribosomalen DNA (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999, WHITE et al., 1990). Eukaryotische Organismen besitzen zwischen der 18S rDNA und der 28S rDNA einen als "intergenic spacer region" bezeichneten DNA-Abschnitt, der von der 5,8S rDNA in zwei Bereiche unterteilt wird (WHITE et al., 1990). Diese Bereiche kodieren für keine Proteine, sind hoch variabel und eignen sich somit zur phylogenetischen Unterscheidung von Gattungen, Arten bis hin zu Populationen oder Stämmen (WHITE et al., 1990). Auch in Prokaryoten finden sich vergleichbare Genomabschnitte. Ein als "internal spacer region" bezeichneter Abschnitt zwischen der 16S rDNA und 23S rDNA enthält nicht kodierende, hoch variable Sequenzen, die eine Identifizierung von Organismen erlauben (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden epiphytische Bakterien und filamentöse Pilze auf Blattoberflächen der Stieleiche untersucht. Im Mittelpunkt der molekularbiologischen Methodenentwicklung stand einerseits das epiphytische Bakterium *Erwinia* spec. sowie andererseits der phytopathogene Pilz *Microsphaera* spec.

4.2.2.1 Quantifizierung phytopathogener Pilze

Zu den bedeutendsten Eichenarten in Deutschland gehören die Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) und die Stieleiche (*Quercus robur* L.) (BUTIN, 1989). Etwa 9 % der Waldfläche Deutschlands sind von Eichen bedeckt (BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT, 2001). Der Eichenmehltau (*Microsphaera alphitoides*), ein parasitischer Pilz aus der Ordnung *Erysiphales* [echte Mehltaupilze], kann beide Eichenarten befallen, wobei die Stieleiche anfälliger ist (BUTIN, 1989). Wie alle obligaten Parasiten ist der Eichenmehltau nicht auf Nährmedien kultivierbar (ESSER, 2000). Eine Quantifizierung mittels mikrobiologischer Methoden war somit nicht möglich. NEWSHAM et al. (2000) beschreiben eine Untersuchungsmethode für *Microsphaera alphitoides*, welche auf der makroskopischen Abschätzung des Bedeckungsgrads der Blattfläche mit Mycel basiert. Dieser Ansatz übersieht jedoch den noch nicht makroskopisch erkennbaren Anteil des wachsenden Mycels und erlaubt keine dreidimensionale Betrachtung. So kann beispielsweise nicht unterschieden werden, ob ein bestimmter Blattbereich nur mit einer dünnen Schicht Pilzmycel bedeckt ist oder aber ein mehrschichtiger Belag auf der

Blattfläche gewachsen ist. Zudem sind Verwechslungen mit anderen Pilzen möglich, die ein ähnliches makroskopisches Erscheinungsbild haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine molekularbiologische Methode zur Quantifizierung von Mehltau entwickelt. Hierzu wurden 15 Sequenzen der "intergenic spacer region" [s. o.] von verschiedenen Mehltau-Arten verglichen, um konservierte Bereiche für die Oligonukleotidsynthese zu lokalisieren (3.3.4). Zu diesem Zeitpunkt befand sich in der EMBL-Datenbank kein Eintrag einer entsprechenden Sequenz von *Microsphaera alphitoides*, so daß ein Sequenzvergleich mit verwandten Mehltauarten [*M. baumleri* [AB015919], *M. blasti* [AB015918], *M. friestii* [AB000939], *M. heiwingiae* [AB015916], *M. juglandis* [AB015928], *M. katsumotoi* [AB015917], *M. magnifica* [AF011312], *M. platani* [AF073349], *M. pseudoloniceræ* [AB015915], *M. pulchra* [AB015935], *M. staphyleae* [AB015922], *M. syringae-japonicae* [AB015920], *M. trifolii* [AB015913], *M. vanbruntiana* [AB015925] und *M. wallrothii* [AB015930]] durchgeführt wurde. Auf Grundlage dieser Sequenzen wurden die Oligonukleotide "Mic for" und "Mic rev" ausgewählt (Tab. 3.1). Da nicht bekannt war, wie groß die Sequenzunterschiede zu *Microsphaera alphitoides* waren, wurden zusätzlich vier weitere Primer ["ITS1" – "ITS4"] eingesetzt (Tab. 3.1), die zur Amplifizierung von rDNA-Abschnitten einer breiten Gruppe von Pilzen geeignet waren (WHITE et al., 1990). Da zu diesem Zeitpunkt die Abhebetechnik (3.3.1) noch in der Entwicklungsphase war, wurde die für PCR-Ansätze benötigte DNA epiphytischer Mikroorganismen direkt aus dem Pilzmycel von herbstlichen Eichenblättern extrahiert (2.7.3.1). Unter Verwendung der Oligonukleotide "ITS1 for" und "Mic rev" wurde mittels PCR ein Amplifikat erwarteter Größe erhalten (Abb. 3.9), welches anschließend sequenziert wurde. Aus demselben PCR-Ansatz wurden fünf unterschiedliche Sequenzen bestimmt (Abb. 3.11). Das Isolat "Micro1" zeigte 100 % Übereinstimmung zu einer inzwischen in der EMBL-Datenbank vorhandenen Basensequenz von *M. alphitoides* [AF298538]. Das Isolat "Micro2", welches an drei Positionen Unterschiede zu "Micro1" aufweist, zeigte 99,8 % Identität zur gleichen Sequenz. Zusammen mit einer anderen Sequenz [AJ309201] sind die Isolate "Micro1" und "Micro2" die einzig verfügbaren Sequenzinformationen der "intergenic spacer region" von *M. alphitoides*, welche von der Stieleiche isoliert wurden. "Micro1" besaß 99,8 % und "Micro2" 99,5 % Übereinstimmung zu dieser Sequenz [AJ309201].

Durch Verwendung eines Mehltau-spezifischen Primers ["Mic rev"] und eines allgemeinen Pilz-spezifischen Oligonukleotids ["ITS1 for"] wurden nicht nur Mehltau-spezifische DNA-Segmente amplifiziert. Eine gelelektrophoretische Untersuchung dieses PCR-Ansatzes (Abb. 3.9) zeigte deutlich ein zweites DNA-Segment von ca. 500 bp Größe. Der Vergleich der Basensequenz des Isolats "Clado" mit der EMBL-Datenbank ergab eine Übereinstimmung von 91,1 % zu einer Sequenz von *Cladosporium spec.* [AJ300336], welche von Schilfrohr (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) isoliert wurde. Da auch die nächst ähnlichen Sequenzen überwiegend aus der Gattung *Cladosporium* stammten, wurde das Isolat "Clado" als *Cladosporium spec.* klassifiziert.

Vergleiche der ebenfalls aus dem gleichen PCR-Ansatz [s. o.] stammenden Isolate "Ramu1" und "Ramu2" mit der EMBL-Datenbank zeigten 96,2 bzw. 96,0 % Identität mit einer Sequenz von *Ramularia collo-cygni* [AF173310]. Da innerhalb der nächst ähnlichen Einträge eine weitere Sequenz der Gattung *Ramularia* enthalten war, wurden beide Isolate als *Ramularia spec.* benannt. Gleichwohl besitzen beide Isolate auch große Übereinstimmungen zu Sequenzen von *Glomerella* und *Mycosphaerella*, so daß bei verbesserter Datenlage der Genbank eine Reklassifizierung nicht auszuschließen ist. Untereinander unterscheiden sich die Sequenzen "Ramu1" und "Ramu2" in fünf Positionen (Abb. 3.11). Sowohl die beiden isolierten DNA-Sequenzen von *Ramularia spec.* als auch das erhaltene *Cladosporium*-Isolat sind die ersten Sequenzinformationen der "intergenic spacer region" dieser Organismen von Blättern der Stieleiche.

