



Bedeutung und Charakterisierung der bakteriellen Flora in *Vitis vinifera* mit und ohne Wurzelhalsgallen

Significance and Characterization of the bacterial community in *Vitis vinifera* with and without crown galls

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Integrative Biologie

vorgelegt von

Hanna Faist

aus

Würzburg

Würzburg 2017

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller

1. Betreuer: Dr. Rosalia Deeken

2. Betreuer: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

3. Betreuer: Dr. Alexander Keller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung -----	5
1.1. Virulente <i>Agrobacteria</i> verursachen Wurzelhalsgallen, die sogenannte Wurzelhalsgallenerkrankung beim Rebstock -----	5
1.2. Gewebeaufbau und Nährstoffgehalt gesunder und erkrankter Rebstöcke --	8
1.3. Die mikrobielle Flora in Rebstöcken -----	12
1.4. Ökonomische Bedeutung der Wurzelhalsgallenerkrankung -----	17
1.5. Zielsetzung -----	21
2. Material und Methoden -----	23
2.1. Probeentnahme im Weinberg -----	23
2.2. Arbeiten mit Bakterien -----	24
2.2.1. Isolierung von Bakterien aus Weinbergmaterial-----	24
2.2.2. Bezogene Bakterienstämme -----	25
2.2.3. Glycerinstocks und Lagerung -----	25
2.2.4. Interaktionsuntersuchungen auf Festmedien -----	26
2.3. Arbeiten mit <i>in vitro</i> kultivierten Weinplänzchen -----	26
2.4. Arbeiten mit DNA -----	27
2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion mit einer Bakterienkolonie -----	27
2.4.2. Vorbereitung und Auswertung der Sangersequenzierungen -----	29
2.4.3. Amplikonsequenzierung-----	31
2.4.4. Genomsequenzierungen -----	36
2.5. Zwei-Photonen-konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie -----	38

3. Ergebnisse	41
3.1. Identifizierung und Charakterisierung von Bakterienisolaten aus Rebstöcken der Region Unterfranken	41
3.2. Die Bakterienflora der Rebstöcke mit und ohne Wurzelhalsgallen	48
3.2.1. Die Probeentnahmestellen beeinflussen die bakterielle Flora	50
3.2.2. Bakterielle Diversität der jeweiligen Probeentnahmestellen	53
3.2.3. Jahreszeiten beeinflussen die Bakterienflora	55
3.2.4. Die Bakterienflora wird an der Pfropfstelle deutlich von der Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflusst	58
3.2.5. Bakterielle Diversität in Pfropfstellen mit und ohne Wurzelhalsgallenerkrankung	60
3.3. Für die Bildung von Wurzelhalsgallen werden nur virulente <i>Agrobacteria</i> benötigt	66
3.4. Lokalisation von <i>Agrobacterium</i> im Tumorgewebe von Weinpflanzen	68
4. Diskussion	75
4.1. Die bakterielle Flora von Rebstöcken ist organspezifisch und wird von den Jahreszeiten beeinflusst	75
4.2. <i>Agrobacterium vitis</i> induziert eine ökologische Nische, die Wurzelhalsgalle	78
4.3. Die Wurzelhalsgalle beherbergt zusätzlich zu <i>Agrobacterium vitis</i> eine spezifische Bakterienflora	81
4.4. Multiple Interaktionsprozesse in der Wurzelhalsgalle	85
4.5. Schlussfolgerung: Das ökologische Gleichgewicht in der Wurzelhalsgalle ..	91
5. Zusammenfassung	95
6. Summary	99

7. Literaturverzeichnis -----	101
8. Anhang -----	119
8.1. Ergebnisse der Sangersequenzierungen -----	119
8.1.1. V4-Region der Rhizobiaceae-----	119
8.1.2. V4-Region der Weinbergisolat ohne Rhizobiaceae-----	124
8.2. Bakterienkollektion und Identifikation mittels BLAST -----	129
8.3. Lokalisation von virulenten <i>A. tumefaciens</i> -----	131
8.3.1. TCSPC-Diagramm zur Berechnung der Lebensdauer der Fluorophore-----	131
8.3.2. Werte der FLIM-Messungen-----	132
8.3.3. Tumorgewebe mit virulenten <i>A. tumefaciens</i> ohne GFP-Markierung-----	133
8.3.4. GFP-markierte, virulente <i>A. tumefaciens</i> am äußeren Bereich des Tumorgewebes---	134
8.3.5. GFP-markierte, virulente <i>A. tumefaciens</i> in kontrastreichen Gewebe-----	135
8.3.6. GFP-markierte, virulente <i>A. tumefaciens</i> in Leitgefäßen-----	137
8.4. Abbildungsverzeichnis -----	138
8.5. Abkürzungsverzeichnis -----	140
Lebenslauf -----	144
Publikationen -----	147
Danksagung -----	148
Eidesstattliche Erklärung -----	151

1. Einleitung

1.1. Virulente *Agrobacteria* verursachen Wurzelhalsgallen, die sogenannte Wurzelhalsgallenerkrankung beim Rebstock

Seit über 100 Jahren ist bekannt, dass virulente *Agrobacteria* an Pflanzen Tumore erzeugen [1]. Die Erreger wurden aus Tumoren an der Wurzel, am Wurzelhals und Ästen von Sträuchern [2], Bäumen [3, 4] und einjährigen Pflanzen [1, 5, 6] isoliert. Induzieren virulente *Agrobacteria* am Wurzelhals des Rebstocks einen Wurzelhalsgallentumor, wird die Erkrankung Mauke genannt. Die Wurzelhalsgallenerkrankung kommt global in Rebstöcken vor (Europa [7-10], inklusive der Türkei [11] und Russland [12], Nordamerika [13], Asien [14], Australien [15] und Afrika [16]).

Jungpflanzen in Weinanlagen sind besonders gefährdet. Sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Rebsorten: einer Unterlage, die gegen Schädlinge wie die Reblaus schützt und dem Edelreiser, der die gewünschten positiven Eigenschaften einer Rebsorte mitbringt. Ein Wundkallus am Wurzelhals, die sogenannte Pfropfstelle (**Abbildung 1A**), verbindet die beiden Rebsorten. Rebstöcke, die an Mauke erkrankt sind, weisen an der Pfropfstelle eine Wurzelhalsgalle auf (**Abbildung 1B, C**). Diese zeichnet sich durch einen vergrößerten Durchmesser des Stammes und durch eine raue Oberfläche mit Knötchen aus. Bei sehr großen Tumoren kann das Leitgewebe die Pflanze nicht mehr versorgen, wodurch diese vertrocknet (**Abbildung 1C**, [17, 18]).

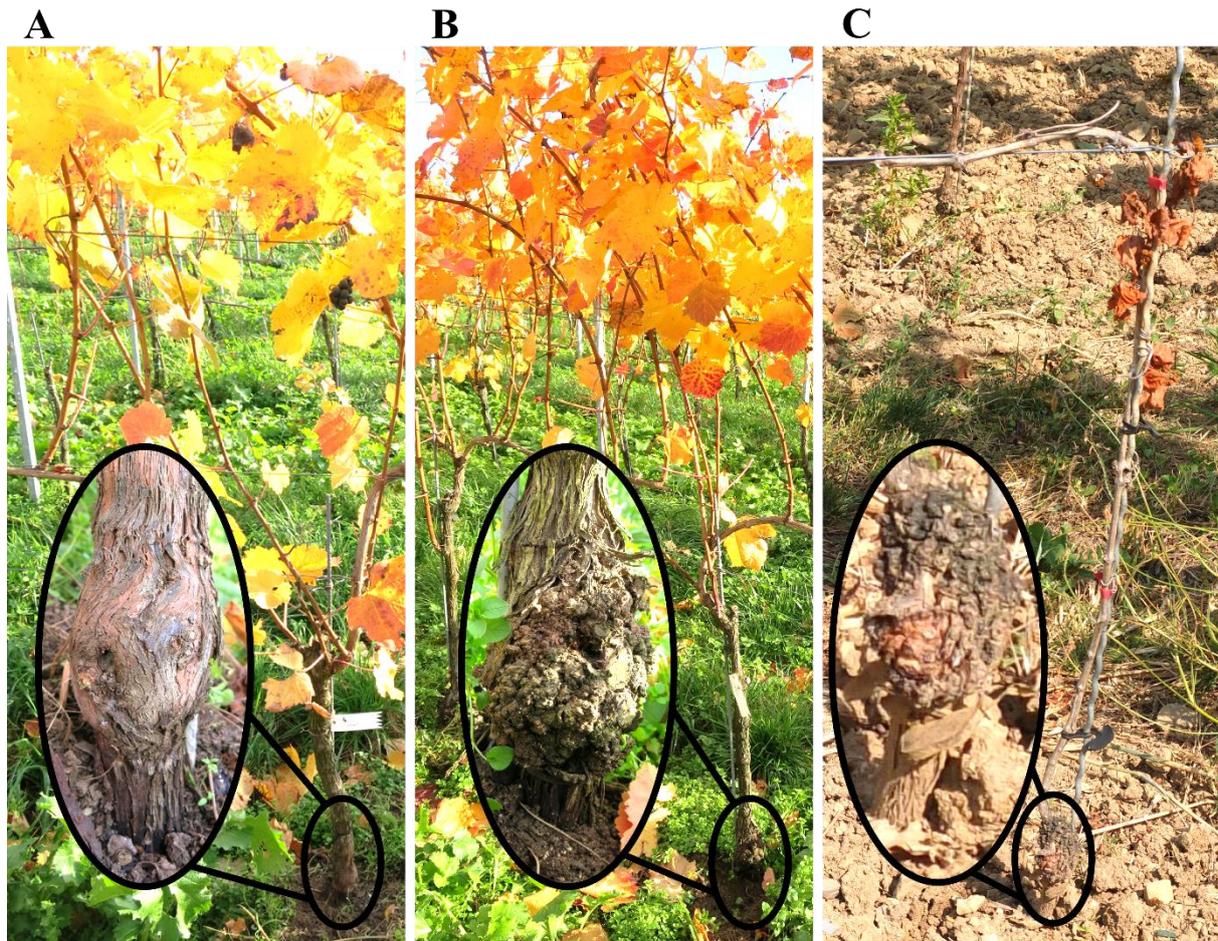


Abbildung 1 Drei Rebstöcke in Weinbergen bei Himmelstadt (A+B) und Veitshöchheim (C) in Unterfranken, Deutschland. Bei den Rebstöcken ist jeweils die Pfropfstelle schwarz eingekreist und vergrößert dargestellt. In (A) handelt es sich um eine gesunde Pfropfstelle. In (B) und (C) zeugen ein vergrößerter Stammumfang und die Knötchen an der Pfropfstelle vom Tumorwachstum. Der Rebstock in (C) ist vertrocknet.

Zur Infektion der Rebstöcke müssen virulente *Agrobacteria* zunächst die mechanische Barriere des Rebstocks, die intakte Epidermis bzw. Borke, überwinden. Drei Infektionswege werden diskutiert: i) über den Boden [19, 20], ii) über die Pflanzenoberfläche [21, 22] und iii) durch kontaminiertes Vermehrungsmaterial [23-25]. Jäger et al. 1989 stellten fest, dass die Häufigkeit der Wurzelhalsgallenerkrankung mit der Herkunft des Mutterstocks zusammenhängt. Dies deutet auf eine Vermehrung über kontaminiertes Pflanzenmaterial hin. Da jedoch virulente *Agrobacteria* auch in wilden Rebstöcken gefunden wurden, kann kontaminiertes Vermehrungsmaterial der Rebschulen nicht die einzige Erregerquelle sein [21,

26]. Virulente *Agrobacteria* wurden in der Wurzel, in der Wurzelhalsgalle und im Saft der Triebe detektiert [8, 24, 27], weshalb sie sich über das Xylem im Rebstock ausbreiten könnten [28]. Ein nur geringer Anteil an pathogenen *Agrobacteria* im Boden (5 von 244 *Agrobacteria*-Isolaten [27]) spricht gegen den Boden als Infektionsquelle. Die Konzentration der pathogenen *Agrobacteria* ist im Tumor am höchsten [29]. Versuche zu epiphytischen Infektionen sind nicht bekannt, es wurde lediglich das Vorkommen von *Agrobacteria* in der Phyllosphäre nachgewiesen [21, 22]. Somit ist umstritten, wie virulente *Agrobacteria* in den Rebstock gelangen.

An der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurde der molekulare Mechanismus der Infektion und Transformation untersucht. Virulente *Agrobacteria* können über einen membran-gebundenen Sensor (VirA) Phenole und Monosaccharide in einer sauren pH-Umgebung als Anzeichen einer Pflanzenwunde detektieren [30, 31], woraufhin sie chemotaktisch in Richtung der Wunde dirigiert werden [32] und die Expression der Vir-Gene induzieren [33]. Die Wunde erlaubt das Eindringen in die Zellwand und das Bakterium nimmt über Pili Kontakt mit der Plasmamembran der Zelle auf [34]. Über ein Typ-IV-Sekretionssystem werden die Transfer-DNA (T-DNA) als Einzelstrang und Vir-Proteine in die Pflanzenzelle eingeschleust [35]. Vom Zytoplasma wird die T-DNA in den Zellkern transportiert und stabil in das Pflanzengenom integriert [35, 36]. Die Expression der auf der T-DNA kodierten bakteriellen Onkogene, unter anderen *iaaM*, *iaaH* und *ipt*, führt zum Tumorwachstum [37-40]. Die Tryptophanmonooxygenase (*iaaM*) und Indole-3-acetamide-Hydrolase (*iaaH*) sind an der Synthese von Auxin, beziehungsweise die Isopentyl-Transferase (*ipt*) an der Synthese von Zytokinin, beteiligt [41, 42]. Ist nur das Gen für die Zytokininsynthese auf der T-DNA enthalten, entstehen Tumore mit Sprossen (*tms*, *tumour morphology stem*),

wohingegen Wurzeln in Gegenwart von Auxin (tmr, *tumour morphology root*) differenzieren [43]. Die tumorartige Vermehrung der Pflanzenzellen ist unabhängig von der Präsenz des Bakteriums [6]. Neben dem Tumorwachstum führt die Expression der T-DNA-kodierten Gene, Octopinsynthese (ocs) und Nopalinsynthese (nos), zur Produktion von Opinen, die insbesondere virulenten *Agrobacteria* als Nahrungsquelle dienen [44]. *Agrobacteria* erschaffen sich mit dem Wurzelhalsgallentumor eine biologische Nische in der Pflanze.

1.2. Gewebeaufbau und Nährstoffgehalt gesunder und erkrankter Rebstöcke

In Querschnitten von Stämmen junger Rebstöcke gibt es offene kollaterale Leitbündel, parenchymatische Stärkezellen, Phloemfasern, vaskuläres Kambium, Xylemgefäße und Strahlenparenchym (**Abbildung 2A**). Werden Querschnitte von Rebstocktrieben mit virulenten *A. vitis* inokuliert, so sind diese während der ersten 48 Stunden in Xylemgefäßen zu finden [45]. Später ist die Anzahl an Bakterien im Xylem reduziert und nach 120 Stunden dort nicht mehr detektierbar [34, 45]. Zeitgleich hat sich erstes Tumorgewebe entwickelt (**Abbildung 2B**, [45]). Der Tumor, in dem sich Phloemfasern befinden, besteht überwiegend aus Parenchymzellen, die in gesunden jungen Rebstockstämmen die Leitbündel abschließen (**Abbildung 2**, [34]). Bei *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Ricinus communis* und *Vitis vinifera* wies der Tumor eine defekte Epidermis und keine intakte Kutikula auf [46]. Der daraus resultierende erhöhte Wasserverlust, beispielsweise bei *Ricinus communis* [17], und eine erhöhte ABA-Konzentrationen im Tumor [47, 48] zeigen Trockenstress an, obwohl ein erhöhter Wassertransport in den Tumor stattfindet [17, 49]. Dank neuer Leitgefäße im Tumor, die mit dem vaskulären System der Pflanze verbunden sind

(*Helianthus annuus*: [50], *Ricinus communis*: [51], *Vitis vinifera* [52], *Arabidopsis thaliana* [53]), ist der erhöhte Wasserverlust gleichzeitig die Triebkraft des Nährstofftransports in den Tumor. Der 35 Tage alte Tumor an *Arabidopsis thaliana* enthält im Vergleich zum Stängel mehr Kohlenhydrate in Form von Glucose und Saccharose, aber nicht in Form von Stärke [46, 54]. Aminosäuren, Opine und anorganische Ionen (Sulfate, Phosphate und Chloride, aber nicht Nitrate) liegen ebenfalls im Tumor in erhöhten Mengen vor [46].

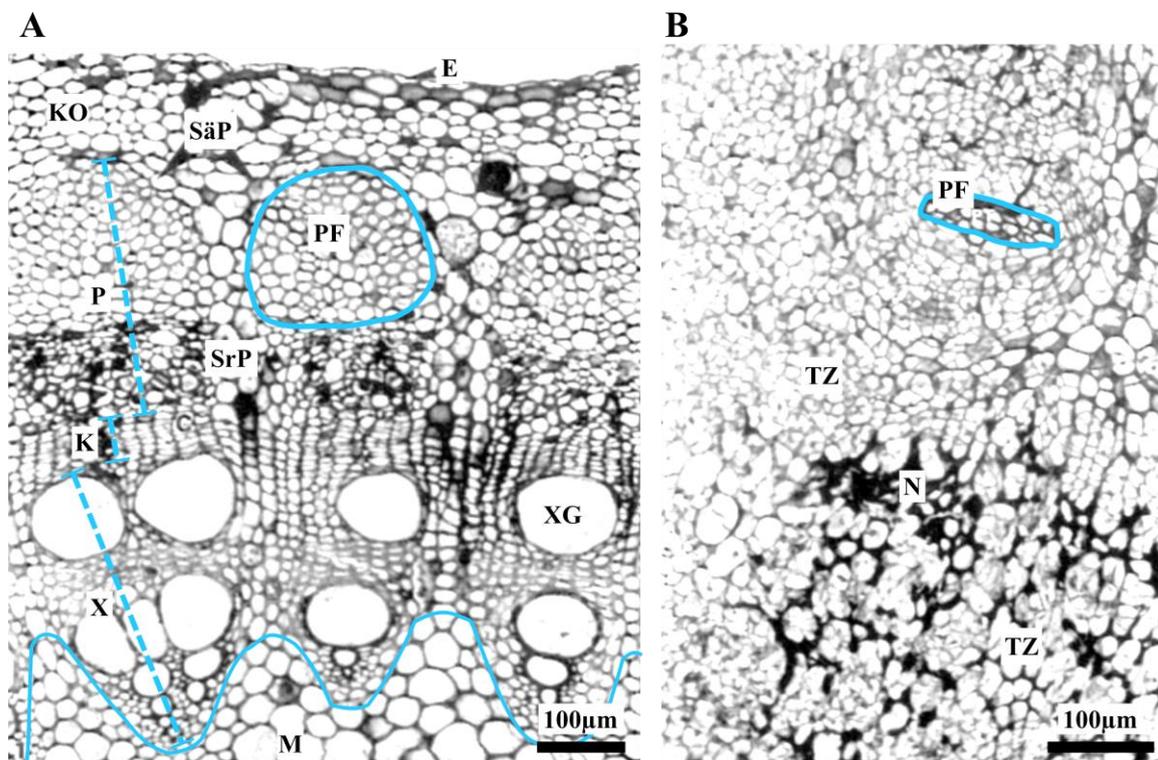
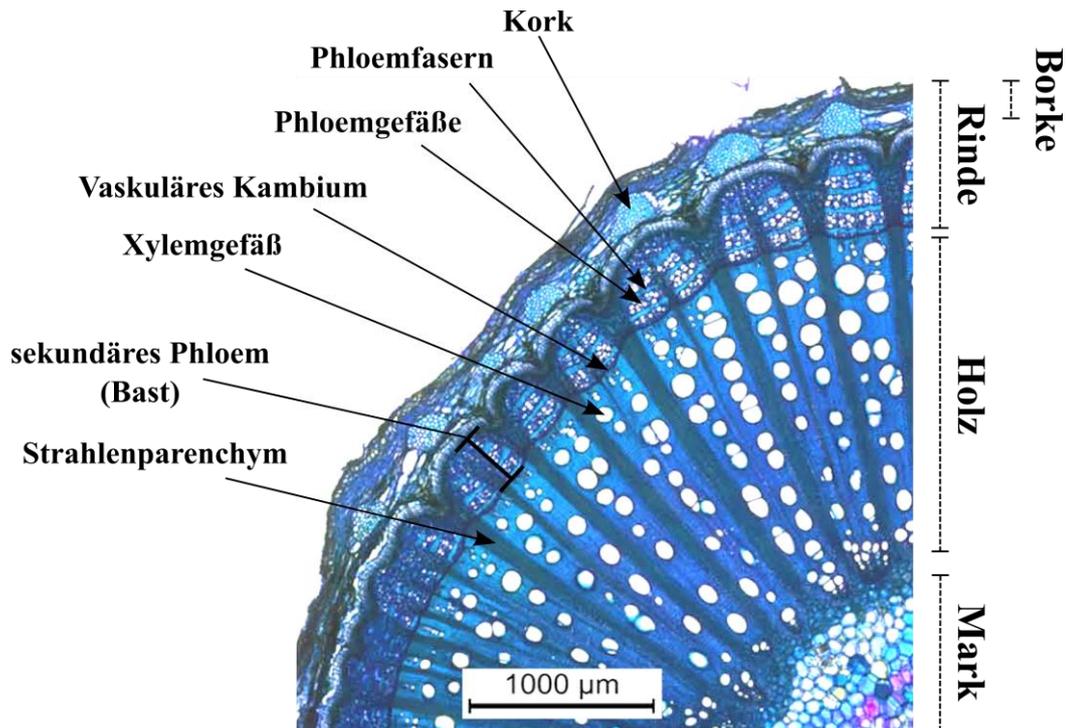


Abbildung 2 Gewebeanordnung in Sprossquerschnitten von Rebstocktrieben. (A) Rebstockgewebe vor der Infektion und (B) 120 h nach der Infektion. Triebstücke von zirka 1 cm Länge wurden auf Agarplatten mit einer Suspension von virulenten *A. vitis* angezogen. In (A) sind Markgewebe (abgegrenzt durch blaue Linie, M), das Xylem (X), Xylemgefäße (XG), Kambium (K), Phloem (P), Phloemfasern (eingekreist, PF) sowie Kortex (KO), Stärkeparenchymzellen (SäP), Strahlenparenchymzellen (SrP) und die Epidermis (E) zu sehen. In (B) sind die Phloemfasern (PF) von den Tumorzellen (TZ) eingequetscht und nekrotische Stellen (N) treten auf. Der Größenstandard wurde mittels eigener Aufnahmen anhand der Phloemfasern geschätzt. Mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier verändert nach [45]

Die Wurzelhalsgalle zeichnet sich dementsprechend durch einen erhöhten Nährstoffgehalt trotz niedriger Photosyntheseaktivität (niedrigere Expression von Genen involviert in Photosynthese und eine reduzierte Anzahl an Chloroplasten) aus. Die heterotrophe Energiegewinnung und ein niedriger Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) in der Wurzelhalsgalle [46] sind Kennzeichen eines Verbrauchsgewebes. Bei gesunden Rebstöcken dient der Stamm als Speichergewebe [55]. Die Gewebe im Rebstockstamm sind von innen nach außen wie folgt angeordnet: Mark, Holzgewebe (Xylem) und Rinde (**Abbildung 3**). Zwischen dem Holzgewebe und der Rinde befindet sich das vaskuläre Kambium, ein teilungsaktives Gewebe, das sekundäres Dickenwachstum durch die Produktion von (i) Xylemgewebe zur Stammmitte und (ii) Phloemgewebe zur Stammoberfläche ermöglicht. Durch die kontinuierliche Produktion von Xylem in die Stammmitte wandert das vaskuläre Kambium an den äußeren Rand. Die Rinde umfasst alle Gewebetypen außerhalb des vaskulären Kambiums (**Abbildung 3**, [56]). Sie besteht aus sekundärem Phloem (Bast), Parenchymzellen (Phellogerm), Korkkambium (Phellogen), Kork (Phellem), primärem abgestorbenem Phloem und primärem Stammparenchym. Das sekundäre Phloem wird durch die Neubildung des Periderms, bestehend aus Phellogerm, Phellogen und Phellem, vom primären Phloem getrennt. Die abgestorbene äußerste Korkschicht bis zur Stammoberfläche wird als Borke bezeichnet (**Abbildung 3**). Als Besonderheit gibt es bei *Vitis vinifera* sklerenchymatische Fasern als tangentielle Bänder im Phloem [57]. Nur das Phloemgewebe des Rebstocks in der Nähe des vaskulären Kambiums (1-4 Zellschichten) transportiert Nährstoffe, wohingegen die äußeren Phloemschichten aus toten Zellen bestehen, die kollabiert sind [58].



*Abbildung 3 Gewebetypen beim Stamm von *Vitis vinifera* in der sekundären Wachstumsphase. Der Querschnitt wurde mit Toluidineblau gefärbt. Mit freundlicher Erlaubnis von Philippe E. Rolshausen, verändert nach [59]*

In Stämmen schwankt der Stärke- und Zuckergehalt (Saccharose und reduzierende Zucker) in Abhängigkeit von der Jahreszeit, dies allerdings schwächer als in einjährigen Trieben [55]. Im Winter wird Stärke zu Zucker umgewandelt, es steigt der Zuckergehalt und der Stärkegehalt fällt von November bis Januar. Umgekehrt steigt von Januar bis März der Stärkegehalt und der Zuckergehalt fällt. Der Netto-Kohlenhydratgehalt bleibt gleich, bis auf geringe Atmungsverluste. Nach Beginn der Wurzelaktivität im März fällt der Kohlenhydratgehalt (Stärke und Zucker), da die neuen Triebe und Blattknospen gebildet werden. Die mit den entstandenen Blättern einhergehende erhöhte Photosyntheseleistung erhöht kurzfristig im Mai den Kohlenhydratgehalt. Jedoch wird dann viel Energie für die Entwicklung der Weinbeeren und das Triebwachstum benötigt. Daher ist im Sommer der geringste Kohlenstoffgehalt der gesamten Wachstumsperiode messbar. Ist die Entwicklung der

Triebe Ende Juni und der Beeren Mitte September [60] abgeschlossen, steigt der Kohlenhydratanteil wieder, bis die Blätter im Oktober abgeworfen werden.

1.3. Die mikrobielle Flora in Rebstöcken

Der Rebstock ist ein Holobiont. Das heißt, er bildet mit einer Vielzahl an endophytischen Mikroben eine biologische Einheit. Einen Holobionten charakterisiert, dass i) die Anzahl an mikrobiellen Zellen und die Summe der mikrobiellen genetischen Information oft größer ist als die des Wirts allein, ii) neben dem Genom des Wirts auch die Mikroben und somit deren Gene auf die Nachkommen des Wirts übertragen werden und iii) die Mikroben die Gesundheit, die Entwicklung, die Morphologie und viele weitere Merkmale des Wirts beeinflussen [61].

Die Mikroflora in Weinanlagen wurde in Nordamerika (Kalifornien [62, 63], New York [64]), Südamerika (Argentinien [65]), Europa (Österreich [66], Deutschland [67], Italien [68, 69], Frankreich [64], Portugal [70]) und Afrika (Tunesien und Ägypten [71]) untersucht. Die Methoden zur Detektion, Identifizierung und Klassifizierung der Bakterien werden in kultivierungsabhängige und -unabhängige Methoden eingeteilt. Die kultivierungsabhängigen Methoden basieren auf der Isolation von Bakterien mittels Nährmedien. Für kultivierungsunabhängige Analysen wird die DNA aus Umweltproben isoliert. Diese komplexe DNA wird in PCRs mit Primern für bakterientaxonspezifische Gene [65, 69] oder für Haushaltsgene eingesetzt. Bei dem 16S-rRNA-Gen, das die Proteinbiosynthese ermöglicht, handelt es sich um ein typisches Haushaltsgen, das häufig zur Klassifizierung von Bakterien verwendet wird. Die Diversität des PCR-Produkts des Haushaltsgens spiegelt die

Diversität der Mikroflora wieder. Diese Diversität kann zum Beispiel mit Hilfe von denaturierenden Gradienten in der Gelelektrophorese [65], Sangersequenzierungen [22, 71] oder Hochdurchsatzsequenzierungen [62, 64, 66-68, 70] untersucht werden. Es wurden endophytische und epiphytische Bakterien mittels dieser Methoden untersucht. Endophyten sind Bakterien, welche einen Teil oder ihren gesamten Lebenszyklus in der Pflanze verbringen. Epiphyten hingegen verbringen einen Teil oder ihren gesamten Lebenszyklus auf der Pflanzenoberfläche. Bakterien, die von außen in die Pflanze eindringen, sind somit zunächst Epiphyten und später Endophyten.

Der Standort des Rebstocks prägt die Mikroflora des Bodens [64], der Rhizosphäre [65], der Wurzeln [64], der Blätter [64, 68], der Weinbeeren [64] und des Mosts [62, 63]. Die Unterschiede in der Mikroflora verschiedener Standorte werden auf das Klima [63], die Rebstocksorte [63] und edaphische Faktoren [64, 65] zurückgeführt. Innerhalb eines Standorts haben die Probeentnahmestelle [22, 64], der Probeentnahmezeitpunkt [64, 69, 70] und Pflanzenkrankheiten [69] einen Einfluss auf die Mikroflora der Weinanlage. Der Faktor Probeentnahmezeitpunkt ist geprägt durch die Temperatur und die Feuchtigkeit [64] sowie die Wachstumsphase des Rebstocks. Einen Einfluss haben außerdem die biologisch-dynamische oder konventionelle Kultivierung der Rebstöcke auf die Rhizosphärenmikroflora [65] und die endophytische Triebmikroflora [72], aber kaum auf die Mikroflora der Weinbeeren [67] und Blätter [68]. Untersuchungen einer Weinanlage in Österreich zeigten, dass die Unterschiede in der Rhizosphären- und Wurzelmikroflora maßgeblich von der Pflanzenspezies (Gräser oder Rebstöcke) abhängig waren [66]. Somit sind die Bakterien der Rhizosphäre und die endophytischen Bakterien nicht nur an die Pflanzen, sondern speziell an den Rebstock angepasst. Als Quelle für rebstockspezifische Bakterien gilt die Bodenmikroflora der Weinanlage [64].

Unter den identifizierten Bakterien der Rebstöcke befinden sich kommensale, symbiotische und pathogene Bakterien. Bei höchstens 26 % von 377 getesteten endophytischen Rebstockbakterien handelt es sich um kommensale Bakterien, da sie im Gegensatz zu den restlichen 74 % keine der getesteten Pflanzenwachstum fördernden Eigenschaften wie Phosphatsolubilisierung, Ammoniumproduktion, Produktion von Auxin oder auxinähnlichen Stoffen, von Siderophoren oder Carboxy-methyl-Cellulosen aufweisen [73]. Bakterien, die das Wachstum von Pflanzen fördern werden als „*plant growth promotion bacteria*“ (PGPB) bezeichnet und sind Symbionten. In einer Studie aus Österreich konnten 85 % der endophytischen Bakterienisolate von Wurzeln des Rebstocks über die ACC-(1-aminocyclopropane-1-carboxylate)-Deaminase (ACC) degradieren. ACC ist eine Vorstufe von Ethylen, welches in hohen Konzentrationen das Pflanzenwachstum hemmt [74]. Symbiotisch verhalten sich zwei Vertreter von *Pseudomonas* und ein *Acinetobacter*, die das Rebstockwachstum unter Trockenstress fördern [75]. *Burkholderia phytofirmans* erhöht die Toleranz von Rebstöcken gegenüber Kälte durch die Manipulation des Kohlenhydratmetabolismus [76]. Zudem konnte gezeigt werden, dass 62 % der endophytischen Wurzelbakterien das Rebstockpathogen *Cylindrocarpon destructans* [66], sowie *Burkholderia phytofirmans* den Schimmelpilz *Botrytis cinerea* hemmen [77]. Somit fördern die Mehrheit der bekannten endophytischen Rebstockbakterien das Rebstockwachstum über die Regulation von Pflanzenhormonen, Pathogenabwehr und eine verbesserte Nährstoff- und Wasserversorgung. Beispiele für bakterielles Pathogene beim Rebstock sind der Erreger der Pierce-Krankheit, *Xylella fastidiosa*, der mittels Biofilmen im Xylem überlebt, und virulente *Agrobacteria*, die Verursacher der Wurzelhalsgallenerkrankung [78]. Bei einem Hemmhof-Screening von 851 endophytischen Rebstockbakterien wurden *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas spp* und *Enterobacter agglomerans* als potentielle Biokontrollen für *A. vitis* iden-

tifiziert [79]. In weiterführenden Versuchen beim Ausbringen von Rebstöcken in die Weinanlage konnten zwei unterschiedliche *Pseudomonas* die Tumorbildung verringern [80]. Die Reduzierung des Wurzelhalsgallenwachstums an Rebstöcken durch *Rhanella aquatilis* wird mit einer antibakteriellen Substanz in Verbindung gebracht [81]. Gegensätzlich wurden in Tumoren von Olivenbäumen, induziert durch einen *Pseudomonas*, Bakterien die das Tumorstadium fördern, *Erwinia toletana*, *Pantoea agglomerans* und *Erwinia oleae*, identifiziert, [82].

Diverse virulenten und nicht-virulenten *Agrobacteria* wurden global aus Rebstöcken isoliert. Zunächst wurden zur Beschreibung der *Agrobacteria* phänotypische (zum Beispiel die Einteilung anhand des Krankheitsbilds [83-85]) und später physiologische (Einteilung anhand biochemischer Eigenschaften in Biovare [4, 7, 85]) Merkmale verwendet. In neueren Studien überwiegt die Analyse der Genfunktionen, die mit bestimmten molekularen Merkmalen in Verbindung stehen (zum Beispiel: Tatratgene, Opingene und Virulenzgene). Erfolgt die Einteilung von *Agrobacteria* in Gruppen anhand eines Katalogs von mehreren Merkmalen, kann es Bakterien geben, die Merkmale unterschiedlicher Gruppen vereinen. Die Existenz solcher Mischformen wurde anhand von Isolaten bestätigt [7, 27]. Dies liegt zum einen an der fehlenden Integrität bakterieller Genome, welche die Merkmale kodieren. Eine hohe Vermehrungsrate führt zu vielen Mutationen und Rekombinationsereignissen, zum Beispiel durch mobile Elemente und konjugative Plasmide im Bakteriengenom. Phänotypisch prägende Merkmale sind oft auf Plasmiden kodiert. Diese werden mittels Konjugation von Bakterium zu Bakterium übertragen. So hängt eine nahe Verwandtschaft von den *Agrobacteria* nicht zwangsläufig mit der Fähigkeit zusammen, Tumore zu erzeugen, denn die Virulenz der *Agrobacteria* ist vom tumorinduzierenden Plasmid (Ti-Plasmid) abhängig [86, 87], das nur 5 % des gesamten Genoms ausmacht [88]. Auch die Einteilung der

Ti-Plasmide anhand von Opinklassen hat den Nachteil, dass Opine sehr divers sind. Allein im Rebstocktumor können drei unterschiedliche Opine produziert werden [89] und mindestens fünf weitere in anderen Pflanzen [90-93]. Zudem existieren Mischformen, die mehrere Opinklassen herstellen [94]. Die Opingene umfassen nur einen kleinen Teil des Ti-Plasmids, die restliche Plasmidsequenz variiert zusätzlich [8, 95]. Manche Ti-Plasmide haben mehrere T-DNA Regionen [96]. Opine, die Stoffwechselprodukte der Wurzelhalsgallen, sind ein Quorum-Sensing-Signal [97]. Sie regen die Produktion von diffundierenden N-acyl-L-Homoserinelactonen (AHL) an, welche bereits in Wurzelhalsgallen des Rebstocks detektiert wurden [98]. Da AHLs die Konjugation des Ti-Plasmids induzieren [99, 100], wird in der Anwesenheit von Opinen die Verbreitung des Ti-Plasmids in der *Agrobacterium*-Population gefördert. Dies könnte die Ursache für das geringe Vorkommen von nicht-virulenten Mutanten von ehemals virulenten *Agrobacterium*-Isolaten (0,01 %) in Tumoren verholzter und unverholzter Pflanzenwirte sein [101].

Haushaltsgene sind essentiell für das Überleben des Bakteriums und gelten daher als genetisch konserviert. Untersuchungen der Haushaltsgene *recA* [102] und 16S-RNA [103]) zeigen, dass es sich bei der klassischen Einteilung von *Agrobacteria* in Biovare um eine polyphyletische Gruppe handelt, die gemischte Untergruppen mit den stickstofffixierenden *Rhizobia* bilden. Ein Beweis für die nahe Verwandtschaft war, dass *Agrobacterium tumefaciens* A136 (C58 ohne Ti-Plasmid) mit Teilen des *Rhizobium*-Plasmids zur Stickstofffixierung Wurzelknöllchen induzieren konnte [104]. Somit wurden *Agrobacteria* in die *Rhizobia* eingegliedert [105]. Nah verwandte Bakterien können in einzelnen variablen Merkmalen, wie der Virulenz, stark voneinander abweichen [106].

Um gleichzeitig die Verwandtschaft und die einzelnen Merkmale eines Bakteriums zu kennen, kann das gesamte Genom sequenziert werden. Das erste komplett sequenzierte *Agrobacterium*-Genom stammt von *A. fabrum* C58 (früher *A. tumefaciens*, Biovar 1), einem Isolat aus einem Kirschbaumtumor [107, 108]. Das erste, vollständig sequenzierte virulente *Agrobacterium*-Genom aus einem Rebstock war das von *A. vitis* S4 [109]. Sowohl C58 als auch S4 können an Rebstöcken Wurzelhalsgallen induzieren [8].

Durch nah verwandte Bakterienstämme des Erregers der Wurzelhalsgallenerkrankung wurde besonders häufig eine Verminderung der Wurzelhalsgallenkrankheit in Rebstöcken beobachtet [110]. ARK-1, VAR03-1 und F2/5 sind nicht-virulente *A. vitis*-Stämme aus Japan [111, 112] und Südafrika [113]. Pre- oder ko-inokuliert reduzieren sie die Tumoranzahl an Rebstöcken. Eine Eindämmung der Wurzelhalsgallenkrankheit durch nicht-virulente Stämme mit naher Verwandtschaft zum Pathogen birgt die Gefahr der Entstehung virulenter Hybridstämme durch den spontanen Transfer und die Rekombination der Ti-Plasmide [114].

1.4. Ökonomische Bedeutung der Wurzelhalsgallenerkrankung

An Obst- und Nussbäumen sind Wurzelhalsgallen für Ertragseinbußen verantwortlich [115]. Hohe Schäden an Rebstöcken entstehen, wenn in neu bepflanzten Weinanlagen Tumore auftreten, da die jungen Pflanzen vertrocknen und ersetzt werden müssen (mündliche Mitteilung, P. Schwappach, Landesanstalt für Wein und Gartenbau). Bei älteren Rebstöcken mit einem Tumor gestaltete sich der Nachweis von Ertragseinbußen schwierig. Studien von 1992 (Südfrankreich) und 1988 (USA, Kalifornien) postulieren eine Abhängigkeit

der Ertragseinbußen vom Anteil des Tumors am Stammumfang [116, 117]. Bei den Rebsorten Muscat d'Alexandrie (Südafrika) oder Zinfandel (USA, Kalifornien) mit leicht erkrankten Rebstöcken (Stammumfang des Tumors <30 %, bzw. <50 %) wurde zunächst ein positiver Wachstumstrend, in Form eines größeren Stammumfangs (abgesehen vom Tumor selbst) und höheren Ertrags, festgestellt. Bei einer stärkeren Bedeckung des Stammumfangs durch den Tumor nahmen schließlich der Stammdurchmesser (mit Ausnahme des Tumors), das Gewicht der Triebe und der Beerenertrag der Rebstöcke ab [116, 117]. Im Weinbau wird das Wachstum der Triebe durch jährliches Beschneiden eingeschränkt und durch Trauben- und Beerenreduktion der Ertrag reduziert, um die Qualität dank eines hohen Extraktgehalts in den übrigen Weinbeeren zu gewährleisten [118]. Somit ist für den Weinanbau nicht die Quantität der Beeren sondern deren Qualität entscheidend. Zum Beispiel könnte ein geringerer Zuckergehalt einen geschmacklichen Nachteil des Weines bedeuten, dieser konnte bei der Wurzelhalsgallenerkrankung jedoch nicht nachgewiesen werden [116]. Werden die Triebe von Rebstöcken mit Tumor für die Vermehrung verwendet, bilden die resultierenden Rebstöcke mit einer hohen Wahrscheinlichkeit selbst einen Tumor aus [119]. Da junge Rebstöcke besonders anfällig sind [1], wird den Rebschulen unterstellt trotz Mikrovermehrung infiziertes Pflanzenmaterial zu verkaufen [23, 24]. Bei der Mikrovermehrung werden nur wenige totipotente pflanzliche Zellen genutzt um *in vitro*, also auf Agar-Nährmedien, Rebstöcke zu kultivieren. Die Rebschulen postulieren hingegen eine natürliche Infektion über den kontaminierten Boden. Werden den Winzern die infizierten Jungreben durch die Rebschulen ersetzt, entsteht den Rebschulen ein ökonomischer Schaden. Die Winzer haben durch die Neubepflanzung einen erhöhten Arbeitsaufwand, der auch mit zusätzlichen Kosten verbunden ist. Deshalb haben sowohl Winzer als auch Rebschulen wirtschaftliche Einbußen wegen der Wurzelhalsgallenerkrankung.