Die DNA-Sequenzen von *Cladosporium spec.*, *Microsphaera alphitoides* und *Ramularia spec.*, welche mittels PCR unter Verwendung einer Template-DNA gewonnen wurden, die von Blattoberflächen der Stieleiche isoliert wurde, zeigten eindeutig, daß diese Organismen Bestandteil der Phyllosphäre sind. Dies ist ein eindeutiger, qualitativer Nachweis dieser Organismen auf Stieleichenblättern. Die quantitative Bestimmung dieser Arten erfolgte mittels Real Time PCR. Durch Verwendung dieser Sequenzinformationen war es möglich, Syber® Green-Systeme aufzubauen, die hoch spezifisch für die isolierten Gattungen waren. Innerhalb der sequenzierten Bereiche wurden Regionen ausgesucht, die sowohl den geforderten Kriterien für eine Quantifizierung mittels Real Time-Technik entsprachen (Tab. 2.3) als auch über ausreichende Spezifität verfügten. Die Kalibrierung dieser Systeme (3.3.7) mittels DNA-Lösungen bekannter Kopienzahlen (2.7.11-12) ergab, daß zwischen 10^2 bis 10^8 Kopien pro Ansatz nachweisbar waren (3.3.7). Dieser breite Meßbereich stellt einen großen Vorteil dieser Methode dar, da Proben auch ohne Kenntnis der Größenordnung der zu untersuchenden DNA-Kopien ohne Vorbehandlung [Verdünnung oder Konzentrierung] untersucht werden können. Die berechneten Regressionskoeffizienten (Abb. 3.13) zwischen 0,985 und 0,999 belegen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der angewendeten Real Time PCR-Systeme.

Es gibt schätzungsweise 10^5 bis 10^6 verschiedene Arten an Mikroorganismen, jedoch sind derzeit nur wenige Tausend beschrieben (KAEBERLEIN et al., 2002). Je mehr Sequenzinformationen in die Datenbanken eingegeben werden, desto spezifischer kann die Auswahl von Oligonukleotiden in der Zukunft erfolgen. Eine weitere Unsicherheit läßt sich auf Unterschiede zwischen der klassischen taxonomischen Unterteilung der Pilze (ESSER, 2000) und Ergebnissen molekularbiologischer Untersuchungen auf Basis der "intergenic spacer region" (WHITE et al., 1990) zurückführen. Während die Klassifizierung der Mehltaupilze beispielsweise unter anderem auf Anzahl und Form von Asci und Kleistothezien basiert (ESSER, 2000), berücksichtigt die phylogenetische Untersuchung auf rDNA-Ebene Sequenzunterschiede und -gemeinsamkeiten (WHITE et al., 1990). Dies erklärt, warum bei einem Sequenzvergleich des Isolats "Micro1" (*Microsphaera alphitoides*) mit den Einträgen der EMBL-Datenbank zum Teil höhere Homologien zu *Erysiphe spec.* gefunden wurden als zu *Microsphaera spec.* Da aber die größten Übereinstimmungen zu *Microsphaera alphitoides* gefunden wurden und *Erysiphe spec.* ebenfalls zu den Mehltaupilzen gehört, ist diese Beobachtung weniger auf unzureichende Spezifität der verwendeten Oligonukleotide zurückzuführen, sondern verdeutlicht vielmehr die Unterschiede zwischen taxonomischen und phylogenetischen Systemen.

4.2.2.2 Quantifizierung epiphytischer Bakterien

Die Gattung *Erwinia* kommt weltweit auf unterschiedlichen Pflanzen, unter anderem auch Eichen, vor (TOTH et al., 1999). Sie können, zumindest für eine gewisse Zeit ohne schädigenden Einfluß für ihren Wirt, auf Blättern oder anderen Pflanzenteilen vorkommen (PEROMBELON, 1981). *Erwinia spec.* ist aber auch der Erreger der Naß- oder Weichfäule ["soft rot"] und des Feuerbrands ["fire blight"] (JOHNSON & STOCKWELL, 1998, TOTH et al., 1999). Für die quantitative Untersuchung von Stieleichenblättern auf das Vorkommen von *Erwinia*-Arten wurde wie zur Untersuchung phytopathogener Pilze (4.2.2.1) die Real Time PCR-Technik eingesetzt. Zur Auswahl geeigneter Oligonukleotide für die Amplifizierung von DNA-Segmenten von *Erwinia spec.* wurden in den Sequenzen der "internal spacer region" zwischen der 16S rDNA und 23S rDNA konservierte Bereiche lokalisiert. Da zu diesem Zeitpunkt lediglich drei Einträge in der Genbank enthalten waren [zwei Stämme von *Erwinia*

pyrifoliae [AJ132969 und AJ009930] und *Erwinia rhapontici* [AF232678]], wurde zusätzlich die Sequenz von *Escherichia vulneris* [AF047421] berücksichtigt. *Escherichia vulneris* ist der nächste Verwandte von *Erwinia rhapontici* außerhalb der Gattung *Erwinia* (Abb. 3.10) und wurde mittels Nukleinsäuresequenzvergleich von *Erwinia rhapontici* mit der Genbank ermittelt. Ein Alignment dieser vier Sequenzen ermöglichte es, Bereiche zu identifizieren, die innerhalb der Gattung *Erwinia* konserviert sind, jedoch verglichen mit anderen Enterobakterien ausreichende Unterschiede für eine Differenzierung aufweisen. Diese Bereiche wurden zur Auswahl der Oligonukleotide "Erwin for2" und "Erwin rev2" genutzt (Tab. 3.1). Mittels PCR (2.7.3.2) und DNA epiphytischer Mikroorganismen, welche mit der Abhebetechnik gewonnen wurde (3.3.1), wurden geeignete Amplifikate erhalten. Nach Klonierung und Sequenzierung wurden sechs verschiedene Klone ["Erwin1-6"] mit Einträgen der Datenbank verglichen. Alle Isolate wurden eindeutig der Gattung *Erwinia* zugeordnet. Beste Übereinstimmungen wurde zu *Erwinia rhapontici* [AF232678] gefunden, wobei je nach Isolat zwischen 86,5 % und 92,7 % Identität ermittelt wurden. Da auch die nächst besten Übereinstimmungen zu Sequenzen von *Erwinia spec.* bestanden, wurde die Zugehörigkeit der Isolate "Erwin1" bis "Erwin6" zu dieser Gattung angenommen. Da es derzeit in den Datenbanken keine Sequenz der "internal spacer region" von *Erwinia quercina*, einer bekanntermaßen auf Eichen vorkommenden *Erwinia*-Art, gibt (TOTH et al., 1999), kann derzeit kein Vergleich mit den in dieser Arbeit isolierten *Erwinia*-Sequenzen von Blattoberflächen der Stieleiche durchgeführt werden. Eine genauere Klassifizierung bis auf Artniveau ist zur Zeit aufgrund der genetischen Unterschiede [bis zu 13,5 % Unterschied] und der wenigen Datenbankeinträge nicht möglich. Die isolierten Klone stellen die ersten Sequenzinformationen der "internal spacer region" von *Erwinia spec.* von Blattoberflächen der Stieleiche dar.

Für die Quantifizierung von *Erwinia spec.* auf Eichenblättern wurde ein Real Time PCR-System auf Syber® Green-Basis (2.7.16) aufgebaut. Zur Auswahl geeigneter Primer und Sonden wurden sowohl die sechs isolierten Sequenzen sowie die oben beschriebenen vier Sequenzen der Datenbank [*Erwinia rhapontici*, zwei Stämme von *Erwinia pyrifoliae*, *Escherichia vulneris*] in analoger Weise (s.o., 4.2.2.1) eingesetzt. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieses Real Time PCR-Systems wurde durch einen hohen Regressionskoeffizienten [$R^2 = 0,993$] der Kalibrierungsgerade (Abb. 3.13) belegt und die Spezifität mittels Schmelzpunktbestimmung aller amplifizierten Genomsegmente überprüft. Da nur drei Sequenzen der Datenbank für die Oligonukleotid-Synthese (Tab. 3.2) zur Verfügung standen, wurde eine weitere Validierung dieses Systems (3.3.8) durchgeführt, um die Spezifität zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein Amplifikat eines Real Time PCR-Ansatzes, in dem *Erwinia spec.* quantifiziert worden war (3.3.8), kloniert und sequenziert. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte bei allen Isolaten erneut größte Übereinstimmungen der Basensequenz [86,5 % bis 87,2 %] zu *Erwinia rhapontici* [AF232678], wobei verglichen mit der ersten Klonierung (3.3.4-6) identische bis sehr ähnliche Sequenzen gefunden wurden (Abb. 3.11). Das entwickelte Syber® Green-System war somit zur Quantifizierung von *Erwinia spec.* geeignet.

Für eine weitere Unterscheidung innerhalb der Gattung *Erwinia* wurde ein Sequenzvergleich der sechs Isolate durchgeführt (Abb. 3.12). Drei Bereiche, die für eine Unterscheidung verschiedener Isolate geeignet waren, wurden für die Synthese von TaqMan®-Sonden ausgewählt. Die Genauigkeit der so aufgebauten TaqMan® Real Time PCR-Systeme wurde durch hohe Regressionskoeffizienten [$R^2 = 0,949$ bis $R^2 = 0,995$] der Kalibrationsgeraden (Abb. 3.14) belegt. Für dieses System wurden die gleichen Forward und Reverse Primer wie beim Syber® Green-System verwendet (Tab. 3.2), dessen Spezifität bereits gezeigt wurde

[s.o.]. Durch die Kombination von Syber® Green- und TaqMan® PCR-Ansätzen war es möglich, die Gesamtkopienzahl von *Erwinia spec.* sowie die Kopienzahlen bestimmter Gruppen oder Isolate zu bestimmen (Abb. 3.14, Abb. 3.15). Da beide Systeme mit den gleichen Forward und Reverse-Primern arbeiten, sind die ermittelten DNA-Kopienzahlen daher direkt miteinander vergleichbar, was einen großen Vorteil dieses Systems darstellt. Die Quantifizierung von rDNA-Kopienzahlen auf Eichenblättern aus dem Freiland (2.3) zeigte, daß mit allen drei entwickelten TaqMan® Sonden unterschiedliche Gruppen von *Erwinia spec.* nachweisbar waren (Abb. 3.15). Ihr Anteil an der Gesamtpopulation von *Erwinia spec.* schwankte von Blatt zu Blatt zwischen weniger als 5 % bis nahezu 100 % (Abb. 3.15). Jedoch lassen sich diese Gruppen oder Isolate nicht auf allen Blättern nachweisen, was darauf hindeutet, daß noch weitere *Erwinia*-Arten bzw. Unterarten auf Eichenblättern vorkommen, die mit den verwendeten TaqMan® Sonden nicht erfaßt werden. Die Untersuchungen zu Querempfindlichkeiten (Tab. 3.3) der verwendeten TaqMan®-Sonden zeigten jedoch auch Grenzen des verwendeten Systems auf. Sonde "Erwin P1" war zwar in der Lage, spezifisch nur die Sequenz von "Erwin3" zu erfassen, jedoch zeigten die Sonden "Erwin P2" und "Erwin P3" jeweils Empfindlichkeiten für zwei Isolate ["Erwin1" und "Erwin5"], da sich die Sequenzen von "Erwin1" und "Erwin5" im Bindungsbereich der Sonden jeweils nur in einer Base unterschieden. Offenbar reicht ein Unterschied von einer Basenposition zwischen den verwendeten Sonden nicht aus, um diese Sequenzen eindeutig voneinander zu unterscheiden. Größere Sequenzunterschiede zwischen Sonde und Isolat, wie beispielsweise zwischen Sonde "Erwin P2" und Isolat "Erwin3", verhindern jedoch eindeutig die Bindung der Sonde an die Sequenz, so daß kein Fluoreszenzsignal emittiert wird. Dennoch war es möglich, innerhalb der sechs *Erwinia*-Sequenzen zwei Gruppen zu unterscheiden. Die Sequenzen "Erwin3" und "Erwin4" zeigten deutliche Unterschiede zu den anderen isolierten Sequenzen von *Erwinia*. Diese Aussage wurde durch eine phylogenetische Untersuchung bestätigt (Abb. 4.1). Ein Vergleich der sechs isolierten *Erwinia*-Sequenzen mit *Erwinia rhapontici*, zwei Stämmen von *Erwinia pyrifoliae* und *Escherichia vulneris*, dem nächsten Verwandten außerhalb der Gattung *Erwinia*, zeigte, daß sich die identifizierten *Erwinia*-Sequenzen deutlich von *Escherichia vulneris* unterscheiden und gemeinsam mit bereits bekannten *Erwinia*-Sequenzen aus der Genbank eine phylogenetische Einheit bilden. Dies kann als weiterer Beleg für die Zugehörigkeit zur Gattung *Erwinia* angesehen werden. Dennoch sind die Unterschiede zu groß, um die isolierten Sequenzen den Arten *Erwinia rhapontici* oder *Erwinia pyrifoliae* zuordnen zu können. Innerhalb der sechs isolierten *Erwinia*-Sequenzen sind zwei Gruppen erkennbar. "Erwin3" und "Erwin4" bilden eine Gruppe [A] und heben sich von "Erwin1", "Erwin2", "Erwin5" und "Erwin6" [Gruppe B] ab. Aufgrund der wenigen verfügbaren Einträge in der Datenbank bleibt die Frage, zu welcher Art die isolierten *Erwinia*-Klone gehören, spekulativ. In diesem Zusammenhang sei an *Erwinia quercina* erinnert, einer auf Eichen nachgewiesenen Art (TOTH et al., 1999). Die Zugehörigkeit zur Gattung *Erwinia* kann jedoch als sicher angesehen werden.

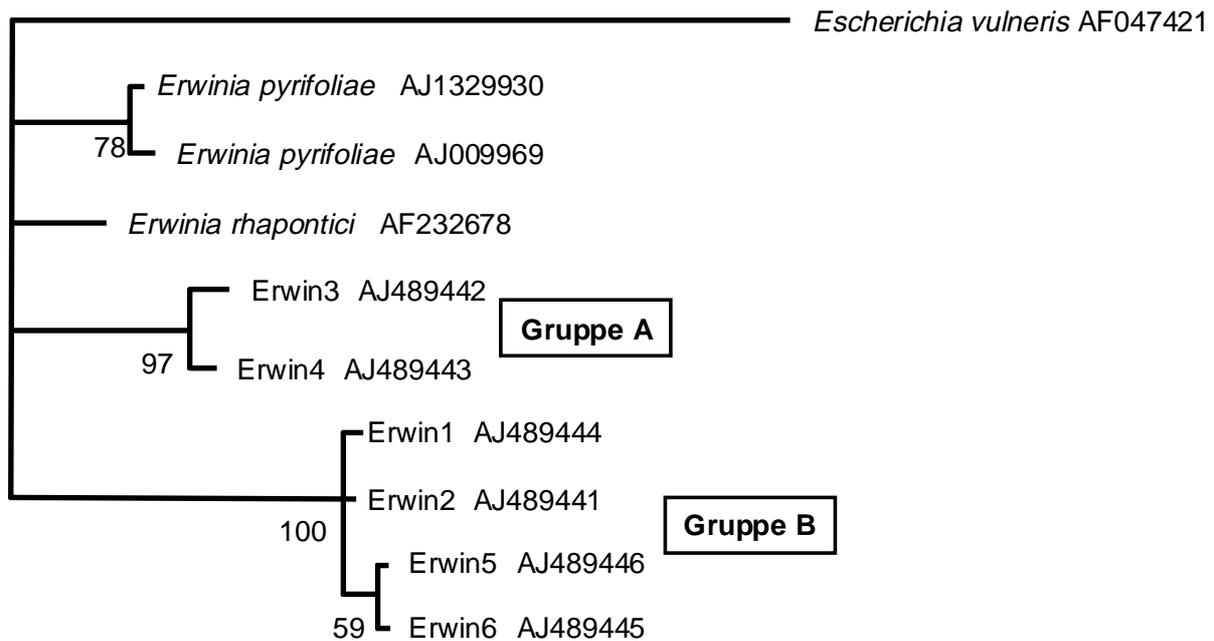


Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum der von Eichenblättern isolierten *Erwinia*-Sequenzen. Sechs Sequenzen der "internal spacer region" von *Erwinia*-Stämmen, welche von der Blattoberfläche von Stieleichen isoliert (3.3.1-5) und mittels PCR (2.7.3) amplifiziert wurden, wurden mit drei bekannten *Erwinia*-Sequenzen [zwei Stämmen von *Erwinia pyrifoliae* [AJ132969 und AJ009930], *Erwinia rhapontici* [AF232678]] und mit *Escherichia vulneris* [AF047421], dem nächsten Verwandten außerhalb der Gattung *Erwinia* mit Hilfe des Softwareprogramms Clustal W verglichen (2.7.2). Auf dieser Basis wurde mittels des Softwareprogramms PAUP (2.7.2) ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Die horizontalen Linien beschreiben den relativen Abstand der Isolate. Die Zahlen unterhalb der Linien stellen die "bootstrap"-Werte dar, welche als Maß für die Zuverlässigkeit der angenommenen Verzweigung bei 100 wiederholten Berechnungen angesehen werden können.