Obwohl biotische und abiotische Faktoren den Verlauf der Wurzelhalsgallenkrankheit beeinflussen, werden zur Bekämpfung befallene junge Rebstöcke aus der Weinanlage entfernt und ausgetauscht. Durch das Vermeiden von Verwundungen, die durch Frost, Hagel oder beim Einsatz von Maschinen entstehen, kann die Infektion der Rebstöcke reduziert werden [33, 120]. Es wurde allerdings durch nah verwandte Stämme des Erregers der Wurzelhalsgallenerkrankung besonders häufig eine Kontrolle des Tumorwachstums in Rebstöcken beobachtet [110]. ARK-1, VAR03-1 und F2/5 sind nicht-virulente *A. vitis* Stämme aus Japan [111, 112] und Südafrika [113]. Pre- oder ko-inokuliert reduzieren sie die Tumorzahl an Rebstöcken. ARK-1 reduziert die Menge an virulenten *A. vitis* an der Verwundungsstelle und unterdrückt die Expression von Virulenz-Genen bei *A. vitis* [121]. Der genaue Wirkmechanismus ist bei ARK-1 genauso wie bei VAR03-1 und den meisten anderen Biokontrollen unbekannt [110-112]. Beim *A. vitis* Stamm F2/5 wird vermutet, dass durch die Induktion einer Hypersensitiven Reaktion im Bereich des Kambiums der Transfer der T-DNA verhindert wird, ohne das Bakterium direkt durch Antibiotika zu schädigen [122, 123]. Die Induktion der Nekrose bei Rebstöcken durch F2/5 ist abhängig vom Quorum-Sensing [124]. Zudem spielen Gene, die in die Siderophorbildung involviert sind, eine Rolle bei der Tumorchemmung [125]. Eine Eindämmung der Wurzelhalsgallenkrankheit durch nicht-virulente Stämme mit naher Verwandtschaft zum Pathogen birgt die Gefahr der Entstehung virulenter Hybridstämme durch den spontanen Transfer und die Rekombination der Ti-Plasmide [114].

Der Einsatz von bakteriellen Biokontrollen, chemischen Substanzen, Bodenbegasung und die Züchtung von resistenten Rebstöcken waren unter kontrollierten Bedingungen teilweise erfolgreich, in Feldversuchen jedoch nicht zufriedenstellend [110]. Sobald im Rebstock-

material der Rebschulen virulente *Agrobacteria* detektiert werden, wird das Material entsorgt. Die Detektion des Erregers ist jedoch schwierig. Eine hohe Nachweisgrenze, die Diversität des Pathogens [102] und die systemische Verbreitung von virulenten *Agrobacteria* im gesamten Rebstock [8, 24, 27] erschweren den Nachweis. Johnson et al. entwickelten einen Nachweis für die Wurzelhalsgallenkrankheit im Rebstock mit magnetischen Kügelchen zur Anreicherung von *Agrobacteria*-spezifischer DNA. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 100 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter [13]. Die Möglichkeiten einer Prävention der Wurzelhalsgallenerkrankung sind somit stark begrenzt.

1.5. Zielsetzung

Trotz vielfacher Bemühungen seit über hundert Jahren ist es nicht gelungen die Wurzelhalsgallenerkrankung aus den Weinbergen zu verbannen. Selbst moderne Diagnosemethoden sind auf Grund der Nachweisgrenze, einer hohen Diversität und Mobilität des Erregers nicht in der Lage die Verbreitung der Krankheit zu verhindern. Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Studie die Infektionsökologie der Wurzelhalsgallenkrankheit untersucht, da die Rolle der bakteriellen Gemeinschaft für die Wurzelhalsgallenbildung völlig unbekannt ist. Als Holobiont ist der Rebstock ein Wirt für Mikroben, welche die Gesundheit, die Morphologie, das Wachstum und die Immunität des Rebstocks gegenüber Pathogenen beeinflussen. Zur Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft und Lokalisation des Pathogens in Rebstöcken mit Wurzelhalsgallenerkrankung wurden in dieser Arbeit Methoden, wie i) Genomsequenzierung, ii) kultivierungsunabhängige Hochdurchsatzsequenzierung und iii) Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM) verwendet. Die Rolle der bakteriellen Flora wurde i) mittels Infektionsversuchen an *in vitro* kultivierten Rebstöcken, ii) anhand der bakteriellen Genome von Isolaten und iii) in Interaktionsstudien mit Isolaten untersucht. Durch die Beschränkung der Untersuchungen auf einen Weinberg wurde der Einfluss von überregionalen Faktoren, wie Unterschieden in Bodenfaktoren, Mesoklima und Rebstockpflege, reduziert. Da die Jahreszeiten, geprägt durch unterschiedliche Temperaturen und Luftfeuchte, den Metabolismus des Rebstocks und den Ausbruch der Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflussen, wurden Sommer, Herbst und Winter einer Wachstumsperiode als Untersuchungszeitpunkte gewählt. Unterschiede in der bakteriellen Flora der Rebstöcke (Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Triebe) mit und ohne Tumor könnten die Verbreitung, den Ausbruch und den Verlauf der Krankheit beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Probeentnahme im Weinberg

Vier verschiedene Rebstöcke wurden beprobt. Sie wuchsen in einer Reihe im Abstand von weniger als 22 m und wurden von der Landesanstalt für Garten- und Weinbau in Himmelstadt (Franken, Bayern, Deutschland, 49°55'234.78N, 9°49'05.22E) bewirtschaftet. Die Edelreiser der Sorte Carbanet Dorsa wurden auf die Unterlage SO4 gepfropft und bilden den Rebstock, der im Jahr 2008 in den lehmigen Sand des Weinbergs gesetzt wurde. Die Probeentnahme erfolgte vormittags bei sonnigem und trockenem Wetter am 30. Oktober 2013 (Herbst), 4. April 2014 (Frühling) und 23. Juli 2014 (Sommer). Laut des Deutschen Wetterdienstes betrug an der Station Arnstein-Müdesheim in ungefähr 20 km Entfernung vom Probeentnahmestandort, am Probeentnahmetag zum Probeentnahmezeitpunkt um 11 Uhr i) die Lufttemperatur im Frühling 23,9°C, im Sommer 27,9 °C sowie im Herbst 12,6°C; ii) die Bodentemperatur in 10 cm Tiefe im Frühling 13,4°C, im Sommer 25°C sowie im Herbst 10,3°C, iii) die Bodenfeuchte in der 5-10 cm Schicht im Frühling 28 % nutzbare Feldkapazität (nFK= Wassergehalt des Bodens in Volumenprozent minus des Wassergehalts des Bodens der nicht von der Pflanze genutzt werden kann) im Sommer 77 % nFK sowie im Herbst:79 % nFK iv) die Luftfeuchte in 2 Metern Höhe im Frühling 45 %, im Sommer 37 % und im Herbst 62 %. Vier unterschiedliche Probeentnahmestellen in der Weinanlage wurden beprobt: i) einjähriger Trieb, ii) die Pfropfstelle des Stamms, iii) die Wurzel, iv) der Boden in der Nähe der Wurzel (**Abbildung 8**). Die Pfropfstelle (**Abbildung 1A**) befindet sich 10-20 cm oberhalb des Bodens am Stamm der Rebe. Die Wurzeln wurden nach der Entnahme mit Leitungswasser gewaschen. Das Periderm wurde von allen gesam-

melten Rebstockmaterialen (i-iii) entfernt. Das Material aus dem Weinberg wurde zu gleichen Teilen für die DNA-Extraktion bei -80°C und für die Isolation von Bakterien bei 4°C gelagert.

2.2. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1. Isolierung von Bakterien aus Weinbergmaterial

Bakterien wurden aus den am 30. Oktober 2013 im Weinberg gesammelten Proben vom Boden, von der Wurzel und von der Pfropfstelle isoliert. Die verholzten Rebstockmaterialien wurden in einer Kugelmühle (Retsch, Hannover, Germany) zerkleinert. Zu 300 mg des zerkleinerten Rebstockmaterials oder des Bodens wurde aufgereinigtes Wasser (Rotisol „*high-performance liquid chromatography [HPLC] gradient grade*“; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 28°C wurde aus dem Überstand eine Verdünnungsreihe (1:9, Überstand:aufgereinigtes Wasser) hergestellt. Auf Agarplatten aus YEP-Medium (0.5 % [wt/vol] Trypton, 0.5 % [wt/vol] Hefeextrakt, 0.5 % [wt/vol] Sucrose, 1,23 % [wt/vol] MgSO_4 [AppliChem, Darmstadt, Deutschland], 1,5 % [wt/vol] Agar-Agar-Kobe I [Carl-Roth]) oder LB-Medium (1 % [wt/vol] Trypton, 0,5 % [wt/vol] Hefeextrakt, 1 % [wt/vol] NaCl [AppliChem], 1,5 % [agar-Agar-Kobe I [carl-Roth]) mit dem Fungizid Cycloheximid (CHX, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) in einer Konzentration von $213\ \mu\text{M}$ werden die isolierten Bakterien angezogen. Hierfür wurden $100\ \mu\text{l}$ der Verdünnungsreihen ausplattiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für 5 Tage bei 28°C . Als Kontrolle diente reines Wasser. Die Bakterienisolate wurden auf YEB-CHX oder LB-CHX Platten subkultiviert.

2.2.2. Bezogene Bakterienstämme

Neben den bakteriellen Isolaten dieser Studie wurden folgende *Agrobacteria* verwendet: i) *A. tumefaciens* pJZ383 [126] mit mut3 GFP (Datenbank IGEM: E0040) [127] zur Lokalisation in Wurzelhalsgallen an *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen; ii) *A. sp.* (ehemals *A. tumefaciens*, neuerdings *A. fabrum*) C58 [108] für Genomsequenzvergleiche und als onkogene Kontrolle in Infektionsversuchen; iii) *A. vitis* S4 [109] für Genomsequenzvergleiche und als onkogene Kontrolle in Infektionsversuchen. iv) *A. sp.* GV3101 [128] als virulente, aber nicht-onkogene Kontrolle in Infektionsversuchen.

2.2.3. Glycerinstocks und Lagerung

Bakterielle Isolate wurden mindestens dreimal auf Agarplatten subkultiviert und als Glycerinstock bei -80°C gelagert. Für den Glycerinstock wurde das Pellet von 1 ml Übernachtskultur in 200 µl flüssigem YEB-Medium resuspendiert und nach dem Mischen mit 200 µl Glycerol (40 % [wt/vol]) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Markierung wurde in die Laborgefäße (Plastik, 1,5 ml) der Kyrokultur mit einer Nadel eine Nummer eingeritzt. Diese Nummer wurde zusammen mit der Rebstocknummer, der Probeentnahmestelle entlang der Pflanzenachse (Boden, Wurzel, Pfropfstelle oder einjähriger Trieb), einem Namenskürzel und in Excel Tabellen gespeichert. Die Identität der Bakterien wurde anhand der V4-Region des 16S-rRNA-Gens und für Rhizobiaceae anhand *recA* bestimmt und später in den Excel-Tabellen ergänzt (**Tabelle 1, Anhang Tabelle 1**). 72 Kyrokulturen, deren bakterielle Identität nicht anhand des 16S-rRNA-Gens bestimmt wurde oder welche nicht vom Weinberg in Himmelstadt stammen, sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

2.2.4. Interaktionsuntersuchungen auf Festmedien

Um Interaktionen zwischen Bakterienisolaten *in vitro* nachzuweisen, wurde mit einer Pipette 30 µl einer bakteriellen Suspension (optische Dichte bei 600 nm: 1,0) in die Mitte von Petrischalen (Durchmesser: 94mm) mit YEP-Festmedium gegeben und bei 28 ° C für drei bis fünf Tage inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden auf der Agarplatte mit 5 ml YEP-Flüssigagar versetzt und mit 500 µl einer Nährmedium-Bakteriensuspension (Optische Dichte bei 600nm: 1,0) überschichtet. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten bei 28°C im Brutschrank für weitere drei bis fünf Tage inkubiert. Bildete sich ein Hemmhof, wurde dieser mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert.

2.3. Arbeiten mit *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen

Weintriebe der Sorte 5BB aus dem Jahr 2000 wurden mit einer Node in Stücke geschnitten, oberflächensterilisiert (96 % Ethanol und 6 % Natrium Hypochlorid) und in eine etwa 8x12 cm große Frischhaltebox mit Deckel aus Plastik mit Agar gesetzt. Alle 8-12 Wochen wurden die Weinpflänzchen auf neues Medium umgesetzt. Diese *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen (Rebschule Steinmann, Sommerhausen, Deutschland) wuchsen 14h bei 23°C im Licht (Intensität: $180\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, Lampen: L36W/25, Osram, München, Deutschland) und 10 h bei 21°C im Dunkeln in selbstgebauten Klimaschränken. Für Versuche wurden die Weinpflänzchen bis zu neun Monate in einer Box kultiviert.

Für den Tumorassay wurden *in vitro* kultivierte Weinpflänzchen verwendet. Hierfür wurde eine *Agrobacterium*-Kolonie direkt von der Agarplatte auf eine sterile Nadel aufgenommen. Durch einen Kratzer mit der Nadel an der zweiten oder dritten Internodie der *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen wurden *Agrobacteria* inokuliert. Pro *Agrobacterium*-Isolat wurden mindestens acht Pflänzchen inokuliert, die wöchentlich mindestens acht Wochen lang visuell auf die Entstehung eines Tumors überprüft wurden. Zur Kontrolle wurden das onkogene *A. vitis* S4 [109] und das nicht-onkogene *A. sp* GV3101 [128] inokuliert.

2.4. Arbeiten mit DNA

2.4.1. Polymerase-Kettenreaktion mit einer Bakterienkolonie

Mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die eine Bakterienkolonie als DNA-Template verwendete, konnten selektiv DNA-Abschnitte des bakteriellen Genoms amplifiziert werden.

Folgende DNA-Abschnitte wurden zur Amplifikation verwendet: i) Zwei unterschiedliche Fragmente des universellen 16S-rRNA-Gens wurden amplifiziert und sequenziert, um die Taxonomie der Bakterien zu bestimmen. Das Vorkommen von ii) selektiven *recA*-Abschnitten und iii) *VirD2* im bakteriellen Genom wurde nachgewiesen, um ii) die *Agrobacteria* zu identifizieren und iii) die Präsenz des Ti-Plasmids im bakteriellen Genom nachzuweisen. Folgende Primerpaare wurden verwendet: i) 16S-rRNA-Gen 27F (5'-AGR GTT YGA TYM TGG CTG AG-3') und 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') oder 515F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3') und 806R(5'GGA CTA CNV GGG

TWT CTA AT-3'). ii) *Agrobacterium*-spezifische *recA*-Primer F8360 (5'-AGC TCG GTT CCA ATG AAA-3') und F8361 (5'-GCT TGC GCA GCG CCT GGC T-3'), *A. vitis*-spezifische *recA*-Primer G0004F (5'-GAT ATC GCG CTC GGC ATT GGT-3') und G0005R (5'-CCT TCG ATT TCA GCT TTC G-3') [102]. Und iii) *virD2*-Primer *virD2F* (5'TTG GAA TAT CTG TCC CGG AAG-3') und *virD2R* (5'-CTT GTA CCA GCA GGG AAG CTT A-3') [13].

Für die PCR wurde eine bakterielle Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte in 20 µl Wasser (Rotisolv HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für ungefähr eine Stunde bei 94°C unter Schütteln in einem Heizblock (Thermomixer, Eppendorf, Deutschland) gekocht. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in einer Tischzentrifuge (13.300 Upm, 1 min; Minispin-Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg). Für die PCR-Ansätze wurden 2 µl des Überstandes eingesetzt. Zwei unterschiedliche 50 µl-PCR-Ansätze wurden verwendet: i) 1X HF-Puffer (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), eine experimentell bestimmte Menge an speziell angefertigter Phusion-Polymerase (53), 0,2 µM je Primer und 400 µM dinucleoside triphosphates (dNTPs, Fermentas, Waltham, MA, USA); ii) 1X Dream-Taq-Puffer (1,2 U Dream-Taq-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland), 0,2 µM je Primer und 400µM dNTPs (Fermentas, Waltham, MA, USA).

Im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) wurde die DNA in folgenden Temperaturschritten amplifiziert: i) Initiale-Denaturierung bei 95°C für 5 min; ii) Denaturierung bei 95°C für 30 s, Hybridisierung bei 56°C, für 30 s, Elongation bei 72°C für 60 s. Die Schrittabfolge

von ii) wurde 35-mal wiederholt. iii) Finale-Elongation 72°C, 5 min. iv) Lagerung bei 4°C. Die Hybridisierungstemperatur variierte je nach Primerpaar (SIGMA Aldrich, Darmstadt).

2.4.2. Vorbereitung und Auswertung der Sangersequenzierungen

Die Qualität der PCR-Produkte wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Für die Gele werden 1 % - 3 % (wt/vol) Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris HCl pH-Wert= 8,3, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA-Na₂) aufgekocht, nach zirka 5 min mit 0,04 µl/ml Gel-Green (10000x verdünnt in Wasser; Biotium, Köln) versetzt und in einen Gelträger (Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen. Die PCR-Proben wurden mit einem DNA-Probenpuffer (0,25 % [wt/vol] Bromphenolblau, 0,25 % [wt/vol] Xylen Cyanol FF, 50% [vol/vol] Glycerin, 100µM EDTA) versetzt und aufgetragen. Als Längenstandard diente der Gene-Ruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) oder der Lambda PstI-Marker (Enzymverdau nach Herstellerangaben von Lambda-DNA; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V für 30 - 45 Minuten in 1x TAE-Puffer. Die fluoreszierenden Amplifikationsprodukte im Agarosegel wurden mithilfe einer Geldokumentationskamera (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

Amplifikationsprodukte des 16S-rRNA-Gens wurden nach dem Herstellerprotokoll des QIAquick PCR Purification (250) Kits (QIAGEN, Hilden) isoliert. Für die Sequenzierung wurden die Proben nach Angaben der Firma LGC (Berlin, Deutschland) oder GATC (Konstanz, Deutschland) verdünnt und extern sequenziert.

Die Analyse der Sangersequenzen erfolgte als ab1-Format mit Qualitätsinformation in Geneious 8.1.7 (<https://www.geneious.com>). Alle Sequenzen wurden am 5' und 3' Ende getrimmt, um Bereiche mit geringer Qualität zu verwerfen („*Trim Ends*“: Grenze der Fehlerwahrscheinlichkeit: 5 %). Da die V4-Sequenz, amplifiziert mit den Primern 515F und 806R, eine Teilsequenz des Produkts der Primer 27F und 1492R ist, konnte, trotz unterschiedlich langer Amplifikationsprodukte, eine Konsensus-Sequenz pro Bakterienisolat berechnet werden. Dazu diente das multiple Geneious-Alignment, ein globales Alignment mit kostenfreien Überhängen („*Pairwise/multiple Align*“: Lückenkosten= 12, Kosten für Lückenerweiterung= 3, Kosten für Basenunterschiede= 4, Gewinn bei gleicher Base= 5). Die Konsensus-Sequenz oder eine einzelne getrimmte Sequenz wurde auf die Länge der V4-Region einheitlich gekürzt und mit einem diskontinuierlichen Megablast („BLAST“: Wortgröße= 11, Samengröße= 18, Lückenkosten= 5, Kosten für Lückenerweiterung= 2, Kosten für Basenunterschiede= 3, Gewinn bei gleicher Base= 2) mit der *NCBI-Genomes* (Chromosomen)-Datenbank verglichen. Unterschiede an den beiden Enden des Sequenztemplates waren erlaubt. Der Treffer mit dem höchsten „*Bit-Score*“ wurde zur Identifikation des Bakteriums verwendet. Zusätzlich wurden die Amplikonsequenzen mit der Datenbank der operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) aus der Hochdurchsatzsequenzierung dieser Arbeit verglichen. Der Assembler („*Map to Reference*“, OTU-Referenzsequenzen im Vergleich zu den Sequenzen der Bakterienisolate: höchste Sensitivität, mehrere Treffer waren erlaubt) ordnete Isolate eine OTU-Nummer zu.

2.4.3. Amplikonsequenzierung

DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolation aus verholzten Rebstockmaterialien (**Abbildung 8**) und aus der Infektions- beziehungsweise Verwundungsstelle der *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen (**Abbildung 5**) wurden die Gewebe im gefrorenen Zustand (Kühlung mit flüssigen Stickstoff) in einer Kugelmühle (Retsch, Hannover, Germany) pulverisiert. Die DNA-Isolation aus 300 mg pulverisiertem Rebstockmaterial oder Boden erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „FastDNA SPIN Kit for soil“ (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Als negative Kontrolle dienten DNA-Extraktionen ohne die Zugabe von pulverisiertem Material.

Amplifikation der DNA

Zur Amplifikation der DNA für die Hochdurchsatzsequenzierung wurden die Primer 515F und 806R je am 5′ Ende ergänzt um i) acht Basenpaare, die spezifisch für eine Probe sind, und um ii) Illumina-Adapter, die zur Sequenzierung benötigt werden [129]. Diese modifizierten Primer amplifizierten die variable Region V4 des 16S-rRNA Gens der bakteriellen Flora der Proben aus dem Weinberg oder *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen. Die Sequenz der Primer war: 5′ –AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACX XXX XXX XTA TGG TAA TTG TGT GCC AGC MGC CGC GGT AA -3′ und 5′ –CCA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXX XXX XXAGTC AGT CAG CCG GAC TAC HVG GGT WTC TAA T -3′. XXX XXX XX steht für eine spezifische Abfolge von Basenpaaren je Probe.

Qualitätssicherung der Amplikons

Zur Qualitätssicherung der Amplikons und um zufällige PCR-Effekte zu vermindern, wurden je Probe drei technische Replikate angefertigt [130]. Der 10 µl PCR-Ansatz enthielt 5 µl 2xPhusion *high-fidelity* PCR Puffer inklusive Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA), 0,33 µl je 10 µM Primer-Lösung (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA), 3,34 µl PCR-Wasser und 1 µl der isolierten DNA. Der DNA-Abschnitt wurde bei folgenden Temperaturschritten amplifiziert: i) Initiale-Denaturierung bei 95°C für 4 min; ii) Denaturierung bei 95 °C für 40 s, Hybridisierung bei 55°C, für 30 s, Elongation bei 72°C für 60 s. Die Schrittabfolge von ii) wurde 35-mal wiederholt. iii) Finale-Elongation 72°C, 5 min. Die drei technischen Replikate wurden zu einem 30-µl-Ansatz vereinigt. In 5 µl des PCR-Ansatzes wurde die Qualität des Amplifikationsproduktes mittels Gelelektrophorese überprüft. Überschüssige Primer und Nukleotide wurden aus den restlichen 25 µl mit Hilfe des Sequel-Prep Normalization Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) entfernt und gleichzeitig die Menge an DNA auf insgesamt 25 ng reduziert. Nun wurden 5 µl des normalisierten PCR-Produktes (Amplikons) mit 5 µl normalisierten DNA-Proben von Projekten anderer Arbeiten vereinigt [129]. Die DNA-Fragmentlänge des Gemisches an DNA-Amplikons wurde mit einem „*high-sensitivity DNA-Chip*“ (Bioanalyzer; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Das Gemisch an variablen V4-Amplikons bildete die in dieser Arbeit erstellte DNA-Bibliothek der Mikrofloraanalysen. Die DNA-Menge der DNA-Bibliothek wurde mit Hilfe des „*Qubit dsDNA HS assays*“ (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) quantifiziert und auf die Konzentration von 2 nM verdünnt. Die Hochdurchsatzsequenzierungen erfolgte mit einem MiSeq-Gerät (Illumina, San Diego, CA, USA).

Qualität der Sequenzierergebnisse

Die Qualität der Sequenzierergebnisse der Amplikonsequenzierung wurde mit „FastQC Version 0.11.2“ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) überprüft. Jede Sequenz wurde von beiden Enden sequenziert. So entstehen zwei Sequenzen, die mit dem Programm „fastq-join Version 1.8.0“ (<https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/>) zu einer Sequenz zusammengefügt wurden. Sequenzen mit einer guten Qualität (Phred-Wert >Q20, Länge >250 bp) wurden mit der „USEARCH Version 8“ [131] für die weitere Analyse ausgewählt. Mit Hilfe von „UCLUST- [131] und UCHIME-Algorithmen“ [132], die in der „USEARCH Version 7.0.1090“ [133] enthalten sind, wurden Chimären verworfen und Sequenzen zu OTUs zusammengefasst. Jeder OTU ordnete der „Ribosomal Database Project (RDP)-Classifier Version 2.2“ [134] eine Taxonomie zu. Je nach Anzahl der charakteristischen Unterschiede in der sequenzierten V4-Region des 16S-rRNA-Gens der Bakterien, war die Zuordnung der Bakteriengruppen (OTUs) auf einem höheren oder niedrigeren Rang der Taxonomie möglich. Sequenzen, die zu Plastiden und Mitochondrien gehören, wurden nicht weiter analysiert und aus dem Datensatz entfernt.

Auswertung der Amplikonsequenzen

Das R-Skript zur Auswertung der Amplikonsequenzen wurde bereits veröffentlicht [135]. Es wurden die R-Pakete „phyloseq“ [136] und „vegan“ (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>) verwendet. Ohne Normalisierung [137] wurden Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung mit Hilfe des Bray-Curtis-Abstands bestimmt und in nicht metrischer, multidimensionaler Skalierung (NMDS), auch nicht metrische Ähnlichkeitsstrukturanalyse genannt, dargestellt. Vier Proben wurden auf Grund der

NMDS verworfen. Faktoren (Probeentnahmestelle, Jahreszeit und Präsenz der Wurzelhalsgalle) wurden auf die Achsen der NMDS-Ordination gefittet, um signifikante Korrelationen zwischen den Faktoren und den Unterschieden in der bakteriellen Flora zu identifizieren. Die Signifikanz eines generellen, linearen Modells, welches die Koeffizienten Boden, Wurzel, Pfropfstelle, Trieb und die Daten einer NMDS-Achse verwendete, wurde durch die Analyse der Varianzen (ANOVA) bestimmt. Auf die gleiche Art wurde für jeden Subdatensatz der Probenentnahmestelle (Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb) ein lineares Modell mit den Koeffizienten Frühling, Sommer und Herbst oder Pfropfstelle mit oder ohne Wurzelhalsgalle erstellt. Ob operative taxonomische Einheiten (OTUs) in zwei Probengruppen unterschiedlich häufig vertreten sind, wurde über „*Fold Changes*“ mit dem R-Paket EdgeR bestimmt [137, 138]. Die „*false discovery rate*“ FDR, nach dem Benjamin-Hochberg-Verfahren, war bei signifikanten „*Fold Changes*“ kleiner als 0.001 und die mittlere Häufigkeit der Sequenzanzahl in einer Gruppe größer oder gleich 20. Für einen Überblick über die taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Flora wurden die OTUs eines Stamms oder einer Gattung zusammengefasst. Um die relative Häufigkeit eines taxonomischen Rangs (Stamm oder Gattung) zu bestimmen, wurden die Sequenzen des Rangs durch alle Sequenzen einer Probeentnahmestelle geteilt. Alle Ränge, deren Anteil kleiner als 0,5 % ist, wurden unter dem Namen „andere“ zusammengefasst. Als Kernflora einer Probengruppe wurden alle OTUs bezeichnet, die in mindestens 80 % der Proben dieser Gruppe mit mindestens 20 Sequenzen vertreten waren. Die Reichhaltigkeit einer Probengruppe wurde anhand der Anzahl an OTUs und die α -Diversität anhand des Shannon Indexes [139] bestimmt. Um signifikante Unterschiede in der Biodiversität und Reichhaltigkeit festzustellen, wurde der Wilcoxon-Rang-Summen-Test verwendet [140]. Die Unterscheidbarkeit von zwei Probengruppen wurde mit einem überwachten Computer-Lernmodell, „*Random Forest*“ [141], bestimmt. Basierend auf der relativen Häufigkeit einer

OTU innerhalb einer Probe wurden die Proben innerhalb der Klassengruppen Probeentnahmestelle (Boden/Wurzel/Pfropfstelle/Trieb), Jahreszeit (Frühling /Sommer /Herbst) oder Gesundheit (mit/ohne Wurzelhalsgalle) mit 1500 Entscheidungsbäumen klassifiziert. Innerhalb einer Klassengruppe führte der Anteil der berechneten Probenzuordnung an der tatsächlichen Probenzuordnung zur „*out-of-bag*“-Fehlerrate (OOB). Hat eine Klassengruppe eine kleine OOB-Fehlerrate, konnten anhand der Mikrofloradaten die Proben den Klassen zugeordnet werden und die Mikroflora unterschied sich zwischen den Klassen. Um zu bestimmen in welchen Probeentnahmestellen ähnliche OTUs vorkamen, wurde mit dem VennDiagram R-Paket [142] der Anteil an gemeinsamen OTUs zwischen zwei Probeentnahmestellen aufgezeigt (Anzahl der OTU-Schnittmenge von A und B/Anzahl der OTUs in A und B). Zum einen wurden alle Proben einer Probeentnahmestelle zusammengefasst, um eine Übersicht an gemeinsamen OTUs zwischen den Probeentnahmestellen zu erstellen. Zum anderen wurden je Jahreszeit zufällig ein erkrankter und gesunder Rebstock gepaart. Mit Hilfe eines gepaarten Wilcoxon-Tests konnten signifikante Unterschiede zwischen Rebstöcken mit und ohne Wurzelhalsgalle festgestellt werden, zum Beispiel ob Wurzelhalsgallen mehr oder weniger gemeinsame OTUs mit dem Boden hatten als Pfropfstellen ohne Wurzelhalsgalle. Das gleiche galt für Wurzeln und Triebe.

Vergleich der OTUs mit Bakterien aus der Literatur

Die Ergebnisse von bakteriellen Studien der Datenbank PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) wurden anhand des Bakteriennamens mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen. Der Vergleich der OTUs mit Bakterien aus der Literatur birgt Risiken, da die Identität des Bakteriums in Amplikonstudien nur anhand des Sequenzabschnittes eines einzigen Haushaltsgens untersucht wurde [143]. Die Analyse mehrerer Haushaltsgene könnte ein anderes Verwandtschaftsverhältnis aufzeigen [144].

Zusätzlich sind die Eigenschaften von verwandten Bakterien, auf Grund von mobilen DNA-Elementen, nur ähnlich und nicht identisch. Daher bietet ein Vergleich mit bereits beschriebenen Bakterien nur Anhaltspunkte für die Rolle der einzelnen Bakterien der Flora, welche in weiteren Versuchen überprüft werden muss.

2.4.4. Genomsequenzierungen

DNA-Isolation

Aus vereinzelt Bakterienkolonien, isoliert aus Weinanlagen (2.2.1), aufbewahrt in Glycerinstocks (2.2.3) wurde DNA isoliert. Die Bakterien wurden fünfmal auf YEB-Agarplatten subkultiviert, um danach eine reine Bakterienkolonie in YEB-Flüssigmedium zu kultivieren. Die DNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben des Nucleo Spin Tissue Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Vorbereitung der Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde die Genom-DNA-Bibliothek, bestehend aus zehn unterschiedlichen Genomen aus verschiedenen Projekten, nach Herstellerangaben mit dem Kit „Nextera XT“ (Illumina, San Diego, CA, USA) erstellt. Die Qualität der DNA-Bibliothek wurde mit dem „*high-sensitivity DNA chip*“ (Bioanalyzer; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft und die Menge der DNA in der Bibliothek mit dem Qubit dsDNA HS assay (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) quantifiziert. Nach Herstellerangaben wurde zur Kartusche des „250 bp paired-end MiSeq sequencing kit, version two“ (Illumina, San Diego, CA, USA) die Genom- oder Mikroflora-DNA-Bibliothek, Sequenzierungsprimer und Indexprimer hinzugefügt. Die Sequenzierung erfolgte in einem MiSeq-Gerät (Illumina, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben. Dabei

wurde nacheinander, ausgehend erst vom einen und anschließend vom anderen Ende des DNA-Fragments, eine Sequenz mit einer Länge von 250 Basenpaaren sequenziert (= „paired-end sequencing“).

Auswertung der Genomsequenzen

Die Auswertung der Genomsequenzen von *A. vitis* Isolat HF7 und *A. sp.* Isolat HF57 wurde von Markus Ankenbrand durchgeführt. Der Vergleich von unterschiedlichen Genomen und Genen sowie die Identifikation der Ti-Plasmidsequenzen fanden in Kooperation statt. Die Genome wurden mit dem Assembler SPAdes v3.10 [145] und SSPACE [146] aus Sequenzenpaaren (paired-end) zusammengesetzt. Resultierende Sequenzen mit einer Länge von mehr als 1000 Basenpaaren wurden ausgewertet. Mit Hilfe der ersten Assemblierung wurden für das Genom *A. vitis* (Isolat HF7) Primer entwickelt, um Lücken mittels LongRange und MidRange PCR (früher PeqLab, nun VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland) in der Genomsequenz zu schließen. Die Gradienten-PCRs wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und die Sequenz der Amplifikationsprodukte per Sangersequenzierung (2.4.2) bestimmt und zur Verbesserung der Assemblierung verwendet. Zur Validierung der Genomsequenzen wurden folgende Strategien gewählt: i) Das Programm bowtie2 [147] berechnete, wie viele Sequenzen die Assemblierung je Basenpaar abdecken, ii) QUASt Ergebnisse [148], zum Beispiel N50 und die Basenpaaranzahl des längsten, überlappenden DNA-Stückes, zeigten eine hohe Kontinuität an, iii) die Vollständigkeit des Genoms wurde am Vorkommen von 107 „essentiellen“ Genen gemessen [149]. Die Annotation des Genoms erfolgte mit Gennamen des annotierten *A. vitis*-S4-Genoms [109]. Auf Nukleotidebene wurden i) Proteine mit „RAST Version 2.0“ [150], ii) tRNA mit „tRNA-scan-SE Version 1.3.1“ [151] und iii) rRNA mit „RNAmmer Version 1.2“

[152] annotiert. Die mittlere Sequenzidentität („*average sequence identity*“, ANI) von Genomen wurde mit „JSpecies Version 1.2.1“ [153] bestimmt. Neben den zwei sequenzierten Isolaten dieser Arbeit wurden die Genomsequenzen von *A. vitis* S4 (NC_011981, NC011982, NC011984, NC011986, NC_011988, NC_011989, NC_011991, [109]), *Agrobacterium tumefaciens* C58 (AE007869-AE007872 [108]) und Rhizobiengenomen von Bakterien in Assoziation mit Arabidopsis (NZ_LMFF01000001, NZ_LMGN01000001 und NZ_LMEY01000001, [154]) verglichen. Die Genannotationen der Genome *A. vitis* S4, *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* HF7 und *A. sp* HF57 wurden in orthologe Gruppen mittels OrthoMCL [155] eingeordnet. Gemeinsame und unterschiedliche orthologe Gruppen der unterschiedlichen Genome wurden in einem Venn-Diagramm dargestellt. Zu allen Genen von *A. vitis* S4 und *A. tumefaciens* C58 mit einem „*Vir*“ im Gennamen der GeneBank-Datei wurden Homologe (OrthoMCL, prozentuale Identität > 50, Exponent des E-values < -5) zu den in dieser Arbeit sequenzierten Isolaten gesucht, um Aussagen über die potenzielle Virulenz der *Agrobacteria* zu treffen. Weitere homologe Gene wurden im Genom mittels „Geneious“ über die Funktion „*Map to reference*“ (Standardeinstellungen, high sensitivity) identifiziert. Mittels „AliTV“ (<https://alitivteam.github.io/AliTV/>) wurde die Homologie zweier Ti-Plasmid-Sequenzen (pTiTm4, GeneBank: U83987.1, AF126447.1) zu einem Ausschnitt des *A. vitis* HF7 Genoms dargestellt.

2.5. Zwei-Photonen-konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie

Agrobacterium tumefaciens in Wurzelhalsgallen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit Multiphotonenanregung und „*Fluorescence lifetime imaging*

microscopy“ (FLIM) lokalisiert. Zur Herstellung der Fluoreszenzprobe wurden GFP-markierte und nicht markierte *A. tumefaciens* in Weinplänzchen, die auf Agar kultiviert wurden, inokuliert. Nach 3-6 Monaten wurden die Tumore transversal per Hand mit einer Rasierklinge in 100-500 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger (76x26x1 mm, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) überführt. Zusätzlich wurden Suspensionskulturen von GFP-markierten *A. tumefaciens* untersucht. Nach der Zugabe eines Tropfens sterilen Wassers wurde ein Deckgläschen (24x60x0,17 mm, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) über den Schnitt gelegt, auf dessen Oberfläche sich ein Tropfen Immersionsöl Type F (Leica, Wetzlar, Deutschland) befand. Mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops TCS SP5 II (Leica, Wetzlar, Deutschland) und der Software Leica Application Suite, Advanced Fluorescence, Version 2.7.2.9586 (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden Durchlichtbilder und Fluoreszenzbilder von den Schnitten aufgenommen. Zwei „HCX PL APO CS“-Objektive von Leica wurden verwendet: ein Immersions- und ein Öl-Objektiv mit einer Vergrößerung von 20x (Übersichtsaufnahmen), beziehungsweise 63x (Detailaufnahmen) und einer numerischen Apparatur von 0,70, beziehungsweise 1,4 (Bestellnummern: 11506326, 11506188). Photonen, erzeugt durch den Multiphotonenlaser (MP, 1,82W, 920nm), wurden im Bereich von 505-565 nm von dem externen HyD RLD1 (Gain: 100 %) detektiert. Der MP-Gain betrug 1-7 % und das Offset 55-85 %. Der FLIM Wizard der Leica Application Suit und die Software SymPhoTime Version 5.3.2.2 (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) wurden für die Berechnung und Visualisierung der Lebensdauer der Fluorophore in der Aufnahme der Probe verwendet. Dabei wurden nach einem Laserpuls bis zum nächsten Laserpuls die Photonen in Abhängigkeit der Zeit gezählt („*time correlated single photon counting*“, TCSPC). Diese Messung wurde wiederholt, bis die Summe der Photonen aller Messungen in einem Pixel maximal 1000 Photonen betrug. Die Abnahme der Intensität (Anzahl der Photonen) zwischen zwei Laserpulsen wurde für alle 512x512 Pixel in

einem TCSPC-Diagramm dargestellt (**Anhang Abbildung 1**), in welchem die Abflachung der Kurve von der Anzahl der Fluorophore und deren Lebensdauer abhängig ist. Die Lebensdauer in der Suspension von GFP-markieren *A. tumefaciens* und in den Tumorproben wurde durch eine multiexponentielle Annäherung (drei Exponenten) an die zeitabhängige Photonenzahl der gesamten Aufnahme bestimmt. Die multiexponentielle Annäherung basiert auf dem Zerfallsgesetz [156]. Ebenfalls mit Hilfe einer dreifach exponentiellen Annäherungskurve und der global bestimmten Lebensdauern wurde die Intensität der Fluorophore, zugehörig zu einer der drei Lebensdauern, je Pixel berechnet. Die GFP-Lebensdauer wurde durch die FLIM-Messung der reinen GFP-markierten Bakteriensuspensionen bestimmt und für die Untersuchung der Tumorproben festgesetzt. Der prozentuale Anteil der GFP-Lebensdauer von 2.3 ns in den Tumorproben wurde je Pixel in den FLIM-Aufnahmen durch eine Farbskala dargestellt.

Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Fiji [157]. Der Kontrast der Fluoreszenzbilder wurde um 0,01 % erhöht. Die Helligkeit und der Kontrast der Durchlichtbilder wurden automatisch angepasst. Mit dem Plugin „*Grid/Collection Stitching*“ (Einstellungen: Grid: row by row, tile overlap: 10 %, linear blending, regression threshold: 0,3, max/avg displacement threshold: 2,5, absolute displacement threshold: 3,5) wurden die Einzelbilder zu einem Übersichtsbild aneinander gesetzt. Die Übersicht des Fluoreszenzbildes (Lookup-Tabelle: „*yellow*“) und des Durchlichtbildes (Lookup-Tabelle: „*grey*“) wurden überlagert. In ScientiFig [158] wurden die Messbalken eingefügt und das Layout der exportierten Vektorgrafiken im Programm Inkscape (<https://inkscape.org/en/>) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung und Charakterisierung von Bakterienisolaten aus Rebstöcken der Region Unterfranken

Zu ihrer Identifizierung und Charakterisierung wurden Bakterien aus einer Weinanlage bei Himmelstadt, Unterfranken isoliert und eine Glycerinstock-Kollektion (2.2.3) erstellt. Die Auswahl von zwei Rebstöcken mit (**Abbildung 4**, Rebstock 1 und 2) und zwei ohne Tumor (**Abbildung 4**, Rebstock 3 und 4) erfolgte anhand phänotypischer Merkmale, wie der Größe der Pfropfstelle und Präsenz von Knötchen auf der Oberfläche. In dieser Arbeit und weiteren phylogenetischen Studien [102, 103] sind *Agrobacteria* ein Teil der *Rhizobium*-Gattung. *Agrobacteria* aus Tumoren des gleichen Weinbergs eines früheren Probeentnahmezeitpunktes wurden in die Bakterienkollektion integriert und wurden ebenfalls charakterisiert [159].