4.3 Quantifizierung von epiphytischen Mikroorganismen der Stieleiche im Jahresverlauf

In den Vegetationsperioden 2000 und 2001 wurden die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen, die Anteile von Pilzen und Bakterien sowie von Nitrifizierern und Denitrifizierern (Abb. 3.4, Abb. 3.5) auf Blattoberflächen von Stieleichen, die unter verschiedenen UV-B Strahlungsniveaus angezogen wurden (2.3), mittels mikrobiologischer Methoden (2.6) bestimmt. Ebenso wurden die Kopienzahlen von rDNA-Genomabschnitten der filamentösen Pilze *Cladosporium spec.*, *Microsphaera spec.* und *Ramularia spec.* sowie von Eubakterien und *Erwinia spec.* (Abb. 3.15) quantifiziert. An dieser Stelle werden die gewonnenen Daten mit Blick auf jahreszeitliche Entwicklung, UV-B Effekt und Standort-Einfluß diskutiert.

Die erzielten Ergebnisse wurden unter Verwendung verschiedener Methoden gewonnen. Deshalb ist es wichtig, bei einem Vergleich von Kopien- und Lebendzellzahlen zu beachten, daß einerseits je nach Nährmedium und Anzuchtbedingungen nicht jede lebende Zelle auch wachstumsfähig ist und andererseits, daß die Anzahl der pro Zelle enthaltenen Kopien des betrachteten Genomabschnitts variieren kann. Während bei *Escherichia coli* TG1 mikroskopisch bestimmte Zellzahl, Lebendzellzahl und Kopienzahl der untersuchten 16S rDNA-Region in der gleichen Größenordnung liegen (Tab. 4.1), können bei anderen

Organismen große Unterschiede auftreten (BACH et al., 2002). Beispielsweise kann die bei der Quantifizierung von phytopathogenen Pilzen herangezogene "intergenic spacer region" in Eukaryoten in mehr als 100 Kopien vorkommen (STRYER, 1996) und daher nicht mit der mikroskopischen Zellzahl oder der Lebendzellzahl gleich gesetzt werden.

Tab. 4.1: Vergleich von Zell- und rDNA-Kopienzahl von *Escherichia coli* TG1. Eine Kultur von *E. coli* TG1 in LB-Medium (2.1.2, 2.7.1) wurde mit unterschiedlichen Techniken untersucht und die mikroskopisch erkennbare Zellzahl [mittels Zählkammer (BAST, 1999)], die Lebendzellzahl [mittels Ausplattieren CFU Bestimmung (2.6.2)] und die rDNA-Kopienzahl (3.3) bestimmt.

Technik	Meßgröße	Wert
Lichtmikroskopie	mikroskopische Zellzahl	$(4,1 \pm 2,5) \times 10^9$
Spatelplattenverfahren	Lebendzellzahl [CFU]	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^9$
Real Time PCR	rDNA Genomkopien	$(9,9 \pm 2,5) \times 10^9$

Da die Zellzahl epiphytischer Mikroorganismen abhängig vom Alter und der Position der untersuchten Blätter innerhalb einer Pflanze ist (JACQUES et al., 1995), wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Eichenblätter gleichen Alters von den höchst gelegenen Ästen [angehende Kronenregion] beprobt. Alle Untersuchungen wurden in vier unabhängigen Parallelen durchgeführt. Allgemein läßt sich sagen, daß große Schwankungen, oftmals um mehr als eine Größenordnung, zwischen den einzelnen Proben beobachtet wurden (Abb. 3.5, Abb. 3.6). Zum Teil sind diese Schwankungen, insbesondere bei Untersuchungen mittels MPN-Technik (2.6), auf methodische Ungenauigkeiten zurückzuführen. Vermutlich liegt der überwiegende Einfluß aber in der natürlichen Variabilität (HIRANO & UPPER, 2000, KINKEL, 1997). Jedes Blatt kann als eigenes Habitat mit individuellem Mikroklima gesehen werden. Nicht immer waren in allen vier untersuchten Parallelen Mikroorganismen nachweisbar. Zum einen kann die Zell- oder Kopienzahlen der epiphytischen Mikroorganismen unterhalb der Nachweisgrenze liegen, oder die Mikroorganismen sind unter den entsprechenden Bedingungen nicht kultivierbar bzw. die DNA-Isolation wurde beeinträchtigt (4.2.2). Da die tatsächliche Ursache nicht feststellbar war, wurden diese Ansätze nicht bei der Quantifizierung berücksichtigt.

Die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen wurde mit zwei unterschiedlichen mikrobiologischen Methoden erfaßt, die übereinstimmende Ergebnisse erzielten (4.2.1). Bakterien und Pilze stellten in etwa gleiche Anteile der Gesamtpopulation, wobei Pflanzen aus dem Freiland einen höheren Bakterienanteil besaßen, während Pflanzen, die in Anzuchtskammern kultiviert wurden, mehr Pilze auf ihren Blättern enthielten. HIRANO & UPPER (2000) ermittelten ebenfalls unter bestimmten Bedingungen mittels Ausplattieren mehr epiphytische Bakterien im Freiland als in Pflanzenanzuchtskammern und führten diesen "Kammereffekt" auf fehlenden Regen zurück. Eventuell könnten veränderte Strahlungs- oder Feuchtebedingungen innerhalb der Anzuchtskammern auch mitverantwortlich sein (4.1). Eine Beeinflussung durch Temperaturunterschiede kann hingegen ausgeschlossen werden (4.1). Innerhalb der untersuchten Pilzgattungen kommen *Ramularia* spec. und *Cladosporium* spec. in gleichen Größenordnungen vor, wohingegen Kopienzahlen von *Microsphaera* spec. um mehrere Größenordnungen überwiegen. Teilweise wurden Unterschiede um mehr als sechs Größenordnungen festgestellt, was die starke Verbreitung dieses Parasiten verdeutlicht. Durch die Untersuchung der Kopienzahl von Eubakterien (BACH et al. 2002) war es möglich, den Anteil von *Erwinia*-Bakterien an der Gesamtbakterienpopulation zu bestimmen. Innerhalb der Eubakterien liegen die Kopienzahlen von *Erwinia* spec. ca. zwei bis drei Größenordnungen

unterhalb der Kopienzahl der Gesamtbakterien, was zeigt, daß *Erwinia spec.* nicht zu den dominierenden Bakterienarten auf Stieleichenblättern zählt.

Mit Ausnahme der autotrophen Ammoniakoxidierer waren allen untersuchten Gruppen von am N-Umsatz beteiligten Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche nachweisbar. Hinsichtlich der gefundenen Größenordnung und der Anzahl positiver Nachweise gab es jedoch große Unterschiede: Autotrophe Nitritoxidierer wurden nur vereinzelt und in geringen Mengen nachgewiesen. Sie stellen in der Regel nur einen kleinen Bruchteil [unter 1 ‰] der Gesamtpopulation dar (Abb. 3.4). Heterotrophe Nitrifizierer wurden ebenfalls nicht in allen Proben nachgewiesen. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen zeigte große Schwankungen, lag jedoch selten über 1 % (Abb. 3.4). Gleiches galt für Denitrifizierer, die zwar öfter nachweisbar waren, deren Zellzahlen aber ebenfalls selten mehr als 1% der heterotrophen Gesamtzellzahl ausmachten. Trotz des geringen Anteils an der Gesamtpopulation darf der Einfluß von am N-Umsatz beteiligten Organismen nicht unterschätzt werden, da sie aufgrund hoher Umsatzraten die Verfügbarkeit von Stickstoff in oder auf Blättern beeinflussen können (ELBELTAGY et al., 2001). Die N-Verfügbarkeit auf Blattflächen hat Einfluß auf das Wachstum von Pathogenen (SNOEIJERS et al., 2000) und wirkt sich somit auch auf die Gesundheit eines Blattes oder der ganzen Pflanze aus.

4.3.1 Zeitliche Entwicklung

Im Laufe beider Vegetationsperioden stiegen sowohl die Gesamtzellzahl heterotropher Organismen als auch die Zellzahlen von Bakterien und Pilzen auf Blattoberflächen der Stieleiche im Tal an (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Dieser Anstieg war sowohl auf Eichenblättern aus dem Freiland als auch aus den Phytokammern ohne Einfluß der UV-B Exposition erkennbar. Durch den Ortswechsel vom Tal, wo alle Eichen zur Etablierung einer natürlichen Besiedlung mit Mikroorganismen vor Versuchsbeginn angezogen wurden, zum Berg-Standort erfolgte eine deutliche Verringerung der Organismenzahlen (4.3.3). Nach diesem "Einbruch" der Zellzahlen war im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode in beiden Jahren bei beiden UV-B Strahlungsniveaus am Berg Standort eine Stagnierung auf diesem Niveau bis hin zu einem leichten Anstieg erkennbar (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Ein deutlich stärkerer Anstieg der Zellzahlen im Verlauf der Vegetationsphase war auf allen Blättern von im Tal kultivierten Eichen meßbar. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Reihe von Beobachtungen anderer Autoren. JACQUES & MORRIS (1995) erwähnen, daß häufig im jahreszeitlichen Verlauf auf Blättern eine Sukzession beobachtet werden kann. Während Bakterien auf jungen Blättern vorherrschen, setzen sich später Hefen durch, die im Herbst von filamentösen Pilzen zahlenmäßig überholt werden. Ebenso wurde auf Apfelblättern (*Malus pumila* Mill. cv. Melba) ein Zuwachs an Pilzzellen im Vegetationsverlauf beschrieben (KINKEL et al., 1989b). THOMPSON et al. (1993) erwähnen hingegen einen zeitgleichen Anstieg aller drei Gruppen im Verlauf des Jahres auf Blättern der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.). Untersuchungen von Endivienblättern (*Chicorium endivia* L. var. *latifolia*) ergaben einen Anstieg der Bakterienzellzahl im Verlauf der Zeit (JACQUES et al., 1995), wobei mit 10^9 CFU m⁻² Blattfläche gegen Ende der Vegetationsperiode ähnliche Zellzahlen wie auf Stieleichenblättern vorherrschten. HELANDER & RANTIO-LEHTIMÄKI (1990) fanden auf Birkenblättern (*Betula pubescens* Ehrh. ssp. *turtuosa*) im Jahresverlauf unterschiedliche Zellzahlen, die jedoch nicht kontinuierlich anstiegen. Darüber hinaus wiesen PÉRISSOL et al. (1993) auch auf Veränderungen bezüglich der Artenzusammensetzung bzw. -häufigkeiten von Bakterien auf Steineichenblättern (*Quercus ilex* L.) hin.

Die Betrachtung der Kopienzahlen von rDNA-Segmenten (Abb. 3.16) epiphytischer Mikroorganismen zeigt wesentlich geringere Unterschiede im Verlauf der Vegetationsperiode. Diese Untersuchungen wurden jedoch nur zu vier Zeitpunkten (P0, P1, P3, P5, Tab. 2.1) durchgeführt, wohingegen die mikrobiologische Bestimmung der Zellzahl an sechs Zeitpunkten (P0 bis P6, Tab. 2.1) erfolgte, so daß die ermittelten Kopienzahlen auf weniger Meßpunkten beruhen. Hierdurch wurde das Erkennen von Trends erschwert. Dennoch wurden für Kopienzahlen von *Erwinia* spec. auf Eichenblättern beider Standorte unabhängig von der UV-B Exposition sinkende Kopienzahlen im Verlauf der Vegetationsperiode ermittelt, wohingegen Kopienzahlen von *Cladosporium* spec. und *Ramularia* spec. nur auf Blättern von Eichen, die am Berg-Standort angezogen wurden, sanken. Eubakterien und *Microsphaera* spec. zeigten innerhalb der Vegetationsperiode kaum Veränderungen in ihren Kopienzahlen.

Der Vergleich von rDNA-Kopienzahlen und mikrobiologisch bestimmten Zellzahlen ist nur unter Vorbehalten möglich. Während die DNA epiphytischer Mikroorganismen zur Bestimmung der Kopienzahlen ausschließlich von der Blattoberseite isoliert wurde, erfolgte die Bestimmung von Lebendzellzahlen mittels mikrobiologischer Extraktionsmethode von beiden Blattseiten (4.2.1). Zudem unterscheiden sich – mit Ausnahme der Eubakterien – die betrachteten Größen, und die Kopienzahlen einer einzelnen Bakteriengattung erlaubten keine Rückschlüsse auf Zellzahlen der gesamten Bakterien. Durch die Kombination molekularbiologischer und mikrobiologischer Methoden ist es möglich, ein Absinken von Genomkopien von *Erwinia* spec. im jahreszeitlichen Verlauf zu erkennen, während die CFU-Zahl der Gesamtbakterien ansteigt. Unter Berücksichtigung der oben genannten Vorbehalte läßt sich sagen, daß der Rückgang der kultivierbaren Bakterien am Standort Berg nicht notwendigerweise das Absterben dieser Organismen bedeuten muß. Denkbar wäre auch, daß sie in ein Ruhe- oder Überdauerungsstadium eintreten, in dem sie nicht mehr kultivierbar, aber durchaus noch lebensfähig sind. Dies würde erklären, warum die Kopienzahlen der Eubakterien nicht oder zumindest nicht so schnell abnehmen wie die mittels MPN und Ausplattieren ermittelten Lebendzellzahlen.

4.3.2 UV-B Einfluß

Während der Vegetationsperioden 2000 und 2001 wurden für jeden Beprobungstermin jeweils an beiden Standorten die Zellzahlen und 2001 auch die Genom-Kopien epiphytischer Mikroorganismen von Eichen, die ohne UV-B Strahlung angezogen wurden [UV-], mit denen von Eichen, welche mit UV-B Strahlung inkubiert wurden [UV+], statistisch auf signifikante Unterschiede getestet. Mit wenigen Ausnahmen wurden in diesen Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den UV-B Expositionen gefunden [t-Test und Mann-Whitney U-Test, $p > 0,05$ entsprechend 95 % Vertrauensbereich]. In zehn der 130 untersuchten Fälle wurden signifikante Unterschiede zwischen den UV-B Behandlungen bestimmt. Diese traten jedoch innerhalb jeder untersuchten Mikroorganismen-Gruppe [Gesamtzellzahl, Bakterien, Pilze, usw.] zu einem von Gruppe zu Gruppe verschiedenen Zeitpunkt auf und waren am nächsten Beprobungstermin nicht mehr nachweisbar. Es konnte auch kein einheitlicher Effekt der UV-B Strahlung auf die Mikroorganismen beobachtet werden, so daß in manchen Fällen höhere und in anderen Fällen niedrigere Zell- und Kopienzahlen unter Anwesenheit von UV-B Strahlung [UV+] detektiert wurden. Berücksichtigt man, daß für alle Untersuchungen lediglich vier unabhängige Proben zur Verfügung standen, so dürfen die wenigen Aussagen eines signifikanten Einflusses nicht überinterpretiert werden, insbesondere unter Beachtung der großen Variabilität zwischen Blattproben des selben Baumes. Mit den bisherigen

Ergebnissen konnte eine Veränderung der Zell- oder Kopienzahlen von epiphytischen Mikroorganismen durch UV-B Strahlung nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Eine drastische Beeinflussung von Zell- und Kopienzahlen epiphytischer Mikroorganismen durch UV-B Strahlung erscheint jedoch unwahrscheinlich. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, ist eine weitere Untersuchung erforderlich, die mit einem deutlich höheren Stichprobenumfang durchgeführt werden sollte.

NEWSHAM et al. (2000) berichten über einen höchst signifikanten Einfluß von UV-B Strahlung auf *Microsphaera alphitoides*. Sowohl der gewählte Versuchsansatz als auch die benutzte Methodik unterscheiden sich jedoch stark von dem in dieser Arbeit verwirklichten Versuchsaufbau. Zum einen wurde der Mehltaubefall von Eichenblättern durch makroskopische Abschätzung der befallenen Blattfläche durchgeführt, was nur eine grobe und nicht spezifische Quantifizierung erlaubt (4.2.2.1). Zum anderen wurden die unterschiedlichen UV-B Strahlungsniveaus nicht wie in der vorliegenden Arbeit durch Ein- oder Ausschluß der natürlich auftretenden UV-B Strahlung hergestellt, sondern durch Verwendung von UV-Lampen eine 30 %ige Erhöhung des natürlichen Strahlungsniveaus erreicht. Mit dem gleichen Ansatz wurde ebenfalls der UV-B Einfluß auf andere Pilze und Hefen untersucht (NEWSHAM et al., 1997). Während die Häufigkeiten von *Aureobasidium pullulans* und *Sporobolomyces roseus* durch UV-B Strahlung verändert wurden, beobachteten NEWSHAM et al. (1997) keine Beeinflussung von *Cladosporium spec.* Aufgrund des stark unterschiedlichen Versuchsansatzes sowie der zur Quantifizierung von *Microsphaera alphitoides* gewählten Methodik ist der Vergleich mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen jedoch nur bedingt möglich.