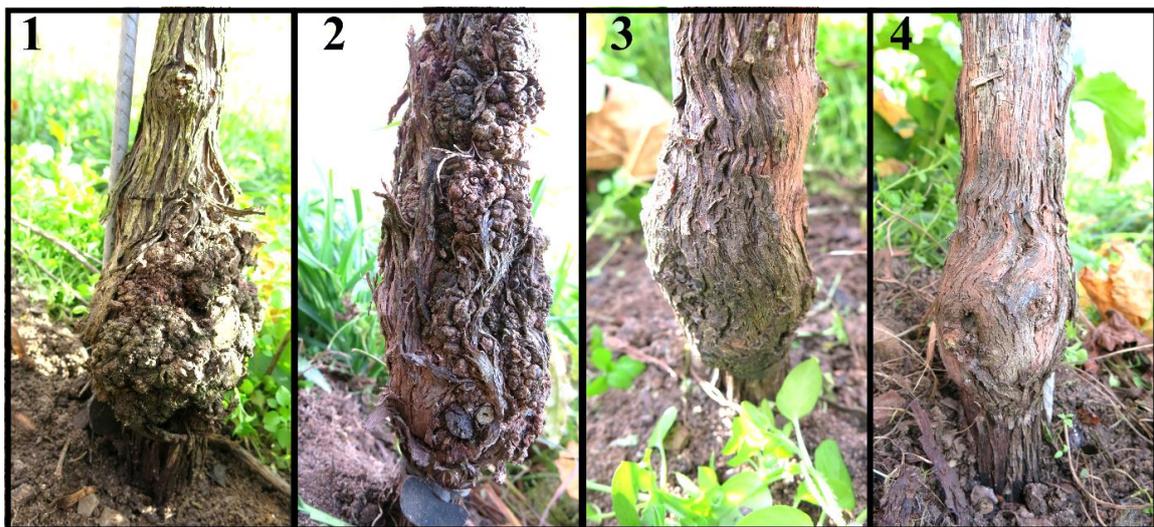


Abbildung 4 Pfropfstellen von Rebstöcken mit (1, 2) und ohne (3,4) Wurzelhalsgallen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

Aus Boden, Wurzel und Pfropfstelle mit und ohne Wurzelhalsgalle wurden insgesamt 62 Bakterienisolate isoliert (**Anhang Tabelle 1**). Nach PCR-Amplifikation der V4-Region der 16S-rRNA-Gens und Sangersequenzierungen wurden die Sangersequenzen der Isolate (8.1) mittels „*basis local alignment search tool*“, BLAST, bekannten Bakterien zugeordnet. Dementsprechend waren acht Bakterienisolate *Agrobacterium vitis* (**Anhang Tabelle 1A**) und 28 andere Rhizobiaceae (**Anhang Tabelle 1B**). Alle Rhizobiaceae-Isolate und die acht *A. vitis* wurden mittels PCR verifiziert und genauer analysiert (**Tabelle 1**). PCR-Amplifikate von Bakterien-DNA mit dem *recA*-Primerpaar, welches spezifisch für *A. vitis* ist, bestätigten die BLAST-Ergebnisse für die acht Isolate (**Tabelle 1A**). Mit einem weiteren *recA*-Primerpaar, spezifisch für *Agrobacterium spp.* aber nicht für *A. vitis* [102], wurden 21 Isolate von den 28 Rhizobiaceae als *A. spp* verifiziert (**Tabelle 1B**). Diese *Agrobacteria*-Isolate (exklusive *A. vitis*) stammen aus den Wurzeln und Stämmen aller vier Rebstöcke (**Tabelle 1**). *A. vitis* wurde in dieser Arbeit nur aus den Wurzeln und der Pfropfstelle der Rebstöcke mit einem Tumor (1, 2) aber nicht aus den phänotypisch gesunden Rebstöcken (3, 4) isoliert. Aus den Proben vom Boden und den Trieben der Rebstöcke 1-4 konnte in dieser Arbeit kein *A. vitis* isoliert werden.

Tabelle 1 Kollektion der Rhizobiaceae-Isolate. Die Bakterienisolate wurden anhand zweier unterschiedlichen *recA*-Primerpaare den *Agrobacterium vitis* (A) und andere Rhizobiaceae (B) zugeordnet. *A. spp* bezeichnet unterschiedliche *Agrobacteria* bei denen es sich nicht um *A. vitis* handelt. Fehlt die Rebstocknummer aus der das Isolat stammt (-), wurde das Isolat zu einem früheren Zeitpunkt aus einem anderen Rebstock der Weinanlage bei Himmelstadt isoliert. Die Probeentnahmestelle (Stelle), das molekulare Markergen (*virD2*) und in planta Tumorassay zum Nachweis der Virulenz (+, -) sowie die interne Nummer des Glycerinstocks (Nr.) sind gelistet.

recA-Identität	Rebstock	Stelle	VIRD2	Tumor-assay	Nr.
A					
<i>A. vitis</i>	1	Pfropfstelle	+	+	HF48
<i>A. vitis</i>	1	Pfropfstelle	+	+	HF52
<i>A. vitis</i>	1	Wurzel	+	+	HF49
<i>A. vitis</i>	2	Wurzel	+	+	HF63
<i>A. vitis</i>	2	Wurzel	+	+	HF43

<i>A. vitis</i>	-	Pfropfstelle	+	+	HF6
<i>A. vitis</i>	-	Pfropfstelle	+	+	HF9
<i>A. vitis</i>	-	Pfropfstelle	+	+	HF7

B

<i>A. sp.</i>	1	Wurzel	-	-	HF32
-	1	Wurzel	-	-	HF50
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF46
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF53
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF55
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF56
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF57
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF58
<i>A. sp.</i>	2	Pfropfstelle	-	-	HF59
<i>A. sp.</i>	3	Wurzel	-	-	HF30
<i>A. sp.</i>	3	Wurzel	-	-	HF34
<i>A. sp.</i>	3	Wurzel	-	-	HF35
<i>A. sp.</i>	3	Wurzel	-	-	HF36
<i>A. sp.</i>	3	Wurzel	-	-	HF37
-	4	Wurzel	-	-	HF60
-	4	Wurzel	-	-	HF61
<i>A. sp.</i>	4	Wurzel	-	-	HF31
<i>A. sp.</i>	4	Wurzel	-	-	HF38
<i>A. sp.</i>	4	Wurzel	-	-	HF62
<i>A. sp.</i>	-	Pfropfstelle	-	-	HF1
<i>A. sp.</i>	-	Pfropfstelle	-	-	HF2
<i>A. sp.</i>	-	Pfropfstelle	-	-	HF3
<i>A. sp.</i>	-	Pfropfstelle	-	-	HF4
<i>A. sp.</i>	-	Pfropfstelle	-	-	HF5

Ob die Rhizobiaceae-Isolate virulent sind, wurde auf molekularer Ebene (2.4.1) und mittels Tumorassay (2.3) nachgewiesen. Die Amplifikation des Markergens VirD2 zeigte die Existenz des Ti-Plasmids in den Isolaten an und damit virulente *Agrobacteria*. Alle isolierten *A. vitis* Stämme besaßen das VirD2-Gen (**Tabelle 1A**) wohingegen kein anderes Rhizobiaceae-Isolat das VirD2-Gen (**Tabelle 1B**) enthielt. Die tumorauslösenden Eigenschaften der Isolate wurden in Tumorassays an *in vitro* kultivierten Rebstöcken überprüft (**Abbildung 5A**). Die Ergebnisse des Tumorassays bestätigten die des molekularen Virulenztests. Wurden Isolate von *A. vitis* (**Tabelle 1A**) inokuliert, bildete sich ein Tumor, wurden die

anderen *Rhizobium*-Stämme (B) inokuliert, war Wochen später die verwundete Stelle immer noch sichtbar. **Abbildung 5B** zeigt beispielhaft einen Tumor, der durch *A. vitis* HF7 (*A. vitis*, Isolat mit der Glycerinstocknummer 7) induziert wurde, und **Abbildung 5C** zeigt die ursprüngliche verwundete Stelle, in die das nicht-onkogene *A. sp.* GV3101 inokuliert wurde. Somit war die Virulenz in den hier untersuchten Rebstöcken auf *A. vitis* beschränkt und es wurde bestätigt, dass es sich bei den Rebstöcken 1 und 2 um Rebstöcke mit Wurzelhalsgallen an der Pfropfstelle handelte (**Abbildung 4**).

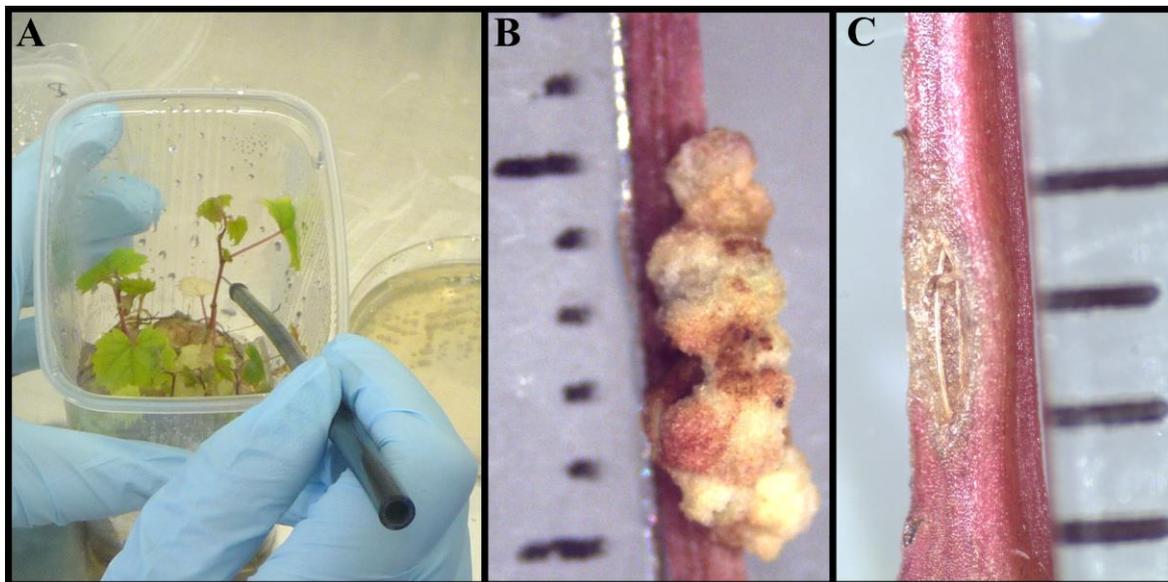


Abbildung 5 Tumorassay mit Weinplänzchen auf Agar. (A) Agrobacteria wurden durch Einstich mit einer Nadel in eine Internodie inokuliert. (B), 4-6 Wochen nach der Inokulation des virulenten *A. vitis* HF7 entwickelte sich ein Tumor (C), 4-6 Wochen nach Inokulation des Agrobakteriums GV3101 ohne Onkogene war die ursprüngliche Verwundung noch zu erkennen. Der Abstand zwischen zwei schwarzen Strichen beträgt 1 mm (B, C).

Die Genome von zwei Agrobacteria-Isolaten

Die Genome zweier *Agrobacteria*-Isolate (*A. vitis* HF7 und *A. sp* HF57, **Tabelle 1**) vom Weinberg bei Himmelstadt wurden mit Hilfe der Hochdurchsatzsequenzierung (MiSeq, Illumina, Durchschnittliche Nukleotidsequenzlänge: ≈ 250 bp) ermittelt (2.4.4). Die vorläufige Genomsequenzanalyse von *A. vitis* HF7 ergab 43 zusammenhängende Sequenzabschnitte (Contigs), die insgesamt 6,2 Millionen Basenpaaren umfassen. Bei *A. sp* HF57 lagen 23 Sequenzabschnitte vor, mit insgesamt 5,7 Millionen Basenpaare. Von 107 als essentiell beschriebenen Genen [149] wurden 106 im Genom von *A. vitis* HF7 und alle bei *A. sp* HF57 detektiert. Von 5795 annotierten Genen im *A. vitis* HF7 Genom waren 5727 Protein codierend, 56 wurden der tRNA und 12 der rRNA zugeordnet. Bei *A. sp* HF57 kodierten von 5626 annotierten Genen 5569 für Proteine, 51 für tRNAs und 6 für rRNAs. Ein Vergleich der Genome mit den Referenzgenomen des virulenten *A. sp* C58 (auch *A. tumefaciens* oder *A. fabrum* genannt [108]) und virulenten *A. vitis* S4 [160] zeigte, dass das *A. vitis* HF7-Isolat zu 93,21 % mit S4 aber nur zu 86,21 % C58 entsprach. *A. sp* HF57 stimmte zu 84,28 % mit S4 und ebenfalls zu 84,7 % mit C58 überein. Auch zu drei weiteren Rhizobiaceae-Genomen [154] hatte *A. sp* HF57 eine Homologie von je 84 %. In einem Venn-Diagramm ist die Anzahl an gemeinsamen orthologen Genen zwischen *A. sp* C58, *A. vitis* S4, *A. vitis* HF7 und *A. sp* HF57 dargestellt (**Abbildung 6**). *A. vitis* HF7 teilte 78 % seiner orthologen Gene mit S4 aber nur 59 % mit C58. *A. sp* HF57 teilte 60 % beziehungsweise 66 % seiner orthologen Gene mit S4 beziehungsweise C58. Das Isolat *A. vitis* HF7 teilte mit *A. sp* HF57 aus dem gleichen Weinberg nur 58 % der orthologen Gene. Zusammengekommen war das *A. vitis* HF7 aus Himmelstadt ähnlicher zum Referenzgenom von *A. vitis* S4 als zu *A. sp* C58, wohingegen *A. sp* HF57 nur entfernt mit *A. sp* C58, *A. vitis* S4, *A. vitis* HF7 und drei weiteren Rhizobiaceae Genomen verwandt war [154].

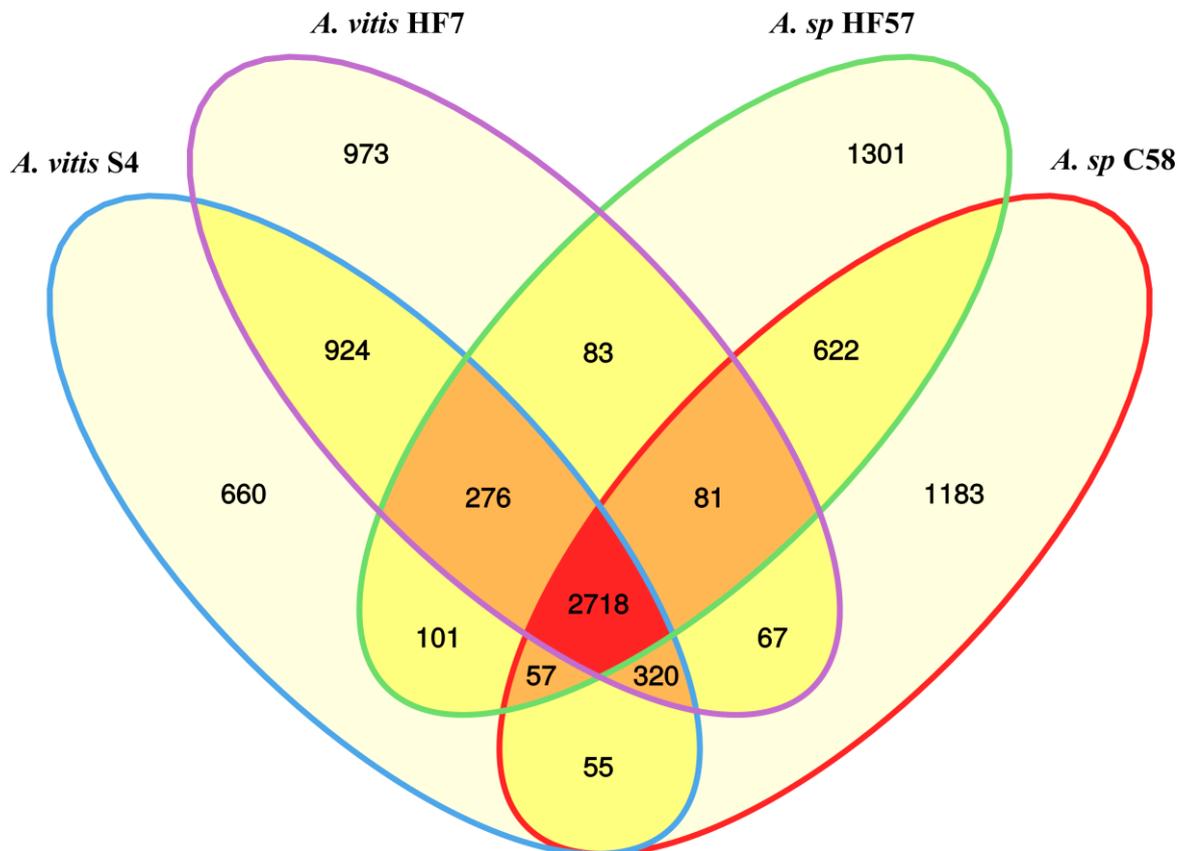


Abbildung 6 Anzahl an gemeinsamen orthologen Genen von *A. vitis* HF7, *A. sp* HF57, *A. sp* C58 und *A. vitis* S4. Orthologe Gene wurden mit dem Programm OrthoMCL (v2.0.9) vorhergesagt.

Zwei der 43 Sequenzabschnitte des *A. vitis* HF7 Genoms (DNA-Sequenz Nummer 14 und 27) wiesen eine hohe Homologie zum pTiTm4 (GeneBank: U83987.1, AF126447.1), dem Ti-Plasmid von *A. vitis* Tm4, auf (**Abbildung 7**, grün=Identität>99 %). Der Sequenzvergleich umfasste die Onkogene (*iaaH*, *iaaM*; *ipt*) und ein Gen, involviert in die Octopin Synthese (*ocs*), welche auf der T-DNA des Ti-Plasmids lokalisiert waren. Im Genom von *A. vitis* HF7 wurden außerdem 22 Sequenzabschnitte mit Homologie zu den Virulenz-Genen von *A. vitis* S4 und *A. sp* C58 (Vir-Gene: *virA*, *virB1*, *virB10*, *virB11*, *virB2*, *virB3*, *virB4*, *virB5*, *virB8*, *virB9*, *virC1*, *virC2*, *virD1*, *virD2*, *virD3*, *virD4*, *virD5*, *virE2*, *virE3*, *virG* und *virH1*) gefunden, aber kein einziges davon im Genom von *A. sp* HF57. Dies

deutete darauf hin, dass *A. sp. HF57* mit hoher Wahrscheinlichkeit kein vollständiges virulentes Ti-Plasmid enthält. In beiden *Agrobacteria*-Isolaten bestand eine Homologie zu acht Genen des Octopin-Katabolismus Operons (*occR=octopin catabolismus R*, *occQ*, *occM*, *occP*, *occT*, *ooxB=octopine oxidase B*, *ooxA=octopine oxidase A* und *ocd=ornithine cyclodeaminase*, [44, 161]). Deren Anordnung war in den Genomen der beiden *Agrobacteria*-Isolate gleich. In den Genomen von *A. vitis* HF7 und *A. sp. HF57* wurden auch homologe Gene zu *traI* (paarweise Sequenzidentität: 84,6 % bzw. 84,6 %) und *traR* (82,6 % bzw. 85,7 %) detektiert, die für Signal- (TraI) und Regulatorproteine (TraR) kodieren und die Konjugation des Ti-Plasmids regulieren [162].

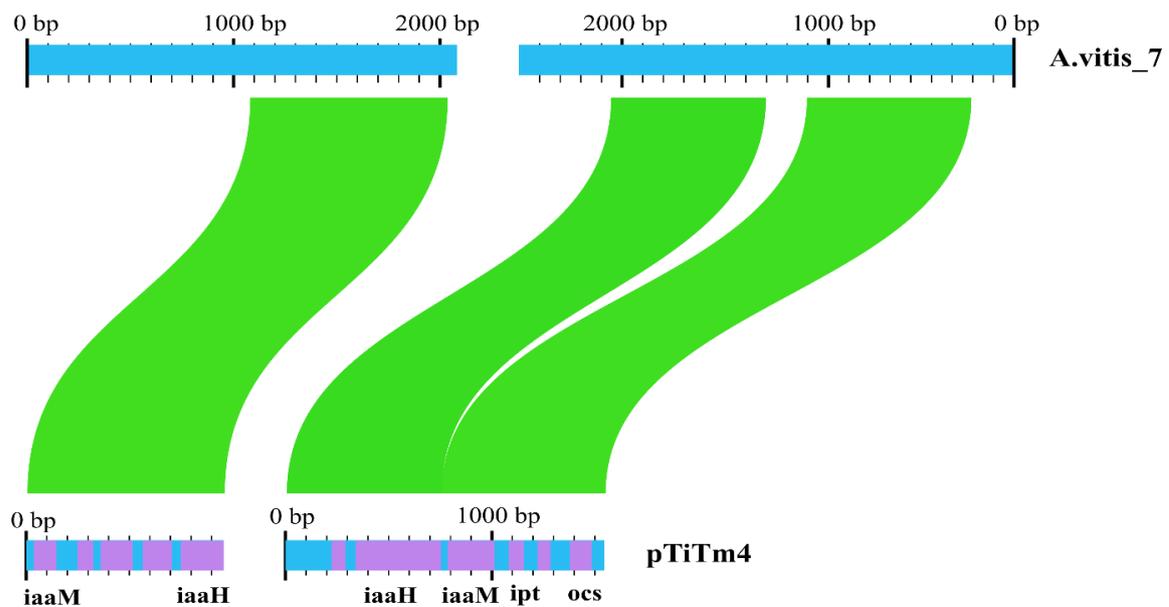


Abbildung 7 Contigs Nr. 14 und Nr. 27 des *A. vitis* HF7-Isolats im Vergleich mit dem Ti-Plasmid von *A. vitis* Tm4 (pTiTm4). Oben ist das Contig Nr. 14 und Nr. 27 des *A. vitis* HF7-Isolats aus Himmelstadt dargestellt. Unten befinden sich zwei Ti-Plasmid-Fragmente von *A. vitis* Tm4 (pTiTm4, zuerst U83987, jetzt AF126447.1). Indol-3-acetamide monooxygenase (*iaaM*), indol-3-acetamide hydrolase (*iaaH*), isopentenyl transferase (*ipt*) und octopine synthase (*ocs*). Grüne Linien verbinden DNA-Stellen mit einer Homologie von >99 %. Die Darstellung und Homologieberechnung erfolgte mit AliTV (<https://alittyteam.github.io/AliTV/>) und das Layout wurde in Inkscape nachbearbeitet.

Die Genomanalyse der beiden Bakterienisolate bestätigte die Ergebnisse des Tumorassays und der PCR: *A. vitis* HF7 war ein Auslöser der Wurzelhalsgallenerkrankung. Es bestand eine 93 % Ähnlichkeit zum bekannten Rebstockpathogen *A. vitis* S4 [109] und die Virulenz-Maschinerie war im Gegensatz zum *A. sp.* HF57-Isolat im Genom vorhanden.

3.2. Die Bakterienflora der Rebstöcke mit und ohne Wurzelhalsgallen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die Mikroflora des Rebstocks von einer Wurzelhalsgalle beeinflusst wird. Dazu wurden die vier Rebstöcke (**Abbildung 4**) des fränkischen Weinbergs bei Himmelstadt untersucht. Die Rebstöcke 1 und 2 waren Rebstöcke mit Tumor und die Rebstöcke 3 und 4 ohne (siehe 3.1). Die Proben wurden zu drei Jahreszeiten genommen (Herbst: 30. Oktober 2013, Frühling: 04 März 2014, Sommer: 23. Juli 2014). Von jedem Probezeitpunkt wurde die Bakterienflora des Bodens (Bo) in Wurzelnähe und die endophytische Bakterienflora der Pflanzenorgane: Wurzel (Wu), Pfropfstelle (Pf) und einjährigem Trieb (Tr) ermittelt (**Abbildung 8A**). Die V4-Regionen der 16S-rRNA-Gene wurde in 144 DNA-Proben (**Abbildung 8B**) mittels Hochdurchsatz-Amplikon-Sequenzierung ermittelt. Die resultierenden Amplikonsequenzen wurden anhand der rdp-Datenbank einer Bakterientaxonomie zugeordnet (2.4.3). Die insgesamt 144 sequenzierten Proben (**Abbildung 8B**) ergaben 4.572.415 Amplikonsequenzen mit Homologien zu 16s rRNA-Genen. Amplikonsequenzen mit mindestens 97 % Identität wurden in einer von 8.779 taxonomischen Einheiten zusammengefasst („*operational taxonomic unit*“, OTU). Nach dem Entfernen der Amplikonsequenzen von Plastiden und Mitochondrien blieben 1.201.593 Amplikonsequenzen und 8.674 OTUs. Dies entsprach einem Anteil von

26 % Mikroflorasequenzen an den ungefilterten Amplikonsequenzen. Von den Mikroflorasequenzen wurden 95 % den Bakterien zugeordnet, daher wurde in dieser Arbeit mittels Amplikonsequenzierung überwiegend die Bakterienflora untersucht.

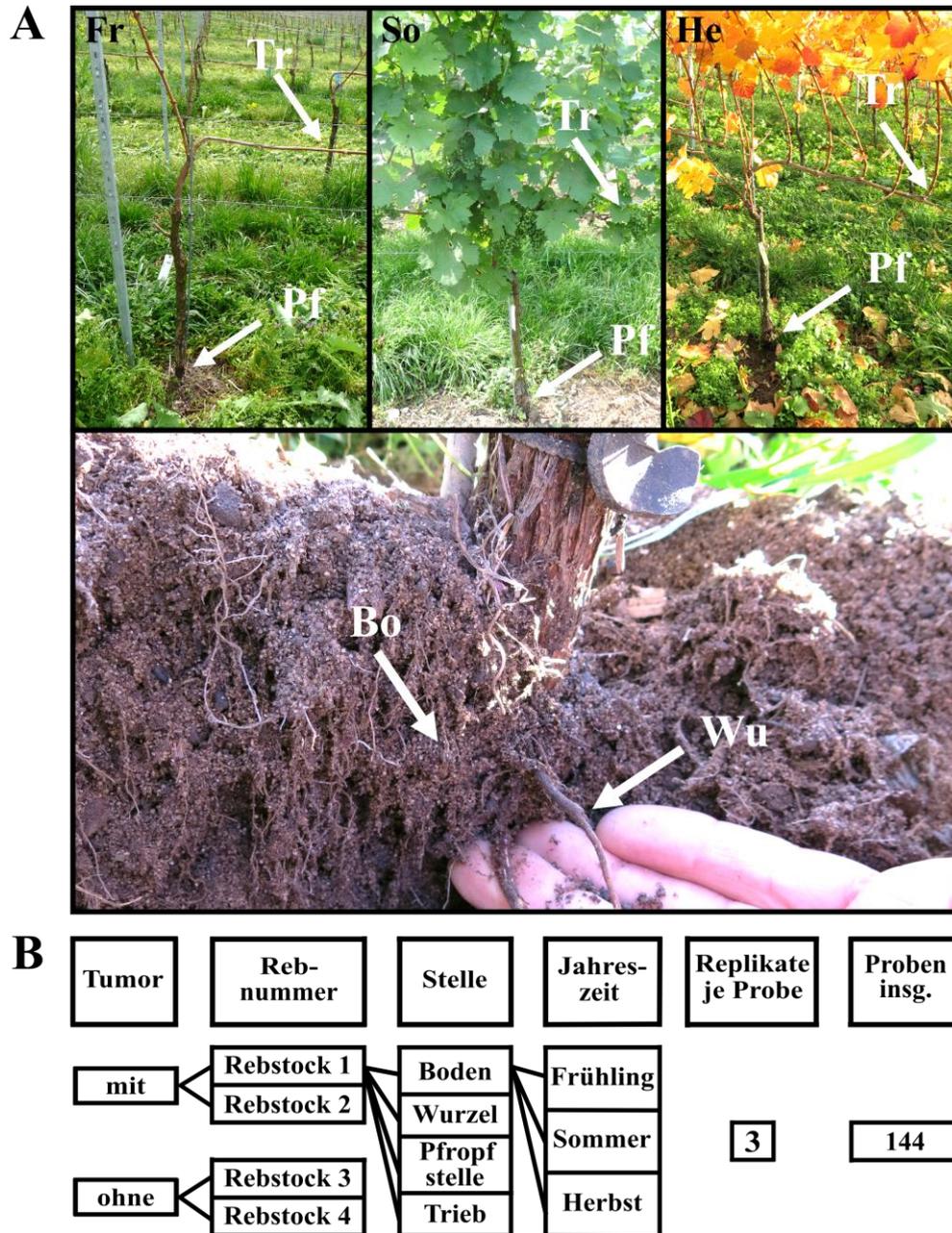


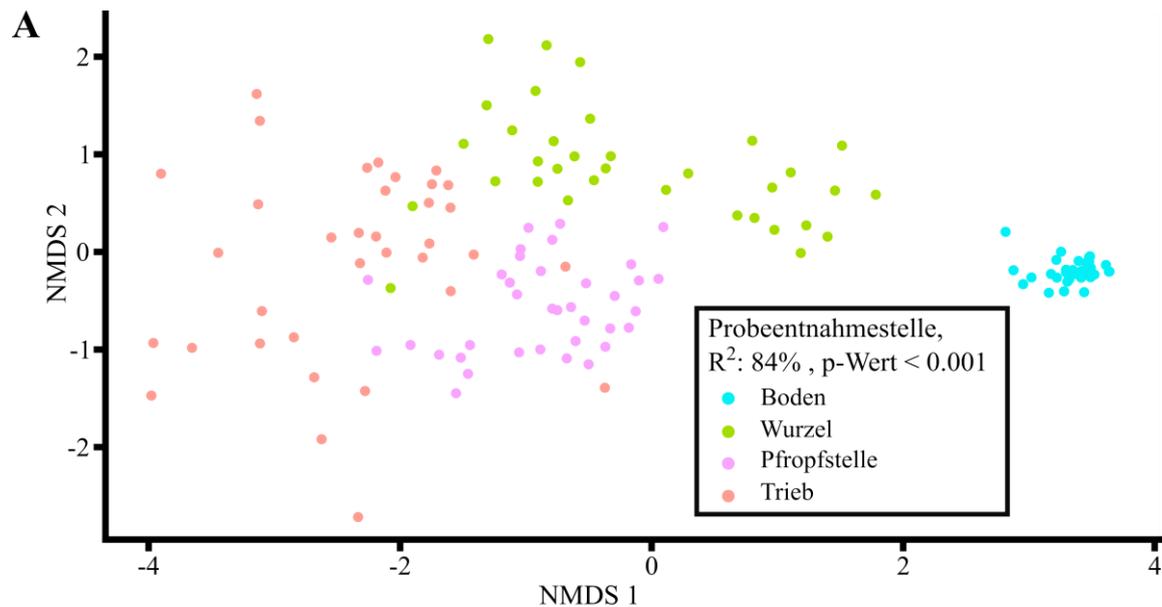
Abbildung 8 Material für die Analyse der Bakterienflora bei Rebstöcken der Region Unterfranken. (A) zeigt die Phänotypen eines Rebstocks zu den drei Probeentnahmezeitpunkten: Frühling (Fr), Sommer (So) und Herbst (He). Pfeile deuten auf die Probeentnahmestellen: den einjährigen Trieb (Tr) die Pfropfstelle (Pf), die Wurzel (Wu) und den Boden (Bo). (B) Schema vom Experiment mit insgesamt 144 Proben. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

3.2.1. Die Probeentnahmestellen beeinflussen die bakterielle Flora

Unabhängig von der Probeentnahmestelle („*unsupervised*“) und der Identität der OTUs wurden die Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den 144 Proben paarweise bestimmt. Die Bray-Curtis-Abstände wurden mittels einer nicht-metrischen, multidimensionalen Skalierung („*non-metric multidimensional scaling*“ NMDS) im zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt (**Abbildung 9**). In der NMDS repräsentierte jeder Punkt eine Probe und die beiden NMDS-Achsen stellen den Hauptunterschied (NMDS Achse 1) und den zweit größten Unterschied (NMDS Achse 2) in der Zusammensetzung der Bakterienflora dar. Proben mit einer ähnlichen Zusammensetzung der Bakterienflora gruppieren sich. Die Einfärbung der Punkte je Probeentnahmestelle legte nahe, dass die Proben einer Probeentnahmestelle sich gruppieren und somit die Proben der gleichen Probeentnahmestelle (Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb) eine ähnliche Bakterienflora hatten (**Abbildung 9A**). Um einen Zusammenhang zwischen der Gruppierung und den Umweltparametern, in diesem Fall den Probeentnahmestellen, herzustellen wurden zwei Analysen verwendet: i) Korrelation der Gruppen Zentromere („*environmental fit*“ (**Abbildung 9A**) und ii) ein allgemeines lineares Model („*general linear model*“, GLM). Mittels „*environmental fit*“ wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Probeentnahmestelle und der Bakterienflora ermittelt (environmental fit, $R^2=84\%$, $p\text{-Wert}\leq 0.001$). Anhand von GLM wurde berechnet, welche Probeentnahmestellen (Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb), repräsentiert durch die Werte der NMDS1-Achse, die Bakterienflora prägten. Das GLM zeigt, dass jede Probeentnahmestelle signifikant mit der bakteriellen Flora korrelierte (Boden, $t\text{-Wert}=32$, $P\text{-Wert}<0,001$; Wurzel, $t\text{-Wert}=12$, $P\text{-Wert}<0,001$; Pfropfstelle, $t\text{-Wert}=8$, $P\text{-Wert}<0,001$; Trieb, $t\text{-Wert}=-18$, $P\text{-Wert}<0,001$). Die

Signifikanz des GLMs wurde mittels ANOVA („*analysis of variances*“) bestätigt. Somit besaß jede Probeentnahmestelle ihre spezifische bakterielle Zusammensetzung.

Die Random-Forest-Analyse teilte die Proben, in Abhängigkeit der Metadaten („*supervised*“), in die jeweilige Klasse (Boden, Wurzel, Pfropfstelle oder Trieb) ein. Die Einteilung basierte auf der Zusammensetzung der Bakterienflora, welche durch die Anzahl an Amplikonsequenzen je OTU repräsentiert wurde. Die berechnete Klassifikation der Proben wurde mit der tatsächlichen Klasse der Proben verglichen. Da nur 2 % der Proben falsch eingeordnet wurden (**Abbildung 9B**, OOB: 2 %), sind die Probeentnahmestelle als Klassen geeignet, die Bakterienflora zu unterteilen. Somit besaßen die unterschiedlichen Probeentnahmestellen eine unterschiedliche Bakterienflora.



B

OOB: 2%	Boden	Wurzel	Pfropfstelle	Trieb	Fehler rate
Boden	35	0	0	0	0%
Wurzel	0	32	0	2	6%
Pfropfstelle	0	0	35	1	3%
Trieb	0	0	0	35	0%

Abbildung 9 Die Probeentnahmestellen beeinflussten die Bakterienflora. (A) Die nicht metrische Ähnlichkeitsstrukturanalyse (NMDS) des Bray-Curtis-Abstands gruppierte diejenigen Proben (symbolisiert als Punkte) mit einer ähnlichen Bakterienflora zusammen. Der Einfluss der Probeentnahmestelle auf die Bakterienflora wurde durch die Analyse des „environmental fits“ (Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 84\%$) bestätigt. Die Signifikanz des Bestimmtheitsmaßes wurde durch einen Permutationstest ermittelt. Ein p -Wert < 0.001 wurde als hoch signifikant unterschiedlich bewertet. (B) Klassifikation der Bakterienflora anhand der Probenentnahmestelle. Das Klassifikationsverfahren „Random Forest“ teilte die Proben der Probeentnahmestelle in Klassen (Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb) ein. Die vorhergesagte Klasse (Spalten) wurde mit der bekannten Klasse (Zeilen) der Probe verglichen. Der OOB(Out-of-bag)-Wert zeigt den prozentualen Anteil an falsch zugeordneten Proben des gesamten Datensatzes, wohingegen die Fehlerrate den prozentualen Anteil der falsch zugeordneten Proben innerhalb einer Klasse angibt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016

3.2.2. Bakterielle Diversität der jeweiligen Probenentnahmestellen

Die Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung wurde in erster Linie von der Probenentnahmestelle bestimmt. Darum wurde anschließend die Zusammensetzung der Bakterienflora von Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb separat analysiert. Die Anzahl an unterschiedlichen OTUs (Reichhaltigkeit) verringerte sich vom Boden (**Abbildung 10A**, Mittelwert±Standardabweichung, 2712±673) über die Wurzel (253±170) zur Pfropfstelle (166±50) bis hin zum Trieb (76±41). Somit war die Bakterienflora im Boden am reichhaltigsten und im Trieb am spezialärmsten. Ähnliche Ergebnisse ergab der Shannon-Index, eine Vielfältigkeitsanalyse, die zusätzlich zur Anzahl an unterschiedlichen OTUs die Häufigkeit der jeweiligen OTU einbezieht. Wie bei der Reichhaltigkeit war die bakterielle Flora im Boden am vielfältigsten (**Abbildung 10B**, Shannon-Index: 6,8±0,2) und nahm über die Wurzel (4,0±0,7) und Pfropfstelle (3,2±0,9) zum Trieb (3,0±1) stetig ab.

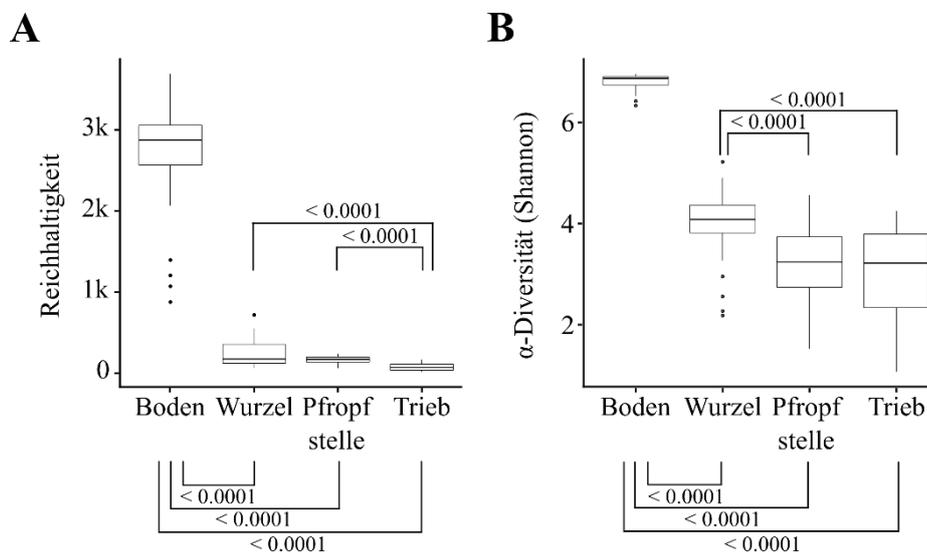


Abbildung 10 Biodiversität der Bakterienflora. (A) Die Reichhaltigkeit stellt die Anzahl an unterschiedlichen taxonomischen Einheiten (OTUs) dar. (B) Die Alpha-Diversität (Shannon-Index) gibt zusätzlich zur Reichhaltigkeit die Häufigkeit der einzelnen OTUs an. Mittels Wilcoxon-Rangsummentests wurde die Signifikanz der Unterschiede berechnet und ein p-Wert $\leq 0,001$ als hoch signifikant bewertet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

Insgesamt waren 410 OTUs (5 %) in allen vier Probeentnahmestellen vertreten. Die größte Schnittmenge an gemeinsamen OTUs hatte jedes Pflanzengewebe mit dem Boden (Wurzel: 88 %, Pflropfstelle: 82 %, Trieb: 79 %). Die Consensus-Sequenz der 16S-rRNA-V4-Region einer OTU wurde mit der Datenbank des „*ribosomal database project*“ (RDP [134]) abgeglichen. Diese beinhaltet DNA-Sequenzen bekannter Bakterien und so konnten 99,5 % der Amplikonsequenzen einem Stamm zugeordnet werden (**Abbildung 11A**). Auf der Stammebene dominierten die Proteobacteria in jeder Probeentnahmestelle. Sie kamen prozentual am häufigsten im Trieb (89 %) und in der Pflropfstelle (89 %) vor, nahmen über die Wurzel (62 %) bis hin zum Boden (22 %) ab. Actinobacteria waren am häufigsten in der Wurzel (20 %) und im Boden (15 %), aber seltener in den oberirdischen Pflanzenteilen (Pflropfstelle: 5 %, Trieb: 2 %). Andere Stämme wie Acidobacteria, Crenarchaeota, Planctomycetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Bacteroidetes und Chloroflexi waren im Boden häufiger als in der Pflanze. Die Gattungszugehörigkeit der OTUs konnte von 41 % der Consensussequenzen ebenfalls mit Hilfe des „*rdp classifiers*“ bestimmt werden (**Abbildung 11B**). *Pseudomonas* dominierte die bakterielle Flora in der Pflanze und die Häufigkeit von *Pseudomonas* nahm entlang der Pflanzenachse vom Boden (2 %) über die Wurzel (11 %), die Pflropfstelle (46 %) und zum Trieb (72 %) zu. *Nitrososphaera* (24 %), *Flavobacterium* (5 %) und *Rhodoplanes* (5 %) waren nahezu ausschließlich im Boden vertreten wohingegen *Methylobacterium* (12 %), *Steroidobacter* (10 %) und *Bradyrhizobium* (5 %) die Wurzelbakterienflora dominierten. Die Gattungen *Erwinia* (6 %), *Sodalis* (6 %) und *Agrobacterium* (17 %) wurden ausschließlich in der Pflropfstelle detektiert. *Agrobacteria* waren, neben *Pseudomonas* (46 %) die zweithäufigste Bakteriengattung in der Pflropfstelle und dort deutlich häufiger vertreten als in den anderen untersuchten Probeentnahmestellen (Boden: 0,3 %, Wurzel: 1,6 %, Trieb: 0,7 %).

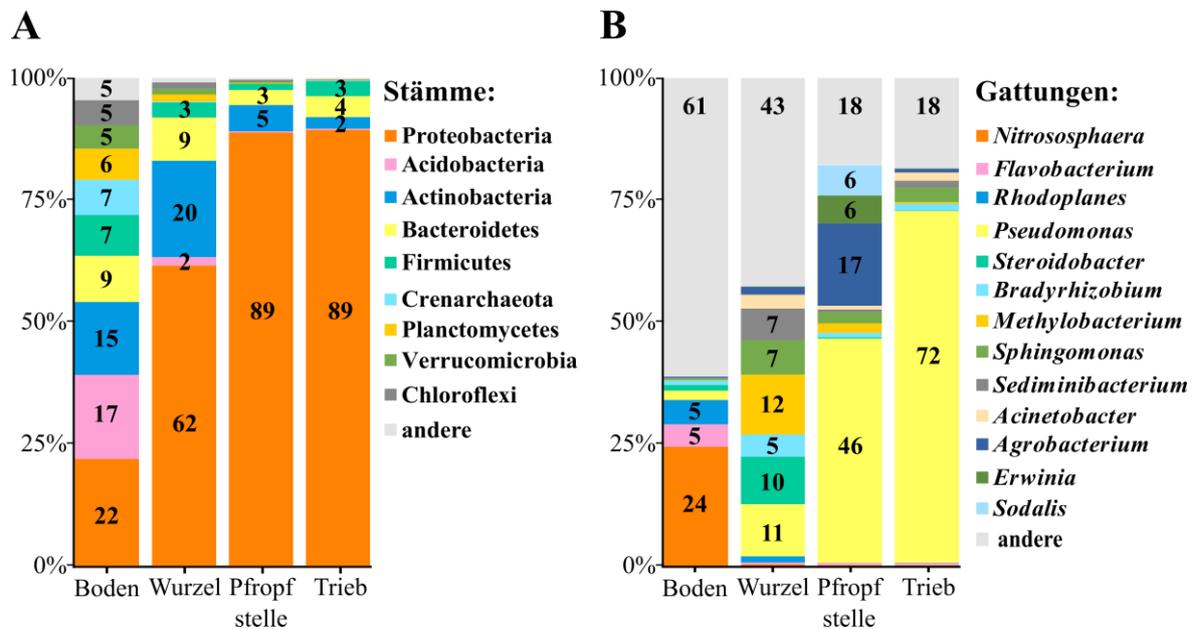


Abbildung 11 Taxonomische Zusammensetzung der Bakterienflora im Weinberg bei Himmelstadt, Unterfranken. Der prozentuale Anteil der Amplikonsequenzen einzelner Stämme (A) oder Gattungen (B) an der gesamten Sequenzanzahl je Probeentnahmestelle ist dargestellt. Stämme oder Gattungen die weniger als 0,5 % der Amplikonsequenzen repräsentieren wurden unter dem Begriff „andere“ zusammengefasst. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

3.2.3. Jahreszeiten beeinflussen die Bakterienflora

Der Einfluss der Jahreszeiten (Frühling, Herbst, Sommer) auf die Zusammensetzung der Bakterienflora der Probeentnahmestellen wurde mittels Bray-Curtis-Abständen untersucht und die Unterschiede, repräsentiert durch die Anzahl an Amplikonsequenzen pro OTU, in nicht metrischen, multidimensional Skalierungen (NMDS) dargestellt (**Abbildung 12A**). Der „*environmental fit*“ zeigte, dass die Zusammensetzung der Bakterienflora des Bodens ($R^2 = 29\%$, P-Wert < 0.001), der Pfropfstelle ($R^2 = 52\%$, P-Wert < 0.001) und des Triebes ($R^2 = 65\%$, P-Wert < 0.001) in Abhängigkeit der Jahreszeit signifikant variiert, wohingegen es in der Wurzel ($R^2 = 13\%$, P-Wert < 0,067) keine signifikante jahreszeitliche Beeinflussung gab.

Ob allerdings jede einzelne Jahreszeit oder alle Jahreszeiten insgesamt die Bakterienflora signifikant beeinflussen, wurde mittels GLM untersucht. Die Signifikanz der GLM je Probeentnahmestelle wurde mittels ANOVA bestimmt. Daraus ergab sich für den Trieb und die Pfropfstelle und den Boden im Gegensatz zur Wurzel eine signifikant unterschiedliche Bakterienflora pro Jahreszeit (Trieb: $F=72$, $P\text{-wert} < 0,001$, restliche Freiheitsgrade=32; Pfropfstelle: $F=58$, $P\text{-Wert} < 0,001$, restliche Freiheitsgrade = 33; Bode: $F=1$, $P\text{-Wert}=0,26$, restliche Freiheitsgrade=31; Wurzel: $F=8$, $P\text{-Wert} < 0,01$, restliche Freiheitsgrade=32). Die GLM-Analyse zeigte für den Trieb und die Pfropfstelle, aber nicht für den Boden und Wurzel, dass jede einzelne Jahreszeit die Zusammensetzung der Bakterienflora signifikant beeinflusst (Trieb: Frühling, $t\text{-Wert} = -9,0$, $P\text{-Wert} < 0,001$, Sommer, $t\text{-Wert} = -11,4$ $P\text{-Wert} < 0,001$, Herbst, $t\text{-Wert} = 9,6$, $P\text{-Wert} < 0,001$; Pfropfstelle: Frühling, $t\text{-Wert} = -5,5$, $P\text{-Wert} < 0,001$, Sommer, $t\text{-Wert} = -10,7$, $P\text{-Wert} < 0,001$, Herbst, $t\text{-Wert} = 7,6$, $P\text{-Wert} < 0,001$; Boden: Frühling, $t\text{-Wert} = 3,6$, $P\text{-Wert} < 0,01$, Sommer, $t\text{-Wert} = 0,07$ $P\text{-Wert} < 0,94$, Herbst, $t\text{-Wert} = -1,66$, $P\text{-Wert} = 0,11$; Wurzel: Frühling, $t\text{-Wert} = 0,52$, $P\text{-Wert} = 0,61$, Sommer, $t\text{-Wert} = -1,1$ $P\text{-Wert} < 0,28$, Herbst, $t\text{-Wert} = 0,26$, $P\text{-Wert} = 0,8$).

Das Klassifikationsverfahren „*Random Forest*“ (RF) gruppierte die Proben der oberirdischen Probeentnahmestellen anhand der Jahreszeiten mit einer geringeren Fehlerrate als die Proben der unterirdischen Probeentnahmestellen (**Abbildung 12B**). Die Fehlerrate der berechneten Klassifizierung zur tatsächlichen Klasse war für die Wurzeln am größten (21 %), gefolgt von der des Bodens (11 %) und den oberirdischen Probeentnahmestellen Pfropfstelle (8 %) und Trieb (9 %). Somit zeigten zwei unterschiedliche statistische Verfahren, GLM und das Klassifikationsverfahren „*Random Forest*“, dass die Zusammensetzung der Bakterienflora, insbesondere in den oberirdischen Probeentnahmestellen (Pfropfstelle und Trieb), von jeder Jahreszeit beeinflusst wurde.

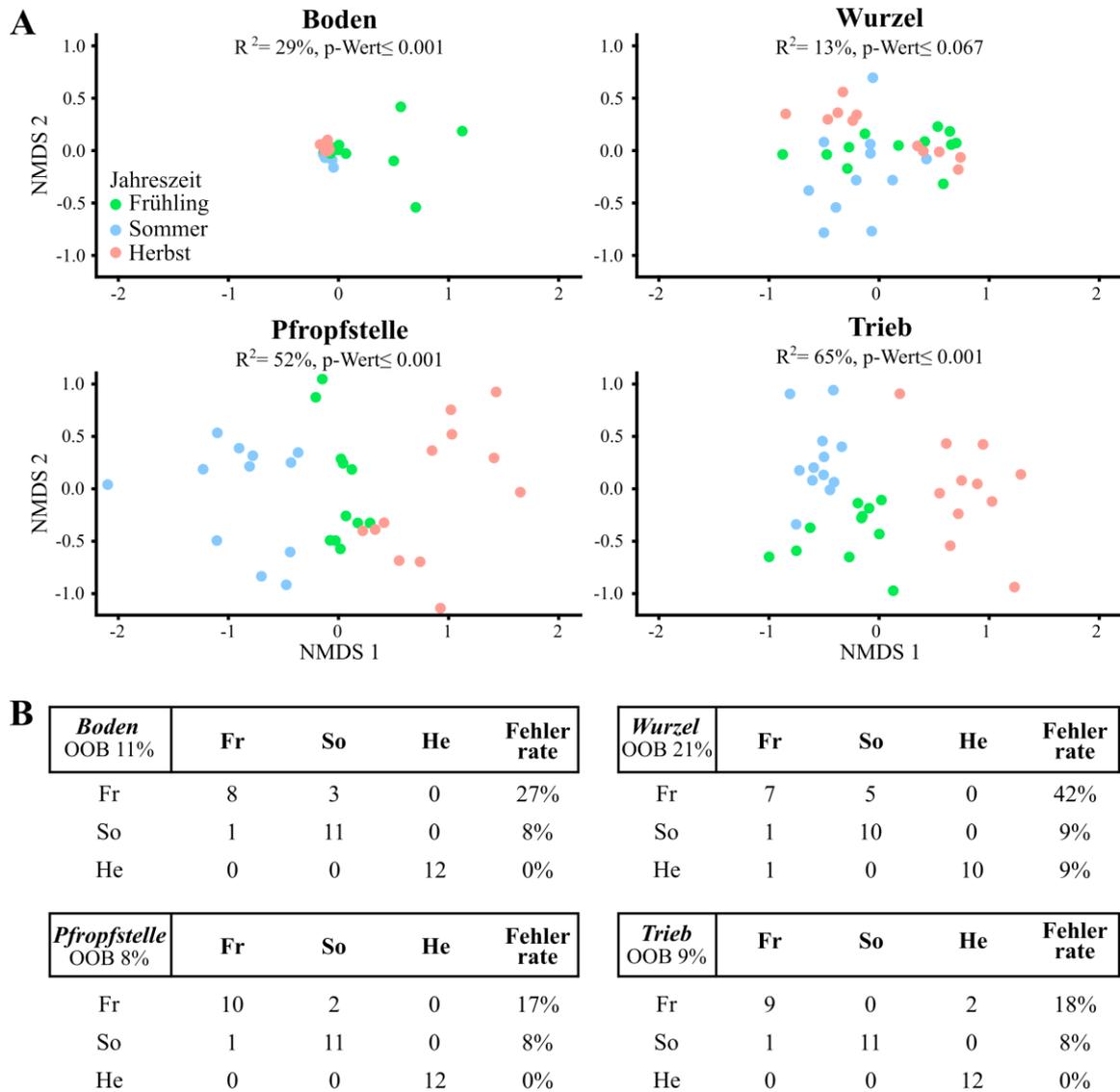


Abbildung 12 Einfluss der Jahreszeiten auf die Bakterienflora in Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb. (A) Die Punkte in der NMDS-Ordination mit Bray-Curtis-Abständen stehen für jeweils eine Probe und sind je nach Jahreszeit unterschiedlich gefärbt. Proben mit ähnlicher Bakterienflora gruppieren. Der „environmental fit“ (Bestimmtheitsmaß = R^2) zeigte, bei einem p-Wert < 0.001 des Permutationstests, eine signifikante Korrelation der Bakterienflora für die Jahreszeiten an. (B) Das Klassifikationsverfahren „Random Forest“ teilte die Proben jeder Probeentnahmestelle in die Klassen, Frühling (Fr), Sommer (So) und Herbst (He) ein. Die berechnete Klasse (Spalten) wurde mit der bekannten Klasse (Zeilen) der Probe verglichen. Die OOB (Out-of-bag)-Wert-Analyse steht für den prozentualen Anteil an falsch zugeordneten Proben des gesamten Datensatzes, wohingegen die Fehlerrate den prozentualen Anteil der falsch zugeordneten Proben innerhalb einer Klasse angibt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

3.2.4. Die Bakterienflora wird an der Pfropfstelle deutlich von der Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflusst

Der Einfluss der Wurzelhalsgallenerkrankung auf die Zusammensetzung der Bakterienflora wurde für die jeweiligen Probeentnahmestellen mittels der Bray-Curtis-Abstände untersucht und die Unterschiede, repräsentiert durch die Anzahl an Amplikonsequenzen je OTU, in nicht metrischen, multidimensionalen Skalierungen (NMDS) dargestellt (**Abbildung 13A**). Keine signifikante Gruppierung der Bakterienfloren anhand der Wurzelhalsgallenerkrankung zeigte sich bei den Probeentnahmestellen Boden („*environmental fit*“, $R^2 = 0\%$, $p\text{-Wert} \leq 0,91$), Wurzel ($R^2 = 1\%$, $p\text{-Wert} \leq 0,76$) und Trieb ($R^2 = 4\%$, $p\text{-Wert} \leq 0,23$). Nur die Bakterienflora der Pfropfstellen gruppieren sich signifikant unterschiedlich je nachdem, ob mit oder ohne Wurzelhalsgalle ($R^2 = 25\%$, $p\text{-Wert} \leq 0,001$). Mit den Werten der zweiten NMDS-Achse, die Unterschiede in der Bakterienflora der Pfropfstelle darstellt, konnte ein aussagekräftiges GLM erstellt werden (Varianzanalyse ANOVA: $F = 79$, $P\text{-Wert} < 0,001$, restliche Freiheitsgrade=34). Das GLM bestätigte die signifikanten Unterschiede in der Bakterienflora in der Pfropfstelle mit ($t\text{-Wert} = -8,9$, $p\text{-Wert} < 0,001$) und ohne Wurzelhalsgallenerkrankung. ($t\text{-Wert} = 6,3$, $p\text{-Wert} < 0,001$).

Die „*Random Forest*“-Klassifizierung gruppierte die Proben der Pfropfstellen ebenfalls in solche mit und ohne Wurzelhalsgallen anhand der Anzahl an Amplikonsequenzen je OTU (**Abbildung 13B**). Die Fehlerrate der berechneten Klassifizierung im Bezug zu den bekannten Klassen war im Vergleich zum Boden (40 %), zur Wurzel (59 %) und zum Trieb (37 %) in der Pfropfstelle (8 %) mit Abstand am kleinsten. Es konnte herausgearbeitet werden, dass von allen Probeentnahmestellen nur die bakterielle Flora der Pfropfstelle signifikant durch die Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflusst wurde.

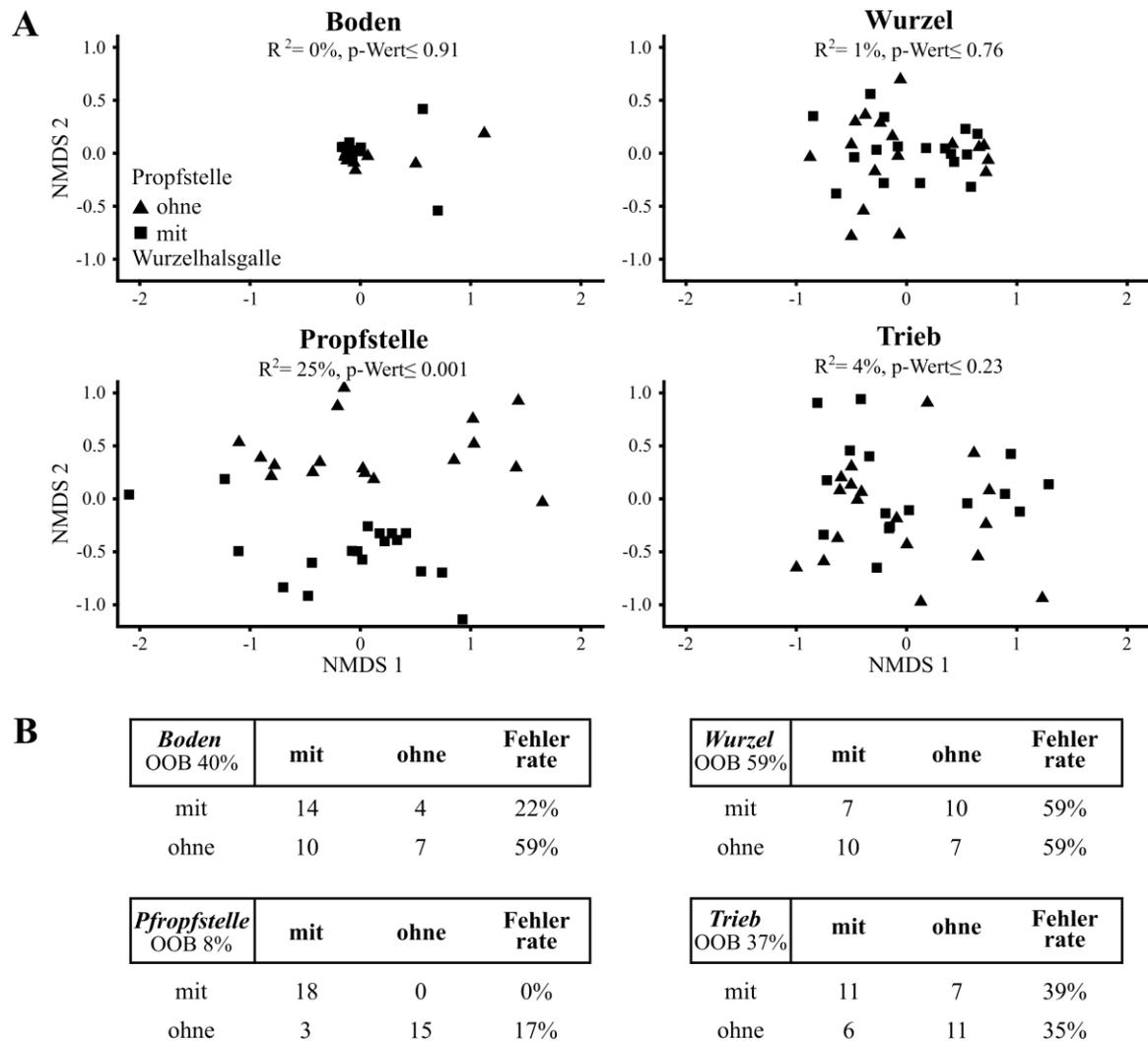


Abbildung 13 Einfluss der Wurzelhalsgallenerkrankung auf die Bakterienflora in Boden, Wurzel, Pfropfstelle und Trieb basierend auf der Häufigkeit der OTUs. (A) In der NMDS-Ordination mit Bray-Curtis-Abständen gruppierten sich die Proben mit ähnlicher Bakterienflora. Der „environmental fit“ (Bestimmtheitsmaß = R^2) zeigte, bei einem p -Wert < 0.001 des Permutationstests, eine signifikante Korrelation der Bakterienflora mit der Wurzelhalsgallenerkrankung an. (B) Das Klassifikationsverfahren „Random Forest“ teilte die Proben je Probeentnahmestelle in die Klassen Rebstock mit und ohne Wurzelhalsgalle ein. Die berechnete Klasse (Spalten) wurde mit der bekannten Klasse (Zeilen) der Probe verglichen. Der OOB (Out-of-bag)-Wert steht für den prozentualen Anteil an falsch zugeordneten Proben des gesamten Datensatzes, wohingegen die Fehlerrate den prozentualen Anteil der falsch zugeordneten Proben innerhalb einer Klasse listet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

3.2.5. Bakterielle Diversität in Pflropfstellen mit und ohne Wurzelhalsgallenerkrankung

Zur Erfassung der bakteriellen Diversität in den beiden Pflropfstellen mit und ohne Wurzelhalsgallentumor wurden die Amplikondatensätze jeder der drei Jahreszeiten (Frühling, Sommer, Herbst) miteinander verglichen. Die Anzahl an OTUs (Reichhaltigkeit) ist im Frühling (p-Wert $\leq 0,065$), Sommer (p-Wert $\leq 0,092$) und Herbst (p-Wert $\leq 0,065$) im Tumor größer als in der Pflropfstelle ohne Tumor, wobei die Unterschiede nicht stark signifikant waren (**Abbildung 14A**). In der Pflropfstelle ohne Tumor war die Anzahl an verschiedenen OTUs im Herbst deutlich niedriger im Vergleich zum Frühjahr (p-Wert $\leq 0,004$) und Sommer (p-Wert $\leq 0,005$). Wenn zusätzlich zur Anzahl an unterschiedlichen OTUs auch deren jeweilige Häufigkeit einbezogen wurde, war die alpha-Diversität (Shannon-Index) im Wurzelhalsgallentumor im Sommer höher als im Frühling (**Abbildung 14B**, p-Wert $\leq 0,002$) und Herbst (p-Wert $\leq 0,002$). Da die Anzahl an unterschiedlichen OTUs (Reichhaltigkeit) in den Tumorproben über die Jahreszeiten konstant blieb, bedeutete ein erhöhter Shannon-Index im Sommer, dass die verschiedenen OTUs in einer ausgewogenen Anzahl vertreten waren. Im Frühling und Herbst hingegen dominierten einige wenige OTUs die bakterielle Zusammensetzung im Wurzelhalsgallentumor.

Betrachtete man nur die drei am häufigsten vorkommenden OTUs in den Datensätzen der beiden Pflropfstellen, wurde deutlich, dass drei OTUs, Vertreter von *A. vitis* (OTU_00003), *Pseudomonas* (OTU_00005) und *Enterobacter* (OTU_00008), die mikrobielle Zusammensetzung im Wurzelhalsgallentumor im Frühjahr (53 %) und Herbst (58 %) mit über der Hälfte aller Amplikonsequenzen dominierten (**Abbildung 14C**). Im Sommer waren sie mit einem Anteil von 19 % an allen Amplikons deutlich seltener. Die drei häufigsten OTUs

bildeten die Kernmikroflora in der Wurzelhalsgalle. Drei weitere OTUs hatten ebenfalls Anteil an der Kernmikroflora im Wurzelhalsgallentumor (Gammaproteobakterium: OTU_3436, Burkholderiales: OTU_0007, *Agrobacterium*: OTU_0032), da diese in 80 % der Tumorproben mit mehr als 20 Amplikonsequenzen vorkamen.

In Pflropfstellen ohne Tumor waren es zu jeder Jahreszeit drei unterschiedliche OTUs, deren Amplikonsequenzen am häufigsten vorkamen (**Abbildung 14C**): Im Frühling Vertreter von *Pseudomonas* (OTU_0055, OTU_2368, OTU_4255); im Sommer *Pseudomonas* (OTU_0005), *Sphingomonas* (OTU_0052), und *Curtobacterium* (OTU_0011) sowie im Herbst *Pseudomonas* (OTU_0055), *Ralstonia* (OTU_0021) und *Erwinia* (OTU_7832). Deren prozentualer Anteil an der gesamten Anzahl an Amplikons war zudem sehr ähnlich (**Abbildung 14C**, Frühling: 42 %, Sommer: 57 %, Herbst: 36 %). Keine OTU in den gesunden Pflropfstellen entsprach der Definition der Kernmikroflora mit mehr als 20 Amplikons in 80 % der Pflropfstellen ohne Tumor. Somit war die Bakterienflora in Tumoren über die Jahreszeiten beständiger als in Pflropfstellen ohne Tumor.

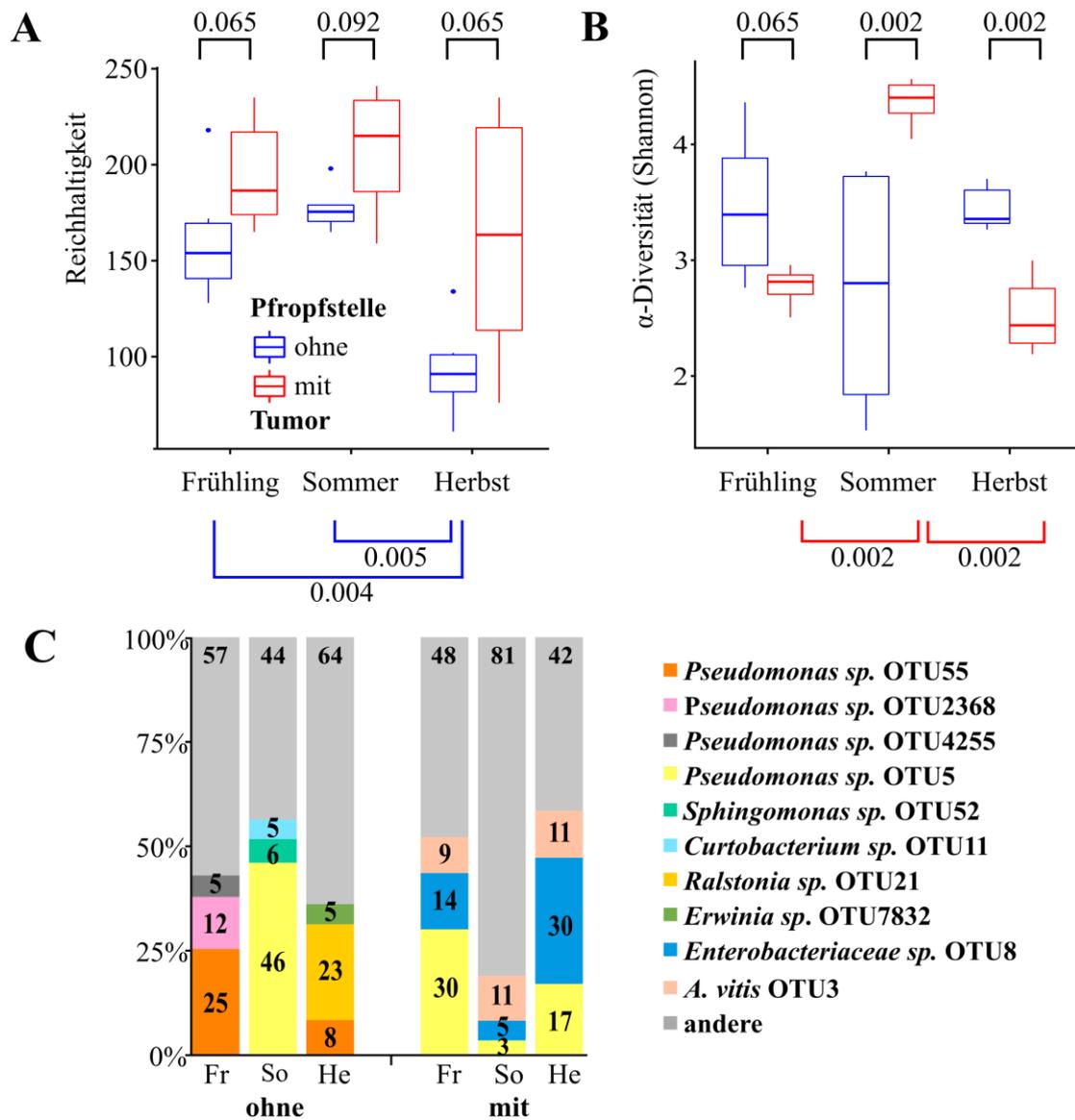


Abbildung 14 Biodiversität und taxonomische Einheiten (OTU) in den Pfropfstellen der Rebstöcke mit und ohne Wurzelhalsgallentumor. (A) Anzahl unterschiedlicher bakterieller OTUs (Reichhaltigkeit). (B) Anzahl der bakteriellen OTUs unter Berücksichtigung ihrer Häufigkeit (alpha-Diversität – Shannon-Index). Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummentest und ein p -Wert $\leq 0,01$ wurde als signifikant bewertet. (C) Prozentuale Anteile der Amplikonsequenzen der drei häufigsten OTUs an der gesamten Anzahl an Amplikons in Pfropfstellen mit und ohne Tumor im Frühling (Fr), Sommer (So) und Herbst (He). Der Begriff „andere“ fasste alle OTUs zusammen, die nicht zu den drei am häufigsten vorkommenden gehörten. Die Abbildung wurde modifiziert nach Faist et al. 2016.

Nach einer EdgeR-fold-change-Analyse (2.4.3) unterschied sich die Anzahl an Amplikons bei 28 OTUs signifikant zwischen den Pflanzstellen mit und ohne Tumor (**Tabelle 2**). Im Tumor waren 26 OTUs signifikant häufiger vorhanden, wovon neun OTUs ausschließlich im Tumor detektiert werden. Zwei OTUs (*A. vitis*, OTU_0003 und ein unbekannter Vertreter der Gammaproteobacteria, OTU_3436) waren außerdem zu jeder Jahreszeit und neun sowohl im Frühling als auch im Herbst im Tumor im Vergleich zu gesunden Pflanzstellen signifikant erhöht. Im Sommer kamen drei der fünf signifikant unterschiedlichen Bakterien seltener im Tumor vor als in der gesunden Pflanzstelle. Es handelte sich um einen Vertreter von *Pseudomonas* (OTU_0005), von *Curtobacterium* (OTU_0011) und von *Sphingomonas* (OTU_0052). Die Fold-Change-Analyse zeigte, dass der Wurzelhalsgallentumor eine charakteristische Bakterienzusammensetzung besaß, die zusätzliche Bakterien im Vergleich zur gesunden Pflanzstelle beinhaltet.

Vergleich (A / B)	Mittelwert		log ₂ FC	Stärke	log ₂ CPM	p-Wert	Güte		Klasse	bakterielle Klassifikation		
	A	B					FDR	FDR		Ordnung	Gattung	Spezies
with / without	1191	8	7.0	15.3	3.19E-13	4.71E-10	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	vitis	OTU_0003	
with / without	4159	94	5.4	17.1	7.06E-07	2.98E-04	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	NA	OTU_0005	
with / without	1872	10	7.4	15.9	4.03E-13	5.10E-10	γ-Proteobacteria	Enterobacteriales	NA	NA	OTU_0008	
with / without	121	8	3.7	12.1	1.65E-09	1.46E-06	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Novosphingobium	NA	OTU_0022	
with / without	985	1	9.1	15.0	3.27E-37	2.89E-33	γ-Proteobacteria	Enterobacteriales	Sodalis	NA	OTU_0043	
with / without	56	5	3.2	11.1	1.41E-06	5.66E-04	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacterium	NA	OTU_0065	
with / without	92	0	6.4	11.7	1.87E-14	3.31E-11	γ-Proteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonas	NA	OTU_0076	
with / without	107	2	5.1	11.9	3.34E-08	2.47E-05	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Bosca	genosp.	OTU_0180	
with / without	26	0	4.4	10.1	5.79E-07	2.70E-04	γ-Proteobacteria	Xanthomonadales	NA	NA	OTU_0188	
with / without	45	0	5.4	10.7	8.63E-17	1.91E-13	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacterium	NA	OTU_0248	
with / without	24	0	4.3	10.0	3.14E-07	1.82E-04	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Pedobacter	NA	OTU_0271	
with / without	24	0	4.5	10.0	6.74E-13	7.46E-10	α-Proteobacteria	Rhodospirillales	NA	NA	OTU_0288	
with / without	22	0	4.0	9.9	2.87E-09	2.31E-06	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonas	NA	OTU_0421	
with / without	23	1	3.7	9.9	4.72E-08	3.22E-05	γ-Proteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	OTU_1129	
with / without	1	244	-7.2	13.0	4.03E-07	2.10E-04	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	NA	OTU_2368	
with / without	875	1	9.1	14.8	9.27E-30	4.11E-26	γ-Proteobacteria	NA	NA	NA	OTU_3436	
with / without	523	0	8.7	14.1	1.78E-18	5.26E-15	γ-Proteobacteria	Enterobacteriales	Erwinia	NA	OTU_7832	
with / without	50	0	5.3	10.9	7.65E-08	4.84E-05	Actinobacteria	Actinomycetales	NA	NA	OTU_8550	
with / without	120	11	3.3	12.6	2.71E-07	4.80E-04	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	vitis	OTU_0003	
with / without	38	1380	-5.1	16.0	9.48E-08	4.20E-04	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	NA	OTU_0005	
with / without	1	139	-6.0	12.7	1.13E-09	1.00E-05	Actinobacteria	Actinomycetales	Currobacterium	NA	OTU_0011	
with / without	4	171	-5.1	13.0	1.58E-07	4.27E-04	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonas	NA	OTU_0052	
with / without	37	1	4.4	11.0	1.93E-07	4.27E-04	γ-Proteobacteria	NA	NA	NA	OTU_3436	
with / without	1230	1	9	16	1.E-30	2.E-27	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	vitis	OTU_0003	
with / without	1855	2	9	16	8.E-22	1.E-18	γ-Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonas	NA	OTU_0005	
with / without	345	1	8	14	2.E-10	2.E-07	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Methylobacterium	NA	OTU_0006	
with / without	509	11	5	14	2.E-09	1.E-06	β-Proteobacteria	Burkholderiales	NA	NA	OTU_0007	
with / without	3315	8	9	17	1.E-13	1.E-10	γ-Proteobacteria	Enterobacteriales	NA	NA	OTU_0008	
with / without	87	8	3	12	7.E-07	3.E-04	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonas	NA	OTU_0013	
with / without	168	1	6	13	4.E-15	4.E-12	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Novosphingobium	NA	OTU_0022	
with / without	252	15	4	13	1.E-08	6.E-06	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Agrobacterium	NA	OTU_0032	
with / without	352	0	8	14	1.E-61	1.E-57	γ-Proteobacteria	Enterobacteriales	Sodalis	NA	OTU_0043	
with / without	61	1	5	11	2.E-47	7.E-44	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacterium	NA	OTU_0065	
with / without	103	0	6	12	2.E-15	3.E-12	γ-Proteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonas	NA	OTU_0076	
with / without	87	1	5	12	1.E-06	6.E-04	α-Proteobacteria	Rhizobiales	Methyloplia	NA	OTU_0121	
with / without	67	1	5	11	1.E-10	1.E-07	Cytophagia	Cytophagales	Dyadobacter	NA	OTU_0144	
with / without	26	1	3	10	2.E-06	8.E-04	Actinobacteria	Actinomycetales	Salinibacterium	NA	OTU_0210	
with / without	25	1	4	10	1.E-09	9.E-07	α-Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonas	NA	OTU_0421	
with / without	26	1	4	10	7.E-16	1.E-12	β-Proteobacteria	Burkholderiales	NA	NA	OTU_3153	
with / without	611	1	8	15	5.E-38	1.E-34	γ-Proteobacteria	NA	NA	NA	OTU_3436	

Tabelle 2 Taxonomische Einheiten (OTUs) mit einem signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl an Amplikonsequenzen zwischen Pfropfstellen mit (A) und ohne (B) Wurzelhalsgalle im Frühling, Sommer und Herbst. Die Unterschiede wurden als log₂FC und log₂CPM (Counts Per Million) angegeben. Die statistische Analyse erfolgt mittels zweiseitiger Berechnung des p-Werts und des an mehrfache Berechnungen angepassten p-Werts nach Benjamin Höchberg (FDR). Als signifikant unterschiedlich galt ein FDR <0.001.

Das Isolat 42 (*Serratia rubidaea*, **Anhang Tabelle 1**) stammte aus dem Rebstock 1 (**Abbildung 4**) mit Wurzelhalsgalle und entspricht OTU_3436 nach den Ergebnissen der Hochdurchsatzsequenzierung. OTU_3436 war Teil der Kernmikroflora im Wurzelhalsgallen und dort zu jeder Jahreszeit erhöht im Vergleich zur gesunden Pfropfstelle vertreten (**Tabelle 2**). Auch das Isolat Nr. 48 (*A. vitis*, **Anhang Tabelle 1**) stammte aus der Wurzelhalsgalle von Rebstock 1. Somit war eine Interaktion zwischen den beiden im Tumor möglich. Um die Annahme zu überprüfen, wurde Isolat 42 mit dem Isolat 48 auf Agarnährmedium ko-kultiviert (2.2.4). Das Isolat 42 bildete einen Hemmhof im Bakterienrasen des *A. vitis* Isolats 48 (**Abbildung 15**).

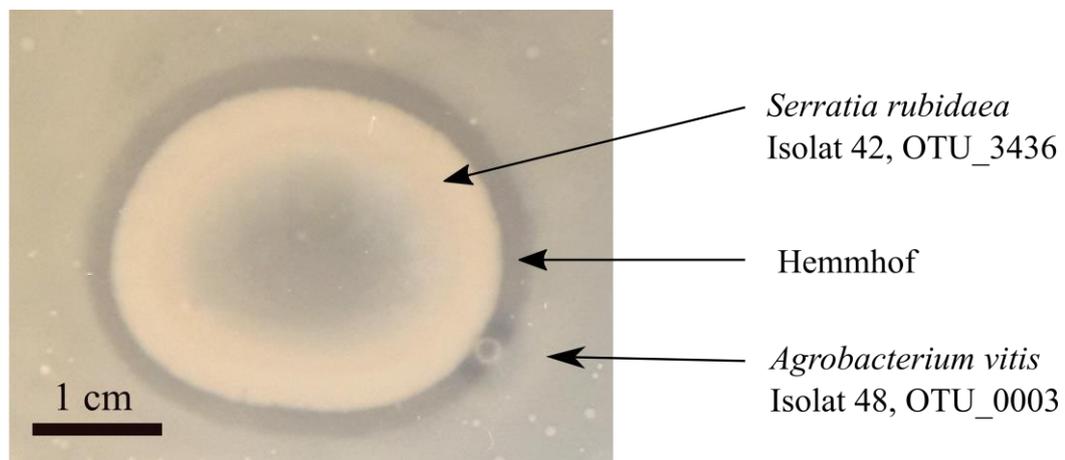


Abbildung 15 Ko-Kultivierung von Isolat 42 (*Serratia rubidaea*) und Isolat 48 (*A. vitis*, Bakterienrasen) auf YEB-Medium. Um das Isolat 42 ist ein durchsichtiger Hemmhof zu sehen.

Um die Herkunft der Bakterien im Wurzelhalsgallentumor zu bestimmen, wurden die OTUs der Pfropfstellen mit denen von Boden, Wurzel und Trieb verglichen. Ein gepaarter Wilcoxon-Test bestätigte, dass Tumore an den Pfropfstellen mehr gemeinsame Bakterien mit den Wurzeln ($p\text{-Wert} \leq 0.024$) und dem Boden ($p\text{-Wert} \leq 0.003$) hatten als gesunde Pfropfstellen. Umgekehrt hatten gesunde Pfropfstellen mehr gemeinsame Bakterien mit dem Trieb als die tumorbildenden Pfropfstellen ($p\text{-Wert} \leq 0.009$). Die Analyse der gemeinsamen Bakterien deutete auf die Einwanderung der Bakterien aus dem Boden oder der Wurzel in den Tumor hin.

3.3. Für die Bildung von Wurzelhalsgallen werden nur virulente *Agrobacteria* benötigt

Ob die Bakterien im Wurzelhalsgallentumor, welche ausschließlich bzw. erhöht in Pfropfstellen mit Wurzelhalsgallentumor vorkamen (**Tabelle 2**), für die Tumorentstehung obligatorisch waren, wurde an 4 Wochen alten, unter sterilen Bedingungen auf Nährmedien kultivierten Rebstöcken untersucht. Die Sprossachsen der Weinpflänzchen wurden mit *A. vitis* HF7, einem virulenten Isolat vom Weinberg bei Himmelstadt oder einem nicht-onkogenen *Agrobacterium*-Laborstamm (GV3101) inokuliert (**Abbildung 5**). Nicht infizierte Weinpflänzchen dienten als Kontrollen. Vier Wochen nach der Inokulation wurde die bakterielle Zusammensetzung von insgesamt 18 Proben (**Abbildung 16**) mittels Amplikonssequenzierung analysiert (2.4.3).

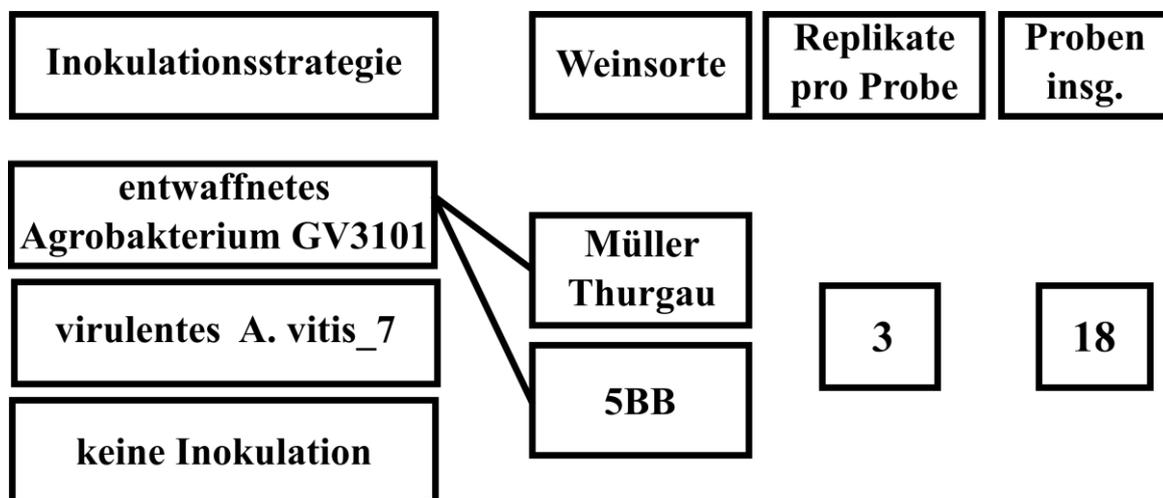


Abbildung 16 Schema vom Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rolle der Tumorbakterienflora beim Wachstum eines Wurzelhalsgallentumors.