4.3.3 Standort-Einfluß

Vor Beginn der Versuche wurden alle Pflanzen für mehrere Wochen im Tal im Freiland inkubiert, um eine natürliche Besiedlung mit Mikroorganismen zu ermöglichen. Zu Versuchsanfang wurden die Pflanzen auf die unterschiedlichen Behandlungsvarianten der Standorte Berg und Tal aufgeteilt und dort während der Vegetationsperiode kultiviert und beprobt (2.3-4). Dieser Standortwechsel bewirkte eine deutliche Reduzierung der Lebendzellzahlen von Bakterien und Pilzen sowie der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen auf Blattoberflächen von Eichen, die vom Tal zum Berg transportiert wurden. Um genauere Aussagen zu den Auswirkungen dieses Standortwechsels zu erhalten, wurden die Zell- und Kopienzahlen von epiphytischen Mikroorganismen auf Eichenblättern von beiden Standorten statistisch auf signifikante Unterschiede untersucht. Für jedem Probennahmetermin wurden unabhängig von der UV-B Exposition jeweils Zell- und Kopienzahlen der untersuchten epiphytischen Mikroorganismen-Gruppen von Eichen, die am Berg untersucht wurden [Berg UV-, Berg UV+], mit den von Eichen im Tal [Tal UV-, Tal UV+, Tal Freiland] ermittelten Werten verglichen. Kopienzahlen von Eubakterien und Mehltau sowie Zellzahlen von Denitrifizierern und Bakterien zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede [t-Test und Mann-Whitney U-Test, $p > 0,05$ entsprechend 95 % Vertrauensbereich]. Vereinzelt wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Standorten innerhalb der Kopienzahlen von *Cladosporium spec.*, *Ramularia spec.*, *Erwinia spec.* sowie der mittels MPN-Methodik bestimmten Gesamtzellzahl heterotropher Organismen ermittelt. Die Zellzahlen von Pilzen sowie die mittels Ausplattieren bestimmten Gesamtzellzahlen heterotropher Organismen zeigten in der Vegetationsperiode 2000 zu allen Probennahmeterminen [bzw. in der Vegetationsphase 2001 ab dem zweiten Probennahmetermin] kontinuierlich signifikante Unterschiede [t-Test und Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$ entsprechend 95 % Vertrauensbereich] zwischen beiden Standorten. In der

überwiegenden Anzahl an Untersuchungen wurden sogar hoch signifikante [$p < 0,01$ entsprechend 99 % Vertrauensbereich] bis höchst signifikante [$p < 0,001$ entsprechend 99,9 % Vertrauensbereich] Unterschiede bestimmt. Auch wenn diese Aussagen ebenfalls auf den geringen Stichprobenumfang von vier Proben zurückzuführen sind, so können diese Ergebnisse im Gegensatz zur unklaren Frage eines UV-B Einflusses (4.3.2) als eindeutig angesehen werden, da einerseits die Unterschiede durchgängig in vier oder sogar allen fünf Probennahmeterminen beobachtet wurden und andererseits das Signifikanzniveau sehr hoch war. Über ähnliche Ergebnisse berichten ALWADI und BAKA (2001), die ebenfalls an hoch gelegenen Standorten [1700 – 2000 m ü. NN] niedrigere Zellzahlen als an tiefer gelegenen Standorten [0 – 300 m ü. NN] ermittelten.

Weiter zeigen diese Resultate, daß die Bestimmung der Gesamtzellzahl heterotropher Organismen mittels Ausplattieren genauere Ergebnisse liefert als die Bestimmung mittels MPN-Methodik (4.2.1). Der Vergleich beider Methoden zeigte, daß die beobachteten Schwankungen zwischen den jeweils untersuchten vier unabhängigen Proben bei Verwendung der MPN-Technik deutlich größer waren als bei Untersuchungen der selben Proben mittels Ausplattieren. Es wird vermutet, daß die größeren Schwankungen innerhalb der vier Parallelmessungen den Standorteffekt überlagern. Vergleicht man die Zellzahlen von Pilzen mit den von Mehltau bestimmten Kopienzahlen, so ist auffällig, daß trotz signifikanter Reduzierung der Gesamtpilzzellzahl die Kopienzahl von Mehltaupilzen keine signifikante Veränderung erfährt. Diese Aussage unterstreicht erneut die Vorteile von einer Kombination beider Methoden.

4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden zur Untersuchung epiphytischer Mikroorganismen auf Blattoberflächen der Stieleiche entwickelt. Beide Methoden wurden verglichen und eine erste Untersuchung der Phyllosphäre von Stieleichen durchgeführt.

Ein klarer Einfluß von UV-B Strahlung auf die Mikroorganismen der Blattoberfläche konnte auf der Basis der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht festgestellt werden. Die bisherigen Versuche sprechen zwar für keine signifikante Beeinflussung, jedoch besteht aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ein nicht zu vernachlässigendes Maß an Unsicherheit. Zudem dürfen Unterschiede in den klimatischen Umweltfaktoren verschiedener Jahre [Jahresgänge] nicht unberücksichtigt bleiben. Um die Frage des UV-B Einflusses auf epiphytische Mikroorganismen zu beantworten, sind weitere Untersuchungen erforderlich, die mit einem deutlich größeren Stichprobenumfang durchgeführt werden sollten, um trotz der großen Variabilität zwischen einzelnen Blättern signifikante Aussagen treffen zu können. Vor dem Hintergrund der für die Zukunft erwarteten klimatischen Veränderungen, insbesondere des Anstiegs der UV-B Strahlung (CALDWELL et al., 1998, REUDER et al., 2001, WELLBURN, 1997) ist eine Ergänzung der bisher behandelten UV-B Expositionen [UV-, UV+] um eine Expositionsvariante, welche durch Einsatz von UV-Lampen ein erhöhtes UV-B Strahlungsniveau [UV++] generieren kann, eine vielversprechende Alternative.

Zur Absicherung der bisher gewonnenen Daten ist die Wiederholung der durchgeführten Untersuchungen wünschenswert, um Unterschiede zwischen verschiedenen Jahresgängen [s.o.] zu erkennen. Die Untersuchung von autotrophen Nitrifizierern erscheint mit den entwickelten Methoden nicht sinnvoll, und auch die weitere Untersuchung von heterotrophen Nitrifizierern und Denitrifizierern sollte geändert werden, da in der Vergangenheit für eine statistisch abgesicherte Auswertung zu wenige positive Nachweise erhalten wurden.

Die entwickelten Methoden sind in ihrer Anwendung nicht auf die Stieleiche beschränkt. Eine Vielzahl weiterer Pflanzen kann in analoger Weise untersucht werden. Von Interesse sind weitere, bedeutende Baumarten, wie beispielsweise Buche, Birke oder Pappel, oder aber Nutzpflanzen wie Getreide oder Wein. Je nach Untersuchungsobjekt ist hierfür der Aufbau neuer Real Time PCR-Systeme zur Quantifizierung wirtsspezifischer Pathogene nötig.

Die entwickelte molekularbiologische Methode wurde bisher nur zur Untersuchung von epiphytischen Mikroorganismen der Oberseiten von Stieleichenblättern genutzt, da diese stärker UV-B strahlungsexponiert sind. In analoger Weise kann aber auch die Blattunterseite analysiert werden. Ein Vergleich von Ober- und Unterseite des selben Blattes bietet sich hierbei an.

Bisher wurde eine Untersuchung der Phyllosphäre von Eichenblättern unter quantitativen Gesichtspunkten durchgeführt. Die isolierte DNA epiphytischer Mikroorganismen kann aber in gleicher Weise auch für qualitative Untersuchungen hinsichtlich der Biodiversität der vorkommenden Mikroorganismen verwendet werden. So könnte die Frage, ob abhängig von der UV-B Strahlungsexposition unterschiedliche Arten oder veränderte Häufigkeiten von Arten vorkommen, beantwortet werden.