Von 568.855 Amplikonssequenzen blieben nach dem Entfernen der Amplikonssequenzen für Plastiden und Mitochondrien 42.700 übrig. Damit konnten gerade einmal 7,5 % der Amplikonssequenzen Bakterien zugeordnet werden. Keine OTU wurde durchschnittlich häufiger

als 15-mal in den nicht-inokulierten Proben detektiert, somit war das Vorkommen von endophytischen Bakterien in den steril kultivierten Weinpflänzchen unwahrscheinlich. In Sprossachsen, die mit dem nicht-virulenten Laborstamm GV3101 inokuliert wurden und deshalb keine Tumore bildeten, lagen drei OTUs in erhöhter Anzahl im Vergleich zu Weinpflänzchen vor, die mit *A. vitis* HF7 inokuliert wurden (GV3101, OTU_0507), ein weiteres *Agrobacterium* (OTU_0032) und ein *Curtobacterium* (OTU_0011, **Tabelle 3**, EdgeR < 0,001). Weinpflänzchen, die mit *A. vitis* HF7 inokuliert wurden und deshalb Tumore induzierten, enthielten eine signifikant erhöhte Anzahl an Amplikons ausschließlich von *A. vitis* HF7 (OTU_0003, **Tabelle 3**, EdgeR < 0,001).

Tabelle 3 Vergleich der bakterielle Flora von steril kultivierten Weinpflänzchen ohne und mit Tumor (ohne Tu, mit Tu). Die Verhältnisse der durchschnittlichen Sequenzanzahl der Gruppe mit (inokuliert mit *A. vitis* HF7) versus der ohne Tumor (inokuliert mit *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) wurde als \log_2 Fold Change (logFC) und \log_2 pro einer Millionen Zählereignissen (counts per million, LogCPM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte nach Benjamin-Hochberg (FDR) mit angepasstem p-Wert. Als signifikant unterschiedlich galt $FDR < 0,001$. OTUs, Operational Taxonomic Units.

Identität der Bakterien	Amplikonanzahl		Log FC	Log CPM	Angepasster p-Wert: FDR
	Ohne Tu	Mit Tu			
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 (OTU_0507)	3.591	78	5,5	16,5	6,29E-63
<i>Agrobacterium</i> (OTU_0032)	124	1	5,8	11,8	1,03E-64
<i>A. vitis</i> (OTU_0003)	6	2.758	-8,6	16,1	8,09E-33
<i>Curtobacterium</i> (OTU_0011)	30	1	4,1	10,1	3,45E-07

Somit war nur das tumorinduzierende Pathogen, aber kein anderes Bakterium im Tumor der Weinpflänzchen auf Nährmedium erhöht. Dies deutete darauf hin, dass kein weiteres Bakterium zur Tumorinduktion und Tumorentwicklung benötigt wurde. In Tumorproben

wurden 78 Amplikonsequenzen der OTU_0507 gefunden, obwohl diese Weinpflänzchen nur mit *A. vitis*, OTU_0003, und nicht mit GV3101, OTU_507, inokuliert wurden. Die Infektionsnadel wurde nur abgeflammt aber nicht von DNA-gereinigt (2.3), somit könnte es sich um DNA-Reste vorheriger Inokulationen gehandelt haben.

3.4. Lokalisation von *Agrobacterium* im Tumorgewebe von Weinpflanzen

Die Lokalisation von virulenten *Agrobacterium tumefaciens* im Tumorgewebe von steril kultivierten Weinpflänzchen erfolgte mittels Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie („*fluorescence lifetime imaging microscopy*“, FLIM) unter Verwendung eines GFP-markierten *A. tumefaciens*-Isolats (2.2.2). Die Lebenszeit des GFP-Reporterproteins von 2,3 ns wurde anhand einer *Agrobacterium*-Suspension ermittelt (**Anhang Tabelle 2A**) und mit den Fluoreszenzlebenszeiten in Tumorschnitten ohne das GFP-markierte *A. tumefaciens* (**Anhang Tabelle 2B**) und Tumorschnitten mit dem GFP-markierten *A. tumefaciens* (**Anhang Tabelle 2C**) verglichen.

In den Tumorquerschnitten ohne das GFP-markierte *A. tumefaciens*, der Negativkontrolle, (**Anhang Tabelle 2B** und **Abbildung 17**) unterschied sich die Lebenszeit der *Agrobacterium*-Fluoreszenz nicht von der Lebenszeit der Autofluoreszenz des Tumorrandes (**Abbildung 17A**, gelb-grünlich) und im Innern des Tumorgewebes (**Abbildung 17B, C**). Weitere drei Aufnahmen befinden sich in der **Anhang Abbildung 2**.

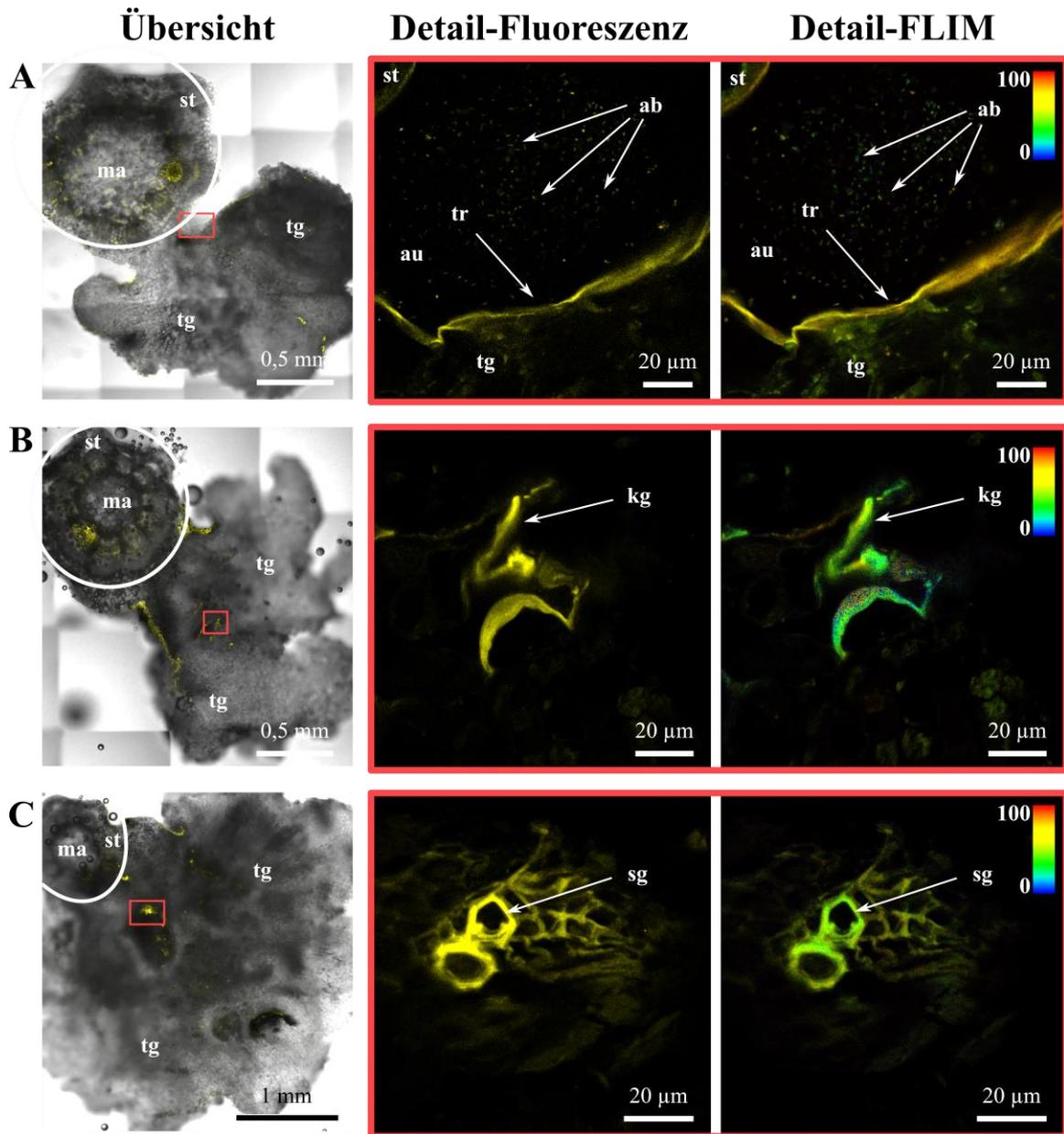


Abbildung 17 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, die mit einem nicht-GFP-markierten, virulenten *Agrobacterium tumefaciens* erzeugt wurden. A-C Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 5 (Anhang Tabelle 2B) von einem Bildausschnitt am Tumorrand (tr) mit dem nicht-fluoreszierenden *A. tumefaciens* (ab) außerhalb des Schnittes (au). Bilderreihe (B) und (C) zeigen die Autofluoreszenz des kontrastreichen Gewebes (kg) beziehungsweise der sklerenchymatischen Gewebe (sg) im Tumor. Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme wurden überlagert und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und Detektion aller Photonen zwischen 505-565nm. Die Farbskala zeigt den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der gesamten Intensität eines Pixels.

Das GFP-markierte, virulente *A. tumefaciens* konnte hingegen im Tumorgewebe von Weinpflänzchen mittels FLIM deutlich von der Autofluoreszenz des Tumorgewebes unterschieden werden (Abbildungen 19-21). Die Farbskala in den Detail-FLIM-Aufnahmen ermöglichte eine Differenzierung zwischen Autofluoreszenz des Tumorgewebes und der GFP-basierten Fluoreszenz des *Agrobacteriums*. Mit Hilfe der FLIM-Methode wurden virulente *A. tumefaciens* an drei unterschiedlichen Stellen im Tumor detektiert.

Sieben FLIM-Untersuchungen an drei Tumoren zeigten das virulente *A. tumefaciens* am äußeren Bereich des Tumorgewebes (**Abbildung 18** und **Anhang Abbildung 3**). Hier bildete der Tumor bedingt durch sein unkontrolliertes Wuchern eine Tasche (**Abbildung 18A**, Übersicht, roter Rahmen). So traten die *A. tumefaciens* (ab) in der Tasche als rote Punkte in der Detail-FLIM-Aufnahme auf und lagen dort in hoher Zelldichte vor (vgl. **Abbildung 18A** Mitte und Rechts). Einzelne Bakterien waren auch außerhalb der Tasche als rote Punkte zu erkennen. Diese Punkte hatten einen sehr hohen Anteil an GFP-Intensität. Auch am äußeren Rand des Tumorgewebes befanden sich *A. tumefaciens* in großer Zahl, erkennbar an den roten Punkten in **Abbildung 18B**, rechts. Das Vorkommen von *A. tumefaciens* 3-5 Monate nach Inokulation zeigte, dass sie auf der Oberfläche des Tumors überleben konnten, denn *A. tumefaciens* wurde mit einer Nadel auf eine verwundete Stängeloberfläche appliziert (2.3)

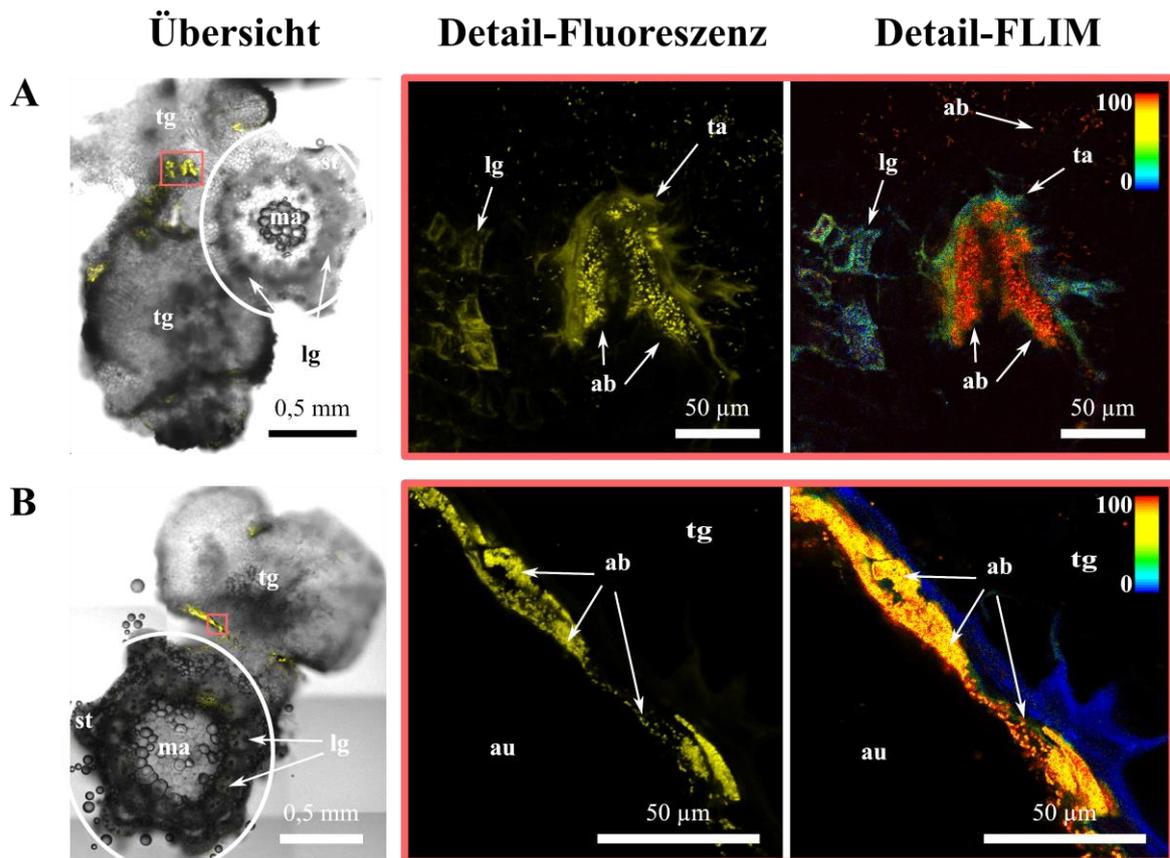


Abbildung 18 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe mit GFP-markiertem, virulentem *Agrobacterium tumefaciens* (ab) im äußeren Bereich. A-B Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 11 (Anhang Tabelle 2C) mit *A. tumefaciens* in einer taschenförmigen Einbuchtung (ta) und (B) Messung Nummer 14 mit *A. tumefaciens* in der Nähe des Tumorrandes (au). Die Übersichtsbilder sind eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565 nm. Die Farbskala repräsentiert den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtintensität pro Pixel.

Neben den *A. tumefaciens* an der Oberfläche wurden auch welche in den kontrastreichen Bereichen der Tumorquerschnitte detektiert (Abbildung 19, kg, Anhang Abbildung 4). Hierbei handelte es sich um abgestorbenes Gewebe, aus dem Interzellularen entstehen. Dort lagt *A. tumefaciens* erneut dicht gedrängt vor.

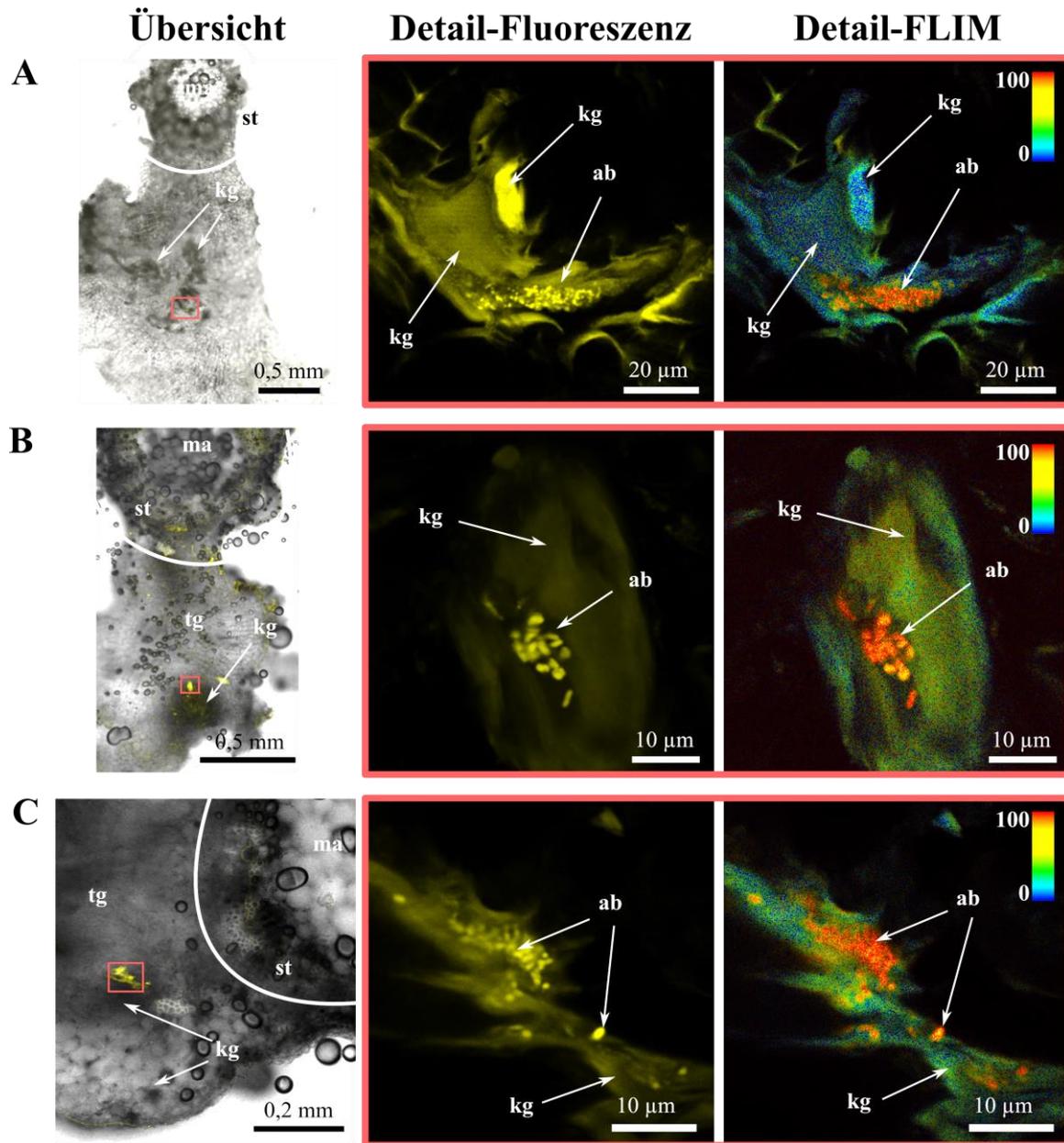


Abbildung 19 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, mit GFP-markierten, virulenten *A. tumefaciens* (ab) in kontrastreichen Geweben (kg). A-C Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 16 (**Anhang Tabelle 2C**), (B) Messung Nr. 17 und (C) Messung Nr. 20. Die Übersichtsbilder sind eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565 nm. Die Farbskala repräsentiert den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtintensität pro Pixel.

Zudem wurde *A. tumefaciens* im Leitgewebe bei vier, mittels FLIM untersuchten Tumoren, lokalisiert (Abbildung 20, Anhang Abbildung 5). Dort kamen sie sich in Leitgefäßen (Abbildung 20A) und mit Leitgefäßen assoziierten, sklerenchymatischen Geweben vor (Abbildung 20B, C).

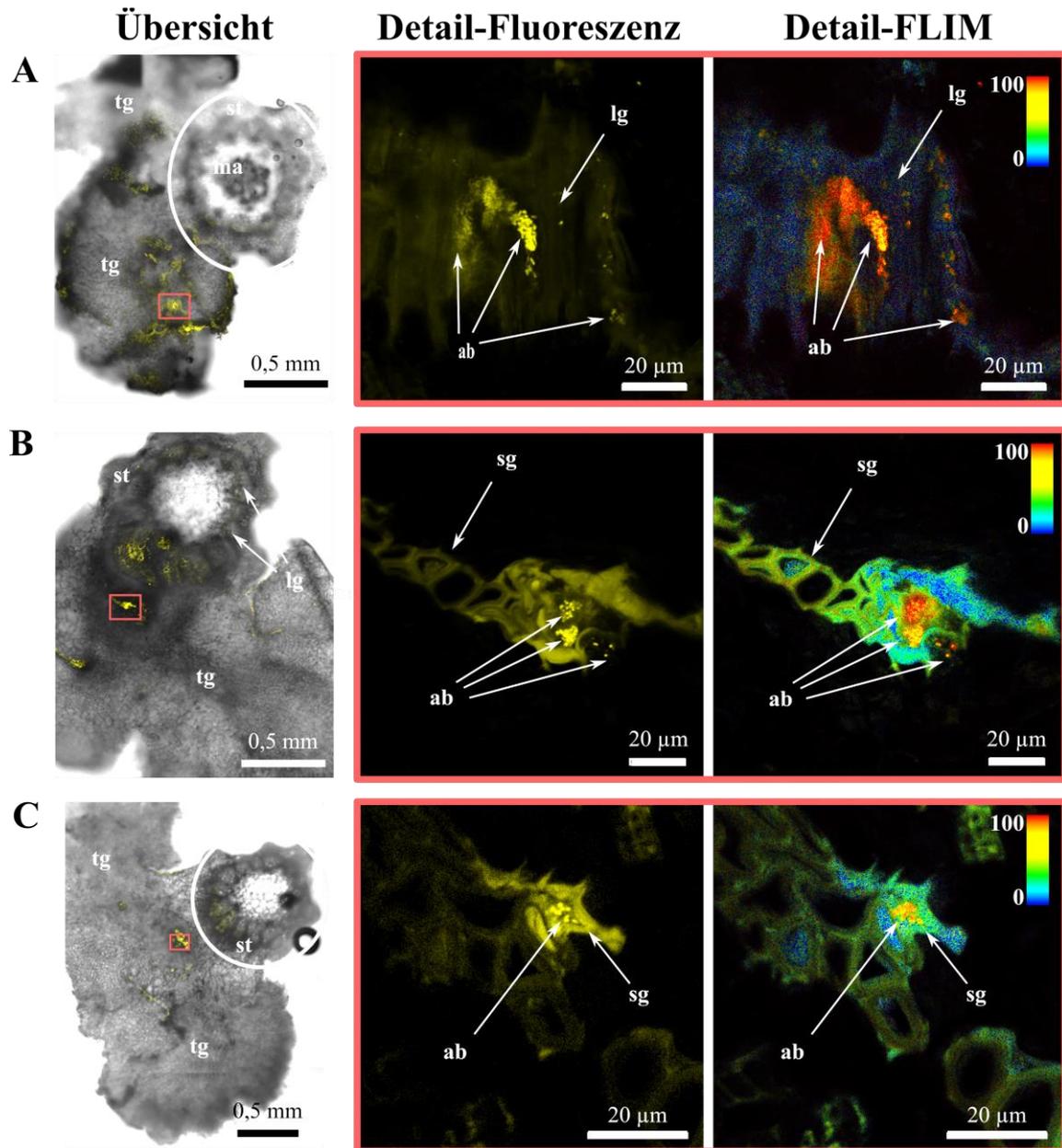


Abbildung 20 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben mit GFP-markierten, virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (ab) in oder assoziiert mit Leitgeweben (lg). A-C Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 21 (Anhang Tabelle 2C). In (B) Messung Nr. 23 und (C) Messung Nr. 22

wurden *A. tumefaciens* in sklerenchymatischen Geweben (sg) detektiert. Die Übersichtsbilder sind Überlagerungen von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565nm. Die Farbskala repräsentiert den Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtfluoreszenzintensität pro Pixel.

Virulente *A. tumefaciens* sammelten sich also bevorzugt in den Mikro-Nischen an der Tumeroberfläche, in den Interzellularen und Leitgefäßen, bzw. Sklerenchymfasern an. Diese lokalen *Agrobacterium*-Ansammlungen umfassten nur einen kleinen Teil des Raumes im Tumor. Im überwiegenden Teil des Tumorparenchyms und im Stängel wurden keine virulenten *A. tumefaciens* detektiert.

4. Diskussion

4.1. Die bakterielle Flora von Rebstöcken ist organspezifisch und wird von den Jahreszeiten beeinflusst

Gegenstand dieser Arbeit ist die von *Agrobacteria* ausgelöste Wurzelhalsgallenerkrankung beim Rebstock und deren Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung in Rebstöcken und deren Rhizosphäre. Die Bakterienflora in Weinbergen wurde bereits in diversen Hochdurchsatzstudien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Standort des Rebstocks, geprägt vom Klima und edaphischen Faktoren, die Bakterienflora maßgeblich beeinflusst [62-65, 68]. Zusätzlich zum Standort haben auch die Organe einer Pflanze [64, 67, 69, 70, 163] und vermutlich die Jahreszeit einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung in Rebstöcken. In dieser Studie wurden der Boden und die Rebstockorgane eines einzigen Standorts untersucht, um standortabhängige Einflüsse auf die Bakterienflora zu vermeiden und sich auf die Einflüsse der Wurzelhalsgallenerkrankung zu konzentrieren. Durch die Kombination von kultivierungsabhängigen (2.4.3) und kultivierungsunabhängigen Methoden (2.2.1) untersuchte ich sowohl einzelne Interaktionen als auch die Zusammensetzung der bakteriellen Flora. Die Bakterienflora in der Rhizosphäre, in Wurzeln, Pfropfstellen und einjährigen Trieben ist, wie bei den anderen Studien auch, eindeutig voneinander unterscheidbar und damit spezifisch für jedes Organ und die Rhizosphäre.

Studien an unterschiedlichen Standorten im In- und Ausland beschreiben, dass sich in unterirdischen Lebensräumen, wie der Rhizosphäre und den Wurzeln von Rebstöcken, bevorzugt Actinobacteria, Proteobacteria und Bacteroidetes anreichern [64-66, 164]. Proteobacteria dominieren in Wurzeln der Rebstöcke und Acidobacteria sowie Firmicutes im Boden.

Auch in oberirdischen Rebstockorganen reichern sich in erster Linie Proteobacteria an [64]. Studien, in denen die Früchte oder Blätter von Rebstöcken untersucht werden, finden ebenfalls insbesondere in konventionell bewirtschafteten Weinanlagen hauptsächlich Proteobacteria [67, 70]. Laut kultivierungsabhängigen Studien (Frankreich [22] und Österreich [165]) und kultivierungsunabhängigen Studien (New York, USA [64]) nimmt die Biodiversität der Bakterienflora nicht nur vom Boden zur Wurzel [66, 71, 166] sondern auch entlang der Pflanzenachse (Boden>Wurzel>Pfropfstelle>Trieb) ab. Die Anreicherung von Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes und Firmicutes je nach Rebstockorgan und im Boden wird in dieser Studie bestätigt. Ebenso bestätigt die Anzahl an operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) und deren jeweilige Häufigkeit, dass die Bakterienflora des Bodens eine höhere mikrobielle Diversität als die Bakterienflora der pflanzlichen Organe besitzt. Die bakterielle Diversität Letzterer ist in unterirdischen Organen höher als die der oberirdischen. Pflanzen beeinflussen aktiv die Struktur der Bakterienflora, etwa durch Wurzelexsudate [167]. Zitronen- und Apfelsäure sind von der Pflanze produzierte Lockstoffe und führen beispielsweise zur Anreicherung von *Pseudomonas fluorescens* in der Rhizosphäre [168]. In Weinreben ist die Weinsäure angereichert, dient für *Agrobacteria* und *Pseudomonas* als Nährstoffquelle [169, 170] und könnte ein rebstockspezifischer Lockstoff sein. Bei einem Vergleich der Bakterienflora von Gräsern mit Rebstöcken eines Standorts in Österreich wurden OTUs zugehörig zu *Pedobacter*, Solirubrobacteraceae und Rhizobiales als Bakterien identifiziert, die nicht in Gräsern vorkamen [66]. Vertreter der rebstockspezifischen Familien und Gattungen werden ebenfalls in dieser Studie in den Rebstöcken gefunden. Diese Studie zeigt, dass die bakterielle Zusammensetzung der Rebstöcke und des Bodens im fränkischen Weinberg den Mustern typisch für Rebstöcke folgt, die auch an anderen Standorten anzutreffen sind.

Abiotische Umweltfaktoren wie Feuchtigkeit und Temperatur formen ebenfalls die Zusammensetzung der Bakterienflora [171, 172]. Zum Zeitpunkt der Probeentnahme für diese Studie lagen in oberirdischen wie unterirdischen Organen und im Boden in Abhängigkeit von der Jahreszeit Unterschiede in der Temperatur und der Feuchtigkeit vor (2.1). Auch der Nährstoffgehalt des Rebstocks schwankt mit dem Metabolismus des Rebstocks abhängig von der Wachstumsperiode der Pflanze. So startet die Versorgung der oberirdischen Gewebe der Pflanze durch Nährstoffe mit dem Saftstrom im Frühling und ist im Herbst reduziert. Zudem ist der Gesamtkohlenhydratgehalt (Stärke und Zucker) des Rebstocks, inklusive der Wurzeln, im Sommer, wegen des Trieb- und Traubenwachstums, niedriger als im Frühjahr und Herbst [55]. Der Stärke- und Zuckergehalt schwankt im einjährigen Wurzelholz zwischen 28 % und 4 %, im dreijährigen Holz des Stamms zwischen 24 % und 16 % und im Triebholz von 22 % bis 6 % des Trockengewichts [55]. Obwohl der Kohlenstoffgehalt in allen Rebstockorganen stark schwankt, ist nur die Struktur der Bakterienflora der oberirdischen Organe und des Bodens saisonal unterschiedlich, aber nicht in der Wurzel. In der bakteriellen Zusammensetzung des Bodens können 29 % der Varianzen, in den Pflanzstellen 52 % der Varianzen und in den einjährigen Trieben 65 % der Varianzen auf den Probeentnahmezeitpunkt zurückgeführt werden. Meine Analysen zeigen, dass oberirdische Bakterienflore besser anhand der Jahreszeit zu unterscheiden sind als unterirdische. Diese Beobachtung wird mit einer Studie an Ulmen (*Ulmus spp.*) bestätigt. Dort werden jährliche Schwankungen in der Bakterienflora in den Ästen, aber kaum in den Wurzeln, detektiert [173]. Studien an Pappelwurzeln (*Populus deltoides*) und der Rhizosphäre zeigen einen signifikanten Anteil der Jahreszeit an der Varianz in der Bakterienflora von ungefähr 4 % [174]. Ein größerer Anteil von 10 % an der Variation der Bakterienflora durch den

Probeentnahmezeitpunkt wird bei oberirdischen Blättern von *Arabidopsis thaliana* detektiert [175]. Die bakterielle Zusammensetzung der Blätter der Rebstöcke ist ebenso vom Probeentnahmezeitpunkt abhängig [70].

Abiotische Faktoren, wie Schädlingsbefall (S), haben ebenso einen Einfluss auf die Bakterienflora von Pflanzen (Pfl). In Italien (Pfl: Weinblätter, S: Phytoplasma) [69], Österreich (Pfl: Kartoffeln, S: *Erwinia carotovora*) [176], Kalifornien (Pfl: Avokadowurzeln, S: *Phytophthora*) [177] und Deutschland (Pfl: Arabidopsisblätter, S: *Albugo*) [175] werden Pflanzenorgane mit und ohne Befall verglichen. In den vier Studien werden strukturelle Veränderungen in der Bakterienflora nur beim befallenen Pflanzenorgan nachgewiesen. Auch in dieser Studie hat nur die Wurzelhalsgalle, die sich als einziges Organ auch optisch von den gesunden Organen unterscheidet, eine andere bakterielle Zusammensetzung. Somit sind drei von vier Probeentnahmestellen (Boden, Pfropfstelle und Trieb) durch die Jahreszeit beeinflusst wohingegen nur die Pfropfstelle als einzige der vier Probeentnahmestellen abhängig von der Wurzelhalsgallenerkrankung variiert. Daher kann man davon ausgehen, dass die Jahreszeit einen größeren Einfluss auf die Bakterienflora der nicht-tumorösen Bereiche des Rebstocks hat als die Wurzelhalsgallenerkrankung.

4.2. *Agrobacterium vitis* induziert eine ökologische Nische, die Wurzelhalsgalle

Die Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflusst die Bakterienflora der Pfropfstelle. An der Propfstelle induziert *Agrobacterium vitis*, aus der Familie der Rhizobiaceae, weltweit das Wachstum von Wurzelhalsgallen an Rebstöcken [8, 19]. Neben *A. vitis* können weitere

Agrobacteria Wurzelhalsgallen an Rebstöcken sowohl im Weinberg als auch im Gewächshaus erzeugen [8, 27, 178]. *Agrobacteria* kommen aber auch als nicht-virulente Kommensale vor [26, 101]. Ihnen fehlt ein funktionsfähiges Ti-Plasmid, weshalb sie die Tumorbildung nicht induzieren können. Zwischen virulenten und nicht-virulenten *Agrobacteria* könnte ein horizontaler Gentransfer stattfinden. Dies beweist die Entdeckung von *A. vitis*-spezifischen Ti-Plasmiden in virulenten *A. tumefaciens* aus Rebstöcken [178]. Von Wurzelhalsgallentumoren an Obstbäumen ist ebenfalls bekannt, dass ein horizontaler Gentransfer zwischen virulenten und nicht-virulenten *Agrobacteria* stattfinden kann [114]. Mutationen im Ti-Plasmid sind bei der hohen bakteriellen Vermehrungsrate zudem wahrscheinlich. Allerdings hat eine Studie gezeigt, dass bei 5419 *Agrobacteria*-Isolaten aus Tumoren nur 0,01 % der Isolate nicht-virulente Mutanten sind und dass ein Verlust der Virulenz in Anwesenheit von Opinen bei *Agrobacteria* sehr selten ist [101]. Auch in den hier untersuchten Rebstöcken vom Weinberg bei Himmelstadt, Unterfranken kommen virulente und nicht-virulente *Agrobacteria* vor. Diese teilen nur 58 % der orthologen Gene und unterscheiden sich somit nicht nur in Anwesenheit (*A. vitis* Isolat HF7) und Abwesenheit (*A. sp* Isolat HF57) der 22 Virulenzgene (3.1). Die Tumorassay an steril kultivierten Weinplänzchen zeigt zudem, dass alle als *A. vitis* identifizierten Isolate Tumore induzieren, während alle Nicht-*A. vitis* Isolate (*A. spp.*) nicht virulent waren. Daher wurde bei den Isolaten aus dem Weinberg bei Himmelstadt keine Genübertragung der Virulenzgene beobachtet. Die Tumorentwicklung kann auch ohne weitere Bakterien, allein durch die Anwesenheit von *A. vitis* induziert werden, wie ich mittels Tumorassays an steril kultivierten Weinplänzchen zeigte. Die ökologische Nische der Wurzelhalsgalle wird somit von einer einzigen virulenten *Agrobacterium*-Spezies induziert.

Zur Lokalisation von virulenten *Agrobacterium*-Isolaten in Wurzelhalsgallen wird in dieser Studie die FLIM-Methode („*Fluoreszenz lifetime imaging microscopy*“) verwendet. Die Detektion von Bakterien in ihrer ökologischen Nische im Pflanzengewebe erfolgte früher anhand der Zellform der Bakterien [28, 34, 45] und heute üblicherweise mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, [179]) oder GFP-Fluoreszenz [180, 181]. Bei einer Lokalisation anhand der Zellform kann es zu Verwechslungen mit anderen Bakterien oder pflanzlichen Strukturen (zum Beispiel Stärkekörnern, Luftblasen) kommen. Autofluoreszierende Pflanzenstoffe wie lignifizierte Zellwände, kutinisierte Epidermen oder suberinisierte Zellwände stören die Detektion der Bakterien anhand von Fluoreszenz [156, 179, 180, 182, 183]. Mit der FLIM-Methode wird in dieser Arbeit das geschilderte Problem gelöst. Ein GFP-markiertes, virulentes *Agrobacterium*-Isolat induziert die Tumorbildung an steril kultivierten Weinplänzchen und wird anhand der Bestimmung der spezifischen Lebenszeit des GFP-Fluorophors von der Autofluoreszenz der Pflanzenbestandteile unterschieden (Tabelle 5 im Anhang). In den Tumoren akkumulieren die GFP-markierten, virulenten *A. tumefaciens* punktuell in drei Mikro-Nischen: i) am äußeren Tumorrand, ii) in der Umgebung von Leitgewebe und iii) in Interzellularen. In anderen Studien kommen *Agrobacteria* auf der Oberfläche von Pflanzen, in der Phyllosphäre, vor [184]. Ähnliches wird bei *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335, dem Auslöser von Tumoren an Olivenästen, beobachtet [182]. Werden *in vitro* kultivierte Olivenplänzchen mit *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 inokuliert, wird das Pathogen auf der Oberfläche der Tumore detektiert. Die Lokalisation in dieser Studie am äußeren Tumorrand zeigt das Vorkommen virulenter *Agrobacteria* auf der Tumeroberfläche an. Von dieser ökologischen Nische ist eine Verbreitung der *Agrobacteria* über Regentropfen oder abfallende pflanzliche Knöllchen im Weinberg möglich. Allerdings könnte *A. vitis*, wie vom Pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 bekannt, bei einer Ko-Inokulation mit nicht-virulenten Stämmen,

in das Innere des Tumors verdrängt werden [182]. In anderen Studien wird gezeigt, dass *Agrobacteria* in der Rinde, direkt unterhalb der Borke von Trieben, vorkommen [119]. Das ist der Bereich des sekundären Phloemgewebes (Bast), welches sklerenchymatische Phloemfasern enthält. Beim älteren Rebstock sind die äußeren Phloemgewebe abgestorben [58], was das Eindringen von Bakterien ermöglicht. Ältere Studien zeigen *Agrobacteria* außerdem im Xylem des Triebes [28, 34, 45]. Auch in dieser Studie werden *Agrobacteria* in sklerenchymatischen Geweben, assoziiert mit den Leitgefäßen, detektiert. Die *Agrobacteria* kommen hingegen nicht im parenchymatischen Tumorgewebe vor, welches den größten Teil des Tumors ausmacht. Innerhalb der ökologischen Nische der Wurzelhalsgalle existieren somit Mikro-Nischen von denen manche nicht von *A. vitis* besiedelt sind und daher Lebensraum für weitere Mikroorganismen bieten.

4.3. Die Wurzelhalsgalle beherbergt zusätzlich zu *Agrobacterium vitis* eine spezifische Bakterienflora

Inklusive *A. vitis* sind 26 OTUs signifikant im Wurzelhalsgallentumor erhöht oder kommen ausschließlich dort vor. Neben dem Pathogen tragen also weitere Bakterien zum Unterschied in der Bakterienflora der Pfropfstellen mit und ohne Wurzelhalsgalle bei. Insgesamt sind mehr unterschiedliche Bakterien im Tumor als in der gesunden Pfropfstelle. Phylogenetisch und physiologisch ähnliche Bakterien kommen vorwiegend in den gleichen Habitaten zusammen vor, da jene in der Regel an die gleichen Umgebungen angepasst sind. Dieses Phänomen ist unter dem Begriff des Habitatfilters bekannt [185]. In meiner Studie gehören neben *A. vitis*, dem Auslöser der Wurzelhalsgallenerkrankung, und *A. spp* 19 der

26 signifikant im Tumor erhöhten OTUs zu den Proteobacteria. Innerhalb der Proteobacteria kommt die Ordnung der Rhizobiales, zu denen auch die *Agrobacteria* gehören, am häufigsten (6 von 26) vor. Unter den signifikant unterschiedlich häufigen OTUs zwischen Tumor und gesunder Pfropfstelle sind neun, die exklusiv im Tumor vertreten sind. Dazu kommen weitere sieben, die in der gesunden Pfropfstellen so gut wie nicht vorhanden sind, da sie im Mittel nur mit einer Amplikonsequenz nachgewiesen werden können. Die Bakterien, die spezifisch in der Wurzelhalsgalle vorkommen, können als Opportunisten eingestuft werden, da sie sich offensichtlich in der neu gebildeten Nische etablieren.