5 Literatur

- ALEF K. (1991) Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg / Lech
- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- ALWADI H. M., BAKA Z. A. M. (2001) Microorganisms associated with *Withania somnifera* leaves. *Microbiol. Res.* 156: 303-309
- AMANN R. I., LUDWIG W., SCHLEIFER K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169
- ANDREWS J. H., KINKEL L. L., BERBEE F. M., NORDHEIM E. V. (1987) Fungi, leaves and the theory of island biogeography. *Microb. Ecol.* 14: 277-290
- ATLAS R. M., PARKS L. C. (Hrsg.) (1993) Handbook of microbiological media. CRC Press, Boca Raton, USA
- BACH H.-J., TOMANOVA J., SCHLOTTER M., MUNCH J. C. (2002) Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J. Microbiol. Methods* 49: 235-245
- BAKER J. H. (1981) Direct observation and enumeration of microbes on plant surfaces by light microscopy. In: *Microbial ecology of the phylloplane* (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 3-14
- BASHAN Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Advan.* 16: 729-770
- BAST E. (1999) *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- BEATTIE G. A., LINDOW S. E. (1994) Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 192: 1-27
- BERGER D. S. (1976) The sunburning ultraviolet meter: Design and performance. *Photochem. Photobiol.* 24: 587-593
- BIRNBOIM H. C., DOLY J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- BLAKEMAN J. P., ATKINSON P. (1981) Antimicrobial substances associated with the aerial surfaces of plants. In: *Microbial ecology of the phylloplane* (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 245-263

- BLAKEMAN J. P., BRODIE I. D. S. (1976) Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 529-557
- BRAKER G., FESEFELDT A., WITZEL K. P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3769-3775
- BRÜGGEMANN N. (1999) Berechnungen der UV-B Strahlungsniveaus in den Solardomen auf dem Wank (Garmisch-Partenkirchen) im Vergleich zu im Freiland gemessenen Werten. Unveröffentlichte Daten
- BRÜGGEMANN N. (2002) Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung bei Eichen. Dissertation Universität Freiburg (2001), Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts für Atmosphärische Umweltforschung, Band 70
- BRÜGGEMANN N., SCHNITZLER J.-P. (2001) Influence of powdery mildew (*Microspheera alphitoides*) on isoprene biosynthesis and emission of pendunculate oak (*Quercus robur*) leaves. J. Appl. Bot. 75: 91-96
- BRUNEL B., PERISSOL C., FERNANDEZ M., BOEUFGRAS J. M., LE PETIT J. (1994) Occurrence of *Bacillus* species on evergreen oak leaves. FEMS Microbiol. Ecol. 14: 331-342
- BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT [BMVEL] (Hrsg.) (2001) Bericht über den Zustand des Waldes 2001, Ergebnisse des forstlichen Umweltmonitorings
- BUTIN H. (1989) Krankheiten der Wald- und Parkbäume: Diagnose, Biologie, Bekämpfung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- CALDWELL, M. M. (1981) Plant response to solar ultraviolet radiation. In: Encyclopedia of plant physiology, physiological plant ecology. I: Responses to the physical environment (Lange O. L., Nobel P. S., Osmand C. B., Ziegler H., Hrsg.), Band 12 A, Springer-Verlag, Berlin, pp.: 169-197
- CALDWELL M. M., BJÖRN L. O., BORNMAN J. F., FLINT S. D., KULANDAIVELU G., TERAMURA A. H., TEVINI M. (1998) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 46: 40-52
- CARROLL G. C. (1981) Microbial productivity on aerial plant surfaces. In: Microbial ecology of the phylloplane (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 15-46
- CARROLL G. C. (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69: 2-9
- CHAND-GOYAL T., SPOTTS R. A. (1996) Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. Microbiol. Res. 151: 427-432
- CLAY K. (1994) Hereditary symbiosis in the grass genus *Danthonia*. New Phytol. 126: 223-231

- CUTTER E. G. (1976) Aspects of the structure and development of the aerial surfaces of higher plants. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 1-40
- DAUM M. (1999) Einfluß simulierten Stickstoffeintrags auf die N₂O-Flüsse in einem Fichtenwald-Ökosystem und molekularbiologische Charakterisierung daran beteiligter, heterotropher Nitrifizierer. Dissertation Universität Freiburg
- DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28: 350-356
- ELBELTAGY A., NISHIOKA K., SATO T., SUZUKI H., YE B., HAMADA T., ISAWA T., MITSUI H., MINAMISAWA K. (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285-5293
- ENSIKAT H. J., NEINHUIS C., BARTHLOTT W. (2000) Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. *Int. J. Plant Sci.* 161: 143-148
- ERCOLANI G. L. (1991) Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microb. Ecol.* 21: 35-48
- ESSER K. (2000) Kryptogamen 1, Cyanobakterien, Algen, Pilze, Flechten. Dritte überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- FISCHBACH R. J. (2001) Monoterpensynthesen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der Steineiche (*Quercus ilex* L.), Charakterisierung, Klonierung und zeitliche Variabilität. Dissertation Universität Freiburg, Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts für Atmosphärische Umweltforschung, Band 67
- FISCHBACH R. J., ZIMMER W., SCHNITZLER J.-P. (2001) Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.). *Eur. J. Biochem.* 268: 5633-5638.
- FROSSARD R. (1981) Effect of guttation fluids on growth of microorganisms on leaves. In: Microbial ecology of the phylloplane (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 213-225
- GADOURY D. M., SEEM R. C., PEARSON R. C., WILCOX W. F., DUNST R. M. (2001) Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of concord grapes. *Plant Disease* 85: 137-140
- GARCÍA-MARTÍNEZ J., ACINAS S. G., ANTÓN A. I., RODRÍGUEZ-VALERA F. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods* 36: 55-64
- GODFREY B. E. S. (1976) Leachates from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 433-439

- HAHN J. (2000) Langjährige Messung von Stickstoffkonzentrationen in Niederschlägen in Garmisch-Partenkirchen. Persönliche Mitteilung
- HECKER U. (1995) BLV Handbuch Bäume und Sträucher. BLV Verlagsgesellschaft, München
- HELANDER M. L., RANTIO-LEHTIMÄKI A. (1990) Effects of watering and simulated acid rain on quantity of phyllosphere fungi of birch leaves. *Microbiol. Ecol.* 19: 119-125
- HICKMAN M. J., ORSER C. S., WILLIS D. K., LINDOW S. E., PANOPOULOS N. J. (1987) Molecular cloning and biological characterization of the *recA* gene from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 169: 2906-2910
- HIRANO S. S., UPPER C. D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 624-653
- JAQUES M.-A., KINKEL L. L., MORRIS C. E. (1995) Population sizes, immigration and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 899-906
- JAQUES M.-A., MORRIS C. E. (1995) A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 1-14
- JETTER R., SCHÄFFER S. (2001) Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiol.* 126: 1725-1737
- JETTER R., SCHÄFFER S., RIEDERER M. (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L.. *Plant Cell Environ.* 23: 619-628
- JOHNSON K. B., STOCKWELL V. O. (1998) Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 227-248
- JONES K. (1976) Nitrogen fixing bacteria in the canopy of conifers in a temperate forest. In: *Microbiology of aerial plant surfaces* (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 451-463
- KAEBERLEIN T., LEWIS K., EPSTEIN S. S. (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129
- KINKEL L. L. (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 327-347
- KINKEL L. L., ANDREWS J. H., NORDHEIM E. V. (1989a) Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. *Microb. Ecol.* 18: 45-58
- KINKEL L. L., ANDREWS J. H., NORDHEIM E. V. (1989b) Microbial introductions to apple leaves: Influences of altered immigration on fungal community dynamics. *Microb. Ecol.* 18: 161-173