Zu den drei am häufigsten vertretenen OTUs, die sich in der Wurzelhalsgalle zu jeder Jahreszeit etablieren, zählen *A. vitis* (OTU_0003), Vertreter von *Pseudomonas* (OTU_0005) und Vertreter von Enterobacteriaceae (OTU_0008). Diese drei OTUs kommen, genauso wie drei weitere OTUs (*Agrobacterium tumefaciens*: OTU_0032, ein Vertreter der Gammaproteobacteria: OTU_3436 und ein Vertreter der Burkholderiales: OTU_0007) in mindestens 80 % aller Tumorproben vor und bilden somit eine stabile Kernmikroflora im Wurzelhalsgallentumor. Auch die Untersuchung einer Infektion von Weinblättern mit Phytoplasma ergibt eine stabile Bakterienflora, die sich über Monate hinweg hält [69]. In Pfropfstellen ohne Wurzelhalsgallen detektierte ich keine Kernmikroflora. Die drei häufigsten OTUs sind von Jahreszeit zu Jahreszeit andere. Die Stabilität der bakteriellen Zusammensetzung in der Wurzelhalsgalle könnte mit der Nährstoffsituation in der Wurzelhalsgalle determiniert werden. Eine tumorspezifische Nährstoffklasse, die zur Anreicherung der tumorspezifischen Bakterien beitragen könnte, sind die Opine (z. B. Octopin, Nopalin). Die pflanzenuntypischen Opine werden im Wurzelhalsgallentumor durch die Expression von T-DNA-kodierten Genen für die Opinsynthese produziert [44]. Auf dem Ti-Plasmid der virulenten *Agrobacteria* befinden sich die *occ* (*octopin catabolism*) oder *noc* (*nopalin*

catabolism) Regionen, die den Opine-Katabolismus ermöglichen. Auch im Genom von *A. vitis* Isolat HF7 (OTU_0003) aus den Rebstöcken von Himmelstadt sind die Produkte von Genen am Octopinanabolismus und Katabolismus beteiligt. In Tumoren, die von *A. vitis* HF7 bei *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen hervorgerufen werden, wurde Octopin nachgewiesen [186]. Octopin ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in den hier untersuchten Tumoren der Rebstöcke vom Himmelstädter Weinberg vorhanden. Interessanterweise wurden Octopinkatabolismuskatalysatoren auch im nicht-virulenten *A. sp.* Isolat HF57 (OTU_0032) nachgewiesen. Weitere Wachstumsversuche mit Octopin als einziger Kohlenstoffquelle zeigen, dass auch die Vertreter von *Pseudomonas* (OTU_0005) neben *A. vitis* (OTU_0003) mit Octopin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann [186]. Übereinstimmend mit diesem Befund wurden *Pseudomonas*, die Opine katabolisieren, bereits in Wurzelhalsgallen von Obstbäumen und bei anderen Rebstöcken gefunden [187, 188]. Somit sind die Octopine im Rebstocktumor keine ausschließliche Nahrungsquelle für *A. vitis*. Alle Bakterien, die das vorhandene Octopin abbauen und als Nahrungsquelle nutzen können, haben einen Vorteil gegenüber dem Rest der Bakterienflora. So wurde nachgewiesen [189], dass in der Rhizosphäre von opinproduzierendem, transgenem Klee (*Lotus corniculatus*) und schwarzem Nachtschatten (*Solanum nigrum*) [190, 191] die Bakterien in ihrer Abundanz erhöht sind, welche Opine verstoffwechseln. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass die drei bekannten octopinkatabolisierenden Bakterien dieser Studie (Vertreter von *Agrobacterium*: OTU_0032, *Pseudomonas*: OTU_0005 und *A. vitis*: OTU_0003) Teil der Kernmikroflora im Tumor sind.

Anders als bei der Diversität sieht es mit der Abundanz der drei häufigsten OTUs der Kernmikroflora im Wurzelhalsgallentumor aus. Diese ist im Sommer um die Hälfte niedriger als in den anderen Jahreszeiten (Frühling: 53 %, Sommer: 29 %, Herbst: 58 %). Deshalb

ist die bakterielle Äquität der Wurzelhalsgallen im Sommer höher als in den anderen Jahreszeiten. Im Gegensatz dazu ist die Abundanz der drei häufigsten aber unterschiedlichen OTUs in gesunden Pfropfstellen über die Jahreszeiten ähnlich verteilt (Frühling: 42 %, Sommer: 57 %, Herbst: 36 %). Die Diversität der bakteriellen Zusammensetzung ist in gesunden Pfropfstellen dementsprechend im Frühling, Sommer und Herbst ähnlich. Von anderen Studien ist bekannt, dass eine Probeentnahme im Sommer die Isolation von *Agrobacteria* erschwert [192]. Es wurden weniger koloniebildende Einheiten in Rebstöcken im Sommer detektiert [29]. Als Ursache für die Reduktion der Bakterienanzahl in Wurzelhalsgallen im Sommer ist Nährstoffmangel unwahrscheinlich, da der Stärke- und Zuckergehalt auch in gesunden Stämmen von Rebstöcken im Sommer reduziert ist [55]. Stattdessen könnte sich die Anzahl der *A. vitis* im Sommer wegen höherer Temperaturen und damit verbundenem Trockenstress im Tumorgewebe reduzieren. Wurzelhalsgallen von *Arabidopsis* [193, 194] und *Ricinus communis* [17] zeigen, aufgrund des Fehlens einer intakten kutinisierten Epidermis, Trockenstresssymptome. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Opine eine stabile Zusammensetzung der Bakterienflora unterstützen und dass Trockenstress im Sommer die Bakterienanzahl reduzieren könnte.

Rebstöcke rekrutieren ihre bakterielle Begleitflora in erster Linie aus dem Boden [64]. Dies wird in dieser Studie für die endophytische Bakterienpopulation bestätigt (Anteil an Bodenbakterien in der Wurzel = 88 %, der Pfropfstelle = 82 % und im Trieb = 79 %). Ebenso wird gezeigt, dass Wurzelhalsgallen mehr Bakterienspezies mit der Wurzel und dem Boden teilen als mit der gesunden Pfropfstelle, an der sich die Wurzelhalsgallen entwickeln. Umgekehrt teilt der einjährige Trieb mehr Bakterien mit der gesunden Pfropfstelle als mit dem Tumor. Dies spricht dafür, dass auch die Bakterienflora der Wurzelhalsgalle aus dem Bo-

den rekrutiert wird. Dabei sind zwei Wege denkbar: i) Bodenpartikel mit Bakterien gelangen durch Spritzwasser oder Wind zur Pfropfstelle, wo Bakterien über die Tumoroberfläche mit fehlender Epidermis [46] eindringen. ii) Bakterien gelangen vom Boden über eine verwundete Wurzel in den Rebstock. Im Rebstock könnten sie, wie es beispielsweise bei *Xylella fastidiosa*, *Yersinia enterocolitica* oder *Burkholderia sp.* der Fall ist, über den Xylemstrom bis in die Blätter verteilt werden [180, 195].

Die Tatsache, dass die bakterielle Flora nicht essentiell für die Entstehung einer Wurzelhalsgalle ist (3.3), aber möglicherweise von den Opinen in der Wurzelhalsgalle profitiert (3.1), unterstützt die These, dass es sich um opportunistische Bakterien handelt, die sich im Laufe der Tumorentstehung herausbilden.

4.4. Multiple Interaktionsprozesse in der Wurzelhalsgalle

Bei über 150 in der Wurzelhalsgalle detektierten Bakterienspezies sind neutrale, symbiotische, antagonistische, und multiple Interaktionen zwischen den Bakterien aber auch zwischen den Bakterien und der Wurzelhalsgalle wahrscheinlich. In meiner Studie löst das virulente *A. vitis* die Wurzelhalsgallenerkrankung aus. Nicht-virulente *Agrobacteria* sowie *Pseudomonas*, die kein Ti-Plasmid replizieren und keine Vir-Gene exprimieren, aber in dieser Studie Octopin verstoffwechseln können, profitieren von dem Ti-Plasmid der virulenten *Agrobacteria*. Sie leben in der nährstoffreichen Wurzelhalsgalle, da sie ebenfalls die Opine als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nutzen können (3.1). Obwohl der dauerhafte Besitz eines Ti-Plasmids Ressourcen verbraucht [196] und unter bestimmten Bedingungen

die Konkurrenzfähigkeit von virulenten *A. vitis* mindert [189], ergaben meine Untersuchungen, dass virulente *A. vitis* in großen Mengen in Wurzelhalsgallentumoren vorkommen (Frühling: 9 %, Sommer: 11 %, Herbst: 11 %). Da nur virulente *A. vitis* das Wachstum der Wurzelhalsgalle induzieren, besiedeln sie diese Nische vermutlich zuerst. Langfristig wird durch die Inhibition der Expression der Vir-Gene nach der Transformation in der bereits entwickelten Wurzelhalsgalle [197, 198] der Kostennachteil des Ti-Plasmids gegenüber Bakterien ohne Ti-Plasmid minimiert. Zudem könnte die hohe Konzentration an Nährstoffen in der Wurzelhalsgalle [46] und eine Aufteilung der Wurzelhalsgalle in Mikro-Nischen (3.4) zu einem niedrigen Konkurrenzdruck zwischen den Bakterien führen [185]. Die Daten dieser Studie zeigen, dass virulente *Agrobacteria* nicht von den nicht-virulenten Opportunisten verdrängt werden, sondern die Bakterien in der mehrjährigen Wurzelhalsgalle koexistieren. Dies führt zu einer hohen Diversität in der Wurzelhalsgalle, die ich ebenfalls mittels Hochdurchsatzsequenzierungen nachweisen konnte (3.2.5). Insgesamt wurden wegen des niedrigen Konkurrenzdrucks überwiegend Kooperationen zwischen den diversen Bakterien in der Wurzelhalsgalle erwartet.

Mittels „*Quorum sensing*“ können manchen Bakterien die Diversität und Dichte der bakteriellen Gemeinschaft detektieren sowie ihren Metabolismus und ihr Verhalten anpassen [199]. In Vertretern der Gattung *Agrobacterium* wird über ein homologes System zum „*Quorum sensing*“ von *Vibrio fischeri* die Konjugation des Ti-Plasmids reguliert [162]. Dabei vermittelt TraI, dessen Expression durch bestimmte Opine induziert wird, die Produktion von N-Acyl-Homoserinlaktone (AHLs) [162]. Die Menge und Produktion von AHLs wird durch TraM, negativ reguliert [200]. AHLs können von Bakterienzelle zu Bakterienzelle diffundieren und führen dazu, dass TraR die Konjugation des Ti-Plasmids fördert [100]. In *A. vitis* ist zusätzlich zur Konjugation die Produktion von Tensiden, die zur

Motilität der Bakterien, einem Virulenzfaktor, beitragen, durch „*Quorum sensing*“ reguliert [97]. Sowohl im virulenten *A. vitis* HF7 als auch im nicht-virulenten *A. sp* HF57-Isolat aus den Wurzelhalsgallen vom Weinberg bei Himmelstadt sind mit den Genen *traI* und *traR* die genetischen Voraussetzungen für eine Kommunikation der beiden Isolate mittels AHLs vorhanden. Inwiefern die Kommunikationsmöglichkeit über AHLs den Verlauf der Wurzelhalsgallenerkrankung beeinflusst, ist nicht bekannt. Bei der Virulenz des tumorauslösenden Bakteriums *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* in Pflanzentumoren von Olivenbäumen spielen AHLs eine Rolle. Dort interagiert *P. savastanoi pv. savastanoi* mit den nicht-pathogenen Bakterien *Erwinia oleae*, *Erwinia toletana* und *Pantoea agglomerans* (Familie der Enterobacteriaceae), um das Tumorwachstum zu fördern [201, 202]. In dieser Studie wurden Vertreter von *Erwinia* (OTU_7832) im Frühling sowie Enterobacteriaceae (OTU_0008) und *Erwinia* (OTU_0043) im Frühling und Herbst ebenfalls signifikant erhöht in der Wurzelhalsgalle gefunden. Außerdem sind zwei Vertreter von *Pseudomonas* (OTU_0005, OTU_2968) ebenfalls signifikant in der Wurzelhalsgalle erhöht. Somit werden in Wurzelhalsgallen Bakteriengattungen detektiert, die auch in Tumoren von Olivenbäumen vorkommen und dort das Tumorwachstum fördern. *P. savastanoi pv. savastanoi* und *E. toletana* kommunizieren mittels den N-Acyl-Homoserin-Laktonen C6-3-oxo-HSL und C8-3oxo-HSL [202]. *P. savastanoi pv. Savastanoi*-Mutanten, die keine N-Acyl-Homoserinlaktone (AHLs) produzieren, induzieren keine Tumore [202]. Bei Ko-Inokulation mit *E. toletana*, die AHLs produzieren, induzieren die AHL-Synthase-Mutanten von *P. savastanoi pv. savastanoi* wieder Tumore [202]. Vermutlich werden die AHLs, welche von *E. toletana* produziert werden, auch von *P. savastanoi pv. savastanoi* erkannt. Somit ist neben der Kommunikation innerhalb der Gattung der *Agrobacteria* auch eine Kommunikation über AHLs zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies in pflanzlichen Tumoren möglich.

Die Kommunikation zwischen Bakterien dient als Basis für Kooperationen in der Wurzelhalsgalle. Zum Beispiel ist eine symbiotische Kooperation zwischen *Pseudomonas* und *A. vitis* denkbar, denn *Pseudomonas* trägt zur Eiskristallbildung in der Pflanze bei und erzeugt dadurch Wunden [203, 204], *A. vitis* benötigt Wunden, um die Virulenzmaschinerie zu aktivieren [33]. Zudem könnte *Pseudomonas A. vitis* bei der Manipulation der Immunabwehr der Pflanze unterstützen, wodurch die Infektion und Transformation der Rebstockzellen durch *A. vitis* erleichtert werden könnte. *Pseudomonas* kann Coronatin, ein Analogon des Pflanzenhormons Jasmonsäure, bilden [205]. Dieses hemmt in *Arabidopsis thaliana* die Salizylsäure (SA)-induzierte Pathogenantwort der Pflanzen gegen biotrophe Bakterien [206]. Bei der Infektion der Pflanzenzelle könnte Coronatin die SA-Pathogenantwort der Pflanze verzögern, die später in der Wurzelhalsgalle die Expression der Virulenz-Gene des biotrophen Pathogens *A. vitis* hemmt [37, 197]. Erste Versuche im Rahmen einer Masterarbeit [186] ergaben Hinweise auf einen positiven Effekt von *Pseudomonas* auf das Tumorstadium bei *in vitro* kultivierten Weinplänzchen: Bei einer Ko-Infektion von *A. vitis* mit dem *Pseudomonas*-Isolat (OTU_0005) entwickeln sich größere Tumore. Es ist bekannt, dass *Pseudomonas* Auxin produziert, wodurch pflanzliches Wachstum und in niedrigen Konzentrationen ($0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$) auch die Pathogeninfektionen gefördert wird [207, 208]. In der Wurzelhalsgalle wird Auxin durch die bakteriellen Onkogene der T-DNA im Rebstockgenom in hohen Konzentrationen ($17,3 \pm 8,8 \mu\text{M}$) produziert und trägt somit zum Wachstum der Wurzelhalsgalle bei [41, 208]. Gleichzeitig hemmen hohe Konzentrationen von Auxin das Wachstum von virulenten *Agrobacteria* in der Wurzelhalsgalle [208, 209]. Somit könnte *Pseudomonas* mit *A. vitis* kooperieren, um die Wurzelhalsgalle zu induzieren und deren Wachstum zu fördern. In meiner Studie detektierte ich sowohl im Frühling als auch im Herbst ein *Novosphingobium*-Bakterium (OTU_22) als signifikant häufiger im Tumor. Gan et al. 2012 isolierten ein *Novosphingobium* aus dem Tumor von Rebstöcken in Ungarn

und analysierten das Genom. Das *Novosphingobium* enthält Gene zur Fixierung von Stickstoff und zur Degradierung von Opinvorstufen [210]. Es liegt somit nahe, dass *Novosphingobium* an die Tumorumgebung angepasst ist, sich dort anreichert und durch die Fixierung von Stickstoff die Nährstoffversorgung des Tumors und somit das Tumorstadium fördern könnte. Obwohl die in der Wurzelhalsgalle gefundenen opportunistischen Bakterien nicht essentiell für dessen Entstehung sind, könnten manche wie das *Pseudomonas*-Isolat und *Novosphingobium*, die Entstehung und das Wachstum der Wurzelhalsgallen fördern.

Neben Kooperationen zwischen *A. vitis* und den opportunistischen Bakterien sind auch Kooperationen zwischen opportunistischen Bakterien und dem Rebstock denkbar. So können folgende Bakterien die Tumorgröße bei Tabak- und Tomatenpflanzen reduzieren: i) ein *Bacillus*-Isolat aus Apfel- und Mandelbäumen [15, 211], ii) *Pseudomonas*-Isolate aus einem Apfelbaum und aus dem Boden eines botanischen Gartens [15, 212] iii) und ein *Serratia*-Isolat aus Rebstöcken [212]. An Rebstöcken reduziert *Pseudomonas* ebenfalls die Anzahl der Tumore und deren Größe [80]. *Serratia rubidaea* (Isolat_42, ähnlich zu OTU_3439) kommt zu jeder Jahreszeit zusammen mit *A. vitis* erhöht im Tumor vor. Erste Interaktionsexperimente mit den beiden Bakterienspezies ergeben auf YEB-Agarmedien, dass *S. rubidaea* bei *A. vitis* eine Wachstumshemmung in Form von Hemmhöfen hervorrief. Ko-Inokulation von *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen mit den beiden Spezies reduzierte das Tumorstadium [186]. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein *Serratia*-Isolat aus der Rhizosphäre vom Rebstock durch die Bildung einer flüchtigen organischen Substanz (Dimethyl Disulfide, DMDS) das Wachstum von *A. vitis* und dadurch das Tumorstadium an Tomatenpflanzen verringert [212]. Wegen des erhöhten Wasserverlustes und

Energieverbrauchs durch den Tumor [17, 46, 49] ist eine Hemmung des Tumorwachstums durch Bakterien für die Vitalität des Rebstocks ein Vorteil.

Isolate von *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Agrobacteria*, *Methylopila*. und *Flavobacteria*. haben in Rebstöcken eine fungizide Wirkung und können Pilzkrankheiten verringern [66, 77]. Zusätzlich fördert *Burkholderia phytofirmans* das Rebstockwachstum unter moderatem Kältestress [213] und manche *Pseudomonas* unter Trockenstress [75]. Vertreter von *Burkholderia* (OTU_0007, OTU_3153), *Pseudomonas* (OTU_0005, OTU_2368), *Agrobacterium tumefaciens* (OTU_0032), *Methylopila* (OTU_0121), und *Flavobacterium* (OTU_0248) sind in dieser Studie häufiger in Wurzelhalsgallen als in gesunden Pfropfstellen. *Burkholderia* (OTU_0007) ist sogar Teil der stabilen Kernmikroflora im Tumor. Dementsprechend könnte die natürliche Bakterienflora im Tumor, neben einem direkten Einfluss auf die Tumorgöße, den Rebstock auch vor Pilzbefall und abiotischem Stress schützen. Da endophytische Bakterien generell und mehrheitlich die Gesundheit der gesamten Pflanze unterstützen [214], sind weitere positive Interaktionen zwischen Rebstock und opportunistischen Bakterien in der Wurzelhalsgalle wahrscheinlich. Tatsächlich haben kleine Tumore in Weinanlagen einen positiven Effekt auf das Rebstockwachstum [116, 117]. Durch eine symbiotische Interaktion der Bakterien in der Wurzelhalsgalle mit der Pflanze könnten die Energie und Nährstoffverluste ausgeglichen werden und die Pflanze könnte von der Wurzelhalsgalle profitieren.

4.5. Schlussfolgerung: Das ökologische Gleichgewicht in der Wurzelhalsgalle

Rebstöcke beherbergen eine organspezifische und saisonal variierende bakterielle Flora (3.2.1, 3.2.3). Eine Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung im Zusammenhang mit der Wurzelhalsgallenerkrankung tritt nur in der Pfropfstelle auf. Dort induziert *A. vitis*, der Erreger der Wurzelhalsgallenerkrankung, durch die stabile Integration der T-DNA in das Rebstockgenom das Wachstum einer Wurzelhalsgalle. Der Rebstock versorgt die Wurzelhalsgalle mit Nährstoffen wie Wasser, Metaboliten und anorganischen Ionen (**Abbildung 21**, grüne Fünfecke), die zum Wachstum der Wurzelhalsgalle und zur Produktion von tumorspezifischen Opinen (rote Fünfecke) nötig sind [46, 53]. Bei der Wurzelhalsgalle handelt es sich somit um eine ökologische Nische mit zusätzlichem Lebensraum (3.4) und Nährstoffen. Neben *A. vitis* (rote Ellipse) etablieren sich weitere Bakterien in der Wurzelhalsgalle (schwarze Ellipsen), die nicht essentiell zur Bildung der Wurzelhalsgalle nötig sind (3.3). Diese Bakterien profitieren von der Wurzelhalsgalle und könnten als opportunistische Bakterien eingestuft werden. Nach der „*Black Queen Hypothese*“ [215] unterstützen Bakterien, die nicht zur Herstellung einer Ressource beitragen, aber die Ressource nutzen, den Produzenten der Ressource, in diesem Fall die Wurzelhalsgalle. Manche Bakterien können das Wachstum der Wurzelhalsgalle fördern (**Abbildung 21 a**). Ebenso könnte eine Verbesserung der Nährstoffversorgung, zum Beispiel durch die Fixierung von Stickstoff mittels Opportunisten (b), die Entwicklung der Wurzelhalsgalle unterstützen. Denkbar ist auch eine Kommunikation zum Beispiel über „*Quorum sensing*“ zwischen Opportunisten und *A. vitis* (c) und die Reduktion der pflanzlichen Pathogenabwehr, um die Entstehung von weiteren Wurzelhalsgallen durch *A. vitis* zu erleichtern (4.4). Nachdem die T-DNA mit den Onkogenen und denen der Opinbiosynthese stabil in das Rebstockgenom integriert

wurden [36], ist *A. vitis* nicht weiter für das Tumorwachstum erforderlich. Es stellt innerhalb der Wurzelhalsgalle einen Konkurrenten um die Nährstoffe und Platz für andere Bakterien dar (d). Manche von Ihnen hemmen das Wachstum von *A. vitis* (e) und könnten somit mit *A. vitis* konkurrieren.

Insgesamt erwarte ich in der Wurzelhalsgalle mehr Kooperation als Konkurrenz, da es sich um eine nährstoffreiche Umgebung [46] mit Mikro-Nischen handelt, in der daher vermutlich niedriger Konkurrenzdruck herrscht [185]. Obwohl mathematische Modelle langfristig vorhersagen, dass virulente *A. vitis*, durch nicht virulente aus dem Tumor verdrängt werden, konnte diese Arbeit dies nicht bestätigen [189]. Um ihre Lebensgrundlage, die Wurzelhalsgalle, dauerhaft zu erhalten, ist es nötig auch die Existenz des Rebstocks zu sichern. Manche opportunistischen Bakterien reduzieren das Wachstum des Tumors (**Abbildung 21 f**), schützen vor biotischem Stress, wie Sekundärinfektionen (g) und abiotischem Stress (h), wie Trockenheit und Kälte. Dies kommt dem Rebstock als Ganzes zugute. Schon bei den Probeentnahmen für diese Arbeit fiel auf, dass die Rebstöcke mit Tumoren keine augenscheinliche Wachstumseinschränkung zeigten und nicht unmittelbar von den gesunden Rebstöcken zu unterscheiden waren.

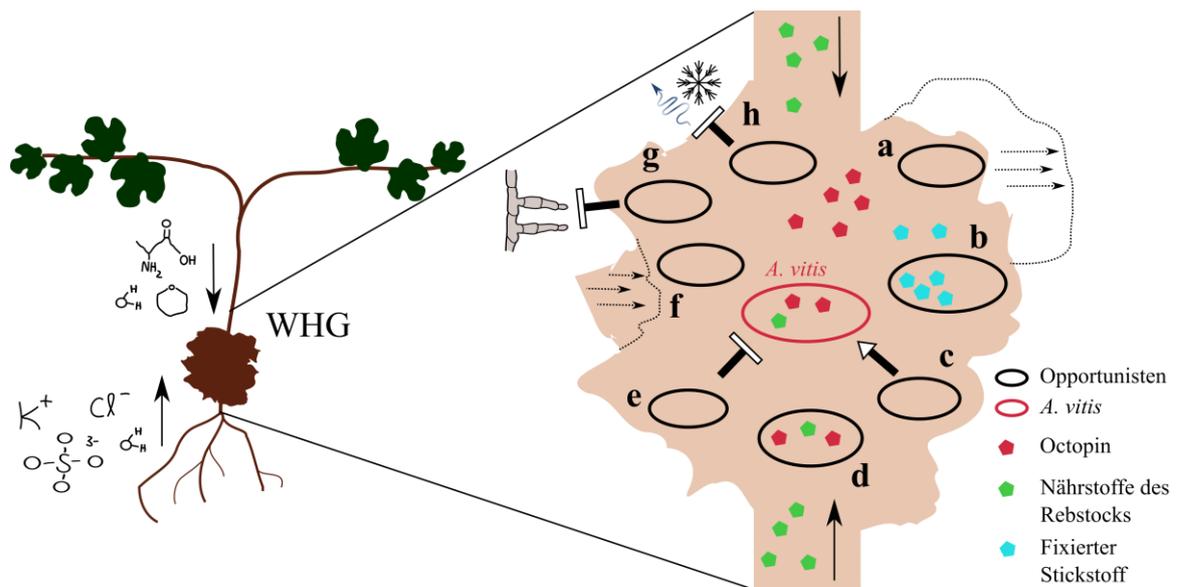


Abbildung 21 *A. vitis* erzeugt eine Wurzelhalsgalle (WHG) am Rebstock, eine neue ökologische Nische. Der Rebstock versorgt die WHG mit Wasser, Metaboliten und anorganischen Ionen (grüne Fünfecke). In der WHG sind neben *A. vitis* (rote Ellipse) weitere Bakterien (schwarze Ellipsen) und Opine (rote Fünfecke) angereichert. Diese Bakterien könnten (a) das Wachstum der WHG fördern [186]; (b) die Nährstoffversorgung der WHG, zum Beispiel durch die Fixierung von Stickstoff (blaue Fünfecke), verbessern [210]; (c) *A. vitis* unterstützen, indem sie möglicherweise die pflanzliche Abwehr unterdrücken oder „Quorum sensing“ verstärken (4.4); (d) wegen der Nutzung der gleichen Ressourcen (Opine und Nährstoffe des Rebstocks) in Konkurrenz zu *A. vitis* stehen (4.3); (e) das Wachstum von *A. vitis* hemmen (3.2.5); (f) die Größe der Wurzelhalsgalle reduzieren [15, 80, 186, 211, 212]; (g) die Resistenz des Rebstocks gegenüber Pilzen [66, 77] und (h) Trocken- [75] und Kältstress [213] erhöhen.

Komplexe Interaktionen zwischen Pflanze und Bakterien sowie Bakterien untereinander in der Wurzelhalsgalle hemmen und fördern gleichzeitig das Wachstum der Wurzelhalsgalle. Bei einem ökologischen Gleichgewicht in der Wurzelhalsgalle wird die Entstehung der Wurzelhalsgalle zwar nicht unterbunden, die Wurzelhalsgallenerkrankung aber auf ein Maß reduziert, sodass sie den Rebstock nicht umbringt. Da die bakterielle Begleitflora der Wurzelhalsgalle aus dem Boden rekrutiert wird, könnten bestimmte Bodenfloren das ökologische Gleichgewicht zu Gunsten des Rebstocks verschieben

5. Zusammenfassung

Am Rebstock werden in der Natur von *Agrobacterium vitis*, dem Auslöser Wurzelhalsgallenerkrankung, charakteristische Wurzelhalsgallentumore induziert. Virulente Vertreter der Gattung der *Agrobacteria* schleusen bakterielle DNA in das pflanzliche Genom ein, wodurch die Pflanze Tumore produziert. Die Wurzelhalsgallenerkrankung wird seit einem Jahrhundert als ein Beispiel der Pflanzen-Pathogen-Interaktion untersucht. Die Rolle der bakteriellen Flora im Zusammenhang mit der Wurzelhalsgallenerkrankung beim Rebstock wurde bisher kaum betrachtet. Um dieser Frage nachzugehen, habe ich die endophytische mikrobielle Zusammensetzung von Rebstöcken mit und ohne Wurzelhalsgalle analysiert. Es werden Proben von drei Zeitpunkten einer Wachstumsperiode (Frühling, Sommer und Herbst) und von den Organen der Rebstöcke (Wurzeln, Pfropfstelle und einjährige Triebe) sowie dem Boden in einer Weinanlage bei Himmelstadt in Unterfranken genommen. Die Bakterienflora dieser Umweltproben wird mit kultivierungsabhängigen (Isolierung von Bakterien) und kultivierungsunabhängigen (Hochdurchsatzsequenzierungen) Methoden untersucht. Zudem werden i) die Virulenz der verschiedenen *Agrobacterium*-Isolate in Tumorassays bestimmt, ii) synthetische Bakteriengemeinschaften von *in vitro* kultivierten Weinplänzchen mit Wurzelhalsgallen analysiert, iii) die Genome von einem virulenten und einem nicht-virulenten *Agrobacteria*-Isolat aus der Wurzelhalsgalle verglichen, iv) erste Interaktionsstudien auf festen Nährmedien durchgeführt und v) virulente *Agrobacteria* mittels bildgebender Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (FLIM) in Wurzelhalsgallen lokalisiert.

Die Rebstöcke dieser Studie haben eine organspezifische Bakterienflora, die innerhalb einer Wachstumsperiode variiert. Nur die Bakterienflora der Pfropfstelle (mit oder ohne

Wurzelhalsgalle) aber nicht die des Bodens, der Wurzeln, und der einjährigen Triebe unterscheidet sich strukturell zwischen gesunden und erkrankten Rebstöcken. Mikroskopisch konnten virulente *Agrobacteria* punktuell in Interzellularen, sklerenchymatischen Geweben und assoziiert mit Leitgefäßen nachgewiesen werden. Dadurch ist ausreichend Lebensraum vorhanden, der zusätzlich von tumorspezifischen Bakterien besiedelt werden kann. Im Gegensatz zur gesunden Pfropfstelle ist in der Wurzelhalsgalle eine saisonal stabile Kernmikroflora, bestehend aus Vertretern von *A. vitis*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Agrobacterium tumefaciens*, Gammaproteobacteria und Burkholderiales, vorhanden. Diese Bakterien werden überwiegend aus dem Boden rekrutiert und profitieren von der Nährstoffsituation in der Wurzelhalsgalle. Wurzelhalsgallen enthalten Opine, die nur von der transformierten Pflanzenzelle produziert werden. Interessanterweise hat in dieser Arbeit ein *Agrobacterium*-Isolat Gene, die zum Opinkatabolismus beitragen und ein *Pseudomonas*-Isolat kann Opine als einzige Kohlenstoffquelle nutzen. Trotzdem sind beide Isolate weder virulent noch verdrängen sie die virulenten *A. vitis*, die ebenso Opine nutzen, aus der Wurzelhalsgalle. In synthetischen Bakteriengemeinschaften an *in vitro* kultivierten Weinpflänzchen konnte gezeigt werden, dass diese und weitere tumorspezifischen Bakterien, neben *A. vitis*, nicht essentiell zur Entstehung der Wurzelhalsgalle nötig sind aber unterschiedliche Funktionen in der Wurzelhalsgalle übernehmen. Ein *Serratia*-Isolat hemmt das Wachstum von *A. vitis* auf festen Nährmedium, andere fördern oder hemmen das Wachstum der Wurzelhalsgalle. Nach Studien in der Literatur erhöhen weitere Bakterien die Resistenz des Rebstocks gegenüber biotischem und abiotischem Stress.

Zusammengefasst identifizierte und isolierte ich in dieser Studie unter 150 unterschiedlichen Bakterien in der Wurzelhalsgalle jene Bakterien, die neben *A. vitis* von der neuen

ökologischen Nische profitieren und somit wahrscheinlich Opportunisten mit unterschiedlichen Funktionen sind. In Folge von multiplen Interaktionen in der Wurzelhalsgalle entsteht ein ökologisches Gleichgewicht zwischen den opportunistischen Bakterien, der Wurzelhalsgalle und dem Rebstock, das den Fortbestand des Rebstocks mit Wurzelhalsgalle ermöglicht.

6. Summary

In nature, *Agrobacterium vitis* is known for the ability to introduce bacterial DNA into the grapevine genome, thereby causing crown gall disease. This plant disease has been studied for a century as a model for plant-pathogen interaction, while the role of the plant microbiota in disease development is not well understood. My study contributes to the understanding of the microbial ecology in crown galls of grapevine, combining culture-dependent with culture-independent high-throughput sequencing techniques. I analysed the structure of the endophytic microbiota by collecting different samples (soil, roots, graft unions and canes) of diseased and non-diseased grapevines from one vineyard in Franconia, Bavaria, Germany during one growing season (spring, summer, autumn). The characterization of the grapevine-associated bacterial microbiota was completed by (i) detecting the virulence of diverse agrobacterial isolates using a tumour growth assay with *in vitro* cultivated grapevine plantlets, (ii) microbial analysis of synthetic communities of *in vitro* cultivated grapevine plantlets with crown galls, (iii) genome sequencing of a virulent and a non-virulent agrobacterial isolate, (iv) *in vitro* interaction studies on solid medium with bacterial isolates and (v) localisation of virulent *A. vitis* using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) in tumour tissues.

Grapevine plants of this study have an organ-specific bacterial community that varies during one growing season. Healthy and diseased grapevine plants differed in the structure of the bacterial community only in the graft union (with or without a crown gall), but not in the soil, root and one-year old cane. Microscopy revealed that virulent *Agrobacteria* mainly

accumulate in defined spots of sclerenchymatous tissue, intercellular space and tissues associated with vessels. Therefore, there is unoccupied living space in a crown gall, which can be additionally colonized by tumour-specific bacteria. A season-independent stable core bacteria exists in grapevine crown galls in contrast to healthy graft unions, consisting of OTUs assigned to *A. vitis*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Agrobacterium tumefaciens*, Gammaproteobacteria and Burkholderiales. These bacteria are predominantly recruited from the soil and most likely profit from special nutrients in the crown gall. The crown gall contains opines, exclusively produced by transformed plant cells. Curiously individual isolates of *Agrobacteria* and *Pseudomonas* of this study that are non-virulent do not outcompete virulent *A. vitis* in the crown gall but harbour, like *A. vitis*, genes involved in octopin-catabolism or use opines in liquid cultures as a sole nutrient source. Although synthetic bacterial communities revealed that the tumour-specific bacteria are not required for crown gall induction using *in vitro* grown grapevine plantlets, they may have different functions in crown gall persistence. A *Serratia*-isolate inhibits the growth of *A. vitis* on solid medium, others reduce or support crown gall development, while some, according to literature, increase resistance of the grapevine plant against biotic and abiotic stresses.

Taken together, among the 150 bacteria found in the crown galls, I identified and isolated bacteria in addition to *A. vitis* that profit from the new ecological niche suggesting an opportunistic lifestyle with different ecological functions. An ecological equilibrium in a bacterial community that balances crown gall growth will support the existence of grapevine plants with a crown gall in vineyards.

7. Literaturverzeichnis

Teile der Methoden und Ergebnisse, die in dieser Arbeit präsentiert und diskutiert werden, wurden bereits, mit mir als Erstautor, im Peer-Review-Journal „Applied and Environmental Biology“ veröffentlicht [135].

1. Smith, E.F. and C.O. Townsend, *A Plant-Tumor of Bacterial Origin*. Science, 1907. **25**(643): p. 671-3.
2. Alippi, A.M., A.C. Lopez, and P.A. Balatti, *First Report of Agrobacterium rubi and A. rhizogenes Causing Crown and Root Gall and Hairy Root on Blueberry in Argentina*. Plant Disease, 2010. **94**(8): p. 1064-1065.
3. Yakabe, L.E., S.R. Parker, and D.A. Kluepfel, *Incidence of Agrobacterium tumefaciens Biovar 1 in and on 'Paradox' (Juglans hindsii x Juglans regia) Walnut Seed Collected from Commercial Nurseries*. Plant Disease, 2014. **98**(6): p. 766-770.
4. Keane, P.J., A. Kerr, and P.B. New, *Crown Gall of Stone Fruit .2. Identification and Nomenclature of Agrobacterium Isolates*. Australian Journal of Biological Sciences, 1970. **23**(3): p. 585-&.
5. Huang, Y.Y., et al., *Complete Genome Sequence of Agrobacterium tumefaciens Ach5*. Genome Announc, 2015. **3**(3).
6. White, P.R. and A.C. Braun, *Crown Gall Production by Bacteria-Free Tumor Tissues*. Science, 1941. **94**(2436): p. 239-41.
7. Ride, M., et al., *Characterization of plasmid-borne and chrome some-encoded traits of Agrobacterium biovar 1, 2, and 3 strains from France*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(5): p. 1818-1825.
8. Genov, N., et al., *Molecular and phenotypic characterization of Agrobacterium species from vineyards allows identification of typical Agrobacterium vitis and atypical biovar 1 strains*. J Appl Microbiol, 2015. **118**(6): p. 1465-77.
9. Palacio-Bielsa, A., et al., *Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three Agrobacterium species isolated from grapevine tumours*. Plant Pathology, 2009. **58**(3): p. 584-593.
10. Kuzmanovic, N., et al., *First Report of Agrobacterium vitis as the Causal Agent of Grapevine Crown Gall in Serbia*. Plant Disease, 2012. **96**(2): p. 286-286.

11. Canik Orel, D., et al., *Phenotypic and molecular characterization of Rhizobium vitis strains from vineyards in Turkey*. *Phytopathologia Mediterranea*, 2016. **55**(1): p. 41-53.
12. Ignatov, A.N., et al., *First Report of Agrobacterium vitis Causing Crown Galls of Wine Grape in Russia*. *Plant Disease*, 2016. **100**(4): p. 853-854.
13. Johnson, K.L., et al., *Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic Agrobacterium vitis in grapevines*. *Phytopathology*, 2013. **103**(6): p. 633-40.
14. Kawaguchi, A. and K. Inoue, *Grapevine crown gall caused by Rhizobium radiobacter (Ti) in Japan*. *Journal of General Plant Pathology*, 2009. **75**(3): p. 205-212.
15. Eastwell, K.C., P.L. Sholberg, and R.J. Saylor, *Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of Rhizobium vitis, causal agent of crown gall disease in grapevines*. *Crop Protection*, 2006. **25**(11): p. 1191-1200.
16. Loubser, J.T., *Identification of Agrobacterium-Tumefaciens Biotype-3 on Grapevine in South-Africa*. *Plant Disease Reporter*, 1978. **62**(8): p. 730-731.
17. Schurr, U., et al., *Structural and functional evidence for xylem-mediated water transport and high transpiration in Agrobacterium tumefaciens-induced tumors of Ricinus communis*. *Botanica Acta*, 1996. **109**(5): p. 405-411.
18. Ullrich, C.I. and R. Aloni, *Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours*. *J Exp Bot*, 2000. **51**(353): p. 1951-60.
19. Burr, T.J. and L. Otten, *CROWN GALL OF GRAPE: Biology and Disease Management*. *Annu Rev Phytopathol*, 1999. **37**: p. 53-80.
20. Burr, T.J., et al., *Survival and Tumorigenicity of Agrobacterium-Vitis in Living and Decaying Grape Roots and Canes in Soil*. *Plant Disease*, 1995. **79**(7): p. 677-682.
21. Johnson, K.L., et al., *Distribution of Agrobacterium vitis in Grapevines and Its Relevance to Pathogen Elimination*. *Plant Disease*, 2016. **100**(4): p. 791-796.
22. Martins, G., et al., *Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e73013.
23. Poppenberger, B., W. Leonhardt, and H. Redl, *Latent persistence of Agrobacterium vitis in micropropagated Vitis vinifera*. *Vitis*, 2002. **41**(2): p. 113-114.

24. Peduto, F., G. Marchi, and G. Surico, *Indexing Agrobacterium vitis in Asymptomatic Grapevine Propagation Material by Two Nested PCR Assays*. American Journal of Enology and Viticulture, 2010. **61**(1): p. 102-112.
25. Kaufmann, M., H.H. Kassemeyer, and L. Otten, *Isolation of Agrobacterium vitis from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation*. Vitis, 1996. **35**(3): p. 151-153.
26. Genov, I., et al., *Isolation and characterization of Agrobacterium strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, V-vinifera ssp silvestris*. Vitis, 2006. **45**(2): p. 97-101.
27. Burr, T.J. and B.H. Katz, *Isolation of Agrobacterium-Tumefaciens Biovar-3 from Grapevine Galls and Sap, and from Vineyard Soil*. Phytopathology, 1983. **73**(2): p. 163-165.
28. Tarbah, F. and R.N. Goodman, *Systemic Spread of Agrobacterium-Tumefaciens Biovar-3 in the Vascular System of Grapes*. Phytopathology, 1987. **77**(6): p. 915-920.
29. Bauer, C., et al., *Population-Dynamics of Agrobacterium-Vitis in 2 Grapevine Varieties during the Vegetation Period*. Vitis, 1994. **33**(1): p. 25-29.
30. Stachel, S.E., E.W. Nester, and P.C. Zambryski, *A Plant-Cell Factor Induces Agrobacterium-Tumefaciens-Vir Gene-Expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(2): p. 379-383.
31. Lin, Y.H., et al., *Role of the VirA histidine autokinase of Agrobacterium tumefaciens in the initial steps of pathogenesis*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 195.
32. Shaw, C.H., et al., *virA and virG are the Ti-plasmid functions required for chemotaxis of Agrobacterium tumefaciens towards acetosyringone*. Mol Microbiol, 1988. **2**(3): p. 413-7.
33. Stachel, S.E., et al., *Identification of the Signal Molecules Produced by Wounded Plant-Cells That Activate T-DNA Transfer in Agrobacterium-Tumefaciens*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 624-629.
34. Tarbah, F.A. and R.N. Goodman, *Ultrastructural Observations of the Process of Agrobacterium-Tumefaciens Biovar-3 Infection of Grape Cv Chancellor*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1988. **32**(3): p. 437-453.
35. Gelvin, S.B., *Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation*. Annual Review of Phytopathology, Vol 48, 2010. **48**: p. 45-68.