- KNOLL D., SCHREIBER L. (1998) Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: Wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytol.* 140: 271-282
- KÖPKE P. (2000) Auswirkungen atmosphärischer Spurenstoffe auf Strahlung und Klima. In: Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie, Band 1B, Atmosphäre: Aerosol/Multiphasenchemie, Ausbreitung und Deposition von Spurenstoffen, Auswirkungen auf Strahlung und Klima (Guderian, R., Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin
- KUNOH H. (1981) Early stages of infection process of *Erysiphe graminis* on barley and wheat. In: Microbial ecology of the phylloplane (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 85-101
- LEPP N. W., FAIRFAX J. A. W. (1976) The role of acid rain as a regulator of foliar nutrient uptake and loss. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 107-118
- LEVEAU J. H. J., LINDOW S. E. (2001) Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3446-3453
- LIN C., BOLSEN K. K., BRENT B. E., HART R. A., DICKERSON J. T., FEYERHERM A. M., AIMUTIS W. R. (1992) Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *J. Dairy Sci.* 75: 2484-2493
- MAYER B. (1997) Messung und Modellierung der spektralen UV-B Bestrahlungsstärke in Garmisch-Partenkirchen. Dissertation, Technische Universität München, Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts für Atmosphärische Umweltforschung, Band 45
- MAYRHOFER S. (2002) Laufende Dissertation, unveröffentlichte Daten
- MCKINLEY A. F., DIFFEY B. L. (1987) A reference spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. In: Human exposure to ultraviolet radiation: Risks and regulations (Passchier W., Bosnjakovic B. F., Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, Niederlande, pp.: 83-87
- MERCIER J., LINDOW S. E. (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 369-374
- MOBARRY B. K., WAGNER M., URBAIN V., RITTMANN B. E., STAHL D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2156-2162
- MORRIS C. E., MONIER J.-M., JACQUES M.-A. (1998) A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4789-4795
- NEWSHAM K. K., LOW M. N. R., MCLEOD A. R., GREENSLADE P. D., EMMETT B. A. (1997) Ultraviolet-B radiation influences the abundance and distribution of phylloplane fungi on pedunculate oak (*Quercus robur*). *New Phytol.* 136: 287-297

- NEWSHAM K. K., OXBOROUGH K., WHITE R., GREENSLADE P. D., MCLEOD A. R. (2000) UV-B radiation constrains the photosynthesis of *Quercus robur* through impacts on the abundance of *Microsphaera alphitoides*. *Forest Pathol.* 30: 265-275
- PANTEN H. (1998) Untersuchungen zur Wirkung von UV-B-Strahlung, Ozon und Bodentrockenheit auf Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.). Dissertation Universität Bremen, Schriftenreihe des Fraunhofer Instituts für Atmosphärische Umweltforschung, Band 52
- PAPEN H., GEBLER A., ZUMBUSCH E., RENNENBERG H. (2002) Chemolithoautotrophic nitrifiers in the phyllosphere of a spruce ecosystem receiving high atmospheric nitrogen input. *Curr. Microbiol.* 44: 56-60
- PAPEN H., VON BERG R. (1998) A most probable number (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant Soil* 199: 123-130
- PAPEN H., VON BERG R., HELLMANN B., RENNENBERG H. (1991) Einfluß von saurer Beregnung und Kalkung auf chemolithotrophe und heterotrophe Nitrifikation in Böden des Höglwaldes. *Forstwiss. Forsch.* 39: 111-116
- PARBERY I. H., BROWN J. F., BOFINGER V. J. (1981) Statistical methods in the analysis of phylloplane populations. In: *Microbial ecology of the phylloplane* (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 47-65
- PAUL N. D. (2000) Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. *Environ. Polut.* 108: 343-355
- PEARSON W. R., LIPMAN D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448
- PEROMBELON M. C. M. (1981) The ecology of *Erwinias* on aerial plant surfaces. In: *Microbial ecology of the phylloplane* (Blakeman J. P., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 411-431
- PÉRISSOL C., ROUX M., LE PETIT J. (1993) Succession of bacteria attached to evergreen oak leaf surfaces. *Eur. J. Soil Biol.* 29: 167-176
- POPLAWSKY A. R., CHUN W. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 466-475
- REUDER J., DAMERIS M., KÖPKE P. (2001) Future UV radiation in central Europe modelled from ozone scenarios. *J. Phytochem. Phytobiol.* B 61: 94-105
- ROZEMA J., BJÖRN L. O., BORNMAN J. F., GABERSCIK A., HÄDER D.-P., TROST T., GERM M., KLISCH M., GRÖNIGER A., SINHA R. P., LEBERT M., HE Y.-Y., BUFFONI-HALL R., DE BAKKER N. V. J., VAN DE STAAL J., MEIJKAMP B. B. (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 66: 2-12
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. Zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

- SCHLEGEL H. G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Siebte überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- SCHLOTER M., WIEHE W., ASSMUS B., STEINDL H., BECKE H., HÖFLICH G., HARTMANN A. (1997) Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2038-2046
- SCHNITZLER J.-P., LANGEBARTELS C., HELLER W., LIU J., LIPPERT M., DÖHRING T., BAHNWEIG G., SANDERMANN H. (1999) Ameliorating effect of UV-B radiation on the response of Norway spruce and Scots pine to ambient ozone concentrations. Global Change Biol. 5: 83-94
- SCHREIBER L., SCHEINPFLUG Y. (2000) Entwicklung einer verbesserten Methode zur Ablösung der epikutikularen Wachsschicht von Blattoberflächen. Persönliche Mitteilung
- SINIGALLIANO C. D., KUHN D. N., JONES R. D. (1995) Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2702-2706
- SKIDMORE A. M. (1976) Interactions in relation to biological control of plant pathogens. In: Microbiology of aerial plant surfaces (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 507-528
- SNOEIJERS S. S., PÉREZ-GARCÍA A., JOOSTEN M. H. A. J., DE WIT P. J. G. M. (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. Eur. J. Plant Pathol. 106: 493-506
- SOLAR LIGHT COMPANY (Hrsg.) Handbuch für UV Biometer 501. Philadelphia, USA
- STADLER B., MÜLLER T. (2000) Effects of aphids and moth caterpillars on epiphytic microorganisms in canopies of forest trees. Can. J. For. Res. 30: 631-638
- STARMER W. T., LACHANCE M.-A., PHAFF H. J. (1987) A comparison of yeast communities found in necrotic tissue of cladodes and fruits of *Opuntia stricta* on islands in the Caribbean sea and where introduced into Australia. Microbiol. Ecol. 14: 179-192
- STRASBURGER E. (Begründer), NOLL F. (Begr.), SCHENCK H. (Begr.), SCHIMPER A. F. W. (Begr.), SITTE P., ZIEGLER H., EHRENDORFER F., BRESINSKY A. (1998) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- STRYER L. (1996) Biochemie. Vierte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- SUNDIN G. W., MURILLO J. (1999) Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *rulAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290-320 nm) radiation and distribution of *rulAB* among *P. syringae* pathovars. Environ. Microbiol. 1: 75-87
- SULLIVAN R. F., WHITE J. F. JR. (2000) *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. Appl. Environ. Microbiol. 66: 425-427

- THOMPSON I. P., BAILEY M. J., FENLON J. S., FERMOR T. R., LILLEY A. K., LYNCH J. M., MCCORMACK P. J., MCQUILKEN M. P., PURDY K. J., RAINEY P. B., WHIPPS J. M. (1993) Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Soil* 150: 177-191
- TOMBOLINI R., VAN DER GAAG D. J., GERHARDSON B., JANSSON J. K. (1999) Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3674-3680
- TOTH I. K., HYMAN L. J., WOOD J. R. (1999) A one step PCR-based method for detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *J. Appl. Microbiol.* 87: 158-166
- TUVESON R. W., LARSON R. A., KAGAN J. (1988) Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. *J. Bacteriol.* 170: 4675-4680
- VÖLKSCH B., MAY R. (2001) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microbiol. Ecol.* 41: 132-139
- WARREN R. C. (1976) Microbes associated with buds and leaves: Some recent investigations on deciduous trees. In: *Microbiology of aerial plant surfaces* (Dickinson C. H., Preece T. F., Hrsg.), Academic Press, London, UK, pp.: 361-374
- WATNICK P., KOLTER R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182: 2675-2679
- WELLBURN A. R. (1997) *Luftverschmutzung und Klimaänderung: Auswirkungen auf Flora, Fauna und Mensch.* Springer-Verlag, Berlin
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Hrsg.) Academic Press, London, UK, pp.: 315-322
- WILSON M., HIRANO S. S., LINDOW S. E. (1999) Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1435-1443
- WILSON M., LINDOW S. E. (1992) Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3908-3913
- ZINSER C., JUNGBLUT T., HELLER W., SEIDLITZ H. K., SCHNITZLER J.-P., ERNST D., SANDERMANN H. JR. (2000) The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Environ.* 23: 975-982