36. Chilton, M.D., et al., *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis*. Cell, 1977. **11**(2): p. 263-71.
37. Lee, C.W., et al., *Agrobacterium tumefaciens promotes tumor induction by modulating pathogen defense in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2009. **21**(9): p. 2948-62.
38. Klee, H., et al., *Nucleotide-Sequence of the Tms Genes of the Ptiabnc Octopine Ti Plasmid - 2 Gene-Products Involved in Plant Tumorigenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1984. **81**(6): p. 1728-1732.
39. Zhang, Y., et al., *Regulation of Oncogene Expression in T-DNA-Transformed Host Plant Cells*. Plos Pathogens, 2015. **11**(1).
40. Escobar, M.A., et al., *RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(23): p. 13437-13442.
41. Thomashow, M.F., et al., *Molecular-Basis for the Auxin-Independent Phenotype of Crown Gall Tumor-Tissues*. Science, 1986. **231**(4738): p. 616-618.
42. Astot, C., et al., *An alternative cytokinin biosynthesis pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(26): p. 14778-14783.
43. Garfinkel, D.J. and E.W. Nester, *Agrobacterium tumefaciens mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism*. J Bacteriol, 1980. **144**(2): p. 732-43.
44. Lang, J., et al., *Fitness costs restrict niche expansion by generalist niche-constructing pathogens*. ISME J, 2017. **11**(2): p. 374-385.
45. Tarbah, F.A. and R.N. Goodman, *Anatomy of Tumor-Development in Grape Stem Tissue Inoculated with Agrobacterium-Tumefaciens Biovar-3, Strain Ag63*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1988. **32**(3): p. 455-466.
46. Deeken, R., et al., *An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach*. Plant Cell, 2006. **18**(12): p. 3617-34.
47. Mistrik, I., et al., *Impact of Agrobacterium tumefaciens-induced stem tumors on NO₃-uptake in Ricinus communis*. Plant and Soil, 2000. **226**(1): p. 87-98.

48. Veselov, D., et al., *Development of Agrobacterium tumefaciens C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid*. *Planta*, 2003. **216**(3): p. 512-22.
49. Wachter, R., et al., *Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 2003. **133**(3): p. 1024-1037.
50. White, P.R. and A.C. Braun, *A Cancerous Neoplasm of Plants. Autonomous Bacteria-Free Crown-Gall Tissue*. *The Journal of Cancer Research*, 1942. **2**: p. 21.
51. Aloni, R., K.S. Pradel, and C.I. Ullrich, *The 3-Dimensional Structure of Vascular Tissues in Agrobacterium Tumefaciens-Induced Crown Galls and in the Host Stems of Ricinus-Communis L*. *Planta*, 1995. **196**(3): p. 597-605.
52. Walther, L., *Vitis vinifera. Aufbau von Sprossachse und Wurzelhalsgallentumor im Vergleich in Julis-von-Sachs Institut für biophysik und Pflanzenphysiologie*. 2015, Universität Würzburg.
53. Deeken, R., et al., *Tumour development in Arabidopsis thaliana involves the Shaker-like K⁺ channels AKT1 and AKT2/3*. *Plant J*, 2003. **34**(6): p. 778-87.
54. Marx, S. and C.I. Ullricheberius, *Solute Accumulation and Electrical Membrane-Potential in Agrobacterium-Tumefaciens-Induced Crown Galls in Kalanchoe-Diagremontiana Leaves*. *Plant Science*, 1988. **57**(1): p. 27-36.
55. Winkler, A.J. and W.O. Williams, *Starch and Sugars of Vitis-Vinifera*. *Plant Physiology*, 1945. **20**(3): p. 412-432.
56. Trockenbrodt, M., *Survey and Discussion of the Terminology Used in Bark Anatomy*. *Iawa Bulletin*, 1990. **11**(2): p. 141-166.
57. Esau, K., *Development and Structure of the Phloem Tissue .2*. *Botanical Review*, 1950. **16**(2): p. 67-114.
58. Davis, J.D. and R.F. Evert, *Seasonal Cycle of Phloem Development in Woody Vines*. *Botanical Gazette*, 1970. **131**(2): p. 128-&.
59. Pouzoulet, J., et al., *Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine*. *Front Plant Sci*, 2014. **5**: p. 253.
60. Ojeda, H., et al., *Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement*. *Vitis*, 1999. **38**(4): p. 145-150.

61. Vandenkoornhuysen, P., et al., *The importance of the microbiome of the plant holobiont*. *New Phytol*, 2015. **206**(4): p. 1196-206.
62. Bokulich, N.A., et al., *Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics*. *MBio*, 2016. **7**(3).
63. Bokulich, N.A., et al., *Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(1): p. E139-48.
64. Zarraonaindia, I., et al., *The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota*. *Mbio*, 2015. **6**(2).
65. Vega-Avila, A.D., et al., *Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015. **107**(2): p. 575-88.
66. Samad, A., et al., *Shared and host-specific microbiome diversity and functioning of grapevine and accompanying weed plants*. *Environ Microbiol*, 2016.
67. Kecskemeti, E., B. Berkelmann-Lohnertz, and A. Reineke, *Are Epiphytic Microbial Communities in the Carposphere of Ripening Grape Clusters (*Vitis vinifera* L.) Different between Conventional, Organic, and Biodynamic Grapes?* *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160852.
68. Perazzolli, M., et al., *Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides*. *Appl Environ Microbiol*, 2014. **80**(12): p. 3585-96.
69. Bulgari, D., et al., *Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process*. *Bmc Microbiology*, 2014. **14**.
70. Pinto, C., et al., *Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome*. *Plos One*, 2014. **9**(1).
71. Marasco, R., et al., *Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 491091.
72. Campisano, A., et al., *Bacterial Endophytic Communities in the Grapevine Depend on Pest Management*. *Plos One*, 2014. **9**(11).
73. Baldan, E., et al., *Beneficial Bacteria Isolated from Grapevine Inner Tissues Shape *Arabidopsis thaliana* Roots*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0140252.

74. Glick, B.R., *Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world*. Microbiol Res, 2014. **169**(1): p. 30-9.
75. Rolli, E., et al., *Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait*. Environ Microbiol, 2015. **17**(2): p. 316-31.
76. Fernandez, O., et al., *Burkholderia phytofirmans PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism*. Mol Plant Microbe Interact, 2012. **25**(4): p. 496-504.
77. Miotto-Vilanova, L., et al., *Burkholderia phytofirmans PsJN Confers Grapevine Resistance against Botrytis cinerea via a Direct Antimicrobial Effect Combined with a Better Resource Mobilization*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 1236.
78. Armijo, G., et al., *Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios*. Front Plant Sci, 2016. **7**: p. 382.
79. Bell, C.R., G.A. Dickie, and J.W.Y.F. Chan, *Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in planta*. American Journal of Enology and Viticulture, 1995. **46**(4): p. 499-508.
80. Khmel, I.A., et al., *Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two Pseudomonas spp. with a wide spectrum of antagonistic activity*. Biocontrol Science and Technology, 1998. **8**(1): p. 45-57.
81. Li, L., et al., *Disruption of gene pqqA or pqqB reduces plant growth promotion activity and biocontrol of crown gall disease by Rahnella aquatilis HX2*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115010.
82. Buonauro, R., et al., *The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease*. Front Plant Sci, 2015. **6**: p. 434.
83. Young, J.M., et al., *Changing Concepts in the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria*. Annual Review of Phytopathology, 1992. **30**: p. 67-105.
84. Skerman, V.B.D., V. McGowan, and P.H.A. Sneath, *Approved Lists of Bacterial Names*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1980. **30**(1): p. 225-420.
85. Ophel, K. and A. Kerr, *Agrobacterium-Vitis Sp-Nov for Strains of Agrobacterium Biovar-3 from Grapevines*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1990. **40**(3): p. 236-241.
86. Van Larebeke, N., et al., *Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer*. Nature, 1975. **255**(5511): p. 742-3.

87. Watson, B., et al., *Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 1975. **123**(1): p. 255-64.
88. Allardet-Servent, A., et al., *Presence of one linear and one circular chromosome in the Agrobacterium tumefaciens C58 genome*. J Bacteriol, 1993. **175**(24): p. 7869-74.
89. Szegedi, E., et al., *Opines in Crown Gall Tumors Induced by Biotype-3 Isolates of Agrobacterium-Tumefaciens*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1988. **32**(2): p. 237-247.
90. Petit, A., et al., *Further Extension of the Opine Concept - Plasmids in Agrobacterium-Rhizogenes Cooperate for Opine Degradation*. Molecular & General Genetics, 1983. **190**(2): p. 204-214.
91. Pionnat, S., et al., *Ti plasmids from Agrobacterium characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(9): p. 4197-4206.
92. Moriguchi, K., et al., *The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae*. Journal of Molecular Biology, 2001. **307**(3): p. 771-784.
93. Davioud, E., et al., *Cucumopine - a New T-DNA Encoded Opine in Hairy Root and Crown Gall*. Phytochemistry, 1988. **27**(8): p. 2429-2433.
94. Dessaux, Y., et al., *Opine utilization by Agrobacterium spp.: octopine-type Ti plasmids encode two pathways for mannopinic acid degradation*. J Bacteriol, 1988. **170**(7): p. 2939-46.
95. Otten, L., et al., *Phylogenetic relationships between Agrobacterium vitis isolates and their Ti plasmids*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1996. **9**(9): p. 782-786.
96. Canaday, J., et al., *Organization and Functional-Analysis of 3 T-Dnas from the Vitopine Ti Plasmid Ptis4*. Molecular & General Genetics, 1992. **235**(2-3): p. 292-303.
97. Sule, S., et al., *Surface motility and associated surfactant production in Agrobacterium vitis*. Lett Appl Microbiol, 2009. **49**(5): p. 596-601.
98. Lowe, N., et al., *Quorum-sensing signal production by Agrobacterium vitis strains and their tumor-inducing and tartrate-catabolic plasmids*. Fems Microbiology Letters, 2009. **296**(1): p. 102-109.

99. Zhang, L.H. and A. Kerr, *A diffusible compound can enhance conjugal transfer of the Ti plasmid in Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 1991. **173**(6): p. 1867-72.
100. Zhang, L., et al., *Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones*. Nature, 1993. **362**(6419): p. 446-8.
101. Llop, P., et al., *Recovery of nonpathogenic mutant bacteria from tumors caused by several Agrobacterium tumefaciens strains: a frequent event?* Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(20): p. 6504-14.
102. Shams, M., et al., *Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of Agrobacterium spp. using recA-based PCR*. Systematic and Applied Microbiology, 2013. **36**(5): p. 351-358.
103. Willems, A. and M.D. Collins, *Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences*. Int J Syst Bacteriol, 1993. **43**(2): p. 305-13.
104. Abe, M., et al., *Transfer of the symbiotic plasmid from Rhizobium leguminosarum biovar trifolii to Agrobacterium tumefaciens*. J Gen Appl Microbiol, 1998. **44**(1): p. 65-74.
105. Young, J.M., et al., *Classification and nomenclature of Agrobacterium and Rhizobium*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 5): p. 1689-95.
106. Kuzmanovic, N., et al., *Genetic relatedness and recombination analysis of Allorhizobium vitis strains associated with grapevine crown gall outbreaks in Europe*. J Appl Microbiol, 2015. **119**(3): p. 786-96.
107. Goodner, B., et al., *Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent Agrobacterium tumefaciens C58*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2323-8.
108. Wood, D.W., et al., *The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2317-23.
109. Slater, S.C., et al., *Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria*. J Bacteriol, 2009. **191**(8): p. 2501-11.
110. Filo, A., et al., *Grapevine Crown Gall Suppression Using Biological Control and Genetic Engineering: A Review of Recent Research*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013. **64**(1): p. 1-14.
111. Kawaguchi, A., K. Inoue, and Y. Ichinose, *Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic Agrobacterium vitis strain VAR03-1*. Phytopathology, 2008. **98**(11): p. 1218-25.

112. Kawaguchi, A., *Reduction in pathogen populations at grapevine wound sites is associated with the mechanism underlying the biological control of crown gall by rhizobium vitis strain ARK-1*. *Microbes Environ*, 2014. **29**(3): p. 296-302.
113. Staphorst, J.L., et al., *Agrocin-Producing Pathogenic and Nonpathogenic Biotype-3 Strains of Agrobacterium-Tumefaciens Active against Biotype-3 Pathogens*. *Current Microbiology*, 1985. **12**(1): p. 45-52.
114. Vicedo, B., et al., *Spontaneous transfer of the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens and the nopaline catabolism plasmid of A-radiobacter strain K84 in crown gall tissue*. *Phytopathology*, 1996. **86**(5): p. 528-534.
115. Pulawska, J., *CROWN GALL OF STONE FRUITS AND NUTS, ECONOMIC SIGNIFICANCE AND DIVERSITY OF ITS CAUSAL AGENTS: TUMORIGENIC AGROBACTERIUM spp.* *Journal of Plant Pathology*, 2010. **92**(1): p. S87-S98.
116. Ferreira, J.H.S., F.G.H. van Zyl, and J.L. Staphorst, *Agrobacterium tumefaciens biovar 3 Responsible for Reduction in Yield and Vigour of Muscat d'Alexandrie*. *S. Afr. J. Enol. Vitiv.*, 1992. **13**(2).
117. Schroth, M.N., et al., *Reduction in Yield and Vigor of Grapevine Caused by Crown Gall Disease*. *Plant Disease*, 1988. **72**(3): p. 241-246.
118. Gil, M., et al., *Effect of two different treatments for reducing grape yield in Vitis vinifera cv Syrah on wine composition and quality: berry thinning versus cluster thinning*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(20): p. 4968-78.
119. Jäger, J., et al., *Latent occurrence of Agrobacterium tumefaciens biovar 3 in grapevine (Vitis vinifera L.)*. *Vitic. Enol. Sci.*, 1989. **44**: p. 7.
120. Burr, T.J., et al., *Crown gall of grape - Biology of Agrobacterium vitis and the development of disease control strategies*. *Plant Disease*, 1998. **82**(12): p. 1288-1297.
121. Kawaguchi, A., *Biological control agent Agrobacterium vitis strain ARK-1 suppresses expression of the virD2 and virE2 genes in tumorigenic A-vitis*. *European Journal of Plant Pathology*, 2015. **143**(4): p. 789-799.
122. Creasap, J.E., et al., *Effect of Wound Position, Auxin, and Agrobacterium vitis Strain F2/5 on Wound Healing and Crown Gall in Grapevine*. *Phytopathology*, 2005. **95**(4): p. 362-7.
123. Kaewnum, S., et al., *A host-specific biological control of grape crown gall by Agrobacterium vitis strain F2/5: its regulation and population dynamics*. *Phytopathology*, 2013. **103**(5): p. 427-35.

124. Hao, G., et al., *luxR* homolog *avhR* in *Agrobacterium vitis* affects the development of a grape-specific necrosis and a tobacco hypersensitive response. *J Bacteriol*, 2005. **187**(1): p. 185-92.
125. Zheng, D. and T.J. Burr, *Inhibition of Grape Crown Gall by Agrobacterium vitis F2/5 Requires Two Nonribosomal Peptide Synthetases and One Polyketide Synthase*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2016. **29**(2): p. 109-18.
126. Hajdukiewicz, P., Z. Svab, and P. Maliga, *The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation*. *Plant Mol Biol*, 1994. **25**(6): p. 989-94.
127. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. *Gene*, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
128. Koncz, C. and J. Schell, *The Promoter of Tl-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector*. *Molecular & General Genetics*, 1986. **204**(3): p. 383-396.
129. Kozich, J.J., et al., *Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform*. *Appl Environ Microbiol*, 2013. **79**(17): p. 5112-20.
130. Fierer, N., et al., *The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(46): p. 17994-9.
131. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(19): p. 2460-1.
132. Edgar, R.C., et al., *UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection*. *Bioinformatics*, 2011. **27**(16): p. 2194-200.
133. Edgar, R.C., *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. *Nat Methods*, 2013. **10**(10): p. 996-8.
134. Wang, Q., et al., *Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(16): p. 5261-7.
135. Faist, H., et al., *Grapevine (Vitis vinifera) Crown Galls Host Distinct Microbiota*. *Appl Environ Microbiol*, 2016. **82**(18): p. 5542-52.
136. McMurdie, P.J. and S. Holmes, *phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61217.

137. McMurdie, P.J. and S. Holmes, *Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible*. PLoS Comput Biol, 2014. **10**(4): p. e1003531.
138. Robinson, M.D. and G.K. Smyth, *Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2881-7.
139. Spellerberg, I.F. and P.J. Fedor, *A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon-Wiener' Index*. Global Ecology and Biogeography, 2003. **12**(3): p. 177-179.
140. Bauer, D.F., *Constructing Confidence Sets Using Rank Statistics*. Journal of the American Statistical Association, 1972. **67**(339): p. 687-690.
141. Breiman, L., *Random forests*. Machine Learning, 2001. **45**(1): p. 5-32.
142. Chen, H. and P.C. Boutros, *VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 35.
143. Clarridge, J.E., 3rd, *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(4): p. 840-62, table of contents.
144. Mallo, D. and D. Posada, *Multilocus inference of species trees and DNA barcoding*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1702).
145. Bankevich, A., et al., *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. J Comput Biol, 2012. **19**(5): p. 455-77.
146. Boetzer, M., et al., *Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE*. Bioinformatics, 2011. **27**(4): p. 578-9.
147. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol, 2009. **10**(3): p. R25.
148. Gurevich, A., et al., *QUAST: quality assessment tool for genome assemblies*. Bioinformatics, 2013. **29**(8): p. 1072-5.
149. Dupont, C.L., et al., *Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage*. ISME J, 2012. **6**(6): p. 1186-99.
150. Aziz, R.K., et al., *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 75.
151. Lowe, T.M. and S.R. Eddy, *tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(5): p. 955-64.

152. Lagesen, K., et al., *RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(9): p. 3100-8.
153. Richter, M. and R. Rossello-Mora, *Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(45): p. 19126-31.
154. Bai, Y., et al., *Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota*. Nature, 2015. **528**(7582): p. 364-+.
155. Fischer, S., et al., *Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups*. Curr Protoc Bioinformatics, 2011. **Chapter 6**: p. Unit 6 12 1-19.
156. Berezin, M.Y. and S. Achilefu, *Fluorescence lifetime measurements and biological imaging*. Chem Rev, 2010. **110**(5): p. 2641-84.
157. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
158. Aigouy, B. and V. Mirouse, *ScientiFig: a tool to build publication-ready scientific figures*. Nat Methods, 2013. **10**(11): p. 1048.
159. Anne Müller, *Untersuchungen zur bakteriellen Besiedlung von Mauke - Tumoren an mainfränkischen Weinstöcken*, in *Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften*. 2012, University of Würzburg: Würzburg.
160. Szegedi, E. and L. Otten, *Incompatibility properties of tartrate utilization plasmids derived from Agrobacterium vitis strains*. Plasmid, 1998. **39**(1): p. 35-40.
161. Zanker, H., et al., *Octopine and nopaline oxidases from Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens: molecular analysis, relationship, and functional characterization*. J Bacteriol, 1994. **176**(15): p. 4511-7.
162. Hwang, I., et al., *TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4639-43.
163. Bulgari, D., et al., *Endophytic Bacterial Diversity in Grapevine (Vitis vinifera L.) Leaves Described by 16S rRNA Gene Sequence Analysis and Length Heterogeneity-PCR*. Journal of Microbiology, 2009. **47**(4): p. 393-401.
164. Hacquard, S., et al., *Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(5): p. 603-16.

165. Compant, S., et al., *Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization*. *Microb Ecol*, 2011. **62**(1): p. 188-97.
166. Zgadzaj, R., et al., *Root nodule symbiosis in Lotus japonicus drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(49): p. E7996-E8005.
167. Scharf, B.E., M.F. Hynes, and G.M. Alexandre, *Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations*. *Plant Mol Biol*, 2016. **90**(6): p. 549-59.
168. Gupta Sood, S., *Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003. **45**(3): p. 219-27.
169. Crouzet, P. and L. Otten, *Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from Agrobacterium vitis*. *J Bacteriol*, 1995. **177**(22): p. 6518-26.
170. Furuyoshi, S., et al., *Purification and characterization of a new NAD(+)-dependent enzyme, L-tartrate decarboxylase, from Pseudomonas sp. group Ve-2*. *J Biochem*, 1991. **110**(4): p. 520-5.
171. Diab, S., et al., *Effects of Relative-Humidity on Bacterial Scab Caused by Xanthomonas-Campestris Pv Vesicatoria on Pepper*. *Phytopathology*, 1982. **72**(9): p. 1257-1260.
172. Leben, C., *Relative-Humidity and the Survival of Epiphytic Bacteria with Buds and Leaves of Cucumber Plants*. *Phytopathology*, 1988. **78**(2): p. 179-185.
173. Mocali, S., et al., *Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs*. *Res Microbiol*, 2003. **154**(2): p. 105-14.
174. Shakya, M., et al., *A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature Populus deltoides trees*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76382.
175. Agler, M.T., et al., *Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation*. *PLoS Biol*, 2016. **14**(1): p. e1002352.
176. Reiter, B., et al., *Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(5): p. 2261-8.

177. Yang, C., D.E. Crowley, and J.A. Menge, *16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and Phytophthora infected avocado roots*. FEMS Microbiol Ecol, 2001. **35**(2): p. 129-136.
178. Szegedi, E., et al., *Characterization of Agrobacterium tumefaciens strains isolated from grapevine*. Vitis, 2005. **44**(1): p. 49-54.
179. Fang, Y. and R.P. Ramasamy, *Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection*. Biosensors (Basel), 2015. **5**(3): p. 537-61.
180. Compant, S., et al., *Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growth-promoting bacterium Burkholderia sp. strain PsJN*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(4): p. 1685-93.
181. Mensi, I., et al., *Breaking dogmas: the plant vascular pathogen Xanthomonas albilineans is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome*. Open Biol, 2014. **4**: p. 130116.
182. Maldonado-Gonzalez, M.M., et al., *From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte Pseudomonas fluorescens PICF7 and the pathogen Pseudomonas savastanoi NCPPB 3335 in olive knots*. Microb Biotechnol, 2013. **6**(3): p. 275-87.
183. Grall, S. and C. Manceau, *Colonization of Vitis vinifera by a green fluorescence protein-labeled, gfp-marked strain of Xylophilus ampelinus, the causal agent of bacterial necrosis of grapevine*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(4): p. 1904-12.
184. Vorholt, J.A., *Microbial life in the phyllosphere*. Nature Reviews Microbiology, 2012. **10**(12): p. 828-840.
185. Ghoul, M. and S. Mitri, *The Ecology and Evolution of Microbial Competition*. Trends Microbiol, 2016. **24**(10): p. 833-45.
186. Walther, L., *Untersuchungen zur Ökologie bakterieller Lebensgemeinschaften in Wurzelhalsgallen von Weinreben (Vitis vinifera) der Region Unterfranken*, in *Julius-von-Sachs-Institut*. 2016, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg. p. 75.
187. Nautiyal, C.S. and P. Dion, *Characterization of the Opine-Utilizing Microflora Associated with Samples of Soil and Plants*. Appl Environ Microbiol, 1990. **56**(8): p. 2576-2579.
188. Moore, L.W., W.S. Chilton, and M.L. Canfield, *Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(1): p. 201-7.

189. Platt, T.G., C. Fuqua, and J.D. Bever, *Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen*. *Evolution*, 2012. **66**(6): p. 1953-65.
190. Oger, P., A. Petit, and Y. Dessaux, *Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment*. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(4): p. 369-72.
191. Mansouri, H., et al., *Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(5): p. 2562-6.
192. Pu, X.A. and R.N. Goodman, *Effects of Fumigation and Biological-Control on Infection of Indexed Crown Gall Free Grape Plants*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1993. **44**(3): p. 241-248.
193. Efetova, M., et al., *A central role of abscisic acid in drought stress protection of Agrobacterium-induced tumors on arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2007. **145**(3): p. 853-862.
194. Klinkenberg, J., et al., *Two fatty acid desaturases, STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN Delta9-DESATURASE6 and FATTY ACID DESATURASE3, are involved in drought and hypoxia stress signaling in Arabidopsis crown galls*. *Plant Physiol*, 2014. **164**(2): p. 570-83.
195. Chatelet, D.S., M.A. Matthews, and T.L. Rost, *Xylem structure and connectivity in grapevine (Vitis vinifera) shoots provides a passive mechanism for the spread of bacteria in grape plants*. *Ann Bot*, 2006. **98**(3): p. 483-94.
196. Platt, T.G., J.D. Bever, and C. Fuqua, *A cooperative virulence plasmid imposes a high fitness cost under conditions that induce pathogenesis*. *Proc Biol Sci*, 2012. **279**(1734): p. 1691-9.
197. Yuan, Z.C., et al., *The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(28): p. 11790-5.
198. Yuan, Z.C., et al., *Comparative transcriptome analysis of Agrobacterium tumefaciens in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and gamma-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and Agrobacterium-plant co-evolution*. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(11): p. 2339-54.
199. Waters, C.M. and B.L. Bassler, *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 319-46.
200. Lang, J. and D. Faure, *Functions and regulation of quorum-sensing in Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci*, 2014. **5**: p. 14.

201. Passos da Silva, D., et al., *Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease*. Microbiology, 2014. **160**(Pt 3): p. 556-66.
202. Hosni, T., et al., *Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease*. ISME J, 2011. **5**(12): p. 1857-70.
203. Lindow, S.E., D.C. Army, and C.D. Upper, *Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants*. Plant Physiol, 1982. **70**(4): p. 1084-9.
204. Sule, S. and E. Seemuller, *The Role of Ice Formation in the Infection of Sour Cherry Leaves by Pseudomonas-Syringae Pv Syringae*. Phytopathology, 1987. **77**(2): p. 173-177.
205. Zhao, Y., et al., *Virulence systems of Pseudomonas syringae pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway*. Plant J, 2003. **36**(4): p. 485-99.
206. Brooks, D.M., C.L. Bender, and B.N. Kunkel, *The Pseudomonas syringae phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Pathol, 2005. **6**(6): p. 629-39.
207. Malik, D.K. and S.S. Sindhu, *Production of indole acetic acid by Pseudomonas sp.: effect of coinoculation with Mesorhizobium sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (Cicer arietinum)*. Physiol Mol Biol Plants, 2011. **17**(1): p. 25-32.
208. Gohlke, J. and R. Deeken, *Plant responses to Agrobacterium tumefaciens and crown gall development*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 155.
209. Liu, P. and E.W. Nester, *Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of Agrobacterium tumefaciens C58*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4658-62.
210. Gan, H.M., et al., *Genome sequence of Novosphingobium sp. strain Rr 2-17, a nopaline crown gall-associated bacterium isolated from Vitis vinifera L. grapevine*. J Bacteriol, 2012. **194**(18): p. 5137-8.
211. Hammami, I., et al., *Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated Bacillus subtilis strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains*. Lett Appl Microbiol, 2009. **48**(2): p. 253-60.
212. Dandurishvili, N., et al., *Broad-range antagonistic rhizobacteria Pseudomonas fluorescens and Serratia plymuthica suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants*. J Appl Microbiol, 2011. **110**(1): p. 341-52.

213. Ait Barka, E., J. Nowak, and C. Clement, *Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, Burkholderia phytofirmans strain PsJN*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(11): p. 7246-52.
214. Hardoim, P.R., et al., *The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes*. Microbiol Mol Biol Rev, 2015. **79**(3): p. 293-320.
215. Morris, J.J., *Black Queen evolution: the role of leakiness in structuring microbial communities*. Trends Genet, 2015. **31**(8): p. 475-82.

8. Anhang

8.1. Ergebnisse der Sangersequenzierungen

Die Ergebnisse der Sangersequenzierungen sind im FASTA-Format dargestellt. Nach dem “>“ befindet sich die Nummer des identifizierten Isolats gefolgt vom Namen des Isolats nach dem Unterstrich. Anhand des Namens und der Nummer können die Sangersequenzen den BLAST-Ergebnissen in **Anhang Tabelle 1** zugeordnet werden.

8.1.1. V4-Region der Rhizobiaceae

> 69_HSt2-a

```
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGC
TCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTCGAGTCCGGAAGAGGTGA
GTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
```

>65_HSt2-c

```
GTGCCAGCACGCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGC
TCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTCGAGTCCGGAAGAGGTGA
GTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGGCTCACNTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGAAACCCAGTAGTCC
```

>64_HSt2-b

```
TTGCCAGCTGCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACTGG
GCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCT
CAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTCGAGTCCGGAAGAGGTGAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGAAACC
```

>63_HW2-12

```
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGC
TCAACTGCGGAACTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
```

GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>62_HW4-39

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>61_HW4-36

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAG
CTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTTCGGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGA
GTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>60_HW4-32

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAG
CTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTTCGGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGA
GTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCRGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>59_HSt2-17

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>58_HSt2-16

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>57_HSt2-15

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTCACCTCTACACTCGCAATTCACCTTACCTCTTCCATACTCAAGATA
CCCAGTATCAAAGGCAGTTCCAGAGTTGAGCTCTGGGATTTACCCCTGACTT
AAATATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>56_HSt2-14

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT

GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>55_HSt2-13

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>53_HSt2-11

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAANGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAG
CTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
GTGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAG
TGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>52_HSt1-5

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCCTTACCTCTTCATACTCAAGATA
ACCAGTATCAAAGGCAGTTCCGCAGTTGAGCTGCGGGATTTACCCCCTGACTT
AATTATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>50_HW1-8

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>49_HW1-6

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTGCGGAAGTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>48_HSt1-6

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCCTTACCTCTTCATACTCAAGATA
ACCAGTATCAAAGGCAGTTCCGCAGTTGAGCTGCGGGATTTACCCCCTGACTT
AATTATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>46_HSt2-12

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT

GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGNG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>43_HW2-13

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCCACTTACCTCTTCCATACTCAAGATA
ACCAGTATCAAAGGCAGTTCCGCAGTTGAGCTGCGGGATTTACCCCTGACTT
AATTATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>38_HW4-31

GGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GAGCAAACAGGATTAGAAACCCCCAGTAG

>37_HW3-30

GGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GAGCAAACAGGATTAGAAACCCCCAGTAG

>36_HW3-29

CGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTG
GAACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTCC
GAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGAAACCCCCAGTAG

>35_HW3-22

CTGGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGA
GCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTA
AGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGAAACCCCCAGTAG

>34_HW3-21

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>33_HW1-10

CTGGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGA
GCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTA
AGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGAAACCCCCAGTAG

>32_HW1-7

CTGGGCGTAANGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAG
AGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGT
AAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACC

AGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGAAACCCAGTAGT

>31_HW4-a1

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>30_HW3-a15

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>9_HStA-11

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTGCGGAAGTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>7_HStA-7

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCACCTTACCTCTTCATACTCAAGATA
ACCAGTATCAAAGGCAGTTCCGCAGTTGAGCTGCGGGATTTACCCCCTGACTT
AATTATNCCGCCTACGTGCGCNTTTACGCCAGTAANTTCCGAACAANCCTA
GCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>6_HStA-1

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCACCTTACCTCTTCATACTCAAGATA
ACCAGTATCAAAGGCAGTTCCGCAGTTGAGCTGCGGGATTTACCCCCTGACTT
AATTATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>5_HStA-22

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>4_HStA-21

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTGCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGCAATTCACCTTACCTCTTCATACTCAAGATA
CCCAGTATCAAAGGCAGTTCCAGAGTTGAGCTCTGGGATTTACCCCCTGACTT

AAATATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCC
CCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>3_HStA-20

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTA
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>2_HStA-15

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTA
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>1_HStA-14

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTA
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGC
TCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAG
TGGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

8.1.2. V4-Region der Weinbergisolate ohne Rhizobiaceae

>143_Z41

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTA
GGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGC
TTAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCAGAGGGGG
GTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
TGCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>142_Z40

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATTA
GGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCCGAGC
TTAACTTGGGAATTGCATTGGTACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGG
GTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
TGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>141_Z39

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTACAAGCGTTGTCCGGAATTAT
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGGAAACGCAACGC
TTAACGTTGCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGT
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG

TGGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTAACCTGACACTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>140_Z38

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGC
TCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAA
AGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>139_Z37

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTACCCGGAATCACTG
GGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCCTGCCAAGTCTGGTTTTAAAGCCTGCGGC
TCAACCGCAGAGATGGACTGGAGACTGGTAGGCTAGACCTCTGGAGAGAGA
ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATACCAGGAGGAACACCG
ATGGCGAAGGCAGGTTCTTGGACAGAAGGTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGT
GGGAGCAAACCGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>138_Z36

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGC
TTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGA
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA
TGCGCAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>137_Z35

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGC
TCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGA
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA
TGCGCAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>136_Z34

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGC
TTAACCTGGGAATTGCGCTTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAGAGGGGG
GTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
TGCGCAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>134_HSt4-Z7

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCG
TCAGTTACAGACCAAAGAGTCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTA
CGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTCTTCTTCTGTACTCAAGCCTT
CCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTA
AAAGGCCGCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCA
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>129_HSt3

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGTG
TCAGTTACAGCCCAGAGTCCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTG
CGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCAGACTCCCTACTGCACTCTAGTCA
GCCCGTACCCACTGCACGCGCAACGTTAAGCGTTGCGTTTCCACAGCAGACG

TGACCAACCACCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGTA
CCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>126_HSt3

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGTG
TCAGTTACAGCCCAGAGTCCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTG
CGCATTTACACCGCTACACCAGGAATTCAGACTCCCCTACTGCACTCTAGTCA
GCCCGTACCCACTGCACGCGAACGTTAAGCGTTGCGTTTCCACAGCAGACG
TGACCAACCACCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGTA
CCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>125_HSt2

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCG
TCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTG
CGCATTTCCACCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAGTCT
GCCCGTACCCACCGCAGATCCCGGGGTTAAGCCCCGGACTTTCACGACAGAC
GCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTCG
CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>111_HSt2

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTACCGGACCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTTCCGGACTCGAGATT
GCCAGTATTAAGGCAGTTCCCGGGGTTGAGCCCCTGGGATTTACCCCTAAC
TTAAC

>100_HSt1

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAATGCCGGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTCCCGGATTCAAGCAA
TCCAGTCTCAAAGGCAGTTCCCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACCTCTGACTT
AAATCGCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCC
CCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>92_HSt2

GGACTACCAGGGTATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCG
TCAGTTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTG
CGCATTTCCACCGCTACACCAGGAATTCATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGC
CGTACCACTGCAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTCACAGCAGACCGACAAC
CGCCACGAGCTTTTCGCCATAATTCCGGATAAGCTTGCGCCTACGTA

>89_HSt1

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAATACCAGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTCCTGGATTCAAGCGA
TGCAGTCTTAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGCTTTCACCTCTAACTT
ACAAAGCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCT
CCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>82_HSt1

GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCG
TCAGTACCGGACCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCGAATATCTA
CGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTTCCGGACTCGAGATT
GCCAGTATTAAGGCAGTTCCAGGGTTGAGCCCTGGGATTTACCCCTAACTT
ACAATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCC
CCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

>78_HSt2

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGG
TTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGA
TCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG
TGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>74_HSt1

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGC
TCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGA
TTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA
TGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTG
GGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCC

>73_HSt1

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGC
TCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGA
TTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGA
TGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTG
GGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCC

>66_HSt2-d

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTACAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTACGTCGCTGCTGTGGAAACGCAACGC
TTAACGTTGCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGT
CTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG
TGCGAAGGCGGGACTCTGGGCTGTA ACTGACACTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>47_HB2-19

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGC
TCAACCTGGGAACTGCATCCAAA ACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTG
GGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>42_HSt1-3

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGGAGC
TTAACTCGGGA ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGG
GTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGCGAAGGCGGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTACGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>41_HSt1-10

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCGCGC
TTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGCGAAGGCGGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGAWACCCTGGTAGTCC

>40_HSt1-9

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGC
TAACTCGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTACGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

>39_HSt1-8

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGC
TAACTCGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTACGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC

8.2. Bakterienkollektion und Identifikation mittels BLAST

Anhang Tabelle 1 Bakterienkollektion. Die taxonomische Identität der V4-Region des 16SrRNA Gens wurde mit Hilfe eines „Basic Local Alignment Search Tools“ BLAST ermittelt. V4 Identität steht für den Treffer mit dem höchsten „Bit-Score“. Der Anteil identischer Basen in Prozent (ID %) mit der Referenzsequenz aus der NCBI Genome Datenbank (Referenznummer), der interne Name der enthaltenen Bakterien und die interne Nummer des Glycerinstocks (Nr.) sind gelistet.

V4 Identität	ID %	Referenznummer	Name	Nr.
--------------	------	----------------	------	-----

A

Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HSt1-6	HF48
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HSt1-5	HF52
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HW1-6	HF49
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HW2-12	HF63
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HW2-13	HF43
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HStA-1	HF6
Agrobacterium vitis	100	NC_011989	HStA-11	HF9
Agrobacterium vitis	98,6	NC_011989	HStA-7	HF7

B

Rhizobium sp.	98,3	NZ_LMFF01000001	HW1-7	HF32
Rhizobium sp.	99,1	NZ_LMFF01000001	HW1-10	HF33
Rhizobium sp.	100	NZ_LMFF01000001	HW1-8	HF50
Rhizobium sp.	97,9	NZ_KB905370	HSt2-a	HF69
Rhizobium sp.	97,4	NZ_KB905370	Hst2-b	HF64
Rhizobium sp.	95,9	NZ_KB905370	HSt2-c	HF65
Rhizobium sp.	99,7	NZ_LMGN01000001	HSt2-12	HF46
Rhizobium sp.	99,7	NZ_LMGN01000001	HSt2-11	HF53
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HSt2-13	HF55
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HSt2-14	HF56
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HSt2-15	HF57
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HSt2-16	HF58
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HSt2-17	HF59
Rhizobium sp.	100	NZ_LMFF01000001	HW3-a15	HF30
Rhizobium sp.	100	NZ_LMFF01000001	HW3-21	HF34
Rhizobium sp.	99,1	NZ_LMFF01000001	HW3-22	HF35
Rhizobium sp.	99,5	NZ_LMFF01000001	HW3-29	HF36
Rhizobium sp.	99,6	NZ_LMFF01000001	HW3-30	HF37
Rhizobium sp.	99,3	NZ_LMEY01000001	HW4-32	HF60
Rhizobium sp.	99,7	NZ_LMEY01000001	HW4-36	HF61
Rhizobium sp.	100	NZ_LMFF01000001	HW4-a1	HF31
Rhizobium sp.	99,6	NZ_LMFF01000001	HW4-31	HF38

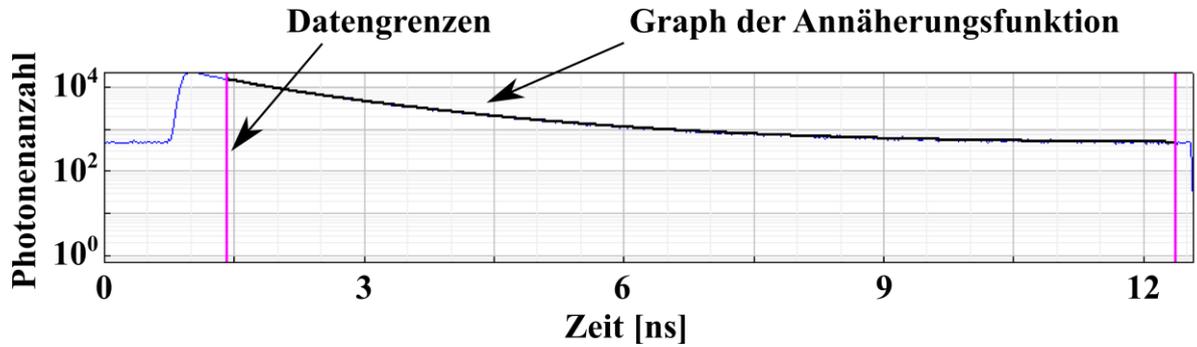
Rhizobium sp.	100	NZ_LMFF01000001	HW4-39	HF62
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HStA-14	HF1
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HStA-15	HF2
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HStA-20	HF3
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HStA-21	HF4
Rhizobium sp.	100	NZ_LMGN01000001	HStA-22	HF5

C

<i>Serratia rubidaea</i>	98,6	NZ_CP014474	HSt1-8	HF39
<i>Serratia rubidaea</i>	98,6	NZ_CP014474	HSt1-9	HF40
<i>Yersinia pestis</i>	99,7	NZ_LIXY01000015	Hst1-10	HF41
<i>Serratia rubidaea</i>	98,6	NZ_CP014474	Hst1-3	HF42
<i>Microbacterium</i> sp.	100	NZ_LMNI01000010	HSt1-73	HF73
<i>Microbacterium</i> sp.	100	NZ_LMNI01000010	HSt1-74	HF74
<i>Mesorhizobium loti</i>	98,3	NZ_KI912159	HSt1-82	HF82
<i>Sphingomonas melonis</i>	100	NZ_KB900605	HSt1-89	HF89
<i>Sphingomonas</i> sp.	100	NZ_CH959307	HSt1-100	HF100
<i>Pseudomonas</i> sp.	99,7	NZ_LN865164	HB2-19	HF47
<i>Brevibacterium linens</i>	100	NZ_CP017150	Hst2-d	HF66
<i>Microbacterium</i> sp.	95,5	NZ_LMPH01000001	HSt2-92	HF92
<i>Mesorhizobium loti</i>	97,2	NZ_LZTK01000001	HSt2-111	HF111
<i>Micrococcus luteus</i>	99,7	NZ_MAYP01000008	HSt2-125	HF125
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	100	NZ_KK211190	Hst2-112b	HF134
<i>Streptomyces griseus</i>	100	NZ_MDKB01000001	HSt2-78a	HF78a
<i>Brevibacterium linens</i>	100	NZ_CP017150	HSt3-126	HF126
<i>Brevibacterium linens</i>	100	NZ_CP017150	HSt-129	HF129
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	100	NC_007974	Z34	HF136
<i>Arthrobacter</i> sp.	100	NZ_LWLP01000001	Z35	HF137
<i>Micrococcus luteus</i>	100	NZ_MAYP01000008	Z36	HF138
<i>Deinococcus swuensis</i>	100	NZ_CP010028	Z37	HF139
<i>Bacillus cereus</i>	100	NZ_KN125577	Z38	HF140
<i>Brevibacterium linens</i>	100	NZ_CP017150	Z39	HF141
<i>Ralstonia pickettii</i>	100	NZ_KN050646	Z40	HF142
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	100	NC_007974	Z41	HF143

8.3. Lokalisation von virulenten *A. tumefaciens*

8.3.1. TCSPC-Diagramm zur Berechnung der Lebensdauer der Fluorophore



Anhang Abbildung 1 „Time correlated single photon counting“ TCSPC-Diagramm zeigt die Abnahme der Photonenzahl pro Nanosekunde von einem Ausschnitt der Fluoreszenzaufnahme als blaue Linie. Innerhalb der Datengrenzen (senkrechte rosa Linien), ist der Graph der Annäherungsfunktion basierend auf dem Zerfallgesetz als schwarze Linie dargestellt. Die berechneten Lebensdauern sind in *Anhang Tabelle 2* (Messung Nr. 4) gelistet.

8.3.2. Werte der FLIM-Messungen

Anhang Tabelle 2 Aufgelistet sind die Resultate der FLIM-Messungen von (A) GFP-markierten, virulenten *A. tumefaciens* in Wasser, (B+C) transversalen Schnitten von *in vitro* Rebstocktumoren (B) ohne und (C) mit GFP-markierten *A. tumefaciens*. (Nr) steht für die Nummer der Messung und ist darüber eindeutig einer Bilderreihe in dieser Arbeit zuzuordnen. (ID) steht für die Identität der Messung während der Auswertung. (DpI) steht für "Days post Infection" und beschreibt die Inokulationszeit der *A. tumefaciens* in Tagen. Der Bereich (Be) ordnet der FLIM-Messung einen Bildausschnitt (Ra= Rand, Ne=Nekrose, Ge=Gefäß) zu. (LT1-3) stehen für die Lebensdauern (ns) und (I1-3) für die zugehörige Intensität. (H) beschreibt die Intensität des Hintergrunds und (X^2) die Abweichung der Annäherungskurve vom TCSPC-Diagramm. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Lebensdauern wurden ohne Ausreißer (in grau) berechnet

Nr	ID	DpI	Be	LT1	LT2	LT3	I1	I2	I3	H	X^2
A GFP-markierte <i>Agrobacterium</i> -Suspension											
1	92			2.45	1.10	0.44	2702	7422	13026	45	1.03
2	93			2.38	1.07	0.04	43943	21931	427	520	1.26
3	94			2.19	1.12	0.41	6983	9422	524	48	1.07
4	95			2.28	1.16	0.43	3726	8512	2174	454	0.93

Mittelwert: 2.32±0,11 1.11±0,04 0.43±0,02

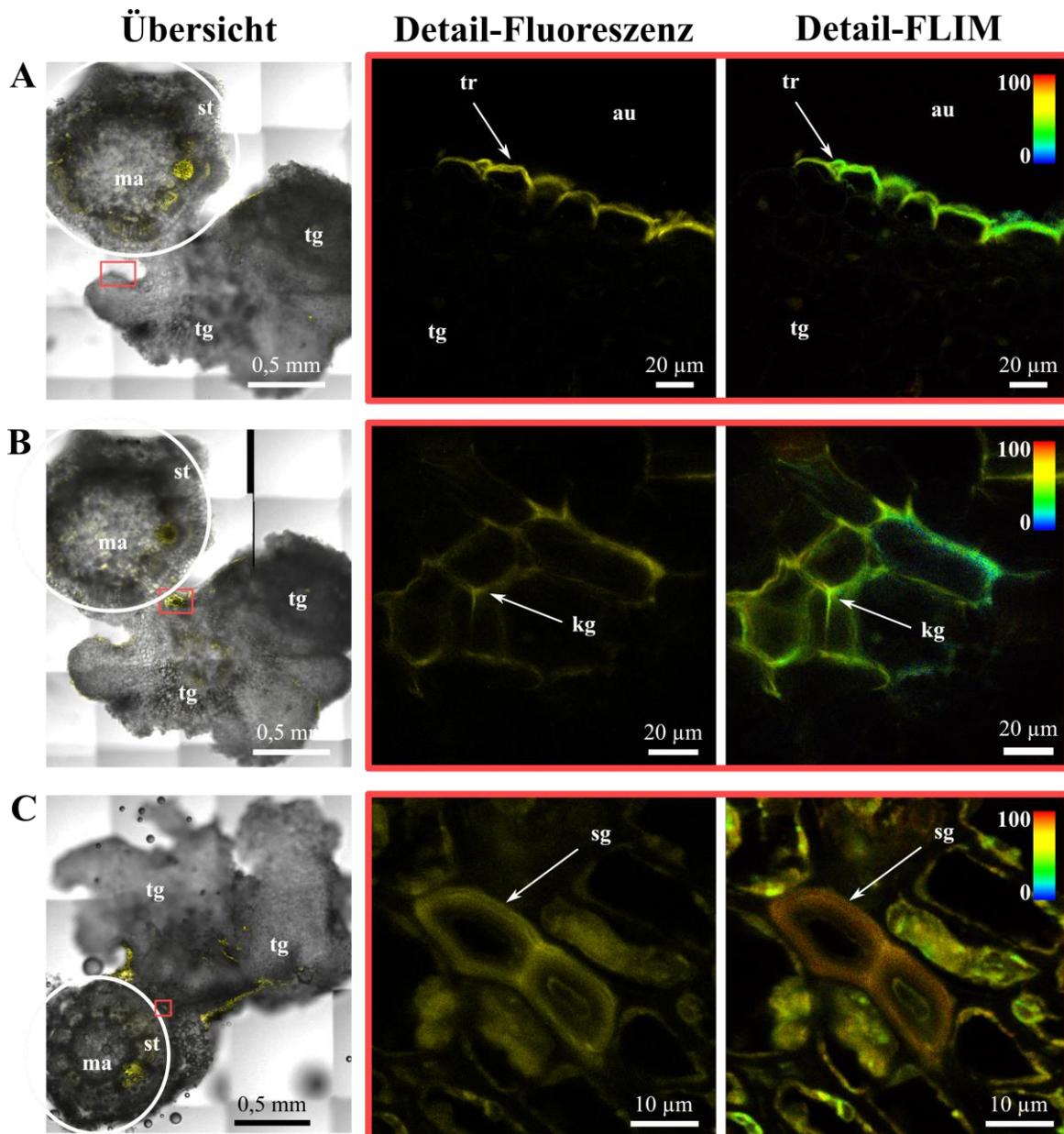
B Tumorprobe ohne markierte virulente <i>A. tumefaciens</i>											
5	75	41	Ra	2.3	0.61	0.16	34034	60097	52833	2634	2.28
6	77	41	Ra	2.3	0.76	0.22	14488	37466	39972	2260	1.30
7	90	41	Ne	2.3	0.69	0.17	12759	36863	57388	254	2.42
8	73	41	Ge	2.3	0.77	0.21	31465	79880	89066	2603	1.91
9	82	41	Ge	2.3	0.82	0.24	24326	49920	47348	511	1.58
10	89	41	Ge	2.3	0.72	0.21	75396	116192	91822	1042	4.06

Mittelwert: 0.73±0,07 0.20±0,03

C Tumorprobe mit markierten, virulenten <i>A. tumefaciens</i>											
11	10	50	Ra	2.3	0.87	0.24	29425	24585	41241	10895	3.13
12	12	50	Ra	2.3	1.04	0.23	80134	29234	24895	5578	1.49
13	40	17	Ra	2.3	0.72	0.06	68768	114272	63479	528	3.92
14	41	17	Ra	2.3	0.84	0.04	87442	69456	16955	301	2.79
15	63	24	Ra	2.3	0.76	0.21	9645	39131	63548	741	1.99
16	3	23	Ne	2.3	0.84	0.23	17704	65270	95050	2834	2.63
17	17	50	Ne	2.3	0.80	0.24	44489	78143	74745	25422	1.94
18	65	100	Ne	2.3	0.82	0.24	28929	110465	136033	583	2.08
19	69	100	Ne	2.3	0.80	0.22	22853	100608	142848	507	2.99
20	27	10	Ne	2.3	0.90	0.25	35702	66801	83302	2710	1.73
21	11	50	Ge	2.3	0.87	0.24	24171	39438	59933	5560	0.84
22	52	24	Ge	2.3	0.81	0.23	22147	73762	89814	679	2.31
23	57	24	Ge	2.3	0.80	0.22	29483	83404	178685	674	2.46
24	58	24	Ge	2.3	0.82	0.22	17613	30555	44328	494	1.53
25	20	10	Ge	2.3	0.77	0.22	56720	49992	52274	640	1.73

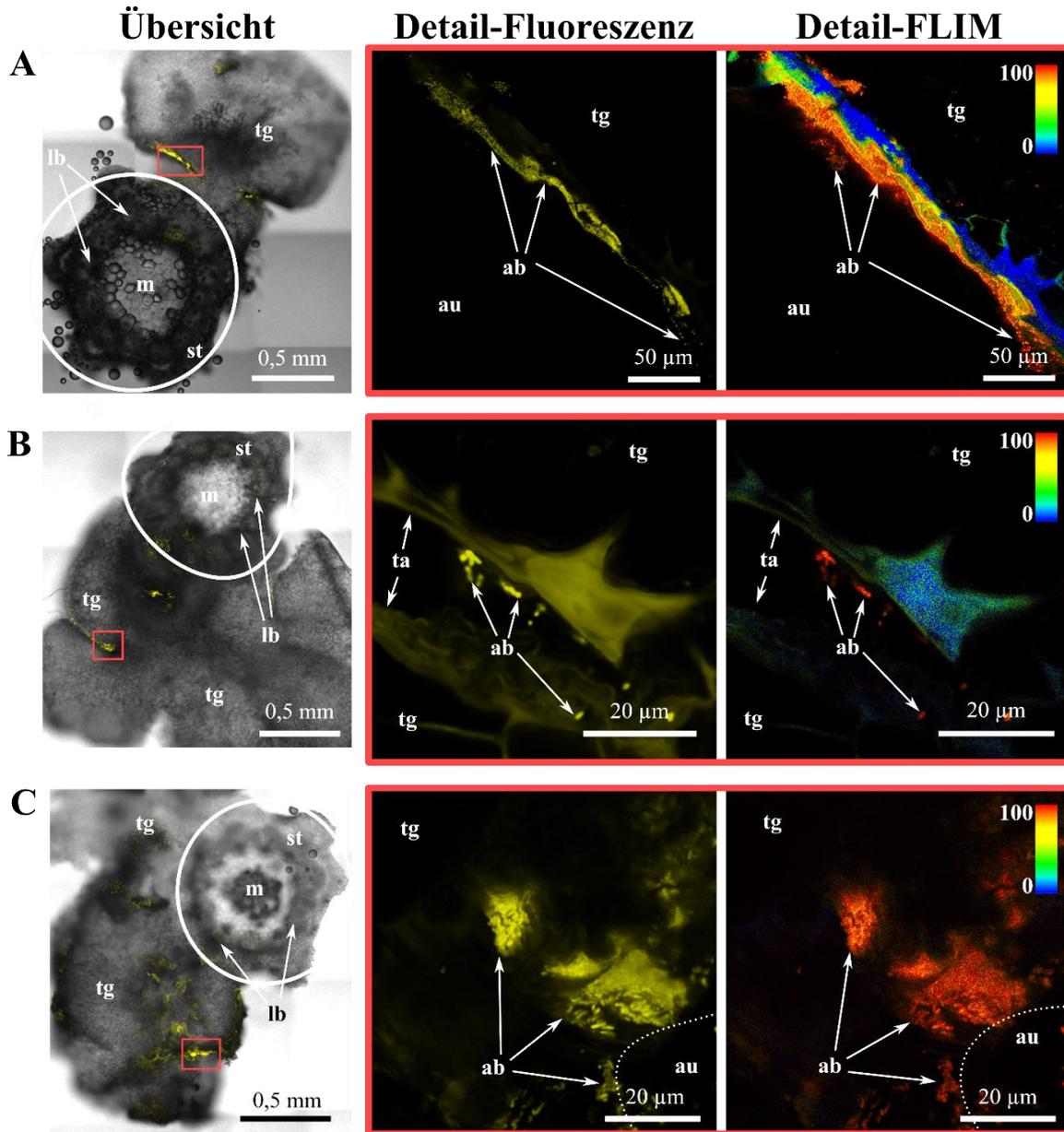
Mittelwert: 0.81±0,04 0.23±0,01

8.3.3. Tumorgewebe mit virulenten *A. tumefaciens* ohne GFP-Markierung

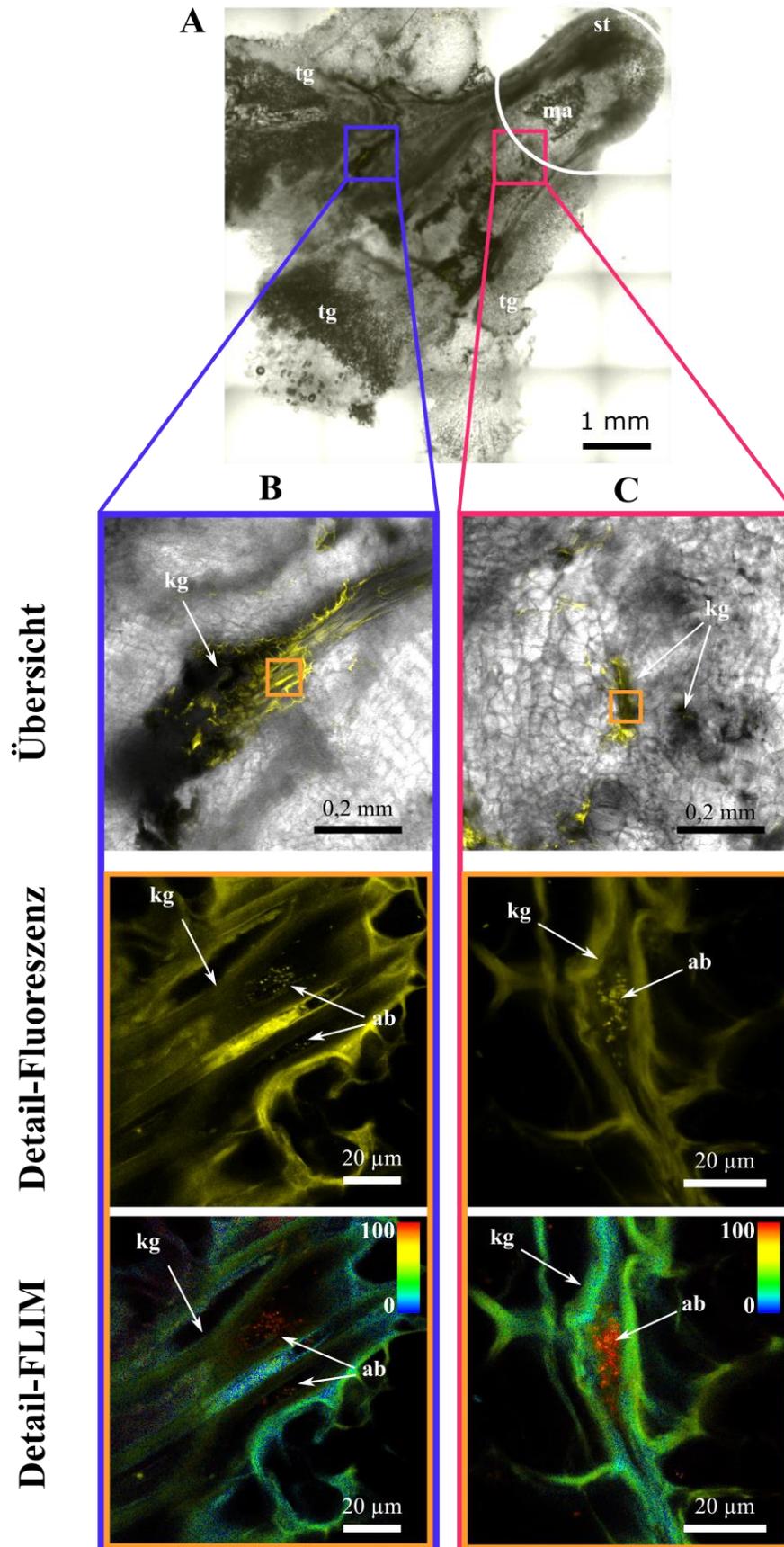


Anhang Abbildung 2 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, die mit einem nicht-GFP-markierten virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (*ab*) erzeugt wurden. A-C Transversale Querschnitte von Stängeln (*st*, eingekreist, Mark, *ma*) mit anhaftendem Tumorgewebe (*tg*). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 6 (**Anhang Tabelle 2B**). Der Tumorrand (*tr*) markiert die Grenze zwischen dem Tumorgewebe (*tg*) und dem Bereich außerhalb des Tumor- und Stängelgewebes (*au*). Bilderreihe (B), Messung Nr. 8, und (C), Messung Nr. 10, zeigen die Autofluoreszenz von kontrastreichen (*kg*) beziehungsweise sklerenchymatischen Gewebe (*sg*) im Tumor. Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme wurden überlagert und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und Detektion aller Photonen zwischen 505-565nm. Die Farbskala zeigt den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der gesamten Intensität eines Pixels

8.3.4. GFP-markierte, virulente *A. tumefaciens* am äußeren Bereich des Tumorgewebes

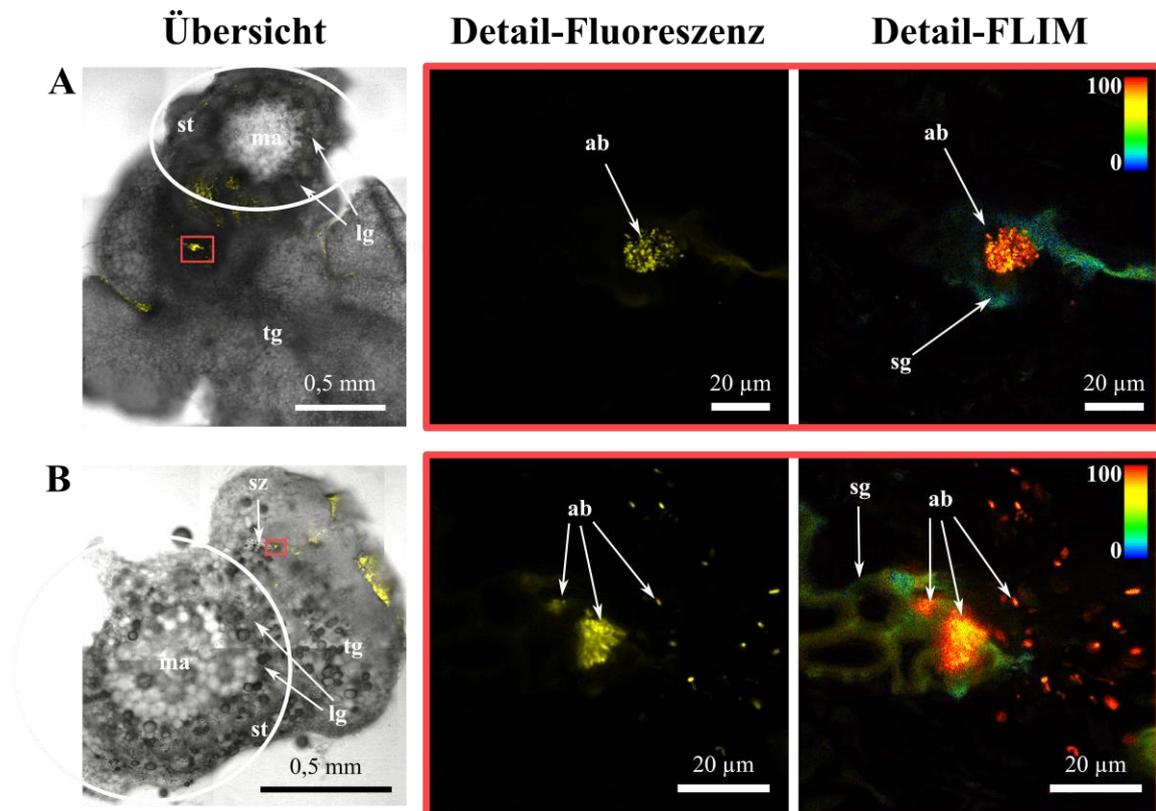


Anhang Abbildung 3 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben mit GFP-markierten, virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (*ab*) im äußeren Bereich (*au*). A-C Transversale Querschnitte von Stängeln (*st*, eingekreist, Mark, *ma*) mit anhaftendem Tumorgewebe (*tg*). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 13 (**Anhang Tabelle 2C**). In (B) Messung Nummer 15, ist *A. tumefaciens* in einer Art Tasche zu erkennen (*ta*). (C) stellt Messung Nr. 12 dar. Die Übersichtsbilder zeigen eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565 nm. Die Farbskala repräsentiert den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtintensität pro Pixel.

8.3.5. GFP-markierte, virulente *A. tumefaciens* in kontrastreichen Gewebe

Anhang Abbildung 4 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, mit GFP-markierten, virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (ab) in kontrastreichen Geweben (kg). (A) Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg). Bilderreihe (B) zeigt die FLIM-Messung Nr. 1 (**Anhang Tabelle 2C**), (C) Messung Nummer 18. Die Übersichtsbilder zeigen eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565 nm. Die Farbskala repräsentiert den prozentualen Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtintensität pro Pixel.

8.3.6. GFP-markierte, virulente *A. tumefaciens* in Leitgefäßen



Anhang Abbildung 5 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe mit GFP-markierten, virulenten *Agrobacterium tumefaciens* (ab) in oder assoziiert mit sklerenchymatischen Gewebe (sg). A-B Transversale Querschnitte von Stängeln (st, eingekreist, Mark, ma) mit anhaftendem Tumorgewebe (tg) mit *A. tumefaciens* (ab). Bilderreihe (A) zeigt die FLIM-Messung Nr. 24 (**Anhang Tabelle 2C**) und (B) Messung Nummer 25. Die Übersichtsbilder zeigen Überlagerungen von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen und der rote Rahmen markiert den Ausschnitt der Detailaufnahmen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit zwei Photonen von 920 nm und die Detektion aller Photonen zwischen 505-565nm. Die Farbskala repräsentiert den Anteil der GFP-Intensität an der Gesamtfluoreszenzintensität pro Pixel.

8.4. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Drei Rebstöcke in Weinbergen bei Himmelstadt t.....	6
Abbildung 2 Gewebeanordnung in Sprossquerschnitten von Rebstocktrieben.....	9
Abbildung 3 Gewebetypen beim Stamm von <i>Vitis vinifera</i> in der sekundären Wachstumsphase.....	11
Abbildung 4 Pfropfstellen von Rebstöcken mit und ohne Wurzelhalsgallen.....	41
Abbildung 5 Tumorassay mit Weinpflänzchen auf Agar.....	44
Abbildung 6 Anzahl an gemeinsamen orthologen Genen von <i>A. vitis</i> HF7, <i>A. sp</i> HF57, <i>A. sp</i> C58 und <i>A. vitis</i> S4.....	46
Abbildung 7 Contigs Nr. 14 und Nr. 27 des <i>A. vitis</i> HF7-Isolats im Vergleich mit dem Ti-Plasmid von <i>A. vitis</i> Tm4 (pTiTm4).....	47
Abbildung 8 Material für die Analyse der Bakterienflora bei Rebstöcken der Region Unterfranken.....	49
Abbildung 9 Die Probeentnahmestellen beeinflussten die Bakterienflora.....	52
Abbildung 10 Biodiversität der Bakterienflora.....	53
Abbildung 11 Taxonomische Zusammensetzung der Bakterienflora im Weinberg.....	55
Abbildung 12 Einfluss der Jahreszeiten auf die Bakterienflora.....	57
Abbildung 13 Einfluss der Wurzelhalsgallenerkrankung auf die Bakterienflora.....	59
Abbildung 14 Biodiversität und taxonomische Einheiten (OTU) in den Pfropfstellen der Rebstöcke mit und ohne Wurzelhalsgallentumor.....	62
Abbildung 15 Ko-Kultivierung von Isolat 42 und Isolat 48.....	65
Abbildung 16 Schema vom Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rolle der Tumorbakterienflora beim Wachstum eines Wurzelhalsgallentumors.....	66
Abbildung 17 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, die mit einem nicht-GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> erzeugt wurden.....	69
Abbildung 18 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben mit GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ab) im äußeren Bereich.....	71
Abbildung 19 FLIM-Untersuchungen von Tumorgeweben, mit GFP-markierten, virulenten <i>A. tumefaciens</i> in kontrastreichen Geweben.....	72

Abbildung 20 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe mit GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in oder assoziiert mit Leitgewebe.....	73
Abbildung 21 <i>A. vitis</i> erzeugt eine Wurzelhalsgalle am Rebstock, eine neue ökologische Nische.	93
Anhang Abbildung 1 „Time correlated single photon counting“ TCSPC-Diagramm	131
Anhang Abbildung 2 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe, die mit einem nicht-GFP-markierten virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> erzeugt wurden.	133
Anhang Abbildung 3 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe mit GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> im äußeren Bereich.....	134
Anhang Abbildung 4 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe, mit GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in kontrastreichen Gewebe.....	136
Anhang Abbildung 5 FLIM-Untersuchungen von Tumorgewebe mit GFP-markierten, virulenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in oder assoziiert mit sklerenchymatischen Gewebe.....	137

8.5. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
A	Adenin
A.	<i>Agrobacterium</i>
A. sp HF57	<i>Agrobacterium</i> -Spezies-Isolat Nummer HF57
A. vitis HF7	<i>Agrobacterium vitis</i> -Isolat Nummer HF7
Ab	<i>agrobacterium</i>
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
AHL	<i>N-acyl-L-Homoserinlacton</i>
AiiB	<i>N-acyl-Homoserinelactonase (autoinducer inactivator B)</i>
ANI	<i>average sequence identity</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of variance</i>)
AttM	<i>N-acyl-Homoserinelactonase (attachment protein M)</i>
BLAST	<i>basis local alignment search tool</i>
Bo	Boden
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CA	Kalifornien
CHX	Cycloheximid
CPM	Anzahl pro Millionen (<i>counts per million</i>)
d	Tage (days)
DMDA	Dimethyl Disulfide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dpi	Tage nach der Infektion (<i>days post infection</i>)
E	Epidermis
<i>E. toletana</i>	<i>Erwinia toletana</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
F	Freiheitsgrad
FC	<i>fold change</i>
FDR	angepasster p-Wert (<i>false discovery rate</i>)
FLIM	Fluoreszenz Lebensdauer Mikroskopie (<i>fluorescents lifetime imaging microscopy</i>)
Fr	Frühling
g	Maß der Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GLM	allgemeines lineares Model (<i>general linear model</i>)

H	Adenin oder Cytosin oder Thymin
h	Stunden (<i>hours</i>)
He	Herbst
HSL	Homoserinlaktat
<i>iaaH</i>	Indole-3-acetamide-Hydrolase-Gen
<i>iaaM</i>	Tryptophanmonooxygenase-Gen
<i>ipt</i>	Isopentyl-Transferase-Gen
K	Kambium
kg	kontrastreiches Gewebe
km	Kilometer
KO	Kortex
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
M	Molar
m	Meter
M	Adenin oder Cytosin
ma	Mark
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
N	Nekrosen
nFk	nutzbare Feldkapazität
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NMDS	Nicht metrische multidimensionale Skalierung (<i>Non-metric multidimensional scaling</i>)
<i>nos</i>	Nopal-Synthase-Gen (<i>nopal synthase</i>)
Nr.	Nummer
ns	Nanosekunde
<i>occ</i>	Octopin-Katabolismus-Gen (<i>octopin catabolism</i>)
<i>ocd</i>	Ornithine-Zyklodeaminase-Gen (<i>ornithine-cyclodeaminase</i>)
<i>ocs</i>	Octopin-Synthase-Gen (<i>octopin synthase</i>)
OD	Optische Dichte
OOB	Fehlerrate (<i>out of bag</i>)
OTU	operative taxonomische Einheit (<i>operational taxonomic unit</i>)
P	Phloem
<i>P. savastanoi</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pf	Pfropfstelle

PF	Phloemfasern
Pfl	Pflanze
pH	<i>potential of hydrogen</i>
Q20	Fehlerrate: 1 von 100 (<i>quality score 20</i>)
R	Adenin oder Guanin
R ²	Determinationskoeffizient, Bestimmtheitsmaß
RDP	<i>ribosomal database project</i>
<i>recA</i>	Rekombinations-Gen A (<i>recombination A</i>)
RF	Random Forest
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Cytosin oder Guanin
SA	Salicylsäure
SäP	Stärkeparenchym
sg	sklerenchymatisches Gewebe
So	Sommer
sp.	Spezies, Singular
spp.	Spezies, Plural
SrP	Strahlenparenchym
st	Stängel
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCSPC	Anzahl an einzelnen Photonen in Abhängigkeit von der Zeit (<i>time correlated singel photon counting</i>)
T-DNA	Transfer-DNA
tg	Tumorgewebe
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
tmr	<i>tumour morphology stem</i>
tms	<i>tumour morphology root</i>
Tr	Trieb
<i>traI</i>	Transfer-Gen I
TraM	Transfer-Protein M
<i>traR</i>	Transfer-Gen-R
TZ	Tumorzellen
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
V	Adenin oder Cytosin oder Guanin
V	Volt
V4	varibale Region Nummer 4
Vir-Gen	Virulenzgen
vol/vol	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	Adenin oder Thymin
WHG	Wurzelhalsgalle
wt/vol	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Wu	Wurzel
X	Xylem
XG	Xylemgefäß
YEB-Medium	<i>yeast extract broth medium</i>

Lebenslauf

Hanna Faist

Geburtsdatum: 13.02.1988
 Geburtsort: Würzburg
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

- Ab 01/2013 **Promotion**
 Universität Würzburg, **Mikrobiologie** und **Pflanzenphysiologie**,
 Universitäts-Förderpreis der Mainfränkischen Wirtschaft,
 Thesis: „Infektionsökologie der Mauke Erkrankung an Weinreben“
- Graduiertenkolleg 1342, „*Lipid signalling*“
 - Graduate School of Life Sciences, Integrative Biology
- Kurse:
- | | |
|---|--|
| - „ <i>Academic Writing</i> “ | - „ <i>Intercultural Communication</i> “ |
| - „ <i>Patent Law in Life Science</i> “ | - Führung von Mitarbeitenden |
| - „ <i>Good Scientific Practice</i> “ | - Rederhetorik und Meinungsbildung |
- 03/2011 - 12/2012 **Master of Science** (Note: 1,6)
 Universität Würzburg, **Funktionelle Genanalyse** und **Fett-Metabolomics**.
 Thesis: Funktionelle Charakterisierung der putativen S-ACP-Desaturase SAD6 aus *Arabidopsis thaliana*
- 10/2007-08/2010 **Bachelor of Science** (Note: 1,8)
 Universität Würzburg, **Proteinbiochemie**.
 Thesis: Untersuchungen zur Interaktion und Phosphorylierung der Rezeptorkinase BAK1 mit weiteren Rezeptorkinasen
- 05/2000 – 06/2007 **Allgemeine Hochschulreife** (Note: 2,2)
 Gymnasium Marktbreit, naturwissenschaftlich technischer Zweig:
- Schüleraustausch Mai-Juli 2005: Kolumbien, Colégio Aleman, Barranquilla
- 09/1998-04/2000 Franz-Ludwig Gymnasium Bamberg

Lehre

- 11/2012-02/2017 **Betreuung** von zehn Bachelor-, Master Studenten und einem Doktoranten in **individuellen Laborpraktika** aus Deutschland, Indien, Griechenland und Iran
- Entwicklung von Teilprojekten
 - Schriftliche und mündliche Einweisungen
 - Feedback zu schriftlichen und mündlichen Aufgaben
- 04/2011-09/2011 **Dozentin**, Seminar „Bionik“
- Einladung von Gastrednern
 - Organisation von Exkursionen
 - Themenstellung und Bewertung der Referate von Bachelorstudenten
- 10/2008-10/2010 Studentische Hilfskraft, Rudolf-Virchow-Zentrum: DFG-Forschungszentrum für experimentelle Biomedizin
- **Betreuung von Schülergruppen** im Labor
 - Leitung von Diskussionen
 - Repräsentation des Rudolf-Virchow-Zentrums auf Messen

Förderung

- 2015 **Dow AgroSciences**, Stipendium zur Reise in die USA, Indianapolis zur „*Crown gall*“ Konferenz
- 2015 **Graduate School of Life Sciences**, Reise-Stipendium

Konferenzen

H. Faist, A. Keller, U. Hentschel, R. Deeken, BACTERIAL DIVERSITY OF GRAPEVINE CROWN GALL DISEASE. Talk. 15-16 November 2015, Crown Gall Conference, Indianapolis, USA

H. Faist, A. Keller, U. Hentschel, R. Deeken, BACTERIAL DIVERSITY OF GRAPEVINE CROWN GALL DISEASE. Poster. 14-15 Oktober 2015, International Symposium EUREKA!, Würzburg, Germany

H. Faist, A. Keller, U. Hentschel, R. Deeken, THE ECOLOGY AND INFECTION PROCESS OF AGROBACTERIUM VITIS IN GRAPEVINE PLANTS. Poster. 19-20 July 2015, Phyllosphere Microbiology, Ascona, Switzerland

H. Faist, A. Keller, U. Hentschel, R. Deeken, INVESTIGATIONS ON THE INFECTION PROCESS AND DIAGNOSIS OF A.SPP IN GRAPVINE CROWN GALL DISEASE. Poster. July 2014. International Symposium-Molecular Plant Microbe Interaction, Rhodes, Greece

Berufseinblicke

- 01/2011-03/2011 Bodengesundheitsdienst, Südzucker AG
- Experimentelle Probenahme und Probenbearbeitung für einen Doktoranten
 - Schreiben von Versuchsanleitungen
- 10/2010-12/2010 Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Referat: Neue Technologien, Thema: Gentechnik
- Beratung der Bundesregierung zu gentechnisch veränderten Lachs.
 - Unterstützung bei der Bewertung von Zulassungsanträgen für GMOs.
 - Teilnahme an internationalen Ausschüssen (Brüssel).

Ehrenamtliche Tätigkeiten

- 07/2015-12/2015 Studentensprecher des Graduiertenkollegs 1342 „*Lipid signalling*“
- Organisation des Sommersymposiums des Julius von Sachs Instituts
 - Organisation des dreitägigen Retreats des Graduiertenkollegs
- Seit 2007 Vereinsarbeit im Turnverein Ochsenfurt, Abteilung Badminton
- Mannschaftsführer, 1. Mannschaft Bayernliga
 - Schiedsrichterin, bis zur 2. Bundeliga
 - Organisation der offenen Stadtmeisterschaften

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache	Französisch	Gut
Englisch	Verhandlungssicher	Spanisch, Türkisch	Grundkenntnisse

Work-Life-Balance

Beim **Badminton spielen** kann ich mich körperlich verausgaben.

Über **Online- und Printmedien** informiere ich mich über gesellschaftliche und politische Themen.

Fotografieren erlaubt überraschende Details und Erinnerungen einzufangen.

Bei **Reisen** lerne ich viel über andere Kulturen.

Würzburg

Ort, Datum

Unterschrift

Publikationen

H. Faist, A. Keller, U. Hentschel, R. Deeken, 2016. CROWN GALLS OF GRAPEVINE (VITIS VINIFERA) HOST DISTINCT MICROBIOTA. Applied and Environmental Biology doi:10.1128/AEM.01131-16

J. Klinkenberg, H. Faist, S. Saupe, S. Lambertz, M. Kriscke, N. Stingl, A. Fekete, MJ Mueller, I. Feussner, R. Hedrich, R. Deeken, 2014. TWO FATTY ACID DESATURASES, STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN DELTA9-DESATURASE 6 AND FATTY ACID DESATURASE 3, ARE INVOLVED IN DROUGHT AND HYPOXIA STRESS SIGNALING IN ARABIDOPSIS CROWN GALLS. Plant Physiology 164:570-583

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinen drei Betreuern bedanken: Dr. Rosalia Deeken, Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida und Dr. Alexander Keller. Ihr wart ein wunderbares Betreuer-team! Danke für die interessante Fragestellung inklusive Kooperationen mit der Industrie und der Freiheit eigene Ideen zu verfolgen. Für den Labor- und Arbeitsplatz in einem angesehenen Institut danke ich Prof. Dr. Rainer Hedrich, der diese Arbeit auch finanziell unterstützt hat. Mein Dank gilt den Kooperationspartnern der bayrischen Landesanstalt für Garten- und Weinbau in Veitshöchheim und der Rebschule Steinmann, mit Petra Steinmann, in Sommerhausen. Herr Peter Schwappach unterstützte die Probeentnahme im Weinberg und Dr. Gabriele Brendel die Kultivierung von *in vitro* Weinpflänzchen für die Versuche. Beide Kooperationspartner vermittelten uns die Probleme und Erkenntnisse der Anwender. Mit Freude erinnere ich mich an unsere konstruktiven Diskussionsrunden und Zwischenberichte zurück, die zum Entstehen dieser Arbeit geführt haben.

Meine Erstbetreuerin Rosalia Deeken, Expertin im Gebiet der Pflanzenphysiologie, hatte sicher am meisten Arbeit (oder Vergnügen) mit mir. Von ihr lernte ich, dass Vorträge und Publikationen bis ins Detail durchdacht sein müssen, um verständlich zu sein. Sie ermöglichte mir einen Vortrag bei der „*Crown gall*“-Konferenz in Indianapolis, den wir mit einem gemeinsamen, wissenschaftlich geprägten Kurzurlaub verbanden. Rosi, ich danke Dir für die schöne Zeit. Zusammen haben wir mindestens zehn Studenten in individuellen Projekten betreut, die alle einen Teil zu dieser Arbeit beitrugen. Hervorheben möchte ich Lisa Walther, die mich in ihrer Bachelor- und Masterarbeit tatkräftig im Labor unterstützte.

Meine Zweitbetreuerin, Ute Henschel, Expertin der Mikrobiologie, dachte auch an eine Zeit nach der Doktorarbeit und ermutigte mich, der „*Graduate School of Life Sciences*“ beizutreten und an verschiedenen Konferenzen teilzunehmen. Trotz eines Ortswechsels und neuer Aufgaben unterstützen Sie mich tatkräftig bei der Publikation und hat bei Zukunfts- und Karrierefragen immer einen guten Rat. Mein Dank gilt auch ihrer Arbeitsgruppe mit Hannes Horn.

Mein Drittbetreuer, Alexander Keller, Experte in Hochdurchsatzsequenzierungen und Biodiversität, verstärkte mein bioinformatisches Interesse indem er sich Zeit nahm sein Wissen zu vermitteln. Er gab mir die Möglichkeit viele Schritte selbst durchzuführen. Gleichzeitig konnte ich immer auf seine Unterstützung und die seines Teams mit Markus Ankenbrand und Wiebke Sickel zählen. Er wird mir als moderner Wissenschaftler mit Rückgrat in Erinnerung bleiben, von denen es mehr geben sollte.

Last but not least, möchte ich mich bei meinen Kollegen des Julis-von-Sachs-Instituts, Freunden und Familie bedanken. Aufmunternde Worte, Lektortätigkeiten, Ruhepole, Belohnungs-Limonaden, freundliches Triesen, gemeinsames Lachen oder Spaß beim Badminton und Basketballspielen trugen einen entscheidenden Teil zu dieser Arbeit bei und das weiß ich sehr zu schätzen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Bedeutung und Charakterisierung der bakteriellen Flora in *Vitis vinifera* mit und ohne Wurzelhalsgallen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Significance and Characterization of the bacterial community in *Vitis vinifera* with and without crown galls“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor similar form.

Würzburg,

Place, Date

Signature

